



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
CAMPUS MARINGÁ

Ana Paula Bernabé Cavalaro

**UM ESTUDO DA LENTE TÉRMICA APLICADO EM  
CORANTES FOTOSSENSÍVEIS**

**MARINGÁ  
2023**

ANA PAULA BERNABÉ CAVALARO

Um Estudo da Lente Térmica aplicado em Corantes  
Fotossensíveis

**Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Universidade Estadual de Maringá, como requisito necessário para obtenção do grau de Bacharel em Física.**

Maringá, 2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

ANA PAULA BERNABÉ CAVALARO

Esta Monografia foi julgada adequada para a obtenção do título de Bacharel em Física, sendo aprovada em sua forma final pela banca examinadora:

---

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Carlos  
Malacarne  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dr. Vitor Santaella Zanuto  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Francielle Sato  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Maringá, 2023.

*Dedico este trabalho a minha amada prima/irmã Júlia Bernabé Nobre de Oliveira (in memoriam) que esteve comigo a minha vida toda, sempre compartilhando sonhos, me apoiando e incentivando em toda a minha trajetória (acadêmica e pessoal), me dando a mão sempre quando precisava. Te amo eternamente.*

# Agradecimentos

Agradeço imensamente ao meu orientador o Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne por toda a ajuda, ensinamentos e paciência durante todo este processo.

A toda minha família que sempre estive ao meu lado me apoiando em toda a minha trajetória, me incentivando e confiando em mim e em todas as minhas escolhas. Ao meu pai e minha mãe (Ronaldo e Cláudia) por acreditarem nos meus sonhos, as minhas irmãs (Beatriz e Maria Luiza) por todas as conversas, risadas e incentivos.

Aos meus amigos Alexandre e Victoria que estiveram comigo desde o começo da graduação e fizeram total diferença na minha trajetória, estando sempre do meu lado, me ajudando nos momentos difíceis ao longo do caminho, e sempre me dando conselhos para nunca desistir. Agradeço por todos os momentos de diversão, risadas, palhaçadas e companheirismo, sem vocês não chegaria até aqui.

Aos meus amigos que chegaram na reta final mas que também fizeram uma grande diferença: Henrique, Luiz, Hygor, e especialmente a Thais que mesmo chegando no final de todo o processo me deu apoio todos os dias, sempre esteve comigo, agradeço por todos os momentos.

# Resumo

Corantes fotossensibilizadores excitados com luz visível, na presença de oxigênio, leva à formação de espécies reativas de oxigênio, uma composição citotóxica, que é o princípio fotoquímico da terapia fotodinâmica. A classe de corantes xantênicos possuem uma tendência fluorescente que apresenta cores fortes que cobrem boa parte do espectro visível, além de uma alta capacidade de gerar oxigênio singlete em meio aquoso. As propriedades destes corantes são extremamente dependentes de sua estrutura e forma protolítica. Neste trabalho utilizou-se a técnica de espectroscopia de Lente Térmica para investigar propriedades de interesse na terapia fotodinâmica dos corantes xantênicos. Foram investigados os fotossensibilizadores: Eritrosina B , Eosina Y e Rosa de Bengala. O corante *Sirius Red* foi utilizado como solução controle, pois a mesma não apresenta fotoatividade aparente. A técnica de Lente Térmica se mostrou útil para o estudo de fotoativação nos corantes fotossensíveis, possibilitando a verificação de efeitos como a fotodegradação dos corantes mesmo em concentrações baixas, e suas propriedades térmicas e ópticas, que são parâmetros importantes na aplicação da TFD.

**Palavras-chave:** Corantes Xantênicos, Lente Térmica, Fotossensibilizadores, Terapia Fotodinâmica.

# Lista de ilustrações

Figura 1 – Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismos de ação em TFD tipo I e tipo II (EROs são as espécies reativas de oxigênio), (Adaptado de D. S. Pellosi, 2012 [12].) . . . . .	3
Figura 2 – Estrutura química característica dos xantenos. . . . .	5
Figura 3 – Estrutura química dos corantes xantênicos e do corante <i>Sirius Red</i> . . . . .	6
Figura 4 – Representação da configuração experimental do considerado primeiro espectrômetro de lente térmica. F são fotodetectores, E são espelhos, <i>beam splitter</i> é um divisor de feixe e as íris utilizadas para selecionar o modo de propagação do feixe TEM00, (adaptado de J. P. Gordon e colaboradores [5]). . . . .	9
Figura 5 – Esquema da configuração extracavidade para a técnica de lente térmica utilizada por Hu e Whinnery [51]. . . . .	10
Figura 6 – Posição da amostra no modo descasado, $w_{0p}$ é a cintura do feixe de prova, $w_{0e}$ é a cintura do feixe de excitação, $Z_{0p}$ é o parâmetro ou distância confocal do feixe de prova, $Z_1$ é a distância da cintura do feixe de prova até a amostra, $Z_2$ é a distância da amostra até o fotodetector e $w_{1p}$ é o raio do feixe de prova na amostra. . . . .	11
Figura 7 – Representação gráfica da montagem experimental da técnica de lente térmica no modo descasado e colinear (adaptado V. G. Camargo, 2015). . . . .	12
Figura 8 – Sinal de Lente Térmica: (a) se $ds/dT$ for negativo (lente divergente); (b) se $ds/dT$ for positivo (lente convergente (adaptado A. M. Freitas, 2010). . . . .	12
Figura 9 – Transientes característicos de LT: a) somente contribuição térmica; b) com o efeito de fotodegradação afetando a absorção óptica e c) contribuição de lente térmica e de lente de concentração. . . . .	15
Figura 10 – Montagem experimental de lente térmica no modo colinear utilizada neste trabalho. . . . .	21
Figura 11 – Gráfico dos perfis do laser de prova (vermelho) e do feixe de excitação (verde). . . . .	22
Figura 12 – Gráficos dos transientes de LT para diferentes valores de potência do laser de excitação. . . . .	25
Figura 13 – Gráfico das absorbâncias dos corantes xantenos, na concentração de $1,5625\mu M$ . . . . .	27
Figura 14 – Espectros de absorção dos corantes estudados em quatro concentrações diferentes. . . . .	28

Figura 15 – Absorbância em função da concentração para os corantes xantenos e para o corante <i>Sirius Red</i> estudados em $\lambda = 514nm$ . . . . .	29
Figura 16 – Gráficos dos transientes de LT com o ajuste do modelo Shen-Pedreira. Nos transientes apresentados as linhas sólidas vermelhas representam o ajuste dos dados experimentais. . . . .	30
Figura 17 – Gráfico do transiente da Água Milli-Q. . . . .	31

# Lista de tabelas

Tabela 1 – Fotossensibilizadores aprovados ou em fase de testes clínicos no tratamento de cânceres [1]. . . . .	4
Tabela 2 – Quantidade de corante usada para preparação das amostras e sua correspondente massa molar. . . . .	19
Tabela 3 – Valores das concentrações, volumes e água utilizadas na preparação dos corantes. . . . .	19
Tabela 4 – Parâmetros utilizados na configuração da Espectroscopia de Lente Térmica. . . . .	23
Tabela 5 – Parâmetros obtidos dos corantes xantenos estudados. A incerteza está relacionada à variação obtida em duas medidas independentes feitas para cada amostra. . . . .	32

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Terapia Fotodinâmica</b>	<b>3</b>
1.1.1	Fotossensibilizadores	4
<b>1.2</b>	<b>Corantes Xantênicos</b>	<b>5</b>
1.2.1	Fluoresceína	6
1.2.2	Rosa de Bengala	7
1.2.3	Eosina Y	7
1.2.4	Eritrosina B	7
<b>1.3</b>	<b>Corante <i>Sirius Red</i></b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos Históricos</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Formação da Lente Térmica</b>	<b>11</b>
2.2.1	Variação do caminho óptico e a diferença de fase do feixe de prova	13
2.2.2	Perfil de Temperatura	15
2.2.3	Considerando o Efeito de Fotorreação	16
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Configuração da Espectroscopia de Lente Térmica</b>	<b>19</b>
3.1.1	Parâmetros da montagem de LT	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>

# 1 Introdução

A incidência de luz na matéria faz com que haja uma aparição de diversos efeitos como variação na temperatura, deformação térmica, variação da absorção e emissão, efeitos fotoquímicos, entre outros [1]. O monitoramento dessas modificações pode fornecer informações das propriedades físicas do material, efeitos esses que podem ser observados incidindo um feixe de laser num dado material com uma determinada intensidade. Quando aumentada a intensidade do feixe de laser podem ser observados efeitos não reversíveis como, vaporização e fusão. Esse tipo de interação luz-matéria pode ocorrer em materiais sólidos, líquidos e gasosos [2].

O princípio da interação da radiação com a matéria se baseia na transformação de parte da energia transportada por uma onda eletromagnética (luz) em energia térmica, que gera um aquecimento no material que foi exposto à radiação, sendo esse fenômeno conhecido como efeito fototérmico. Este efeito é de grande interesse para análises das propriedades termo-ópticas de um dado material. Existem várias técnicas que são baseadas nos efeitos induzidos pela absorção da luz [3, 4], sendo seguidos por processos de relaxação de estados excitados, resultando em um incremento da energia interna. Uma dessas técnicas é conhecida como Espectroscopia de Lente Térmica (ELT) que faz o uso de lasers para o estudo de processos fotofísicos de fotossensibilizadores, permitindo que a luz possa ser focalizada em pequenos volumes causando uma ampliação no sinal fototérmico por conta de sua alta potência e pureza espectral, além de seu comprimento de onda emitido apresentar uma largura de banda pequena [2]. Neste trabalho utilizaremos a ELT para a caracterização da família de corantes xantenos.

Um feixe de laser é composto pelo mesmo tipo de luz emitida pelo sol, possuindo propriedades bem definidas. Essa luz que é emitida pelo laser é confinada em uma pequena região do espaço que forma um cilindro em torno do seu eixo de propagação. Quando se utiliza um laser com perfil de intensidade gaussiana, este cilindro possui uma distribuição radial de intensidade com perfil gaussiano. A interação desse modo do feixe laser com a matéria induz um gradiente de temperatura, o qual modifica localmente o índice de refração, com um formato semelhante a uma lente. Essa é a origem do nome atribuído à técnica, espectroscopia de lente térmica [3].

O efeito de Lente Térmica foi primeiramente observado por Gordon e seus colaboradores em 1964 [5], quando os pesquisadores notaram uma mudança de divergência do feixe na saída das amostras transparentes na cavidade do laser, nesse caso um laser de He-Ne, e também notou-se transientes de potência. Gordon então propôs uma teoria descrevendo o efeito: quando um feixe de laser passa através de um material com uma absorção óptica

finita, o calor gerado causa um aumento na temperatura da amostra e muda o seu índice de refração, o qual por sua vez afeta a propagação do feixe óptico [6]. Essa dependência do índice de refração com a temperatura, devido à absorção da energia de um laser, provoca uma mudança não uniforme no caminho óptico, fazendo com que o material atue como uma lente, podendo ser convergente ou divergente (dependendo de suas propriedades).

A técnica de Lente Térmica (LT) caracteriza-se pela geração e detecção de um gradiente de índice de refração na amostra após ela ser irradiada por um feixe de laser, assim é possível detectar a variação do caminho óptico induzido pela absorção localizada do feixe de laser. O principal papel da técnica de LT é a obtenção das propriedades térmicas e ópticas das amostras. Por conta de algumas outras propriedades, ela tem sido bem atrativa [3, 4], sendo elas: o caráter remoto, o qual possibilita o controle da temperatura durante o processo de medidas; a técnica é resolvida no tempo, o que permite a determinação de propriedades dinâmicas da amostra; o caráter quase não destrutivo, já que apenas um pequeno volume da amostra é exposto à excitação do feixe de laser. Com isso conclui-se que a técnica de LT apresenta vantagens ao ser comparada com a espectroscopia convencional, visto que sua densidade de energia é maior do que outras fontes de luz, sendo também altamente sensível, o que permite analisar amostras em concentrações micromolar e nanomolar [7].

Como somente uma fração de luz absorvida pelo material terá influência no efeito de LT, ou seja, o efeito independe da quantidade de luz que foi espalhada ou refletida, a técnica ELT é considerada um método quantitativo na detecção de propriedades termodinâmicas, químicas e ópticas e pode ser aplicada em amostras líquidas e sólidas. O estudo dos transientes gerados pela técnica podem fornecer parâmetros como o coeficiente de difusão de massa e de fotorreação, e taxas que revelam a ocorrência de reações fotoquímicas [7–9]. A amplitude do sinal obtido é uma função do coeficiente de absorção, coeficiente de variação térmica do índice de refração, eficiência quântica de fluorescência, coeficiente de expansão térmica, entres outros, dependendo do tipo de material que está sendo estudado.

Sistemas físicos que apresentam uma reação fotoquímica podem ser estudados pela espectroscopia de lente térmica. Esses tipos de amostras exibem espécies fotoativas da qual a interação com a radiação incidente se alteram, por meio de complexos mecanismos, de modo a alterar os valores da absorção óptica, e conseqüentemente o sinal de LT. Com o uso de modelos teóricos que levam em conta este tipo de efeito, é possível determinar e analisar propriedades qualitativas e quantitativas com relação à fotodegradação dessas espécies. Recentemente demonstrou-se que o efeito de fotodegradação produz transientes bem característicos na ELT, tornando a técnica de LT uma ferramenta auxiliar na caracterização fotoquímica de materiais fotossensíveis, os quais apresentam alto potencial para serem utilizados na Terapia Fotodinâmica (TFD) [10].

## 1.1 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é um conjunto de técnicas e procedimentos utilizados em tratamentos de doenças epidérmicas e diversos tipos de câncer, sendo sua base formada pela combinação de materiais fotossensíveis com a luz. A TFD consiste na ativação de um composto fotossensibilizador (FS) por meio da absorção de luz, fazendo com que o material chegue ao seu estado excitado. Uma vez excitado, o fotossensibilizador pode danificar substratos biológicos por dois principais mecanismos fotoquímicos de ação fotodinâmica, sendo ações do tipo I e do tipo II, como ilustrado na Figura 1 [11]. O processo de relaxação pode ser pela emissão de luz, geração de calor ou transferência de energia para outras moléculas. Na presença de oxigênio molecular, esse processo pode gerar espécies reativas de oxigênio, principalmente o oxigênio singlete [1]. Essas espécies reativas de oxigênio são responsáveis pela morte das células, pois possuem potencial de danificar o meio biológico.

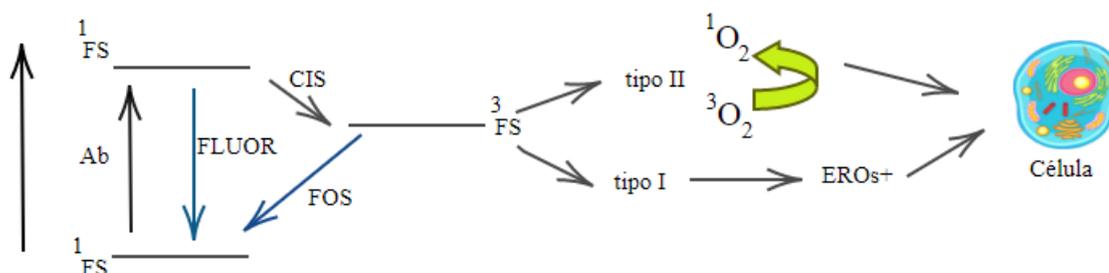


Figura 1 – Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismos de ação em TFD tipo I e tipo II (EROs são as espécies reativas de oxigênio), (Adaptado de D. S. Pellosi, 2012 [12].)

Os mecanismos apresentados no esquema acima descrevem o processo da geração das espécies reativas do oxigênio (EROs). A ação do tipo I está relacionada com as transferências de elétrons ou a abstração de um átomo de hidrogênio entre o FS excitado e um substrato, gerando radicais livres. Estes reagem com o oxigênio para formar então as espécies reativas como ânions superóxidos, radicais hidroxila, entre outros. Já na ação do tipo II, o FS transfere sua energia diretamente para o oxigênio molecular no estado fundamental tripleto ( $O_2^3$ ) gerando o oxigênio excitado singlete ( $O_2^1$ ), espécie que é de altíssima reatividade [13].

Ambos processos (tipo I e tipo II) são de interesse na TFD e também ambos levam à morte celular, seja por apoptose, relacionada ao tipo I, ou por necrose, relacionada ao tipo II. Entretanto, o mecanismo normalmente admitido como principal passa pela geração do oxigênio singlete como espécie citotóxica [13].

Em consequência da alta reatividade e o pequeno tempo de vida das EROs, apenas os substratos biológicos que estão próximos de onde são produzidas as EROs serão afetados pela TFD. Dessa maneira, a localização do FS se torna um fator importante.

Assim, para eficácia do tratamento fotodinâmico, o fotossensibilizador precisa apresentar algumas características específicas, como sua pureza química, eliminação rápida dos tecidos, seletividade de localização no tecido alvo, alto rendimento quântico para geração das espécies reativas de oxigênio ou calor, baixa toxicidade na ausência de luz [14].

Para se conseguir um melhor resultado da técnica de TFD é importante ter conhecimento dos mecanismos de fotoativação dos fotossensibilizadores, que são dependentes de vários fatores como: temperatura, concentração, pH e tipo de solvente [1], e das suas propriedades físico-químicas.

### 1.1.1 Fotossensibilizadores

Como citado anteriormente, para a aplicação da TFD é necessário um FS o mais próximo do ideal. Neste sentido, muito esforço tem sido empregado para que os FS sejam melhores caracterizados quanto à sua eficiência e seletividade. Entre as características que são interessantes para um bom FS, destacam-se: uma alta absorção de luz na janela fototerapêutica (600-800 nm); características fotofísicas favoráveis (alto rendimento quântico de estados tripletos e singletos); baixa citotoxicidade no escuro; maior afinidade no tecido tumoral em detrimento ao tecido saudável [15, 16]. Entre tantas características para se ter um bom FS, se destaca a a afinidade com biomembranas.

As membranas biológicas que são constituídas principalmente de lipídeos e proteínas, são os principais alvos da destruição foto-induzida [17].

Devido a todas propriedades fotoquímicas citadas anteriormente, apenas alguns FS são aprovados globalmente e estão em uso clínico. Na Tabela 1 estão apresentados alguns desses FS aprovados ou em teste clínico no tratamento de câncer.

Fotossensibilizador (FS)	Família	$\lambda(nm)$	Câncer
Derivado da hematoporfirina (Photofrin)	Porfirina	630	Pulmão, esôfago, etc.
5-ALA: 5- ácido aminolevulínico (Levulan)	Precursor porfirina	630	Pele, bexiga, etc.
h-ALA:L aminolevulinato de hexilo (Hexvix)	Precursor porfirina	Luz branca	Célula basal.
BDP: derivado da benzoporfirina (Visudyne)	Porfirina	690	Pâncreas e seios.
<i>Fimaporfin</i> , <i>disulfonated tetraphenyl chlorin</i> , <i>TPCS2a (amphiox)</i>	Clorina	633	Câncers superficiais.
<i>Motexafin lutetium (Lutex)</i>	<i>Texaphyrin</i>	732	Seios.

Tabela 1 – Fotossensibilizadores aprovados ou em fase de testes clínicos no tratamento de cânceres [1].

## 1.2 Corantes Xantênicos

No final do século XIX, os xantênicos eram utilizados na aplicação de tingimento de roupas. Porém ao longo do tempo foi se percebendo que devido à exposição das roupas à luz, elas iam perdendo sua coloração, ocorrendo um fotobranqueamento. Devido a isso deixaram de ser utilizados com essa finalidade. A atividade fotodinâmica contra microorganismos foi descoberta acidentalmente pelo cientista Oscar Raab através de observações feitas sobre a interação da Eosina Y com a luz [18]. Atualmente esses compostos xantênicos têm sido empregados de diversas maneiras por apresentarem uma alta capacidade de gerar oxigênio singleto e serem solúveis em meio aquoso.

Os corantes xantenos são compostos orgânicos que possuem uma estrutura química formada por dois anéis benzênicos unidos por um átomo de carbono e um átomo de oxigênio, que formam assim a estrutura tricíclica, como ilustrada na Figura 2.

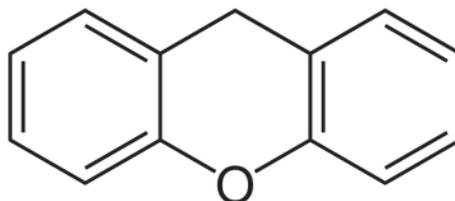


Figura 2 – Estrutura química característica dos xantenos.

Essa estrutura base constitui o esqueleto de vários compostos, como podemos observar na Figura 3. Dentre eles temos a Eosina (EOS), Eritrosina (ERY), Rosa de Bengala (RB) e Fluoresceína (FLUO). Estes corantes possuem uma tendência fluorescente apresentando cores fortes que cobrem boa parte do espectro visível. As propriedades desses corantes são extremamente dependentes de sua estrutura e forma protolítica, podendo apresentar quatro formas diferentes como: catiônica ( $FH_3^+$ ), neutra ( $FH_2$ ), monoaniônica ( $FH^-$ ), e dianiônica ( $F^{2-}$ ), dependendo do solvente utilizado e do pH. Na figura 3.e temos o corante *Sirius Red* (SR), o qual será utilizado como corante controle por apresentar absorção na mesma região e não ter fotoatividade aparente.

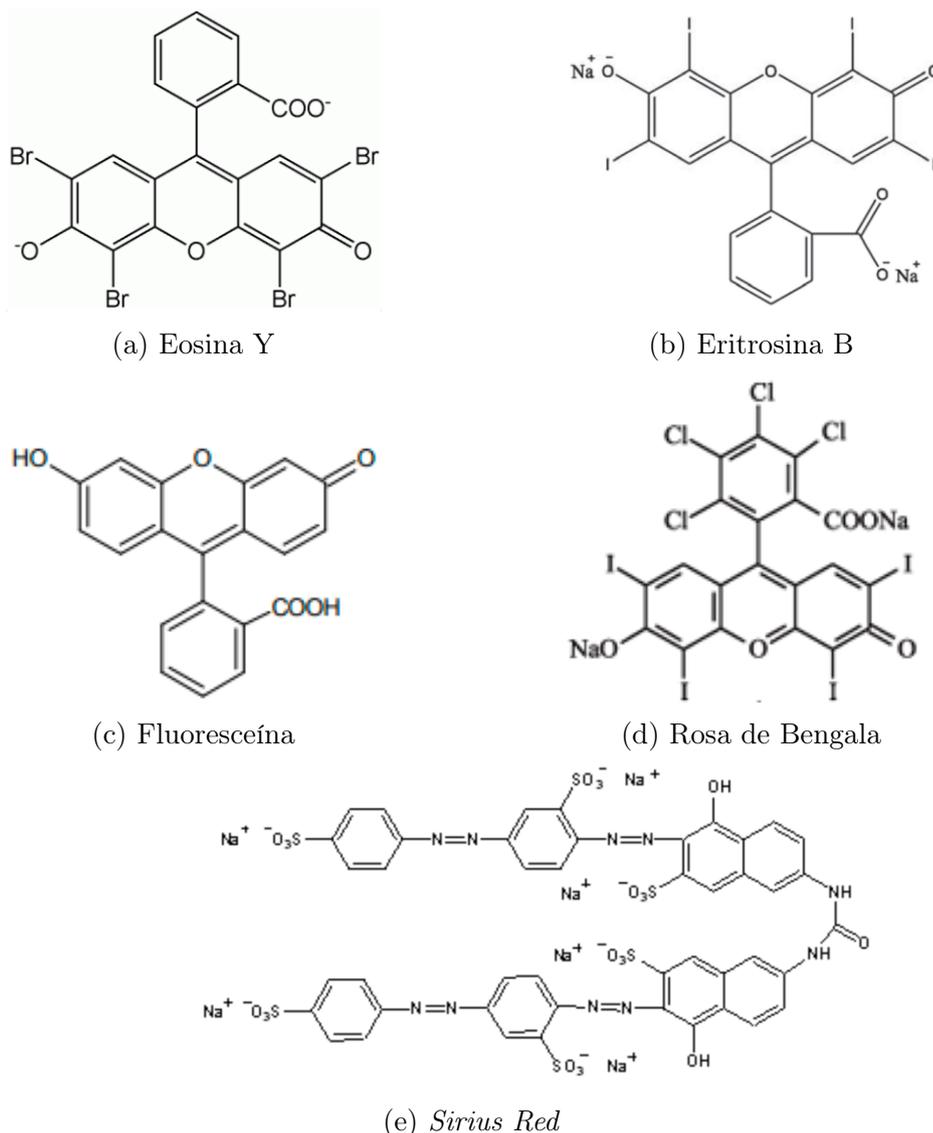


Figura 3 – Estrutura química dos corantes xantênicos e do corante *Sirius Red*.

Nesta classe de corantes xantenos citados anteriormente, o anel benzênico e o anel xantênico são ortogonais entre si [19]. Em consequência dessa ortogonalidade existe uma pequena sobreposição de orbitais moleculares entre os dois anéis, logo a ressonância eletrônica não é muito efetiva, o que acaba tornando cada um dos anéis independente um do outro [20]. Desse modo, na absorção de luz o elétron excitado ficaria confinado na parte xantênica, de forma que todos os processos fotofísicos e fotoquímicos resultantes devem-se à parte xantênica dos corantes [21]. A seguir faremos uma descrição um pouco mais detalhada de cada corante utilizado neste trabalho.

### 1.2.1 Fluoresceína

A Fluoresceína (FLUO) por conta de ter um coeficiente de absortividade molar elevado e ter propriedades fluorescentes é utilizada em diversas áreas da indústria, da medicina e da ciência [22, 23]. Quando está com um pH levemente alcalino a FLUO

está presente em sua forma dianiônica com um rendimento quântico de fluorescência elevado [24].

Este tipo de corante destaca-se no uso como contraste na detecção de doenças oculares por meio do exame chamado angiografia, por conta da sua alta capacidade de acumulação no sistema vascular do olho [25].

### 1.2.2 Rosa de Bengala

A Rosa de Bengala (RB) é um haleto derivado da fluoresceína e tem sido utilizada na oftalmologia como um corante para diagnóstico de várias doenças externas ao olho. Ela é capaz de matar micro-organismos, como, vírus, bactérias e protozoários, além de induzir efeitos fotodinâmicos.

Em um ambiente aquoso que contenha nucleotídeos, o mecanismo fotodinâmico da rosa de bengala sob uma irradiação em 532nm é predominantemente do tipo II, gerando 80% de oxigênio singlete e 20% ânion superóxido [26, 27].

### 1.2.3 Eosina Y

A Eosina Y (EOS) é um derivado halogenado do corante fluoresceína, conhecida por ser uma poderosa sonda de moléculas biológicas e um agente fotossensibilizador eficiente para produção de oxigênio singlete. Suas aplicações estão na detecção de quantidades sub-microgramas de uma ampla gama de proteínas [28, 29], no uso de células solares sensibilizadas com corante [30–33], inativação fotodinâmica de vírus e células, e fototerapia para câncer [34–36]. Possui propriedades fluorescentes altamente dependentes das variações em seu ambiente [37–41], como a polaridade do solvente e a presença de tensoativos catiônicos. Essa dependência fluorescente do ambiente torna este corante uma poderosa sonda de moléculas biológicas.

A degradação por fotobranqueamento é uma das características da EOS e outros xantenos, especialmente em meios com presença de oxigênio. Como a técnica de LT utiliza uma excitação laser com densidade de energia bem localizada, foi verificado que a técnica pode ser utilizada no estudo do processo de fotodegração destes compostos [42]. Por exemplo, pode-se obter informações quantitativas sobre a taxa de fotodegração e a eficiência quântica de fluorescência.

### 1.2.4 Eritrosina B

A Eritrosina B (ERY) é utilizada na coloração de célula como contraste [43], corante de alimentos (por ter uma coloração vermelha) [44, 45], e também para corar o agente etiológico das doenças orais comuns (placa dentária). Na área odontológica a eritrosina é

aplicada como evidenciador de biofilme dental para caracterização de cárie. Esse corante tem vantagem sobre outros fotossensibilizadores por ter aprovação para uso na boca.

Primeiramente a ERY foi sintetizado por Muhlhauser em 1886 a partir da halogenação direta da FLUO em solução diluída de ácido acético com excesso de iodo [46]. Assim, como a fluoresceína, por conta da similaridade estrutural, como observa-se na Figura 3, a ERY também poderia ser usada na detecção de doenças oculares. Por esse corante também ser um bom gerador de EROs poderia casualmente exercer função fotodinâmica para combater doenças. Em adição, por ser um corante relativamente barato pode-se tornar o tratamento mais acessível.

### 1.3 Corante *Sirius Red*

O *Sirius Red* é um corante ácido utilizado em histologia para a coloração de fibras de colágenos (tendo afinidade para fibras que são coradas em vermelho) e em outros tecidos, tais como músculos e ossos. Ele é um corante usado como controle para os outros, pois não apresenta fotoatividade e nem fluorescência. É específico para o uso em fatias de tecido para determinar o conteúdo de colágeno e distribuir os tipos de colágeno I e III em alguns estudos. Moratta e colaboradores [47] relataram pela primeira vez o método colorimétrico com o *Sirius Red* para a estimativa quantitativa do colágeno. Zou e colaboradores [48] relataram que quanto mais energia térmica for fornecida para a desnaturação do colágeno, menor será o valor de absorção medido pelo corante. Este corante, por não apresentar nenhuma fotoatividade, será utilizado como nossa amostra controle.

No capítulo seguinte iremos fazer uma breve descrição da técnica de LT e dos modelos utilizados no estudo de fotorreação.

## 2 Espectroscopia de Lente Térmica

As técnicas fototérmicas englobam um grupo de técnicas de alta sensibilidade utilizadas para medida de propriedades térmicas e ópticas de diversos materiais. A base dessas técnicas consiste na absorção óptica seguida de um processo de relaxação dos estados excitados, o qual resulta em uma variação da energia interna, gerando uma variação de temperatura. Dentre essas diversas técnicas destacam-se, a espectroscopia fotoacústica, e especialmente a espectroscopia de lente térmica (ELT).

### 2.1 Aspectos Históricos

Durante um experimento de espalhamento Raman em líquidos, em que uma cubeta contendo diferentes solventes orgânicos era inserida na cavidade de um laser de Hélio-Nônio (He-Ne), conforme representada na Figura 4, Gordon e seus colaboradores [5] observaram a divergência do feixe de laser e um decaimento no transiente de potência. Utilizando esse efeito, que foi denominado efeito lente térmica, calcularam o coeficiente de absorção óptica de solventes orgânicos puros [49].

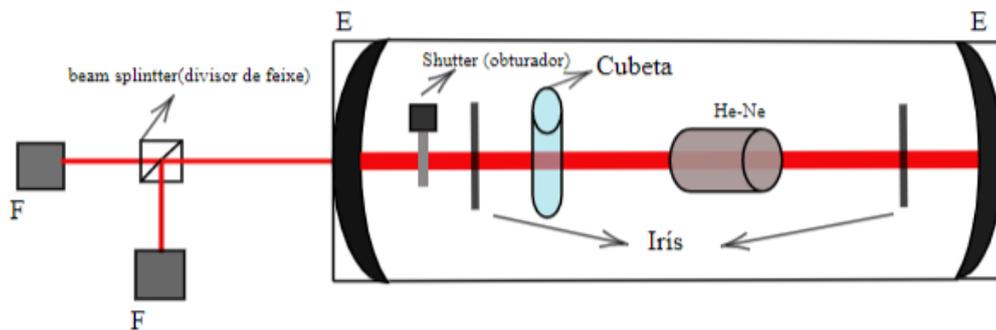


Figura 4 – Representação da configuração experimental do considerado primeiro espectrômetro de lente térmica. F são fotodetectores, E são espelhos, *beam splitter* é um divisor de feixe e as íris utilizadas para selecionar o modo de propagação do feixe TEM<sub>00</sub>, (adaptado de J. P. Gordon e colaboradores [5]).

Contudo, esta montagem inicial apresentava limitações quanto ao alinhamento da amostra, levando a dificuldade de reprodutibilidade dos resultados. Futuramente, foi realizado medidas extracavidade por Rieckhoff [50], que observou o raio de um feixe laser aumentar após atravessar uma cubeta com solventes orgânicos, sendo mais uma vez reforçado a característica de lente deste efeito. A introdução de uma lente focalizadora à montagem extracavidade foi utilizada em 1973 por Hu e Whinnery [51], no qual mostraram que ao se posicionar a amostra após a posição da cintura gerada no feixe pela adição da lente, a detecção do efeito de lente térmica seria realizado com maior sensibilidade.

Outra modificação que fizeram foi utilizar um *pinhole* em frente ao fotodetector, assim a divergência do feixe poderia ser provada monitorando a intensidade na posição central do feixe, conforme a Figura 5.

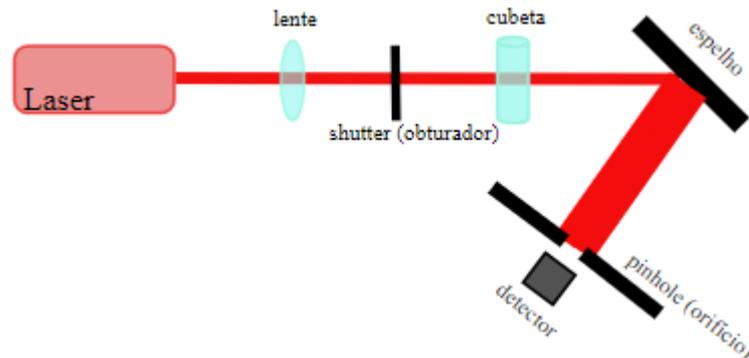


Figura 5 – Esquema da configuração extracavidade para a técnica de lente térmica utilizada por Hu e Whinnery [51].

Em sequência, outros autores trabalharam no aperfeiçoamento da técnica. Podemos destacar entre eles os trabalhos de J. Shen e colaboradores em 1992 [52], no qual desenvolveram um modelo que consiste em utilizar dois feixes luminosos, cada um (feixe de prova, e feixe de excitação) possuindo um raio diferente na posição da amostra, sendo o laser de prova com uma baixa potência e com maior diâmetro na amostra. O laser de excitação mais intenso e focado para provocar a variação na temperatura, e assim gerar o efeito. Esse modo é conhecido como configuração no modo descasado, nele os dois feixes possuem diâmetros diferentes da amostra, sendo encontrada na cintura do feixe de excitação, como ilustra a Figura 6, e a uma distância  $Z_1 = \sqrt{3}Z_c$  da cintura do feixe de prova,  $Z_c$  ou  $Z_{0p}$  é o parâmetro ou distância confocal do feixe de prova [52].

Dentre as configurações de lente térmica, a configuração descasada é atualmente a mais utilizada por conta de sua maior sensibilidade e flexibilidade, e por não depender de divisores de feixes. A Figura 7 representa um exemplo desta configuração experimental de lente térmica. Este novo modelo da técnica poderia ser utilizado para realizar medidas em estado estacionário ou resolvido no tempo.

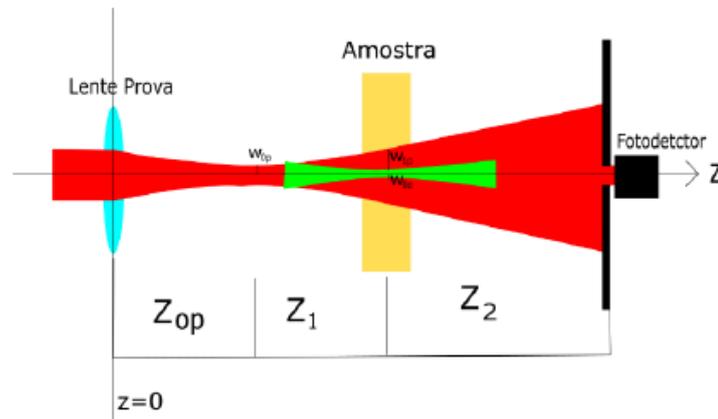


Figura 6 – Posição da amostra no modo descasado,  $w_{0p}$  é a cintura do feixe de prova,  $w_{0e}$  é a cintura do feixe de excitação,  $Z_{0p}$  é o parâmetro ou distância confocal do feixe de prova,  $Z_1$  é a distância da cintura do feixe de prova até a amostra,  $Z_2$  é a distância da amostra até o fotodetector e  $w_{1p}$  é o raio do feixe de prova na amostra.

Por meio desta técnica conseguimos monitorar a intensidade do feixe que passa pela amostra utilizando um fotodiodo. Quando incidido o feixe de excitação na amostra, começamos a medir a variação dessa intensidade em função do tempo, obtendo assim dados que nos fornecem informações quantitativas sobre algumas propriedades da amostra.

## 2.2 Formação da Lente Térmica

A Lente Térmica (LT) é formada quando um laser com perfil de intensidade gaussiano (laser de excitação) induz uma variação local da temperatura. Esse aquecimento induz um gradiente no índice de refração, podendo também gerar *stress* e deformação no caso de amostras sólidas. O segundo feixe (laser de prova), também de perfil gaussiano, e centralizado com o laser de excitação na região aquecida, irá provar o efeito. Em geral o laser de prova é escolhido com um comprimento de onda que não gere efeito adicional na amostra. O gradiente de variação do caminho óptico induzido gera o efeito similar a de uma lente, o qual fará o feixe de prova divergir ou convergir, dependendo da amostra a ser estudada.

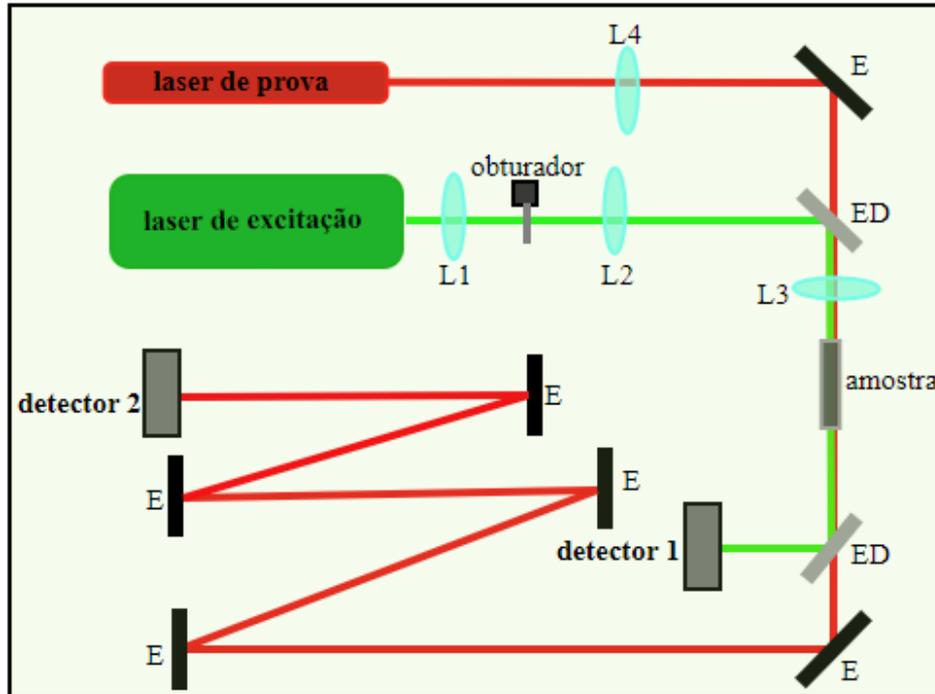


Figura 7 – Representação gráfica da montagem experimental da técnica de lente térmica no modo descasado e colinear (adaptado V. G. Camargo, 2015).

A convergência do feixe está relacionada ao coeficiente de variação do caminho óptico com a temperatura  $ds/dT$ . Quando  $ds/dT$  for positivo a lente formada é convergente, e quando negativo a lente formada é divergente. Pela análise da intensidade da radiação que chega ao detector é possível obter propriedades termo-ópticas do material, como a difusividade térmica, condutividade térmica, eficiência quântica de fluorescência, o coeficiente de variação do caminho óptico ( $ds/dT$ ), entre outros. A Figura 8 representa o caso teórico do sinal de LT para os casos de lentes convergentes e divergentes.

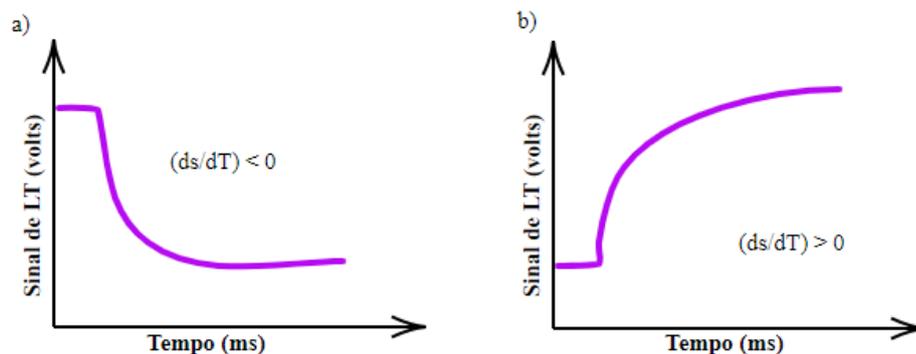


Figura 8 – Sinal de Lente Térmica: (a) se  $ds/dT$  for negativo (lente divergente); (b) se  $ds/dT$  for positivo (lente convergente) (adaptado A. M. Freitas, 2010).

No caso de líquidos e gases, estes são estudados em recipientes que não absorvem a radiação incidente, podendo ser considerado que  $ds/dT = dn/dT$ . O fluxo de calor gerado na região iluminada pelo laser resulta em um gradiente térmico que é proporcional à

distribuição de intensidade do laser na amostra. O coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) varia para os diferentes tipos de materiais, sendo em geral negativo para gases e líquidos, e positivo para sólidos [2].

### 2.2.1 Variação do caminho óptico e a diferença de fase do feixe de prova

A mudança do caminho óptico está relacionado a dois fatores: ao índice de refração e à espessura da amostra. Considerando um feixe com simetria axial propagando na direção  $z$ , podemos definir o caminho óptico,  $S(r, t)$ , como sendo

$$S(r, t) = \int_{u_z(r, 0, t)}^{L+u_z(r, L, t)} n(r, z, t) dz, \quad (2.1)$$

sendo, nessa expressão,  $n(r, z, t)$  o índice de refração do material que sofre os efeitos induzidos pelo laser de excitação,  $L$  sendo a espessura da amostra antes de ser perturbada, e  $u_z$  é a componente do vetor deslocamento induzido pelos efeitos termoelástico da amostra, no caso de líquidos confinado em uma espessura fixa  $u_z = 0$ .

A variação do caminho óptico causa uma distorção, mesmo que pouca, das frentes de onda do feixe. Assim, essa distorção pode ser considerada como uma diferença de fase dada por

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

na qual,  $\lambda_p$  é o comprimento de onda do feixe de prova.

Como mostrado na Figura 6, na LT monitoramos a intensidade do centro de um feixe de prova de perfil gaussiano. A amplitude do campo elétrico do centro do feixe, na posição do fotodetector, é dada pela relação

$$U(Z_1 + Z_2, t) = C_1 \int_0^\infty e^{-(1-V)g - i\Phi(g, t)} dg \quad (2.3)$$

com  $g = (r/w_{1p})^2$ ,

$$C_1 = B[i\pi w_{1p}^2 / (\lambda_p Z_2)] e^{-2i\pi Z_2 / \lambda_p}, \quad (2.4)$$

e

$$V = \frac{Z_1}{Z_c} + \frac{Z_c}{Z_2} \left[ 1 + \left( \frac{Z_1}{Z_c} \right)^2 \right]. \quad (2.5)$$

$w_{1p}$  é o raio do feixe de prova na amostra,  $Z_1$  é a distância da cintura do feixe de prova até a amostra,  $Z_c$  é a distância confocal do feixe de prova e  $Z_2$  é a distância da amostra até o fotodetector, como representado na Figura 6.

A intensidade central do feixe de prova na posição do fotodetector é descrita pela relação,

$$I(t) = \left| \int_0^\infty e^{-(1+iV)g} e^{-i\Phi(g,t)} dg \right|^2. \quad (2.6)$$

Para amostras líquidas, as quais há uma mudança na solução causada pelo laser de excitação, pode-se ter contribuições da variação do índice de refração devido à variação na concentração das substâncias da amostra. Assim, podemos escrever essa variação de fase na amostra como,

$$\Phi(r, t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \int_0^l \left[ \frac{dn}{dT} T(r, t) + \frac{dn}{dC_r} C_r(r, t) \right] dz, \quad (2.7)$$

na qual,  $T(r, t)$  equivale-se ao gradiente de temperatura, e  $C_r(r, t)$  ao gradiente de concentração induzido pelo feixe de excitação,  $dn/dT$  é o coeficiente térmico do índice de refração, e  $dn/dC_r$  é o coeficiente de concentração do índice de refração para o comprimento de onda do feixe de prova  $\lambda_p$ .

Em muitos casos, o termo  $dn/dC_r$  é pequeno comparado com a contribuição térmica, de modo que é possível desprezar o último termo na expressão da fase [53]. A foto-modificação na amostra quando altera o coeficiente de absorção óptica, mesmo que  $dn/dC_r$  seja desprezível, induz efeito característico no sinal de LT visto que a taxa de geração de calor fica dependente do tempo.

Os efeitos relacionados à contribuição da lente de concentração envolve a difusão de massa, a qual tem um tempo característico maior que o térmico. Desta forma, uma maneira de detectar a contribuição desse efeito no sinal de LT é monitorar o transiente durante e depois do laser de excitação incidir na amostra, denominado de transiente *On-Off* [9].

Na Figura 9 observamos transientes característicos de LT, na Figura 9.a temos um transiente onde somente o efeito térmico contribui para o transiente. Pode-se notar que o processo de geração e o processo de relaxação, do efeito térmico, após o laser ser desligado (*laser-Off*) são similares. Na Figura 9.b é possível observar o sinal quando há presença de fotodegradação da amostra, notando uma diminuição na amplitude de sinal durante o período de excitação, o qual é explicado pela diminuição da absorção óptica devido ao efeito de fotorreação, porém o processo de relaxação é puramente térmico. Na Figura 9.c nota-se que no período que o laser é desligado há um processo de relaxação que não é puramente térmico, sendo que o sinal de LT ultrapassa o valor inicial, este tipo de sinal é característico quando há uma contribuição do segundo termo da Eq. (2.7),  $dn/dC_r$ , conhecido como lente de concentração, no qual o processo de relaxação e formação depende da difusão de massa relativo as espécies modificadas pelo processo de fotorreação.

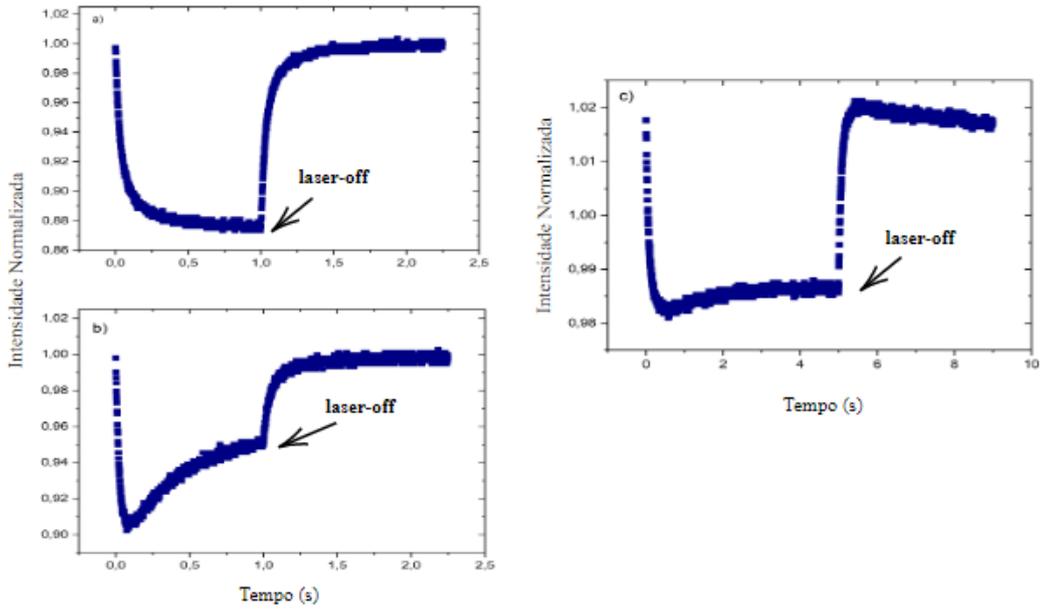


Figura 9 – Transientes característicos de LT: a) somente contribuição térmica; b) com o efeito de fotodegradação afetando a absorção óptica e c) contribuição de lente térmica e de lente de concentração.

Para descrição desses efeitos que observamos na Figura 9 é preciso descrever o perfil de temperatura e de concentração induzidos pela interação do feixe de excitação na amostra, que são descritos pela equação de difusão térmica e de massa. A seguir vamos obter a expressão da fase para o caso onde temos foto-modificação na amostra, de forma a termos uma variação no coeficiente de absorção óptica, no entanto vamos considerar que a contribuição da lente de concentração é dispersível. Os dados experimentais destes corantes são consistentes com essa aproximação, visto que os transientes “on-off” são similares ao da Figura 9.b.

### 2.2.2 Perfil de Temperatura

A equação de difusão de calor é de grande importância nos estudos da lente térmica pois nos fornece o perfil de temperatura da amostra gerado por meio do laser de excitação. O conhecimento do perfil de temperatura se faz necessário para obter o perfil do índice de refração da amostra dependente do tempo, e a correspondente variação do caminho óptico.

Devido à simetria axial, e considerando amostras de baixa absorção óptica, o perfil de temperatura em coordenadas cilíndricas fica somente dependente da coordenada radial, descrito pela equação de difusão

$$\frac{\partial T(r, t)}{\partial t} - D\nabla^2 T(r, t) = Q_0\beta(t)\exp(-2r^2/w_{0e}^2), \quad (2.8)$$

com  $Q_0 = 2P_e\phi/(\pi w_{0e}^2\rho c_p)$ .

Sendo  $P_e$  a potência do laser de excitação,  $\beta(t)$  o coeficiente de absorção óptica da amostra,  $w_{0e}$  o raio do feixe laser de excitação, e  $\phi$  a eficiência de geração de calor, ou seja, a fração de energia absorvida que gera calor na amostra. E com,  $D = k_T/\rho c_p$  sendo a difusividade térmica, com  $\rho$ ,  $c_p$  e  $k_T$  sendo a densidade, o calor específico, e a condutividade térmica da amostra, respectivamente.

Para se resolver a equação de difusão é necessário levar em conta algumas condições de contorno. Assumindo que o fluxo de calor entre o meio e a amostra é nulo e considerando que a amostra é semi-infinita (tem o raio maior do que o raio dos feixes laser), ou seja,

$$\left. \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial z} \right|_{z=0} = 0, \quad (2.9)$$

$$T(\infty, t) = 0. \quad (2.10)$$

Além disso, pode-se considerar que no tempo  $t = 0$  a temperatura na amostra é uniforme, ou seja,

$$T(r, 0) = 0. \quad (2.11)$$

Repare que a condição de  $T(\infty, 0) = 0$  é um limitante e deve ser respeitada durante a medida experimental, ou seja, o tempo da medida deve ser pequeno o suficiente para que o calor gerado não chegue nas bordas da amostra.

No caso de não haver fotorreação, ou seja  $\beta(t) = \beta_0$ , a solução analítica da equação diferencial pode ser facilmente obtida através das transformadas de Laplace, Fourier e Hankel. Com o auxílio do *software* Mathematica, ao se aplicar as transformadas e suas respectivas transformadas inversas, obtemos

$$T(r, t) = Q_0 \int_0^t \frac{\beta_0}{1 + 2\tau/t_c} e^{-\frac{2r^2/w_{0e}^2}{1+2\tau/t_c}} d\tau, \quad (2.12)$$

sendo  $t_c = w_{0e}^2/4D$ .

### 2.2.3 Considerando o Efeito de Fotorreação

Para descrever a modificação na concentração induzida pela excitação laser, vamos assumir uma reação de primeira ordem [9], na qual o processo de fotorreação é descrito como

$$C_R(0) + hv \rightarrow C_R(t) + C_p(t), \quad (2.13)$$

com vínculo que a soma da concentração do reagente,  $C_R(t)$ , e a concentração do produto gerado,  $C_p(t)$ , é constante no tempo, ou seja,  $C_R(t) + C_p(t) = C_0$ . Por conta da localidade da reação e ao perfil gaussiano do laser, a equação de difusão que descreve a variação na concentração na região excitada pelo feixe laser, é dada por

$$\frac{\partial C_R(r, t)}{\partial t} - D_m \nabla^2 C_R(r, t) = k_r \exp(-2r^2/w_{0e}^2) C_R(r, t), \quad (2.14)$$

no qual, temos que  $D_m$  é o coeficiente de difusão de massa,  $k_r$  é a taxa de fotodegradação que descreve a capacidade da espécie absorver a luz em um determinado comprimento de onda e induzir a fotomodificação da substância,  $h$  a constante de Planck, e  $v$  a frequência óptica do feixe de excitação.

O coeficiente de absorção óptica, no caso em que ocorre fotomodificação na região iluminada pode ser escrito como

$$\beta(r, t) = \beta_0[(1 - \epsilon)C_R(r, t) + \epsilon], \quad (2.15)$$

em que  $\beta_0 = \beta(r, 0)$  é o coeficiente de absorção óptica do reagente, e  $\epsilon = \epsilon_p/\epsilon_R$  é a razão entre a absorvidade molar do produto ( $\epsilon_p$ ) e do reagente ( $\epsilon_R$ ) [9]. A equação 2.14 não tem solução analítica. Uma análise utilizando a solução numérica pode ser encontrada na referência [9]. Para obtermos a solução analítica da equação utilizamos a proposta de Pedreira [6] de assumir a média espacial na equação da variação da concentração  $C_R(t) = \langle C_R(r, t) \rangle$ , de forma que a equação que descreve a variação na concentração se reduz

$$\frac{dC_R(t)}{dt} = k_R C_R(t), \quad (2.16)$$

sendo  $k_R$  a taxa média de fotodegradação e o movimento causado pela difusão molecular.

A equação acima tem como solução,

$$C_R(t) = C_0 e^{-k_R t}. \quad (2.17)$$

Desta forma, podemos escrever o coeficiente de absorção óptica como

$$\beta(t) = \beta(0)[(1 - \epsilon)e^{-k_R t} + \epsilon] \quad (2.18)$$

Com isso, é possível substituir na equação de difusão de calor, obtendo como resultado:

$$T(r, t) = Q_0 \beta_0 (1 - \epsilon) e^{-k_R t} \int_0^t e^{-k_R \tau} \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega^2}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau + \epsilon \int_0^t \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega^2}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau. \quad (2.19)$$

Podemos observar, que no caso de não haver fotorreação,  $k_T = 0$ , ou no caso que a absorção molar do produto e do reagente são iguais,  $\epsilon = 1$ , a expressão acima para a temperatura se reduz a expressão no qual  $\beta$  é uma constante, o que equivale quando não há fotorreação na amostra.

Dessa forma, podemos reescrever a expressão da contribuição térmica para fase induzida na frente de onda, usando a expressão aproximada da temperatura dada pela equação 2.19, assim temos

$$\Phi(g, t) = \frac{\theta_{TL}}{t_c} \left[ (1 - \epsilon)e^{-k_R t} \int_0^t e^{-k_R \tau} \frac{e^{-\frac{2mg}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau + \epsilon \int_0^t \frac{e^{-\frac{2mg}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau \right], \quad (2.20)$$

na qual  $m = (w_{1p}/w_{0e})^2$ ,  $g = (r/w_{1p})^2$ , sendo  $w_{1p}$  o raio do feixe de prova na posição da amostra, e  $\theta_{TL}$  a constante relacionada com a amplitude do efeito de lente térmica, temos então que o coeficiente de conversão térmica é dada por

$$\theta_{TL} = -\frac{P_e \beta_0 L \phi \, dn}{k_{th} \lambda_p \, dT}, \quad (2.21)$$

que determina a amplitude da variação da fase devido ao aquecimento da região.

### 3 Materiais e Métodos

As amostras dos corantes xantênicos (Eritrosina B, Eosina Y e Rosa de Bengala) e do *Sirius Red* foram inicialmente preparadas com uma concentração de  $25\mu M$  em Água Milli-Q. Essa solução estoque foi depois diluída até uma concentração de  $1,5\mu M$ , para realização das medidas de LT. A Tabela 2 mostra a quantidade em gramas(g) utilizada de cada corante para se obter a concentração desejada de  $25\mu M$ , e também sua massa molar(g/mol).

Corante Xantênico	Massa Molar (g/mol)	Massa (g)
Eritrosina(ERY)	879,86	0,001
Eosina(EOS)	647,89	0,001
Rosa de Bengala(RB)	973,67	0,0009
<i>Sirius Red</i> (SR)	1373,07	0,0044

Tabela 2 – Quantidade de corante usada para preparação das amostras e sua correspondente massa molar.

A preparação das amostras dos corantes foi realizada a partir da diluição de cada corante em  $10mL$  de Água Milli-Q, e calculado a partir dos dados existentes do volume final, concentração inicial e concentração final, o volume inicial utilizando-se da equação,

$$c_i \cdot v_i = c_f \cdot v_f. \quad (3.1)$$

Dessa forma, conseguimos calcular a quantidade total de água Milli-Q que precisaria ser adicionado juntamente com o volume inicial do corante diluído (já em água Milli-Q) para chegarmos na nossa concentração desejada ( $25\mu M$ ). As quantidades usadas para cada corante em preparo estão descritos na Tabela 3, sendo o volume final e a concentração final a mesma para todas as amostras. As amostras foram colocadas em frascos de vidros escuros limpos com tampa, com um volume de  $30mL$ .

Corante Xantênico	Concentração Inicial ( $\mu M$ )	Volume Inicial ( $\mu L$ )	Água Milli-Q ( $\mu L$ )
Eritrosina(ERY)	113,65	6598,0	23401,0
Eosina(EOS)	154,35	4859,0	25140,0
Rosa de Bengala(RB)	92,43	8113,0	21886,0
<i>Sirius Red</i> (SR)	320,45	2340,0	27659,0

Tabela 3 – Valores das concentrações, volumes e água utilizadas na preparação dos corantes.

#### 3.1 Configuração da Espectroscopia de Lente Térmica

A montagem experimental foi realizada na configuração de feixe duplo no modo descasado e colinear ( $\gamma = 0$ ) como ilustrado na Figura 10. Os lasers de prova e excitação

foram utilizados com emissão no regime contínuo com perfil gaussiano ( $TEM_{00}$ ). Para a excitação das amostras foi usado um laser de íons de Argônio com emissão em  $\lambda = 514nm$ , e para a prova do efeito de lente térmica foi utilizado um laser de Hélio-Neônio (He-Ne) com emissão em  $\lambda = 632,8nm$ .

Analisando os elementos presentes na montagem vemos, um “*Shutter*” que é o nosso obturador que controla o tempo de exposição do laser de excitação sobre a amostra, 4 lentes que servem para guiar o feixe até a amostra, com a L1 sendo posicionada afim de que o raio do feixe de excitação fosse minimizado na posição do “*shutter*”, fazendo com que o feixe seja interrompido o mais rápido possível. Uma segunda lente L2 foi colocada de forma que o feixe fique colimado ao atravessá-la, já a L3 foi utilizada para que se obtivesse o menor raio do feixe de excitação. Por outro lado, a L4 foi posicionada para focalizar o laser de prova fazendo com que atingisse a amostra colinearmente ao feixe de excitação.

Para conseguirmos uma montagem colinear utilizamos um espelho dicróico (ED) (representado na figura pelo espelho cinza antes e depois da L3) que reflete o feixe de excitação para a região da amostra e um outro espelho dicróico para refleti-lo para o detector 1 (conectado ao osciloscópio), utilizado como um “*trigger*”, o qual tem como função acionar a captura de dados assim que o feixe de excitação incidisse na amostra. Outros espelhos foram utilizados para guiar a propagação do feixe de prova até o detector 2 (que também está conectado ao osciloscópio para fazer a captura dos dados) com uma distância de pelo menos  $4m$ .

Os transientes de LT são coletados do detector 2 por meio de um osciloscópio digital (conectado ao fotodetector do feixe de prova). As amostras líquidas são colocadas em uma cubeta de quartzo, de  $L = 10mm$ , com tampa e posicionadas em um porta amostra. A Figura 10 representa a montagem experimental (real) na qual foram realizadas as medidas dos corantes para este trabalho.

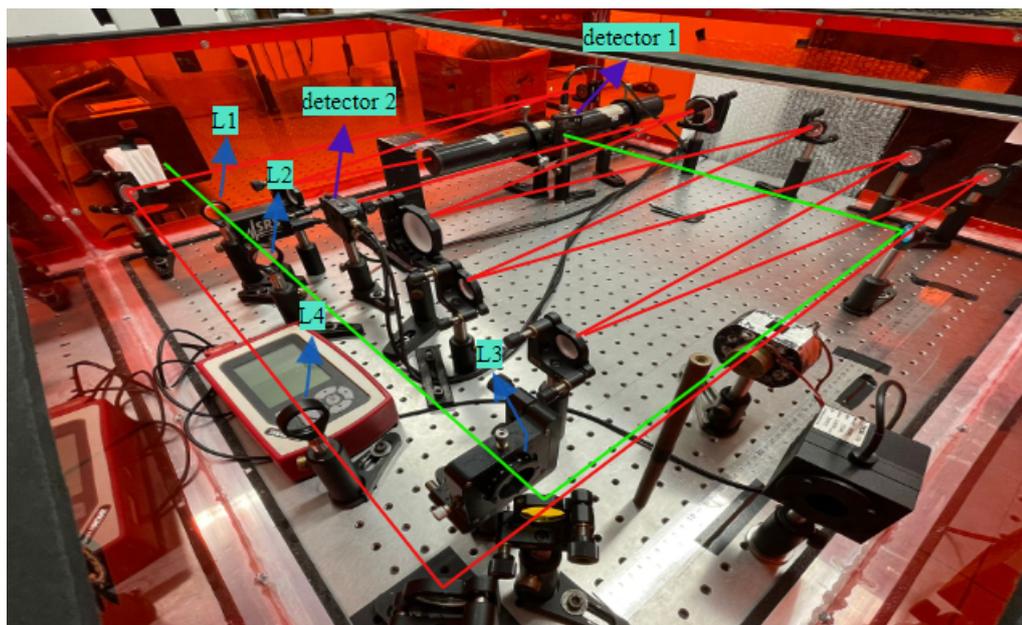


Figura 10 – Montagem experimental de lente térmica no modo colinear utilizada neste trabalho.

Para conseguirmos uma montagem de LT com uma melhor precisão dos resultados, primeiramente precisamos fazer um alinhamento dos feixes (excitação e prova), o qual pode ser feito com um solvente que conhecemos e sabemos que não apresenta nenhum efeito indesejado que não seja a lente térmica. Como amostras fotossensíveis apresentam transientes que variam a amplitude ao longo do tempo de exposição ao feixe de excitação, a montagem no modo colinear torna-se a mais efetiva para tratar amostras com essas propriedades, logo o processo de alinhamento é importante para minimizar erros.

O processo de alinhamento dos feixes é iniciado com o laser de prova por meio do movimento dos espelhos posicionados após o porta amostra, buscando uma maximização do sinal inicial de LT no osciloscópio. Em seguida é feito o alinhamento do laser de excitação através do ajuste da lente posicionada antes do porta amostra, para que se obtenha a máxima variação do sinal de LT monitorado, que é obtido quando os dois feixes estão colineares na posição da amostra.

Foram coletados transientes da concentração mais baixa obtida de  $1,5625\mu M$  através da diluição da concentração estoque citada no início do capítulo. Para cada corante foram realizadas medidas utilizando-se quatro potências distintas do laser de excitação, porém sem que ultrapassasse 25% da variação do sinal de LT, para evitar efeitos indesejados, como convecção. Para cada um dos corantes as medidas foram feitas em duplicata.

### 3.1.1 Parâmetros da montagem de LT

Vimos que para uma montagem de LT o processo de alinhamento dos feixes é importante, porém também é essencial conseguir parâmetros para que ao fazermos o ajuste

dos dados obtidos chegemos a bons resultados. Para isso, utilizamos um “*Beam Profiler*” para obter os perfis dos feixes de laser tanto do de prova quanto de excitação, sendo feito em função ao longo da direção de propagação do feixe, obtendo-se assim o raio do feixe gaussiano [53].

Podemos fazer o ajuste desses dados obtidos, para obtermos os parâmetros do perfil do laser, e analisarmos o comportamento do nosso feixe mostrado na Figura 11, através da equação,

$$w(z) = w_0 m_{00} \sqrt{1 + \frac{(z - z_0)\lambda}{\pi w_0^2}} \quad (3.2)$$

Na equação acima  $m_{00}$  representa um fator que descreve o caráter gaussiano do laser (para um feixe perfeitamente gaussiano  $m_{00}$  é igual a 1),  $z_0$  e  $w_0$  são a posição da cintura do feixe e o seu correspondente raio, e  $\lambda$  é o comprimento de onda do feixe.

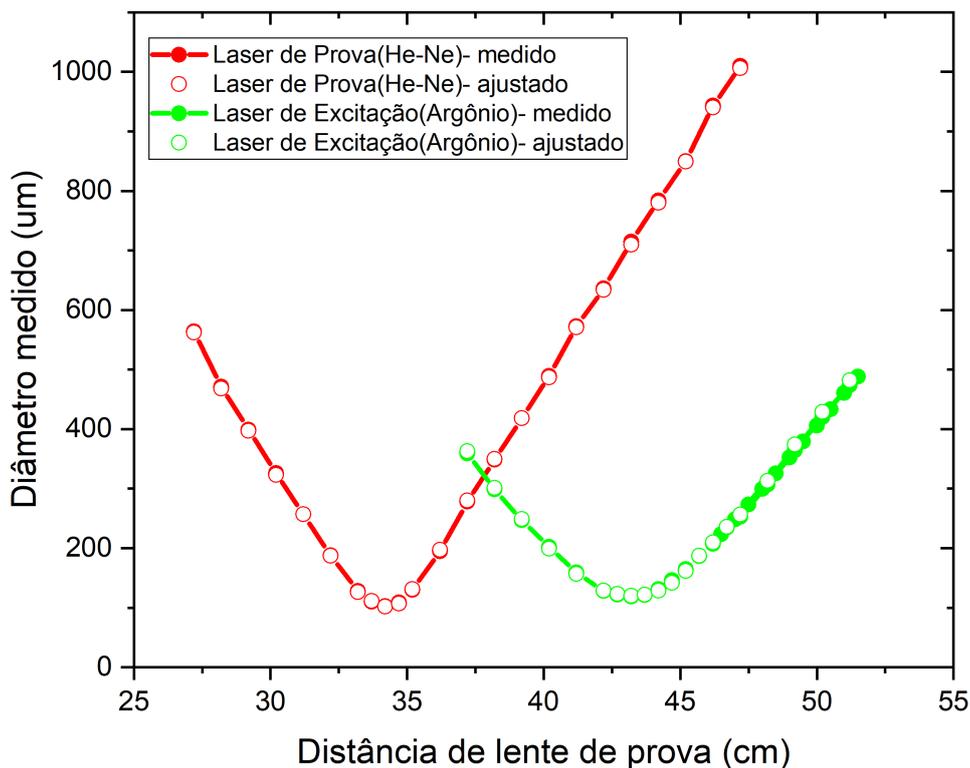


Figura 11 – Gráfico dos perfis do laser de prova (vermelho) e do feixe de excitação (verde).

Conseguimos obter outros parâmetros como a distância da cintura do feixe de prova até a amostra ( $Z_{1p}$ ), também o parâmetro  $V$  descrito pela equação (2.5) e o foco dos feixes sendo o parâmetro  $m$ .

Na Tabela 4 estão descritos os parâmetros dos feixes da montagem.

Parâmetro	Valor Medido
$m$	38,1
$V$	6,88
$w_{1p}(\mu m)$	357,5
$w_{0e}(\mu m)$	57,9
$Z_{1p}(cm)$	9,0

Tabela 4 – Parâmetros utilizados na configuração da Espectroscopia de Lente Térmica.

## 4 Resultados e Discussão

Os resultados dos transientes da LT dos corantes xantênicos: Eritrosina B (ERY), Eosina Y (EOS), Rosa de Bengala (RB) e do corante *Sirius Red* (SR) diluídos em água ultrapura (Água Milli-Q) serão abordados a seguir, juntamente com a discussão a respeito dos possíveis mecanismos ligados à fotodegradação.

Como dito anteriormente, a técnica de lente térmica trata dos efeitos induzidos através da absorção da luz com o material, a qual permite investigar suas propriedades térmicas e ópticas. Devido a alta sensibilidade da técnica LT conseguimos tratar de amostras líquidas com concentrações micromolares e sub-micromolares.

Neste trabalho utilizamos a técnica para o estudo dos corantes xantênicos, que são fotossensibilizadores utilizados em terapia fotodinâmica. Esses corantes apresentam fotorreação, efeito que será quantificado pela análise do sinal de LT, visto que o mesmo é sensível à variação do índice de refração ou ao coeficiente de absorção óptica da amostra. Como o efeito no transiente relacionado com a variação do índice de refração com a concentração depende do tempo característico de difusão de massa, este efeito ocorre em um tempo característico diferente do térmico. Como mencionado anteriormente, podemos discriminar esse efeito observando o comportamento de relaxação do sinal após o laser de excitação ser desligado. Durante o tempo que o laser está ligado, o efeito de lente de concentração e da diminuição da taxa de aquecimento devido à fotodegradação pode apresentar um comportamento muito similar. Porém, na ausência de lente de concentração o processo de relaxação é puramente térmico, descrevendo um comportamento bem determinado no transiente.

A Figura 12 mostra os transientes de LT normalizados obtidos para os quatro corantes diluídos em Água Milli-Q na concentração de  $1,5625\mu M$ , para quatro potências diferentes do feixe de excitação (sendo variáveis de acordo com cada corante).

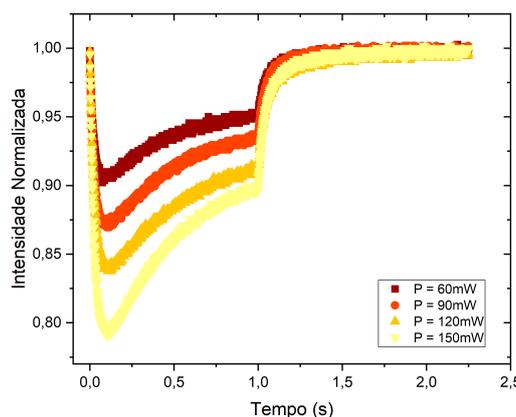
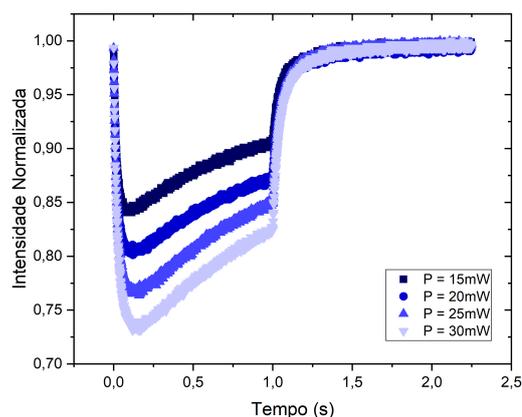
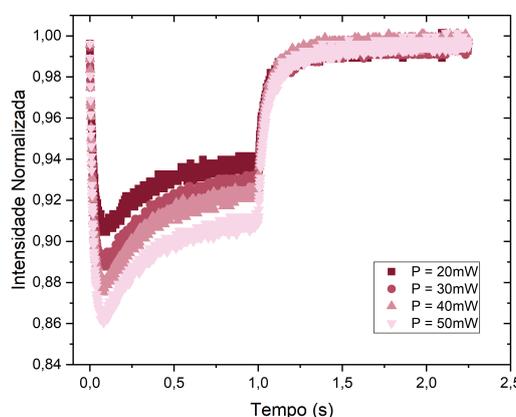
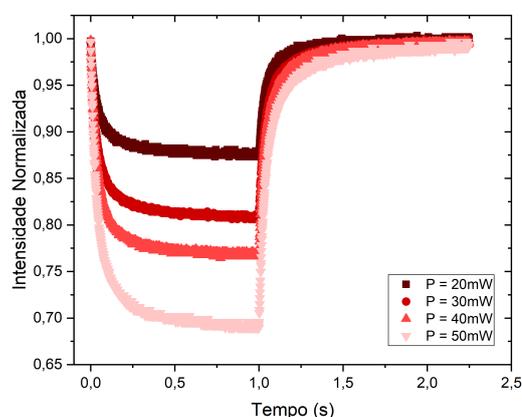
(a) *Eritrosina* em Água Milli-Q.(b) *Eosina* em Água Milli-Q.(c) *Rosa de Bengala* em Água Milli-Q.(d) *Sirius Red* em Água Milli-Q.

Figura 12 – Gráficos dos transientes de LT para diferentes valores de potência do laser de excitação.

Fazendo uma análise visual dos gráficos podemos observar que, dos quatro corantes estudados, três deles, Eritrosina (ERY); Eosina (EOS); Rosa de Bengala (RB), apresentam um efeito adicional do que apenas um sinal puramente térmico, possuindo também uma fotorreação (que está relacionada com a fotodegradação dos corantes), sendo mais evidenciado conforme fomos aumentando a potência do feixe de excitação. Para o corante *Sirius Red* (SR) observamos que não há um efeito adicional, independente da potência utilizada ele mantém um sinal característico puramente térmico. Pelo comportamento do sinal após o laser de excitação ser desligado podemos afirmar que não temos efeitos de lente de concentração significativo. Desta forma a variação observada no transiente, em que temos uma diminuição da amplitude após a fase inicial da formação de lente térmica, é bem característica de uma diminuição do calor gerado devido à fotodegradação da amostra.

No processo de fotoativação, a absorção da luz laser excita as moléculas do estado fundamental para a primeira banda do estado singleto excitado. A relaxação para o

estado fundamental pode ocorrer por processos radiativos ou não radiativos. No processo radiativo a molécula volta ao estado fundamental pela emissão de fótons (fluorescência e fosforescência). O processo não radiativo pode ocorrer pela geração de calor ou transferência de energia para outra molécula. Na presença de oxigênio molecular na solução, este último processo pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo o oxigênio singleto [42].

Note que os três corantes citados no parágrafo acima, que apresentam fotodegradação, possuem comportamentos diferentes em relação a este efeito. A fotodegradação das amostras ocorre por meio de vários processos, entre eles a interação do corante-corante no estado excitado, interação do corante com outras espécies reativas formadas no processo, como por exemplo o oxigênio singleto. Estas interações podem induzir quebras da estrutura química, levando à degradação permanente do corante [54]. Por outro lado, esses processos dependem de uma interação de contato, de forma que o coeficiente de difusão dessas moléculas no solvente utilizado, o tempo de vida no estado tripleto, além da fração de oxigênio singleto gerado podem afetar o resultado final.

Cada um dos corantes observados na Figura 12, por mais que possuam um mesmo efeito, com exceção do SR, o comportamento deles é visto de uma forma diferente. Para a Eosina observamos uma variação mais suave no transiente após a queda inicial devido ao efeito térmico. Essa variação mais suave pode estar relacionada à contribuição da taxa de reposição via difusão de massa para a região fotoativada. Como as moléculas estruturalmente são distintas, o coeficiente de difusão pode variar. A massa molar da EOS é menor que os outros xantenos, de forma que a reposição de moléculas na região fotoativada via difusão é mais efetiva, levando um tempo maior para atingir o estado estacionário. No caso da RB, o sinal tem uma tendência de atingir o estado estacionário mais rápido. Novamente isso pode estar relacionado à taxa de reposição via difusão de massa. Como a massa molar da RB é maior que as outras, a taxa de reposição aparentemente é mais lenta, fazendo com que o regime estacionário entre a taxa de fotodegradação e a taxa de reposição seja atingido mais rápido.

A amplitude do sinal térmico, que está associado à razão  $\theta_{TL}/P_e$ , depende do coeficiente de absorção de cada molécula no comprimento de onda de excitação, que neste caso foi de  $514nm$ . Nesse sentido, conforme observado na Figura 13, o maior valor de  $\beta$  nesse comprimento de onda é para a EOS, seguido da RB e ERY. Devido a isso, foi utilizado potências diferentes na geração de sinal de cada amostra.

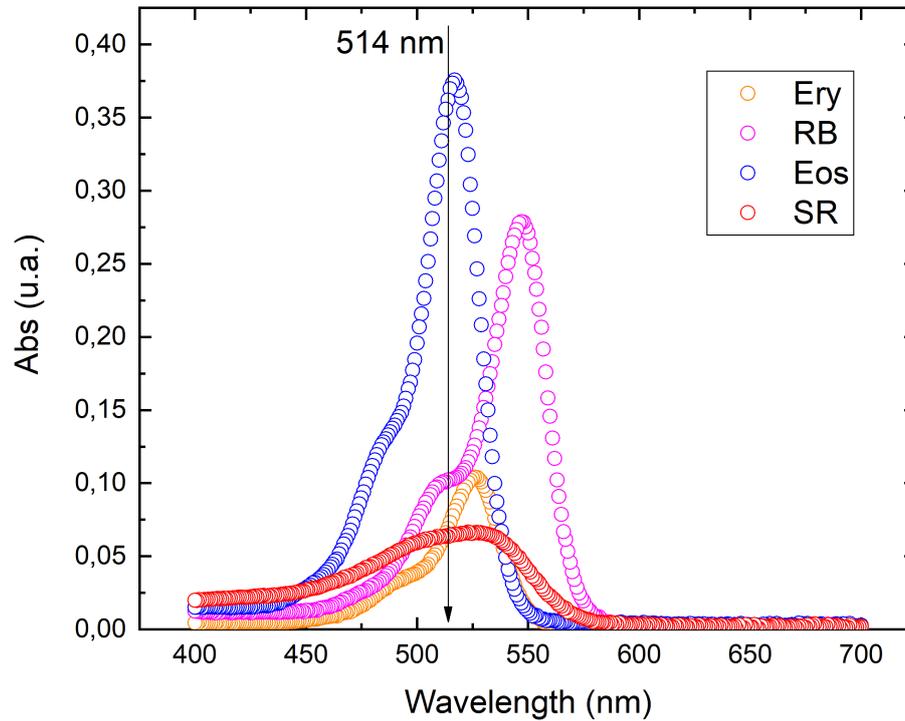


Figura 13 – Gráfico das absorvâncias dos corantes xantenos, na concentração de  $1,5625\mu M$ .

Além do interesse na caracterização da região de absorção das amostras preparadas, os espectros de absorvância ajudam na interpretação dos dados de lente térmica. Podemos obter o coeficiente de absorção óptica ( $\beta_0$ ) para o comprimento de onda desejado monitorando como a absorção muda em função da concentração. Os resultados desse monitoramento em função da concentração para  $\lambda = 514nm$  são apresentadas na Figura 14.

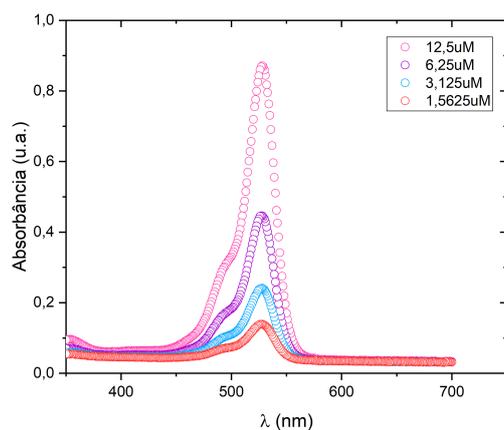
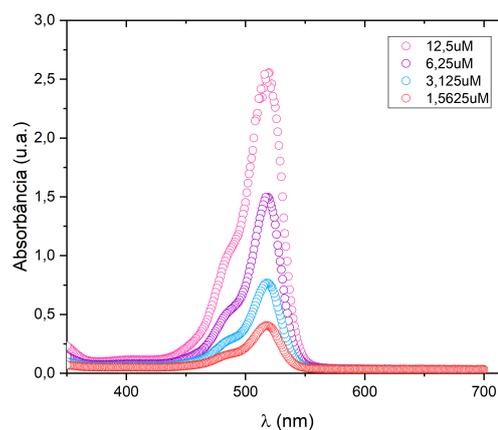
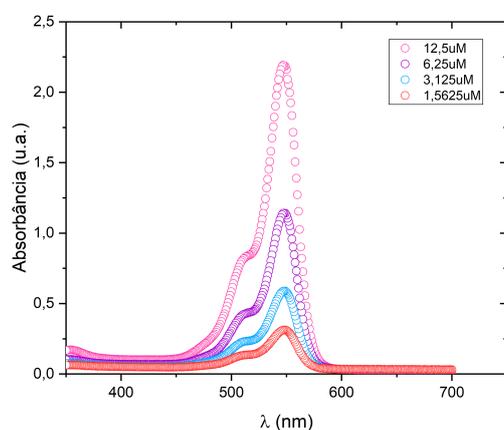
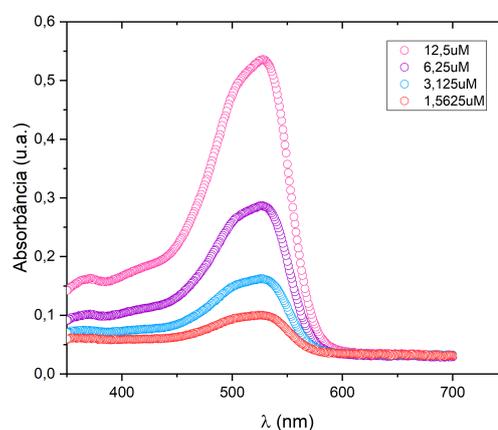
(a) *Eritrosina* em Água Milli-Q(b) *Eosina* em Água Milli-Q(c) *Rosa de Bengala* em Água Milli-Q(d) *Sirius Red* em Água Milli-Q

Figura 14 – Espectros de absorção dos corantes estudados em quatro concentrações diferentes.

Podemos observar que a distribuição espectral permanece centralizada ao redor de um mesmo comprimento de onda independente do valor da concentração, variando apenas a amplitude de sinal da absorbância de acordo com o aumento da concentração. Monitorando o valor medido da absorbância em função da concentração, no comprimento de onda de excitação, foi possível adquirir valores para que se obtê-se o gráfico representado pela Figura 15, apresentando o “*fitting linear*” da absorbância em função da concentração para cada um dos corantes.

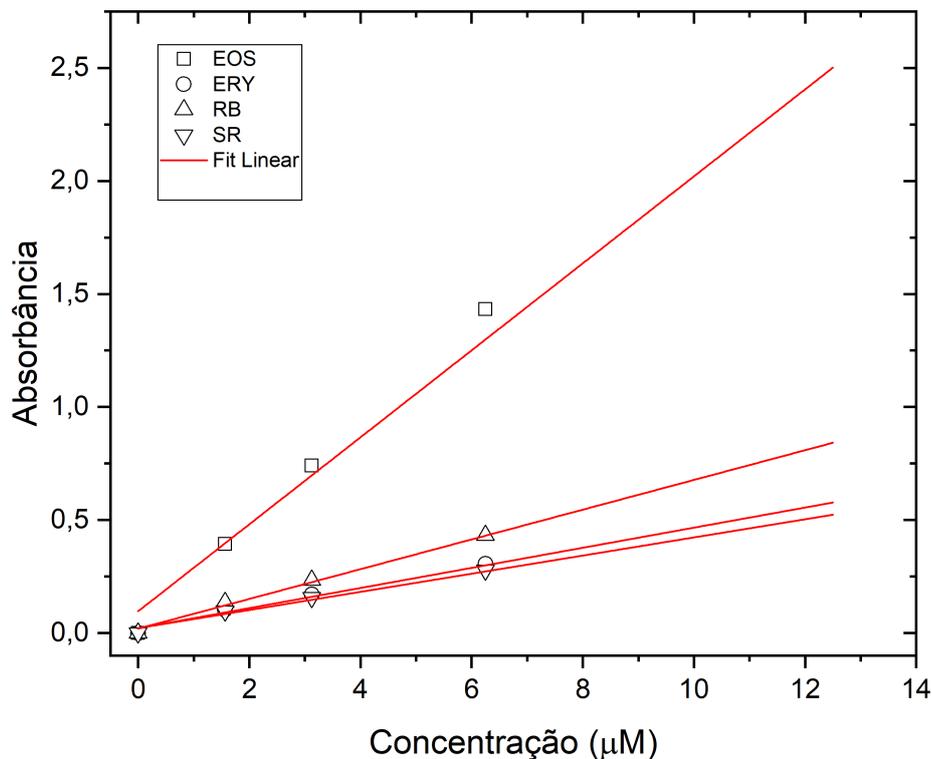


Figura 15 – Absorbância em função da concentração para os corantes xantenos e para o corante *Sirius Red* estudados em  $\lambda = 514nm$ .

No processo de ajuste dos transientes, como as concentrações são baixas, vamos assumir que as propriedades térmicas e ópticas, como difusividade térmica, condutividade térmica e  $dn/dT$ , sejam próximas às propriedade do solvente utilizado, sendo que somente a absorção óptica e as propriedades relativas à fotodegradação variem entre eles. Isso foi confirmado pelo ajuste do transiente de LT para o corante SR. Como nesse caso somente temos efeitos térmicos, obtivemos do ajuste o valor da difusividade térmica sendo  $D = 1.43 \times 10^{-7} m^2 s^{-1}$ , que é, como esperado, o valor da difusividade térmica da água.

Na Figura 16 estão representados os ajustes térmicos dos transientes obtidos para os quatro corantes estudados. A partir deles conseguimos obter certos parâmetros térmicos e fotofísicos das amostras, e também valores aproximados da taxa de fotodegradação e do coeficiente de conversão térmica ( $\phi_T$ ), parâmetros esses que foram descritos no Capítulo 2.

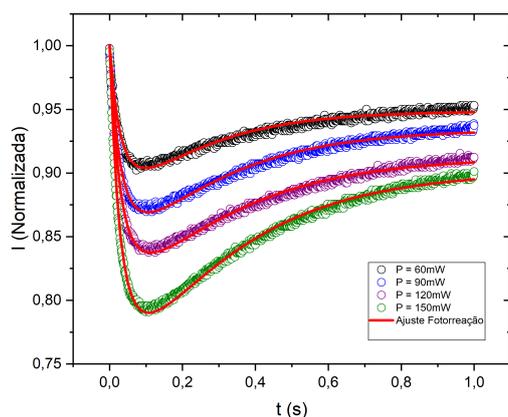
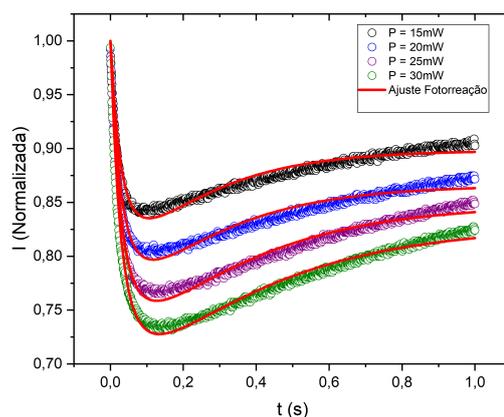
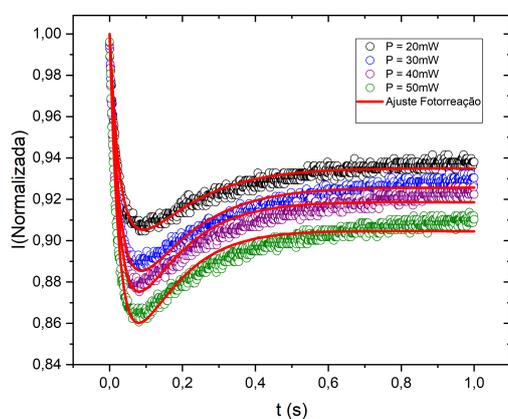
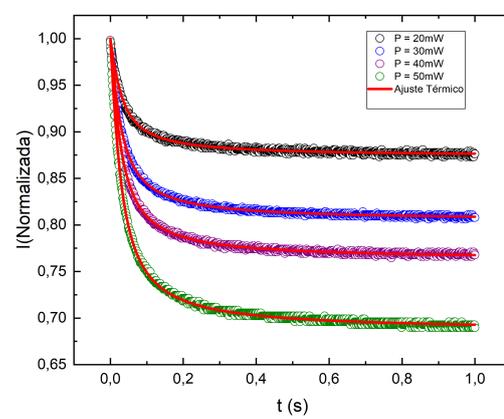
(a) *Eritrosina* em Água Milli-Q(b) *Eosina* em Água Milli-Q(c) *Rosa de Bengala* em Água Milli-Q(d) *Sirius Red* em Água Milli-Q

Figura 16 – Gráficos dos transientes de LT com o ajuste do modelo Shen-Pedreira. Nos transientes apresentados as linhas sólidas vermelhas representam o ajuste dos dados experimentais.

Como esperado no transiente do corante SR o comportamento é puramente térmico, sem apresentar fotodegradação, sendo igual ao transiente na ausência do corante, ou seja, igual ao transiente da água pura, como pode-se observar na Figura 17. Já analisando os ajustes dos xantenos, representados pela Figura 16.a, 16.b e 16.c, observamos uma correspondência dos transientes normalizados com o ajuste teórico de fotorreação.

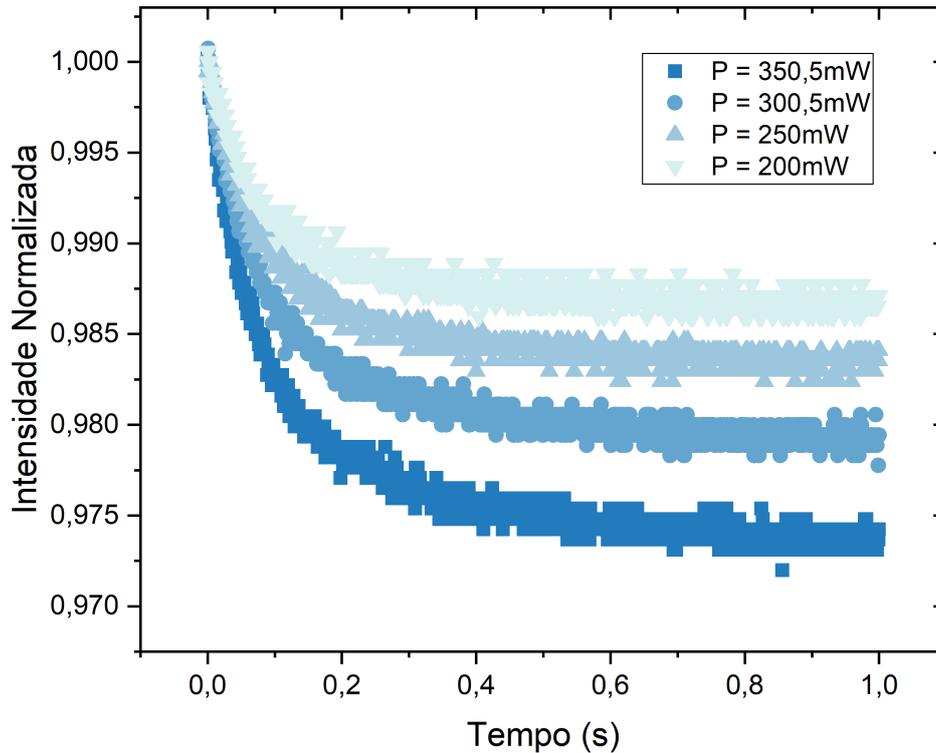


Figura 17 – Gráfico do transiente da Água Milli-Q.

Como dito anteriormente no Capítulo 1, entende-se que a reação fotoquímica dos fotossensibilizadores produz radicais parcialmente reduzidos, de modo que o favorecimento de um ou outro mecanismo de fotodegradação, depende das concentrações relativas dos fotossensibilizadores, do oxigênio, e possivelmente da presença de inibidores em solução [9], de forma que o modelo teórico de reação de primeira ordem não seja efetivo para uma descrição completa do processo de fotodegradação. Por outro lado, se incorporamos os vários processos, isso levaria a um modelo com vários parâmetros, o qual geralmente leva a uma instabilidade no ajuste, especialmente quando esses processos acontecem em escalas de tempo próximos. Desta forma, a análise dos transientes de LT fornecem uma informação mais qualitativa do que quantitativa do processo de fotodegradação.

O modelo descrito no Capítulo 2, Eq. (2.20), temos quatro parâmetros para serem ajustados,  $k_R$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta_{TL}$ , e  $t_c$ . O parâmetro  $t_c$  é relacionado com a difusividade térmica por  $D = w_{0e}^2/4t_c$ . Para o ajuste dos transientes dos xantenos, mantemos o parâmetro  $t_c$  fixo, obtido do ajuste do transiente do SR. A partir dos valores de  $\theta_{TL}$  obtidos para cada um dos xantenos, e do valor de  $\beta_0$  obtidos a partir dos espectros de absorção, conseguimos determinar o valor do coeficiente de conversão térmica ( $\phi_T$ ) utilizando a equação 2.21, onde  $L$  é o caminho óptico da cubeta e  $\lambda_p$  o comprimento de onda do laser de prova que

são parâmetros conhecidos do montagem experimental. A condutividade térmica  $k_T$  e o coeficiente  $dn/dT$  foram assumidos como sendo os valores para o solvente utilizado nas medidas (Água Milli-Q).

Alternativamente, considerando que a absorbância é proporcional ao coeficiente de absorção óptico, e considerando que a fluorescência do SR é desprezível, isto é,  $\phi_{SR} \approx 1$ , podemos escrever

$$\phi_{Xanteno} = \frac{(\theta/P)_{Xanteno}}{(\theta/P)_{SR}} \frac{A_{SR}}{A_{Xanteno}} \quad (4.1)$$

A partir desta relação, utilizando a razão das absorbâncias obtida na Figura 13, e os valores de  $\theta/P$  dos ajustes, podemos determinar a eficiência de geração de calor em cada xanteno, como mostrado na Tabela 5.

A partir dos parâmetros  $k_R$  e  $\epsilon$ , o valor do coeficiente de absorção relativo (em percentual) para o tempo total do transiente ( $t=1s$ ),

$$\beta_r(t) = \frac{\beta(t)}{\beta_0} \times 100, \quad (4.2)$$

a qual de uma maneira qualitativa representa a fotodegradação observada em cada uma das amostras. Os valores para  $\theta_{TL}/P$ ,  $\Delta\beta$  e  $\phi_T$  estão apresentados na Tabela 5.

Corante Xantenos	$\theta_{TL}/P$ ( $W^{-1}$ ) $\times 10^{-6}$	$\beta_r(1)$ (%)	$\phi_{Xanteno}$
Eritrosina	$1,4 \pm 0,2$	$33 \pm 1$	$0,25 \pm 0,04$
Eosina	$7,2 \pm 0,9$	$42 \pm 1$	$0,24 \pm 0,03$
Rosa de Bengala	$2,3 \pm 0,1$	$38 \pm 1$	$0,28 \pm 0,01$
<i>Sirius Red</i>	$5,1 \pm 0,1$	1,0	1,0

Tabela 5 – Parâmetros obtidos dos corantes xantenos estudados. A incerteza está relacionada à variação obtida em duas medidas independentes feitas para cada amostra.

## 5 Conclusão

O uso da técnica de Lente Térmica se mostrou útil para o estudo e caracterização da fotodegradação dos corantes xantenos. Uma vantagem da técnica de LT é a sua alta sensibilidade, permitindo que analisemos amostras em concentrações micromolares e apenas uma região muito pequena é iluminada durante a obtenção do transiente de LT, logo a amostra é praticamente não danificada. Essa técnica permite a determinação de parâmetros importantes no estudo da caracterização dos fotossensibilizadores utilizados na TFD. A taxa de fotodegradação, por exemplo, é um fator importante pois entra como um parâmetro decisivo na definição da dosimetria utilizada. A taxa de geração de calor é um outro fator de interesse, pois pode ser relacionado com a capacidade de geração de oxigênio singleto, além de ser importante no casos de fotossensibilizadores nos quais além da terapia fotodinâmica, se associa à terapia fototérmica, a qual consiste da inativação de moléculas biológicas pelo aumento localizado da temperatura do meio. Como observado nos resultados, a EOS apresenta o menor fator de fotodegradação entre os xantenos. A amostra com maior fator de conversão de calor foi a Rosa de Bengala (RB) com  $\phi_{Xanteno} = 0,28$ .

De uma forma geral, o objetivo deste trabalho foi atingido no sentido de dar a estudante uma formação adicional, a qual não é obtida regularmente no curso de bacharelado, além de aproximar o estudante em linhas de pesquisas atualmente desenvolvidas no DFI.

## Referências

- [1] V. G. CAMARGO, *A utilização de técnicas fototérmicas na caracterização de fotosensibilizadores aplicados na terapia fotodinâmica. 2019. Tese (Doutorado)*. - Programa de Pós Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá,, 2019.
- [2] L. H. D. SILVA, *Teoria unificada para a variação do caminho óptico em sólidos isotrópicos: Aplicação na espectroscopia de lente térmica. Tese (Doutorado em Física)*. Programa de Pós Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- [3] S. E. Bialkowiski, *Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis*. (Wiley, New York), 1996.
- [4] D. P. Almond and P. M. Patel, *Photothermal Science and Techniques.*, vol. 10. (Chapman and Hall, London), 1996B.
- [5] J. Gordon, R. Leite, R. Moore, S. Porto, and J. Whinnery, “Long-transient effects in lasers with inserted liquid samples,” *Journal of Applied Physics*, vol. 36, no. 1, pp. 3–8, 1965.
- [6] P. R. B. PEDREIRA, *Desenvolvimento de um Protótipo de Lente Térmica Resolvida no Tempo Para Estudos de Líquidos em Condições Transitórias em Tempo Real. Tese (Doutorado em Física)*. Programa de Pós Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- [7] S. E. Bialkowiski, N. G. C. Astrath, and M. A. Proskurnin, *Photothermal Spectroscopy Methods*. ch. 1-5, pp. 1–284. John Wiley Sons, Inc., 2019.
- [8] P. Pedreira, L. Hirsch, J. Pereira, A. Medina, A. Bento, M. Baesso, M. Rollemberg, and M. Franko, “Observation of Laser Induced Photochemical Reaction of  $cr(vi)$  Species in Water During Thermal Lens Measurements“, vol. 396, no. 4, pp. 221–225. *Chemical Physics Letters*, 2004.
- [9] L. C. Malacarne, E. L. Savi, M. L. Baesso, E. K. Lenzi, and N. G. C. Astrath, “Role of Photophysics Processes in Thermal Lens Spectroscopy of Fluids: A Theoretical Study“, vol. 118, no.31, pp. 5983-5988. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2014. PMID: 25017719.
- [10] V. S. ZANUTO, L. S. HERCULANO, and L. C. MALACARNE, “Investigation of the photobleaching process of eosin y in aqueous solution by thermal lens spectroscopy.,” *J. Phys. Chem.*, 2013.

- [11] D. Sternberg, E. D.; Dolphin 1996.
- [12] D. S. Pellosi, "Estudos Físico-Químicos do corante Eritrosina B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas". Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, 2012.
- [13] T. Macdonald, I.J; Dougherty, *Basic principles of photodynamic therapy*. 2001, 5, 105-129.
- [14] H. MUKHTAR, K. KALKA, and H. MERK., "Photodynamic therapy in dermatology.," 2000.
- [15] E. D. Sternberg, D. Dolphin, and C. Brückner, "Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy," *Tetrahedron*, vol. 54, no. 17, pp. 4151–4202, 1998.
- [16] R. C. Bonnett, "Aspects of photodynamic therapy.," vol. V. 1, 2000.
- [17] G. Jori, "Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy.," *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1996, 36, 87-93.
- [18] J. Perussi, "Photodynamic inactivation of micro-organism.," 2007, 30(4): 988-994.
- [19] K. YAMAGUSHI, Z. TAMURA, and M. MAEDA, *Disodium Fluorescein Octahydrate*. Acta Crystallogr., 1997, 53, 284.
- [20] R. S. Osborn and D. Rogers, "The crystal and molecular structure of the 1: 1 complex of acetone with the lactoid form of fluorescein," *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 359–364, 1975.
- [21] F. Amat-Guerri, M. Lopez-Gonzalez, R. Sastre, *et al.*, "Spectrophotometric determination of ionization and isomerization constants of rose bengal, eosin y and some derivatives," *Dyes and pigments*, vol. 13, no. 3, pp. 219–232, 1990.
- [22] W. Tan, Z. Shi, and Y. Kopelman, "Ultrasensitive fluorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in capillary electrophoresis.," 1992, 64, 2985.
- [23] J. Slavik, "Fluorescent probes in cellular and molecular biology," 1994.
- [24] R. Sjöback, J. Nygren, and M. Kubista, "Absorption and fluorescence properties of fluorescein," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 51, no. 6, pp. L7–L21, 1995.
- [25] H. S. Maia, R. Turchetti, M. Zajdenweber, and O. F. M. Brasil, "Terapia fotodinâmica com verteporfirina em neovascularização coroidiana subfoveal secundária a coriorretinopatia serosa central: relato de caso," *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, vol. 68, pp. 561–564, 2005.

- [26] S. C. G. Tseng, R. P. G. Feenstra, and B. D. Watson, "Investigative ophthalmology visual science," 1994, 35, 3295.
- [27] M. Schafer, C. Schmitz, R. Facius, and others., "Photochem. photobiol.," 2000, 71, 514.
- [28] A. Waheed and P. Gupta, "Estimation of submicrogram quantities of protein using the dye eosin y," *Journal of biochemical and biophysical methods*, vol. 42, no. 3, pp. 125–132, 2000.
- [29] A. Waheed, K. S. Rao, and P. Gupta, "Mechanism of dye binding in the protein assay using eosin dyes," *Analytical biochemistry*, vol. 287, no. 1, pp. 73–79, 2000.
- [30] S.-S. Kim, J.-H. Yum, and Y.-E. Sung, "Improved performance of a dye-sensitized solar cell using a tio<sub>2</sub>/zno/eosin y electrode," *Solar energy materials and solar cells*, vol. 79, no. 4, pp. 495–505, 2003.
- [31] W.-P. Tai and K. Inoue, "Eosin y-sensitized nanostructured sno<sub>2</sub>/tio<sub>2</sub> solar cells," *Materials Letters*, vol. 57, no. 9-10, pp. 1508–1513, 2003.
- [32] S. S. Mali, C. Betty, P. Bhosale, and P. Patil, "Eosin-y and n3-dye sensitized solar cells (dsscs) based on novel nanocoral tio<sub>2</sub>: A comparative study," *Electrochimica Acta*, vol. 59, pp. 113–120, 2012.
- [33] S. Hazebroucq, F. Labat, D. Lincot, and C. Adamo, "Theoretical insights on the electronic properties of eosin y, an organic dye for photovoltaic applications," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 112, no. 31, pp. 7264–7270, 2008.
- [34] M. Lapidoth, D. Ben-Amitai, S. Bhandarkar, L. Fried, and J. L. Arbiser, "Efficacy of topical application of eosin for ulcerated hemangiomas," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 60, no. 2, pp. 350–351, 2009.
- [35] F. Wilkinson, W. P. Helman, and 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.
- [36] M. Niedre, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo," *Photochemistry and photobiology*, vol. 75, no. 4, pp. 382–391, 2002.
- [37] G. Fleming, A. Knight, J. Morris, R. Morrison, and G. Robinson, "Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 99, no. 13, pp. 4306–4311, 1977.

- [38] M. Chakraborty and A. K. Panda, "Spectral behaviour of eosin y in different solvents and aqueous surfactant media," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 81, no. 1, pp. 458–465, 2011.
- [39] J. Del Valle, J. Catalán, and F. Amat-Guerri, "Comparative photophysical study of rose bengal, eosin y and their monomethyl and dimethyl derivatives," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 49–53, 1993.
- [40] P. Meallier, S. Guittonneau, C. Emmelin, and T. Konstantinova, "Photochemistry of fluorescein and eosin derivatives," *Dyes and pigments*, vol. 40, no. 2-3, pp. 95–98, 1999.
- [41] L. Grossweiner and E. Zwicker, "Primary processes in the photochemistry of eosin," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 31, no. 4, pp. 1141–1142, 1959.
- [42] L. Herculano, L. Malacarne, V. Zanuto, G. Lukasiewicz, O. Capeloto, and 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.
- [43] G. J. Augustine and H. Levitan, "Presynaptic effect of erythrosin b at the frog neuromuscular junction: ion and photon sensitivity.," *The Journal of Physiology*, vol. 334, no. 1, pp. 65–77, 1983.
- [44] A. J. Gava, "Princípio da tecnologia de alimentos.," 1981.
- [45] N. S. Allen and J. F. McKellar, "Photochemistry of dyed and pigmented polymers," 1980.
- [46] Muhlhauser, "Dinglers polytech.," 1886, 268 , 99.
- [47] M. Marotta and G. Martino, "Sensitive spectrophotometric method for the quantitative estimation of collagen," *Analytical biochemistry*, vol. 150, no. 1, pp. 86–90, 1985.
- [48] M. Zou, M. Zhang, M. Deng, *et al.*, "A preliminary study on the quantitative determination of collagen of aquatic animal origin by using sirius red staining in vitro.," 2016.
- [49] R. Leite, R. Moore, and J. Whinnery, "Low absorption measurements by means of the thermal lens effect using an he–ne laser," *Applied Physics Letters*, vol. 5, no. 7, pp. 141–143, 1964.
- [50] K. E. Rieckhoff, "Self-induced divergence of cw laser beams in liquids—a new nonlinear effect in the propagation of light," *Applied physics letters*, vol. 9, no. 2, pp. 87–88, 1966.

- 
- [51] C. Hu and J. Whinnery, “New thermo-optical measurement method and a comparison with other methods,” *Applied Optics*, vol. 12, no. 1, pp. 72–79, 1973.
- [52] J. Shen, R. D. Lowe, and 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.
- [53] J. M. COLET, *Aplicação da Espectroscopia de Lente Térmica para o Estudo de Fotorredução do Óxido de Grafeno. Dissertação (Mestrado em Física)*. Programa de Pós Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, 2017.
- [54] L. Song, E. Hennink, I. T. Young, and H. J. Tanke, “Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy,” *Biophysical journal*, vol. 68, no. 6, pp. 2588–2600, 1995.