

Universidade Federal de São Carlos
Departamento de Física

**Avaliação da fluorescência da protoporfirina IX em modelo tumoral
de pele em camundongo na aplicação de terapia fotodinâmica utilizando
sistema portátil com baixa irradiação**

Aluna: Harelline Belotti Perez
Orientadora: Dra. Michelle Barreto Requena
Co-orientador: Dr. Paulo Henrique Dias Ferreira

Abril 2022
São Carlos – SP

Universidade Federal de São Carlos
Departamento de Física

Harelline Belotti Perez

Avaliação da fluorescência da protoporfirina IX em modelo tumoral de pele em camundongo na aplicação de terapia fotodinâmica utilizando sistema portátil com baixa irradiação

Trabalho de conclusão de curso da graduação em Engenharia Física do Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos, sob orientação da Dra. Michelle B. Requena

Abril 2022
São Carlos – SP

“A insatisfação é a principal motivadora do progresso.”

(Thomas Edison)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Deus, pela minha vida e por permitir passar por todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho com sua benção.

A minha mãe Ledir Isabel, pelo incentivo, apoio e preocupação, a ela eu dedico todas as minhas conquistas e o amor incondicional.

A minhas irmãs, Catherine e Jaqueline, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava aos estudos.

A minha amiga Isabel, pelo empréstimo do computador dela para o desenvolvimento do trabalho em diversos momentos durante a execução e escrita.

A minha orientadora Michelle, por toda paciência em me ensinar e pela amizade que pudemos construir ao longo da elaboração do trabalho, agradeço imensamente por ter compartilhado tanto comigo e por ser uma mulher inspiradora.

Ao meu co-orientador Paulo Henrique que pôde estar comigo e me amparar e por me proporcionar segurança ao término da graduação.

Ao professor Sebastião, por ter inicialmente me acolhido junto ao grupo de óptica, sou eternamente grata pela oportunidade que me abriu e pelo estímulo científico.

Ao amigo Marlon, por toda paciência de ensinamento, por todo o conhecimento transmitido, a atenção, disponibilidade em estar sempre presente oferecendo suporte quando necessário e elaboração das rotinas.

A Mirian, por toda a sua dedicação ao projeto, pelos conselhos e a prestatividade em me auxiliar nas dificuldades.

Ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica pelo acolhimento e estrutura aos estudos.

Meu imenso agradecimento e respeito a todos.

Lista de tabelas

Tabela 1: Apresentação resumida dos procedimentos experimentais realizados em cada grupo.	26
--	----

Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de Jablonski adaptado. [19].....	12
Figura 2: Estrutura química ALA [16]	15
Figura 3: Estrutura química M-ALA [16]	15
Figura 4: Estrutura química PpIX [16]	16
Figura 5: (a) Sistema de irradiação LINCE® (MMOptics, Brasil), (b) tratamento e (c) evidenciador.....	22
Figura 6: Sistema protótipo portátil de irradiação, b) Sistema protótipo portátil de irradiação em funcionamento.	23
Figura 7: Animal anestesiado com proteção da luz ambiente durante o tempo de incubação.....	24
Figura 8: Tumor no flanco direito do animal sendo irradiado pelo protótipo.	24
Figura 9: Espectros médios da intensidade fluorescência normalizadas pela intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 450 nm.....	27
Figura 10: Gráfico boxplot do grupo 1. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento.	28
Figura 11: Gráfico boxplot do grupo. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento.....	28
Figura 12: Gráfico boxplot do grupo 3. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento.	29
Figura 13: Gráfico boxplot do grupo 4. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento.	30
Figura 14: Imagens de campo amplo de fluorescência coletadas: A) antes do creme B) após a incubação e C) após a iluminação.	30
Figura 15: Representação de uma imagem de fluorescência RGB de campo amplo na decomposição em vermelho, verde e azul, com a região de interesse delimitada do vermelho e a mesma região em foco. Fonte: OLIVEIRA [23]	31

Figura 16: Gráfico do tipo boxplot com os valores médios da intensidade no canal do vermelho das imagens de fluorescência de campo amplo coletadas no tumor 1 hora de incubação..... 32

Resumo

PEREZ, H. B., **Avaliação da fluorescência da protoporfirina IX em modelo tumoral de pele em camundongo na aplicação de terapia fotodinâmica utilizando sistema portátil com baixa irradiação**. 2022. 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Física) – Departamento de Física, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma opção de tratamento tópico utilizado para câncer de pele não melanoma e lesões de pele pré-malignas. A TFD desenvolve-se com a interação de um fotossensibilizador (FS), luz com comprimento de onda adequado na presença de moléculas de oxigênio no tecido, causando morte celular. No Brasil, há tratamentos com protocolos já bem definidos e aprovados utilizando protoporfirina IX (PpIX) como FS, através da aplicação tópica de creme contendo seu precursor (aminolevulinato de metila) e o equipamento de irradiação comercial LINCE[®]. Uma nova proposta de tratamento, com um sistema portátil de irradiação desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP) foi testado a fim de otimizar o tempo de permanência de pacientes no hospital. Este projeto teve por objetivo o estudo comparativo da ativação e degradação da PpIX pelo sistema portátil com o sistema comercial de irradiação. Esse estudo foi feito utilizando modelo tumoral em camundongos, avaliando diferentes protocolos (variação na irradiação e tempo de incubação) através de espectroscopia de fluorescência e imagem de campo amplo de fluorescência para comparar a produção e degradação da PpIX no tumor e na pele ao redor. Com os resultados obtidos, foi possível verificar que a degradação da PpIX foi semelhantes na utilização do sistema portátil de irradiação (protótipo) e do sistema comercial (LINCE), tanto pela análise por espectroscopia de fluorescência quanto por imagens de fluorescência de campo amplo.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, *single visit*, baixa irradiação, dispositivo portátil.

Sumário

1.	Contextualização do estudo	10
2.	Introdução.....	11
a.	<i>Câncer de pele não melanoma</i>	11
b.	<i>Fluorescência</i>	12
c.	<i>Terapia fotodinâmica</i>	13
d.	<i>Fotossensibilizador</i>	15
e.	<i>Fonte de luz</i>	16
f.	<i>Oxigênio</i>	17
g.	<i>Protocolo clínico</i>	17
h.	<i>Fluorescência e TFD</i>	19
3.	Objetivos.....	20
a.	<i>Objetivos específicos</i>	20
4.	Materiais e Métodos	21
a.	<i>Modelo animal</i>	21
b.	<i>Indução tumoral por injeção de células</i>	21
c.	<i>Fonte de luz</i>	22
d.	<i>Fotossensibilizador</i>	23
e.	<i>Medidas de Fluorescência</i>	24
i.	<i>Espectroscopia de fluorescência</i>	24
ii.	<i>Imagem de fluorescência de campo amplo</i>	25
f.	<i>Delineamento experimental</i>	25
5.	Resultados e discussão	26
6.	Conclusão.....	34
	Referências bibliográficas.....	35

1. Contextualização do estudo

A realização do presente trabalho de conclusão de curso é um fragmento de um projeto maior que envolve o estudo de um novo protocolo de tratamento de terapia fotodinâmica (TFD) utilizando um sistema portátil de irradiação. Neste projeto, múltiplos experimentos pré-clínicos foram conduzidos para avaliar a viabilidade da realização de uma das sessões de TFD utilizando o sistema portátil de irradiação para minimizar o período de permanência do paciente no hospital.

2. Introdução

a. Câncer de pele não melanoma

O câncer de pele não melanoma é o mais frequente no Brasil e corresponde a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país [1]. Apresenta altos percentuais de cura, se for detectado e tratado precocemente. Entre os tumores de pele, é o mais frequente e de menor mortalidade, porém, se não tratado adequadamente pode deixar mutilações bastante expressivas [1].

Este tipo de lesão é mais comum em pessoas com mais de 40 anos, é raro em crianças e negros, com exceção daqueles já portadores de doenças cutâneas. Porém, com a constante exposição de jovens aos raios solares, a média de idade dos pacientes vem diminuindo. Pessoas de pele clara, sensíveis à ação dos raios solares, com histórico pessoal ou familiar deste câncer ou com doenças cutâneas prévias são as mais atingidas [1].

O câncer de pele não melanoma apresenta tumores de diferentes subtipos. Os mais frequentes são o carcinoma basocelular (CBC) (o mais comum e também o menos agressivo) e o carcinoma espinocelular (CEC). A cirurgia é o tratamento mais indicado tanto nos casos de CBC como de CEC.

Esses tipos de canceres tem o tratamento mais comum a excisão da área afetada com as células neoplásicas mais uma área de pele sadia como margem de segurança. Dependendo da gravidade do caso, há a necessidade de reconstrução da área com retalhos de pele sadia, contudo, áreas nasais e palpebrais são áreas mais sensíveis que necessitam de maior variedade de retalhos, dificultando o tratamento. Existem diversas técnicas cirúrgicas para a ressecção da neoplasia cutânea e a opção mais adequada para cada caso depende principalmente da localização, tipo e tamanho das lesões [2].

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma opção terapêutica que vem sendo recomendada para o tratamento de queratose actínica (lesão precursora do câncer de pele), CBC superficial e CEC *in situ* (Doença de Bowen) [3].

No caso TFD aplicada no tratamento de lesões de pele, a protoporfirina IX (PpIX) é um fotossensibilizador (FS) endógeno bastante utilizado, além de ser um marcador devido sua fluorescência [4, 5]. Para que ocorra seu acúmulo celular, porém, costuma-se induzir sua produção utilizando a aplicação tópica

de precursores, como o ácido aminolevulínico (ALA) e aminolevulinato de metila (M-ALA).

Nas próximas seções, serão descritos fundamentos teóricos dos conceitos físicos relacionados a este estudo, assim como, mais detalhes das técnicas utilizadas.

b. Fluorescência

A fluorescência é uma transição radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin, ou seja, quando há transição de um singlete para outro singlete, temos a fluorescência.

Para descrição dos eventos envolvidos na absorção e na emissão de luz por uma molécula, o diagrama de Jablonski (Figura 1) é uma ferramenta muito importante, nomeado desta forma em homenagem a Alexander Jablonski (1898 – 1980) considerado o pai da espectroscopia de fluorescência. Com esta forma de representação, pode-se visualizar melhor os diferentes estados eletrônicos, rotacionais e vibracionais, além do estado fundamental e avaliar os possíveis processos quânticos como: absorção de fóton, conversão interna, cruzamento intersistemas, fosforescência e fluorescência. Pode-se inclusive representar as interações de supressão, energia de transferência e interação com o meio.

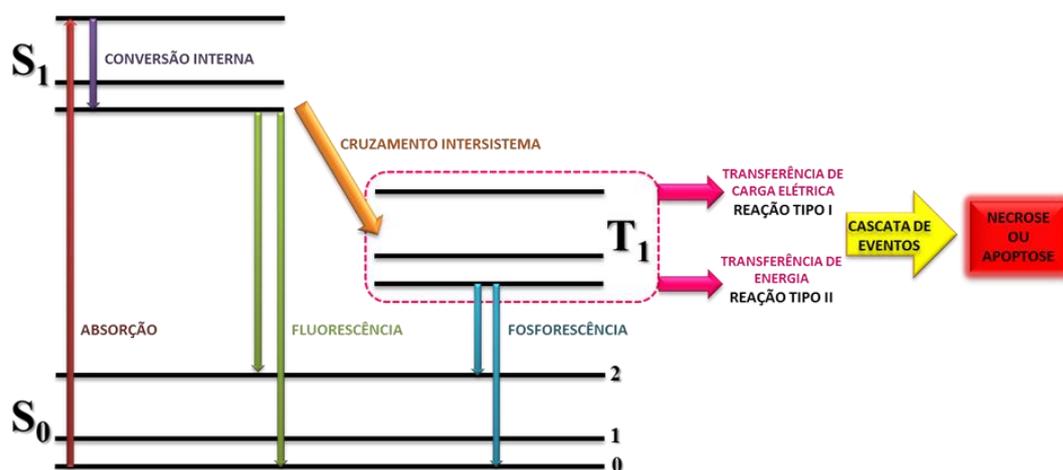


Figura 1: Diagrama de Jablonski adaptado [6].

De acordo com o princípio de Franck-Condon as transições entre diferentes estados eletrônicos são em uma ordem de tempo muito pequena (10-15 segundos).

O estado fundamental singleto é chamado de S_0 e os estados excitados são representados por S_n com $n= 1, 2, 3, \text{ etc.}$ Uma molécula apresenta um estado singleto quando não apresenta nenhum spin desemparelhado, mesmo em orbitais diferentes. Moléculas que apresentam spins desemparelhados possuem propriedades magnéticas, e sob um campo magnético, se dividem em três subestados, esses estados são chamados como tripletos e são representados como T_n em que “T” indica que existem três possibilidades de orientação de spin a partir de dois elétrons desemparelhados. A energia do fóton absorvido determina qual estado excitado os elétrons irão atingir.

A conversão interna é um fenômeno sem caráter luminescente, isto é, não radiativa, e tem seu decaimento de energia caracterizado por uma transição entre dois estados de mesma multiplicidade de spin, em direção ao estado de menor energia e ocorre em um tempo entre 10^{-10} segundos.

O cruzamento intersistema é uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais de mesma energia que pertencem a estados eletrônicos com diferentes multiplicidades. Por exemplo, uma molécula no estado S_1 pode fazer uma mudança de estado para o primeiro estado tripleto, T_1 [7].

A fluorescência é a emissão de luz derivada de um estado excitado singleto em que o elétron excitado não muda a orientação do seu spin, continuando desemparelhado, com isso o retorno deste ao estado fundamental é permitido e acontece de forma muito rápida via emissão de um fóton; a taxa de emissão é típica da ordem de nanossegundos, sendo uma transição radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin, ou seja, quando há transição de um singleto para outro singleto, temos a fluorescência.

A fluorescência é uma ferramenta importante na TFD, pois permite o monitoramento e avaliação da produção e consumo do FS.

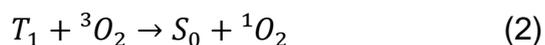
c. Terapia fotodinâmica

A TFD consiste basicamente da interação entre a molécula de FS, luz e oxigênio molecular presente no tecido. A fonte de luz utilizada para a irradiação deve ter emissão em comprimento de onda compatível à absorção do FS para ser capaz de excitar a molécula. Na aplicação desta terapia para câncer, o FS acumula-se preferencialmente nas células neoplásicas e, ao ser irradiado, umas das reações possíveis é a molécula de FS excitada transferir energia

para o oxigênio molecular transformando-o em oxigênio singleto, que é altamente citotóxico e capaz de promover a morte celular por necrose ou apoptose [8, 9]. demonstrados na figura 1, no diagrama de Jablonski.

A morte por TFD tende a seguir principalmente por duas vias de morte celular, a necrose ou apoptose: a apoptose é um evento regulado, participando inclusive de eventos fisiológicos, enquanto a necrose é o tipo mais comum da morte celular devido a estímulos exógenos, tais como ruptura celular e degradação de organelas celulares [10]. Estudos recentes colocam autofagia como uma via de morte possível, a autofagia é um processo que envolve o transporte de organelas celulares e proteínas através de vias de degradação lisossomal e está relacionada à sobrevivência, desenvolvimento e diferenciação celular, quando as proteínas sofrem danos irreversíveis formando proteínas oxidada tóxica, a autofagia será estimulada para remover essas espécies tóxicas [11].

Há dois tipos de reações possíveis para TFD, chamadas de reação do tipo I (via formação de radicais) e reação do tipo II (via formação de oxigênio singleto). Na reação do tipo I (equação 1), o FS no estado excitado tripleto pode interagir com o substrato biológico transferindo elétrons ou abstraindo um átomo de hidrogênio. A reação do tipo II (equação 2) é uma reação de estado excitado, na qual o FS no estado tripleto excitado transfere energia para o oxigênio molecular no estado fundamental, também tripleto, levando-o a um estado excitado favorecendo a conversão de um *spin* formando oxigênio singleto, uma espécie reativa de oxigênio que é altamente citotóxica e desencadeia danos celulares responsáveis pela morte da célula [5].



Sendo T_1 a representação do FS no estado tripleto, S_0 o FS no estado fundamental, SB o substrato biológico, 3O_2 oxigênio molecular, 1O_2 oxigênio singleto, SB^- produto da reação da interação do substrato biológico transferindo elétrons ou removendo átomo de hidrogênio, ficando apenas com radicais livres.

O tipo preferencial de reação entre a molécula de FS e as moléculas do tecido (reação do tipo I ou tipo II), assim como a via de morte celular dependerá das condições do tecido, aporte de oxigênio e principalmente das características fotoquímicas da molécula do FS.

d. Fotossensibilizador

A PpIX é um FS endógeno comumente utilizado no tratamento dessas lesões. A formação de PpIX é estimulada pela aplicação de precursores metabólicos, como o ácido aminolevulínico (ALA) ou o aminolevulinato de metila (M-ALA), através da aplicação tópica por creme. A eficiência do tratamento depende diretamente da formação e acúmulo suficiente de PpIX na lesão e posterior ativação adequada pela luz.

A fórmula molecular do ALA é $C_5H_9NO_3$ e peso molecular de 131,13 g/mol, a estrutura química do composto está ilustrada na Figura 2.

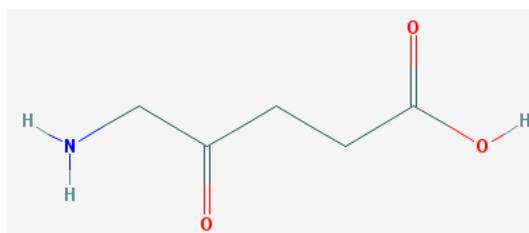


Figura 2: Estrutura química ALA [12]

A fórmula molecular do M-ALA é $C_6H_{11}NO_3$, possui peso molecular de 145,16 g/mol e sua estrutura molecular está representada na Figura 3. A diferença do ALA para o M-ALA está na adição de um grupo metila (CH_3) na molécula que proporcional caráter mais lipossolúvel e, por isso, permite maior penetração na pele. [12]

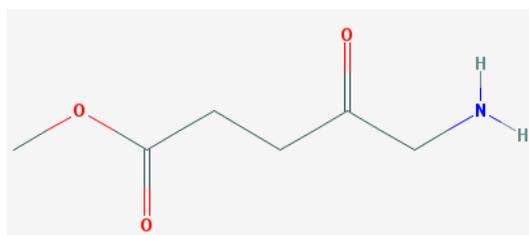


Figura 3: Estrutura química M-ALA [12]

A fórmula molecular da PpIX é dada por $C_{34}H_{34}N_4O_4$, possui peso molecular de 562,66 g/mol e a estrutura química da molécula está ilustrada na Figura 4. A molécula de PpIX participa do ciclo heme para formação da hemoglobina, a aplicação exógena de seus precursores através do creme tem a função de propiciar o acúmulo desta molécula dentro da célula para realização da TFD [6].

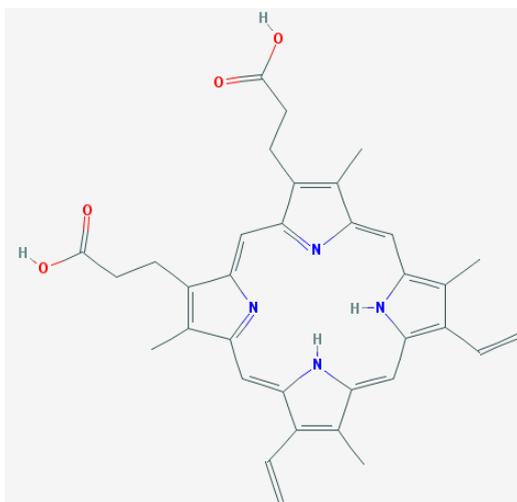


Figura 4: Estrutura química PpIX [12]

e. Fonte de luz

Diferentes fontes de luz diferem-se pelo seu espectro de emissão e o processo pelo qual emitem luz. Na irradiação em TFD uma fonte de luz ideal pode ser descrita como aquela que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do FS, sem efeitos térmicos significativos [13].

As fontes de luz mais utilizadas são lasers, LED e lâmpadas, tendo os lasers com o espectro de emissão mais estreito em comparação com outras fontes de luz citadas, fazendo com o que o feixe seja considerado altamente monocromático, isso é por conta do processo de emissão estimulada de luz, que permite que os fótons de energia muito bem determinada sejam emitidos pelo dispositivo laser [10].

O laser é uma fonte de luz bastante utilizada em TFD devido à alta intensidade e possibilidade de acoplamento em fibras ópticas, que permitem iluminar regiões de difícil acesso, além da possibilidade de seleção bem determinada de um comprimento de onda que permita ativar uma das bandas

específicas de um FS, mas possuem alto custo de aquisição e manutenção. A alternativa custo-benefício encontrada são os lasers de diodo, com emissão passível de ser obtida em praticamente em todo o espectro visível e infravermelho próximo, com este tipo de laser ainda é possível fornecer luz pulsada com considerável potência e precisão sobre o tecido irradiado.

Os diodos emissores de luz (LEDs) de cores definidas possuem um espectro de emissão mais amplo em relação a lasers, emitindo luz em uma faixa de comprimentos de onda (aproximadamente 50 nm de largura). Entretanto, LEDs brancos são uma exceção, pois possuem dois picos de emissão originando um espectro mais largo de emissão se comparado a outros LEDs [19]. Os LEDs podem ser indicados e usados em casos de tratamento em regiões extensas, pois há a vantagem do custo reduzido.

f. Oxigênio

O FS é ativado por luz com comprimento de onda adequado, que por sua vez é ativado na presença de oxigênio molecular, o FS gera espécies de oxigênio citotóxicas capazes de danificar componentes celulares como membranas, proteínas e ácidos nucleicos resultando em morte celular [14].

Em consequência da fotoativação, o FS absorve energia passando do seu estado fundamental para o estado singleto de alta energia, podendo perder energia da forma de fluorescência ou calor, voltando ao seu estado fundamental ou passando para o estado tripleto, menos energético e mais estável.

Na reação do tipo II, o FS reage com o oxigênio molecular formando oxigênio singleto, sendo o principal responsável pela morte celular na TFD. Este tipo de reação depende da composição do substrato e concentração de oxigênio [6].

g. Protocolo clínico

De acordo com as diretrizes publicadas no Fórum Europeu de Dermatologia, a TFD é licenciada para o tratamento de CBC em vários países europeus. [3] O protocolo brasileiro baseia-se em 3 horas de incubação de creme usando um curativo oclusivo, seguido de irradiação por luz vermelha

(630 nm, 125 mW/cm², 150 J/cm²) e o tratamento é repetido após uma semana [14].

Os protocolos possuem duas sessões e são usados a fim de superar a resposta limitada do tratamento para lesões em torno de 2 mm de espessura, melhorando o sucesso do tratamento. As duas sessões são separadas por um intervalo de uma semana. A taxa de resposta completa para lesões superficiais do CBC é de cerca de 90%, mas para lesões nodulares é de 60 a 70%, possivelmente devido à penetração menos eficaz do creme em toda a lesão [7].

Considerando a grande incidência deste tipo de lesão, a alta demanda de pacientes precisando de tratamento, as dificuldades que enfrentam ao percorrer longas distâncias para chegar até o hospital, além de que, a maior parte dos pacientes possuem idade mais avançada e comorbidades; foi realizado um estudo com protocolo de TFD *single visit* (única sessão). Neste estudo, foram avaliados protocolos com duas sessões de TFD realizadas no mesmo dia. Um dos protocolos apresentou 95,4% de resposta completa após 30 dias do tratamento na eliminação das lesões, neste protocolo foi atribuído 3 horas de incubação do creme na primeira sessão e 1,5 horas na segunda [15]. Mesmo com uma taxa de sucesso alta, com a aplicação deste protocolo, o paciente permanece no hospital por um longo período de tratamento, de 6 a 7 horas.

Pensando em estabelecer um protocolo em que o paciente pudesse ser dispensado do ambiente hospitalar e realizar parte do tratamento em casa, foi desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP) um protótipo de irradiação portátil. Com a utilização deste dispositivo, o tempo de permanência desses pacientes no hospital poderia ser menor em relação ao protocolo *single visit* atualmente empregado, uma vez que a segunda sessão poderia ser feita fora do hospital. Além de oferecer maior conforto ao paciente, diminuindo a permanência dos pacientes no ambulatório durante o tratamento também é possível favorecer a dinâmica ambulatorial, permitindo que mais lesões possam ser tratadas no mesmo dia.

Além de destas vantagens, realizar a TFD com baixa irradiância, e, portanto, com maior tempo de irradiação fará com que o tratamento seja praticamente indolor, proporcionando maior conforto ao paciente, além de favorecer o abastecimento de novas moléculas de PpIX e oxigênio ao tecido que pode aumentar a eficiência do tratamento.

h. Fluorescência e TFD

Para que haja acúmulo suficiente de PpIX para a realização do tratamento de lesões epiteliais como o CBC, o tempo de incubação do protocolo clínico convencional é de aproximadamente 3 horas após a aplicação tópica do precursor [10, 13].

A diminuição da fluorescência está associada ao consumo da PpIX e pode ser monitorada por espectroscopia e imagem de fluorescência. O consumo de PpIX e, conseqüentemente, a diminuição do sinal de fluorescência pode ser associada, portanto, com a efetividade da terapia.

3. Objetivos

Realizar um estudo pré-clínico em modelo tumoral animal para entender os aspectos fundamentais da TFD a partir da irradiação prolongada por meio de um sistema portátil utilizando técnicas de fluorescência.

a. *Objetivos específicos*

- Análise da produção e degradação da PpIX por espectroscopia de fluorescência;
- Análise da produção e degradação da PpIX por imagem de fluorescência de campo amplo;

4. Materiais e Métodos

a. Modelo animal

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem balb/c, do tipo nude, com aproximadamente seis semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um alojamento para animais, em rack ventilado com sistema de climatização controlada, montado no IFSC/USP, no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica. Foram alojados em gaiolas forradas com maravalha e receberam água filtrada e ração comercial específica para roedores, ambos *ad libitum*.

Antes dos procedimentos os animais foram anestesiados com anestesia inalatória com isoflurano (BioChimico®, Itatiaia, RJ, Brasil) na concentração de 2 a 4% em oxigênio para indução. Em seguida, foi feita a manutenção do plano anestésico, avaliado de acordo com depressão respiratória e cardíaca e ausência de resposta a estímulos, também via administração inalatória de isoflurano (1,5 a 2% em oxigênio).

A eutanásia foi realizada por overdose anestésica via inalatória aplicando a dose máxima de indução dos experimentos (4% de isoflurano em oxigênio) até o animal entrar em óbito. Como método de confirmação de morte, foram verificadas ausência de batimentos cardíacos, ausência de movimentos respiratórios, palidez de mucosas, temperatura corpórea e ausência de reflexos.

b. Indução tumoral por injeção de células

A indução tumoral xenográfica foi feita a partir de uma linhagem celular de CEC humano (A-431, ATCC® CRL-1555™), por ser um modelo de câncer de pele não melanoma de crescimento rápido e bem estabelecido na literatura, com formação de tumor nodular e não de cisto (como acontece em casos de indução de CBC) [9,10]. Estes tipos celulares crescem por adesão em meio de cultura específico, suplementado com soro fetal bovino e antibióticos. As células foram mantidas em incubadora a 37°C sob atmosfera umidificada e de CO₂.

Para a indução, foi feita a inoculação das células por injeção intradérmica no flanco direito do animal, com concentração de 10⁶ células. O

volume de cada tumor foi estimado com base no volume de uma esfera, com altura, largura e comprimento medidos com paquímetro para estimar o raio médio. Os experimentos sempre foram conduzidos quando o volume do tumor atingir entre 10 e 20 mm³.

c. Fonte de luz

Foi utilizado o sistema comercial de irradiação LINCE® (MMOptics, Brasil) (Figura 5) e um sistema protótipo portátil de irradiação desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do IFSC-USP (Figura 6), ambos compostos por LEDs centrados no comprimento de onda 630 ± 10 nm. Os parâmetros de irradiação foram baseados em estudos prévios em animais, a fim de entregar uma subdose (30 J/cm²) de TFD para avaliação do dano em diferentes protocolos, sem erradicação completa do tumor [19].

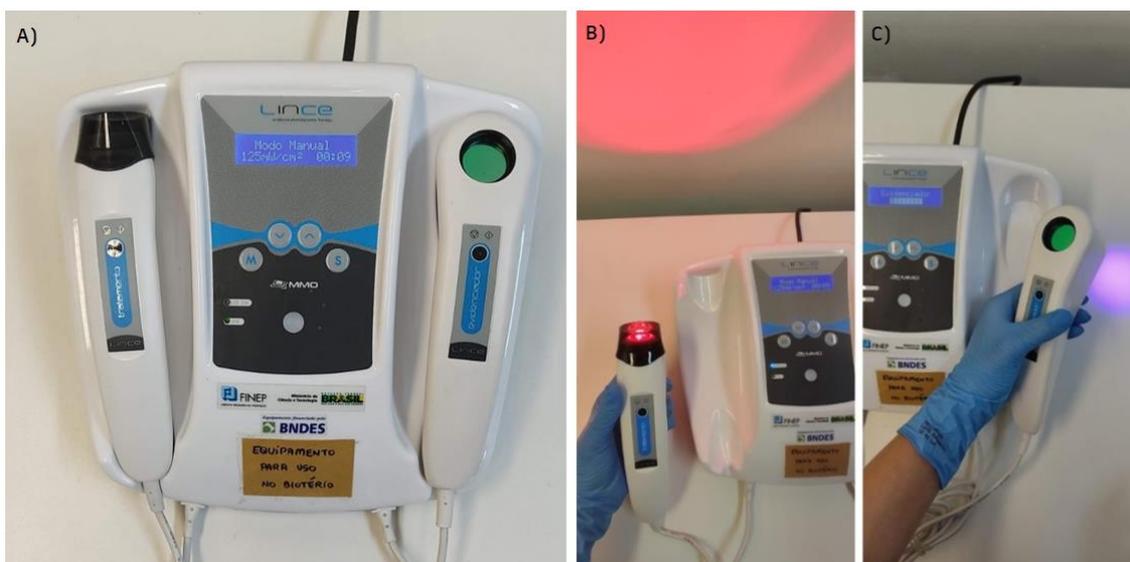


Figura 5: (a) Sistema de irradiação LINCE® (MMOptics, Brasil), (b) tratamento e (c) evidenciador.
Fonte: Elaborada pela autora.

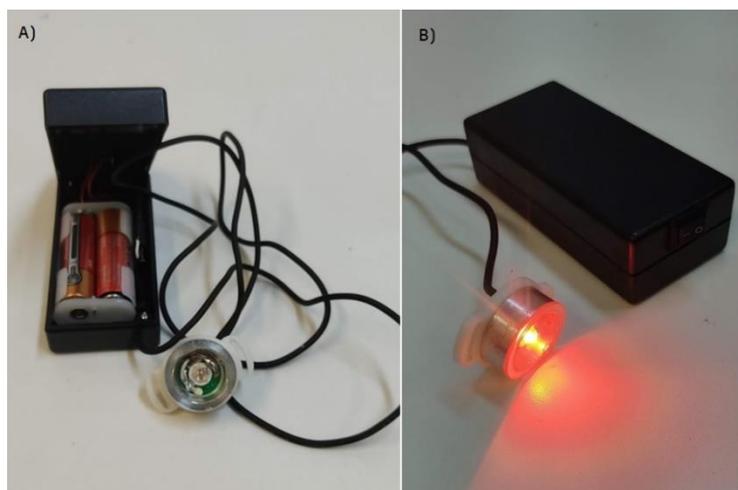


Figura 6: Sistema protótipo portátil de irradiação, b) Sistema protótipo portátil de irradiação em funcionamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando a equação 3, para a entrega de 30 J/cm² [19] o LINCE foi calibrado para uma irradiância de 102 mW/cm² e, portanto, utilizado por 5 minutos. Quando a TFD foi feita com o protótipo, como sua irradiância é de 15,8 mW/cm², a irradiação era feita por 31 minutos para entregar a mesma fluência de energia.

$$E \left(\frac{J}{cm^2} \right) = I \left(\frac{W}{cm^2} \right) \cdot t(s) \quad (3)$$

Sendo E a dose de energia, I a irradiância do equipamento e t o tempo de irradiação. A energia emitida ao tecido por ponto de aplicação é proporcional a irradiância da luz com o tempo.

d. Fotossensibilizador

A PpIX teve seu acúmulo estimulado pela aplicação do creme contendo 20% do cloridrato de aminolevulinato de metila (M-ALA, PDT Pharma®, Cravinhos, Brasil), que foi incubado no tumor por 1 hora antes da primeira sessão e 30 minutos nos grupos em que houve uma segunda sessão de TFD. Neste período, o animal estava anestesiado para evitar que o creme fosse removido e o local ficou coberto papel alumínio para evitar exposição da luz ambiente durante o tempo de incubação (Figura 7).



Figura 7: Animal anestesiado com proteção da luz ambiente durante o tempo de incubação.
Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 8 refere-se ao tumor do animal sendo irradiado com o sistema portátil.



Figura 8: Tumor no flanco direito do animal sendo irradiado pelo protótipo.
Fonte: Elaborada pela autora.

Tanto por espectroscopia quanto por imagem de fluorescência de campo amplo, a eliminação tecidual da PpIX também pode ser monitorada para observar se havia PpIX residual local mesmo após a realização da TFD

e. Medidas de Fluorescência

i. Espectroscopia de fluorescência

A coleta de espectros de fluorescência da PpIX foi feita nos testes em animais a partir de um sistema montado no Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP, que consiste de um espectrofotômetro USB2000 (OceanOptics Inc., EUA) acoplado a um computador e a um laser para

excitação de 405 nm. Foram coletados espectros de cinco diferentes pontos do tumor e da pele ao redor do tumor. Estes espectros foram processados a partir do programa Origin[®] (OriginLab, EUA) para estimar a intensidade de fluorescência em cada região ao longo do tratamento.

ii. Imagem de fluorescência de campo amplo

Para verificar a homogeneidade de produção superficial da PpIX foi utilizado um sistema de imagem de fluorescência por campo amplo que provém do acoplamento da ponteira de monitoramento do LINCE[®], à base de LEDs (que emitem na região entre 400 e 450 nm), à uma câmera fotográfica para aquisição de imagens [7].

Para o processamento dessas imagens foi utilizado um algoritmo escrito em Python[®] que relaciona a intensidade da componente vermelha das imagens com a fluorescência da PpIX na superfície do tumor.

f. Delineamento experimental

Foram utilizados 16 animais distribuídos em 4 grupos experimentais, 4 animais por grupos. Os grupos foram planejados para verificar o acúmulo e degradação da PpIX com uma ou duas sessões de TFD, simulando a sequência que acontece no protocolo *Single Visit* e substituindo a segunda sessão pelo uso do protótipo portátil de irradiação. Segue descrição dos grupos experimentais:

Apenas uma sessão de TFD:

Grupo 1: incubação do creme M-ALA por 1 h, irradiação com LINCE;

Grupo 2: incubação do creme M-ALA por 1 h, irradiação com protótipo portátil;

Duas sessões de TFD:

Grupo 3: incubação do creme M-ALA por 1h, irradiação com LINCE, nova incubação do creme M-ALA por 30 min, irradiação com LINCE;

Grupo 4: incubação do creme M-ALA por 1h, irradiação com LINCE, nova incubação do creme M-ALA por 30 min;

Os procedimentos experimentais de cada grupo também podem ser observados resumidamente na Tabela 1.

Tabela 1: Apresentação resumida dos procedimentos experimentais realizados em cada grupo.

	1ª sessão		2ª sessão	
	Tempo (h)	Equipamento	Tempo (h)	Equipamento
Grupo 1	1 h	LINCE	-	-
Grupo 2	1 h	Protótipo portátil	-	-
Grupo 3	1 h	LINCE	30 min	LINCE
Grupo 4	1 h	LINCE	30 min	Protótipo portátil

Fonte: Elaborada pela autora.

5. Resultados e discussão

Foram coletados 5 espectros no tumor e 5 espectros na pele ao redor do tumor, em cada etapa do protocolo. Para estimar a quantidade de PpIX em função das etapas dos tratamentos, evitando possíveis oscilações do sistema e variação no posicionamento da fibra durante a coleta, foi realizado uma normalização nos espectros de fluorescência. Cada ponto do espectro foi dividido pelo valor da intensidade de fluorescência no comprimento de cada onda de 450 nm (Equação 4), isto seguindo referências anteriores baseadas em observações de que nesta região do espectro não há variação correspondente a informação da fluorescência da PpIX [16].

$$Normalização = \frac{I(\lambda)}{I(\lambda_{450})} \quad (4)$$

Os espectros de intensidade fluorescência normalizadas (Figura 9) representam medidas coletadas no tumor e pele ao redor antes da aplicação do creme (fluorescência endógena do tecido) e após a incubação do creme. A partir da normalização, os valores de intensidade de fluorescência normalizada no pico característico da molécula de PpIX, observado em 635 nm, é um parâmetro mais preciso para comparar a quantidade de FS em cada etapa do protocolo aplicado. É possível observar que esse pico aparece apenas no espectro de fluorescência referente ao tumor, após a incubação do creme.

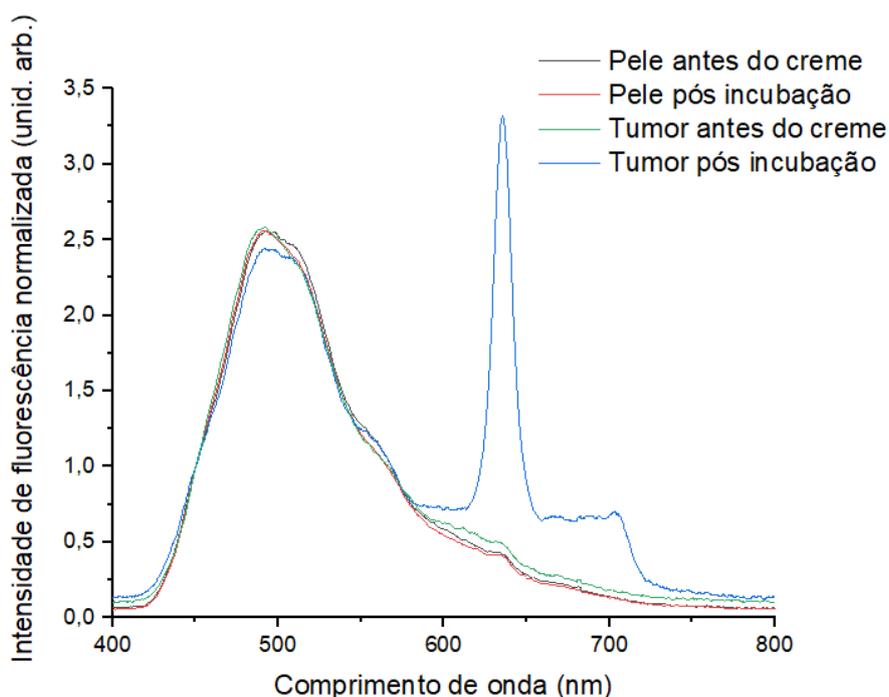


Figura 9: Espectros médios da intensidade fluorescência normalizadas pela intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 450 nm.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Com os experimentos realizados e obtidos os espectros de cada animal de cada grupo, para o melhor estudo e a visualização do comportamento de cada grupo de acordo com seu respectivo protocolo, os dados foram organizados em gráficos do tipo boxplot, tanto para o tumor quanto para pele ao redor, com a linha cronológica dos procedimentos. Nos gráficos apresentados, cada ponto no boxplot equivale ao valor da intensidade de fluorescência normalizada em 635 nm para cada um dos 5 espectros coletados em cada animal, em cada etapa do protocolo.

O grupo 1 tem como protocolo uma sessão com a irradiação feita pelo LINCE e seus dados de intensidade de fluorescência normalizada estão apresentados na figura 10. Na figura 10A é possível observar que ao longo do protocolo não houve variação de intensidade de fluorescência na pele. Isto é esperado, uma vez que o creme é posicionado apenas sob o tumor e o acúmulo de PpIX tende a ser seletivo nas células neoplásicas [11]. O que pode ser comprovado com os dados apresentados na figura 10b, na qual os valores de intensidade de fluorescência normalizada são referentes aos espectros coletados na área do tumor, demonstrando que após a incubação do creme há um acúmulo de PpIX que é proporcional ao aumento da fluorescência local. Assim como, após a irradiação, a intensidade de fluorescência diminui devido

ao consumo da PpIX. Contudo, a intensidade de fluorescência não é tão baixa após a irradiação como era o sinal antes da incubação, pois foi utilizada uma subdose de TFD que indica que ainda há PpIX no tecido.

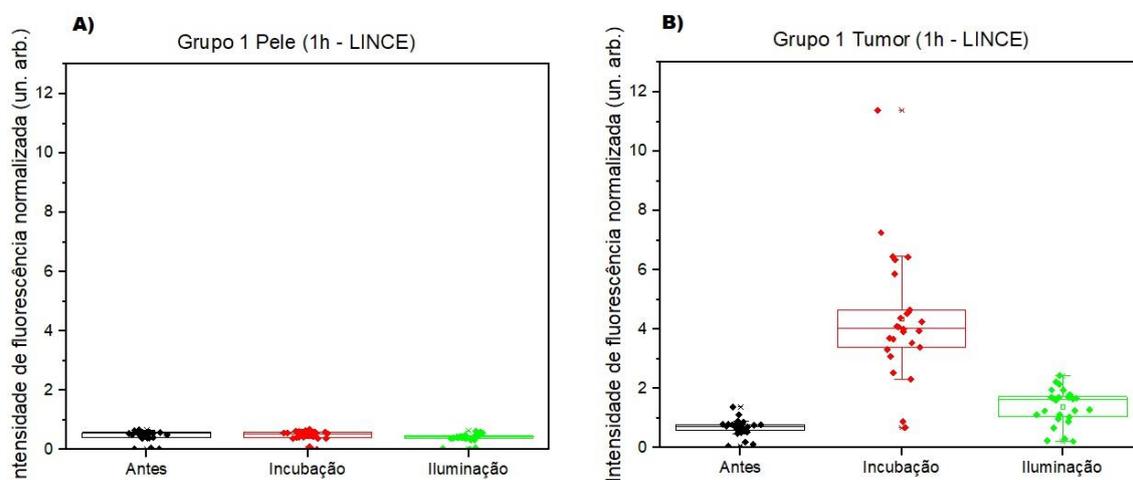


Figura 10: Gráfico boxplot do grupo 1. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento.
 Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo 2, o protocolo é semelhante ao grupo 1, mas tem como alteração o uso do protótipo como equipamento de irradiação. A figura 11A é o gráfico da pele, sendo possível observar que também não houve nenhuma alteração na intensidade de fluorescência ao longo do tratamento. Na figura 11B, há o aumento dos valores de intensidade de fluorescência após a incubação e diminuição após a irradiação do protótipo, diminuição essa bastante semelhante a observada com o uso do LINCE (Figura 10B).

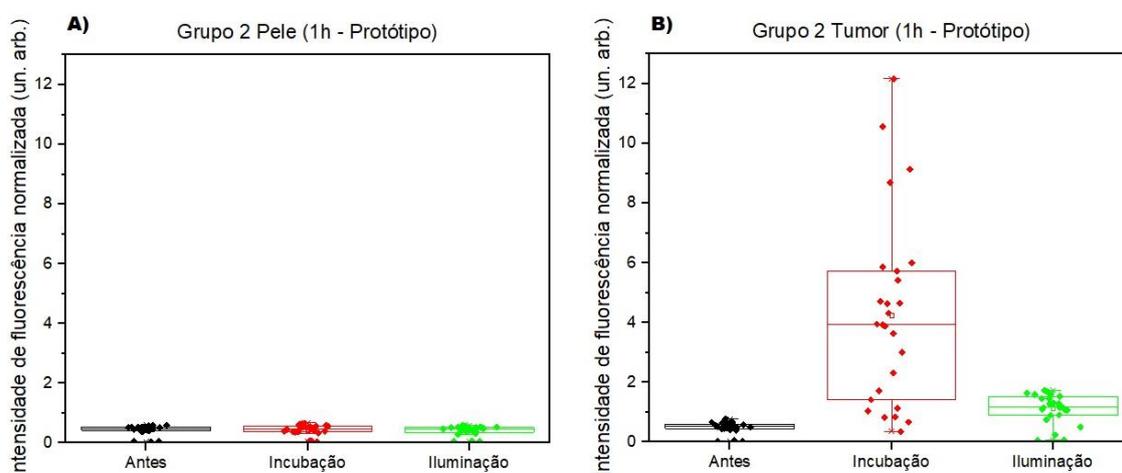


Figura 11: Gráfico boxplot do grupo 2. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento
 Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo 3, o protocolo tem duas incubações e duas irradiações com o LINCE. A figura 12A é o gráfico da pele sadia, sendo possível observar que não há alteração na intensidade ao longo do tratamento. Na figura 12B, entretanto, há o aumento dos valores de intensidade de fluorescência após ambas as etapas de incubação, sendo observados valores maiores na primeira incubação comparados com a segunda incubação; após as iluminações, o padrão de diminuição da fluorescência é similar.

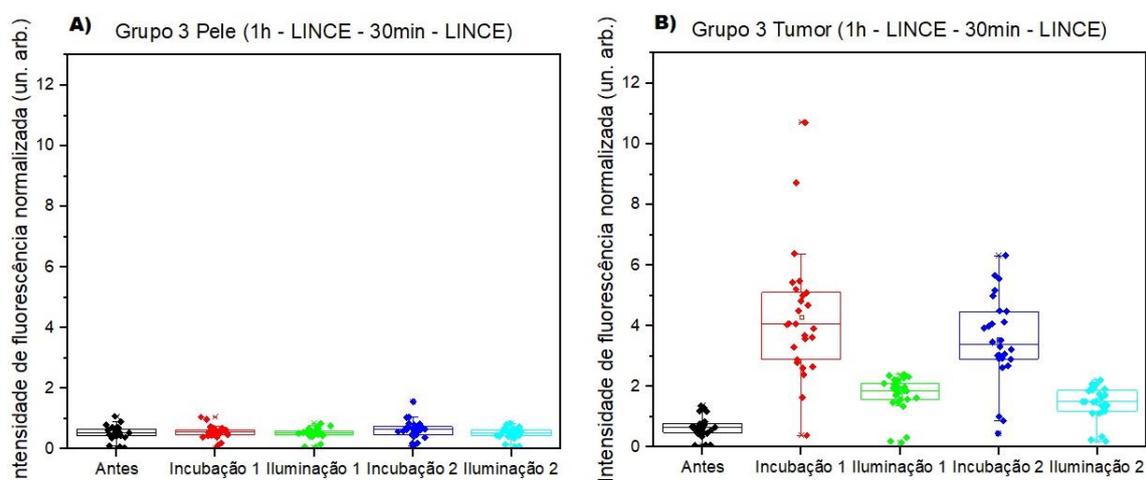


Figura 12: Gráfico boxplot do grupo 3. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo 4, o protocolo tem duas sessões de TFD, semelhante ao protocolo do grupo 3 com alteração de que a segunda irradiação é realizada com o protótipo. A figura 13A tem os dados da pele, sendo possível observar pouca alteração na intensidade de fluorescência ao longo do tratamento. Na iluminação 1 há pontos em que a intensidade de fluorescência se destacou um pouco em relação aos outros momentos, o que pode indicar que em algum dos animais o creme pode ter se difundido numa área além do tumor. Mesmo assim, esses valores são desprezíveis comparados aos valores obtidos após a incubação do creme no tumor. Na figura 13B, há aumento da intensidade de fluorescência, sendo os valores da primeira incubação maiores do que na segunda incubação. Após as irradiações, têm diminuição nas intensidades esperadas, com diminuições maiores na segunda irradiação.

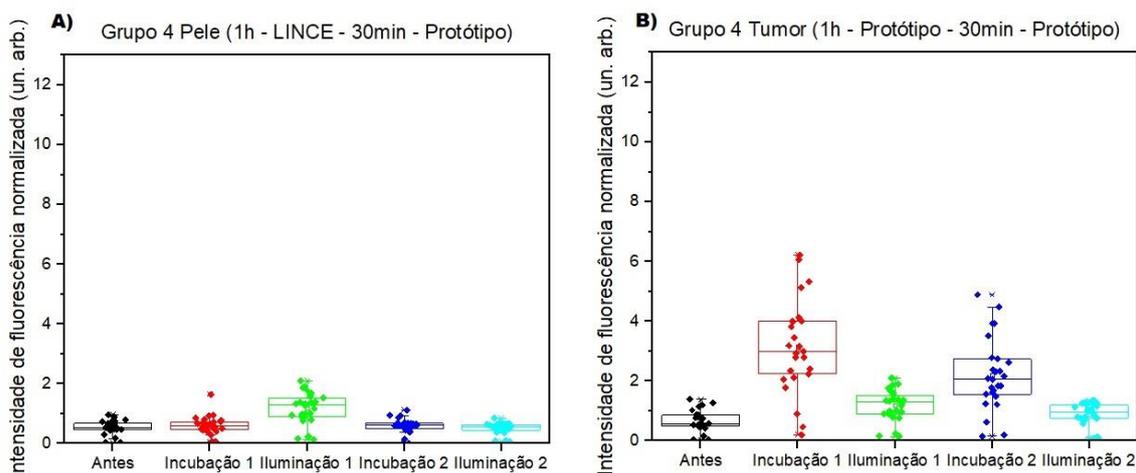


Figura 13: Gráfico boxplot do grupo 4. A) dados de intensidade de fluorescência normalizada da pele sadia em função das etapas do experimento. B) dados de intensidade de fluorescência normalizada do tumor em função das etapas do experimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 14 contém imagens representativas das imagens de fluorescência de campo amplo coletadas nos experimentos. A figura 14A ilustra a fluorescência endógena do tumor e pele ao redor, que com a excitação utilizada (450 nm) e filtros do equipamento pode ser observada no tom verde.

Em todos os animais foram realizadas as coletas das imagens e dos espectros de fluorescência, antes da aplicação do creme, após incubação e após a irradiação. Portanto, com as imagens de fluorescência de campo amplo é possível identificar também que a autofluorescência do tumor é mais escura que a da pele sadia do animal (figura 14a) e que após a incubação, a fluorescência em vermelho mostra o acúmulo superficial de PpIX (figura 14b), assim como o consumo parcial da PpIX (figura 14c) provocando uma diminuição da intensidade do vermelho associada a presença da PpIX.

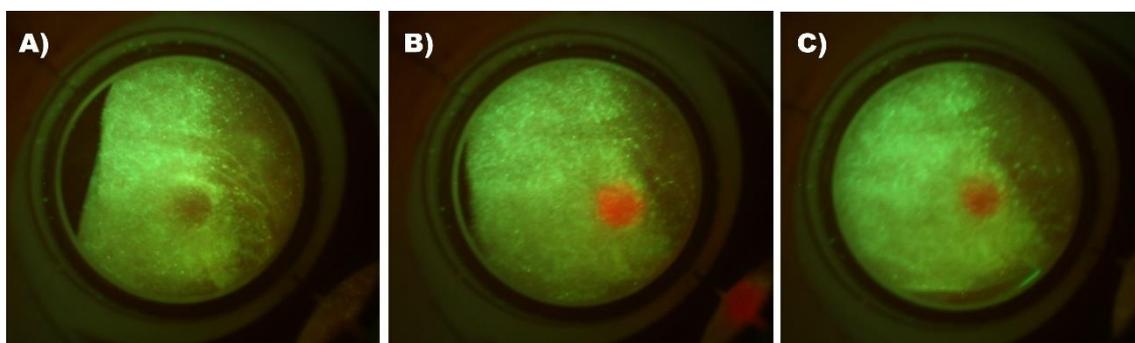


Figura 14: Imagens de campo amplo de fluorescência coletadas: A) antes do creme B) após a incubação e C) após a irradiação.

Fonte: Elaborada pela autora.

As regiões ao redor do tumor, nas quais não foram aplicadas o creme, não apresentam fluorescência na região do vermelho, como esperado, podendo-se afirmar que a produção de PpIX deu-se de forma uniforme apenas na região tumoral com o acúmulo do FS sendo visível e homogêneo.

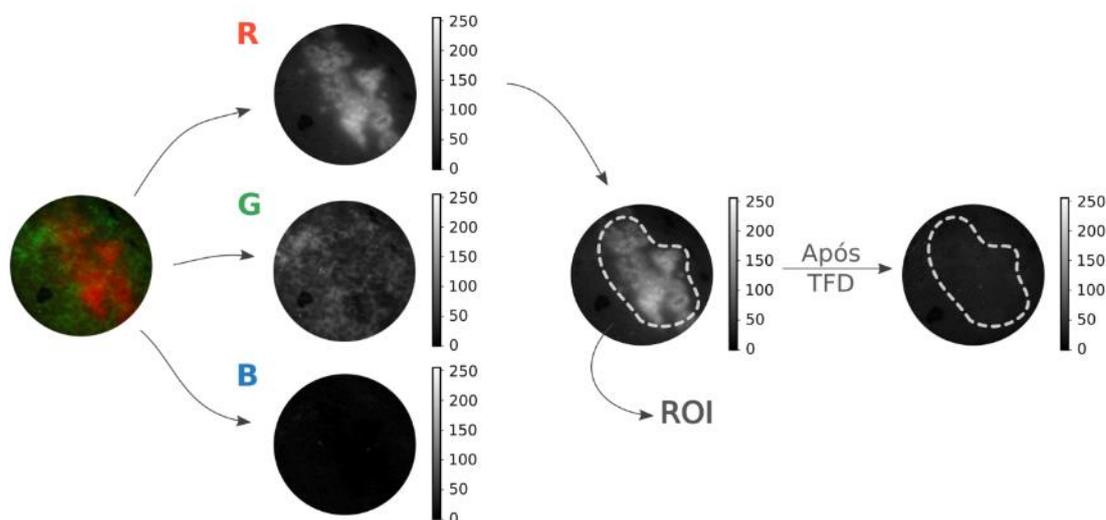


Figura 15: Representação de uma imagem de fluorescência de campo amplo RGB e suas respectivas imagens após decomposição nos canais vermelho, verde e azul. Neste esquema também está ilustrado a delimitação da região de interesse (ROI) em uma imagem no canal vermelho e a mesma região após a sessão de TFD. Estas imagens são referentes a lesão de QA de um paciente tratados com TFD em um estudo clínico que utilizou o mesmo tipo de processamento de imagens deste estudo. Fonte: [17]

Com o diagrama da figura 15 é possível observar que ao decompor uma imagem RGB de fluorescência de campo amplo após incubação do creme, a maior intensidade associada a região da lesão (que contém PpIX nesta etapa do tratamento) está no canal vermelho. Assim como, a informação referente a pele sadia está presente no canal verde da imagem. Sendo o canal azul, com menos informação tanto em relação a lesão quanto a pele sadia. Por isso, para a análise das imagens de fluorescência de campo amplo serem associadas a presença de PpIX, foi utilizada sempre a imagem do canal vermelho, avaliando sua intensidade e considerando-a proporcional a quantidade de FS.

A partir da rotina de avaliação da intensidade de fluorescência nas imagens de campo amplo, é possível delimitar uma região de interesse manualmente para cada imagem coletada antes da incubação do creme (autofluorescência do tumor), e assim, essa respectiva região é considerada para as imagens coletada ao longo do tratamento. O algoritmo calcula a intensidade média dos pixels no canal vermelho das imagens dentro da região de interesse. Como previamente descrito, foi considerado que a intensidade média do pixel no canal vermelho é proporcional à intensidade média de fluorescência da PpIX

dentro desta região. Os valores de intensidade das imagens são correlacionados de 0 a 255 uma vez que os pixels das imagens tinham 8 bits. Portanto, quanto maior o número de intensidade, maior a fluorescência da PpIX associada.

Considerando as imagens de fluorescência de cada animal dos grupos, foi possível obter a intensidade de fluorescência média da PpIX estimada para cada protocolo (figura 16).

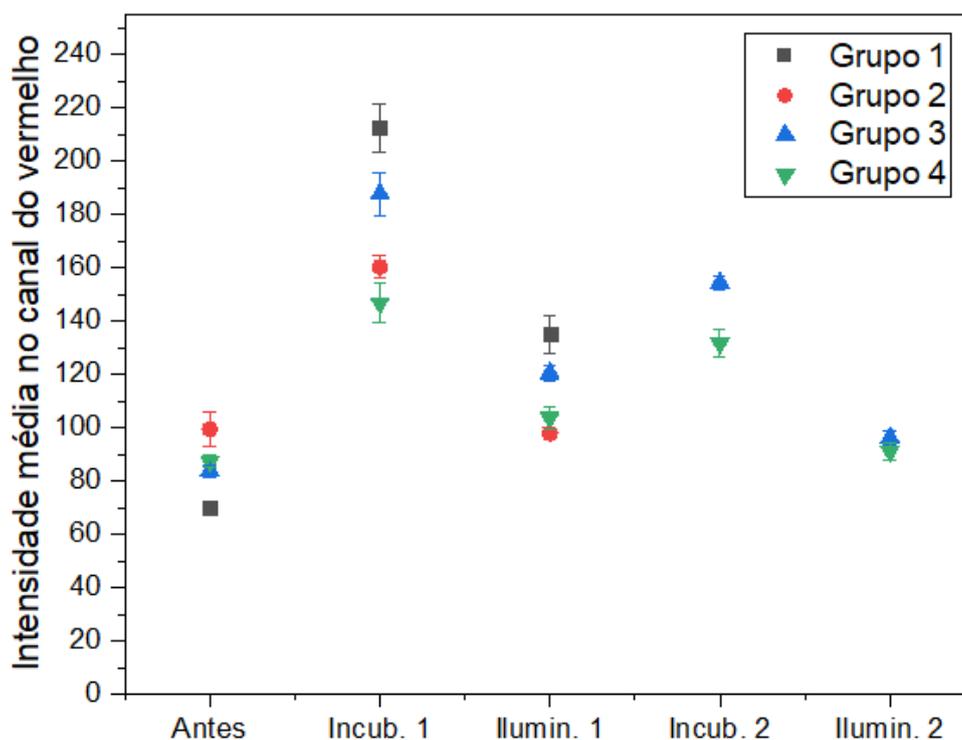


Figura 16: Gráfico do tipo boxplot com os valores médios da intensidade no canal do vermelho das imagens de fluorescência de campo amplo coletadas no tumor 1 hora de incubação.
Fonte: elaborada pela autora.

A partir da figura 16, é possível observar a intensidade média no canal vermelho em cada um dos grupos ao longo das etapas dos protocolos, antes da aplicação do creme, após a incubação, após iluminação. Especialmente para os grupos 3 e 4, há 2 incubações e 2 iluminações.

Uma maior intensidade no canal vermelho pode ser observada após a primeira incubação em relação a segunda. Considerando que o tempo de incubação da primeira sessão é maior que da segunda, este pode ser fator associado ao maior acúmulo de PpIX observado. Além disso, após a primeira irradiação há células que podem estar comprometidas e incapacitadas de produzir PpIX.

Considerando os grupos 3 e 4, que diferem pela irradiação da segunda sessão ter sido feita com o sistema comercial ou com o protótipo, respectivamente; as intensidades médias após a segunda irradiação não possuem diferença significativa, demonstrando que ambos os equipamentos foram capazes de proporcionar degradação similar, com mesma eficácia na redução da intensidade dos pixels do canal vermelho.

Sabe-se que alguns estudos têm mostrado que ao entregar a mesma dose de energia ao tecido, mas com menores irradiâncias e conseqüentemente maior tempo de irradiação, a eficiência do tratamento é praticamente a mesma do protocolo convencional, apresentando o benefício da menor dor, eliminando este fator de desconforto ao paciente [6, 10, 14].

A partir dos resultados obtidos pelas análises de fluorescência superficial, não foram observadas diferenças na degradação da PpIX entre os protocolos, o que indica que a eficiência da irradiação pelo protótipo portátil foi similar à do equipamento comercial.

Além disso, a irradiação por período prolongado também tem como fator positivo proporcionar maior tempo para produção de novas moléculas de PpIX e para abastecimento de oxigênio ao tecido, dois elementos essenciais para que ocorra a ação fotodinâmica [6, 10, 14].

Os resultados obtidos nesse estudo foram essenciais para o planejamento de um estudo clínico que teve início no Hospital Amaral Carvalho em Jaú – SP (cadastro do estudo UTN: U111-1255-7721), pois foi possível observar que o protótipo portátil utilizado consome quantidade de PpIX equivalente ao equipamento comercial LINCE® durante a TFD depositando a mesma fluência sobre a lesão. O novo protocolo clínico poderá favorecer pacientes de idades avançadas, diminuindo o tempo de sua permanência no hospital para o tratamento de câncer de pele não melanoma.

Os estudos com os animais utilizando este sistema envolveram também realização de lâminas histológicas para avaliação de dano tecidual e de amostras congeladas para análise por microscopia confocal de fluorescência para avaliar também a distribuição do FS em profundidade. Contudo, devido a situação de pandemia, houve dificuldades para uso de determinados equipamentos, impossibilitando as análises complementares ao presente estudo. Por isso, este trabalho contém a análise parcial dos resultados obtidos com os experimentos em animais.

6. Conclusão

Com a execução deste projeto, estamos propondo entender novas tecnologias de entrega de luz que podem ser capazes de solucionar problemas práticos relacionados à TFD. O equipamento avaliado neste estudo pode ser promissor para o aperfeiçoamento da TFD com relação à sua aplicação tópica convencional. Com a obtenção de um menor tempo de tratamento no hospital é possível à diminuição dos custos envolvidos e o menor tempo de desconforto pode ser oferecido ao paciente, fazendo com a TFD seja uma opção de tratamento ainda mais favorável e aceita pela comunidade médica e pelos pacientes.

A partir das medidas de fluorescência superficial, por espectroscopia e imagem de campo amplo, pôde-se avaliar a diminuição da fluorescência associada ao consumo da PpIX, que está associada com a efetividade da terapia. Dada a similaridade observada na degradação da PpIX avaliada com ambos os sistemas de irradiação, há o indicativo de que a efetividade do sistema portátil foi tão eficiente quanto o sistema comercial.

Como perspectivas futuras, a fim de complementar e embasar ainda mais esta conclusão parcial, se vê indispensável à avaliação da distribuição do FS no tumor por microscopia confocal de fluorescência e a avaliação do dano por histologia. Os resultados obtidos até o momento são promissores na evolução dos estudos clínicos utilizando sistemas de irradiação portátil, mesmo que com menor irradiância, igualmente eficientes e possivelmente menos dolorosos, ao entregar a mesma dose de energia prolongando o tempo de irradiação na sessão, mas com maior conforto aos pacientes fora do ambiente hospitalar.

Referências bibliográficas

- [1] Câncer de pele não melanoma, 19 ago. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- [1] INCA. Câncer de pele não melanoma, <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>. 2021.
- [2] FREITAS C. A. F., LUZA A. C., SALES S. C. Tratamento cirúrgico da neoplasia maligna de pele não melanoma. Estudo de 100 casos tratados em Campo Grande. *Rev bras cir cabeça pescoço* 2009; 190–193.
- [3] MORTON C.A., SZEIMIES R.M., Basset-Séguin N. European Dermatology Forum guidelines on topical photodynamic therapy 2019 Part 2: emerging indications – field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2020; 34: 17–29.
- [4] BAGNATO V.S. *Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. Brasil: Livraria da Física*. 2008.
- [5] JI H.T., CHIEN L.T., LIN Y.H. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. *Mol Cancer*. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1186/1476-4598-9-91.
- [6] Requena M. B. Otimização da entrega de fármacos para tratamento de câncer de pele por Terapia Fotodinâmica. 2019; 45: 95–98.
- [7] BRAUN R. K. Síntese e caracterização fotofísica de benzocalcogenodiazolas sililadas.
- [8] TRAKETELLI M, MORTON C, Nagore E. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management: Developed by the guideline subcommittee of the European Dermatology Forum. *Eur J Dermatology* 2014; 24: 312–329.
- [9] RAMIREZ D.P., MORIYAMA L.T., DE OLIVEIRA E.R. Single visit PDT for basal cell carcinoma – a new therapeutic protocol. *Photodiagnosis Photodyn* 2019; 26: 375–382.
- [10] GRECCO, C.; VOLLET-FILHO, J. D.; CARVALHO, M. T.; BAGNATO VS. Physics of lasers and LEDs. *Lasers Dent* 2015; 1–10.
- [11] Mehraban N, Freeman HS. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production. *Materials*. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.3390/ma8074421.
- [12] CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. Composto da base de dados, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15722> (2022).

- [13] MACHADO, A. E. TERAPIA FOTODINÂMICA: PRINCÍPIOS, POTENCIAL DE APLICAÇÃO E PERSPECTIVAS. 2000; 23: 237–243.
- [14] BUZZÁ H. H., MORIYAMA L. T., VOLLET-FILHO J. D. Overall Results for a National Program of Photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma: A Multicenter Clinical Study to Bring New Techniques to Social Health Care. *Cancer Control* 2019; 26: 107327481985688.
- [15] RAMIREZ D. P., MORIYAMA L.T., OLIVEIRA E. R. Single visit PDT for basal cell carcinoma – a new therapeutic protocol. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019; 26: 375–382.
- [16] REQUENA M. B. Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele sadia de suínos e diferentes fotossensibilizadores. 2015; 224–233.
- [17] OLIVEIRA E. R., SALVIO A. G., MIOT H. A. Randomized controlled trial for evaluation of efficacy and pain during photodynamic therapy for actinic keratosis of face and scalp comparing two irradiation protocols. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2022; 37: 102623.
- [15] BRAUN, R. K. Síntese e Caracterização Fotofísica de Benzocalcogenodiazolas Sililadas. 59 p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- [16] CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. Composto da base de dados PubChem CID=15722. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15722>>. Acesso em: março/2022.
- [17] MACHADO, A. E. H. Da terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- [18] GRECCO, C.; VOLLET-FILHO, J. D.; CARVALHO, M. T.; BAGNATO, V. S. Physics of lasers and LEDs. *Lasers in Dentistry*. 2015. p. 1–10. doi: 10.1002/9781118987742.ch1.
- [19] REQUENA, M. B. Otimização da entrega de fármacos para tratamento de câncer de pele por terapia fotodinâmica. 133 p. Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2019.
- [20] BUZZÁ, H. H. Overall results for a national program of photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a multicenter clinical study to bring new techniques to social health care. *Cancer Control*, 2019.
- [21] MEHRABAN, N.; FREEMAN, H. S. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production. *Materials*, v. 8, North Carolina State University, 2015.
- [22] REQUENA, M. B. Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele sadia de suínos e diferentes

- fotossensibilizadores. 111p. Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2015.
- [23] FREITAS, C. A. F; LUZA, A. C. Tratamento cirúrgico de neoplasia maligna de pele não melanoma. Estudo de 100 casos tratados em Campo Grande. Revista Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço v.38, p. 190-193, 2009.
- [24] OLIVEIRA, E. R.; SALVIO, A. G. Randomized controlled trial for evaluation of efficacy and pain during photodynamic therapy for actinic keratosis of face and scalp comparing two irradiation protocols. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, [S. l.], p. 1-8, 24 out. 2021