



## Fotoativação de Eritrosina B em Fluidos Corporais Simulados

Acadêmico: Eduardo Victor Bergmann

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne

---

1 de dezembro de 2021



## Fotoativação de Eritrosina B em Fluidos Corporais Simulados

Dissertação ao Departamento de Física da  
Universidade Estadual de Maringá, sob  
orientação do professor Dr. Luis Carlos  
Malacarne, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Física

Acadêmico: Eduardo Victor Bergmann

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne

---

1 de dezembro de 2021

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

B499f

Bergmann, Eduardo Victor

Fotoativação de eritrosina B em fluidos corporais simulados / Eduardo Victor Bergmann. -- Maringá, PR, 2021.  
94 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2021.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Lente térmica. 3. Eritrosina. 4. Fotobranqueamento. I. Malacarne, Luis Carlos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 23.ed. 530.4

# Sumário

Agradecimentos	iv
Resumo	vii
Abstract	viii
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Breve história da TFD	3
1.2 Mecanismos de ação	10
1.2.1 Fotossensibilizadores	10
1.2.2 Oxigênio Singlete	14
1.2.3 Luz	15
1.3 Breve história da Lente Térmica	16
1.4 Objetivos	19
<b>2 Materiais e métodos</b>	<b>21</b>
2.1 Espectrofotômetro UV/VIS	23
2.2 Espectrofluorímetro	26
2.3 Tempo de Vida do Estado Tripleto	26
2.4 Lente Térmica	27
<b>3 Resultados</b>	<b>29</b>
3.1 Fotoativação da Eritrosina em Fluidos Biológicos Simulados	29
3.1.1 Cinética de Fotoativação da Eritrosina	30
3.1.2 Tempo de Vida do Estado Tripleto	36
3.1.3 Lente Térmica	37
3.2 Fotoativação do Azul de Metileno em Fluidos Biológicos Simulados	41
3.2.1 Cinética de Fotoativação do Azul de Metileno	41
<b>Conclusões</b>	<b>49</b>
<b>A Modelo teórico da técnica de Lente Térmica</b>	<b>50</b>
A.1 Modelo sem Fotorreação	50
A.1.1 Transformada de Laplace	54
A.1.2 Transformada de Hankel	55
A.1.3 Transformada de Fourier Cosseno	55
A.1.4 Inversa de Laplace	56
A.1.5 Transformada Inversa de Hankel	56
A.1.6 Inversa de Fourier Cosseno	56

A.2	Modelo de Lente Térmica para Amostras Fotossensíveis . . . . .	58
A.2.1	Temperatura no Espaço Hankel-Fourier-Laplace . . . . .	60
A.2.2	Perfil de Temperatura . . . . .	60
A.2.3	Fase e Intensidade . . . . .	61
<b>B</b>	<b>Ajustes dos dados</b>	<b>62</b>
<b>C</b>	<b>Trabalho publicado</b>	<b>66</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>74</b>

**O que há em mim é sobretudo cansaço —**

O que há em mim é sobretudo cansaço —  
Não disto nem daquilo,  
Nem sequer de tudo ou de nada:  
Cansaço assim mesmo, ele mesmo,  
Cansaço.

A subtileza das sensações inúteis,  
As paixões violentas por coisa nenhuma,  
Os amores intensos por o suposto em alguém,  
Essas coisas todas —  
Essas e o que falta nelas eternamente —;  
Tudo isso faz um cansaço,  
Este cansaço,  
Cansaço.

Há sem dúvida quem ame o infinito,  
Há sem dúvida quem deseje o impossível,  
Há sem dúvida quem não queira nada —  
Três tipos de idealistas, e eu nenhum deles:  
Porque eu amo infinitamente o finito,  
Porque eu desejo impossivelmente o possível,  
Porque quero tudo, ou um pouco mais, se puder ser,  
Ou até se não puder ser...

E o resultado?  
Para eles a vida vivida ou sonhada,  
Para eles o sonho sonhado ou vivido,  
Para eles a média entre tudo e nada, isto é, isto...  
Para mim só um grande, um profundo,  
E, ah com que felicidade infecundo, cansaço,  
Um supremíssimo cansaço,  
Íssimo, íssimo, íssimo,  
Cansaço...

---

Álvaro de Campos/ Fernando Pessoa, 1888-1935

# Agradecimentos

Antes de entrar na universidade, eu pensava, e me diziam, que ela me daria conhecimento. Nesses quase seis anos ganhei muito mais do que isso. Ela me deu momentos, amigos, histórias. Grande parte disso tudo ajudou na construção deste trabalho.

Agradeço à Capes, ao CNPq e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Agradeço ao meu amigo Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luis Carlos Malacarne por sua paciência, orientação e preocupação comigo.

Agradeço a todos os companheiros do GEFF que me ajudaram nas dificuldades do laboratório, em especial ao Gabriel, Vitor e Ângelo.

Agradeço aos meus amigos do Departamento de Química por toda a ajuda fornecida, em especial à Camila.

Agradeço à minha família, que fez e faz de tudo no apoio aos meus estudos.

Agradeço ao meu pai Leonir, à minha mãe Marlise e à minha irmã Ana.

Agradeço ao meu amigo Giovani pela ajuda com o português e pela ajuda com a vida.

Agradeço aos meus amigos da conhecida "Salinha", pelas risadas essenciais para poder passar pela Pós-Graduação.

Agradeço aos meus amigos da graduação, mas que serão levados comigo pela vida toda, em especial ao Gustavo, ao Vinicius, ao Matheus, e à Mariana. "Nem demais e nem de menos. Nem tão longe e nem tão perto. Na medida mais precisa que eu puder. Mas amar-te sem medida e ficar na tua vida, da maneira mais discreta que eu souber. Sem tirar-te a liberdade, sem jamais te sufocar. Sem forçar tua vontade. Sem falar, quando for hora de calar. E sem calar, quando for hora de falar. Nem ausente, nem presente por demais. Simplesmente, calmamente, ser-te paz."

"Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta. Não quero só o ombro ou o colo, quero também sua maior alegria. Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto. Meus amigos são todos assim: metade loucura, metade seriedade. Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos. Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos, nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice. Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto, e velhos, para que nunca tenham

pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou, pois vendo-os loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que a normalidade é uma ilusão imbecil e estéril."

E, por último, agradeço a Deus por colocar estas pessoas em meu caminho.



Jesus compreendeu que viera trazido ao engano como se leva o cordeiro ao sacrifício, que a sua vida fora traçada para morrer assim desde o princípio dos princípios, e, subindo-lhe à lembrança o rio de sangue e de sofrimento que do seu lado irá nascer e alagar toda a terra, clamou para o céu aberto onde Deus sorria, Homens perdoai-lhe porque ele não sabe o que fez.

---

O Evangelho segundo Jesus Cristo/ José Saramago, 1922-2010

# Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método de tratamento alternativo poderoso contra doenças, especialmente as cancerosas, e também como agente antimicrobiano. Porém, como é um tratamento relativamente recente, é necessária a construção de um protocolo rigoroso para a sua aplicação. Uma das dificuldades é considerar as diferenças de desempenho da TFD observadas entre as aplicações *in vitro* e *in vivo*. Neste sentido, para contornar parcialmente este problema, os fluidos corporais simulados nos dão geralmente uma compreensão prévia das particularidades dos diferentes sistemas. No entanto, estes estudos ainda são escassos na TFD. Sendo assim, neste trabalho, investigamos a fotoativação da Eritrosina, um fotossensibilizador amplamente utilizado na TFD, em diferentes fluidos corporais simulados. Diferentes técnicas ópticas foram utilizadas para a investigação; dentre elas, a espectrofotometria UV-Vis, espectrofluorimetria, transmitância dependente do tempo e lente térmica. A lente térmica é uma técnica que recentemente tem sido utilizada com sucesso na investigação de propriedades de fotossensibilizadores aplicados na TFD. Diferenças na cinética de fotodegradação, tempo de vida do estado tripleto e geração de oxigênio singleto foram observadas entre os fluidos utilizados. Os resultados podem ajudar a explicar e definir os protocolos de aplicação da TFD. O estudo também foi expandido para o Azul de Metileno, outro fotossensibilizador bem conhecido na TFD.

**Palavras-chave:** Eritrosina, Fotobranqueamento, Tempo de vida, Lente Térmica, Terapia Fotodinâmica.

# Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) is a powerful alternative treatment method against diseases, especially cancerous ones, and also as an antimicrobial agent. However, since it has been developed quite recently, it is necessary to build a rigorous protocol in order to apply it. One of the difficulties that arise is the performance differences observed between *in vitro* and *in vivo* applications. In this sense, aiming to partially overcome this issue, simulated body fluids can generally provide notions of the particularities of these different systems in advance. Yet, such studies are still scarce in PDT. Hence, this work aims to investigate the photoactivation of Erythrosine – a widely used photosensitizer in PDT – in different simulated body fluids. Different optical techniques were used for the investigation. Among them, spectrophotometry UV-Vis, spectrofluorimetry, time-dependent transmittance, and thermal lens. The Thermal lens is a new technique that helps in the investigation of PDT and has been showing good results. Differences in photodegradation kinetics, triplet lifetime, and singlet oxygen generation were observed among the fluids that were used. The results may help to explain and define the protocols for the application of PDT. The study was also expanded to Methylene Blue, another well-known photosensitizer in PDT.

**Keywords:** Erythrosine, Photobleaching, Triplet lifetime, Thermal lens, Photodynamic therapy.

# Capítulo 1

## Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método clínico que se baseia na fotoativação de um fármaco fotossensibilizador (FS) por radiação (com comprimento de onda coerente com seu espectro de absorção eletrônica) na presença de oxigênio ( $^3O_2$ ) [1–3]. A interação entre os três acarreta na geração de espécies citotóxicas, como o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), e de outras espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são responsáveis pela morte celular. Na medicina, este efeito já é bem conhecido e vem sendo utilizado como uma alternativa para a destruição seletiva de tecidos, auxiliando, assim, no tratamento de várias doenças, como diabetes, hiperplasia prostática benigna, degeneração macular da retina, Liquen escleroatrófico, onicomicose, leishmaniose cutânea, doenças infecciosas, herpes, e especialmente no tratamento de doenças cancerígenas e tumores. [4–14]

Denomina-se genericamente como “câncer” qualquer forma de tumor maligno. Um tumor pode ser entendido como um crescimento anormal do tecido celular, também sendo chamado de “neoplasma” ou “blastoma”. Quando as células passam a exibir distúrbios em seu genoma, elas se reproduzem a uma velocidade maior do que a observada na divisão de células normais. Tal proliferação gera, assim, um tumor benigno ou maligno. No caso do tumor benigno, as células têm um ritmo lento de crescimento, similar ao do tecido normal, e há boas chances de recuperação do paciente por procedimentos cirúrgicos. Já no caso dos tumores malignos, a proliferação de células doentes é muito rápida e desordenada, podendo ameaçar a integridade e funcionamento dos demais órgãos. De modo geral, as formas mais comuns de câncer são os de pele, mama feminina, próstata, pulmão e estômago (estes últimos quatro, aliás, costumam ser letais com o câncer colorretal sendo o terceiro tipo que mais atinge homens e mulheres.) [15].

É comum que células cancerosas de certos tipos passem de uma parte do corpo para a outra por meio do sangue ou dos vasos linfáticos (isto é, metástases), na qual começará o crescimento dos tecidos. Nesse sentido, se uma célula de câncer de mama fosse transferida para o fígado de um paciente, esta ainda seria considerada como câncer de mama, e não do órgão para o qual se alastrou. Dito isso, vale destacar que o desenvolvimento de células cancerosas acontece por conta de células normais com DNA danificado. Por mais que o corpo humano consiga reparar o DNA defeituoso na maior parte dos casos, isso não ocorre com o câncer, o qual pode se originar tanto de fatores hereditários (mutações genéticas herdadas) como pela exposição a agentes danosos (por exemplo, o cigarro e a luz solar) [16].

Em decorrência dos graves efeitos colaterais sentidos em métodos de tratamento convencionais, os quais também demonstram ter limitações em sua eficiência (como a quimioterapia, radioterapia e cirurgias), diversas alternativas têm sido propostas no intuito de

contornar estes problemas [17]. A TFD, apesar de recente, é uma das alternativas que se destacam nesse ramo. Além de poder ser empregada no combate a esta doença, a TFD também encontra aplicações no tratamentdo da degeneração macular da retina, restenosis, psoríase, arteriosclerose, artrite reumatóide sistêmica, micoses, verrugas, AIDS, entre outros [18, 19]. Inclusive, o próprio fato de que a TFD já é estudada e utilizada em uma escala mundial para tratar tais doenças, assim como outras de origem relacionada, atesta a sua pertinência e potencial de viabilidade [20–22].

Além do uso da TFD na oncologia, o uso dela como uma modalidade terapêutica alternativa para o tratamento de infecções microbianas tem mostrado resultados satisfatórios. Particularmente, quando direcionada para o tratamento de microrganismos, a TFD é denominada como “Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA)”, e pode ser usada para controlar doenças causadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus. [23]

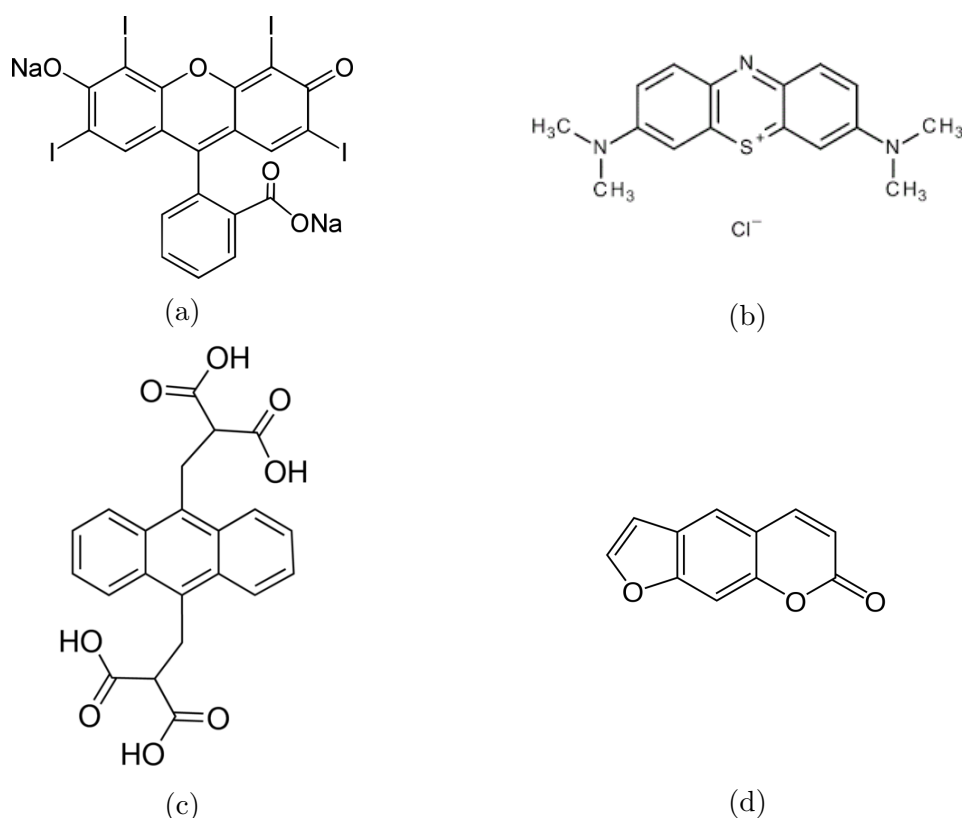


Figura 1.1: a) Molécula de Eritrosina. b) Molécula de Azul de Metileno. c) Molécula de ABDA. d) Molécula de Psoraleno.

A partir da década de 1930, o uso inicial e conjunto de medicamentos antimicrobianos e vacinas surtiu excelentes resultados em seus tratamentos, a ponto de ter revolucionado a medicina e dado aos estudiosos a impressão de que seria possível alcançar um grande controle e até, talvez, erradicar as doenças infecciosas. No entanto, essas aspirações demonstraram estar longe da realidade: ainda hoje, as infecções estão entre as maiores causas de morte no mundo, afinal, os microrganismos patogênicos permeiam toda a natureza, o que significa um risco constante por conta das várias fontes de infecção em potencial. Além disso, a inadequação e falta de eficácia observada em tratamentos com antibióticos e antivirais contribui para um aumento da própria resistência microbiana contra tais medicações. Nesse cenário, a cada ano, a problemática dos microrganismos resistentes à múltiplas drogas (do inglês, “multidrug-resistant”, MDR) aumenta e com ela os custos

econômicos com tratamentos, assistência médica e investimentos na área da saúde. Como apontam Hamblin e Hassan, tal dilema pode vir a encerrar o período chamado de “era do antibiótico”, o qual compreende o último meio século [24].

O quadro de urgência na busca de alternativas aos antibióticos favorece a busca por novos tratamentos que contornem este problema. Nesse sentido, a terapia fotodinâmica apresenta as seguintes vantagens sobre o tratamento com antibióticos: capacidade de eliminar bactérias, boa seletividade de microrganismos, baixa toxicidade quando no escuro, inativação rápida de microrganismos, e o não desenvolvimento de resistência a fotossensibilizadores (FS). O que dita a eficácia da terapia fotodinâmica para o combate a diferentes tipos de microrganismo é o tipo de FS, a sua concentração e a especificidade tratada (bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, vírus, etc). Por sua vez, as características físico-químicas do corante fotossensível, a saber, solubilidade em água, solubilidade em lipídios, constante de ionização, absorção de luz, eficiência de formação do estado triplete excitado e a produção do oxigênio singleto, são essenciais para a interação entre microrganismos e o FS [25–30].

## 1.1 Breve história da TFD

As primeiras evidências do uso da fototerapia pela humanidade podem ser atribuídas a civilizações antigas como a Grécia, o Egito e a Índia. Na antiguidade, ela já era empregada por meio do uso de plantas contendo fotossensibilizantes psoralenos (Figura 1.1d). Porém, há 3.000 anos, entre os gregos acreditava-se que somente o uso da luz como um agente terapêutico, ou “helioterapia”, poderia restaurar a saúde de alguém – a origem da prática, na qual os pacientes eram deitados nus em áreas especialmente escolhidas para serem totalmente expostos ao sol, é ligada a Heródoto. No Papiro Ebers<sup>1</sup> de 1550 a.C., os antigos egípcios empregavam a fototerapia usando plantas das margens do rio Nilo, como *Pastinaca sativa* (pastinaga), *Petroselinum crispum* (salsa), *Hypericum perforatum* (Erva-de-são-jão) e *Ammi majus* (Âmio-maior), para fazer um pó que era aplicado sobre lesões despigmentadas e, posteriormente, para tratar leucoderma [32, 33]. Quando o paciente era exposto à luz solar, isso levava à pigmentação da pele, um efeito semelhante à queimadura solar [32, 34, 35]. Também vale citar o exemplo da Índia, onde os psoralenos eram usados desde 1.400 a.C. Pelo que indica o livro Atharva-Verda, os psoralenos obtidos das sementes de *Psoralea Corylifoliu* eram usados no sistema ayurvédico<sup>2</sup> de medicina com o propósito de ajudar na repigmentação da pele com vitiligo pela estimulação da produção de melanina.

Na antiga China, a técnica era empregada dentro dos dogmas do daoísmo com o intuito de obter a imortalidade, tendo sido introduzida por Lingyan Tzu-Ming no primeiro século da era cristã durante a dinastia Han [34]. Num rito curioso descrito cerca de quatro séculos depois, na dinastia Tang, e praticado exclusivamente por homens, o adepto deveria ficar à luz do sol de manhã cedo segurando na mão direita um papel verde com o caractere do sol (日) pintado em vermelho. Após um certo tempo, o papel aquecido era picado, mergulhado em água, e então ingerido para que se prendesse a essência solar no corpo

---

<sup>1</sup>O papiro Ebers é um rolo de 20,23 metros de comprimento e contém 108 colunas de texto com uma série de prescrições, as quais são agrupadas de acordo com diferentes doenças, enfermidades e lesões, sendo datado do reinado de Amenófis I (1536 a.C.) [31].

<sup>2</sup>Conhecimento médico desenvolvido na Índia, há cerca de 7 mil anos, o que faz dele um dos mais antigos sistemas medicinais da humanidade. *Ayurveda* significa, em sânscrito, ciência (veda) da vida (ayur) [36].

(para as mulheres, o ritual seguia as mesmas linhas, mas sob o luar) [34,37].

O nome “helioterapia”, inclusive, surgiu no século II a.C com o trabalho do médico grego Hipócrates. Figura de destaque na época e historicamente chamado de “Pai da Medicina”, Hipócrates praticou a medicina em moldes empíricos em contraste com o domínio desta pelo nicho dos sacerdotes [38]. Hipócrates teria recomendado a exposição ao sol após as descobertas de seus efeitos curativos que teve ao viajar ao Egito, local onde a prática já era comum [32,34,39]. A influência do tratamento também foi vista em outras partes do mundo helênico: sabe-se que os romanos continuaram a usar o sol para essas finalidades, especialmente as doenças de pele, tendo sido os responsáveis pelos conhecidos banhos públicos ao sol, ou “termas”. Com a queda do Império Romano e a propagação e eventual hegemonia da fé cristã, tantos os banhos romanos como o próprio conceito da helioterapia foram esquecidos [32,34,39].

Essas práticas acabaram caindo em obscurantismo, em parte por conta do estigma cristão inculcado contra elas por sua associação a formas de pensamento pagão, como a própria adoração ao sol. Porém, por mais que a sua eficácia tenha sido conhecida desde esses primórdios, foi só a partir do início do século XX que a ação fotodinâmica veio a ser decisivamente redescoberta e eventualmente estabelecida como uma terapia eficaz por conta da atuação de grandes nomes como Niels Finsen, Oscar Raab e Herman von Tappeiner [33,35].

Finsen, um médico dinamarquês, foi o responsável por desenvolver a fototerapia ao patamar de ciência e também por popularizá-la, tendo recebido o Prêmio Nobel em 1903, relacionado ao seu trabalho no uso da fototerapia com arco de carbono para o tratamento de lúpus vulgaris (Figura 1.2) [33]. Entre seus achados, Finsen publicou em 1893 que a exposição à luz vermelha é capaz de evitar a formação de pústulas (ou supuração) de varíola e de tratar esta doença, além de ter descoberto que a luz ultravioleta pode ser usada para tratar a tuberculose cutânea [40]. A primeira publicação científica especificamente voltada para o uso de fotossensibilizadores na TFD viria só em 1900, na qual Raab observou a morte do protozoário *Paramecium Caudatum* depois da exposição à luz na presença do corante acridina (Figura 1.3a) por efeitos citotóxicos. Suas contribuições foram as primeiras instâncias nas quais reações fotossensíveis foram analisadas de forma científica e introduzidas à medicina no mundo moderno [40]. Von Tappeiner, por sua vez, junto com o dermatologista A. Jesionek, foi o responsável pela realização dos primeiros experimentos de aplicações terapêuticas da ação fotodinâmica sobre pacientes com câncer, assim como pela própria introdução do termo “fotodinâmico” [40]. Seus trabalhos envolveram o uso da eosina Y (Figura 1.3c) como um FS para tratar câncer de pele, lúpus e condiloma feminino. Foram eles também que empregaram o termo “terapia fotodinâmica”, em 1907, para denominar o fenômeno no qual se dava a fotossensibilização dependente da presença do oxigênio para a eficácia do processo. Tappeiner também foi o primeiro cientista a tentar utilizar a TFD para tratar tumores. Em três de seus pacientes foi aplicada uma solução de 5 % de eosina Y, também auxiliada pela injeção de corantes no interior do tumor em certos casos, e a área era exposta à luz solar ou lâmpada de arco voltaico por várias semanas [33].

Graças à incapacidade adaptativa de microrganismos, a diversidade de usos em áreas como a medicina (oncologia, dermatologia, infectologia), veterinária e agricultura, e devido à variedade de microrganismos possíveis de serem inativados pela TFD - como bactérias, fungos, vírus, parasitas, entre outros (Figura 1.4), a área vem alcançando um grande avanço científico que contribui para o aumento de sua eficácia, do número de tratamentos e para a redução de custos.

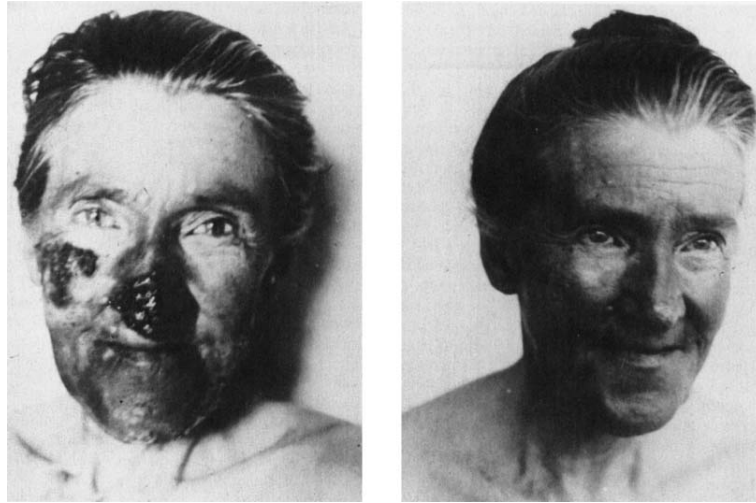


Figura 1.2: Lúpus vulgaris extenso, curado após um ano de helioterapia. Fotografias de uma coleção de slides de lanterna mágica realizada na Unidade de História Médica da Universidade de Melbourne [33].

Na veterinária, a TFD teve início em 1980, quando vários tipos de tumores em cães e gatos foram tratados com HPD (Hematoporfirina, Figura 1.3 b) e irradiados com luz [41]. Nos dias de hoje, a utilização da TFD já pode ser encontrada em animais domésticos, ovelhas, cavalos, gado, pássaros, répteis, pinguins, tartarugas, macacos, cobras, entre outros. Ela é empregada para o tratamento de doenças como o carcinoma de células escamosas, carcinoma do trato urinário inferior, tumores, papilomatose oral, abscesso de linfadenite em linfonodo mandibular, carcinoma de células escamosas perioculares, sarcóides, infecções em geral, mastite, úlceras, dermatites, fibropapilomatose e estomatite, para citar alguns exemplos [42, 43].



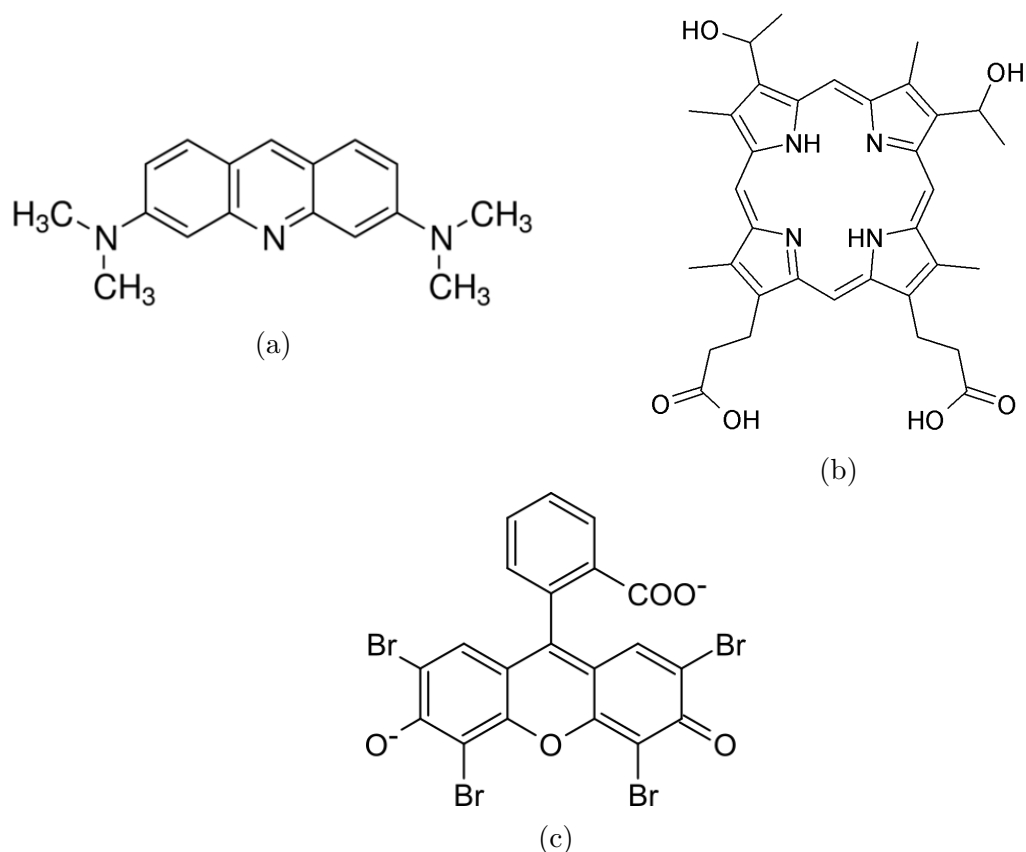


Figura 1.3: a) Molécula de Acridina. b) Molécula de Hematoporfirina. c) Molécula de Eosina Y.

A TFD também tem demonstrado aplicações promissoras na agricultura como um substituto para agrotóxicos, atuando como inseticida e pesticida. Antônio Barbieri pode ser considerado como o iniciador de tais estudos. Em 1928, ao considerar os efeitos surtidos pela TFD, o pesquisador propôs que esta fosse empregada no controle de mosquitos para evitar a proliferação da malária na Argentina. Vários testes foram realizados envolvendo uma gama de corantes, misturas de corantes em soluções diluídas, diversas fontes de luz, e larvas de *Anopheles* e *Culex pipiens*. Dentre as misturas possíveis, a que se relevou como a mais tóxica foi a que continha rosa de bengala B com eritrosina B [44].

Apoiando-se nas contribuições de Barbieri, Schildmacher demonstrou em 1950 que as larvas de três espécies de mosquito possuíam uma alta suscetibilidade tanto ao vermelho de acridina como ao rosa de bengala B com exposição à luz, até quando os organismos eram retirados e mergulhados em água pura depois que o corante fosse ingerido [45]. Sugeriu-se que a causa de morte tenha sido a reação fotoquímica ocorrida no intestino. Mediante testes tanto internos como externos, provou-se a grande eficácia do corante como um larvicida e a ausência de danos nos peixes utilizados no estudo. O estágio moderno dos estudos de inseticidas de procedência fotodinâmica inicia-se com o relatório de Yoho *et al.*, em 1971, [46], no qual são apresentados dados que examinam a proporção entre a mortalidade e a concentração do corante em meio a insetos adultos alimentados com o mesmo.

Em linhas similares, os efeitos tóxicos do azul de metileno observados na dieta administrada e por sua injeção em larvas de farinha foram percorridos por Graham *et al.* [47]. Em 1975, Broome *et al.* [48] sugeriram o possível emprego da enzima de controle do

neurotransmissor acetilcolinesterase após o estudo do comportamento e dos sintomas experimentados por formigas *Solenopsis invicta*, ou “formigas de fogo”, com o corante rosa de bengala B. Estes autores mostraram, a propósito, que há uma série de fatores dos quais depende a toxicidade a ser obtida: concentração do corante, iluminação contínua, intensidade da luz, e tempo de exposição. Pouco tempo depois, já em 1980, Pimprikar *et al.* seriam os realizadores da primeira tentativa moderna de uma aplicação prática de um inseticida fotodinâmico com a utilização de sprays de eritrosina B para o controle de moscas em galinheiros [49].

No que se refere às aplicações agrônômicas, o estudo do uso de FS exógenos (Figura 1.5) ainda está em andamento em virtude dos danos que podem ser causados às plantas. Sendo assim, a aplicação de qualquer FS com a finalidade de erradicar patógenos em plantas envolve necessariamente uma pesagem dos riscos inerentes aos hospedeiros da planta. Já podem ser encontrados relatos do emprego de FS naturais, como os exemplos das cumarinas e furocumarinas, e de sintéticos, como as porfirinas em agentes patogênicos inativados, tais como vírus (vírus do mosaico do tabaco), bactérias (*Pseudomonas syringae*) e fungos (*Collectotrchum abscissum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Collectotrichum acutatum*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*) [50, 51].

Numa abordagem que partilhou de interesses próximos ao do estudo supracitado, Issawi encabeçou um estudo que buscou responder estrategicamente a um interesse mútuo: o de erradicar simultaneamente formas de vegetações indesejáveis e fitopatógenos sem eliminar plantas que pudessem ser benéficas ao agrônomo. Com isso em mente, o estudioso e os demais pesquisadores examinaram o funcionamento da TFDA sobre tomates e sobre a *Arabidopsis thaliana* (erva daninha). Desta forma, demonstrou-se que a terapia em questão conseguia matar as mudas de *Arabidopsis* sem fazer o mesmo com o tomate [52–55].

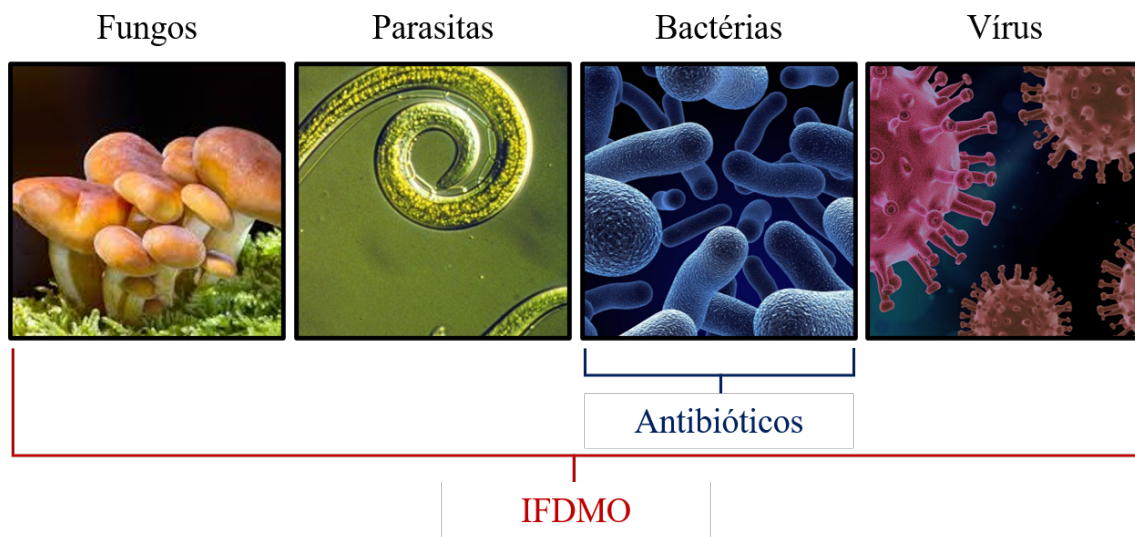


Figura 1.4: Representação do alcance da inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDMO) comparada à ação de antibióticos. Figura adaptada da referência [23].

Dentro da medicina, por mais que a ênfase da TFD tenha sido muito forte no tratamento de câncer, também houve um aumento perceptível nas investigações do uso da terapia em formas de doenças não cancerosas. A Tabela 1.1 lista algumas destas aplicações, as quais no momento estão em diversos estágios de desenvolvimento, tanto pré-clínico

como clínico [56].

Cardiologia/Vascular	Hiperplasia intimal Aterosclerose
Dermatologia	Ceratose actínica Psoríase Depilação
Ginecologia	Destruição endometrial Endometriose
Microbiologia	Doença periodontal Controle de infecção
Oftalmologia	Neovascularização ocular Degeneração macular relacionada à idade ocular Neovascularização ocular da córnea
Ortopedia	Artrite reumatóide Osteoartrite
Reparo de tecido	Reparo de feridas Colagem de tecido
Transplante biológico	Rejeição de órgão
Banco de sangue	Esterilização de hemoderivados

Tabela 1.1: Algumas das novas aplicações da TFD [56].

Em outras palavras, o potencial da técnica de “Inativação Fotodinâmica de Microrganismos” (IFDMO) ou “Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana” (TFDA) já é reconhecido há muitos anos no combate a bactérias, fungos e vírus. No entanto, o seu destaque na atualidade deve ser devidamente compreendido em seu contexto histórico: em um primeiro momento, quando houve o desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos (como o exemplo da penicilina durante a 2<sup>a</sup> Guerra Mundial), este avanço quase anulou a relevância dos FS em sua ação como ativos antimicrobianos; hoje, fatores como a grave propagação da AIDS, o aumento nos números das infecções hospitalares e a crescente resistência de bactérias a antibióticos, todos justificam o aumento da procura pela TFD [57]. Afinal, a técnica possui amplas possibilidades de ação e é eficaz contra microrganismos resistentes a antibióticos, acarretando efeitos colaterais mais brandos nos pacientes se comparada a outros tratamentos. A TFD também não implica de forma alguma o desenvolvimento de resistência microbiana, pois a sua inativação opera mediante a produção de espécies que são altamente reativas e atacam uma multiplicidade de alvos celulares. Esta qualidade, por exemplo, torna a TFD uma ótima opção para a esterilização de bolsas de sangue, para usos na periodontia e a conservação e purificação de alimentos [29, 58–61].

Os usos da TFD não se limitam somente a estes, abrangendo também o tratamento da icterícia neonatal, a utilização dermatológica da combinação de moléculas psoralenas e luz ultravioleta e a fotodeteção. Os psoralenos, por exemplo, já na década de 1970 estavam sendo usados clinicamente para tratar a psoríase e a vitiligo, assim como na imunoterapia [62]. Aplicações como estas têm representado um renascimento da luz como uma ferramenta terapêutica de grande utilidade para a medicina e em práticas cirúrgicas [33]. Também é válido salientar a importância das porfirinas – o primeiro estudo com o seu uso em seres humanos foi realizado por Friedrich Meyer-Betz em 1913, no qual este aplicou

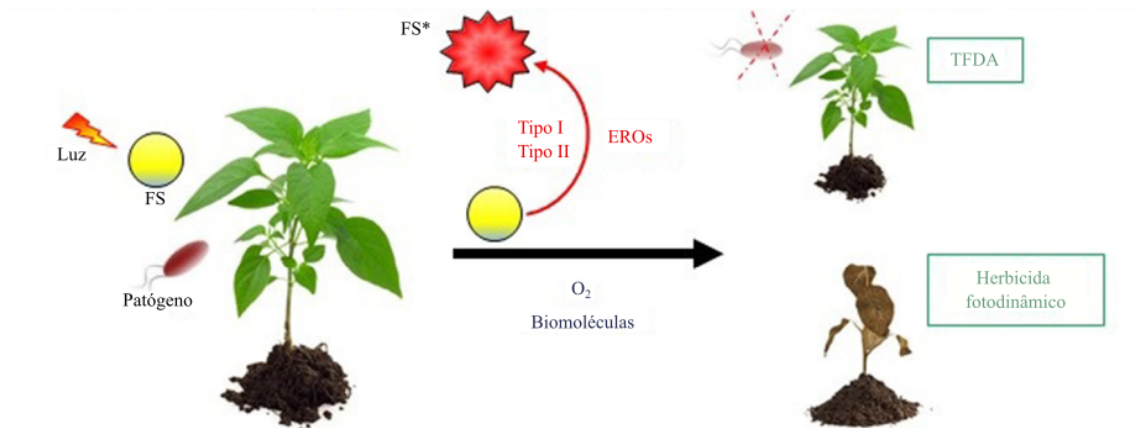


Figura 1.5: A ação fotodinâmica direta é realizada por meio do uso de FS exógeno, como porfirinas, corantes fenotiazínicos, cumarinas e furocumarinas, levando à geração de EROs por meio de dois tipos de reação fotoquímica após a irradiação. Recentemente, o método foi investigado para aplicações em agronomia no contexto de TFDA e para o desenvolvimento de novos herbicidas. Figura adaptada da referência [52].

200mg de hematoporfirina (Figura 1.3b) em suas próprias mãos, relatando os efeitos de inchaço e dor sentidos especificamente sobre as áreas de sua pele expostas à luz [40]. Com tal experimento, o estudioso buscava determinar se os mesmos efeitos fotossensíveis poderiam ser induzidos tanto em ratos como em humanos [62]. No mesmo período, em 1911, Hausmann, estudando os seus efeitos biológicos, explorou os efeitos da hematoporfirina e da luz sobre um paramécio e sobre hemácias, também descrevendo as reações da pele de ratos após a exposição à luz no contexto da administração de hematoporfirina [62]. No entanto, um desenvolvimento mais sofisticado nessa direção viria em 1924, quando o francês Policard, da cidade de Lyon, realizou a primeira instância de localização de um tumor maligno por meio da fosforescência de porfirina: Policard observou a fosforescência vermelha da hematoporfirina no sarcoma de um rato iluminado com luz ultravioleta de uma lâmpada de Wood (LW) [62]. Apenas cerca de cinquenta anos depois, em 1972, é que seria alcançada a destruição efetiva de células tumorais com o trabalho de Diamond, o qual envolveu implantar células gliais sensibilizadas à hermatoporfirina nas camadas subcutâneas de ratos e expô-los à luz de uma lâmpada fluorescente [33]. Diamond propôs que a combinação das propriedades fototóxicas e localizadoras de tumores das porfirinas poderiam ser exploradas para matar células cancerosas. Pouco tempo depois, em 1975, Thomas Dougherty já atuava tratando com êxito o câncer de pele em pacientes [40]. O primeiro medicamento sensibilizador de TFD foi aprovado no Canadá em 1999 [40].

Atualmente, sabe-se que as perspectivas futuras da TFD são bem promissoras: ela oferece vantagens como um auxílio no tratamento de tumores malignos e como método agressivo de controle de tumores locais, evitando-se danos às demais estruturas do corpo do paciente [33]. Além dos exemplos apresentados até este ponto, a TFD também tem sido empregada para tratar o câncer de cavidade oral, câncer bronquial, câncer de esôfago, câncer de bexiga, tumores na cabeça e no pescoço, assim como doenças não-malignas [38, 63]. A TFD também demonstrou o potencial de contribuir para a cura precoce de tumores e o controle paliativo de câncer avançado. Dentre outros direcionamentos que a TFD tem tomado, estão a busca por uma melhor definição de seu mecanismo de ação e das suas vantagens oferecidas com relação a outros tratamentos de câncer tradicionais [62, 64].

## 1.2 Mecanismos de ação

### 1.2.1 Fotossensibilizadores

O diagrama de Jablonski (Figura 1.6) ilustra bem os processos energéticos que ocorrem em uma reação fotoquímica. O FS é inicialmente excitado absorvendo energia luminosa e passa do estado singlete fundamental  $S_0$  para o primeiro estado singlete excitado  $S_1$ . Neste estado, primeiramente ocorrerá o relaxamento vibracional e, na sequência, o decaimento pode ocorrer por emissão de fluorescência (desativação radiativa) ou por conversão interna (desativação não radiativa). Em algumas circunstâncias, apesar de se tratar de um processo proibido pelas regras de seleção, pode ocorrer o cruzamento inter-sistemas, o que significaria sofrer mudança em sua multiplicidade de spin, o que o leva ao estado tripleto excitado  $T_1$ . Como a transição do estado  $T_1$  para  $S_0$  é uma transição proibida por spin, ele possui um tempo de vida maior, o que possibilita reações químicas importantes neste estado. Moléculas citotóxicas são produzidas a partir de dois modelos básicos de reação (Tipo I e Tipo II) [65,66]. Na reação do Tipo I, ocorre a transferência de elétrons entre  $T_1$  e substratos biológicos, gerando assim íons-radicais. Estes, por sua vez, tendem a reagir com o oxigênio, formando as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), por exemplo. Já no mecanismo do Tipo II, o estado  $T_1$  transfere diretamente a energia para o oxigênio no estado fundamental, por ser tripleto ( $^3O_2$ ), o que leva à formação do oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o qual é altamente oxidante. Os dois tipos de reação levam à morte celular, no entanto, o mecanismo Tipo II é adotado como a principal via de ação da TFD. Uma das vantagens da terapia é a seletividade de ação do corante devido à alta reatividade dos EROs e do  $^1O_2$  e seu curto tempo de vida. Porém, quanto à escolha dos corantes FS para utilização em TFD, deve-se estudar suas características físico-químicas, como a alta absorção de luz e a geração de  $^1O_2$ . Além disso, é de suma importância que o FS apresente uma farmacocinética favorável, baixa toxicidade no escuro, elevada estabilidade, e que seja de fácil obtenção e preferencialmente de baixo custo. A solubilidade do FS em meio biológico é outro fator a ser levado em conta, já que os processos de autoagregação do FS diminuem consideravelmente a geração de  $^1O_2$  devido a processos de autocolisões [67–72]. A Tabela 1.2 lista a série de reações que ocorrem durante a TFD [29,73–79].

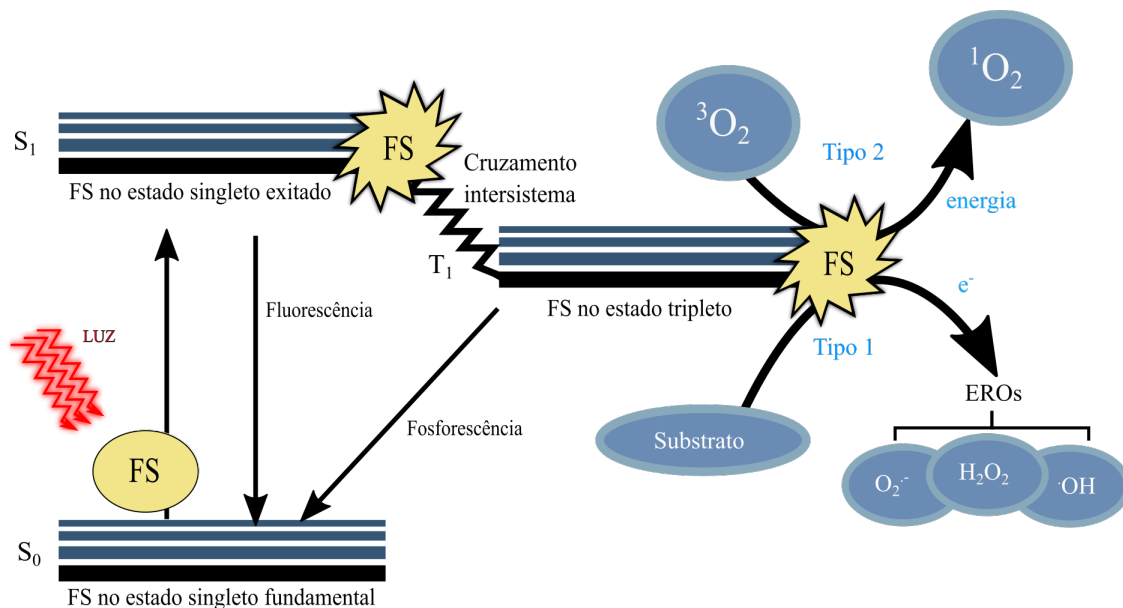


Figura 1.6: Diagrama de energia de Jablonski simplificado. A molécula absorve a energia do fóton, indo do estado fundamental para o estado excitado singleto mais baixo. O estado excitado singleto mais baixo pode fazer uma transição radiativa de volta para o estado fundamental na escala de tempo de nanossegundos. Também pode fazer um cruzamento inter-sistema sem radiação para o estado excitado tripleto mais baixo. Do estado excitado tripleto mais baixo, há dois caminhos possíveis: este pode retornar ao estado fundamental diretamente, emitindo fosforescência, ou libera energia, que é transferida para o oxigênio ou outros inibidores de estado tripleto. Figura adaptada das referências [21, 79, 80].

Excitação	$^1FS + h\nu \rightarrow ^1FS^* \rightarrow ^3FS^*$	
Fotoprocisso	Reação	Produto
Tipo I	$^3FS^* + ^1FS \rightarrow$	$FS^{\cdot-} + FS^{\cdot+}$
	$^3FS^* + D \rightarrow$	$FS^{\cdot-} + D^+$
	$FS^{\cdot-} + O_2 \rightarrow$	$^1FS + O_2^{\cdot-}$
	$^3FS^* + O_2 \rightarrow$	$FS^{\cdot+} + O_2^{\cdot-}$
	$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow$	$O_2 + H_2O_2$
	$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow$	$Fe^{2+} + O_2$
	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow$	$O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$
Tipo II	$^3FS^* + ^3O_2 \rightarrow$	$^1FS + ^1O_2$

Tabela 1.2: Reações que ocorrem durante a ação fotodinâmica.  $^1FS$  é o FS no estado fundamental.  $^1FS^*$  e  $^3FS^*$  são o FS no estado singleto e tripleto excitado respectivamente.  $D$  é a molécula doadora de elétrons [76].

Um ponto de importância crítica para o avanço das pesquisas sobre a TFD é a procura constante por novos fármacos FS, uma vez que a disponibilidade destes no mercado tende a ser limitada. Sabe-se que as concentrações e a dose de luz dos FS são selecionadas cuidadosamente e que é necessário corresponder a uma série detalhada de pré-requisitos para que eles se encaixem no critério de “FS”, propriamente dito: deve ser de fácil obtenção; deve ter rendimento quântico de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) alto; índice alto de pureza; boa seletividade e afinidade por células tumorais; ativação em comprimentos de onda com luz

de excelente penetração em tecidos (chama-se de “janela terapêutica” a margem entre 600-800 nm); deve apresentar uma farmacocinética favorável; intervalos curtos entre a administração do FS e a sua acumulação máxima no tecido tumoral; deve possuir índices de reação de fotobranqueamento baixos; deve ocorrer a excreção do componente pelo corpo depois do tratamento; a fotossensibilidade não pode se prolongar; a toxicidade no escuro deve ser mínima; deve ser de formulação simples; deve ser reproduzível; deve ser altamente estável química e fisicamente [81–83].

Uma classe de compostos que se destaca é a dos xantenos, os quais podem ser identificados pelos seus três anéis aromáticos condensados em arranjo linear, tendo um átomo de oxigênio no anel central. Por conta do aspecto de sua estrutura tricíclica, os xantenos têm excelentes propriedades espectrofotométricas. Logo, quando ocorre a absorção da luz na região do visível entre 500-570 nm, tais corantes recebem tonalidades muito distintas, como o vermelho, o laranja e o rosa. Embora essa propriedade tenha sido aproveitada para tingir roupas por volta do século XIX, a prática não perdurou, pois o fotobranqueamento decorrente da exposição à luz acabava apagando as cores [83, 84].

A Eritrosina B, ou 2,4,5,7 tetraiodofluoresceína, é um corante de tons rosa-cereja geralmente comercializado como sal sódico. De forma geral, a Eritrosina B é vantajosa por ser o único corante dentre os xantenos que é compatível com o uso em alimentos – sendo, portanto, empregada quando se deseja destacar a cor vermelha ou o rosa (em iogurtes e doces, por exemplo) [84]. É também usada na odontologia para evidenciar a placa dentária e caracterizar a cárie. Outro contexto de aplicação da Eritrosina B é o do biofilme dental, no qual esta tem demonstrado resultados promissores em testes como FS em tratamentos de acúmulo preferencial no biofilme dental contra microrganismos [85]. A propósito, um estudo recente desenvolvido por pesquisadores da UEM (Universidade Estadual de Maringá) mostrou a atividade fotodinâmica da Eritrosina B em diversas linhagens de bactérias, apresentando a ordem de atividade a seguir: *S. aureus* < *A. hydrophila* < *E. coli* < *S. Typhimurium* < *P. aeruginosa* [86]. Inclusive, a linhagem de fungos *Candida Albicans* foi incorporada à esfera de atuação da atividade da Eritrosina B [87], que também foi observada no tratamento de lesões orais malignas (H357) e pré-malignas (DOK) [83, 88].

Com seu equilíbrio protolítico de elevada complexidade, a Eritrosina B pode ser encontrada em quatro formas diferentes: catiônica (CT -  $\text{ERIH}_3^+$ ), neutra (NE -  $\text{ERIH}_2$ ), monoaniônica (MO -  $\text{ERIH}^-$ ) e dianiônica (DA -  $\text{ERIX}^{2-}$ ), correspondendo a três equilíbrios protolíticos. Além destes, ainda pode haver a existência de espécies tautoméricas para  $\text{ERIH}_2$  (lactona - NEL, zwitteriônica - NEZ e quinoide - NEQ) e  $\text{ERIH}^-$  (carboxilato - MAC e fenolato - MAF). Essas espécies são ilustradas no Esquema 1, demonstrando a complexidade do sistema discutido [83, 89, 90].

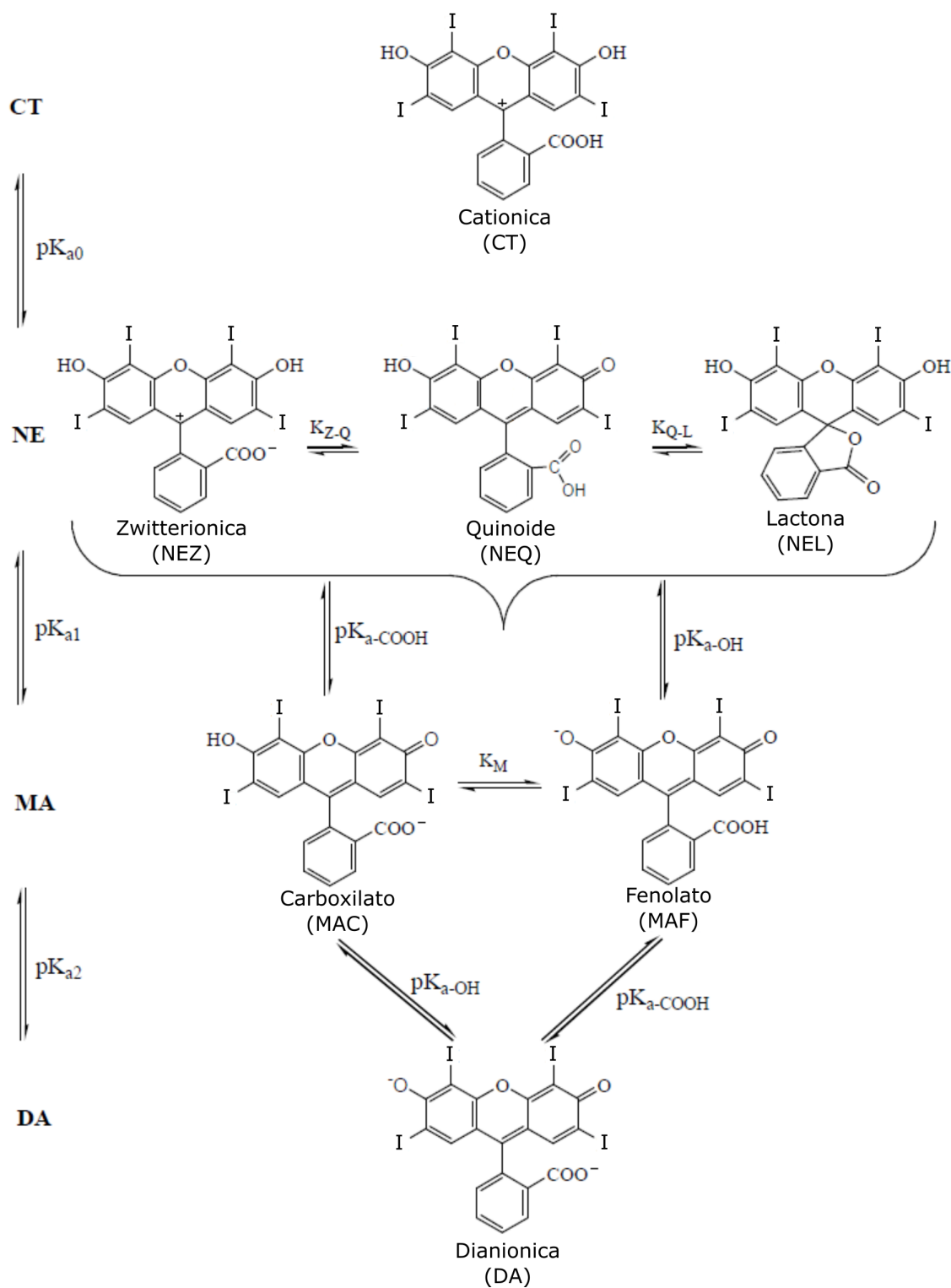


Figura 1.7: Formas protolíticas e suas estruturas tautoméricas para a Eritrosina [83].

Na Figura 1.7, é observado o rompimento da ressonância entre os anéis aromáticos na formação do tautômero NEL. Logo, acaba havendo uma diminuição intensa da absorvidade molar, causando a perda da cor da solução. De qualquer maneira, sabe-se que a Eritrosina B ocorre na forma dianiônica quando está em condições de pH fisiológico (pH=



7,4) – a espécie com a maior absorvidade molar. Pode-se depreender que o comprimento de onda de máxima absorção da Eritrosina B é ligeiramente inferior à da “janela terapêutica” já mencionada acima (de 600 a 800 nm). Apesar disso, as ótimas características físico-químicas e fotofísicas da Eritrosina B dão a ela um alto potencial fotodinâmico, principalmente para lesões próximas à superfície da pele, além da vantagem do “sinal verde” que esta tem em relação ao uso alimentício por avaliação do FDA [83,91].

## 1.2.2 Oxigênio Singlete

A efetividade da TFD depende integralmente da presença do oxigênio molecular. Como dita a Teoria do Orbital Molecular (TOM), em seu estado fundamental, este possui a configuração de triplete ( $^3O_2$ ). Nessa condição específica, ele tem dois elétrons desemparelhados que ocupam os orbitais antiligantes duplamente degenerados  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ , demonstrando um alto grau de multiplicidade e uma condição de energia menor [92,93]. Na Tabela 1.3 a seguir, exibem-se os termos espectroscópicos, a distribuição eletrônica nos orbitais antiligantes e a energia referente aos estados fundamental e excitado do oxigênio molecular [94].

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia <sup>a</sup> (KJ/mol)
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow \ ]\pi_x^*[\uparrow \ ]\pi_y^*$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow \ \downarrow]\pi_x^*[\ ]\pi_y^*$	92,4
$^1\Delta_y$	$[ \ ]\pi_x^*[\uparrow \ \downarrow]\pi_y^*$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow \ ]\pi_x^*[\downarrow \ ]\pi_y^*$	159,6

<sup>a</sup> Relativo ao estado fundamental.

Tabela 1.3: Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio (Adaptado da referência [94]).

Assim, diferente da maior parte das moléculas, o oxigênio molecular encontra-se no estado fundamental triplete. Dentre os cientistas que contribuíram para essa descoberta, Faraday em meados de 1840 observou que o oxigênio era atraído por materiais magnéticos. Contudo, seria apenas em 1925 que Robert Mulliken ofereceria uma explicação mais definitiva do magnetismo do oxigênio, empregando a teoria quântica, a qual havia acabado de ser desenvolvida [95]. Em sua análise, Mulliken demonstrou que o oxigênio molecular possui dois elétrons desemparelhados em seu estado de energia mais baixa - aliás, vale mencionar que já em 1924, Goudsmit e Uhlenbeck haviam proposto o conceito do magnetismo intrínseco dos elétrons. Na natureza, é raro que se encontre elétrons de valência desemparelhados (Figura 1.8) em uma molécula estável, possuindo uma alta reatividade química por conta disso [96].

Como dito anteriormente, no estado fundamental, a maior parte das moléculas tem uma configuração singlete. Isto é, a regra de conservação de spin proíbe a redução direta destas por reativos com dois elétrons com spins paralelos ( $^3O_2$ ) [97]. Ainda assim, sabe-se que no momento em que um FS decai, este pode transferir a sua energia ao oxigênio molecular que se encontra no meio (mecanismo tipo II), gerando o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ): uma espécie dotada de grande reatividade. O que possibilita isso é o fato de os dois se encontrarem com a mesma multiplicidade de spin. Os três estados eletronicamente excitados recebem o nome de "oxigênio singlete", sendo imediatamente superiores ao oxigênio molecular no seu estado fundamental. Tendo em vista a alta reatividade observada no

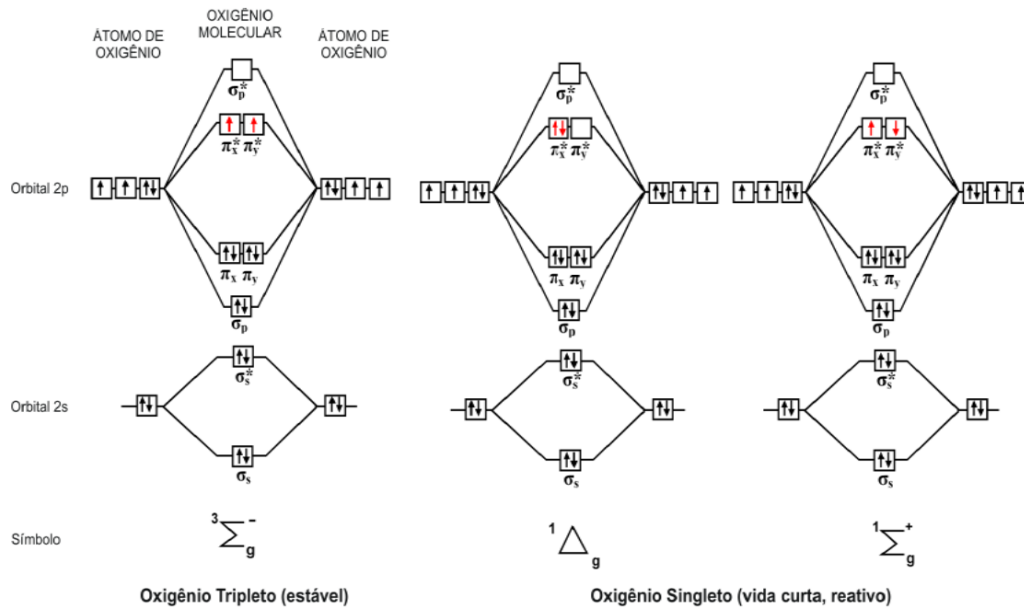


Figura 1.8: Orbitais atômicos e moleculares do Oxigênio nos estados tripleto e singlete. O orbital 1s não é mostrado, pois o nível 1 de cada átomo está completamente preenchido (Figura adaptada da referência [96]).

oxigênio singlete, este tem um tempo de vida muito curto. Segundo os dados fornecidos pela literatura, em  $H_2O$ , esta é de cerca de  $4,0 \mu s$  [98, 99]. Dentro das células, contudo, o quadro fica ainda mais drástico: em decorrência da afinidade pelos substratos biológicos, o seu tempo de vida é diminuído para  $0,2 \mu s$ , o que implica uma limitação adicional sobre o raio de ação do  $^1O_2$  em tal meio, uma vez que o seu tempo de vida já demonstra ser curto por si só. Uma ampla variedade de métodos tem sido propostos para a detecção de  $^1O_2$  na prática da TFD, mas de forma geral, estes podem ser compreendidos segundo as categorias “indiretos” e “diretos”. Dentre os primeiros, pode-se mencionar o uso do ácido 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic (ABDA) como um reagente para determinar química e quantitativamente a ação fotodinâmica dos FS. O que torna favorável a aplicação destes, a princípio, é a baixa sobreposição espectral, visto que a absorção de ABDA acontece em  $\lambda < 470nm$  - o que facilita a realização de análises relativas ao fotobranqueamento dos FS. Quanto aos segundos, um exemplo pertinente é o método de detecção da emissão de fosforescência do  $^1O_2$  em  $1270 nm$  [100, 101]. Apesar da baixa intensidade da fosforescência vista em grande parte dos solventes, com o uso de detectores de alta sensibilidade é possível determinar precisamente o tempo de vida do oxigênio singlete examinando-se o seu decaimento. Por outro lado, o que dificulta a utilização dessa técnica é o alto custo e sofisticação dos equipamentos necessários para o processo [102].

### 1.2.3 Luz

Outra restrição da TFD é a capacidade de penetração da luz, que é limitada pela dispersão óptica dentro do tecido pela absorção por cromóforos endógenos e da droga sensibilizante (Figura 1.9). Comprimentos de onda menores que  $600 nm$  são absorvidos principalmente pela hemoglobina, enquanto a água absorve comprimentos de onda superiores a  $800 nm$ , apresentando, assim, efeitos térmicos sobre a pele e restringindo a “janela

terapêutica” (Figura 1.10) da pele entre 600 a 800 nm. Esta região do espectro é conhecida como a primeira janela biológica. A segunda janela biológica é entre 1000 nm e 1400 nm, sendo esta limitada pelas bandas de absorção da água em 980 nm e 1500 nm [103]. No entanto, para a aplicação da TFD ou TFDA tópica, muitas vezes a profundidade de penetração deixa de ser um problema e passa a ser um fator importante para limitar a ação fotodinâmica sobre a região de interesse.

Em adição à capacidade de penetração, temos também a necessidade de uma fotoativação eficiente do FS utilizado. O espectro de emissão da fonte luminosa e o espectro de absorção precisam ter um casamento, de forma que o número de fótons absorvidos seja apropriado. Para a ação em tumores volumétricos, busca-se FS que absorvam na janela biológica. No entanto, para tratamento superficiais, outras classes de FS são mais apropriadas. Desta forma, a definição de dosimetria ideal precisa ser definida levando-se em conta todos estes aspectos, além da calibração apropriada da fonte de luz. Fontes de luz a laser ou LEDs são normalmente utilizadas, sendo que esta última tem atraído mais atenção pelo seu menor custo e larga disponibilidade de comprimentos de onda.

Na definição das propriedades fotofísicas dos FS e também na definição da dosimetria, as técnicas espectroscópicas têm um papel fundamental. Além das técnicas comerciais, como espectrofotômetros e fluorímetros, algumas técnicas não tradicionais podem ser úteis. Neste sentido, a técnica de lente térmica (LT) tem se mostrado uma ferramenta auxiliar importante, especialmente por sua sensibilidade, uma qualidade que permite o estudo de amostras em concentrações nanomolares, às quais os equipamentos comerciais não são sensíveis. Na seção seguinte, faremos uma breve revisão da história da técnica de LT. No capítulo seguinte e no apêndice serão abordados os seus detalhes técnicos.

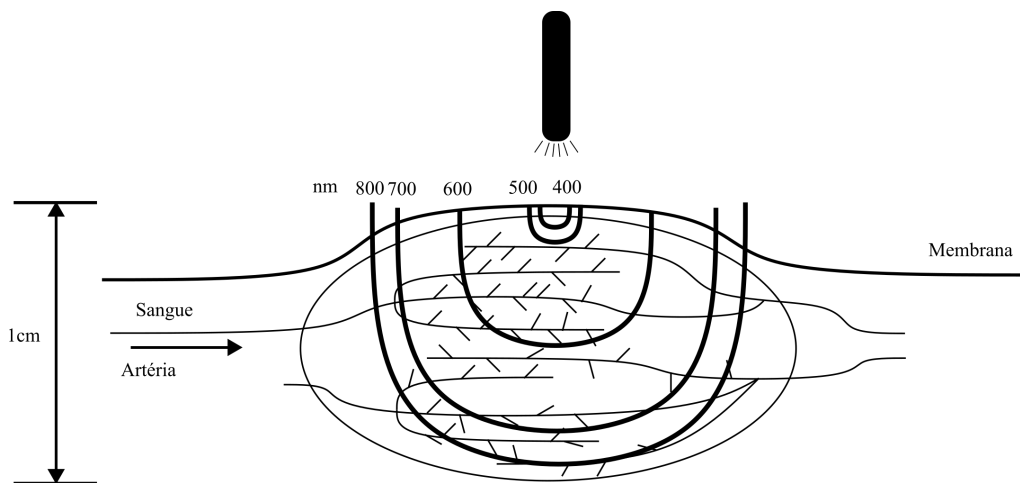


Figura 1.9: Esquema representativo da pele humana exibindo a profundidade de penetração da luz em função do comprimento de onda. Figura adaptada da Ref. [73].

### 1.3 Breve história da Lente Térmica

Técnicas ópticas são de extrema importância na TFD, pois estas possibilitam o conhecimento de propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores, auxiliando na obtenção de uma melhor aplicação terapêutica, na caracterização de corantes e para uma melhor resposta terapêutica desejada. Dentre as técnicas, podemos destacar medidas de fluorescência, absorção óptica, transmitância e a lente térmica.

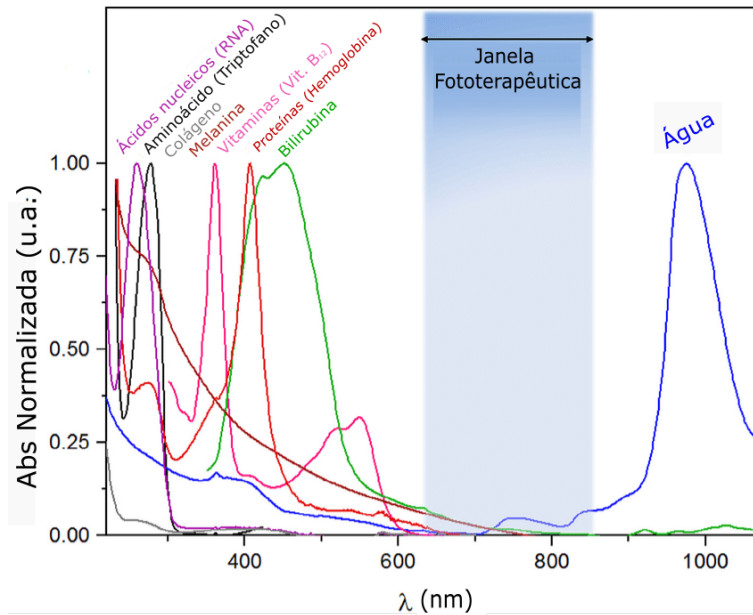


Figura 1.10: Gráfico dos espectros de absorção de alguns componentes na pele humana limitando a janela fototerapêutica. Figura adaptada das Refs. [104, 105].

A técnica de Lente Térmica (LT) foi observada pela primeira vez por Gordon *et al.* em 1964 [106] quando, ao colocar uma cubeta com amostra líquida em uma cavidade de laser He-Ne para espectroscopia Ramam (Figura 1.11), os pesquisadores observaram uma variação na potência do laser ao passar pela amostra. Segundo os autores, houve um aumento da intensidade inicial do feixe de laser que chegava à fotomultiplicadora até atingir um valor máximo e em seguida havia um decréscimo, abaixo de seu valor inicial; efeito este que não era observado sem a amostra. Estes transientes eram da ordem de tempo de segundos e a constante de tempo relacionada à formação dos mesmos sugeria que eles eram de origem térmica. Porto *et al.* [107] (1965) observaram que outros efeitos e fatores, como o tempo de relaxação e a posição da amostra, também afetaram o transiente. Análises sobre o diâmetro do laser antes e após a amostra confirmavam a suposição inicial de que a amostra se comportava como uma lente. Em seu trabalho, concluiu-se que o feixe, ao passar por um meio absorvente finito, aquece a amostra e muda o seu índice de refração, afetando a propagação do feixe - um efeito parecido com uma lente, focalizando ou desfocalizando o feixe. Logo, dá-se o nome: “Lente Térmica”. A partir disso, foram desenvolvidos modelos teóricos com aproximações para melhor descrever o efeito. Estes modelos levam em conta somente o caso de um feixe passando pelas amostras, ou seja, o laser sofre o efeito gerado por ele mesmo.

Mais adiante, em 1972, surgiram modelos utilizando mais de um laser, como o de Grabiner *et al.* [108], por exemplo, que consistia em dois feixes de lasers se propagando através da célula, mas ela ainda permanecia dentro da cavidade, como ilustrado esquematicamente na Figura 1.12.

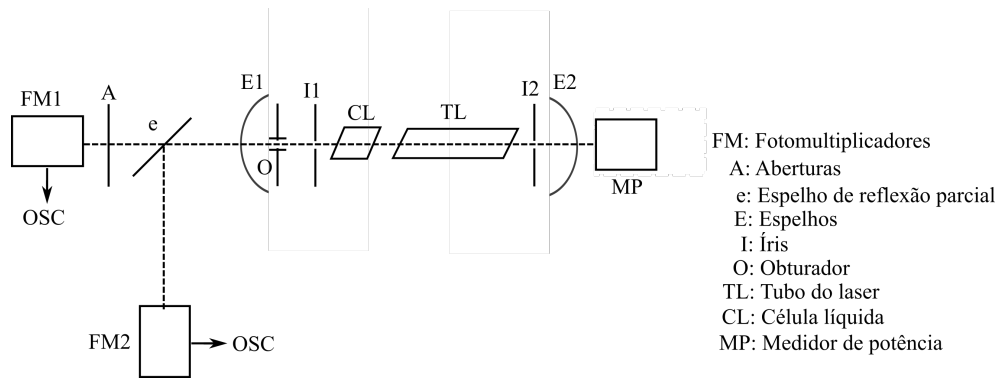


Figura 1.11: Esquema da montagem utilizada por Gordon *et al.* para observação do efeito de LT (Figura adaptada da Ref. [106]).

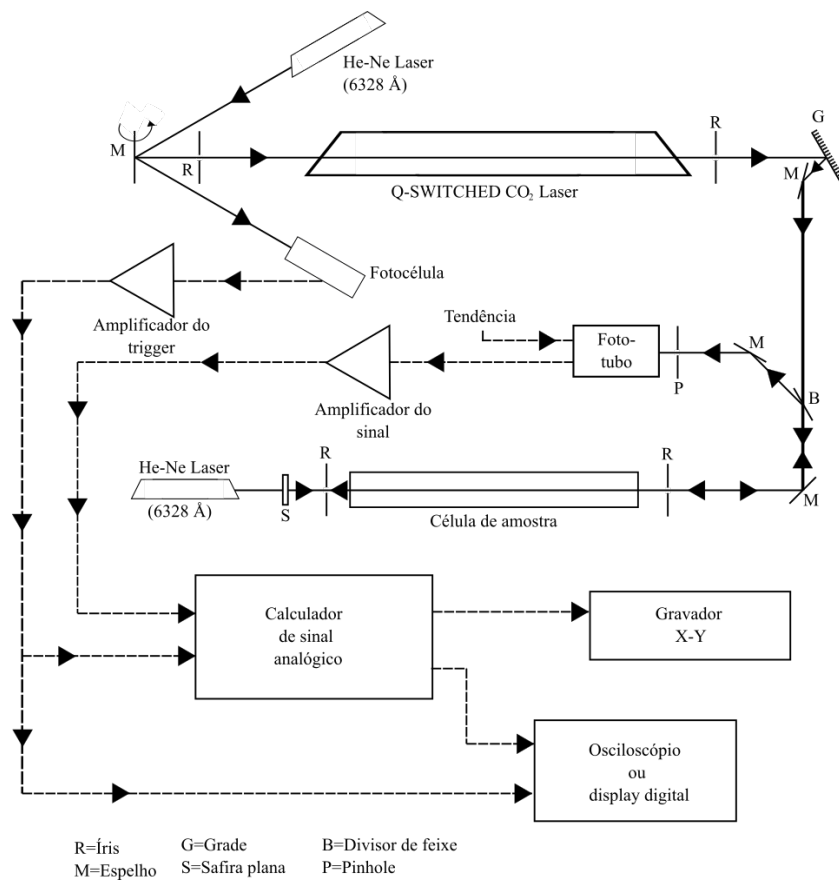


Figura 1.12: Esquema da montagem utilizada por Grabiner *et al.* (Figura adaptada da Ref. [108]).

Hu e Whinnery [109], em 1973, constataram que a configuração com a amostra colocada fora da cavidade era mais flexível e poderia resultar em medidas de absorvância mais sensíveis. Posteriormente, em 1982, Sheldon *et al.* [110] desenvolveram modelos para técnicas que usavam dois feixes de laser: um para a excitação da amostra e outro para provar o efeito. A utilização de dois lasers na técnica de lente térmica a aperfeiçoou, otimizando os resultados obtidos.

Modelos para dois feixes foram propostos ao longo do tempo. Porém, o modelo que melhor descreve o efeito levando em consideração dois feixes de perfil Gaussiano foi de-

envolvido por J. Shen *et al.* [111] em 1992. A configuração com dois feixes, um gerando o efeito e outro apenas provando, possibilita ao cientista trabalhar com o modo casado, ou seja, os dois feixes com aproximadamente o mesmo diâmetro incidindo na amostra, e também com o modo descasado (Figura 1.13), no qual os dois feixes têm diâmetros diferentes. Neste último modelo, foi considerada a diferença na fase do feixe de laser ocasionada pela LT, como na teoria de Sheldon *et al.* O nome provém da configuração na qual tem-se dois feixes de laser Gaussianos com raios diferentes, um com o raio menor para aquecer a amostra (feixe de excitação) e outro com raio maior, para provar o efeito (feixe de prova). A montagem feita por Shen *et al.* é a mais utilizada até os dias atuais e foi a utilizada neste trabalho.

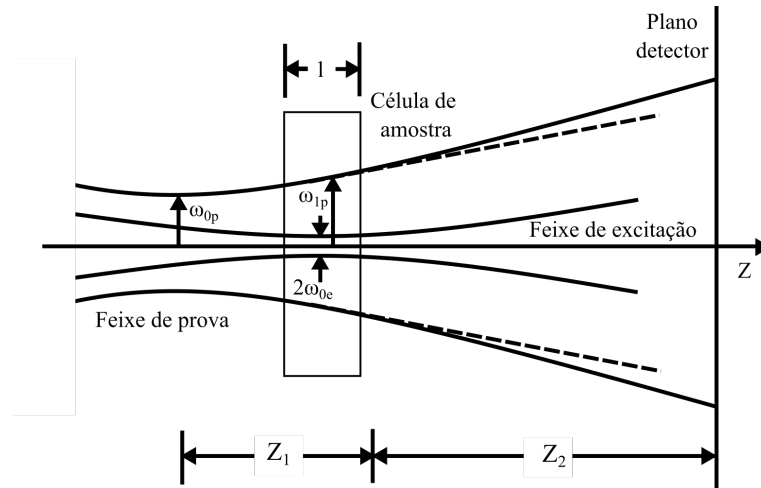


Figura 1.13: Esquema da montagem utilizada por Shen *et al.* Figura adaptada da Ref. [111].

Por último, Malacarne *et al.* [112–114] (2010 - 2014) descreveram um modelo particularmente importante para fluidos, para quando a excitação localizada induz a uma fotorreação na amostra. Detalhes do modelo com fotorreação são apresentados no Apêndice A. Em adição ao efeito térmico, amostras em multi-misturas de fluido podem apresentar uma difusão de massa, induzindo um efeito de Lente de Concentração, conhecido como Efeito Soret. Os autores, em seu trabalho, apresentaram uma abordagem numérica para descrever a dinâmica térmica e de difusão de massa, e também quantificar a contribuição de diferentes efeitos à técnica de Lente Térmica.

A técnica de LT vem se mostrando muito útil na caracterização de fotossensibilizadores para TFD, tanto pelas propriedades fototérmicas e fotoquímicas possíveis de se analisar, quanto pela sensibilidade da técnica em baixas concentrações onde outras técnicas não são sensíveis.

## 1.4 Objetivos

Os resultados positivos do uso da TFD ou TFDA nem sempre são atingidos, principalmente pelo desconhecimento dos mecanismos envolvidos, além do fator dos protocolos utilizados que, muitas vezes, são determinados empiricamente. Pela forte dependência das condições ambientais e de excitação, resultados *in vitro* e *in vivo* nem sempre são compatíveis. Por exemplo, sabe-se que xantenos podem existir em quatro diferentes formas protolíticas dependentes do pH. Essas diferentes formas podem alterar a absorção de

luz e a fotoatividade do corante. Desta forma, uma boa caracterização do FS para uso em TFD deve incluir a determinação de propriedades como tempo de vida de estado tripleto, processos de fotodegradação e geração de EROs em diferentes condições.

Uma das informações importantes na TFD seria o comportamento e a dinâmica desses mecanismos em fluidos diferentes, já que estamos tratando de uma terapia bastante aplicável e de materiais biológicos que, de fato, em sua maioria, são bastante diversos. Especialmente, a aplicação da TFD requer um bom entendimento da eficiência do oxigênio singlete em condições fisiológicas. Idealmente, a eficácia deve ser estudada *in vivo*, mas tais estudos são complicados e caros. Assim, uma opção seria realizar um estudo *in vitro* usando fluidos corporais simulados, no entanto, estudos da TFD com esse direcionamento são escassos. O objetivo deste estudo é, portanto, determinar a influência de diferentes microambientes na fotoativação de FS utilizados na TFD, especificamente a Eritrosina (Figura 1.1a). O estudo foi parcialmente estendido para o caso do FS Azul de Metileno (Figura 1.1b) [78]. Sendo assim, estudaremos o processo de fotoativação de FS em diferentes meios, como o simulador de fluido intestinal (SIF<sup>3</sup>), simulador de fluido corporal (SBF<sup>4</sup>), a saliva artificial (SSF<sup>5</sup>), tampão fosfato-salino (PBS<sup>6</sup>),  $H_2O$  e simulador de fluido gástrico (SGF<sup>7</sup>).

Para a análise do processo de fotoativação, foi empregado um conjunto de técnicas espectroscópicas (como espectros de absorção, fluorescência, cinética de degradação, transmitância resolvida no tempo e Lente Térmica). As cinéticas de fotodegradação foram feitas na presença da prova de geração de oxigênio singlete ABDA (9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid) (Figura 1.1c). O ABDA é um derivado do antraceno que pode ser convertido em seu endoperóxido correspondente após ser oxidado por  $^1O_2$ , o que resulta em uma diminuição em seus picos de absorbância na região de 380nm [66,115–119]. Isto nos permite monitorar a eficiência de geração de  $^1O_2$  nos diferentes fluidos utilizados neste trabalho. Inclusive, a cinética de fotoativação também nos permite monitorar a taxa de fotodegradação do mesmo. A técnica de transmitância resolvida no tempo foi utilizada a fim de obter o tempo de vida do estado tripleto do corante. Além disso, foi utilizada a técnica de Lente Térmica como técnica complementar no estudo da fotodegradação, visto que esta é capaz de medir amostras em concentrações muito baixas, às quais as técnicas comerciais não são aplicáveis [120–122].

---

<sup>3</sup>Abreviação do inglês: Simulated Intestinal Fluid

<sup>4</sup>Abreviação do inglês: Simulated Body Fluid

<sup>5</sup>Abreviação do inglês: Simulated Saliva Fluid

<sup>6</sup>Abreviação do inglês: Phosphate-buffered saline

<sup>7</sup>Abreviação do inglês: Simulated Gastric Fluid

## Capítulo 2

### Materiais e métodos

Neste trabalho, utilizamos um conjunto de técnicas ópticas para investigar o processo de fotoativação, a geração de oxigênio singlete, o tempo de vida do estado tripleto e a taxa de fotodegradação de Eritrosina em diferentes fluidos corporais simulados. Os resultados para a solução de Eritrosina em SSF e SBF foram investigados e comparados com a Eritrosina em água e PBS. Além disso, o estudo foi estendido para SIF e SGF na ausência de enzimas. O SIF foi incluído por apresentar o mesmo valor de pH do PBS e SBF, e um valor de pH semelhante ao do SSF, mas com composições químicas mais simples, enquanto o fluido SGF é, por natureza, fortemente ácido. Diferenças claras entre a cinética de fotodegradação, o tempo de vida do estado tripleto e a geração de oxigênio singlete foram observadas, as quais, como veremos, não podem ser conectadas apenas a um efeito de pH. Os reagentes utilizados para a produção dos fluidos simulados estão presentes na Tabela 2.1. Com o objetivo de verificar se esse comportamento era mantido em outra classe de FS, fizemos os estudos da cinética de degradação do Azul de Metileno na presença do ABDA. Apesar de qualitativamente o resultado observado na Eritrosina se manter, efeitos adicionais foram observados, o que de alguma forma comprometeu uma análise mais detalhada. Além disso, para esse corante, não tivemos acesso a uma montagem de LT com lasers apropriados para a excitação e prova do efeito.



Fluido	Reagentes	Concentração (g/L)
SBF	<i>NaCl</i>	8.035
	<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	0.355
	<i>KCl</i>	0.225
	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O</i>	0.231
	<i>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	0.311
	<i>HCl – 1.0M</i>	39 mL
	<i>CaCl<sub>2</sub></i>	0.292
	<i>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	0.072
	<i>TRIS</i>	6.118
SSF	<i>NaCl</i>	1.0
	<i>C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>2</sub></i>	2.0
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0.4
	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	0.2
	<i>MgCl<sub>2</sub></i>	0.05
	<i>KCl</i>	1.0
	<i>NaF</i>	0.002
	<i>CMC</i>	2.0
PBS	<i>NaCl</i>	8.0
	<i>KCl</i>	0.2
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	1.44
	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	0.24
SIF	<i>NaOH</i>	0.896
	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	6.805
SGF	<i>HCl – 1.0M</i>	7 mL
	<i>NaCl</i>	2

Tabela 2.1: Reagentes para a preparação dos simuladores de fluidos corporais em água destilada e deionizada.

Os compostos Azul de Metileno ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ), Eritrosina B ( $C_{20}H_{14}I_4Na_2O_5$ ) e 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA;  $C_{22}H_{18}O_8$ ) foram obtidos da Sigma Aldrich Inc. As soluções de estoque foram preparadas para todas as soluções estudadas. Soluções nas concentrações necessárias para cada técnica foram preparadas antes de cada medição. Concentrações adequadas de Eritrosina e Azul de Metileno foram selecionadas para que fosse obtida uma boa sensibilidade das técnicas correspondentes. Nas medidas dos espectros de absorção e emissão, a concentração de Eritrosina e Azul de Metileno foi de  $5 \mu\text{M}$ . Já com as técnicas de LT e de transmissão dependente do tempo, as medidas foram feitas somente na Eritrosina por não haver lasers de comprimentos de onda correspondentes para a medida do Azul de Metileno. Na técnica de LT foi usada uma concentração de 100nM de Eritrosina. A solução estoque de ABDA (2 mM) foi dissolvida em 2 mL de DMSO e, em seguida, foi colocada no ultrassom por 10 min. Esta solução estoque foi adicionada a soluções de Eritrosina e Azul de Metileno a fim de obter uma absorbância significativa na região em torno de 380nm ( $75 \mu\text{L}$  de ABDA/3 mL de solução) [123]. A preparação do SBF foi feita seguindo-se o procedimento padrão, usando água ultrapura tipo I (Milli-Q Sistema de purificação de água de referência) [124]. O SSF foi adquirido da Farmácia de Manipulação *Medicinal* (Maringá-Brasil). As soluções

de SIF e SGF foram feitas pelo departamento de Química. A solução de PBS foi feita utilizando o procedimento padrão.

## 2.1 Espectrofotômetro UV/VIS

Neste trabalho, foram utilizadas algumas técnicas ópticas no auxílio para a caracterização das amostras. Dentre elas, os espectros para a cinética de fotodegradação foram medidos utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS modelo Cary 50 (Figura 2.1). O aparelho funciona segundo o esquema simplificado na Figura 2.2. A luz é emitida por uma fonte policromática e passa por uma grade de difração, separando assim os espectros da luz; depois, passa por uma fenda para selecionar o comprimento de onda a ser medido. Esse raio monocromático incide na amostra com intensidade  $I_0$  e após passar por ela, como a amostra absorve uma fração desta luz, sai com intensidade  $I$ . Então, um fotodetector mede a diferença entre  $I_0$  e  $I$ . A absorbância é obtida pela relação  $A = \text{Log}_{10}(I_0/I)$ . Uma das vantagens deste aparelho é a de que a luz que passa na amostra é modulada, de modo que a luz externa não é capaz de causar interferências nas análises, o que permite o monitoramento da variação do espectro de absorção durante o processo de fotoativação.



Figura 2.1: Espectrofotômetro UV/VIS modelo Cary 50 utilizado.

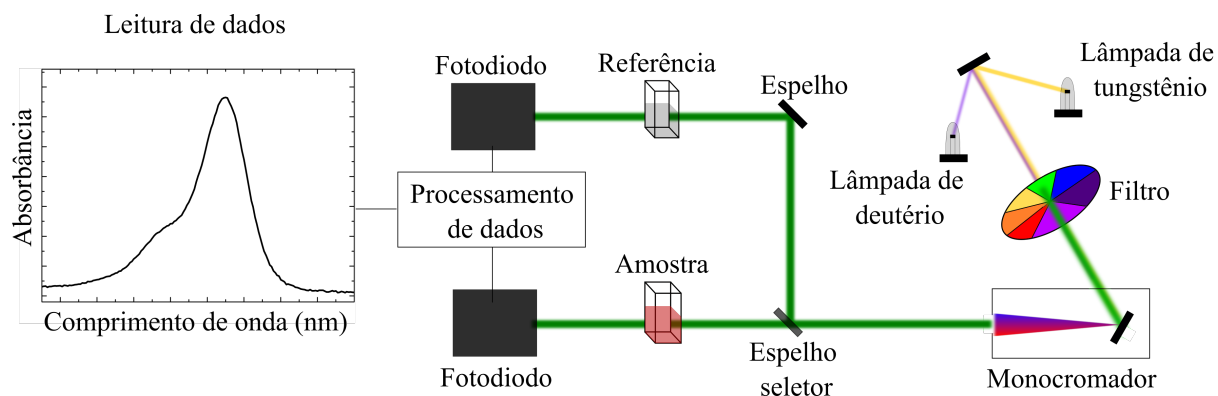


Figura 2.2: Esquema simplificado do funcionamento do espectrofotômetro utilizado [125].

O processo de fotoativação foi realizado empregando-se um sistema de LED verde (Figura 2.3) para as amostras de Eritrosina e um vermelho (Figura 2.4) para o Azul de Metileno. As amostras (depositadas em uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas e espessura de 1 cm) foram colocadas em um sistema de controle de calor, onde foram irradiadas uniformemente por cima com irradiância constante ( $17.6 \text{ mW/cm}^2$  para Eritrosina e  $33.8 \text{ mW/cm}^2$  para o Azul de Metileno). Os espectros de irradiância (Figura 2.5) foram adquiridos a partir de um espectrorradiômetro (Gooch & Housego, OL 756) acoplado a uma fibra óptica (Gooch & Housego, OL 730 7q-1.0) e uma esfera integradora de 50,8 mm de diâmetro (Gooch & Housego, IS-270).

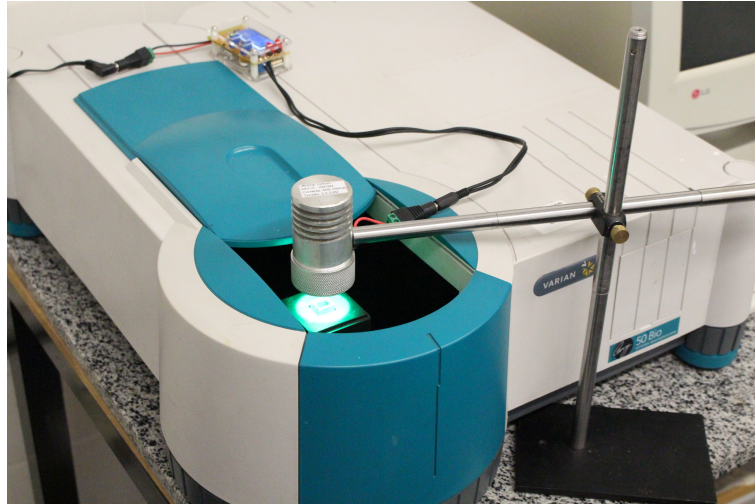


Figura 2.3: Espectrofotômetro UV/VIS modelo Cary 50 com sistema de iluminação com LED verde.

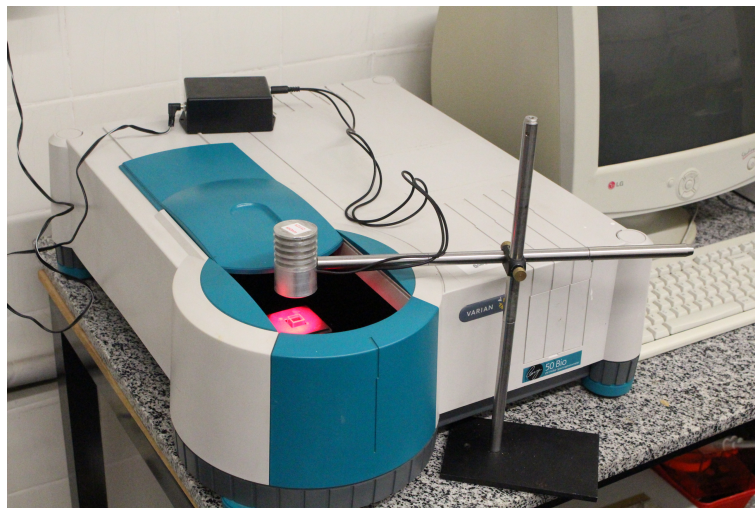


Figura 2.4: Espectrofotômetro UV/VIS modelo Cary 50 com sistema de iluminação com LED vermelho.

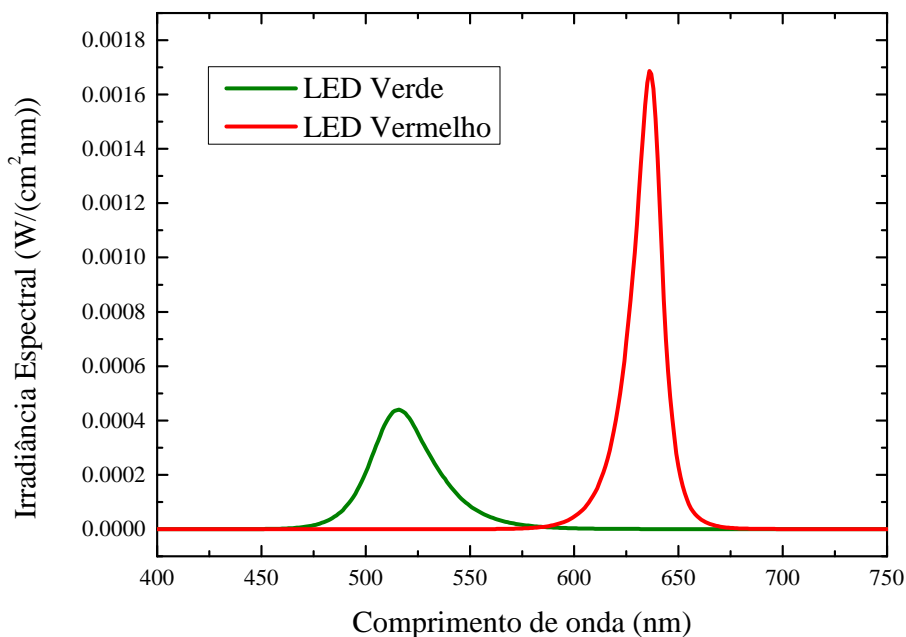


Figura 2.5: Espectros de irradiância do LEDs utilizados.

A geração de oxigênio singlete pela fotoativação de Eritrosina e Azul de Metileno foi obtida pelo monitoramento da diminuição da região de absorção de ABDA. ABDA é um derivado do antraceno que pode ser convertido em seu endoperóxido correspondente depois de ser oxidado por  $^1O_2$  (Figura 2.6), o que resulta na diminuição de seus picos de absorvância.

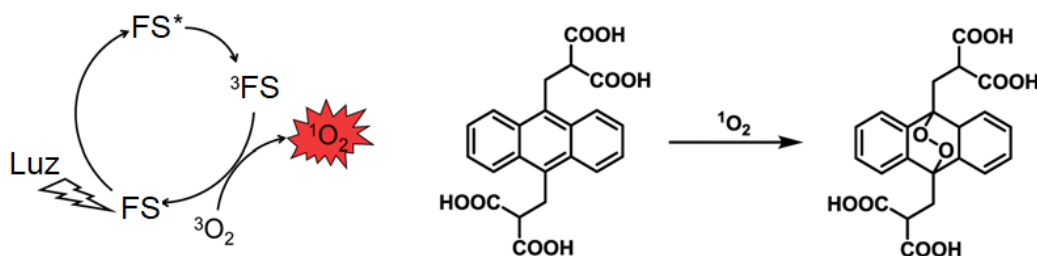


Figura 2.6: Diagrama de geração de  $^1O_2$  e reação química do ABDA com  $^1O_2$  [118].

O decaimento dos picos de absorção do ABDA tem uma correlação direta com a quantidade de  $^1O_2$  gerada. No entanto, a taxa de geração de oxigênio singlete ( $k_D$ ) obtida pelo decaimento do pico do ABDA não pode ser comparada de uma forma direta entre os fluidos, visto que esta também é dependente do número de fótons absorvidos. Como o espectro de absorção varia durante o processo de fotodegradação dos FS, para obtermos uma eficiência de geração de oxigênio singlete precisamos levar em consideração o número de fótons absorvidos, que na presença de fotobranqueamento é dado por [126]:

$$N_{ABS} = \frac{1}{hcN_a} \int_0^t \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} P_e(\lambda) [1 - 10^{-Abs(\lambda)}] e^{-k_d\tau} \lambda d\lambda d\tau, \quad (2.1)$$

na qual  $t$  é o tempo de iluminação,  $h$  é a constante de Plank,  $c$  é a velocidade da luz,  $N_a$  é a constante de Avogadro,  $\lambda_{i,f}$  é o comprimento de onda inicial/final, e  $P_e = \int I dA$

é a potência espectral, ou a irradiância espectral integrada sobre a área iluminada. A eficiência fotodinâmica química é dada por  $\gamma_{\Delta} = k_D/N_{ABS}$ .

## 2.2 Espectrofluorímetro

Os espectros de emissão foram medidos usando um espectrômetro de fluorescência (Perkin Elmer, modelo LS45). A fluorescência é um processo que envolve a emissão de luz de qualquer substância nos estados excitados. A absorção e emissão são ilustradas no diagrama de Jablonski. Um fluoróforo vai para um estado eletrônico ou vibracional superior a partir do estado fundamental após a excitação. As moléculas excitadas podem voltar ao estado fundamental na forma de emissão de fluorescência. A maioria dos espectrofluorímetros funcionam principalmente em quatro partes: fontes de luz, monocromadores, filtros ópticos e detector, como mostra a Figura 2.7 [127].

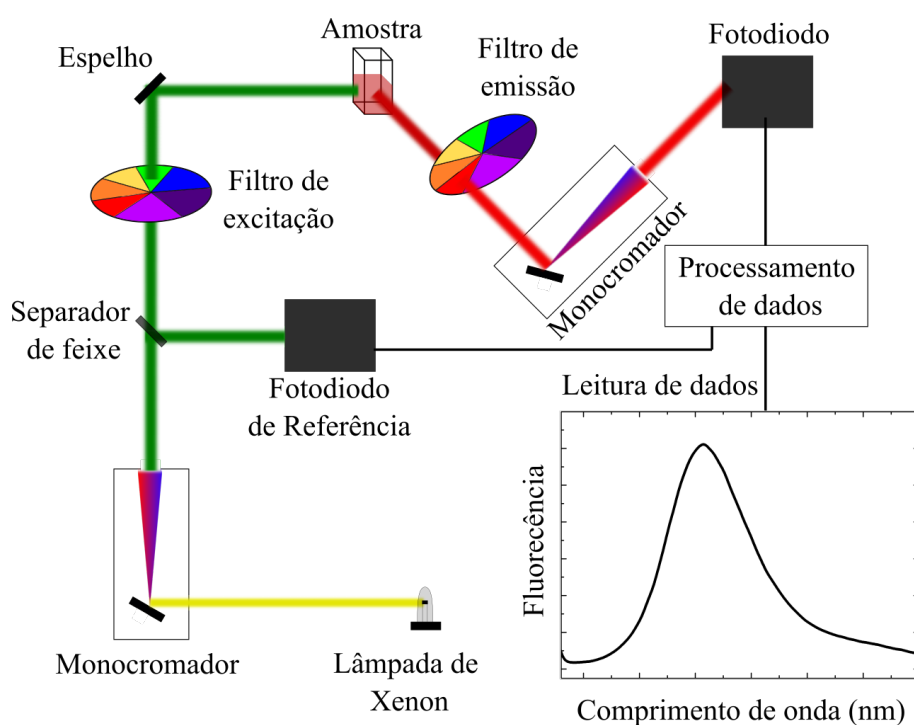


Figura 2.7: Esquema simplificado do espectrofluorímetro utilizado [125, 127].

As amostras de Eritrosina e Azul de Metileno foram medidas numa concentração de  $5\mu\text{ M}$  sem a presença do ABDA.

## 2.3 Tempo de Vida do Estado Tripleto

Para as medidas do tempo de vida do estado tripleto da eritrosina numa concentração de  $5\mu\text{ M}$ , foi utilizado um laser pulsado como laser de excitação (Nd-Yag Brilliant B Quantel) e um laser de prova (He-Ne Unifase, modelo 11335p). Utilizamos um fotodiodo com filtro (Newport, modelo 818-BB-22) para monitorar a variação na transmitância do laser de prova. Para evitar efeitos de lente térmica, foi utilizada uma lente focando o laser de prova na amostra, posicionando o forno resistivo no foco da lente. As amostras eram depositadas em uma cubeta com faces paralelas de quartzo. Uma segunda lente 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. Depois da amostra, o feixe de excitação foi direcionado para outro fotodiodo para acionar o início da medida quando a amostra era exposta ao laser de excitação. O sinal pré-amplificado foi adquirido por um osciloscópio digital (Tektronix, modelo DPO4102B). Neste aparato experimental, o raio do feixe de excitação é muito maior que o de prova, garantindo que todas as moléculas na região do laser de prova fossem para o estado excitado;  $\omega_{0e} = 143.5\mu m$  e  $\omega_{0p} = 2.3\mu m$ , respectivamente. Uma representação do aparato experimental pode ser observada na Figura 2.8.

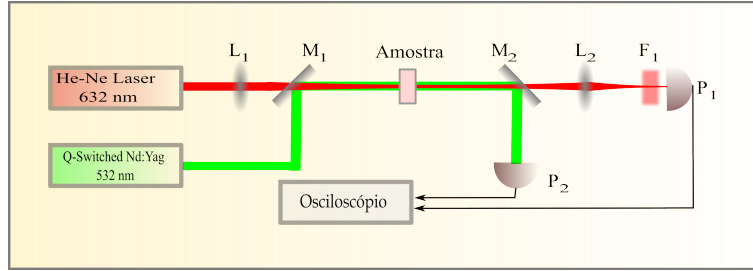


Figura 2.8: Aparato experimental de transmitância resolvida no tempo; aqui,  $L_1$  e  $L_2$  são as lentes;  $M_1$ ,  $M_2$  e  $M_3$  são os espelhos;  $P_1$  e  $P_2$  são os fotodiodos e  $F_1$  é o filtro.

## 2.4 Lente Térmica

Na técnica de LT de feixe duplo de modo descasado, dois lasers Gaussianos  $TEM_{00}$  contínuos foram usados para gerar e testar o efeito de LT. Quando a fotorreação ocorre durante a irradiação do laser de excitação, a absorção óptica da amostra pode mudar, seguido pela mudança na produção de calor. Se a quantidade de calor diminuir, a amplitude do efeito de lente térmica torna-se menor. Esta dependência temporal do sinal LT nos dá informações importantes sobre os processos de fotorreação. Além disso, a mudança no rendimento de fluorescência também afeta a quantidade de calor gerado, o que induz à mudança na amplitude do sinal da LT. Como a fluorescência e o fotobranqueamento ocorrem em diferentes escalas de tempo, ambos os efeitos podem ser detectados.

Na configuração deste trabalho, como feixes de laser de excitação e de prova, foram usados um laser Coherent, modelo Verdi G a 532 nm, e um laser He-Ne Thorlabs, modelo HNL225R a 632,8 nm, respectivamente. O laser de excitação foi focado na amostra por uma lente com distância focal  $f_1 = 30cm$ . O feixe de prova passa pela amostra, quase colinear com o laser de excitação, sendo utilizada uma lente de quartzo com distância focal  $f_2 = 10cm$  para focar o feixe de prova a uma distância  $z_1$  da amostra. O ângulo entre o laser de prova e o laser de excitação é menor que  $1,5^\circ$ , a fim de permitir o uso do modelo colinear. O tempo de exposição do feixe de excitação foi controlado por um obturador mecânico (SRS, modelo SR470). A intensidade da parte central do feixe de prova foi medido por um conjunto pinhole-filtro-fotodiodo (Thorlabs, modelo DET100A / M), posicionado em  $z_2 = 500cm$  da amostra. A medição da intensidade do feixe de prova foi acionada por um fotodiodo (Thorlabs, modelo DET10A / M). Os sinais dos fotodiodos foram registrados por um osciloscópio digital (Tektronix, modelo DPO4102B). As amostras foram colocadas em uma cubeta de quartzo com espessura  $L = 0,5mm$ . A cubeta foi mantida a  $25^0C$  por meio de um forno resistivo. A representação esquemática da configuração da LT é apresentada na Figura 2.9.

A vantagem da técnica LT é sua alta sensibilidade, o que a torna um método apropriado para detectar a cinética de reações em soluções muito diluídas (faixa de concentrações submicromolares), as quais não podem ser acessadas por técnicas fotométricas disponíveis comercialmente. O sinal TL é dado por [111]

$$\frac{I(t)}{I(0)} = \frac{\left| \int_0^\infty e^{-(1+iV)g-i\Phi(g,t)} dg \right|^2}{\left| \int_0^\infty e^{-(1+iV)g} dg \right|^2}, \quad (2.2)$$

no qual  $\Phi(g, t)$  é a mudança de fase induzida. Na presença de fotodegradação, a mudança de fase para a reação de primeira ordem pode ser dada aproximadamente por [114]

$$\Phi(g, t) = \frac{\theta_T L}{t_c} \int_0^t \beta(\tau) \frac{1 - e^{-2m\tau/(1-2\tau/t_c)}}{(1 - 2\tau/t_c)} d\tau, \quad (2.3)$$

com  $\beta(t) = \beta_0[(1 - \epsilon)e^{-k_R t} + \epsilon] + \beta_{sol}$ , em que  $\beta_0$  é o coeficiente de absorção óptica do reagente e  $\epsilon = \epsilon_P/\epsilon_R$  é a razão entre os coeficientes de atenuação molar do produto e do reagente, e  $\beta_{sol}$  é a absorção óptica do solvente. Para sistemas de reação mais complexas, como no fotobranqueamento de FS usados em TFD, apenas soluções numéricas podem ser obtidas. Neste caso, devido ao grande número de processos, o ajuste multiparamétrico leva a uma grande flutuação nos resultados. Detalhes do modelo de LT na presença de fotorreação são mostrados no Apêndice A. Aqui, usamos as Eqs. (2.2) e (2.3) para obter uma constante  $k_R$  efetiva que dá apenas resultados qualitativos sobre a taxa de fotobranqueamento para baixa concentração do fotossensibilizador.

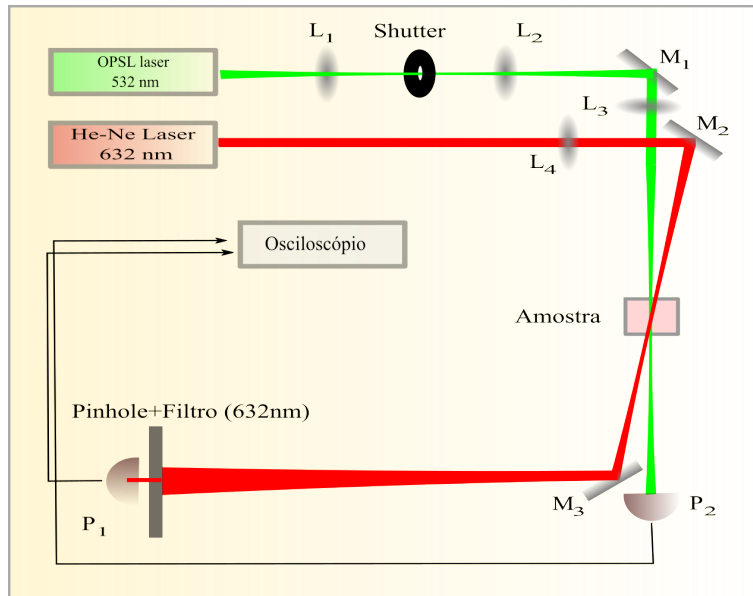


Figura 2.9: Esquema da montagem utilizada neste trabalho; aqui,  $L_1$ ,  $L_2$  e  $L_3$  são as lentes;  $M_1$ ,  $M_2$  e  $M_3$  são os espelhos e  $P_1$  e  $P_2$  são os fotodiodos. Os parâmetros geométricos são:  $\omega_{0e} = 47\mu m$ ,  $\omega_{1P} = 426,5\mu m$  e  $V = 10,06$ .

# Capítulo 3

## Resultados

Neste capítulo, vamos descrever os resultados do estudo do processo de fotoativação da Eritrosina e as correspondentes taxas de fotodegradação, geração de oxigênio singlete e tempo de vida de estado tripleto. Um estudo equivalente para o caso do Azul de Metileno não foi possível por conta de alguns aspectos que discutiremos mais adiante. No entanto, como de uma forma qualitativa as propriedades observadas na solução de Eritrosina também apareceram no caso do Azul de Metileno, estes resultados serão apresentados e discutidos.

### 3.1 Fotoativação da Eritrosina em Fluidos Biológicos Simulados

Os espectros de absorção e emissão de Eritrosina em diferentes soluções são mostrados na Figura 3.1a e 3.1b, respectivamente. A Eritrosina em PBS, SIF e SBF apresenta espectros de absorção e emissão semelhantes. No caso do SSF, há uma pequena diminuição na fluorescência e absorção, além de um leve deslocamento do pico dos espectros para um comprimento de onda maior. Para SGF, há uma extinção total da absorção e emissão do FS.

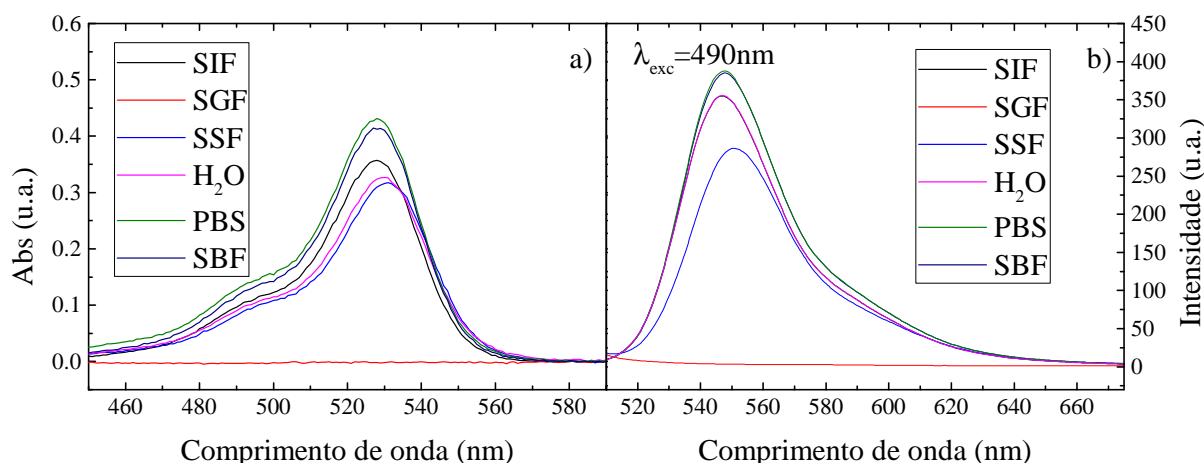


Figura 3.1: (a) Espectros de Absorção inicial e (b) espectros de emissão para a Eritrosina em todos os fluidos corporais utilizados.



### 3.1.1 Cinética de Fotoativação da Eritrosina

Como já dito, o ABDA foi utilizado para a observação da produção de  $^1O_2$  a partir da fotoativação da Eritrosina. O ABDA apresenta um pico de absorção máxima em torno de 380nm, em adição a dois picos próximos, os quais decrescem ao interagir com o  $^1O_2$  produzido pelo corante. Este comportamento de decrescimento da intensidade dos picos de absorção do ABDA só ocorre de forma significativa na presença do corante em adição de luz, e, portanto, pela produção de  $^1O_2$ , como veremos a seguir.

Com o propósito de comparar as taxas de produção de  $^1O_2$  e a fotodegradação entre os fluidos, foram extraídas as cinéticas de degradação a partir dos espectros de absorção nos comprimentos de onda de 380 nm e 532 nm, para soluções de Eritrosina nos diferentes fluidos estudados. A Figura 3.2 mostra as cinéticas de fotoativação para Eritrosina em PBS. Na Figura 3.2.a, temos a cinética de controle obtida pela evolução temporal dos espectros na ausência de luz. Como observado, nesta condição, nenhuma mudança significativa é observada nas regiões de absorção do ABDA e da Eritrosina. Na Figura 3.2.b, temos a cinética de fotoativação na presença de ABDA+Eritrosina na presença de luz. Note-se que as bandas de absorção tanto do ABDA quanto da Eritrosina sofrem um decaimento causado pela ação do  $^1O_2$  no ABDA e o fotobranqueamento da Eritrosina. Na Figura 3.2.c, foi refeita a cinética de fotoativação da Eritrosina na ausência do ABDA para mostrar que o ABDA não interfere de forma significativa na fotodegradação da Eritrosina. Finalmente, na Figura 3.2.d, observamos a cinética na presença do ABDA e luz e na ausência da Eritrosina. Este resultado mostra a conexão direta do decaimento do ABDA com a ação do  $^1O_2$ , sem nenhum efeito de fotodegradação do ABDA diretamente pela luz. A Figura 3.3 mostra a evolução temporal dos picos do ABDA em 380 nm e a Figura 3.4, a da Eritrosina em 532 nm para as cinéticas apresentadas na Figura 3.2. As cinéticas de controle para os outros fluidos mostraram resultados similares, ocorrendo o decaimento dos picos do ABDA somente na presença Eritrosina+Luz.

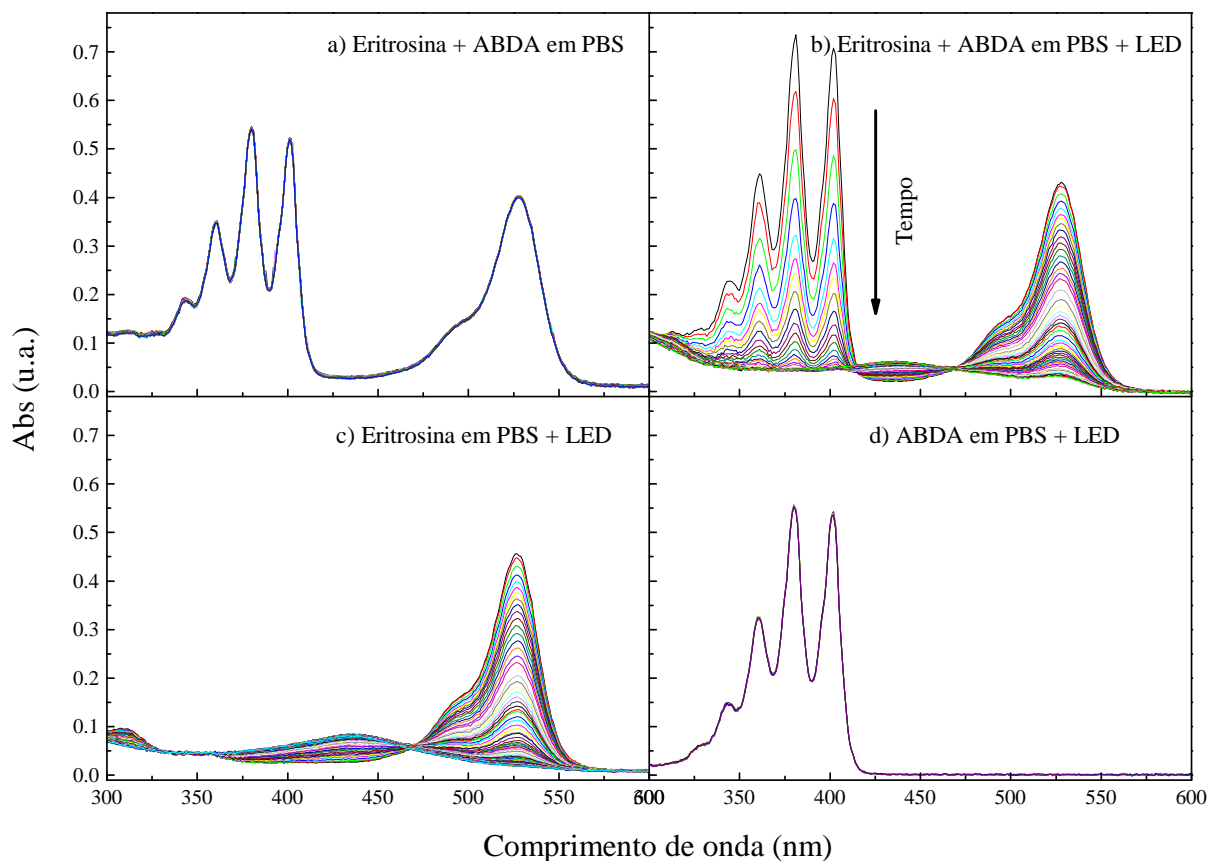


Figura 3.2: Espectros para as cinéticas de absorção em função do tempo de degradação.

Na Figura 3.3, fica visível a necessidade do corante fotossensível com a luz para o decaimento do pico de absorção do ABDA em 380 nm. Sendo assim, estas cinéticas evidenciam que o decaimento do ABDA está relacionado com a taxa de produção de  $^1O_2$ , visto que não há decaimento da absorção em 380 nm com Eritrosina+ABDA sem a luz LED ou ABDA+luz na ausência do FS.

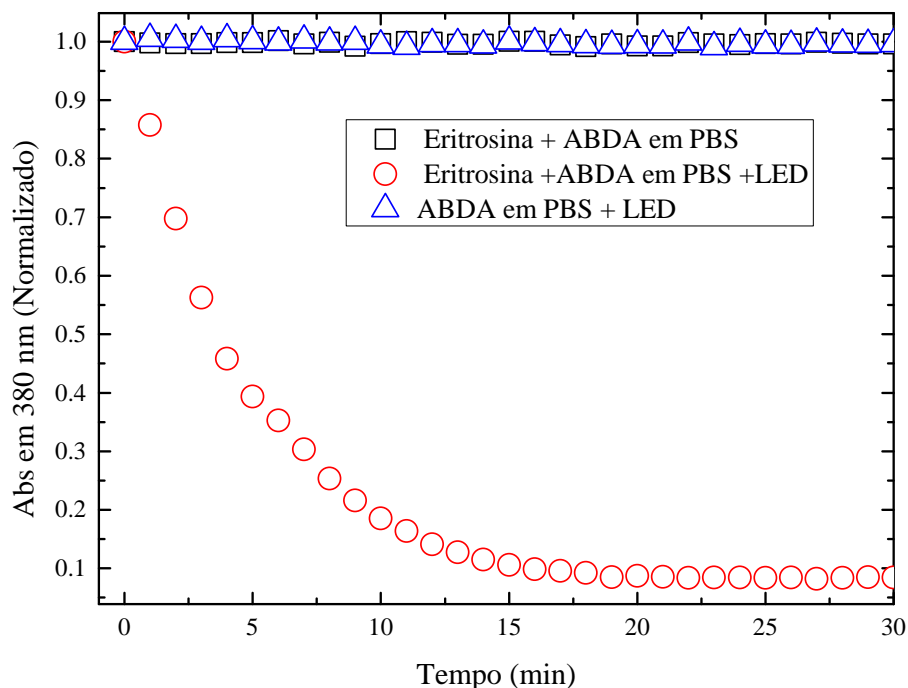


Figura 3.3: Cinéticas em 380 nm referentes aos espectros da Figura 3.2.a, 3.2.b, 3.2.d.

É perceptível uma proximidade entre as cinéticas da Eritrosina+ABDA+LED e a Eritrosina+LED em 532 nm, como mostrado na Figura 3.4. A pequena diferença entre estas cinéticas se dá, provavelmente, pela interação entre ABDA e  $^1O_2$ , diminuindo assim a interação entre o corante e o  $^1O_2$ . Conforme a Tabela 1.2, temos vários processos que contribuem para a degradação dos FS, entre os quais está a interação FS+ $O_2$ . Como o ABDA consome parcialmente o  $^1O_2$  produzido na fotoativação da Eritrosina, isso justifica a ligeira redução da fotodegradação na presença do ABDA.

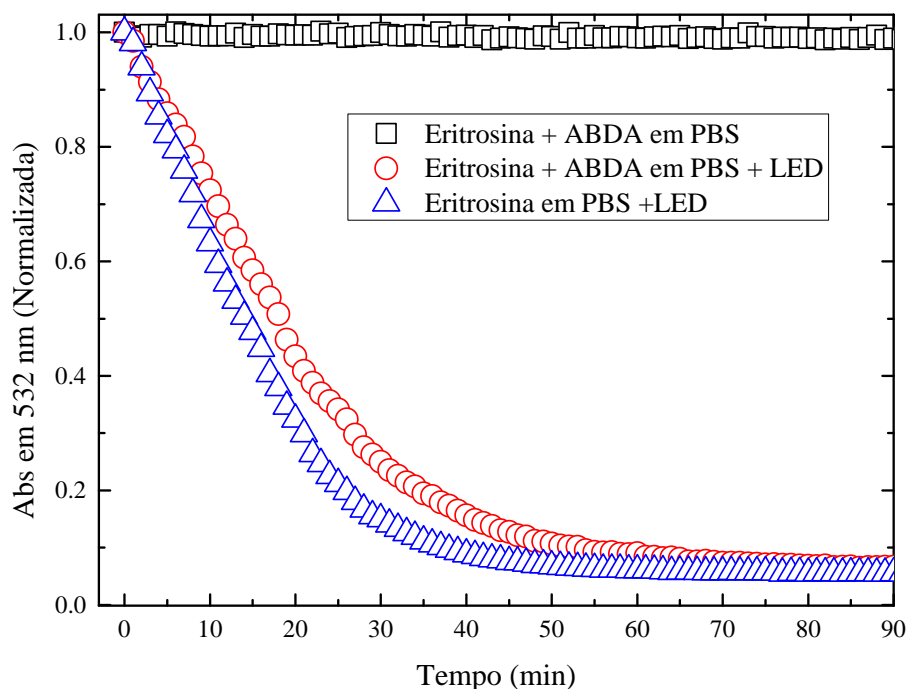


Figura 3.4: Cinéticas em 532 nm referentes aos espectros da Figura 3.2.a, 3.2.b, 3.2.c.

Para a comparação das taxas de produção de  $^1O_2$  ( $k_D$ ) e da fotodegradação ( $k_d$ ) entre os diferentes fluidos, foram extraídas as cinéticas de degradação a partir dos espectros de absorção presentes na Figura 3.5 para os comprimentos de onda de 380 nm e 532 nm, em PBS, SIF, SSF, SGF, SBF e  $H_2O$ . Há uma maior diferença de comportamento dos espectros de absorção do corante em SSF e SGF. No caso do SSF, não ocorreu a degradação completa do corante após um grande tempo de excitação, como no caso do PBS, SBF, SIF e  $H_2O$ . Já no caso do SGF, o espectro de absorção da Eritrosina não apresentou a mesma amplitude na mesma concentração de  $5\mu M$  utilizadas nas medidas. Isso se deve ao fato de que a Eritrosina apresenta uma espécie protolítica neutra em pHs ácidos, a qual possui uma baixa absorção óptica. O tautômero neutro predominante é a lactona (NEL). Essa espécie apresenta o rompimento da ressonância na região cromofórica (responsável pela absorção de luz - anel xantênico), extinguindo a absorção eletrônica (solução incolor) [128].

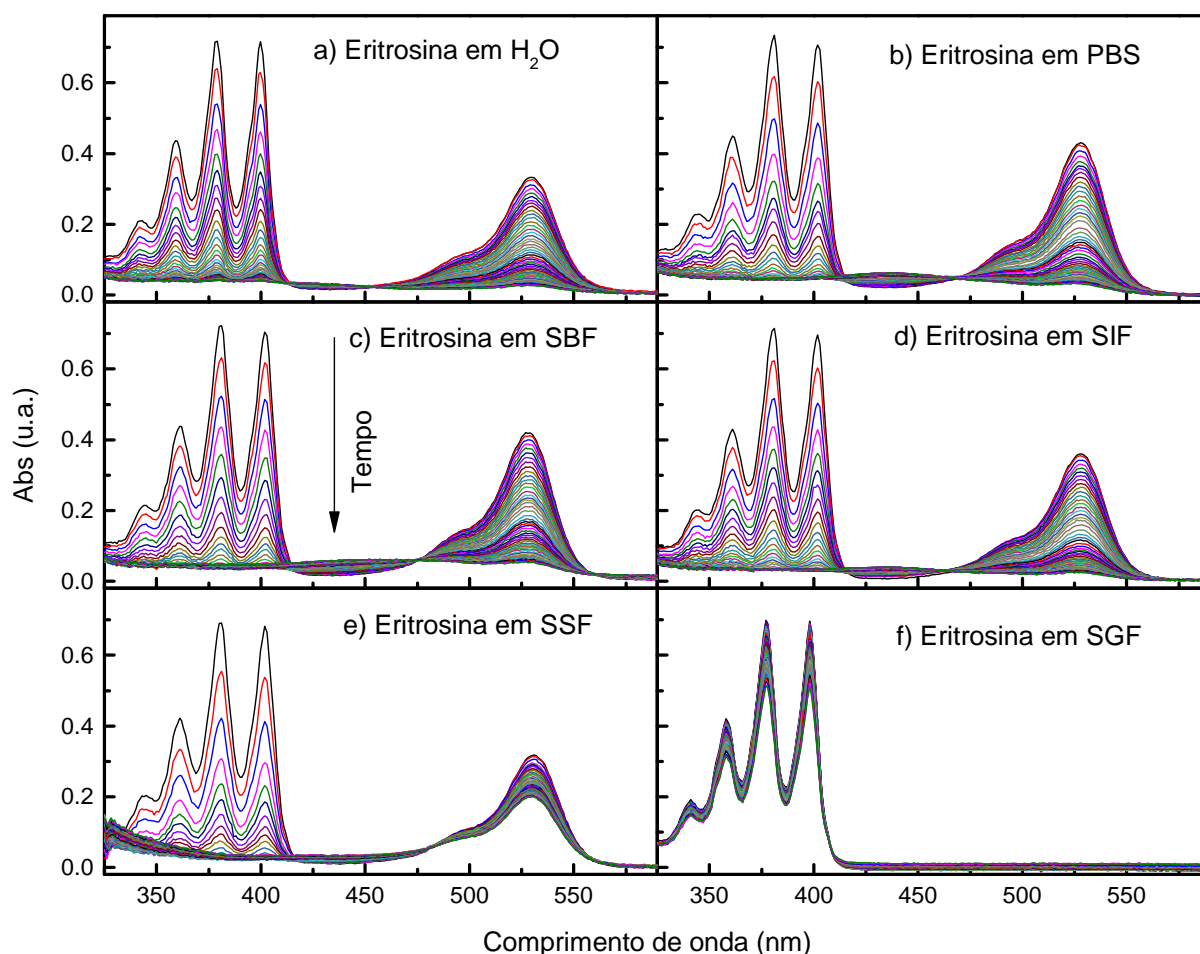


Figura 3.5: Espectros para as cinéticas de absorção em função do tempo de degradação pelo LED verde para Eritrosina em diferentes simuladores de fluidos corporais. Para todas as amostras a concentração de Eritrosina foi de  $5\mu M$ .

Podemos perceber a partir das cinéticas da Figura 3.6, uma diferença na taxa de fotodegradação da Eritrosina entre os meios, principalmente no SSF, que apresenta um fotobranqueamento mais lento. Como esperado, devido à baixa absorção óptica do corante, a foto-oxidação do ABDA em SGF foi muito lenta. Além disso, ao analisar as cinéticas da Eritrosina em SSF, podemos observar que houve uma diminuição significativa na degradação da Eritrosina, o que parcialmente explica a maior produção de  $^1O_2$ ,

numa taxa maior que no PBS, SBF, SIF SGF e  $H_2O$ . Como tivemos uma menor degradação no caso do SSF, o número de fótons absorvidos apresenta um menor decaimento ao longo da cinética, permitindo uma maior fotoativação do FS e a consequente geração de  $^1O_2$ .

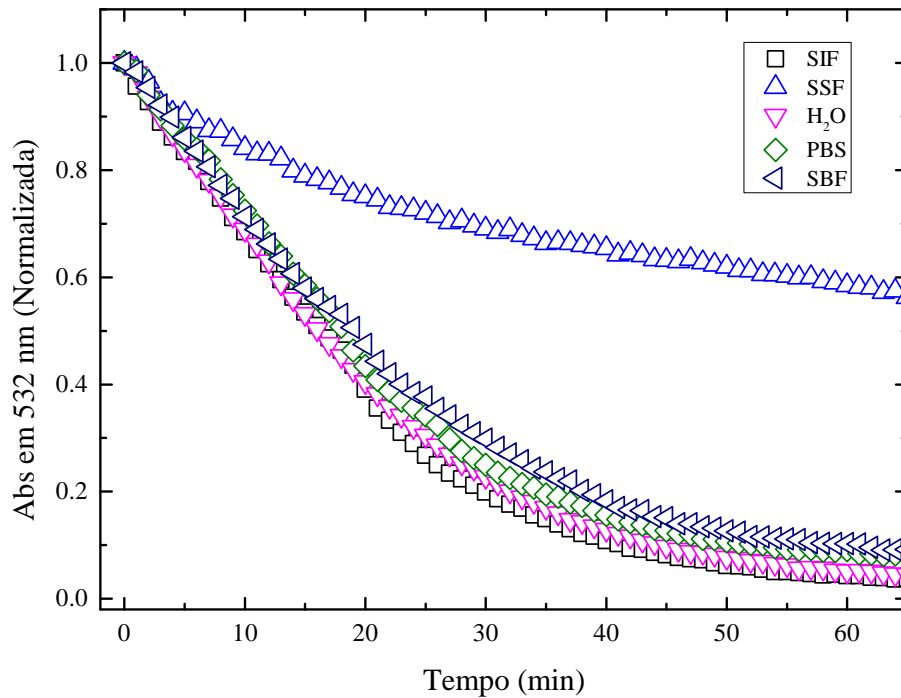


Figura 3.6: Fotobranqueamento da Eritrosina em 532 nm para diferentes simuladores de fluidos corporais.

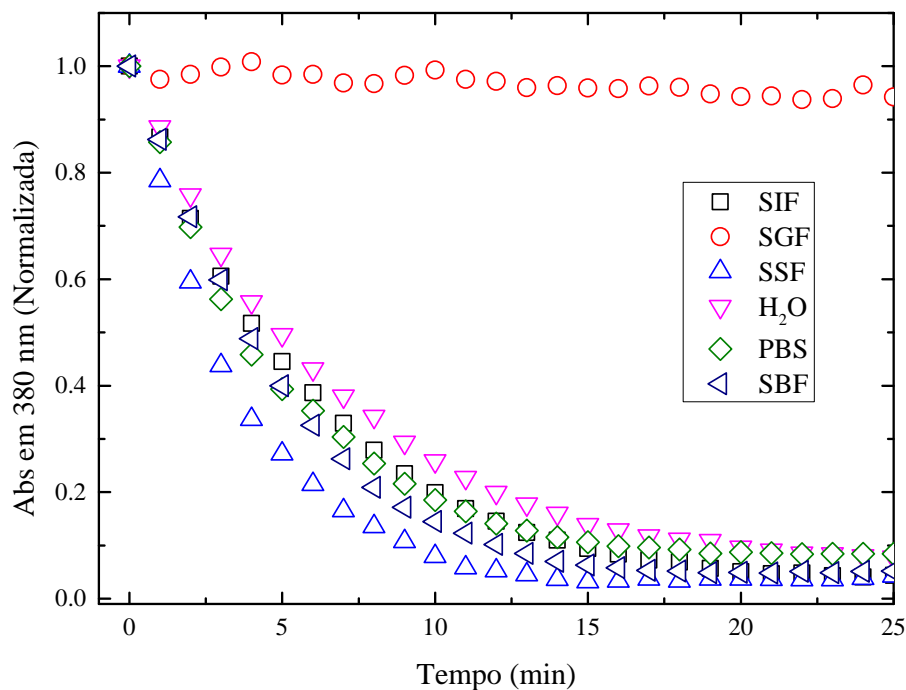


Figura 3.7: Foto-oxidação do ABDA em 380 nm pela fotoativação da Eritrosina em diferentes simuladores de fluidos corporais.

Como comentado anteriormente, a ausência de coloração da Eritrosina no SGF pode ser explicado pela condição ácida desta solução, na qual a Eritrosina assume a forma protolítica neutra. No entanto, a mudança na emissão, fotobranqueamento e geração de oxigênio singleto da Eritrosina em SSF, onde apenas a forma dianiônica é esperada, não é um efeito de pH, uma vez que seu pH é semelhante ao das outras soluções. Portanto, apenas os valores de pH não podem ser usados como base para discutir as diferenças observadas [128].

As taxas de fotodegradação ( $k_d$ ) e taxas de produção de oxigênio singleto ( $k_D$ ) foram obtidas a partir do ajuste exponencial do decaimento dos picos em 380 nm e 532 nm apresentados nas Figs. 3.6 e 3.7. Estes ajustes são mostrados no Apêndice C. A razão  $k_D/k_d$  foi usada por Arnaut et al. para determinar as atividades fotodinâmicas relativas contra as células cancerosas [129]. Calculando esta razão  $k_D/k_d$  para Eritrosina, observamos um aumento da eficiência da Eritrosina em SSF em comparação com os outros fluidos (Figura 3.8). Uma pequena mudança na tendência de fotobranqueamento é observada em torno de 10 min., que é semelhante ao tempo característico de consumo de ABDA. Enquanto o ABDA está reagindo com o  $^1O_2$ , o fotobranqueamento é governado principalmente pela interação corante-corante, pois o processo de fotodegradação Corante-Oxigênio é menor enquanto o ABDA está reagindo com o  $^1O_2$  em relação ao efeito após o consumo do ABDA. Depois de quase todo o ABDA ser consumido, os processos de corante-oxigênio e corante-corante contribuem para a fotodegradação de Eritrosina [130]. Como, na verdade, a tendência de fotodegradação da eritrosina observada na Figura 3.6 não é bem descrita por uma função exponencial simples, mas está relacionada aos diferentes processos que envolvem tanto o corante-corante, como corante-oxigênio e corante-inibidores, o ajuste exponencial é uma estimativa aproximada da taxa de fotodegradação. Aliás, como a absorvância apresenta variação durante o processo de fotoativação, a eficiência de geração de oxigênio singleto deve levar em consideração o número de fótons absorvidos,  $N_{ABS}$ . Como explicitado no capítulo anterior, a eficiência fotodinâmica química é dada por  $\gamma_\Delta = k_D/N_{ABS}$ . Para um tempo de  $t = 20$  min., o resultado para  $\gamma_\Delta$  é apresentado na Tabela 3.1. Como esperado, observamos uma eficiência maior para a Eritrosina em SSF do que nos outros fluidos estudados, tanto a partir dos valores de  $\gamma$ , quanto pela razão entre as taxas  $k_D/k_d$ .

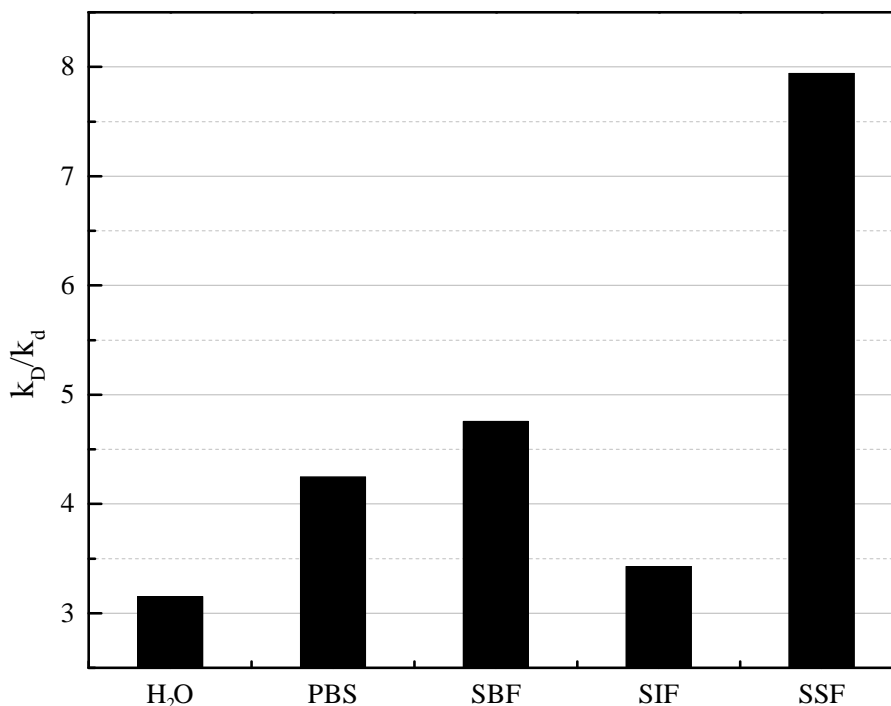


Figura 3.8: Razão entre a taxa de produção de oxigênio singleto ( $k_D$ ) e a taxa de foto-branqueamento da Eritrosina ( $k_d$ ).

### 3.1.2 Tempo de Vida do Estado Tripleto

Ao absorver a energia do fóton, a molécula do FS vai do estado fundamental para o estado excitado singleto mais baixo. Este estado pode fazer uma transição radiativa de volta para o estado fundamental na escala de tempo de nanosegundos, mas também pode fazer um cruzamento inter-sistema sem radiação, passando para o estado excitado tripleto mais baixo. Este, por sua vez, é um estado com tempo de vida na escala de  $\mu s$ . O FS no estado excitado apresenta maior absorção óptica na região de comprimento de onda de 632 nm do que o estado fundamental [131]. Desta forma, monitorando a variação temporal da transmitância em 632 nm, obtemos de forma direta o tempo de vida do estado tripleto. A Figura 3.9 mostra o transiente de transmitância dependente do tempo para Eritrosina em PBS com o ajuste correspondente pela função exponencial  $T(t) = A + Be^{-t/\tau}$ , sendo  $\tau$  o tempo característico de decaimento, correspondente ao tempo de vida do estado tripleto. O gráfico inserido na Figura 3.9, assim como a Tabela 3.1, mostra os valores do tempo de vida do estado tripleto e o correspondente desvio padrão obtido pelas médias em triplicata. Os transientes para todos os fluidos estudados são apresentados no apêndice B, Figura B.3. Como observado, o tempo de vida do SSF é menor do que o encontrado nas outras soluções, apresentando maior eficiência de transferência de energia do estado tripleto ao oxigênio molecular. Este resultado, em associação com os espectros de emissão, e a cinética de fotoativação dos espectros de absorção podem explicar por que a eficiência quântica da geração de oxigênio singleto foi maior do que em todos os outros casos. De um ponto de vista químico, ainda não ficaram claros os tipos de processos de interação com o solvente que são responsáveis por esse comportamento.

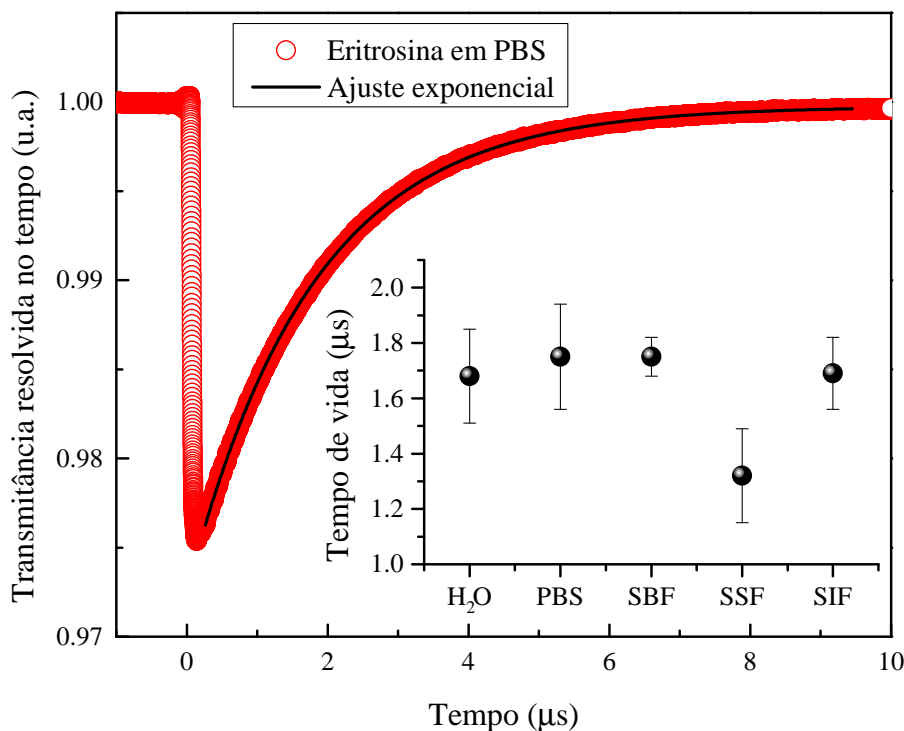


Figura 3.9: (Círculos abertos) Transientes de transmitância dependentes do tempo para a Eritrosina em PBS. (Linha contínua) O ajuste exponencial pela função exponencial  $T(t) = A + Be^{-t/\tau}$ . (Gráfico interno) Tempo de vida do estado tripleto correspondente para todos os fluidos.

### 3.1.3 Lente Térmica

A técnica LT foi empregada como ferramenta adicional no estudo da cinética de fotobranqueamento da Eritrosina em diferentes soluções. Como o processo de fotobranqueamento é dependente da interação corante-corante, ele pode ser afetado pela concentração do corante. Aqui, a alta sensibilidade da técnica LT é usada para investigar, em concentração sub-micromolar, os efeitos observados anteriormente na cinética de absorção. O transiente LT fornece informações de absorção e fluorescência, desde que seus tempos característicos sejam distintos dos da lente térmica para serem discriminados no transiente. O tempo de característica de fluorescência está relacionado à rápida decadência radiativa com uma escala de tempo de nanosegundos. O tempo de característica térmico é definido pela propriedade de difusividade térmica, que em fluidos é da escala de microsegundos. A fotodegradação está relacionada a um conjunto de reações entre corante-corante, corante-oxigênio etc. (Ver Tabela 1.2), e é regida pela propriedade de difusão de massa, o que implica uma escala de tempo maior do que o térmico. Nesse sentido, a mudança na fluorescência afeta basicamente a amplitude inicial do sinal LT. No entanto, essa amplitude também depende do coeficiente de índice de refração térmica ( $dn/dT$ ), da condutividade térmica e do coeficiente de absorção óptica inicial (Equação 2.3). Portanto, as amplitudes dos transientes de LT não podem ser comparadas facilmente sem uma determinação precisa de todos os parâmetros, o que implica a utilização de técnicas adicionais.

Em relação à difusividade térmica, visto que a concentração de corante é pequena, espera-se que a mesma não seja afetada pela presença do corante. Desta forma, podemos obter o valor de  $D_{th}$  a partir de medidas de LT nos solventes puros (Figura 3.10). Os valores obtidos para os diferentes fluidos são apresentados na Tabela 3.1. Esses valores



serão utilizados para diminuir o número de parâmetros de ajuste do sinal de LT na presença do FS, os quais, como mostrado na Figura 3.11, apresentam um comportamento característico de fotodegradação. Esse efeito na absorção óptica por fotodegradação afeta a evolução do sinal LT após o transiente inicial e pode dar informações sobre a taxa de fotobranqueamento. Vale notar que os transientes de LT para os solventes sem o corante apresentam comportamentos semelhantes, com valores próximos para a difusividade térmica. Somente observamos o SSF apresentar uma amplitude maior, o que provavelmente se relaciona a uma maior absorção nesse comprimento de onda. Desta forma, para mantermos as amplitudes similares, na Figura 3.10, mostramos os transientes com potência de excitação  $P = 900mW$ , com exceção ao SSF, cuja potência foi de  $100mW$ .

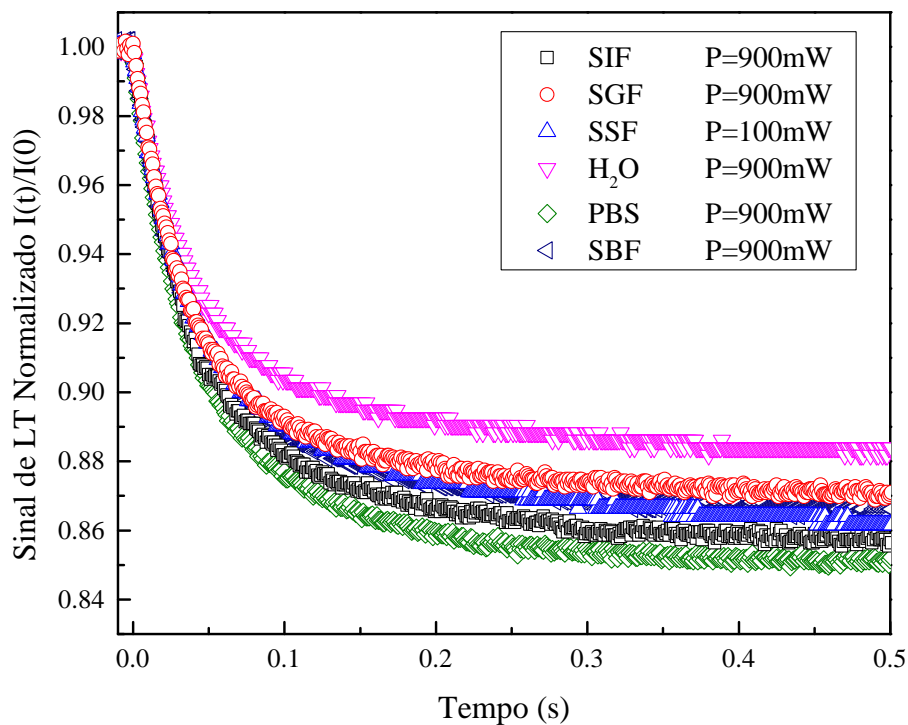


Figura 3.10: Sinal de LT para solventes puros.

A Figura 3.11 mostra os transientes LT normalizados para os fluidos corporais simulados na presença de Eritrosina para a potência de excitação  $P = 100 mW$ . Como a Eritrosina em SGF apresenta uma absorção óptica menor que a dos outros fluidos, o sinal LT foi obtido com  $P = 700 mW$ . As curvas pontilhadas na Figura 3.11 mostram o sinal térmico esperado na ausência de fotodegradação. A curva experimental (círculo aberto) mostra que, inicialmente, a amplitude do sinal LT diminui devido ao efeito inicial de LT. Depois disso, a diminuição na absorção devido à fotodegradação ocorre, diminuindo a amplitude dos transientes e reduzindo a concentração de espécies absorventes na região excitada. Observe que as taxas de fotobranqueamento na Eritrosina em água, PBS, SIF e SBF são semelhantes, o que é indicado pela linha sólida guia na Figura 3.11. Lentamente, um aumento no sinal LT é observado para Eritrosina em SSF, indicando um fotobranqueamento menor do que na água, PBS, SIF e SBF, estando, assim, de acordo com os resultados dos espectros de absorção cinética apresentados na Figura 3.6. Para a solução de Eritrosina em SGF, o resultado confirma que em condições ácidas, não é observada fotoativação significativa, e os transientes se assemelham ao comportamento térmico puro, estando de acordo com os resultados das demais técnicas. Todos os transientes para so-

luções na presença de Eritrosina com diferentes potências de excitação são mostrados na Figura 3.12.

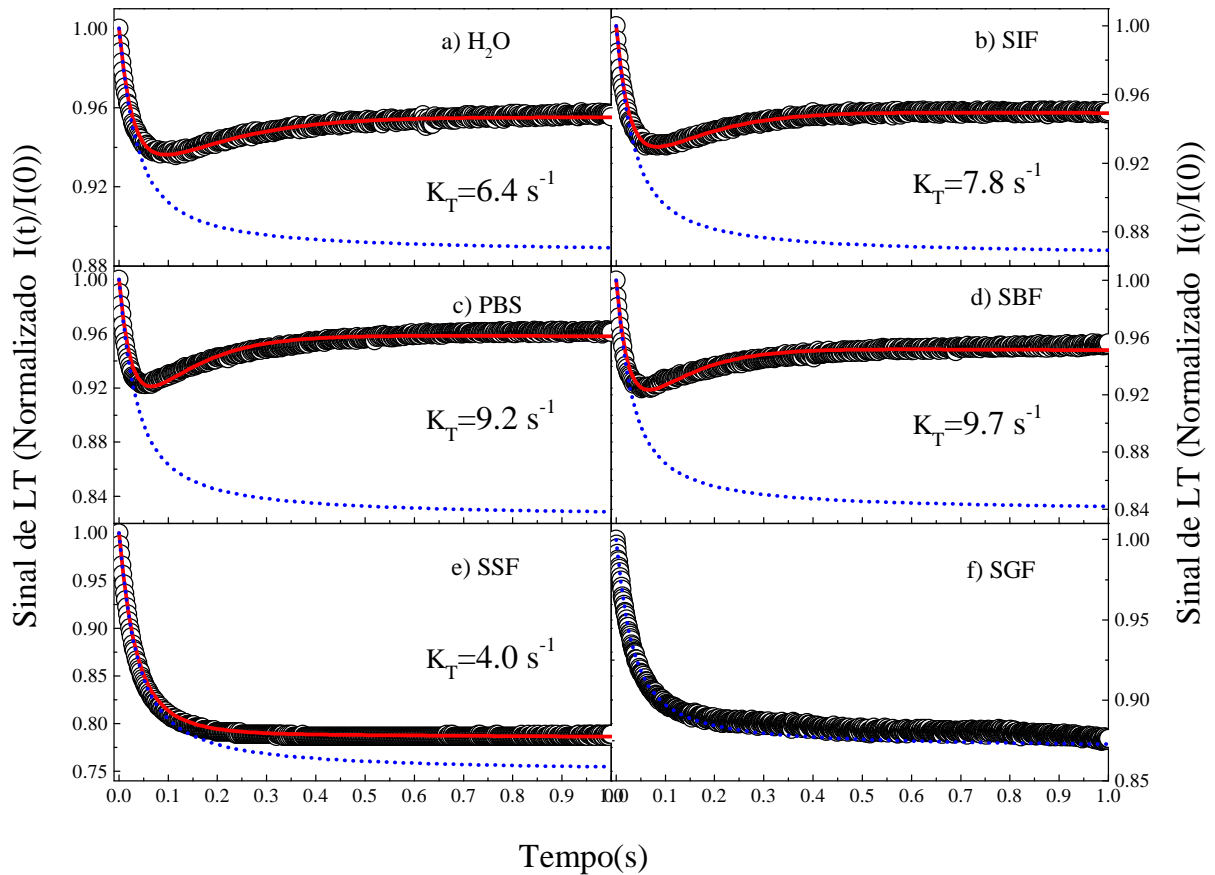


Figura 3.11: Transientes de LT normalizados dos fluidos corporais simulados na presença de Eritrosina e seus ajustes utilizando a equação 2.2. As curvas pontilhadas representam o sinal térmico esperado. A potência de excitação é de  $P_e = 100mW$ , com exceção para Eritrosina em SGF com  $P_e = 700mW$ . A concentração de Eritrosina é de  $100 nM$  para todas as soluções.

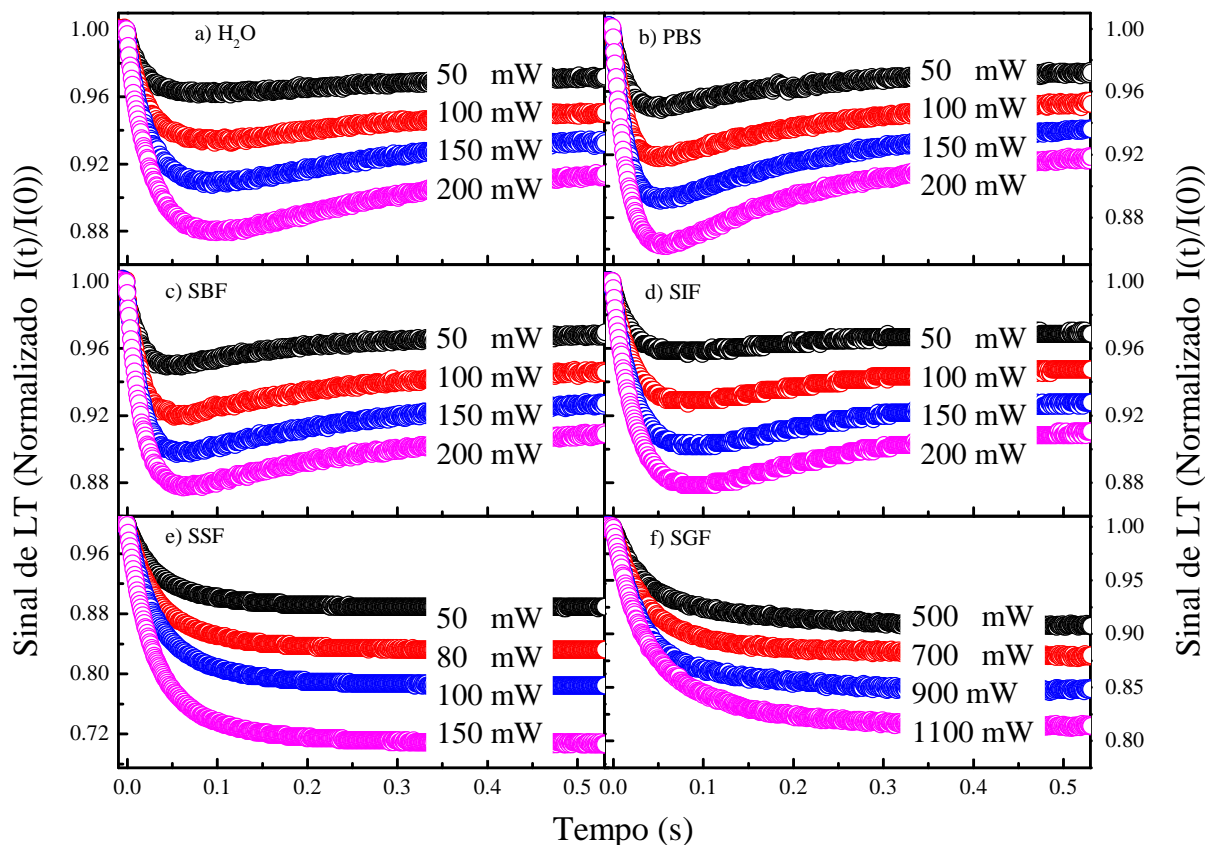


Figura 3.12: Transientes de LT em diferentes potências de excitação para a Eritrosina nas diferentes soluções estudadas.

Vale lembrar que a técnica LT, na presença de reação fotoquímica, pode ser descrita analiticamente e pode fornecer informações quantitativas apenas no caso de uma reação de primeira ordem [114, 132]. No entanto, o fotobranqueamento pode ocorrer por vários mecanismos diferentes e, de um ponto de vista geral, podendo ser considerados de alta complexidade, sendo que a dinâmica de fotodegradação não tem um comportamento bem descrito por exponenciais simples ou duplas. O fotobranqueamento de sensibilizadores resulta em radicais semi-reduzidos ou formas semi-oxidadas, em que o papel de cada mecanismo acima depende das concentrações relativas dos sensibilizantes, oxigênio e inibidores. Apesar da solução numérica ser possível, o número de parâmetros e interações na reação fotoquímica é muito grande, o que provavelmente não levaria a resultados consistentes [130, 133]. Por este motivo, faremos uma análise somente qualitativa dos resultados, e o parâmetro  $K_T$  representando uma taxa global aproximada para o processo de fotobranqueamento observado. Neste sentido, apesar de não termos uma descrição completa dos processos, a técnica de LT pode ser usada como uma ferramenta adicional para detectar a cinética de reações em soluções muito diluídas, alcançando concentrações submicromolares, as quais não podem ser acessadas por técnicas fotométricas disponíveis comercialmente.

De uma forma resumida, observamos pelos resultados anteriores que o processo de fotoativação da Eritrosina apresentou comportamento distinto para o SSF e SGF. O caso do SGF somente confirma o que era esperado para a Eritrosina em meio fortemente ácido. Por outro lado, o SSF apresentou uma eficiência de geração de oxigênio singleto, fotodegradação e tempo de vida do estado tripleto diferenciados, o que não pode ser explicado somente pelo pH. Com o objetivo de entender se esse efeito era exclusivo à

Solução	Tempo de vida do estado tripleto	$pH^a$	$D_{th}^b$	$k_D/k_d$	$\gamma_\Delta$
	$\mu s$		$\times 10^{-7} m^2/s$		
H2O	$1.7 \pm 0.2$	6.9	$1.46 \pm 0.03$	3.2	131.3
PBS	$1.8 \pm 0.2$	7.4	$1.40 \pm 0.05$	4.2	149.6
SBF	$1.8 \pm 0.1$	7.4	$1.52 \pm 0.04$	4.8	151.0
SIF	$1.7 \pm 0.1$	7.4	$1.46 \pm 0.03$	3.4	147.1
SSF	$1.3 \pm 0.2$	6.7	$1.53 \pm 0.07$	7.9	231.5
SGF		1.2	$1.33 \pm 0.05$		

<sup>a</sup> Medido usando phmetro modelo iCEL PH-1600,  
<sup>b</sup> obtido pelo ajuste dos transientes de LT dos solventes puros.

Tabela 3.1: Tempo de vida do estado tripleto, pH, difusividade térmica,  $k_D/k_d$  e  $\gamma_\Delta$  da Eritrosina em diferentes fluidos corporais simulados.

Eritrosina, iniciamos uma investigação utilizando o Azul de Metileno, o qual é outro corante bem conhecido na TFD. Neste caso, a aplicação da técnica de LT acabou sendo prejudicada pela ausência de lasers apropriados para a medida, visto que a absorção do Azul de Metileno apresenta pico em torno de  $660 \text{ nm}$ . Abaixo, apresentaremos os resultados obtidos pela cinética de fotoativação utilizando espectroscopia UV-Vis.

## 3.2 Fotoativação do Azul de Metileno em Fluidos Biológicos Simulados

Os espectros de absorção e emissão do Azul de Metileno em diferentes soluções são mostrados na Figura 3.13a e 3.13b, respectivamente. Os espectros de absorção em SIF, SGF, PBS, SBF e  $H_2O$  são semelhantes. O Azul de Metileno, da mesma forma que a Eritrosina, para o caso do SSF apresenta um leve deslocamento do pico para maiores comprimentos de onda. Já para a fluorescência, o SGF e  $H_2O$  possuem um espectro menor e o SSF maior que em SIF, PBS e SBF, sendo que o pico de emissão do SSF também apresenta um pequeno deslocamento para a região do infravermelho (batocrômico). A ligeira diferença observada entre a Eritrosina e o Azul de Metileno nos espectros de absorção e emissão mostra que os FS apresentam algum tipo de interação com os fluidos solventes, a qual é responsável pelo comportamento observado. Apesar disso, em ambos os FS, o deslocamento dos picos de absorção e emissão em SSF em relação aos outros fluidos é observado.

### 3.2.1 Cinética de Fotoativação do Azul de Metileno

A Figura 3.14 mostra as cinéticas de fotoativação para o Azul de Metileno em PBS. Na Figura 3.14.a, temos a cinética de controle obtida pela evolução temporal dos espectros na ausência de luz. Como observado, nesta condição, nenhuma mudança significativa é observada nas regiões de absorção do ABDA e do Azul de Metileno. Na Figura 3.14.b, temos a cinética de fotoativação na presença de ABDA+Azul de Metileno na presença de luz. Note-se que as regiões tanto do ABDA quanto do Azul de Metileno sofrem um decaimento, causado pela ação do  $^1O_2$  no ABDA e pelo fotobranqueamento do Azul de Metileno. Na Figura 3.14.c, foi refeita a cinética de fotoativação do Azul de Metileno

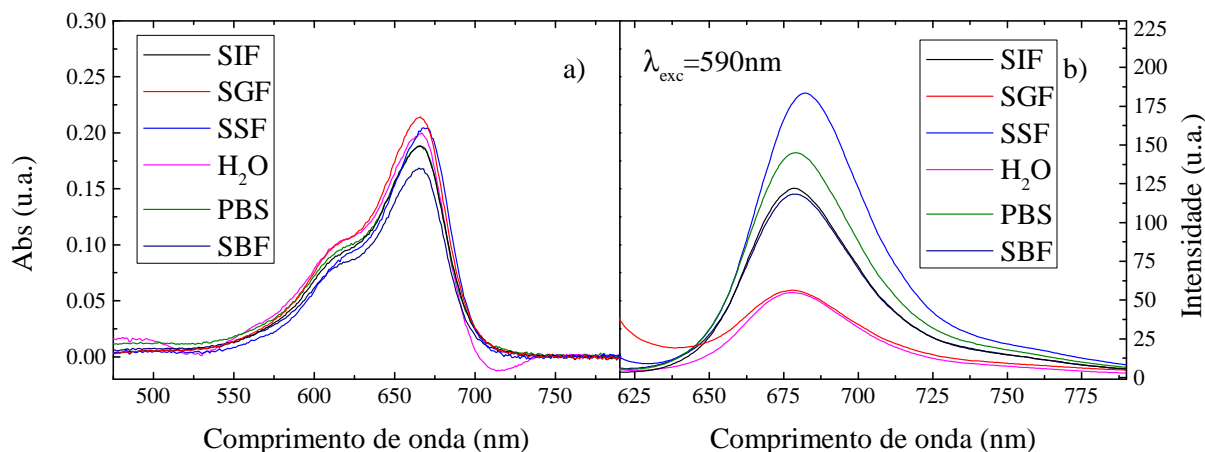


Figura 3.13: Espectros de absorção inicial para o Azul de Metileno em todos os fluidos corporais utilizados.

na ausência do ABDA para mostrar que o ABDA não interfere de forma significativa na fotodegradação do Azul de Metileno. Finalmente, na Figura 3.14.d observamos a cinética na presença do ABDA e na ausência do Azul de Metileno. Este resultado novamente mostra a conexão direta do decaimento do ABDA com a ação do  $^1O_2$ , sem nenhum efeito de fotodegradação do ABDA diretamente pela luz. A Figura 3.15 mostra a evolução temporal dos picos do ABDA em  $380\text{ nm}$  e a Figura 3.16, a do Azul de Metileno em  $660\text{ nm}$  para as cinéticas apresentadas na Figura 3.14. As cinéticas de controle para os outros fluidos mostraram resultados similares, ocorrendo um decaimento significativo dos picos do ABDA somente na presença Azul de Metileno+Luz.

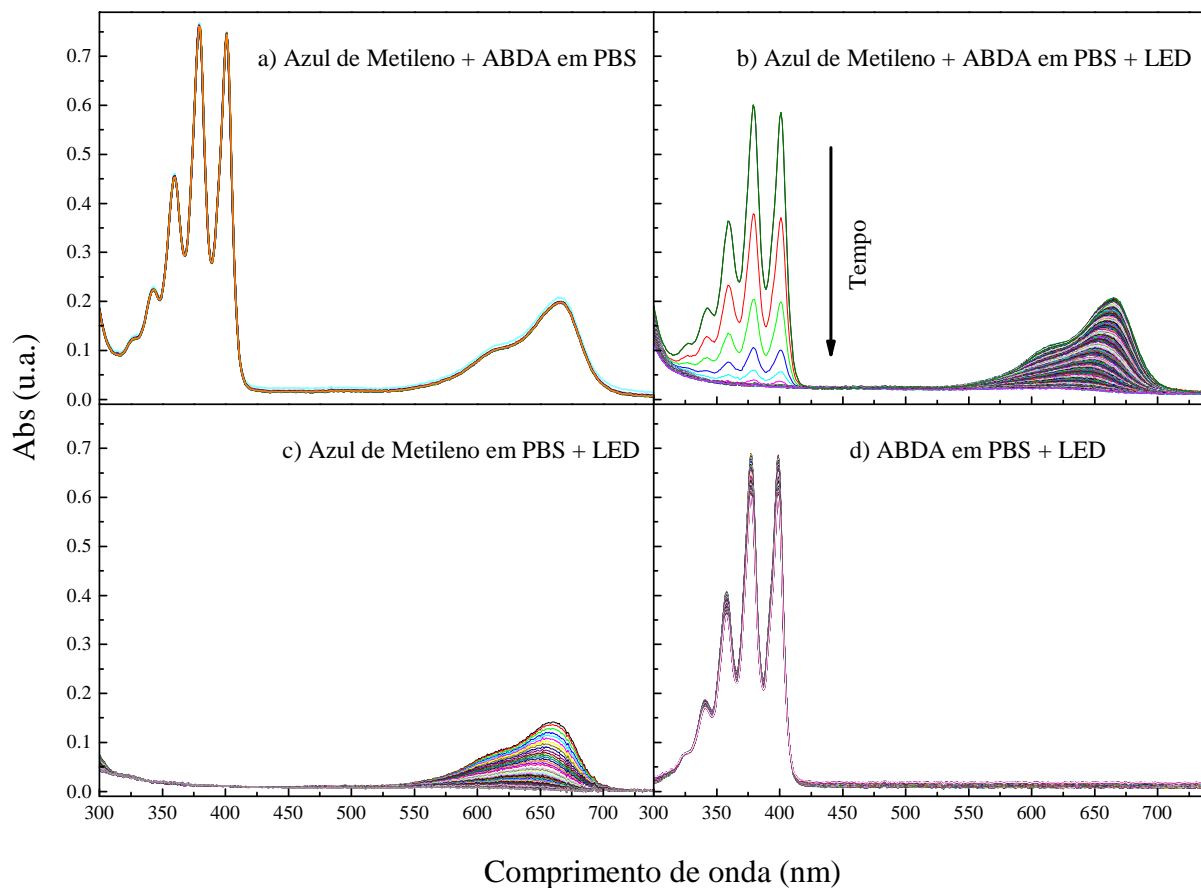


Figura 3.14: Espectros para as cinéticas de absorção em função do tempo de degradação.

Novamente, como no caso da Eritrosina, observamos na Figura 3.15 a evolução da oxidação do ABDA somente na presença do corante e da luz, conectando assim o decaimento do seu pico de absorção com a produção de  $^1O_2$ .

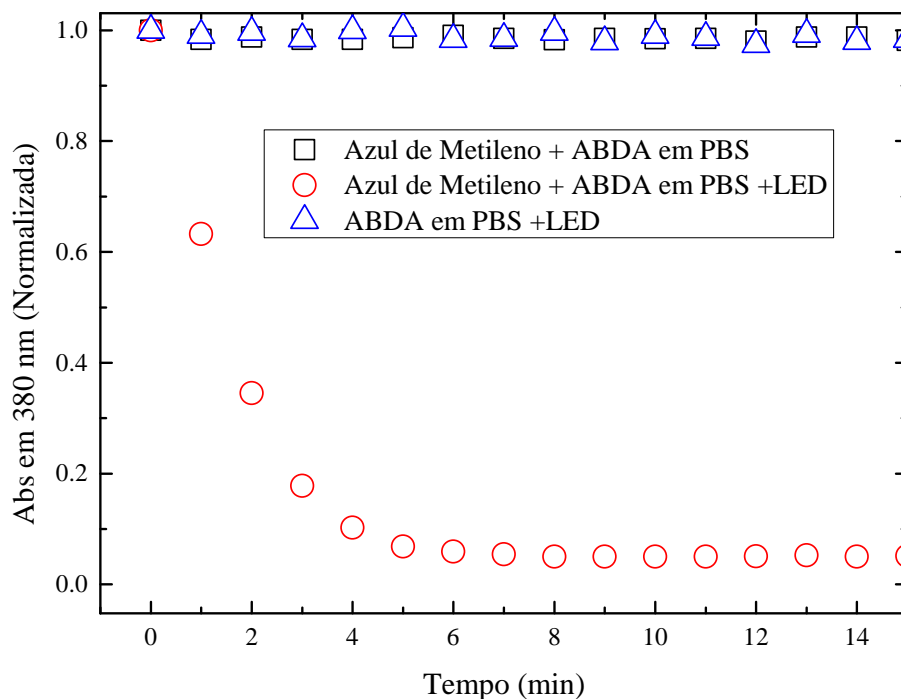


Figura 3.15: Cinéticas em 380 nm referentes aos espectros da Figura 3.14.a, 3.14.b, 3.14.d.

Na Figura 3.16, o mesmo efeito de uma leve diminuição da taxa de fotodegradação do corante na presença do ABDA fica evidente, relacionado à diminuição do processo corante-oxigênio na fotodegradação do FS. No entanto, diferentemente do caso da Eritrosina, observamos que, para os tempos iniciais, temos um comportamento diferenciado entre as cinéticas do Azul de Metileno na presença e na ausência do ABDA. Este mesmo comportamento anormal aconteceu para os outros fluidos, com maior ou menor amplitude dependendo do caso. A seguir, apresentaremos os resultados e faremos uma análise mais detalhada desse efeito.

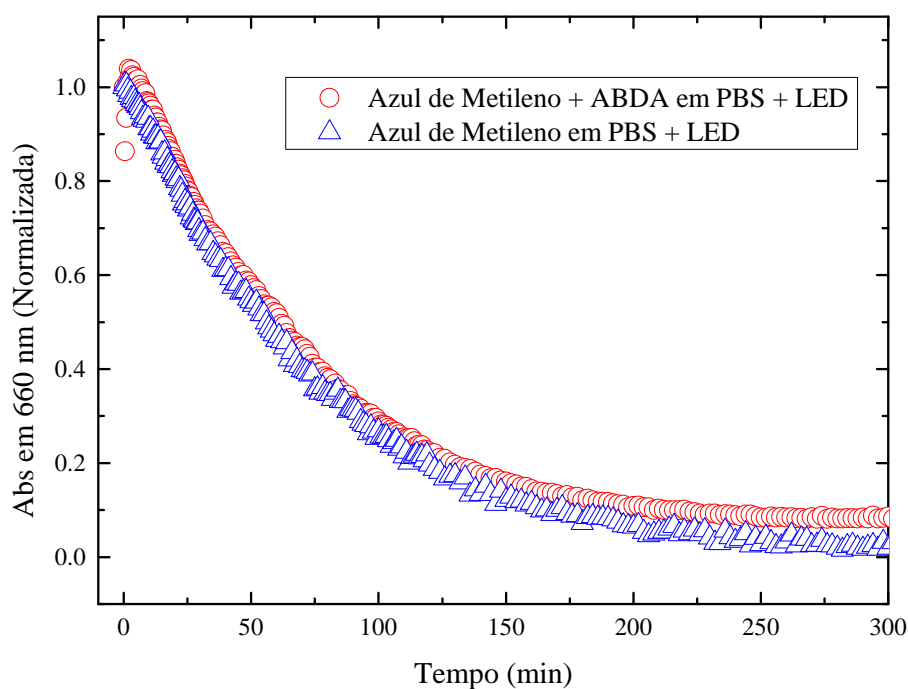


Figura 3.16: Cinéticas em 660nm referentes aos espectros da Figura 3.14.a, 3.14.b, 3.14.c.

Fica claro na Figura 3.17 um comportamento similar ao observado anteriormente para a Eritrosina, como a semelhança entre o decaimento dos espectros de absorção do corante em  $H_2O$ , PBS e SBF, Figuras 3.17.a-c. Nestes três casos, observamos também uma leve modificação na posição do pico, com um deslocamento hipsocrômico (para o azul).. Para o caso do SIF, Figura 3.17-d, esse deslocamento é ainda mais pronunciado. Para o Azul de Metileno em SSF, Figura 3.17-e, novamente verificamos uma grande diminuição da fotodegradação do FS, o que resulta em uma maior eficiência na geração de  $^1O_2$ , visto que o pico do ABDA neste caso apresenta um rápido decaimento. Finalmente, no caso do SGF, diferentemente da Eritrosina, o FS continua apresentando o pico de absorção. No entanto, uma rápida fotodegradação é observada, resultando na baixa eficiência na geração de  $^1O_2$ , a qual é evidenciada pela pequena variação no pico do ABDA, Figura 3.17.f.

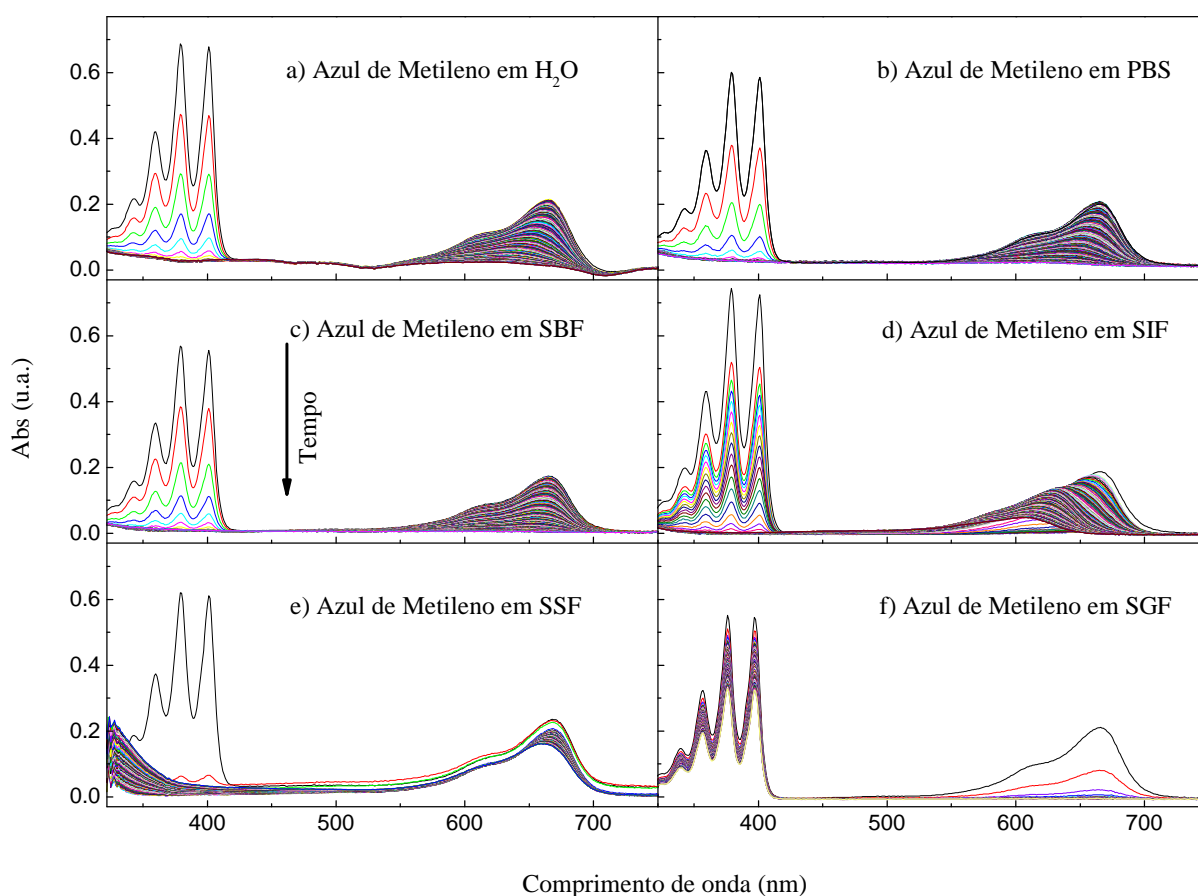


Figura 3.17: Espectros para as cinéticas de absorção em função do tempo de degradação pelo LED vermelho para o Azul de Metileno em diferentes simuladores de fluidos corporais. Para todas as amostras, a concentração de Azul de Metileno foi de  $5\mu M$ .

A partir dos espectros da Figura 3.17, podemos analisar a evolução temporal dos picos de absorção em  $380\text{ nm}$  e  $660\text{ nm}$ , os quais trazem as informações da taxa de geração de  $^1O_2$  e da taxa de fotodegradação. Na Figura 3.18, mostramos a evolução dos picos em  $660\text{ nm}$ . No caso do SGF, temos somente o rápido decaimento como mencionado acima. Note-se que o efeito anormal aparece novamente para os outros fluidos, com um amplitude maior para o caso do SIF, onde observamos um quase total fotobranqueamento do FS, porém reversível após um determinado instante, provavelmente relacionado com o equilíbrio para a forma leuco (processo de oxirredução). Além disso, deve estar relacionado



à interação do AM como o ABDA, pois após a degradação do ABDA o espectro do AM retorna. Após esse transiente inicial, observamos a fotodegradação normal do FS. Vale salientar que, como mencionado acima, o SSF apresenta uma diminuição significativa do fotobranqueamento se comparado aos outros fluidos.

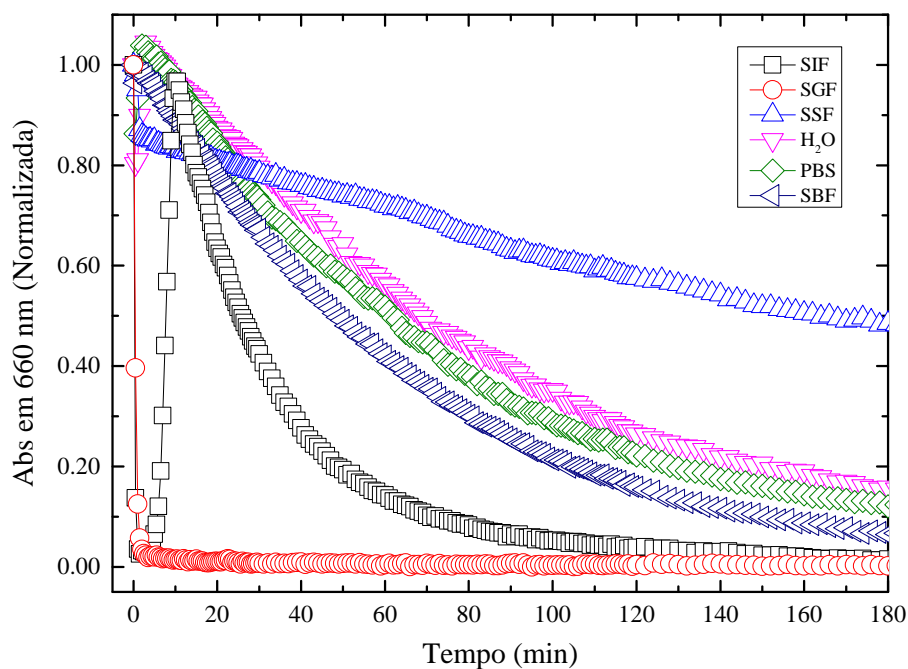


Figura 3.18: Cinética de fotodegradação do Azul de Metileno em 660 nm.

Para uma melhor análise desse comportamento inicial, na Figura 3.19 vamos dar uma amplificada no gráfico para esta fase inicial. Com exceção ao SGF, observamos uma diminuição abrupta transitória da absorção do corante, com amplitude e duração variando em cada fluido. Esse fotobranqueamento reversível está relacionada à forma leuco do Azul de Metileno. Como verificado acima para o caso do PBS, essa diminuição ocorre somente na presença do ABDA e da luz. Note-se que essa diminuição interfere na produção de oxigênio singleto pelo corante, e que por consequência também afeta a cinética do ABDA.

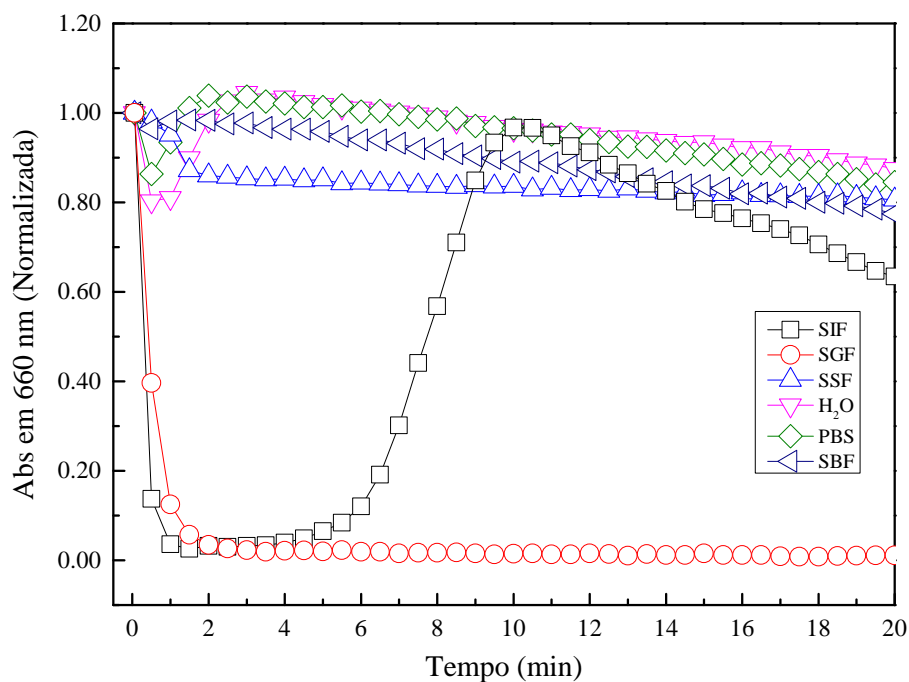


Figura 3.19: Cinética de fotodegradação do Azul de Metileno em 660 nm em uma escala de tempo menor.

A Figura 3.20 mostra a evolução temporal do pico do ABDA em 380 nm. Podemos identificar que o fotobranqueamento transitório observado acima ocorre na mesma escala de tempo em que o ABDA é consumido. Após a completa conversão do ABDA em seu endoperóxido correspondente, o Azul de Metileno retorna da fase leuco para a normal. No caso do SIF, esse efeito é mais evidenciado, visto que o tempo de consumo do ABDA é mais lento, mantendo a forma leuco do Azul de Metileno por um tempo maior. No caso da SSF, ocorre o inverso, no qual o ABDA é consumido muito rapidamente, de forma que quase não observamos variação do pico em 660 nm. Pelo comportamento observado nos picos do Azul de Metileno e do ABDA, podemos concluir que durante o período de consumo de ABDA, por algum processo que não é tão claro, o Azul de Metileno tende a assumir a forma leuco, a qual apresenta uma fraca absorção. Esse processo é finalizado após o consumo total do ABDA.

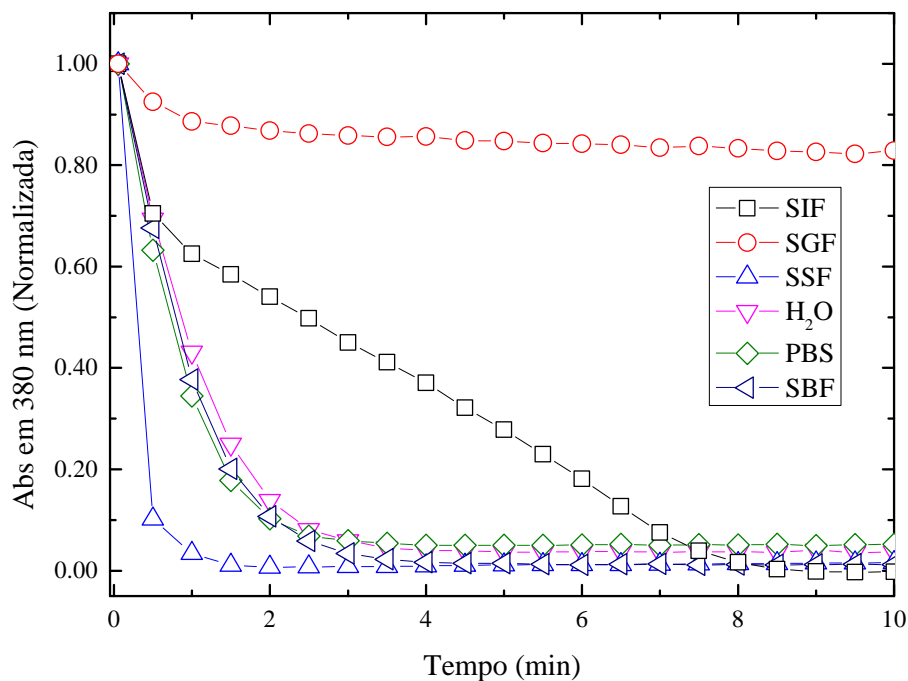


Figura 3.20: Foto-oxidação do ABDA em função do tempo de irradiação em 380 nm para Azul de Metileno em diferentes simuladores de fluidos corporais.

Em uma análise qualitativa, apesar do comportamento anômalo na fase inicial, observamos pelos gráficos que há em pH mais ácido (SGF) uma degradação mais rápida do corante. Novamente, o efeito de maior produção de oxigênio singlete e de menor taxa de fotobranqueamento em SSF aparentemente permanece.

# Conclusões

Neste trabalho, foi realizado um estudo da fotoativação da Eritrosina nos fluidos corporais simulados com o uso de diferentes técnicas fotométricas. Como resultado, observou-se que o tempo de vida tripleto, a eficiência da geração de oxigênio singleto e a taxa de fotobranqueamento evidenciaram diferentes valores, os quais não podem ser explicados apenas pela dependência do pH. Vimos que o SSF apresentou melhores resultados do que as outras soluções, como o SBF e o SIF (ambos com o mesmo pH neutro). Os resultados obtidos por meio de outras técnicas ópticas foram confirmados na técnica de LT, o que mostrou que os mesmos não são dependentes da concentração, uma vez que na LT foram usadas concentrações submicromolares - as quais não podem ser examinadas pelas técnicas fotométricas disponíveis no mercado. Os resultados apresentados podem ser úteis na definição de dosimetria de luz, especialmente na aplicação em odontologia, onde a Eritrosina tem sido amplamente utilizada. Infelizmente, não foi possível obter as medidas de transmitância resolvida no tempo e LT para o corante Azul de Metileno, pois não houve a disponibilidade dos lasers com os comprimentos de onda necessários. Porém, as cinéticas de degradação do Azul de Metileno com ABDA mostraram resultados interessantes, que convidam ao prosseguimento de estudos semelhantes em perspectivas de trabalhos futuros e que busquem determinar com maior precisão as taxas de degradação e geração de oxigênio singleto em diferentes meios biológicos e a compreensão do mecanismo de interação AM/ABDA/luz.

# Apêndice A

## Modelo teórico da técnica de Lente Térmica

### A.1 Modelo sem Fotorreação

Ao incidirmos sobre uma amostra um feixe de luz laser (laser de excitação) do mesmo comprimento de onda em que ela absorve, obtemos um efeito térmico devido à energia absorvida, o qual induz um gradiente de temperatura. Esse gradiente de temperatura gera uma variação local do índice de refração, o qual funciona como uma espécie de “lente”, mudando a convergência do feixe. Assim, pode-se pensar que, ao passar pela amostra durante a excitação, um segundo laser (laser de prova), cuja amostra não absorve e, portanto, não gera efeitos térmicos, sofre os efeitos desta “lente” (Figura A.1). Sendo assim, com o monitoramento da intensidade do laser de prova, podemos aferir algumas propriedades relacionadas à amostra. A partir de um modelo teórico descrevendo a variação de intensidade do feixe de prova, podemos utilizar a técnica de LT para o estudo de propriedades térmicas e ópticas de amostras, como veremos a seguir.

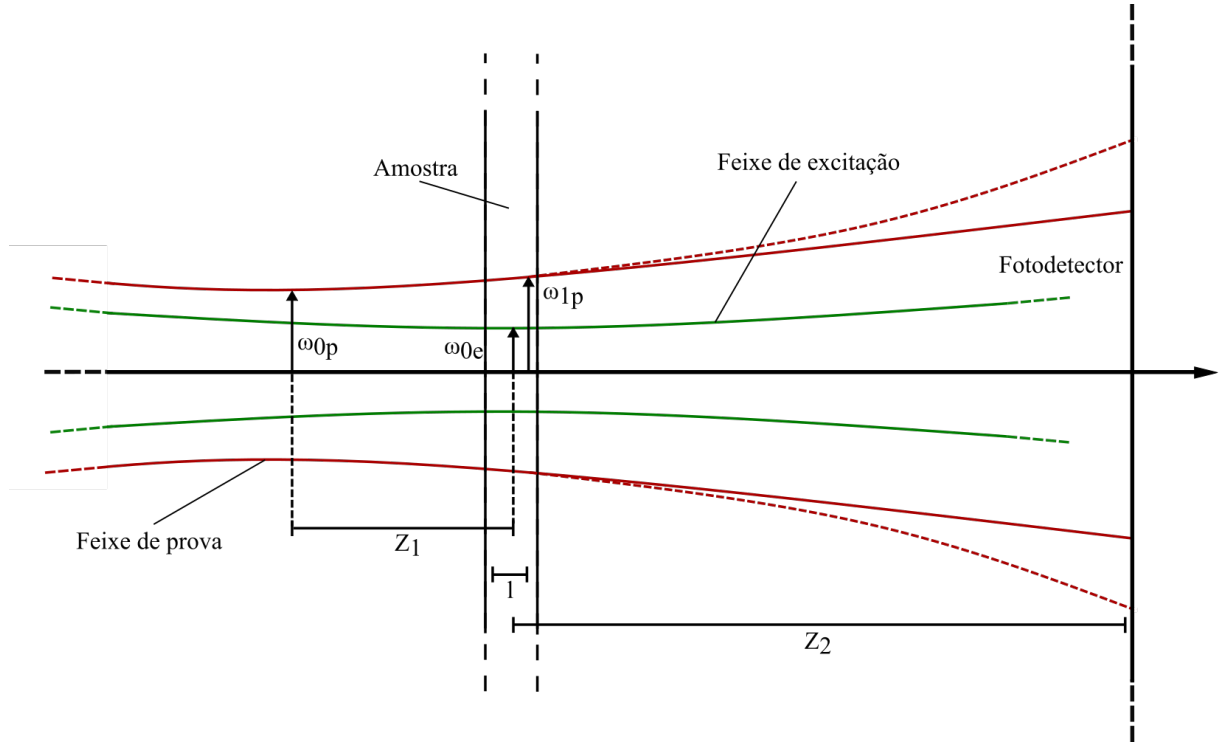


Figura A.1: Esquema da posição geométrica dos feixes em um experimento de LT em modo descasado.

A variação de intensidade no detector é descrita em termos da amplitude do campo elétrico pela relação [111],

$$I(t) = |U(z_1 + z_2, t)|^2. \quad (\text{A.1})$$

Utilizando a teoria de difração de Fresnel e o princípio de Huygens, podemos escrever a amplitude da onda do feixe de prova no centro do plano de saída como (veja Figura A.2)

$$U_{PS}(t) = \frac{i}{\lambda_p} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} U_{PE}(r, t) \left( \frac{1 + \text{Cos}(2\alpha)}{2} \right) \frac{1}{|z_2 - r|} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda_p}|z_2 - r|} r dr d\theta, \quad (\text{A.2})$$

com  $U_{PE}$  sendo a amplitude do feixe de prova no plano de entrada.

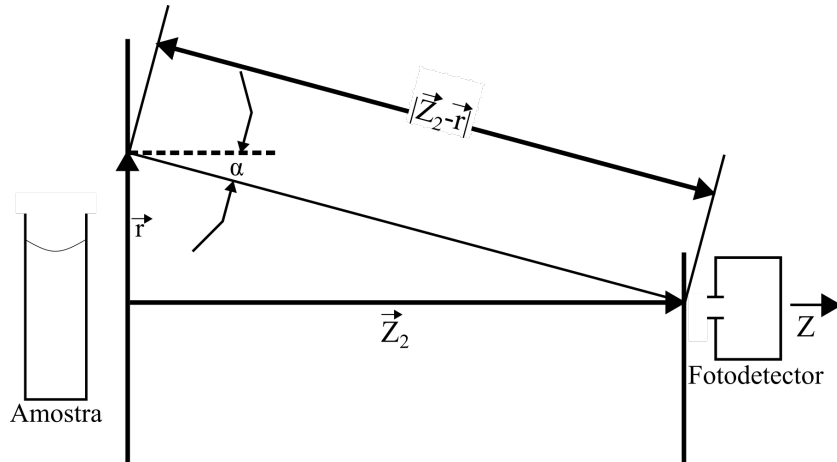


Figura A.2: Esquema para o cálculo da amplitude complexa do campo elétrico no fotodetector [134].

Para campo distante,  $z_2 \gg r$  (Figura A.2), podemos simplificar a expressão utilizando as aproximações

$$\frac{1 + \text{Cos}(2\alpha)}{2} \approx 1, \quad (\text{A.3})$$

$$|z_2 - r| \approx z_2 \quad (\text{A.4})$$

e

$$\frac{2\pi}{\lambda_p} |z_2 - r| = \frac{2\pi}{\lambda_p} (z_2^2 + r^2)^{1/2} \approx \frac{2\pi}{\lambda_p} \left( z_2 + \frac{r^2}{2z_2} \right). \quad (\text{A.5})$$

Assim, temos a expressão para o campo elétrico no plano de saída

$$U_{PS}(t) = A \int_0^\infty \int_0^{2\pi} U_{PE}(r, t) e^{-i \frac{\pi}{\lambda_p} \frac{r^2}{z_2}} r dr d\theta, \quad (\text{A.6})$$

sendo

$$U_{PE}(r, t) = \sqrt{\frac{2P_p}{\pi}} \frac{1}{\omega_{1p}} \left( e^{-\frac{r^2}{\omega_{1p}^2}} \right) e^{-\frac{i}{\lambda_p} \left( 2z_1 + \frac{r^2}{R_{1p}} \right)}, \quad (\text{A.7})$$

com  $P_p$  sendo a potência do feixe de prova e  $R_{1p}$  o raio de curvatura do feixe em  $z_1$ . Considerando que o feixe de prova ao passar pela amostra sofre uma defasagem devido ao gradiente do índice de refração, o feixe adquire uma fase  $\phi(r, t)$ ,

$$U_{PE}(r, t) = \sqrt{\frac{2P_p}{\pi}} \frac{1}{\omega_{1p}} \left( e^{-\frac{r^2}{\omega_{1p}^2}} \right) e^{-\frac{i}{\lambda_p} \left( 2z_1 + \frac{r^2}{R_{1p}} + \Phi(r, t) \right)}. \quad (\text{A.8})$$

Definindo a constante

$$C = \frac{1}{\omega_{1p}} \sqrt{\frac{2P_p}{\pi}} e^{-i \frac{2\pi z_1}{\lambda_p}} \frac{i\pi\omega_{1p}^2}{\lambda_p z_2} e^{-i \frac{2\pi z_2}{\lambda_p}} \quad (\text{A.9})$$

e introduzindo a variável  $g = (r/\omega_{1p})^2$ , e substituindo na equação A.6, temos a amplitude do campo ao se chegar ao fotodetector,

$$U_{PS}(z_1 + z_2, t) = C \int_0^\infty e^{-g-i \left[ \frac{\pi}{\lambda_p} \left( \frac{\omega_{1p}^2}{R_{1p}} + \frac{\omega_{1p}^2}{z_2} \right) g + \Phi(g, t) \right]} dg. \quad (\text{A.10})$$

Utilizando as relações características de feixe Gaussiano

$$\omega_{1p}^2 = \omega_{0p}^2 \left( 1 + \frac{z_1^2}{z_{cp}^2} \right), \quad (\text{A.11})$$

$$R_{1p} = \frac{z_1^2 + z_{cp}^2}{z_1} \quad (\text{A.12})$$

e

$$z_{cp} = \frac{\pi\omega_{0p}^2}{\lambda_p}, \quad (\text{A.13})$$

com  $z_{cp}$  sendo a distância confocal do laser de prova, podemos, finalmente, escrever

$$U(z_1 + z_2, t) = C \int_0^\infty e^{[-i\Phi(g, t) - g(1+iV)]} dg. \quad (\text{A.14})$$

Na relação acima,

$$V = \frac{z_1}{z_c} + \frac{z_c}{z_2} \left[ 1 + \frac{z_1^2}{z_c^2} \right], \quad (\text{A.15})$$

sendo  $V$  um parâmetro geométrico da montagem [110]. Portanto, para a intensidade, basta calcularmos

$$I(t) = |U(z_1 + z_2, t)|^2; \quad (\text{A.16})$$

então, a intensidade pode ser escrita como

$$I(t) = \left| C \int_0^\infty e^{-(1+iV)g - i\Phi(g,t)} dg \right|^2. \quad (\text{A.17})$$

Para descrevermos a variação da fase, levamos em conta a variação do caminho óptico,  $S(r, t)$ , em função da direção radial e da espessura da amostra. A diferença de fase para lente térmica pode ser escrita como

$$\Phi(r, t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \int_0^l [S(r, t) - S(0, t)] dz, \quad (\text{A.18})$$

sendo  $l$  a espessura da amostra. Podemos obter uma expressão a partir do caminho óptico para um feixe axial se propagando através da amostra (utilizaremos a coordenada  $z$  como o eixo de propagação do feixe), o qual é definido como

$$S(r, t) = \int_{\text{caminho}} n(r, t, z) dz. \quad (\text{A.19})$$

A variação do índice de refração ou da espessura da amostra induz a uma variação do caminho óptico. Como o índice de refração depende da temperatura, além de outros fatores, o gradiente de temperatura induzido pela absorção de energia do laser de excitação torna-se a contribuição dominante na formação da fase de LT. Para materiais semitransparentes e em condições onde as aproximações “plane-stress” ou “plane-strain” são válidas,  $S(r, t)$  pode ser escrito de uma forma aproximada como

$$S(r, t) = S_0 + \frac{dS}{dT} T(r, t), \quad (\text{A.20})$$

visto que em geral o aumento de temperatura induzido na técnica de LT geralmente não é muito grande, de forma que a aproximação linear é satisfatória. O termo  $dS/dT$  é conhecido como coeficiente de variação do caminho óptico com a temperatura. No caso de líquidos  $dS/dT = dn/dT$ , sendo  $dn/dT$  o coeficiente de variação do índice de refração com a temperatura. No caso de amostras sólidas onde as aproximações “plane-stress” ou “plane-strain” não são válidas é necessário um modelo mais completo para a descrição da variação do caminho óptico [135]. No nosso caso de interesse, como as amostras são líquidos, temos que

$$\Phi(r, t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \frac{dn}{dT} \int_0^l [T(r, z, t) - T(0, z, t)] dz \quad (\text{A.21})$$

Assim, para obtermos a expressão analítica que descreve o sinal de LT, basta obtermos a expressão para o gradiente de temperatura causado pelo laser de excitação na amostra, o qual é descrito pela equação de difusão de calor,

$$\frac{\partial T(r, z, t)}{\partial t} - D_{th} \nabla^2 T(r, z, t) = Q(r, z, t). \quad (\text{A.22})$$



Na expressão acima,  $T(r, z, t)$  é a variação de temperatura causada pelo laser de excitação,  $Q$  é o termo de fonte caracterizado pelas propriedades do feixe de laser e pelo coeficiente da absorção óptica,  $D_{th} = \frac{k}{\rho c}$  é a difusividade térmica, sendo  $k$  a condutividade térmica,  $\rho$  a densidade de massa e  $c$  o calor específico. Para o caso de laser com perfil de intensidade Gaussiano, o termo de fonte é dado pela equação (A.23)

$$Q(r, z, t) = Q_0 e^{-\frac{2r^2}{\omega_{0e}^2}} Q(z), \quad (\text{A.23})$$

com

$$Q_0 = \frac{2P_e \phi \beta}{\pi \omega_{0e}^2 \rho c}, \quad (\text{A.24})$$

na qual  $\phi$  é a porcentagem de energia absorvida que gera calor na amostra,  $\beta$  é o coeficiente de absorção térmica,  $\omega_{0e}$  é o raio do feixe de excitação e  $P_e$ , a potência do laser de excitação. O termo  $Q(z)$  descreve a atenuação do feixe ao longo da amostra.

A solução analítica da equação (A.22) para condições iniciais e de contorno reais é muito difícil de ser obtida. Desta forma, usaremos algumas aproximações que nos permitam obter uma solução analítica, e que podem ser razoavelmente respeitadas do ponto de vista experimental. Por exemplo, vamos assumir que o fluxo de calor com o meio externo possa ser negligenciado, que o raio da amostra é muito maior do que o raio do laser de excitação, e que a amostra inicialmente está com uma temperatura uniforme, isto é:

$$\left. \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial t} \right|_{z=0} = 0, \quad (\text{A.25})$$

$$T(\infty, z, t) = 0 \quad (\text{A.26})$$

e

$$T(r, z, 0) = 0. \quad (\text{A.27})$$

Devido à simetria axial do feixe de excitação, o sistema de coordenadas cilíndricas é o mais apropriado. Neste caso, o operador Laplaciano é descrito pela expressão

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}. \quad (\text{A.28})$$

Na busca da solução para a equação de difusão térmica, utilizaremos o método das transformadas integrais de Laplace, Fourier e Hankel, as quais são apropriadas pelas condições de contorno e simetria do sistema.

### A.1.1 Transformada de Laplace

A transformada de Laplace será aplicada na coordenada  $t$  devido à condição inicial  $T(r, z, 0) = 0$ . Uma vez que

$$\mathcal{L}[T(r, z, t)] = T(r, z, s) = \int_0^\infty T(r, z, t) e^{-st} dt, \quad (\text{A.29})$$

tem-se como propriedades

$$\mathcal{L} \left[ \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial t} \right] = sT(r, z, s) - T(r, z, 0), \quad (\text{A.30})$$

e

$$\mathcal{L}[1] = \frac{1}{s}. \quad (\text{A.31})$$

Aplicando a transformada de Laplace na equação (A.22)

$$\mathcal{L} \left[ \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial t} - D_{th} \nabla^2 T(r, z, t) \right] = \mathcal{L} [Q(r, z)], \quad (\text{A.32})$$

e usando a condição inicial, temos

$$sT(r, z, s) - D_{th} \nabla^2 T(r, z, s) = \frac{1}{s} Q(r, z). \quad (\text{A.33})$$

### A.1.2 Transformada de Hankel

A transformada de Hankel será aplicada na variável  $r$  devido à consideração de raio infinito (raio da amostra muito maior do que o do feixe de excitação). Ela é definida como

$$\mathcal{H}[T(r, z, s)] = T(\alpha, z, s) = \int_0^\infty T(r, z, s) J_0(\alpha r) r dr, \quad (\text{A.34})$$

com  $J_0$  sendo a função de Bessel de ordem 0. Assim, temos que

$$\mathcal{H} \left[ \frac{\partial^2 T(r, z, s)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial T(r, z, s)}{\partial r} \right] = -\alpha^2 T(\alpha, z, s), \quad (\text{A.35})$$

e

$$Q(\alpha) = \mathcal{H}[e^{-\frac{2r^2}{\omega_0^2}}] = \frac{1}{4} e^{-\frac{1}{8} \omega_0^2 \alpha^2} \omega_0^2. \quad (\text{A.36})$$

A aplicação da transformada de Hankel na equação (A.33) nos conduz à equação para temperatura no espaço de Hankel-Laplace

$$sT(\alpha, z, s) + D_{th} \alpha^2 T(\alpha, z, s) - D_{th} \frac{\partial^2 T(\alpha, z, s)}{\partial z^2} = \frac{1}{s} Q_0 Q(\alpha) Q(z). \quad (\text{A.37})$$

### A.1.3 Transformada de Fourier Cosseno

Em relação à coordenada  $z$ , vamos assumir as condições de fluxo nulo em  $z = 0$  e que o feixe é atenuado ao longo da amostra seguindo a lei de Beer-Lambert,  $Q(z) = e^{-\beta z}$ . Negligenciando a condição de contorno na outra interface (amostra semi-infinita), usamos a transformada de Fourier definida como

$$\mathcal{F}_c [T(\alpha, z, s)] = T(\alpha, \lambda, s) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} T(\alpha, z, s) \cos(\lambda z) dz. \quad (\text{A.38})$$

Assim, tem-se a seguinte propriedade:

$$\mathcal{F}_c \left[ \frac{\partial^2 T(\alpha, z, s)}{\partial z^2} \right] = -\lambda^2 T(\alpha, \lambda, s) - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\partial T(\alpha, z, s)}{\partial z} \Big|_{z=0}. \quad (\text{A.39})$$

Isso nos conduz à temperatura no espaço Hankel-Fourier-Laplace  $(\alpha, \lambda, s)$

$$sT(\alpha, \lambda, s) + D_{th} \alpha^2 T(\alpha, \lambda, s) + D_{th} \lambda^2 T(\alpha, \lambda, s) = \frac{Q_0 Q(\alpha) Q(\lambda)}{s}, \quad (\text{A.40})$$

sendo

$$Q(\lambda) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\beta}{\beta^2 + \lambda^2}. \quad (\text{A.41})$$

Resolvendo, temos a temperatura no espaço Hankel-Fourier-Laplace

$$T(\alpha, \lambda, s) = \frac{Q_0 Q(\alpha) Q(\lambda)}{s[s + D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)]}. \quad (\text{A.42})$$

Para a solução no espaço das coordenadas  $r$ ,  $z$  e  $t$ , basta aplicarmos as transformadas inversas.

### A.1.4 Inversa de Laplace

Aplicando a transformada inversa de Laplace, temos que

$$\mathcal{L}^{-1} \left[ \frac{1}{s[s + D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)]} \right] = \frac{1 - e^{-D_{th}t(\alpha^2 + \lambda^2)}}{D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)} = \int_0^t e^{-D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} d\tau. \quad (\text{A.43})$$

Então,

$$T(\alpha, \lambda, t) = \int_0^t Q_0 Q(\alpha) Q(\lambda) e^{-D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} d\tau. \quad (\text{A.44})$$

### A.1.5 Transformada Inversa de Hankel

Para a transformada inversa de Hankel, temos

$$\mathcal{H}^{-1}[T(\alpha, \lambda, t)] = T(r, \lambda, t) = \int_0^\infty T(\alpha, \lambda, t) J_0(\alpha r) \alpha d\alpha. \quad (\text{A.45})$$

Utilizando-se isto em (A.44), encontramos

$$T(r, \lambda, t) = \int_0^\infty \int_0^t Q_0 \frac{1}{4} e^{-\frac{1}{8}\omega_{0e}^2 \alpha^2} \omega_{0e}^2 Q(\lambda) e^{-D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} J_0(\alpha r) \alpha d\tau d\alpha. \quad (\text{A.46})$$

Como

$$\int_0^\infty e^{-\frac{1}{8}\omega_{0e}^2 \alpha^2} e^{-D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} J_0(\alpha r) \alpha d\alpha = \frac{4e^{-\left(\frac{2r^2}{8D_{th}t + \omega_{0e}^2}\right)}}{8D_{th}t + \omega_{0e}^2} e^{(-D_{th}\lambda^2\tau)}, \quad (\text{A.47})$$

e introduzindo a variável  $t_c = \frac{\omega_{0e}^2}{4D_{th}}$ , em que  $t_c$  é o tempo característico de formação da Lente Térmica, a expressão da temperatura se torna

$$T(r, \lambda, t) = Q_0 \int_0^t Q(\lambda) e^{-\frac{\omega_{0e}^2 \lambda^2}{8} \frac{2\tau}{t_c}} \left( \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{(1+2\tau/t_c)}}}{(1 + \tau/t_c)} \right) d\tau. \quad (\text{A.48})$$

### A.1.6 Inversa de Fourier Cosseno

Para efetuar a transformada inversa de Fourier, considerando o modelo seguindo a lei de Beer-Lambert (BLM<sup>1</sup>)  $Q_{BLM}(z) = e^{-\beta z}$ , ou seja,  $Q_{BLM}(\lambda) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\beta}{\beta^2 + \lambda^2}$ , vamos utilizar o teorema da convolução

$$\mathcal{F}_c^{-1} [\mathcal{F}[f]\mathcal{F}[g]] = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} g(s) [f(|z - s|) + f(z + s)] ds; \quad (\text{A.49})$$

<sup>1</sup>Abreviação do inglês: Beer-Lambert Model

sendo que

$$g = \mathcal{F}_C^{-1} \left[ \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\beta}{\beta^2 + \lambda^2} \right] = e^{-\beta z} \quad (\text{A.50})$$

e

$$f = \mathcal{F}_C^{-1} \left[ e^{-\frac{\omega_{0e}^2 \lambda^2}{8} \frac{2\tau}{t_c}} \right] = \frac{\sqrt{2t_c} e^{-\frac{t_c z^2}{\tau \omega_{0e}^2}}}{\omega_{0e}^2 \sqrt{\tau}}. \quad (\text{A.51})$$

Portanto, a convolução fica

$$\begin{aligned} \mathcal{F}_C^{-1} [\mathcal{F}[f]\mathcal{F}[g]] &= \frac{1}{2} e^{\frac{1}{4}\beta \left( \frac{\beta \tau \omega_{0e}^2}{t_c} - 4z \right)} \times \\ &\times \left( \text{Erfc} \left[ \frac{\beta \tau \omega_{0e}^2 - 2zt_c}{2\sqrt{\tau} \omega_{0e} \sqrt{t_c}} \right] + e^{2z\beta} \text{Erfc} \left[ \frac{\beta \tau \omega_{0e}^2 + 2zt_c}{2\sqrt{\tau} \omega_{0e} \sqrt{t_c}} \right] \right). \end{aligned} \quad (\text{A.52})$$

Assim, temos finalmente a expressão da temperatura

$$\begin{aligned} T_{BLM}(r, z, t) &= Q_0 \int_0^t \frac{1}{2} e^{\frac{1}{4}\beta \left( \frac{\beta \tau \omega_{0e}^2}{t_c} - 4z \right)} \times \\ &\times \left( \text{Erfc} \left[ \frac{\beta \tau \omega_{0e}^2 - 2zt_c}{2\sqrt{\tau} \omega_{0e} \sqrt{t_c}} \right] + e^{2z\beta} \text{Erfc} \left[ \frac{\beta \tau \omega_{0e}^2 + 2zt_c}{2\sqrt{\tau} \omega_{0e} \sqrt{t_c}} \right] \right) \left( \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{(1+2\tau/t_c)}}}{(1+2\tau/t_c)} \right) d\tau. \end{aligned} \quad (\text{A.53})$$

Para o caso em que o coeficiente de absorção óptica é muito pequeno, podemos fazer a aproximação de baixa absorção óptica (LAM<sup>2</sup>)  $e^{-\beta z} \approx 1$ ,  $Q_{LAM}(\lambda) = \sqrt{2\pi} \delta(\lambda)$ . Desta forma,

$$\mathcal{F}_C^{-1} \left[ \sqrt{2\pi} \delta(\lambda) e^{-\frac{\omega_{0e}^2 \lambda^2}{8} \frac{2\tau}{t_c}} \right] = 1. \quad (\text{A.54})$$

Para esta aproximação, o perfil de temperatura fica independente da variável axial,

$$T_{LAM}(r, t) = Q_0 \int_0^t \left( \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{(1+2\tau/t_c)}}}{(1+2\tau/t_c)} \right) d\tau. \quad (\text{A.55})$$

Esta expressão se torna matematicamente muito simples e é útil para a maioria das situações de interesse.

Em adição, temos uma aproximação muito útil, que consiste em escrever

$$T_{BLMAP}(r, z, t) = T_{LAM}(r, t) e^{-\beta z}, \quad (\text{A.56})$$

a qual também é matematicamente simples e descreve de maneira satisfatória o perfil de temperatura para o caso de absorção óptica moderada. Esta aproximação negligencia a difusão de calor axial, e assume um decaimento da temperatura seguindo o mesmo comportamento da atenuação da absorção.

---

<sup>2</sup>Abreviação do inglês: Low-Absorption Model

Utilizando a expressão para a variação de temperatura, a expressão para a diferença de fase induzida fica,

$$\Phi_{BLM}(g, t) = \frac{\theta_{LT}}{t_c} \left[ \int_0^t \frac{1}{2} e^{\frac{1}{4}\beta \left( \frac{\beta\tau\omega_{0e}^2}{t_c} - 4z \right)} \times \right. \\ \left. \times \left( \text{Erfc} \left[ \frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 - 2zt_c}{2\sqrt{\tau}\omega_{0e}\sqrt{t_c}} \right] + e^{2z\beta} \text{Erfc} \left[ \frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 + 2zt_c}{2\sqrt{\tau}\omega_{0e}\sqrt{t_c}} \right] \right) \left( \frac{1 - e^{\left( \frac{2mg}{1+2\tau/t_c} \right)}}{1 + 2\tau/t_c} \right) \right] d\tau, \quad (\text{A.57})$$

na qual

$$\theta_{LT} = -\frac{P\beta l\phi}{k\lambda_p} \frac{dS}{dT}, \quad (\text{A.58})$$

$$m = (\omega_{1p}/\omega_{0e})^2 \text{ e } g = r^2/\omega_{1p}^2.$$

No caso de baixa absorção óptica, a expressão se simplifica em

$$\Phi_{LAM}(g, t) = \frac{\theta_{LT}}{t_c} \left[ \int_0^t \frac{1 - e^{\left( \frac{2mg}{1+2\tau/t_c} \right)}}{1 + 2\tau/t_c} \right] d\tau. \quad (\text{A.59})$$

Para o caso de absorções moderadas, podemos utilizar a aproximação (A.56), o que nos fornece a diferença de fase

$$\Phi_{ef}(g, t) = \frac{\theta_{LT}^{ef}}{t_c} \left[ \int_0^t \frac{1 - e^{\left( \frac{2mg}{1+2\tau/t_c} \right)}}{1 + 2\tau/t_c} \right] d\tau. \quad (\text{A.60})$$

Neste caso,

$$\theta_{LT}^{ef} = -\frac{P\beta l_{ef}\phi}{k\lambda_p} \frac{dS}{dT}, \quad (\text{A.61})$$

no qual introduzimos a definição de  $l$  efetivo

$$l_{ef} = \frac{1 - e^{-\beta l}}{\beta}. \quad (\text{A.62})$$

Sendo assim, podemos escrever a intensidade normalizada como

$$\frac{I(t)}{I(0)} = \frac{\left| \int_0^\infty e^{-(1+iV)g - i\Phi(g,t)} dg \right|^2}{\left| \int_0^\infty e^{-(1+iV)g} dg \right|^2}. \quad (\text{A.63})$$

Apesar da expressão acima somente ter solução analítica para a aproximação  $e^{-i\Phi(g,t)} \approx 1 - i\Phi(g,t)$ , podemos de maneira muito simples efetuar o cálculo da intensidade através de integração numérica, utilizando, por exemplo, o software Wolfram Mathematica.

Na seção seguinte, vamos mostrar como podemos incorporar efeitos de fotorreação no modelo de LT e estudar os processos de fotodegradação induzidos pelo feixe de excitação.

## A.2 Modelo de Lente Térmica para Amostras Fotosensíveis

Nesta seção, será apresentado o modelo teórico de LT para amostras que apresentem fotorreação química, a qual modifica o coeficiente de absorção óptica da amostra. Para o caso de reação de primeira ordem,



a variação da concentração da amostra  $C_R$  (reagente) é descrita pela equação de difusão

$$\frac{\partial C_R(r, t)}{\partial t} - D_m \nabla_r^2 C_R(r, t) = \frac{2P_e \sigma}{\pi \omega_{0e}^2 h \nu} e^{-r^2/\omega_{0e}^2} C_R(r, t) f(t), \quad (\text{A.65})$$

no qual  $\sigma$  é a seção reta de fotorreação,  $\nu$  é a frequência óptica e  $f(t) = [1 - H(t - \xi)]$ , na qual  $H(t - \xi)$  é a função Heaviside<sup>3</sup>, a qual é usada se forem considerados os tempos em que o feixe de excitação está ligado e desligado [136]. Na solução da equação acima, consideramos a conservação entre produtos e reagentes,

$$C_R(t) + C_P(t) = C_0, \quad (\text{A.66})$$

sendo  $C_R$  e  $C_P$  a concentração de reagentes e de produtos, respectivamente, e  $C_0$  é a concentração inicial. O coeficiente de absorção óptica  $\beta(r, t)$  é escrito como

$$\beta(r, t) = \epsilon_R C_R(r, t) + \epsilon_P C_P(r, t), \quad (\text{A.67})$$

ou ainda

$$\beta(r, t) = \beta_0 \left[ (1 - \epsilon) \frac{C_R(r, t)}{C_0} + \epsilon \right], \quad (\text{A.68})$$

com  $\beta_0$  sendo o coeficiente de absorção óptica inicial do reagente e  $\epsilon$  a razão entre a absorbância molar do produto ( $\epsilon_P$ ) e do reagente ( $\epsilon_R$ ),  $\epsilon = \epsilon_P/\epsilon_R$ .

Neste caso, o perfil de temperatura é obtido pela equação de difusão, levando em consideração a variação na absorção

$$\frac{\partial T(r, t)}{\partial t} - D_{th} \nabla^2 T(r, t) = \frac{2P_e \phi}{\pi \omega_{0e}^2 \rho c_p} \beta(r, t) e^{-r^2/\omega_{0e}^2} f(t). \quad (\text{A.69})$$

O conjunto de equações diferenciais acopladas acima não apresenta solução analítica. Uma aproximação usualmente utilizada é assumir uma média espacial para a concentração, ou seja,  $C_R(t) = \langle C_R(r, t) \rangle_r$ , de forma que a equação (A.65) assume uma forma simplificada [137]

$$\frac{dC_R(t)}{dt} = -K_T C_R(t), \quad (\text{A.70})$$

cuja solução é

$$C_R(t) = C_0 e^{-K_T t}, \quad (\text{A.71})$$

em que  $K_T$  é uma taxa efetiva de fotorreação e movimento devido à difusão molecular [138]. Neste caso, obtemos

$$\beta(r, t) = \beta_0 [(1 - \epsilon) e^{-K_T t} + \epsilon]. \quad (\text{A.72})$$

Agora, basta resolvermos a equação de difusão térmica para o perfil de temperatura. Utilizaremos o mesmo método das transformadas integrais e condições iniciais e de contorno usadas anteriormente.

---

<sup>3</sup> $H(t - \xi) = \begin{cases} 1 & \text{se } t \geq \xi \\ 0 & \text{se } t < \xi \end{cases}$

## A.2.1 Temperatura no Espaço Hankel-Fourier-Laplace

A equação de difusão térmica, devido à variação temporal do coeficiente de absorção, fica descrita por

$$\frac{\partial T(r, t)}{\partial t} - D_{th} \nabla^2 T(r, t) = Q(r, z, t), \quad (\text{A.73})$$

sendo o termo de fonte

$$Q(r, z, t) = Q_0 e^{-r^2/\omega_{0e}^2} Q(z) Q(t), \quad (\text{A.74})$$

no qual a dependência temporal é dada por

$$Q(t) = \beta_0 [(1 - \epsilon) e^{-K_T t} + \epsilon] [1 - H(t - \xi)], \quad (\text{A.75})$$

e

$$Q_0 = \frac{2P_e \phi}{\pi \omega_{0e}^2 \rho c_p}. \quad (\text{A.76})$$

Utilizando-se as propriedades da transformada de Laplace

$$\mathcal{L} [C e^{-K_T t}] = \frac{C}{K_T + s}, \quad (\text{A.77})$$

$$\mathcal{L} [C H(t - \xi)] = \frac{C e^{-s\xi}}{s}, \quad (\text{A.78})$$

e

$$\mathcal{L} [C e^{-K t} H(t - \xi)] = \frac{C e^{-(K+s)\xi}}{K + s}, \quad (\text{A.79})$$

a equação de difusão no espaço de Laplace fica dada por

$$sT(r, z, s) - D_{th} \nabla^2 T(r, z, s) = \beta_0 \left[ \frac{(1 - \epsilon)}{K_T + s} + \frac{\epsilon}{s} - \frac{(1 - \epsilon) e^{-(K+s)\xi}}{K + s} + \frac{\epsilon e^{-s\xi}}{s} \right] Q(r, z). \quad (\text{A.80})$$

Aplicando-se as transformadas de Fourier-Cosseno e Hankel, temos a temperatura no espaço  $(\alpha, \lambda, s)$

$$T(\alpha, \lambda, s) = \beta_0 \left[ \frac{(1 - \epsilon)}{K_T + s} + \frac{\epsilon}{s} - \frac{(1 - \epsilon) e^{-(K+s)\xi}}{K + s} + \frac{\epsilon e^{-s\xi}}{s} \right] \frac{Q(\alpha, \lambda)}{[s + D_{th}(\alpha^2 + \lambda^2)]}. \quad (\text{A.81})$$

## A.2.2 Perfil de Temperatura

Para obter a expressão da temperatura no espaço  $(r, z, t)$  vamos fazer as transformadas inversas. A transformada inversa de Fourier cosseno leva a uma equação final não muito simples. Como estamos interessados no estudo de soluções apresentando baixa absorção óptica, vamos utilizar a aproximação  $Q(z) \approx 1$ , o que leva a uma expressão da temperatura que independe da coordenada axial [139]. Assim, aplicando as transformadas inversas de Laplace e Hankel, temos

$$T(r, t) = Q_0 \beta_0 \left[ (1 - \epsilon) e^{-K_T t} \int_{t_0}^t e^{-k_T \tau} \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_e^2}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau + \epsilon \int_{t_0}^t \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_e^2}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau \right], \quad (\text{A.82})$$

com  $t_0 = (t - \xi)H(t - \xi)$  e  $t_c = \omega_{0e}^2/4D_{th}$ . Portanto, podemos perceber que no limite de  $\epsilon \rightarrow 1$  ou  $K_T = 0$ , obtemos a solução encontrada anteriormente, relacionada à temperatura para soluções que não apresentam fotorreação. Para o caso de coeficientes de absorção moderados, a aproximação de  $l_{ef}$  nos fornece bons resultados.

### A.2.3 Fase e Intensidade

Em situações onde o feixe de excitação pode induzir foto-modificações na amostra, o gradiente de concentração gerado devido à fotodegradação pode levar a uma variação do índice de refração com a concentração. Neste caso, a fase pode ter contribuição tanto do gradiente de temperatura quanto do gradiente de concentração. Portanto, a fase induzida é agora descrita como

$$\Phi(r, t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \int_0^l \left[ \frac{dn}{dT} T(r, t) + \frac{dn}{dC_R} C_R(r, t) \right] dz. \quad (\text{A.83})$$

Porém, para grande parte das soluções de interesse, o termo  $\frac{dn}{dC_R} \ll \frac{dn}{dT}$ , de forma que a contribuição do termo de lente de concentração pode ser desprezada. Fazendo a substituição de  $m = (\omega_{1p}/\omega_{0e})^2$  e  $g = (r^2/\omega_{0e})^2$ , obtemos [140]

$$\Phi(g, t) = \frac{\theta}{t_c} \left[ (1 - \epsilon) e^{-k_T t} \int_{t_0}^t e^{-k_T t'} \frac{e^{-\frac{2mg}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau + \epsilon \int_{t_0}^t \frac{e^{-\frac{2mg}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau \right], \quad (\text{A.84})$$

com

$$\theta = -\frac{P_e \beta_0 l}{k \lambda_p} \frac{dn}{dT} \phi. \quad (\text{A.85})$$

Note-se que no limite de  $\epsilon \rightarrow 1$  obtemos o modelo sem fotorreação independentemente do valor de  $K_T$ , indicando que o produto gerado na fotorreação tem o mesmo valor de absorção óptica, e que neste caso não seria detectado pelo transiente de LT, a não ser que  $dn/dC_R$  apresente contribuição significativa. Para a intensidade, basta usarmos a equação (A.17), ou seja,

$$\frac{I(t)}{I(0)} = \frac{\left| \int_0^\infty e^{-(1+iV)g - i\Phi(g,t)} dg \right|^2}{\left| \int_0^\infty e^{-(1+iV)g} dg \right|^2}. \quad (\text{A.86})$$



# Apêndice B

## Ajustes dos dados

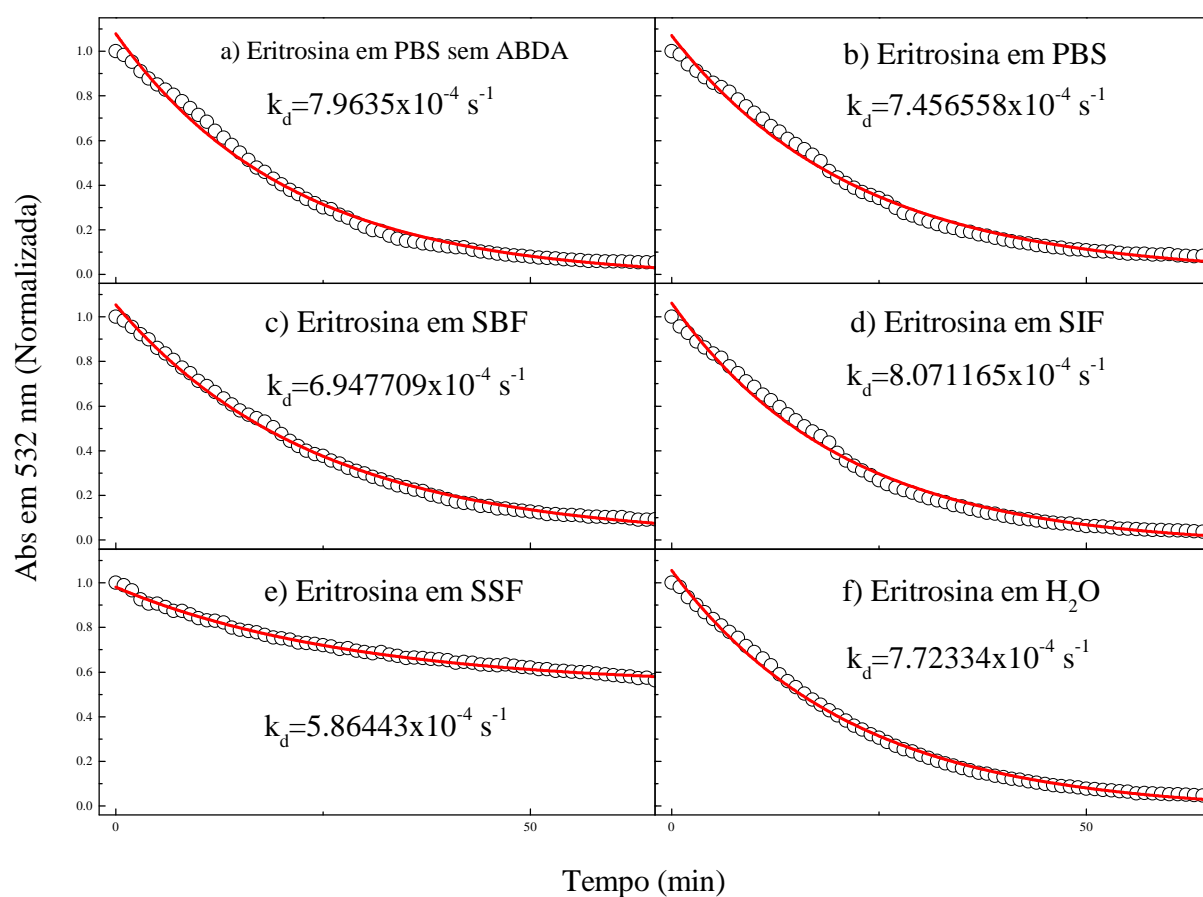


Figura B.1: Cinéticas de fotobranqueamento da Eritrosina e seus respectivos ajustes.

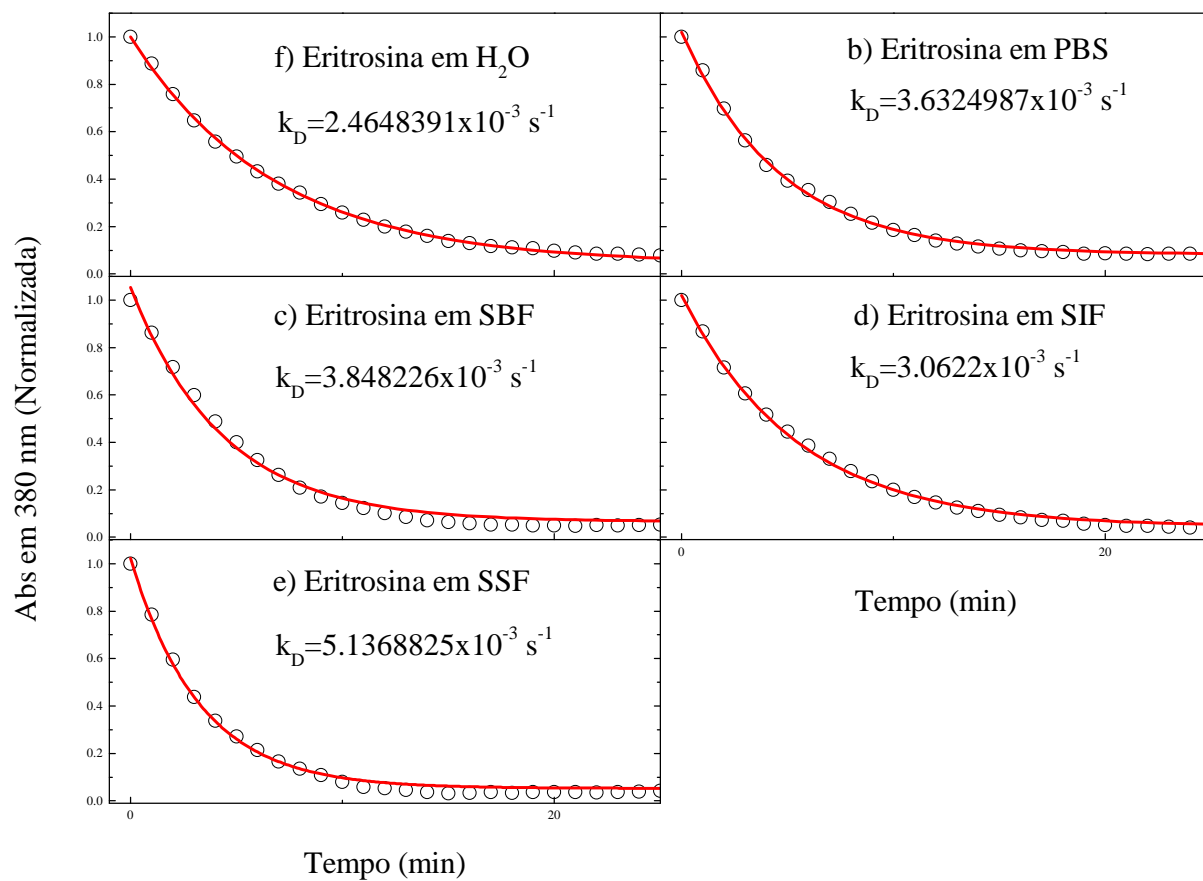


Figura B.2: Cinéticas de foto-oxidação do ABDA e seus respectivos ajustes.

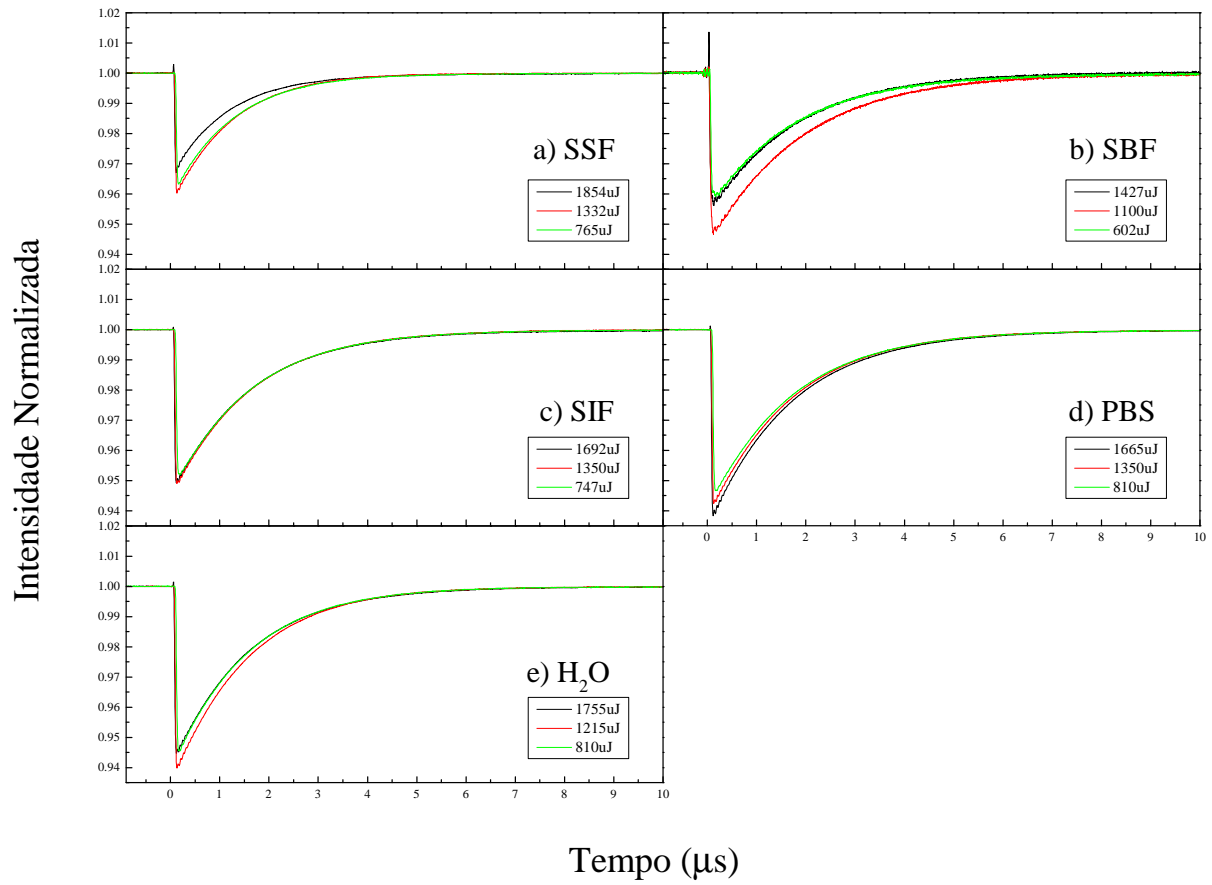


Figura B.3: Transientes de transmitância dependentes do tempo para a Eritrosina em diferentes fluidos simulados.

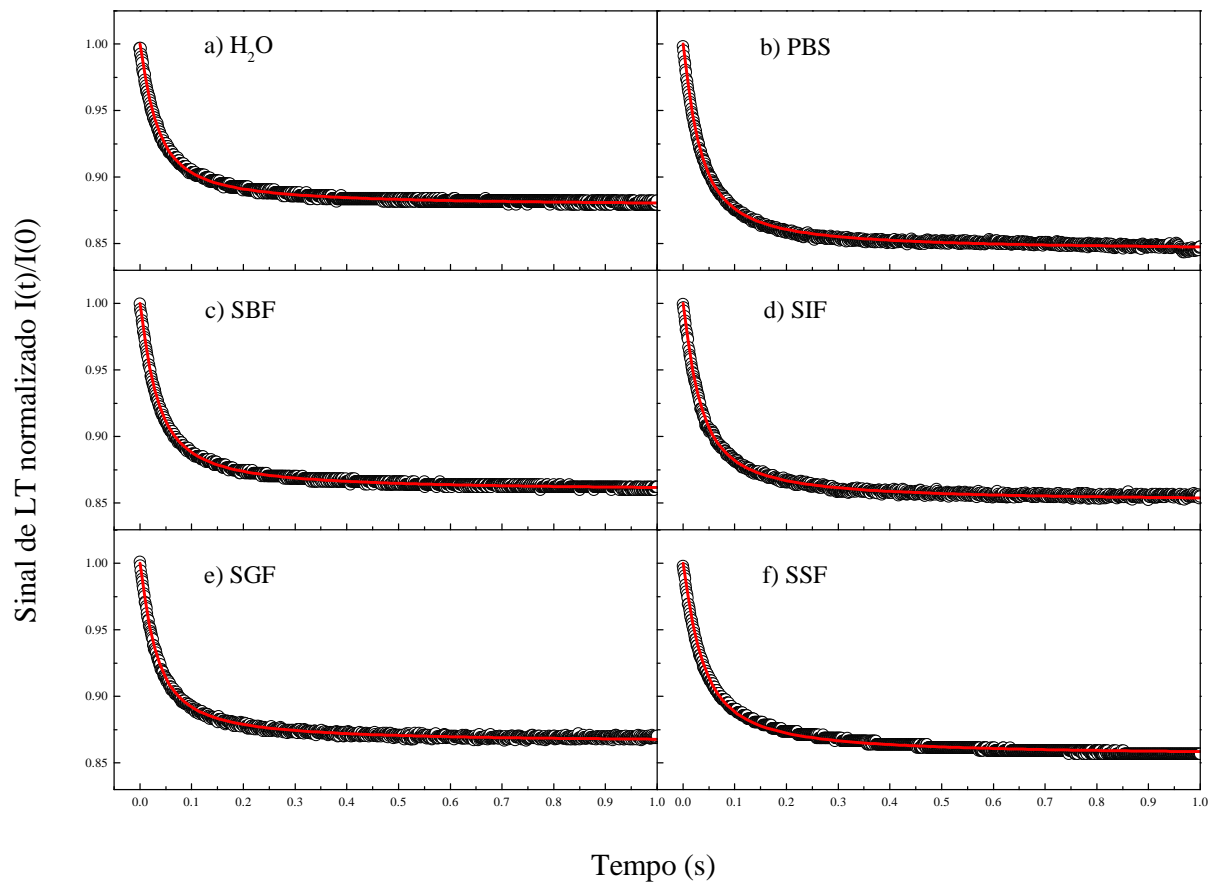


Figura B.4: Sinal de LT para solventes puros com ajustes em linhas vermelhas.

# Apêndice C

## Trabalho publicado

E. V. Bergmann, O. A. Capeloto, A. T. Catanio, G. A. Flizikowski, N. M. Kimura, C. F. Freitas, L. S. Herculano, N. G. Astrath, e L. C. Malacarne, “Photoactivation of erythrosine in simulated body fluids,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 259, p. 119867, 2021.



Contents lists available at ScienceDirect

## Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/saa](http://www.elsevier.com/locate/saa)

## Photoactivation of Erythrosine in simulated body fluids



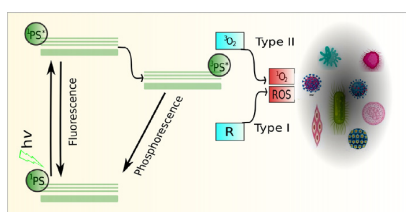
Eduardo V. Bergmann<sup>a</sup>, Otávio A. Capeloto<sup>b</sup>, Angelo T.S. Catanio<sup>a</sup>, Gabriel A.S. Flizikowski<sup>a</sup>, Newller M. Kimura<sup>a</sup>, Camila F. Freitas<sup>c</sup>, Leandro S. Herculano<sup>d</sup>, Nelson G.C. Astrath<sup>a,\*</sup>, Luis C. Malacarne<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR 87020-900, Brazil<sup>b</sup> Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari, Universidade Federal do Amazonas, Coari, AM 69460-000, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR 87020-900, Brazil<sup>d</sup> Departamento de Física, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, PR 85884-000, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Photoactivation process of Erythrosine was investigated in different simulated body fluids.
- Optical techniques were used to investigate the photoactivation process.
- Thermal lens results revealed photobleaching in submicromolar concentrations range.
- Clear differences in the photodegradation kinetics, triplet lifetime and singlet oxygen generation were observed.
- The results presented could help to explain and to define Photodynamic Therapy application protocols.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 March 2021

Received in revised form 15 April 2021

Accepted 19 April 2021

Available online 27 April 2021

## Keywords:

Erythrosine  
Photobleaching  
Triplet Lifetime  
Thermal Lens

## ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a powerful technique for the treatment of cancer and non-cancerous diseases. The precise PDT treatment protocol definition must consider the performance difference between *in vitro* and *in vivo* applications. This also occurs in other biological studies, and to partially overcome this difficulty, the simulated body fluids are generally applied as a prior understanding of the particularities of the different systems. However, in PDT these studies are scarce. In this work, we investigated the photoactivation of Erythrosine, a photosensitizer widely used in PDT, in different simulated body fluids. Differences in the photodegradation kinetics, triplet lifetime, and singlet oxygen generation were observed. The results can help to explain and to define PDT application protocols.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a technique applied to combat various diseases, which is based on the photoactivation of a photosensitizing compound (PS) by radiation of wavelength consistent

with its absorption spectrum, in the presence of molecular oxygen ( $^3O_2$ ). The interaction of these species leads to the generation of cytotoxic species, such as singlet oxygen ( $^1O_2$ ) and other reactive oxygen species (ROS), which are responsible for cell death [1–4]. Currently, PDT represents a well-established clinical modality for the treatment of a variety of malignant tumors [5,6]. However, it has also been used in the treatment of various non-cancerous conditions such as benign prostatic hyperplasia, age-related macular

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [ngcastrath@uem.br](mailto:ngcastrath@uem.br) (N.G.C. Astrath), [lcmala@dfi.uem.br](mailto:lcmala@dfi.uem.br) (L.C. Malacarne).

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119867>

1386-1425/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

degeneration of the retina, and in the treatment of infectious diseases [7]. Particularly, when directed to the treatment of microorganisms it is referred to as Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), and can be applied to control diseases caused by bacteria, fungi, parasites, and viruses [7].

As represented in the Jablonsky energy diagram in Fig. 1, cell death occurs by two main mechanisms. In the type I mechanism, the PS can transfer electrons or subtract hydrogen atoms from a substrate, generating free radicals. These species react with molecular oxygen, giving rise to several reactive oxygen species capable of oxidizing a variety of biomolecules [5]. On the other hand, in the type II mechanism, the PS in the long-lived excited triplet state ( $^3PS^*$ ) transfers energy directly to molecular oxygen in its triplet fundamental state ( $^3O_2$ ), giving rise to singlet oxygen ( $^1O_2$ ). Singlet oxygen is a highly reactive specie that attacks/oxidizes biological molecules easily, causing disorder in the cell wall and damages to the cellular organelles, inducing cell death, and destruction of diseased tissue.

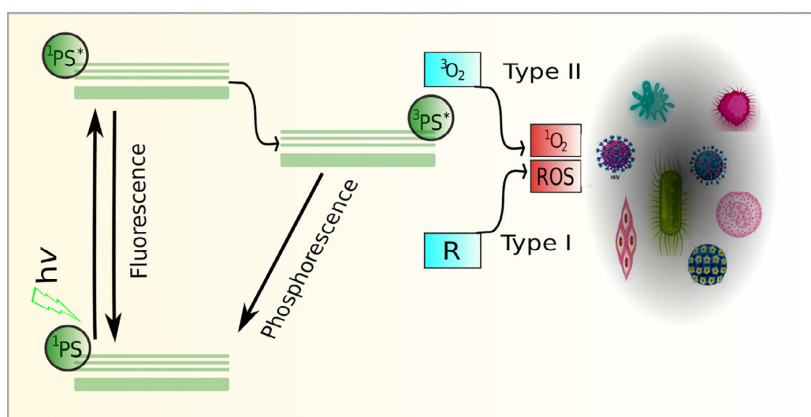
In the last decade, there are studies in the search for ideal PS with low toxicity in the absence of light, high affinity with diseased tissue, non-prolonged sensitivity, high solubility in aqueous and biological media, high free radical and reactive oxygen forms generation, in addition to the rapid elimination by the body [6]. Erythrosine B (Ery), or 2,4,5,7-Tetraiodofluorescein disodium salt also known as acid red dye 51 (Color Index, CI 45430) is a cherry-pink dye, marketed in the form of sodium salt. It is a halo-derivative of fluorescein that has four iodine substituent in its chromophoric region. Ery has the advantage of being the only dye among xanthenes accepted for food use. Thus, it is commonly used in sweets, yogurts, and soft drinks whenever you want to emphasize the color pink or red [8,9]. It also presents a potential application in PDT and aPDT due to its relatively low toxicity, high optical absorption in visible light, long-lived triplet state, and high singlet oxygen generation [10–13]. Furthermore, a special differential of Ery is its usability as evidence of dental plaque. In this sense, Ery can be distinctly seen providing a valuable visual aid and help in the oral health [14]. This kind of oral biofilms, mainly constituted by *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus species*, are also responsible for demineralization of the teeth and the formation of caries [15]. To make matters worse, oral biofilms are also associated with the resistance of oral bacteria to antibiotics [16]. In this scenario, we can take advantage of the preferential accumulation of Ery in dental biofilm applying visible light

doses from the light-curing used in dental offices aiming the aPDT [17–19]. Besides that, recent studies have shown the photodynamic activity of Ery in several strains of bacteria, including *Streptococcus mutans* [20,23,24,21,22]. Ery activity has also been demonstrated on the *Candida Albicans* fungi lineage [25].

The positive results of the use of PDT or aPDT are not always reached, especially due to the lack of knowledge of the mechanisms involved, in addition to the protocols used that are often empirically determined. By the strong dependence on both environmental and excitation conditions, *in vitro* and *in vivo* results are not always compatibles. It is known that xanthenes can exist in four different pH-dependent protolytic forms: cationic, neutral, monoanionic, and dianionic. Besides that, cationic species is only found in extremely acid conditions. Moreover, the neutral species presents three tautomeric forms: the quinoid, the lactone (NEL), and the zwitterionic. The monoanionic species exhibits two tautomers: the carboxylate and the phenolate forms, and the dianionic species is present only as a tautomeric structure [26]. These different forms can change light absorption and dye photoactivity [27].

A good characterization must include different conditions involved in the triplet lifetime, photodegradation processes, and ROS generation. The application of PDT requires a good understanding of the efficiency of single oxygen under physiological conditions. Optimally, the efficacy should be studied *in vivo* using relevant administration routes and dosages, but such studies are complicated and expensive. Thus, an option is a study *in vitro* using simulated body fluids. However, in PDT such studies are scarce to date. It has been shown that the protolytic equilibria between neutral/monoanionic and monoanionic/dianionic species are medium dependent [26]. The aim of this study is therefore to determine the influence of different microenvironments on the photoactivation of Ery, which is essential for the development of Ery-based PDT.

In this work, we used a set of optical techniques to investigate the photoactivation process of Ery in different simulated body fluids. The singlet oxygen generation, triplet lifetime and photodegradation rate of Ery in Simulated Saliva Fluid (SSF), and the biomimetic medium Simulate Body Fluid (SBF) are investigated. The results are compared to the usual Ery in water and Phosphate Buffered Saline (PBS) solutions. Also, the study is extended to Simulated Intestinal Fluid (SIF) and Simulated gastric fluid (SGF) without enzyme. SIF was included since it presents the same pH value as PBS and SBF, and similar pH value as SSF, but simpler chemical



**Fig. 1.** Simplified Jablonski energy diagram. The molecule absorbs photon energy going from the ground state  $^1PS$  to the lowest singlet excited state  $^1PS^*$ . The  $^1PS^*$  state can make a radiative transition back to  $^1PS$  on the time scale of nanoseconds. It can also make a radiationless intersystem crossing to the lowest triplet excited state  $^3PS^*$ . From  $^3PS^*$  there are two possible pathways: It can return to  $^1PS$  directly by emitting phosphorescence or it releases its energy, which is transferred to oxygen or other triplet state quenchers.

compositions, while the SGF fluid is naturally strongly acidic. The values of pH for all fluids are presented in Table 1.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

All reagents used in this study were of the highest purity available and used without further purification: Erythrosine B ( $C_{20}H_{14}Na_2O_5$ ,  $\approx 95\%$ ) and 9,10-anthracenediyl-bis(methylene) dimalonate (ABDA) were obtained from Sigma Aldrich Inc. The stock solutions were prepared for all studied solutions. Fresh solutions of the PS were prepared before each measurement. The appropriated concentrations of Ery were selected to obtain good sensitivity of the corresponding techniques. For time-dependent optical transmittance, absorption, and emission spectra measurements the Ery concentration was  $5 \mu\text{M}$  and for the thermal lens (TL) technique  $100 \text{ nM}$  was used. The ABDA stock solution ( $2 \text{ mM}$ ) was dissolved in  $2 \text{ mL}$  of DMSO, then ultrasonicated for  $10 \text{ min}$ . This stock solution was added in Ery solutions to get significant absorbance in the region around  $380 \text{ nm}$ . The preparation of the simulated body fluids was done following standard procedure [28,29] using ultrapure type I water (Milli-Q Reference Water Purification System). The SSF was purchased from Medicinal handling pharmacy (Maringá-Brazil). The composition of all fluids is shown in Table S1 in the Supplementary Material.

### 2.2. Time resolved transmittance

The experimental setup for the triplet state lifetime measurements is shown in Fig. 2. A Nd:YAG pulsed laser (Quantel, Brilliant B, at  $532 \text{ nm}$ ) was used as the excitation laser and a He-Ne (Uniphase, model 11335p) was used as the probe laser. In order to monitor the change in the transmittance of the probe laser, a filter-photodiode assembly (Newport, model 818-BB-22) was used. To avoid thermal lens effects, the lens  $L_1$  with  $30.0 \text{ cm}$  focal length was placed at the probe beam path, positioning the resistive furnace (at  $30^\circ\text{C}$ ) at the lens focus. The samples were placed in a  $0.5\text{-cm}$  thick quartz parallel cuvette. A second lens  $L_2$  of  $7.5 \text{ cm}$  focal length was also used to focus the entire probe beam into the photodiode  $P_1$ . A laser line filter  $F_1$  (ThorLabs, model FL632.8-10) was positioned in front of the photodiode  $P_2$  to prevent the detection of the excitation laser. Two dichroic mirrors,  $M_1$  and  $M_2$  (Thorlabs, model DMLP567), were used to set up the beams collinearly in the sample and to separate the excitation beam after passing the sample. After the sample, the excitation beam was directed to the trigger sensor,  $P_2$ . The signal was pre-amplified and recorded by a digital oscilloscope (Tektronix, model DPO4102B). In the present setup, the radii of the probe and excitation beams were  $\omega_{0e} = 143.5 \mu\text{m}$  and  $\omega_p = 2.3 \mu\text{m}$ , respectively. The excitation and probe beam radii were measured with a laser beam profiling camera (Coherent, model LaserCam-HR).

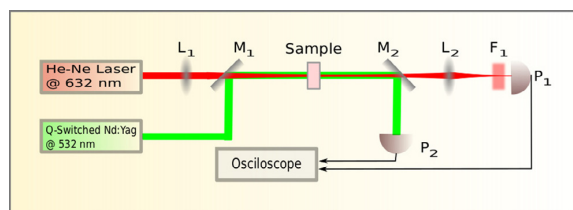


Fig. 2. Time resolved transmittance setup.  $M_1, L_1, P_1$  are mirrors, lens, and photodiode, respectively.  $F_1$  is an optical filter.

### 2.3. UV-vis Spectrometry

The photodegradation kinetics by the absorbance spectra were measured using an UV-vis spectrometer (Varian, model Cary 50). This equipment is characterized by working with phase radiation, where the external light is not capable of causing interference in the analyzes. The photobleaching was performed by employing a homemade green LED system (peak at  $\lambda = 516 \text{ nm}$  and variance around  $30 \text{ nm}$ ). The samples (deposited in a quartz cuvette with four polished faces and thickness of  $1.0 \text{ cm}$ ) were placed in a heat control system where they were uniformly irradiated from the top side at constant irradiance of  $17.6 \text{ mW/cm}^2$ . The singlet oxygen generation by the photoactivation of Ery was monitored by the decrease in the ABDA absorption region. ABDA is a derivative of anthracene that can be converted to its corresponding endoperoxide after being oxidized by  $^1\text{O}_2$ , which results in a decrease in its absorbance peaks [30,31]. ABDA was added at the solutions of  $5 \mu\text{M}$  of Ery in each solvent and homogeneously mixed, and then irradiated with the green light. The absorbance spectra were recorded every minute. The emission spectra were measured using a fluorescence spectrometer (Perkin Elmer, model LS45) with the excitation wavelength at  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$  in order to avoid the overlap of the excitation and emission spectra.

### 2.4. Thermal Lens Spectrometry

In the mode-mismatched dual-beam thermal lens (TL) technique, two continuous TEM<sub>00</sub> Gaussian lasers were used to generate and probe the thermal lens effect. When photoreaction occurs during the excitation laser irradiation, the optical absorption of the sample changes followed by the change in heat production. If the amount of heat decreases, the optical path and, consequently, the amplitude of the thermal lens effect becomes smaller. This temporal dependence of the TL signal gives us important information about the photoreaction process. Besides, a variation in the fluorescence yield also affects the amount of generated heat, inducing a change in TL amplitude. As fluorescence and photobleaching occur at different time scales, both effects are detectable.

Table 1

Triplet lifetime, pH, thermal diffusivity, and  $k_D/k_d$  ratio for Ery in simulated body fluids at  $30^\circ\text{C}$ .

Solution	Triplet lifetime $\mu\text{s}$	pH <sup>a</sup>	$D_{th}^b$ $\times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$	$k_D/k_d$	$k_R$	$\gamma_A$
Water	$1.7 \pm 0.2$	6.9	$1.46 \pm 0.03$	3.2	$6.0 \pm 0.3$	131.3
PBS	$1.8 \pm 0.2$	7.4	$1.40 \pm 0.05$	4.2	$8.5 \pm 0.3$	149.6
SBF	$1.8 \pm 0.1$	7.4	$1.52 \pm 0.04$	4.8	$8.6 \pm 0.8$	151.0
SIF	$1.7 \pm 0.1$	7.4	$1.46 \pm 0.03$	3.4	$7.6 \pm 0.9$	147.1
SSF	$1.3 \pm 0.2$	6.7	$1.53 \pm 0.07$	7.9	$4.1 \pm 1.1$	231.5
SGF	$1.1 \pm 0.5$	1.2	$1.33 \pm 0.05$			
SBF + N	$11.1 \pm 0.5$	7.4				

<sup>a</sup> Measured using pH meter model iCEL PH-1600, <sup>b</sup> Obtained by the fitting of TL transients of pure fluids.



The advantage of TL technique is its high sensitivity, which makes it a very successful method to detect the kinetics of reactions in very diluted solutions (submicromolar concentrations range), which cannot be accessed by commercially available photometric techniques. The TL signal is given by [32]

$$I(t) = \left| \int_0^{\infty} \exp[-(1+iV)g - i\phi(g,t)] dg \right|^2, \quad (1)$$

where  $\phi(g,t)$  is the induced phase shift. In the presence of photobleaching, the phase shift for first order reaction can be given approximately by [32]

$$\phi(g,t) = \frac{\theta_T L}{t_c} \int_0^t \beta(\tau) \frac{1 - e^{-2mg/(1-2\tau/t_c)}}{(1-2\tau/t_c)} d\tau, \quad (2)$$

with  $\beta(t) = \beta_0[(1-\epsilon)e^{-kt} + \epsilon] + \beta_{sol}$ , in which  $\beta_0$  is the optical absorption coefficient of the reactant and  $\epsilon = \epsilon_P/\epsilon_R$  is the ratio between the molar attenuation coefficients of the product and reactant, and  $\beta_{sol}$  is the solvent optical absorption. For more complex reaction systems, as in the photobleaching of photosensitizers used in PDT, only numerical solution can be obtained. In this case, by the large numbers of processes, the multiparameter fitting leads to a large fluctuation in the results. Details of TL technique are found in Refs. [33,34]. Here, we use Eqs. 1 and 2 to obtain an effective constant that gives only qualitative results on the rate of photobleaching for low dye concentration.

### 3. Results and Discussion

The effect of the photoactivation of Ery in PBS in the presence of ABDA is observed in Fig. 3 (a). ABDA presents peaks around 380 nm, in which the monotonically decreased in intensity with the increase in exposure time indicates the presence of singlet oxygen. ABDA reacts with  $^1O_2$  to form the corresponding endoperoxide component observed by the decrease of the optical absorption [30,31]. To confirm whether the reduction of ABDA was induced by singlet oxygen generated in the photoactivation of Ery, the solutions of PBS containing only ABDA were irradiated and no variation

was observed (Fig. S2 (a), Supplementary Material). Also, all solutions of Ery in the presence of ABDA in dark conditions do not present any significant variation. The decrease in the optical absorption in the region around 532 nm corresponds to the Ery photobleaching. The decay time for the Ery peak is not affected by the presence of ABDA. The kinetics for the absorption spectra for all solutions and also for the control samples are presented in the Supplementary Material.

The emission spectra of Ery in different solutions are shown in Fig. 3 (b). Similar emissions are observed for Ery in Water, PBS, SIF, and SBF. In the case of SSF, a small decrease in the fluorescence occurs, and for SGF there is a total quenching in the fluorescence. This quenching in the emission is related to the tautomeric species present at this pH, as the NEL, where the resonance rupture on the chromophoric ring due to the  $sp^3$  hybridization of the carbon  $C^9$  that reduces the light absorption and the dye photoactivity [26]. The absorption spectra for all fluids and the corresponding LED emission are shown in Fig. S1 of Supplementary Material.

The time evolution of the peak at 380 nm for all studied fluids are shown in Fig. 3 (c). As expected, in the SGF solution the peak at 380 nm remains approximately constant indicating that no production of  $^1O_2$  occurs under this condition, as a direct consequence of the small light absorption. In the SSF, a faster decrease than all other fluids is observed, indicating a higher rate of singlet oxygen production. In Fig. 3 (d), the decreasing of the peak at 532 nm describes the rate of photobleaching. The results show that for the solutions of Ery in water, PBS, SIF, and SBF, a similar rate of photobleaching is observed. The solution of Ery in SSF has a slower photobleaching rate, which can partially explain the increase in singlet oxygen production. The fitting of ABDA and Ery kinetics by pure exponential decay function gives the corresponding singlet oxygen production rate ( $k_D$ ) and photobleaching rate ( $k_d$ ). The ratio of  $k_D/k_d$  was used to determine the relative photodynamic activities against cancer cells [35]. The ratio of  $k_D/k_d$  for Ery shows the increase in the efficiency of Ery in SSF in comparison with the other fluids (Table 1). In fact, the Ery photobleaching trend observed in Fig. 3 (d) is not well described by a simple exponential function, which is related to the different processes evolving both oxygen-

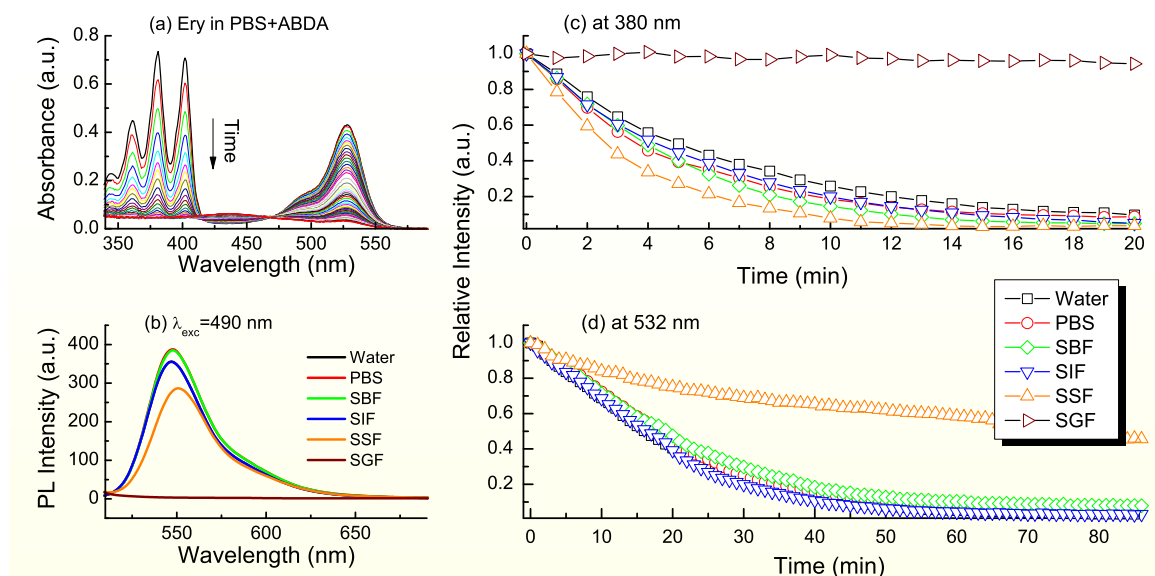


Fig. 3. a) Kinetics for the absorption spectrum for Ery in PBS in the presence of ABDA (for the other fluids see Supplementary Material), (b) Emission spectra for Ery in all simulated fluids. (c) The photo-oxidation of ABDA. (d) photobleaching of Ery as a function of irradiation time for Ery in simulated body fluids.

dye, dye-dye, and dye-quenchers in the full contribution to the Ery photodegradation [36]. As the absorbance presents a slight variation, the relative photodynamic activity should take the number of absorbed photons into account, which in the presence of photobleaching is given by [37]

$$N_{\text{ABS}} = \frac{1}{hcN_a} \int_0^t \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} P_e(\lambda) \left[ 1 - 10^{-\text{Abs}(\lambda)} \right] e^{-k_q \tau} \lambda d\lambda d\tau, \quad (3)$$

where  $t$  is the illumination time,  $h$  is the Plank constant,  $c$  is the speed of light,  $N_a$  is the Avogadro constant,  $\lambda_{i,f}$  is the initial/final wavelength, and  $P_e = \int I dA$  is the spectral power, or the Spectral irradiance integrated over the illuminated area. The chemical photodynamic efficiency is given by  $\gamma_{\Delta} = k_D/N_{\text{ABS}}$ . For a time of  $t = 20$  min, the results for  $\gamma_{\Delta}$  are presented in Table 1, showing the increase in the efficiency of Ery in SSF in comparison with the other fluids.

The bleaching of Ery in SGF can be explained by the acidic condition of this solution, in which the Ery assumes neutral protolytic form [26]. However, the change in the emission, photobleaching, and singlet oxygen generation of Ery in SSF is not a pH effect since it has similar pH to the other solutions, where only dianionic form is expected [26]. Therefore, the pH values alone can not be used as a basis for discussing the observed differences. Direct interaction with the medium probably is responsible for this effect.

Fig. 4 shows the normalized time-dependent transmittance transients for Ery in PBS with the corresponding fit by the exponential function, which is related to the triplet state lifetime. The inset plot and Table 1 show the corresponding triplet lifetime ( $\tau$ ) for all samples obtained by triplicate measurements. The molecule absorbs the photon energy and is excited from the ground state  $^1PS$  to the lowest singlet excited state  $^1PS^*$ . The  $^1PS^*$  state can make a radiative transition back to  $^1PS$  on the time scale of nanoseconds. It can also make radiation less intersystem crossing to the lowest triplet excited state  $^3PS^*$ . This is a long-lived state, on the scale of  $\mu\text{s}$ , which presents a higher optical absorption at the probe wavelength (632 nm) than the fundamental state [38]. The characteristic lifetime ( $\tau$ ) is obtained by the fitting of the experimental data by an exponential decay function,  $T(t) = A + Be^{-t/\tau}$ , and the values obtained are consistent with the triplet lifetime for Erythrosin in water [38]. As observed the lifetime of SSF is smaller than the other solutions showing high energy transfer efficiency from the triplet state to the molecular oxygen. This result in association with the

emission spectra and the photoactivation kinetics from the absorption spectra can explain the higher quantum efficiency of singlet oxygen generation than in all other cases. To check the correlation of oxygen as a quencher of triplet state, the triplet lifetime was obtained for Ery in PBS when the  $O_2$  was purged by flushing the solution with nitrogen. It was observed an increase in the tripled lifetime to  $\approx 11 \mu\text{s}$ , showing the strong quencher effect of triplet state by Oxygen.

Finally, the TL technique is employed as an additional tool in the study of photoactivation kinetics of Ery solutions. As the photobleaching process is dependent on dye-dye interaction, it can be affected by the dye concentration. Here, the high sensibility of the TL technique is used to investigate, in sub-micromolar concentration, the effects observed previously in the UV-vis kinetics. The TL transient gives information about both absorption and fluorescence changes, provided that their characteristic times are distinct from the thermal time to be discriminated in the transient. The fluorescence characteristic time is related to the fast radiative decay with a time scale of nanoseconds. The thermal characteristic time is defined by the thermal diffusivity property, which in fluids is of micro-seconds scale. The photobleaching is related to a set of reactions between dye-dye, dye-oxygen, and dye-quenchers, and it is governed by mass diffusion property, which implies a time-scale bigger than the thermal time. In this direction, the change in the fluorescence basically affects the initial amplitude of the TL signal. However, this amplitude is also dependent on the thermal refractive index coefficient,  $dn/dT$ , the thermal conductivity, and the initial optical absorption coefficient. Then, the amplitude of TL transients can not be compared easily without a precise determination of all parameters, which implies the use of additional techniques. However, the change in the optical absorption by photobleaching affects the evolution of the TL signal after the initial transient and can give information about the photobleaching rate. Figs. 5 (a)-(e) show the normalized TL transients for the simulated body fluids in presence of Ery for the excitation power  $P = 100$  mW. As SGF presents a smaller optical absorption than the other fluids, the TL signal was obtained with  $P = 700$  mW. All transients for pure solutions or in the presence of Ery with different excitation power are shown in Supplementary Material. The dotted curves in Fig. 5 show the expected thermal signal in the absence of photobleaching. The experimental curves (open circles) show that initially the amplitude of the TL signal decreases when the excitation laser irradiates de samples, in which mainly the thermal effect is supposed to occur. Thereafter, photobleaching takes place decreasing the amplitude of the transients by reducing the concentration of absorbing species. Note that the photobleaching rate of Ery in water, PBS, SIF, and SBF are similar, indicating by the continuous lines in Fig. 5. A slowly increase in the TL signal is observed for Ery in SSF, indicating smaller photobleaching than in water, PBS, SIF, and SBF, in agreement with the results from the absorption spectra kinetics presented in Fig. 3 (b). For the solution of Ery in SGF, Fig. 5 (f), the result confirms that in acidic condition any photoactivation is observed, and the transients resemble the pure thermal behavior, in agreement with previous results.

The TL technique in the presence of photochemical reaction can be analytically described and can give quantitative physical information only in the case of first-order reaction [33,34]. However, the strong dependence on both environmental and excitation conditions indicate that photobleaching can occur by several different mechanisms and, from a general point of view, can be considered to be high complex [36]. As the complexity of the overall photobleaching processes, with different reaction rates that also depend on different physical conditions, the dynamics of photobleaching is in general not well described by simple or double exponential behavior. The photobleaching of sensitizers results in semi-

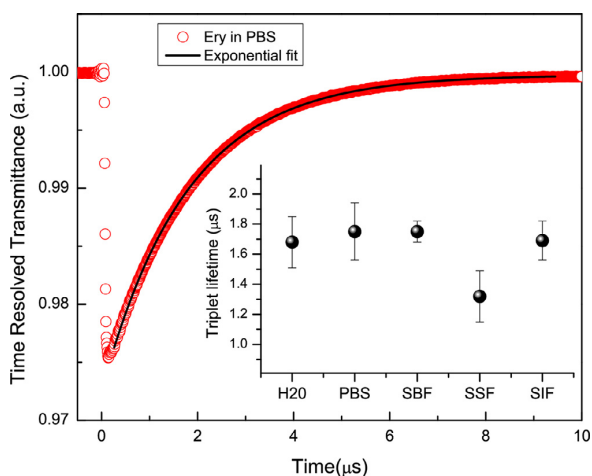
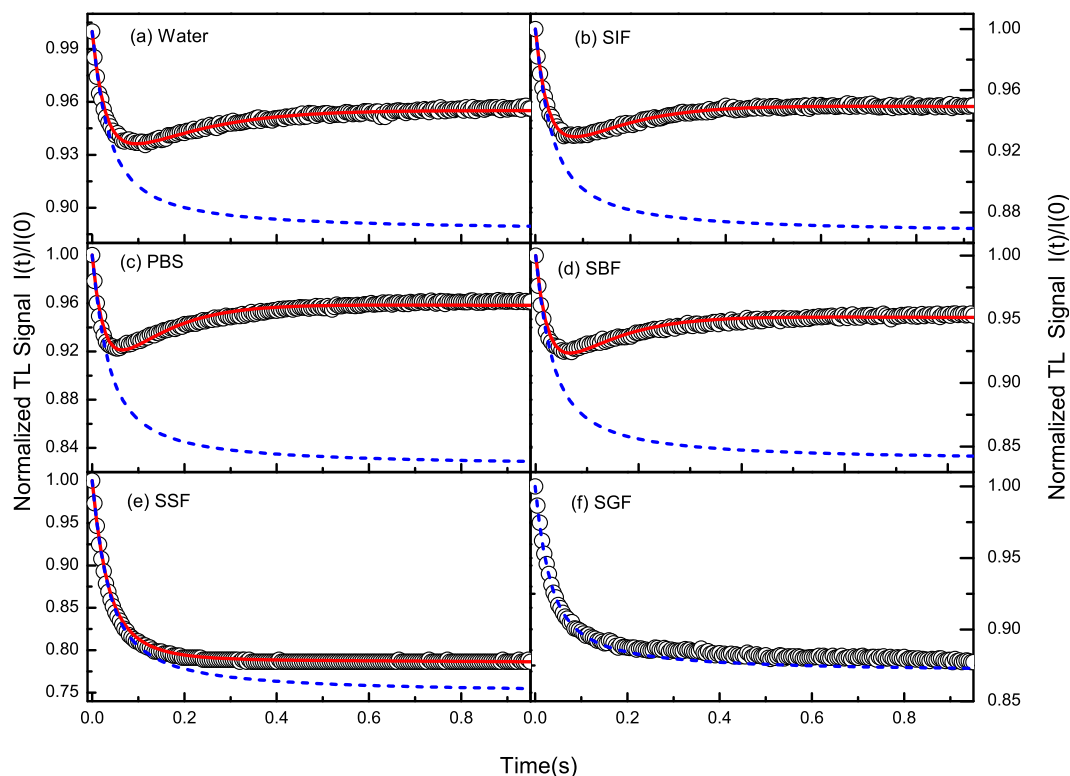


Fig. 4. Time-dependent transmittance transients for the Ery in PBS (open circle) and the exponential fit by the exponential function  $T(t) = A + Be^{-t/\tau}$  (continuous line). The corresponding triplet lifetime for all fluids in shown in the inset plot.



**Fig. 5.** Normalized TL transients (open circles),  $I(t)/I(0)$ , for (a) water and the simulated body fluids in the presence of Ery; (b) SIF, (c) PBS, (d) SBF, (e) SSF, (f) SGF. The dashed curves represent the expected thermal signal. The excitation power was  $P = 100$  mW with exception for Ery in SGF that was  $P = 700$  mW. The Ery concentration is 100 nM for all solutions. The continuous lines are the fitting of the transients with the approximated model given by Eq. 1 with Eq. 2.

reduced or semi-oxidized radical forms, in which the role of each above mechanisms depends on the relative concentrations of sensitizers, oxygen, and quenchers [39,36]. Thereafter, only qualitative results can be obtained in the case of FS from the TL transients. The global reaction rate  $k_R$  obtained from the fitting of all transients with the approximated model Eq. 1, with Eq. 2, is presented in Table 1. The uncertainty was obtained by the fitting of the transients at different excitation powers, considering the mean values and the standard deviation.

Note that there is no direct relationship between the two constants  $k_R$  (from TL measurements) and  $k_d$  (from UV-vis measurements), since both parameters are obtained in different experimental conditions. In the TL measurements, the sample is illuminated by a focused laser beam with a known intensity distribution, which allows the precise definition of the reaction constant in units of  $J^{-1}$ . In the UV-vis absorption measurements, in addition to the difficulty of defining the number of photons per unit area, the concentration required to detect any change in transmittance is around two orders of magnitude larger than in the TL experiments. However, similar results are obtained, being the photobleaching rate constants smaller in SSF than in the other fluids in both conditions.

#### 4. Conclusion

The photoactivation of Ery in the simulated body fluids was studied with different photometric techniques and the results from the triplet lifetime, the singlet oxygen generation efficiency and photobleaching rate gave different values that can be not explained

only by pH dependence. The SSF presented a better performance than other similar buffer composition as SBF and SBF (same neutral pH). Thermal lens technique validated the results obtained by the other optical techniques, showing that the observed results are not concentration-dependent since in thermal lens it was used submicromolar concentrations range, which cannot be accessed by commercially available photometric techniques. The results presented here can be useful in the light dosimetry definition, especially in odontology applications where Ery has been largely used.

#### Author contribution statement

E.V.B.: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization; O.A.C., A.T.S.C., G.A.S.F., N.M.K., C.F.F., L.S.H.: Methodology, Investigation, Validation; N.G.C.A.: Writing - Reviewing and Editing; L.C.M.: Supervision, Visualization, Writing - Reviewing and Editing.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work was supported by CNPq (401160/2016-5, 402836/2018-9), CAPES (Finance Code 001), and Fundação Araucária.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119867>.

## References

- [1] I.J. MacDonald, T.J. Dougherty, Basic principles of photodynamic therapy, *J. Porphyr. Phthalocyanines* 5 (2001) 105–129, <https://doi.org/10.1002/jppp.328>.
- [2] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis and Photodyn. Ther.* 1 (2004) 279–293, [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- [3] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagnosis and Photodyn. Ther.* 2 (2005) 1–23, [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X).
- [4] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiagnosis and Photodyn. Ther.* 2 (2005) 91–106, [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00060-8).
- [5] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nature Rev. Cancer* 3 (2003) 380–387, <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [6] A.F. Santos, D.R.Q. Almeida, L.F. Terra, M.S. Baptista, L. Labriola, Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review, *J. Cancer Metastasis Treat.* 5 (2019) 25, <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>.
- [7] M.R. Hamblin, Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes, *Curr. Opin. Microbiol.* 33 (2016) 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>.
- [8] A.A. de Barros, E.B.P. Barros, A química dos alimentos: produtos fermentados e corantes, *Soc. Bras. Química, Edit-SBQ, São Paulo* (2010), ISBN: 978-85-64099-04-3.
- [9] F.M.D. Chequer, V.P. Venancio, M.L.P. Bianchi, L.M.G. Antunes, Genotoxic and Mutagenic Effects of Erythrosine B, a Xanthene Food Dye, on HepG2 Cells, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 3447–3451, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.042>.
- [10] M.C. DeRosa, R.J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coord. Chem. Rev.* 233–234 (2002) 351–371, [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).
- [11] A. Mansha, G. Grampp, S. Landgraf, Photoinduced electron transfer between triplet erythrosin dianion and highly charged ionic quenchers, *Monatsh. Chem.* 142 (2011) 11–17, <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0414-1>.
- [12] A. Mansha, S. Asim, G. Grampp, M. Zahid, S. Landgraf, A Mechanistic Study of Photoinduced Electron Transfer from Triplet Erythrosin to Various Quinones Using Time Resolved Absorption and ESR-CIDEF Measurements, *Z. Phys. Chem.* 228 (2014) 301–324, <https://doi.org/10.1515/zpch-2013-0461>.
- [13] C.F. de Freitas, I.R. Calori, A.C.P. da Silva, L.V. de Castro, F. Sato, D.S. Pellosi, A.L. Tessler, W. Caetano, N. Hioka, PEG-coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 175 (2019) 530–544, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.031>.
- [14] R. Keerthana, G. Jeevanandan, Recent developments in dental plaque, *Drug Invention Today* 10 (2018) 2769–2772.
- [15] K. Jhaharia, A. Parolia, K.V. Shetty, L.K. Mehta, Biofilm in endodontics: A review, *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 5 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.4103/2231-0762.151956>.
- [16] I. Kanwar, A.K. Sah, P.K. Suresh, Biofilm-mediated Antibiotic-resistant Oral Bacterial Infections: Mechanism and Combat Strategies, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 2084–2095, <https://doi.org/10.2174/1381612822666161124154549>.
- [17] Y.-H. Lee, H.-W. Park, J.-H. Lee, H.-W. Seo, S.-Y. Lee, The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit, *Int. J. Oral Sci.* 4 (2012) 196–201, <https://doi.org/10.1038/ijos.2012.63>.
- [18] J. Gong, H. Park, J. Lee, H. Seo, S. Lee, Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Candida albicans*, *Photobiomodul. Photomed. Laser Surg.* 37 (2019) 282–287, <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4571>.
- [19] L.M. Tokubo, P.L. Rosalen, J.C.O. Sardi, I.A. Freires, M. Fujimaki, J.E. Umeda, P.M. Barbosa, G.O. Tecchio, N. Hioka, C.F. de Freitas, R.S.S. Terada, Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 23 (2018) 94–98, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.004>.
- [20] S. Wood, D. Metcalf, D. Devine, C. Robinson, Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms, *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2006) 680–684, <https://doi.org/10.1093/jac/dkl021>.
- [21] D. Metcalf, C. Robinson, D. Devine, S. Wood, Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation, *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2006) 190–192, <https://doi.org/10.1093/jac/dkl205>.
- [22] A.F. Silva, A. Borges, C.F. Freitas, N. Hioka, J.M.G. Mikcha, M. Simões, Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Rose Bengal and Erythrosine Is Effective in the Control of Food-Related Bacteria in Planktonic and Biofilm States, *Molecules* 23 (2018) 2288, <https://doi.org/10.3390/molecules23092288>.
- [23] N.N. Yassunaka, C.F. de Freitas, B.R. Rabello, P.R. Santos, W. Caetano, N. Hioka, T.U. Nakamura, B.A. de Abreu Filho, J.M.G. Mikcha, Photodynamic inactivation mediated by erythrosine and its derivatives on foodborne pathogens and spoilage bacteria, *Curr. Microbiol.* 71 (2015) 243–251, <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0827-5>.
- [24] E. Bonin, L.H. Ribeiro, M.E. Favero, C.F. de Freitas, W. Caetano, N. Hioka, Photodynamic inactivation of foodborne bacteria by eosin Y, *J. Appl. Microbiol.* 124 (2018) 1617–1628, <https://doi.org/10.1111/jam.13727>.
- [25] A.C.B.P. Costa, V.M.C. Rasteiro, E.S.H.S. Hashimoto, C.F. Araújo, C.A. Pereira, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge, Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells, *Oral Med.* 114 (2012) 67–74, <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.02.002>.
- [26] C.F. de Freitas, D. Vanzin, T.L. Braga, D.S. Pellosi, V.R. Batistela, W. Caetano, N. Hioka, Multivariate analysis of protolytic and tautomeric equilibria of Erythrosine B and its ester derivatives in ionic and non-ionic micelles, *J. Mol. Liq.* 313 (2020) 113320, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113320>.
- [27] V.R. Batistela, D.S. Pellosi, F.D. de Souza, W.F. da Costa, S.M.O. Santana, V.R. Souza, W. Caetano, H.P.M. Oliveira, I.S. Scarmínio, N. Hioka, pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (2011) 889–897, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.027>.
- [28] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [29] United States Pharmacopeia – 34 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.
- [30] H. Liu, P.J.H. Carter, A.C. Laan, R. Eelkema, A.G. Denkova, Singlet Oxygen Sensor Green is not a Suitable Probe for  $^1O_2$  in the Presence of Ionizing Radiation, *Sci. Rep.* 9 (2019) 8393, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44880-2>.
- [31] T. Entradas, S. Waldrona, M. Volka, The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 204 (2020) 111787, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>.
- [32] P.R.B. Pedreira, L.R. Hirsch, J.R.D. Pereira, A.N. Medina, A.C. Bento, M.L. Baesso, Real-time quantitative investigation of photochemical reaction using thermal lens measurements: Theory and experiment, *J. Appl. Phys.* 100 (2006) 044906, <https://doi.org/10.1063/1.2245201>.
- [33] L.C. Malacarne, N.G.C. Astrath, A.N. Medina, L.S. Herculano, M.L. Baesso, P.R.B. Pedreira, J. Shen, Q. Wen, K.H. Michaelian, C. Fairbridge, Soret effect and photochemical reaction in liquids with laser-induced local heating, *Opt. Exp.* 19 (2011) 4047–4058, <https://doi.org/10.1364/OE.19.004047>.
- [34] L.C. Malacarne, E.L. Savi, M.L. Baesso, E.K. Lenzi, N.G.C. Astrath, Role of Photophysics Processes in Thermal Lens Spectroscopy of Fluids: A Theoretical Study, *J. Phys. Chem. A* 118 (2014) 5983–5988, <https://doi.org/10.1021/jp505255a>.
- [35] L.G. Arnaut, M.M. Pereira, J.M. Dbrowski, E.F.F. Silva, F.A. Schaberle, A.R. Abreu, L.B. Rocha, M.M. Barsan, K. Urbańska, G. Stochel, C.M.A. Brett, Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers, *Chem. Eur. J.* 20 (2014) 1–13, doi: 10.1002/chem.201304202.
- [36] L. Song, E.J. Nennink, I.T. Young, H.J. Tanke, Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy, *Biophys. J.* 68 (1995) 2588–2600, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80442-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80442-X).
- [37] B.R. Rabello, A.P. Gerola, D.S. Pellosi, A.L. Tessler, J.L. Aparício, W. Caetano, N. Hioka, Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: systematic evaluation, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 238 (2012) 53–62, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.04.012>.
- [38] R. Brennetot, J. Georges, Investigation of the erythrosine triplet decay rate using pulsed-laser photothermal spectrometry and transient bleaching of the singlet state, *AIP Conf. Proc.* 463 (1999) 229–231, <https://doi.org/10.1063/1.58193>.
- [39] J.K.G. Karlsson, O.J. Woodford, R. Al-Aqar, A. Harriman, Effects of Temperature and Concentration on the Rate of Photobleaching of Erythrosine in Water, *J. Phys. Chem. A* 121 (2017) 8569–8576, <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b06440>.

# Referências Bibliográficas

- [1] P. Zhang, H. Huang, S. Banerjee, G. J. Clarkson, C. Ge, C. Imberti, e P. J. Sandler, “Nucleus-targeted organoiridium–albumin conjugate for photodynamic cancer therapy,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 58, no. 8, pp. 2350–2354, 2019.
- [2] C. Santezi, B. D. Reina, e L. N. Dovigo, “Curcumin-mediated photodynamic therapy for the treatment of oral infections—a review,” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 21, pp. 409–415, 2018.
- [3] C. L. L. Saw, P. W. S. Heng, e M. Olivo, “Potentiation of the photodynamic action of hypericin,” *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, vol. 27, no. 1, 2008.
- [4] W. Yu, J. O. Naim, e R. J. Lanzafame, “Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice,” *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, vol. 20, no. 1, pp. 56–63, 1997.
- [5] R. Jayasree, A. Gupta, K. Rathinam, P. Mohanan, e M. Mohanty, “The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats,” *Journal of biomaterials applications*, vol. 15, no. 3, pp. 176–186, 2001.
- [6] L. Jiao, F. Song, J. Cui, e X. Peng, “A near-infrared heptamethine aminocyanine dye with a long-lived excited triplet state for photodynamic therapy,” *Chemical Communications*, vol. 54, no. 66, pp. 9198–9201, 2018.
- [7] R. A. Belotto, M. C. Chavantes, J. P. Tardivo, R. E. dos Santos, R. C. M. Fernandes, A. C. R. T. Horliana, C. Pavani, e D. F. T. da Silva, “Therapeutic comparison between treatments for vulvar lichen sclerosus: study protocol of a randomized prospective and controlled trial,” *BMC Women’s Health*, vol. 17, no. 1, p. 61, 2017.
- [8] J. P. Tardivo, F. Adami, J. A. Correa, M. A. S. Pinhal, e M. S. Baptista, “A clinical trial testing the efficacy of pdt in preventing amputation in diabetic patients,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 11, no. 3, pp. 342–350, 2014.
- [9] J. P. Tardivo e M. S. Baptista, “Treatment of osteomyelitis in the feet of diabetic patients by photodynamic antimicrobial chemotherapy,” *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 27, no. 1, pp. 145–150, 2009.
- [10] J. P. Tardivo, M. Wainwright, e M. Baptista, “Small scale trial of photodynamic treatment of onychomycosis in são paulo,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 150, pp. 66–68, 2015.

- [11] D. Song, J. A. L. Lindoso, L. K. Oyafuso, E. H. Y. Kanashiro, J. L. Cardoso, A. F. Uchoa, J. P. Tardivo, e M. S. Baptista, “Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis,” *Photomedicine and laser surgery*, vol. 29, no. 10, pp. 711–715, 2011.
- [12] J. P. Tardivo, R. Serrano, L. M. Zimmermann, L. L. Matos, M. S. Baptista, M. A. S. Pinhal, e Á. N. Atallah, “Is surgical debridement necessary in the diabetic foot treated with photodynamic therapy?” *Diabetic Foot & Ankle*, vol. 8, no. 1, p. 1373552, 2017.
- [13] J. P. Tardivo, M. Wainwright, e M. S. Baptista, “Local clinical phototreatment of herpes infection in são paulo,” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 9, no. 2, pp. 118–121, 2012.
- [14] G. H. A. Salomao, A. U. Fernandes, M. S. Baptista, J. P. Tardivo, D. M. Christofolini, e J. A. Correa, “Chlorophyllin-m: A new substance for photodynamic therapy in the retina and choroid,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 47, no. 5, pp. 421–425, 2015.
- [15] L. Foulds, “The natural history of cancer,” *Journal of chronic diseases*, vol. 8, no. 1, pp. 2–37, 1958.
- [16] A. Sudhakar, “History of cancer, ancient and modern treatment methods,” *Journal of cancer science & therapy*, vol. 1, no. 2, p. 1, 2009.
- [17] V. T. DeVita e E. Chu, “A history of cancer chemotherapy,” *Cancer research*, vol. 68, no. 21, pp. 8643–8653, 2008.
- [18] J. G. Levy, “Photodynamic therapy,” *Trends in biotechnology*, vol. 13, no. 1, pp. 14–18, 1995.
- [19] M. Wagner, E. Suarez, T. Theodoro, C. Machado Filho, M. Gama, J. Tardivo, F. Paschoal, e M. Pinhal, “Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases,” *Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology*, vol. 37, no. 5, pp. 527–533, 2012.
- [20] F. I. Simplicio, F. Maionchi, e N. Hioka, “Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos,” *Química Nova*, vol. 25, no. 5, pp. 801–807, 2002.
- [21] M. H. Ling, “Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da hipericina e da curcumina em células tumorais,” Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2016.
- [22] J. Tardivo, A. Del Giglio, L. Paschoal, A. Ito, M. d. S. Baptista *et al.*, “Treatment of melanoma lesions using methylene blue and r150 light source,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 1, no. 4, p. 345, 2004.
- [23] T. Dai, Y.-Y. Huang, e M. R. Hamblin, “Photodynamic therapy for localized infections—state of the art,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 6, no. 3-4, pp. 170–188, 2009.

- [24] M. R. Hamblin e T. Hasan, “Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?” *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 3, no. 5, pp. 436–450, 2004.
- [25] X. Cheng, S. Guan, H. Lu, C. Zhao, X. Chen, N. Li, Q. Bai, Y. Tian, e Q. Yu, “Evaluation of the bactericidal effect of nd: Yag, er: Yag, er, cr: Ysgg laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (apdt) in experimentally infected root canals,” *Lasers in surgery and medicine*, vol. 44, no. 10, pp. 824–831, 2012.
- [26] L. Costa, J. P. Tomé, M. G. Neves, A. C. Tomé, J. A. Cavaleiro, M. A. Faustino, Â. Cunha, N. C. Gomes, e A. Almeida, “Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of apdt,” *Antiviral research*, vol. 91, no. 3, pp. 278–282, 2011.
- [27] P. Dharmaratne, D. N. Sapugahawatte, B. Wang, C. L. Chan, K.-M. Lau, C. Lau, K. P. Fung, D. K. Ng, e I. Margaret, “Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (apdt) against methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa): A systematic review,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, p. 112341, 2020.
- [28] E. Carrera, H. Dias, S. Corbi, R. Marcantonio, A. Bernardi, V. Bagnato, M. Hamblin, e A. N. S. Rastelli, “The application of antimicrobial photodynamic therapy (apdt) in dentistry: a critical review,” *Laser physics*, vol. 26, no. 12, p. 123001, 2016.
- [29] J. R. Perussi, “Inativação fotodinâmica de microrganismos,” *Química Nova*, vol. 30, no. 4, pp. 988–994, 2007.
- [30] F. Vohra, Z. Akram, S. H. Safii, R. D. Vaithilingam, A. Ghanem, K. Sergis, e F. Javed, “Role of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 13, pp. 139–147, 2016.
- [31] A. Hallmann-Mikołajczak, “Ebers papyrus. the book of medical knowledge of the 16th century bc egyptians,” *Archiwum historii i filozofii medycyny*, vol. 67, no. 1, pp. 5–14, 2004.
- [32] H. Kostron, B. C. Wilson, J. Moan, Q. Peng, B. Ortel, D.-P. Hader, G. Jori, C. J. Gomer, T. G. Sutedja, N. Brasseur *et al.*, *Photodynamic Therapy*. Royal Society of Chemistry, 2007.
- [33] M. Daniell e J. Hill, “A history of photodynamic therapy,” *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, vol. 61, no. 5, pp. 340–348, 1991.
- [34] A. F. McDonagh, “Phototherapy: from ancient egypt to the new millennium,” *Journal of Perinatology*, vol. 21, no. 1, pp. S7–S12, 2001.
- [35] M. H. Abdel-Kader, *Photodynamic therapy*. Springer, 2016.
- [36] M. Yoshikawa, T. Murakami, H. Shimada, H. Matsuda, J. Yamahara, G. Tanabe, e O. Muraoka, “Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the ayurvedic traditional medicine salacia reticulata in sri lanka and india,” *Tetrahedron Letters*, vol. 38, no. 48, pp. 8367–8370, 1997.

- [37] J. Needham, *Science and Civilisation in China: Chemistry and chemical technology: pt. 1. Paper and printing*. University Press, 1983, vol. 5.
- [38] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel *et al.*, “Photodynamic therapy of cancer: an update,” *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 61, no. 4, pp. 250–281, 2011.
- [39] R. Hobday, *The healing sun: sunlight and health in the 21st century*. Findhorn press, 2000.
- [40] D. E. Dolmans, D. Fukumura, e R. K. Jain, “Photodynamic therapy for cancer,” *Nature reviews cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380–387, 2003.
- [41] M. D. Lucroy, B. F. Edwards, e B. R. Madewell, “Veterinary photodynamic therapy,” *Journal of the American veterinary medical association*, vol. 216, no. 11, pp. 1745–1751, 2000.
- [42] J. Buchholz e H. Walt, “Veterinary photodynamic therapy: a review,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 10, no. 4, pp. 342–347, 2013.
- [43] F. P. Sellera, C. L. Nascimento, e M. S. Ribeiro, *Photodynamic therapy in veterinary medicine: From basics to clinical practice*. Springer, 2016.
- [44] A. Barbieri, “Sensibilizadores fluorescentes como larvicidas. accion fotodinamica de la luz,” *Riv. Malariol*, vol. 7, p. 456, 1928.
- [45] H. Schildmacher, “Uber photosensibilisierung von stechmuckenlarven durch fluoreszierende farbstoffe,” *Biol. Zentralbl*, vol. 69, pp. 468–477, 1950.
- [46] T. P. Yoho *et al.*, “photodynamic effect of light on dye-fed house flies, musca domestica l,” *The National Agricultural Library*, 1973.
- [47] K. Graham, E. Wrangler, e L. H. Aasen, “Susceptibility of the mealworm (*tenebrio molitor* (l.)) to photodynamic injury by methylene blue,” *Canadian Journal of Zoology*, vol. 50, no. 12, pp. 1625–1629, 1972.
- [48] J. R. Broome, M. F. Callahan, L. A. Lewis, C. M. Ladner, e J. R. Heitz, “The effects of rose bengal on the imported fire ant, *solenopsis richteri* (forel),” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, vol. 51, no. 1, pp. 117–121, 1975.
- [49] G. D. Pimprikar, J. E. Fondren Jr, e J. R. Heitz, “Small-and large-scale field tests of erythrosin b for house fly control in caged layer chicken houses,” *Environmental Entomology*, vol. 9, no. 1, pp. 53–58, 1980.
- [50] G. B. Orlob, “Inactivation of purified plant viruses and their nucleic acids by photosensitizing dyes,” *Virology*, vol. 31, no. 3, pp. 402–413, 1967.
- [51] H. D. de Menezes, A. C. Pereira, G. T. Brancini, H. C. de Leão, N. S. M. Júnior, L. Bachmann, M. Wainwright, J. K. Bastos, e G. U. Braga, “Furocoumarins and coumarins photoinactivate *colletotrichum acutatum* and *aspergillus nidulans* fungi under solar radiation,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 131, pp. 74–83, 2014.



- [52] M. Issawi, V. Sol, e C. Riou, “Plant photodynamic stress: what’s new?” *Frontiers in plant science*, vol. 9, p. 681, 2018.
- [53] D. Guillaumot, M. Issawi, A. Da Silva, S. Leroy-Lhez, V. Sol, e C. Riou, “Synergistic enhancement of tolerance mechanisms in response to photoactivation of cationic tetra (n-methylpyridyl) porphyrins in tomato plantlets,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 156, pp. 69–78, 2016.
- [54] M. Issawi, D. Guillaumot, V. Sol, e C. Riou, “Responses of an adventitious fast-growing plant to photodynamic stress: comparative study of anionic and cationic porphyrin effect on arabidopsis thaliana,” *Physiologia plantarum*, vol. 162, no. 3, pp. 379–390, 2018.
- [55] J. Robinson, “Photodynamic insecticides: A review of studies on photosensitizing dyes as insect control agents, their practical application, hazards, and residues,” *Residue reviews*, pp. 69–100, 1983.
- [56] T. Patrice, *Photodynamic therapy*. Royal Society of Chemistry, 2003, vol. 2.
- [57] M. D. Poole, “Are we facing the end of the antibiotic era?” *Ear, Nose & Throat Journal*, vol. 72, no. 6, pp. 433–433, 1993.
- [58] M. L. Balata, L. P. d. Andrade, D. B. N. Santos, A. N. Cavalcanti, U. d. R. Tunes, E. D. P. Ribeiro, e S. Bittencourt, “Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial,” *Journal of Applied Oral Science*, vol. 21, no. 2, pp. 208–214, 2013.
- [59] A. Gupta, P. Avci, T. Dai, Y.-Y. Huang, e M. R. Hamblin, “Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation,” *Advances in wound care*, vol. 2, no. 8, pp. 422–437, 2013.
- [60] L. A. Fernandes, T. M. Martins, J. M. d. Almeida, L. H. Theodoro, e V. G. Garcia, “Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats,” *Journal of Applied Oral Science*, vol. 18, no. 3, pp. 237–243, 2010.
- [61] M. Bartolomeu, S. Reis, M. Fontes, M. G. P. Neves, M. A. F. Faustino, e A. Almeida, “Photodynamic action against wastewater microorganisms and chemical pollutants: an effective approach with low environmental impact,” *Water*, vol. 9, no. 9, p. 630, 2017.
- [62] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, e M. Reed, “The history of photodetection and photodynamic therapy,” *Photochemistry and photobiology*, vol. 74, no. 5, pp. 656–669, 2001.
- [63] M. Triesscheijn, P. Baas, J. H. Schellens, e F. A. Stewart, “Photodynamic therapy in oncology,” *The oncologist*, vol. 11, no. 9, pp. 1034–1044, 2006.
- [64] L. M. Davids, B. Kleemann, D. Kacerovská, K. Pizinger, e S. H. Kidson, “Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 91, no. 2-3, pp. 67–76, 2008.

- [65] L. F. d. Paula *et al.*, “Desenvolvimento de dispositivos de irradiação utilizando led e sua aplicação à fotoinativação de staphylococcus aureus e trichophyton rubrum,” Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
- [66] J. Krajczewski, K. Rucińska, H. E. Townley, e A. Kudelski, “Role of various nanoparticles in photodynamic therapy and detection methods of singlet oxygen,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 26, pp. 162–178, 2019.
- [67] J. Yu, C.-H. Hsu, C.-C. Huang, e P.-Y. Chang, “Development of therapeutic amethylen blue nanoparticles for targeted photodynamic therapy of cervical cancer cells,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 7, no. 1, pp. 432–441, 2015.
- [68] M. Price, J. J. Reiners, A. M. Santiago, e D. Kessel, “Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy,” *Photochemistry and photobiology*, vol. 85, no. 5, pp. 1177–1181, 2009.
- [69] M. Bancirova, “Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and cypridina luciferin analogues,” *Luminescence*, vol. 26, no. 6, pp. 685–688, 2011.
- [70] J. R. Harbour e S. L. Issler, “Involvement of the azide radical in the quenching of singlet oxygen by azide anion in water,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 104, no. 3, pp. 903–905, 1982.
- [71] C. Triantaphylides, M. Krischke, F. A. Hoerberichts, B. Ksas, G. Gresser, M. Havaux, F. Van Breusegem, e M. J. Mueller, “Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants,” *Plant physiology*, vol. 148, no. 2, pp. 960–968, 2008.
- [72] T. Kiesslich, B. Krammer, e K. Plaetzer, “Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy,” *Current medicinal chemistry*, vol. 13, no. 18, pp. 2189–2204, 2006.
- [73] D. S. Pellosi, “Estudos físico-químicos do corante eritrosina b e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas,” Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2012.
- [74] M. R. Hamblin, “Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes,” *Current opinion in microbiology*, vol. 33, pp. 67–73, 2016.
- [75] M. Hedayati, M. J. Neufeld, M. M. Reynolds, e M. J. Kipper, “The quest for blood-compatible materials: recent advances and future technologies,” *Materials Science and Engineering: R: Reports*, vol. 138, pp. 118–152, 2019.
- [76] A. B. Ormond e H. S. Freeman, “Dye sensitizers for photodynamic therapy,” *Materials*, vol. 6, no. 3, pp. 817–840, 2013.
- [77] A. P. Castano, P. Mroz, e M. R. Hamblin, “Photodynamic therapy and anti-tumour immunity,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 7, pp. 535–545, 2006.
- [78] J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. De Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. de Fátima Turchiello, e M. S. Baptista, “Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 2, no. 3, pp. 175–191, 2005.

- [79] E. V. Bergmann, O. A. Capeloto, A. T. Catanio, G. A. Flizikowski, N. M. Kimura, C. F. Freitas, L. S. Herculano, N. G. Astrath, e L. C. Malacarne, “Photoactivation of erythrosine in simulated body fluids,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 259, p. 119867, 2021.
- [80] G. Tegos, T. Dai, B. B. Fuchs, J. J. Coleman, R. A. Prates, C. Astrakas, T. G. St Denis, M. S. Ribeiro, E. Mylonakis, e M. R. Hamblin, “Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform,” *Frontiers in microbiology*, vol. 3, p. 120, 2012.
- [81] R. R. Allison e K. Moghissi, “Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 10, no. 4, pp. 331–341, 2013.
- [82] H. Abrahamse e M. R. Hamblin, “New photosensitizers for photodynamic therapy,” *Biochemical Journal*, vol. 473, no. 4, pp. 347–364, 2016.
- [83] C. F. de Freitas, “Estudos físico-químicos de derivados ésteres da eritrosina b incorporados em sistemas lipossomais revestidos com copolímeros do tipo peo-ppo-peo almejando aplicações em terapia fotodinâmica,” Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, 2018.
- [84] B. E. B. d. P. Barros A A de, *A Química dos Alimentos: Produtos Fermentados e Corantes*. Edit-SBQ, 2010.
- [85] S. Wood, D. Metcalf, D. Devine, e C. Robinson, “Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 57, no. 4, pp. 680–684, 2006.
- [86] N. N. Yassunaka, C. F. de Freitas, B. R. Rabello, P. R. Santos, W. Caetano, N. Hioka, T. U. Nakamura, B. A. de Abreu Filho, e J. M. G. Mikcha, “Photodynamic inactivation mediated by erythrosine and its derivatives on foodborne pathogens and spoilage bacteria,” *Current microbiology*, vol. 71, no. 2, pp. 243–251, 2015.
- [87] A. C. B. P. Costa, V. M. C. Rasteiro, E. S. H. da Silva Hashimoto, C. F. Araújo, C. A. Pereira, J. C. Junqueira, e A. O. C. Jorge, “Effect of erythrosine-and led-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and candida albicans adherence to buccal epithelial cells,” *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, vol. 114, no. 1, pp. 67–74, 2012.
- [88] A. D. Garg, M. Bose, M. I. Ahmed, W. A. Bonass, e S. R. Wood, “In vitro studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e34475, 2012.
- [89] V. R. Batistela, D. S. Pellosi, F. D. de Souza, W. F. da Costa, S. M. de Oliveira Santin, V. R. de Souza, W. Caetano, H. P. M. de Oliveira, I. S. Scarminio, e N. Hioka, “pka determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariate analysis applied to uv–vis spectrophotometric data,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 79, no. 5, pp. 889–897, 2011.

- [90] D. Vanzin, C. Freitas, D. Pellosi, V. Batistela, A. Machado, R. Pontes, W. Caetano, e N. Hioka, “Experimental and computational studies of protolytic and tautomeric equilibria of erythrosin b and eosin y in water/dmsO,” *RSC advances*, vol. 6, no. 111, pp. 110 312–110 328, 2016.
- [91] J. N. Barrows, A. L. Lipman, e N. Belai, “History of us regulation of color additives and colorants,” in *Food additives and packaging*. ACS Publications, 2014, pp. 57–71.
- [92] B. Halliwell e J. Gutteridge, “Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.” *Biochemical journal*, vol. 219, no. 1, p. 1, 1984.
- [93] P. Atkins, D. F. Shriver, T. Overton, J. Rourke, M. Weller, e F. Armstrong, “Química inorgânica,” *McGraw-Hill*, pp. 153–158, 2008.
- [94] A. E. d. H. Machado, “Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas,” *Química Nova*, vol. 23, no. 2, pp. 237–243, 2000.
- [95] R. S. Mulliken, *Spectroscopy, molecular orbitals, and chemical bonding*. Norstedt, 1967.
- [96] A. S. P. Goncalves, “Fotogeração de espécies reativas de oxigênio induzida por fulerenos e derivados: um estudo por ressonância paramagnética eletrônica e captura de spins,” Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- [97] H. Schneider, “Placental oxygen consumption. part ii: in vitro studies—a review,” *Placenta*, vol. 21, pp. S38–S44, 2000.
- [98] S. Hatz, J. D. Lambert, e P. R. Ogilby, “Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability,” *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 6, no. 10, pp. 1106–1116, 2007.
- [99] C. Triantaphylidès e M. Havaux, “Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling,” *Trends in plant science*, vol. 14, no. 4, pp. 219–228, 2009.
- [100] R. W. Redmond e J. N. Gamlin, “A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules,” *Photochemistry and photobiology*, vol. 70, no. 4, pp. 391–475, 1999.
- [101] Z. Mehrdad, A. Noll, E.-W. Grabner, e R. Schmidt, “Sensitization of singlet oxygen via encounter complexes and via exciplexes of  $\pi \pi^*$  triplet excited sensitizers and oxygen,” *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 1, no. 4, pp. 263–269, 2002.
- [102] F. Wilkinson, W. P. Helman, e A. B. Ross, “Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution,” *Journal of physical and chemical reference data*, vol. 22, no. 1, pp. 113–262, 1993.
- [103] E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré, e F. Vetrone, “Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm,” *Nanoscale Horizons*, vol. 1, no. 3, pp. 168–184, 2016.

- [104] J. M. Dąbrowski e L. G. Arnaut, “Photodynamic therapy (pdt) of cancer: from local to systemic treatment,” *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 14, no. 10, pp. 1765–1780, 2015.
- [105] J. M. Dąbrowski, B. Pucelik, A. Regiel-Futyra, M. Brindell, O. Mazuryk, A. Kyzioł, G. Stochel, W. Macyk, e L. G. Arnaut, “Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers,” *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 325, pp. 67–101, 2016.
- [106] J. Gordon, R. Leite, R. Moore, e S. Porto, “S.; whinnery, jr,” *Bull. Am. Phys. Soc.*, vol. 9, p. 501, 1964.
- [107] J. Gordon, R. Leite, R. Moore, S. Porto, e J. Whinnery, “Long-transient effects in lasers with inserted liquid samples,” *Journal of Applied Physics*, vol. 36, no. 1, pp. 3–8, 1965.
- [108] F. R. Grabiner, D. R. Siebert, e G. W. Flynn, “Laser induced time-dependent thermal lensing studies of vibrational relaxation: translational cooling in ch<sub>3</sub>f,” *Chemical Physics Letters*, vol. 17, no. 2, pp. 189–194, 1972.
- [109] C. Hu e J. Whinnery, “New thermo-optical measurement method and a comparison with other methods,” *Applied Optics*, vol. 12, no. 1, pp. 72–79, 1973.
- [110] S. Sheldon, L. Knight, e J. Thorne, “Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model,” *Applied Optics*, vol. 21, no. 9, pp. 1663–1669, 1982.
- [111] J. Shen, R. D. Lowe, e R. D. Snook, “A model for cw laser induced mode-mismatched dual-beam thermal lens spectrometry,” *Chemical Physics*, vol. 165, no. 2-3, pp. 385–396, 1992.
- [112] L. C. Malacarne, N. G. Astrath, P. R. Pedreira, R. S. Mendes, M. L. Baesso, P. R. Joshi, e S. E. Bialkowski, “Analytical solution for mode-mismatched thermal lens spectroscopy with sample-fluid heat coupling,” *Journal of Applied Physics*, vol. 107, no. 5, p. 053104, 2010.
- [113] L. C. Malacarne, N. G. Astrath, e M. L. Baesso, “Unified theoretical model for calculating laser-induced wavefront distortion in optical materials,” *JOSA B*, vol. 29, no. 7, pp. 1772–1777, 2012.
- [114] L. Malacarne, E. Savi, M. Baesso, E. Lenzi, e N. Astrath, “Role of photophysics processes in thermal lens spectroscopy of fluids: a theoretical study,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 118, no. 31, pp. 5983–5988, 2014.
- [115] Y. Liu, H. C. van der Mei, B. Zhao, Y. Zhai, T. Cheng, Y. Li, Z. Zhang, H. J. Busscher, Y. Ren, e L. Shi, “Eradication of multidrug-resistant staphylococcal infections by light-activatable micellar nanocarriers in a murine model,” *Advanced Functional Materials*, vol. 27, no. 44, p. 1701974, 2017.
- [116] B. Khlebtsov, E. Tuchina, V. Tuchin, e N. Khlebtsov, “Multifunctional au nanoclusters for targeted bioimaging and enhanced photodynamic inactivation of staphylococcus aureus,” *Rsc Advances*, vol. 5, no. 76, pp. 61 639–61 649, 2015.

- [117] Y. Yuan, C.-J. Zhang, S. Xu, e B. Liu, “A self-reporting aie probe with a built-in singlet oxygen sensor for targeted photodynamic ablation of cancer cells,” *Chemical science*, vol. 7, no. 3, pp. 1862–1866, 2016.
- [118] J. Liang, P. Wu, C. Tan, e Y. Jiang, “White light-induced cell apoptosis by a conjugated polyelectrolyte through singlet oxygen generation,” *RSC advances*, vol. 8, no. 17, pp. 9218–9222, 2018.
- [119] B. Zhao, J.-J. Yin, P. J. Bilski, C. F. Chignell, J. E. Roberts, e Y.-Y. He, “Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles,” *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 241, no. 2, pp. 163–172, 2009.
- [120] V. Sánchez, M. P. Romero, S. Pratavieira, e C. Costa, “Physiological considerations acting on triplet oxygen for explicit dosimetry in photodynamic therapy,” *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 19, pp. 298–303, 2017.
- [121] M. C. A. Issa e M. Manela-Azulay, “Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica,” *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 85, no. 4, pp. 501–511, 2010.
- [122] L. S. Peloi, R. R. Soares, C. E. Biondo, V. R. Souza, N. Hioka, e E. Kimura, “Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue,” *Journal of biosciences*, vol. 33, no. 2, pp. 231–237, 2008.
- [123] H. Liu, P. J. Carter, A. C. Laan, R. Eelkema, e A. G. Denkova, “Singlet oxygen sensor green is not a suitable probe for 1 o 2 in the presence of ionizing radiation,” *Scientific reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1–8, 2019.
- [124] T. Kokubo e H. Takadama, “How useful is sbf in predicting in vivo bone bioactivity?” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [125] D. A. Skoog, F. J. Holler, e S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning, 2017.
- [126] B. R. Rabello, A. P. Gerola, D. S. Pellosi, A. L. Tessaro, J. L. Aparício, W. Caetano, e N. Hioka, “Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation,” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 238, pp. 53–62, 2012.
- [127] R. S. Becker e R. S. Becker, *Theory and interpretation of fluorescence and phosphorescence*. Wiley Interscience New York, 1969, vol. 85.
- [128] C. F. de Freitas, D. Vanzin, T. L. Braga, D. S. Pellosi, V. R. Batistela, W. Caetano, e N. Hioka, “Multivariate analysis of protolytic and tautomeric equilibria of erythrosine b and its ester derivatives in ionic and non-ionic micelles,” *Journal of Molecular Liquids*, p. 113320, 2020.
- [129] L. G. Arnaut, M. M. Pereira, J. M. Dąbrowski, E. F. Silva, F. A. Schaberle, A. R. Abreu, L. B. Rocha, M. M. Barsan, K. Urbańska, G. Stochel *et al.*, “Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers,” *Chemistry—A European Journal*, vol. 20, no. 18, pp. 5346–5357, 2014.

- [130] L. Song, E. Hennink, I. T. Young, e H. J. Tanke, “Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy,” *Biophysical journal*, vol. 68, no. 6, pp. 2588–2600, 1995.
- [131] R. Brennetot e J. Georges, “Investigation of the erythrosine triplet decay rate using pulsed-laser photothermal spectrometry and transient bleaching of the singlet state,” in *AIP Conference Proceedings*, vol. 463. American Institute of Physics, 1999, pp. 229–231.
- [132] L. Malacarne, N. Astrath, A. Medina, L. Herculano, M. Baesso, P. Pedreira, J. Shen, Q. Wen, K. Michaelian, e C. Fairbridge, “Soret effect and photochemical reaction in liquids with laser-induced local heating,” *Optics Express*, vol. 19, no. 5, pp. 4047–4058, 2011.
- [133] J. K. Karlsson, O. J. Woodford, R. Al-Aqar, e A. Harriman, “Effects of temperature and concentration on the rate of photobleaching of erythrosine in water,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 121, no. 45, pp. 8569–8576, 2017.
- [134] P. R. B. Pedreira, “Desenvolvimento de um protótipo de lente térmica resolvida no tempo para estudos de líquidos em condições transitórias em tempo real,” *Departamento de Física*, p. 206, 2005.
- [135] L. C. Malacarne, N. G. Astrath, e L. S. Herculano, “Laser-induced wavefront distortion in optical materials: a general model,” *JOSA B*, vol. 29, no. 12, pp. 3355–3359, 2012.
- [136] L. Herculano, L. Malacarne, V. Zanuto, G. Lukasiewicz, O. Capeloto, e N. Astrath, “Investigation of the photobleaching process of eosin y in aqueous solution by thermal lens spectroscopy,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 117, no. 6, pp. 1932–1937, 2013.
- [137] P. Pedreira, L. Hirsch, J. Pereira, A. Medina, A. Bento, M. Baesso, M. C. Rollemberg, M. Franko, e J. Shen, “Real-time quantitative investigation of photochemical reaction using thermal lens measurements: Theory and experiment,” *Journal of applied physics*, vol. 100, no. 4, p. 044906, 2006.
- [138] N. G. Astrath, F. B. Astrath, J. Shen, J. Zhou, K. H. Michaelian, C. Fairbridge, L. C. Malacarne, P. R. Pedreira, A. Medina, e M. L. Baesso, “Thermal-lens study of photochemical reaction kinetics,” *Optics letters*, vol. 34, no. 22, pp. 3460–3462, 2009.
- [139] L. S. Herculano, G. V. B. Lukasiewicz, E. Sehn, W. Caetano, D. S. Pellosi, N. Hioaka, N. G. C. Astrath, e L. C. Malacarne, “Photodegradation in micellar aqueous solutions of erythrosin esters derivatives,” *Applied Spectroscopy*, vol. 69, no. 7, pp. 883–888, 2015.
- [140] L. Herculano, N. Astrath, L. Malacarne, J. Rohling, S. Tanimoto, e M. Baesso, “Laser-induced chemical reaction characterization in photosensitive aqueous solutions,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 30, pp. 9417–9420, 2011.