

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------------------------------|
| RESUMO ----- | 6 |
| CAPÍTULO 1 ----- | 8 |
| 1.1 Introdução----- | 8 |
| 1.2 Objetivo----- | Erro! Indicador não definido. |
| CAPÍTULO 2 ----- | 12 |
| <i>Considerações teóricas</i> ----- | 12 |
| 2.1 Espectroscopia óptica----- | 12 |
| 2.2 Espectroscopia Fotoacústica----- | 14 |
| 2.3 Efeito Fotoacústico----- | 16 |
| 2.3.1 Comportamento óptico da amostra----- | 16 |
| 2.3.2 Comportamento térmico----- | 17 |
| 2.4 Mecanismos de geração do sinal fotoacústico----- | 18 |
| CAPÍTULO 3 ----- | 21 |
| <i>Modelo Teórico para a Difusão Térmica</i> ----- | 21 |
| 3.1 A célula fotoacústica----- | 21 |
| 3.2 Condução do Calor----- | 23 |
| 3.2.1 Dedução da equação de Difusão de Calor----- | 23 |
| 3.2.2 Produção de calor na amostra----- | 25 |
| 3.2.3 Equação geral de difusão----- | 26 |
| 3.2.4 O sinal fotoacústico----- | 29 |
| 3.2.5 Casos limites----- | 31 |
| 3.2.6 Amplitude e fase----- | 32 |
| CAPÍTULO 4 ----- | 33 |
| <i>Características gerais da pele</i> ----- | 33 |
| 4.1 Anatomia e fisiologia da pele----- | 33 |
| 4.2 Rotas de permeação----- | 34 |
| 4.3 Cicatrização----- | 36 |
| 4.3.2 Processo da cicatrização----- | 37 |
| CAPÍTULO 5 ----- | 38 |
| <i>Experimental</i> ----- | 38 |
| 5.1 Pomadas utilizadas----- | 38 |
| 5.2 Amostras de pele----- | 38 |
| 5.3 Espectrômetro Fotoacústico----- | 40 |
| CAPÍTULO 6 ----- | 43 |

| | |
|--|-----------|
| Resultados e discussão | 43 |
| 6.1 Espectros de absorção óptica das pomadas..... | 43 |
| 6.2 Medidas de absorção na pele “ex vivo”..... | 44 |
| 6.3 Determinação da taxa de penetração em função do tempo de tratamento..... | 53 |
| 6.4 Comparação dos resultados obtidos com a fotoacústica com a evolução da cicatrização via estudo histológico | 56 |
| | |
| CAPÍTULO 7 | 58 |
| | |
| Conclusão | 58 |
| | |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

Resumo

Neste trabalho a Espectroscopia Fotoacústica (*Photoacoustic Spectroscopy*-PAS) foi utilizada para avaliar a penetração, em feridas cutâneas de ratos, de duas formulações diferentes de pomadas de própolis. Os experimentos foram realizados com a espectroscopia fotoacústica operando na região espectral entre 250 até 500 nm, monitorando-se as bandas de absorção óptica associadas à própolis. Foram utilizadas as frequências de modulação em 10, 15 e 40Hz. Foram realizadas leituras de pomadas de própolis, denominadas A e B, de acordo com a composição do líquido extrator da própolis e da base da pomada (controle). O espectro de absorção da pele, sem qualquer tipo de formulação, também foi determinado. Estes espectros foram utilizados para a realização de ajustes gaussianos. As medidas foram executadas na face externa e na face interna das feridas (face dermal), após quatro, sete, dez e quatorze dias de tratamento com as pomadas de própolis. As leituras realizadas na face externa de feridas comprovaram a presença das pomadas A e B na superfície da ferida. As leituras na face interna detectaram a presença das pomada A e B com frequências de 10 e 15Hz, mas não com 40Hz, que representa a maior profundidade.

As medidas tomadas em função do tempo de cicatrização mostraram uma diminuição na quantidade de própolis permeada. Esta é a primeira vez que a PAS é utilizada para avaliar a penetração de fármacos na pele, durante o processo de cicatrização de feridas, demonstrando mais uma vez o potencial da PAS para a avaliação do perfil de profundidade de substâncias em amostras não homogêneas. Nossos resultados demonstraram que houve a permeação da pomada de própolis, detectada na região da derme logo abaixo da epiderme, detectada com a frequência de 10Hz, e um pouco mais profundamente, detectada com a leitura na frequência de 15 Hz. Não houve um sinal da presença das pomadas de própolis nas leituras realizadas com a frequência de 40Hz. A maior taxa de permeação das pomadas A e da B foram obtidas aos 4 e 10 dias. Aos 7 e 14 dias houve permeação, porém em menor quantidade. Acredita-se que fatores como a barreira física promovida pela da casca da ferida e pelo epitélio em regeneração, bem como os componentes utilizados na formulação das pomadas foram fatores determinantes para a obtenção da taxa de permeação. Além disso, os resultados mostraram que a estratégia de se incidir a luz modulada, que gera o sinal fotoacústico na face interna da pele, no lado oposto ao da ferida onde se aplicou o medicamento, permitiu assegurar que a própolis permeou através dos tecidos.

sugerindo que a formação do epitélio inibe o processo de difusão. indicando que a aceleração do processo de cicatrização da ferida tratada com a pomada de própolis só ocorreu porque a pomada permeou ao longo da mesma, Os resultados deste trabalho indicam que esta técnica pode ser ampliada para se estudar a penetração de fármacos na pele.

Ao compararmos os resultados da taxa de penetração em função da cicatrização com aqueles obtidos a partir de observações histológicas, constatamos que há uma coincidência entre a melhora no processo de cicatrização da ferida tratada com o processo de permeação da própolis,

Abstract

In this work Photoacoustic Spectroscopy PAS was used to evaluate the penetration in wounds, during the process of healing, of formulations of bee-propolis containing two different concentrations. The experiments were carried out in the spectral region between 250 and 500 nm, monitoring the optical absorption bands associated to the bee-própolis. The measurements were performed in induced wounds in rats after four, seven, ten and fourteen days of treatment. The results showed that the strategy of using the modulated light exciting the internal face of the skin, in the opposite side to the one of the wound where the medicine was applied, allowed us to investigate if the bee-propolis propagated along with the wounds. The measurements as a function of the period of treatment showed a reduction of the penetration rate of the bee-propolis, suggesting that the formation of the epithelium inhibits the diffusion process. When comparing the results of the penetration rates as a function of the healing with those determined from histological observation the results suggest that the improvement in the process of healing of the wound may have occurred because of the penetration of the active principle, the bee-propolis extract, as a consequence of the appropriate choice of the used vehicle in the formularizations. As far as we know this is the first time that the PAS is used to evaluate the penetration of topically applied formulations during the process of healing of wounds, demonstrating once again the potential of this

technique for the evaluation of the depth profile of substances in heterogeneous samples. The results of this work indicate that this technique can be extended to study the penetration of formulations in skin.

Capítulo 1

1.1 Introdução

A pele é a proteção natural do corpo contra lesões, invasão bacteriana, absorção da radiação ultravioleta e em geral funciona como barreira entre agentes externos e o meio interno do organismo. Como é o envoltório de estruturas internamente situadas, apresenta uma resistência maior que os órgãos por ela envolvidos [1].

Como a pele reveste todo o corpo, sendo assim a região mais periférica e superficial, é a mais frequentemente lesada por agentes agressores externos. Traumatismos desencadeados de diferentes maneiras podem destruir zonas do corpo que a partir desse instante necessitam de reparação [2].

Se um agente agressor causa um dano local, imediatamente ocorre uma série de fenômenos que visam a reorganização daquela zona e conseqüentemente inicia-se os mecanismos de reparação tecidual, ou seja, a cicatrização. [2][3], que envolve os processos de inflamação, reepitelização, fibroplasia e remodelação tecidual [Martin]. Todos estes processos ocorrem de forma espaço-temporal altamente coordenada e são regulados por fatores de crescimento e citocinas [Martin, Rui Cury]

O intervalo de tempo necessário para a cicatrização depende da profundidade e do grau de comprometimento da lesão, ou seja, se há maior ou menor perda tecidual, se ocorre ou não infecção, se há contato entre os tecidos, se o movimento não os desloca [4] ou da preexistência de patologias crônicas como o diabetes ou insuficiência vascular que afetam a cicatrização [autor].

Este processo pode ou não ser auxiliado pelo uso de medicamentos agem como coadjuvantes no processo de cura e podem proporcionar melhores condições para o processo de reparação se desenvolver [4].

O tratamento de lesões cutâneas, especialmente aquelas de caráter crônico geram custos elevados pois demandam muito tempo de tratamento, por vezes internações e incapacitam os indivíduos ao trabalho. É essencial que indivíduos portadores deste tipo de lesão recebam assistência continuada, pois processos de cicatrização nestes casos são muito complexos [4].

Esclarecer os mecanismos de neoformação tecidual e os processos fisiológicos envolvidos, bem como, uma análise da ação de medicamentos de uso tópico ou sistêmico sobre as lesões [5][6] têm sido um foco de investigação para o tratamento de lesões cutâneas.

Um grande desafio para os profissionais de saúde é a escolha dos produtos eficazes, de baixo custo e fácil acesso para prescrição aos pacientes, para que estes dêem continuidade aos tratamentos.

Neste contexto, é cada vez mais reconhecido que a própolis tem grande importância por suas propriedades cicatrizantes. A pomada de própolis é um medicamento fitoterápico de forte presença na Secretaria da Saúde de Maringá e vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de feridas agudas e crônicas, sendo amplamente utilizada por centenas de pacientes/mês. Além da eficácia no tratamento, a pomada é obtida a um custo muito baixo, de tal modo que vem sendo distribuída gratuitamente aos pacientes.

A ação cicatrizante de diferentes fórmulas farmacêuticas pomada de própolis têm sido demonstrada através de estudos de reepitelização [Apadec], neovascularização e fibroplasia em feridas agudas, em ratos. Estes resultados somados à experiência de seu uso nas Unidades de Saúde, que tem demonstrado a eficácia da pomada de

própolis no tratamento das lesões agudas, sugerem que há necessidade de se ampliar os métodos de análise de modo a se obter um maior grau de informação sobre este medicamento fitoterápico.

A determinação da taxa de penetração cutânea, o perfil de distribuição e do tempo de permanência da pomada na região da ferida são importantes parâmetros no estabelecimento da efetividade dos efeitos biológicos atribuídos aos fármacos de uso tópico.

A Espectroscopia Fotoacústica (PAS) é uma técnica que permite a avaliar “*in vivo*”¹, “*ex-vivo*”², ou “*in vitro*”³ a propagação e distribuição de medicamentos ou cosméticos topicamente aplicados [7]-[9]. Com esta técnica, pode-se realizar separação espectral dos diferentes constituintes das formulações que contribuírem para a absorção óptica, descrita pelo espectro total do sistema. Além disso, uma das características únicas deste método é a possibilidade de se determinar o perfil de penetração das substâncias ao longo da espessura da amostra sob teste.

Outra vantagem da PAS é que por ser uma técnica muito sensível, permite detectar a presença de baixas concentrações dos componentes absorvedores na amostra. Além disso, o método é não destrutivo permitindo que a amostra testada seja reutilizada para outros ensaios.

Estudos anteriores desenvolvidos pelo Grupo de Estudos dos Fenômenos Fototérmicos do Departamento de Física/UEM [10]-[13] e por outros pesquisadores [14]-[19] já demonstraram a potencialidade da fotoacústica para o estudo da penetração de fármacos e protetores solares na pele de humanos e de cobaias. Como exemplo desses, podemos incluir a determinação da penetração do dimetilsulfoxido (DMSO) através da pele “*in vitro*” [20], a veiculação de protetores solares na pele humana e em pele de ratos “*in vivo*” [10][11][13], a penetração de antifúngicos na unha humana “*in vitro*” [12], etc.

1

2

3

1.2. Justificativas e Objetivos

Considerando-se:

- a característica única da PAS, de permitir a determinação do perfil de profundidade, de maneira não destrutiva, de centros absorvedores ao longo da amostra;
- a necessidade de conhecer o grau de permeação de fármacos de uso tópico, como forma de atribuir seu efeito biológico à sua distribuição na pele;
- a reconhecida ação cicatrizante das pomadas de própolis.

Este trabalho tem como objetivos:

- 1) Avaliar, através da PAS a taxa de propagação e distribuição de duas pomadas de própolis, preparadas com extratos diferentes, em feridas excisionais, na pele de ratos;
- 2) Associar os resultados na PAS, com aqueles obtidos a partir das análises histológicas.

Capítulo 2

Considerações teóricas

2.1 Espectroscopia óptica

A espectroscopia caracteriza-se por estudar a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Comprimentos de ondas diferentes transportam diferentes quantidades de energia resultando em interações que podem ser avaliadas para se obter informações sobre a estrutura molecular do material analisado. Em geral os estudos espectroscópicos são tão eficientes para revelar as propriedades de um meio que suas informações podem ser consideradas como uma impressão digital do sistema em estudo [21].

A radiação eletromagnética, da qual a luz visível é um exemplo, tem à ela associado um comprimento de onda que é inversamente proporcional à sua frequência. Quanto mais curto for o comprimento de onda, maior a frequência e mais energia será transportada pela radiação [21].

O espectro de radiações eletromagnéticas (ilustrado na Fig. 1) estende-se, em ordem crescente de energia, das ondas de rádio, até radiações de alta energia como os raios-X e os raios- γ que têm comprimentos de onda muito curtos, da ordem de Angstroms. O espectro inclui também regiões de radiações com energias intermediárias, entre as microondas e o ultravioleta. Cada uma dessas regiões tem suas formas próprias de serem produzidas e detectadas e não existe uma interface perfeitamente definida entre regiões adjacentes, o que caracteriza o espectro como contínuo do ponto de vista macroscópico [21].

As microondas são ondas eletromagnéticas com frequências na faixa de 1 a 100 GHz. Esta é a região da espectroscopia de ressonância de spin, e também da espectroscopia rotacional, especial para estudos das moléculas na fase gasosa [21].

A radiação infravermelha é um tipo de radiação eletromagnética não ionizante. Ao interagir com a matéria ela induz vibrações nas moléculas e o resultado é um aumento da temperatura do sistema [21].

As transições eletrônicas podem ocorrer no infravermelho, contudo elas têm maior probabilidade de ocorrer nas regiões do visível e do ultravioleta. Nessas regiões são observados espectros de bandas de absorção de moléculas, ou seja, espectros consistindo de transições eletrônicas com transições vibracionais e rotacionais superpostas [23].



Figura 2.1. Espectro esquemático da radiação eletromagnética.

O átomo emite ou absorve um quanta de luz de uma determinada cor quando um dos seus elétrons salta de uma órbita para outra. Os componentes de uma molécula são os núcleos dos diferentes átomos que a formam e os elétrons que rodeiam cada núcleo.

A emissão e a absorção de luz por parte de uma molécula correspondem a seus diferentes modos de rotação, aos modos de oscilação de seus núcleos atômicos e aos movimentos periódicos de seus elétrons nas distintas órbitas. Se for possível medir o comprimento da onda dos fótons emitidos por uma molécula ou átomo, é possível deduzir uma considerável quantidade de informações sobre sua estrutura e sobre os distintos modos de movimento periódico de seus componentes [23].

Podemos expressar a energia total de excitação de uma molécula, com boa aproximação, como a soma das energias das excitações parciais dos níveis eletrônico, vibracional e rotacional:

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (2.1)$$

Em que os subscritos *el*, *vib* e *rot* significam eletrônica, vibracional e rotacional respectivamente.

As transições obedecem às regras de seleção que satisfazem o princípio de Franck-Condon [22] e podemos distinguir entre três tipos de espectros ópticos: rotacionais, rotacionais-vibracionais e eletrônicos [21][23][24].

Espectros rotacionais são transições entre os níveis rotacionais de um dado nível vibracional em um estado eletrônico particular. Somente o número quântico rotacional J muda nessas transições. Estes espectros estão na região de microondas ou no infravermelho distante. Eles consistem tipicamente de um grande número de linhas espectrais aproximadamente eqüidistantes. Os espectros rotacionais também podem ser observados por meio da espectroscopia Raman [22].

Espectros rotacionais-vibracionais consistem de transições dos níveis rotacionais de certo estado vibracional para os níveis rotacionais de um outro estado vibracional no mesmo termo eletrônico. O estado de excitação eletrônica, assim, permanece inalterado. Mudam os números quânticos J e v , em que v caracteriza os níveis vibracionais quantizados. Estes espectros ocorrem na região do infravermelho. Eles são formados por um número de "bandas" que são grupos de linhas estreitamente espaçadas, denominadas de linhas de banda. Eles podem ser observados com espectroscopia Raman, assim como espectroscopia infravermelha, entre elas a espectroscopia fotoacústica [21].

Espectros eletrônicos, que são de interesse neste trabalho, ocorrem com maior intensidade na região do visível e ultravioleta e consistem de transições entre os níveis rotacionais dos vários níveis vibracionais de um estado eletrônico e os níveis rotacionais e vibracionais de um outro estado eletrônico. Isto é chamado de sistemas de bandas. Ele contém todas as bandas vibracionais da transição eletrônica em observação, cada uma das quais com sua estrutura rotacional. Em geral todos os três números quânticos mudam nessas transições: J e v , e mais aquele que caracteriza o estado eletrônico (n , l , m_l ou j e m_j) [21].

2.2 Espectroscopia Fotoacústica

A Espectroscopia Fotoacústica é uma técnica espectroscópica que é baseada no efeito fotoacústico. Este fenômeno foi observado pela primeira vez em 1880 por Alexandre Graham Bell quando ele trabalhava em seu fonômetro [25]. Bell observou que a incidência de luz solar modulada em um sólido, dentro de uma câmara fechada, produzia efeitos sonoros que podiam ser ouvidos por meio de um tubo ligado a esta câmara. Motivados pela descoberta de Bell, Tyndall [28] e Röntgen [29], descobriram

que o sinal acústico podia ser produzido quando um gás dentro de uma câmara fechada é iluminado por uma luz modulada. A intensidade deste efeito sonoro dependia da quantidade de luz solar absorvida e da natureza da amostra. Como o sistema de detecção usado nas experiências era o próprio ouvido, não foi possível para eles obterem dados quantitativos, e assim os experimentos envolvendo o efeito fotoacústico foram abandonados à época.

Em 1881, Bell atribuiu o efeito fotoacústico, realizado em sólidos porosos como o carbono preto, como sendo um ciclo de expulsão e reabsorção do ar nos poros da amostra [30]. Isto estava de acordo com a teoria de Rayleigh [31] a qual também previa que o efeito era também gerado pelo movimento mecânico do próprio sólido. Ao contrário, Preece [32] por meio de experimentos sugeriu que o sólido não realizava movimentos mecânicos, mas sim o efeito de contração e expansão do ar dentro da célula. Já Mercadier [33] concluiu que o aquecimento periódico fazia vibrar a camada de ar em contato com a amostra devido à radiação que estava sendo absorvida.

Cinquenta anos mais tarde, com o desenvolvimento de microfones mais sensíveis, o estudo do efeito fotoacústico foi retomado com as medidas sendo realizadas em gases [27]. Neste caso, o gás absorve os fótons incidentes resultando em aumento na energia cinética das suas moléculas, causando assim uma flutuação na pressão dentro da câmara.

Em 1973, a espectroscopia fotoacústica torna-se uma técnica analítica para a determinação das propriedades ópticas e térmicas de materiais não gasosos [34], particularmente de materiais opacos ou espalhadores de luz. Isto ocorreu porque os Profs. Allan Rosencwaig e Allen Gersho [26][35] desenvolveram o primeiro modelo teórico que permitia a utilização de equações analíticas para descrever o comportamento do sinal fotoacústico, tanto em termos da potência de luz incidente, como da frequência de modulação do feixe de excitação. Este modelo aliado aos experimentos em sólidos foi imediatamente aplicado para a determinação quantitativa para o estudo de propriedades térmicas e ópticas de materiais. Isto fez com que a fotoacústica fosse considerada como um método de grande valia para o estudo de sólidos, e entre suas características, talvez a que mais atraiu a atenção dos pesquisadores foi a possibilidade da técnica permitir a realização de estudos de perfil de profundidade dos entes absorvedores ao longo da amostra teste [36].

No Brasil a fotoacústica foi introduzida pelo Prof. Helion Vargas na década de 80 do século passado [37][38] e é hoje utilizada em pelo menos 15 grupos de pesquisa, com aplicações nas mais variadas áreas da ciência.

2.3 Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico consiste na geração de uma onda acústica, e pode ser observado quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula fechada contendo gás (podendo ser o próprio ar), acoplada a um microfone. A luz é absorvida e transformada em energia térmica por um processo de desexcitação não radioativo. O aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com a mesma. Essa variação de pressão do gás é detectada pelo microfone que resulta no Sinal Fotoacústico, e a intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente.

2.3.1 Comportamento óptico da amostra

Nem toda radiação incidente na amostra é absorvida. Quando um feixe de luz atinge a superfície de um meio parcialmente transparente, poderão ocorrer três processos principais: reflexão, transmissão ou absorção da luz. A penetração da radiação ao longo da espessura da amostra ocorre de tal forma que a intensidade do feixe incidente diminui exponencialmente de acordo com a Lei de Beer. A distância de penetração do feixe na amostra até sua intensidade ser reduzida a $1/e$ caracteriza a absorção óptica do material. O parâmetro que mede essa absorção é chamado de comprimento de absorção óptica l_{β} e especifica o caráter óptico do material. Em materiais opacos, o comprimento de absorção óptica é muito menor que a espessura da amostra, em materiais absorvedores l_{β} é da ordem da espessura da amostra e em materiais transparentes l_{β} é bem maior que a espessura da amostra, conforme mostra a figura, na qual l é a espessura da amostra [26].

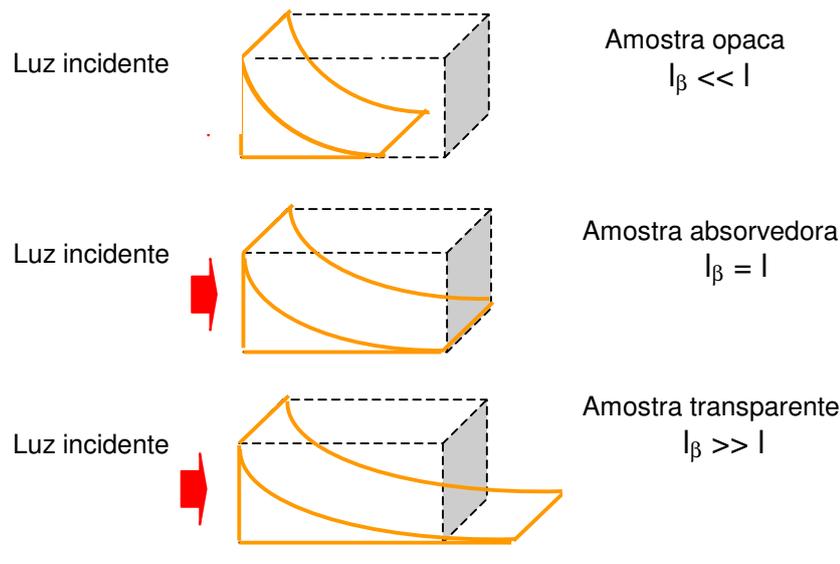


Figura 2.2. Representação esquemática da absorção óptica de materiais parcialmente transparentes, absorvedores e opacos.

O comprimento de absorção óptica é definido como: $l_{\beta} = 1/\beta$, em que β é o coeficiente de absorção óptica do material.

2.3.2 Comportamento térmico

A fração de luz, incidente na amostra, que for absorvida pelas moléculas pode ser convertida em calor. Este calor gerado pode chegar até a superfície da amostra e contribuir para o sinal fotoacústico, dependendo da profundidade do ponto de geração e da frequência de modulação da luz utilizada. O comprimento de difusão térmica, μ_s , é definido como a profundidade na qual a onda de calor gerada pode se propagar até a superfície e contribuir para a geração do sinal fotoacústico. Esse comprimento é definido pela seguinte expressão:

$$\mu = \left(\frac{D}{\pi f} \right)^{1/2}, \text{ em que } \mu \text{ é comprimento de difusão térmica (cm), } D \text{ é a difusividade}$$

térmica (cm^2/s) e f é a frequência de modulação (Hz) do feixe de luz que vai iluminar a amostra sob teste. Portanto, mudando a frequência de modulação, o comprimento de difusão térmica pode ser alterado de tal forma que um perfil de profundidade possa ser obtido. Assim, quando se aplica uma substância sobre a pele e ela penetra através de sua superfície, o sinal fotoacústico revelará a sua profundidade através da intensidade

do sinal. Esse procedimento tanto pode ser realizado com apenas um comprimento de onda, na banda de absorção da substância, quanto em toda a faixa espectral disponível, analisando-se o sinal em cada comprimento de onda.

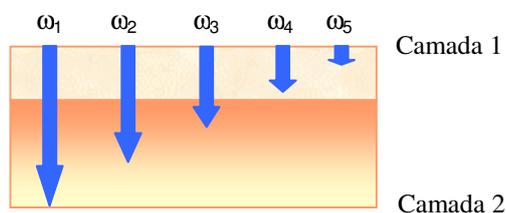


Figura 2.3. Esquema do perfil de profundidade na geração do sinal fotoacústico, aqui $\omega=2\pi f$.

A figura 2.3 mostra um esboço do perfil de penetração numa amostra, ilustrando o que ocorre se a frequência de modulação da luz (ω) é modificada, ou seja, a informação necessária é extraída da amostra analisada em diferentes profundidades. Quanto menor a frequência de modulação da luz maior será a profundidade de geração do sinal fotoacústico. As flechas representam as profundidades até onde o sinal PA é gerado, para a respectiva frequência de modulação. Nesta figura, a frequência cresce a partir de ω_1 até ω_5 .

2.4 Mecanismos de geração do sinal fotoacústico

Ao incidir radiação modulada sobre um material, ocorrem processos de transferência da energia térmica que são gerados nos pontos da amostra onde a radiação foi absorvida. A transmissão de energia térmica para o resto do material, através da condução, caracteriza a difusão térmica (figura 2.1). Este mecanismo foi proposto em 1973 por Rosencwaig e Gersho [35] e pode ser compreendido da seguinte forma: o sinal fotoacústico é considerado como sendo gerado a partir da absorção da radiação eletromagnética modulada, por uma amostra sólida posicionada dentro de uma célula fotoacústica fechada. Na amostra a energia absorvida é convertida, parcialmente ou totalmente, em calor por processo de decaimento não radiativo. O calor gerado no interior da amostra é então transferido para a superfície do gás que está em contato com a amostra a partir do mecanismo de difusão térmica. Como consequência, o gás na superfície da amostra será aquecido e irá se expandir e contrair na mesma frequência de modulação da luz incidente. Neste processo, a coluna de gás fronteira à amostra funciona como um pistão vibratório, produzindo,

assim, as variações de pressão que são detectadas pelo microfone conectado na câmara. Este é o princípio de geração do sinal fotoacústico para o caso do mecanismo de difusão térmica, representado na Fig. 2.4.

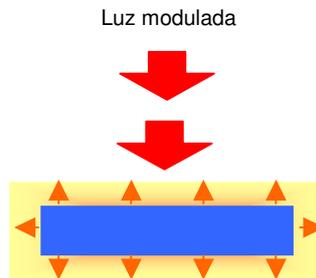


Figura 2.4. Representação da geração do sinal fotoacústico via mecanismo de difusão térmica.

O sinal fotoacústico também pode ser gerado pela expansão térmica da amostra, como mostra a Fig. 2.5. Neste caso ocorrem vibrações mecânicas, devido à expansão e contração induzidas pela absorção da luz modulada, gerando assim ondas acústicas que podem ser detectadas pelo microfone. Este mecanismo foi proposto por McDonald e Wetsel [39] e é conhecido também como modelo do pistão composto, pois ele em geral se soma ao de difusão térmica, dependendo das características do material analisado.

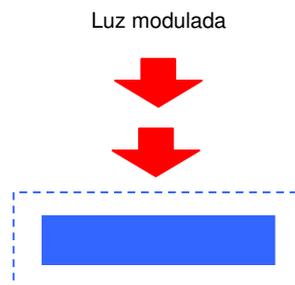


Figura 2.5. Representação da geração do sinal fotoacústico via mecanismo de expansão térmica.

Quando se tem um gradiente de temperatura dentro da amostra, devido à incidência de luz modulada, pode ocorrer a flexão termoelástica conforme mostra a figura 2.6. Este mecanismo de geração do sinal fotoacústico pode ocorrer quando a amostra está presa em suas extremidades e foi proposto por Rousset, Lepoutre e Bertrand [40]. Este efeito em geral depende do gradiente de temperatura dentro da amostra, que faz com que a expansão térmica seja dependente da profundidade com relação à superfície iluminada, flexionando a amostra. Esta flexão periódica faz com que a superfície da amostra produza o sinal fotoacústico.

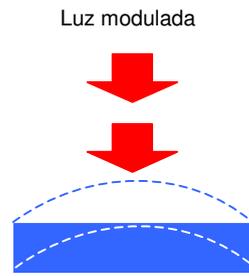


Figura 2.6. Representação da geração do sinal fotoacústico via mecanismo de flexão termoelástica.

Outro mecanismo de geração do sinal é o efeito fotobárico, que consiste na troca gasosa entre a amostra e o gás da célula, podendo ocorrer em amostras fotoquimicamente ativas (figura 2.7). Bults et all [41] constataram este mecanismo em folhas de vegetais, em que a evolução do oxigênio, devido a reações fotossintéticas induzidas pela absorção da luz modulada também contribui para a geração do sinal fotoacústico.

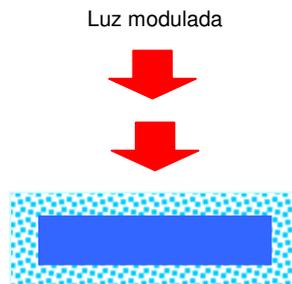


Figura 2.7. Representação da geração do sinal fotoacústico via mecanismo de efeito fotobárico.

Capítulo 3

Modelo Teórico para a Difusão Térmica

Os quatro mecanismos de geração do sinal fotoacústico descritos anteriormente, podem, em geral, ocorrer para condições experimentais diferentes e desta forma demandam que se estabeleça *a priori* como a amostra será afixada na célula fotoacústica. As medidas neste trabalho foram realizadas com as amostras posicionadas no interior da célula fotoacústica e o interesse do trabalho é determinar os espectros de absorção óptica tanto das feridas como das substâncias nelas aplicadas. Embora neste caso não seja necessário conhecer qual o mecanismo dominante que gera o sinal fotoacústico, é provável que o processo de difusão térmica seja dominante. Desta forma, para esclarecer os parâmetros físicos envolvidos nas medidas, faremos a seguir uma breve abordagem do modelo teórico para a difusão térmica, apresentando a abordagem desenvolvida por Rosencwaig e Gersho.

3.1 A célula fotoacústica

Rosencwaig e Gersho [35] desenvolveram um modelo teórico (modelo RG) para explicar o efeito fotoacústico que é baseado na difusão do calor gerado na célula como resultado da absorção da energia luminosa pela amostra. A configuração da célula fotoacústica está representada na Fig. 3.1 e consiste de uma amostra sólida colocada dentro de uma célula, a uma distância l_0 da janela de vedação que deve ser transparente e é posicionada de modo a estar em contato de um lado com o gás (ar) e do outro com o suporte metálico. Considera-se que o ar e o suporte não absorvem a radiação incidente. Um microfone capacitivo é acoplado na parede lateral da célula e em contato com o gás, o qual capta as variações de pressão do ar.

O sinal fotoacústico é produzido quando a amostra absorve um feixe de luz modulado e converte esta radiação em calor gerando ondas térmicas no seu interior. Estas ondas se propagam tanto para a interface amostra-gás quanto para a interface amostra-suporte.

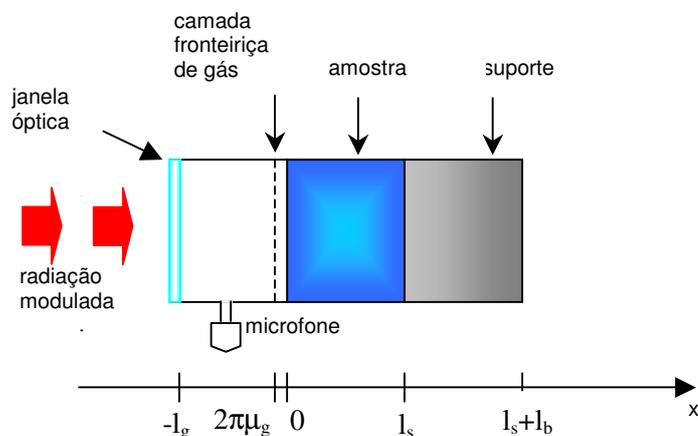


Figura 3.1. Geometria da célula fotoacústica convencional.

Define-se, usando os símbolos do modelo RG, i (g = gás, s = amostra e b = suporte) e também alguns parâmetros físicos, conforme a Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Parâmetros fototérmicos usuais.

| Parâmetro | Denominação | Unidade (CGS) |
|--------------------------------|--|--------------------------|
| l_s | Espessura da amostra | cm |
| l_b | Espessura do suporte | cm |
| l_g | Espessura do gás | cm |
| k_i | Condutividade térmica | cal/s.cm ² °C |
| ρ_i | Densidade de massa | g/cm ³ |
| c_i | Calor específico | J/g.K |
| $\alpha_i = k_i/\rho_i c_i$ | Difusividade térmica | cm ² /s |
| $a = (\omega/2\alpha_i)^{1/2}$ | Coeficiente de difusão térmica | cm ⁻¹ |
| $\mu_i = 1/a_i$ | Comprimento de difusão térmica | cm |
| $\sigma_i = (1+j)a_i$ | Coeficiente complexo de difusão térmica | cm ⁻¹ |
| β | Coeficiente de absorção óptica | cm ⁻¹ |
| η | Eficiência de conversão luz-calor | adimensional |
| r | Coeficiente de reflexão da luz incidente na superfície | adimensional |
| $l_\beta = 1/\beta$ | Comprimento de absorção óptica | cm |

3.2 Condução do Calor

3.2.1 Dedução da equação de Difusão de Calor

Nesta seção apresentaremos uma breve descrição sobre a obtenção das equações necessárias para o tratamento dos dados obtidos nos experimentos. Iniciaremos pela dedução da equação de difusão de calor [37][38].

Considerando um elemento de volume $dV = sdx$, atravessado por um fluxo de calor, Φ , definido como a quantidade de calor que atravessa uma superfície perpendicular ao fluxo por unidade de tempo, como ilustrado na Figura 3.2.

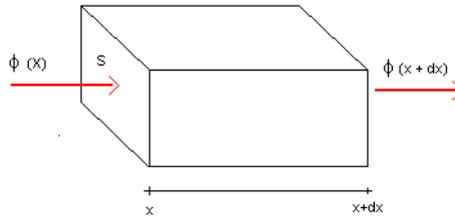


Figura 3.2. Fluxo de calor sobre um elemento de volume dV .

Segundo a lei linear de Fourier, Φ está relacionado com a temperatura da seguinte forma:

$$\Phi = -k \left(\frac{\partial \theta}{\partial x} \right), \quad (3.1)$$

em que k é a condutividade térmica e θ é a temperatura. O sinal negativo aparece porque o fluxo de calor ocorre em sentido contrário ao gradiente de temperatura, fluindo da temperatura mais alta para a temperatura mais baixa.

O elemento de volume dV sofre uma variação temporal na quantidade de calor nele depositado, devido ao gradiente de temperatura. A variação $\frac{\partial Q}{\partial t}$ da quantidade de calor é dada pelo fluxo que entra e sai do volume mais a quantidade de calor ali gerada $F(r,t)$.

$$\frac{\partial Q(r,t)}{\partial t} = \oint_{\text{fluxo}} k \frac{\partial}{\partial x} \theta(r,t) ds + \int_{\text{fonte}} F(r,t) dV \quad (3.2)$$

A quantidade de calor $\frac{\partial Q}{\partial t}$ elevará a temperatura neste volume e a forma desta variação temporal será dada pela calorimetria:

$$\frac{\partial Q(r,t)}{\partial t} = \int \rho c \frac{\partial \theta(r,t)}{\partial t} dV \quad (3.3)$$

em que ρ é a densidade de massa e c é o calor específico.

Para que todo o volume esteja sob a mesma temperatura, θ , admite-se que dV seja suficientemente pequeno. Igualando-se (3.2) e (3.3) temos:

$$\int_s k \frac{\partial \theta(r,t)}{\partial x} ds + \int_v F(r,t) dV = \int_v \rho c \frac{\partial \theta(r,t)}{\partial t} dV \quad (3.4)$$

Pode-se aplicar o teorema da divergência no primeiro membro do lado esquerdo desta equação. Ele estabelece que o fluxo total que atravessa a superfície fechada é igual à integral da divergência da densidade de fluxo no volume por ela limitado, obtendo:

$$\int_v k \frac{\partial^2 \theta(r,t)}{\partial x^2} dV + \int_v F(r,t) dV = \frac{\partial}{\partial t} \int_v \rho c \theta(r,t) dV \quad (3.5)$$

Então:

$$\nabla^2 \theta(r,t) - \frac{\rho c}{k} \frac{\partial \theta(r,t)}{\partial t} + \frac{F(r,t)}{k} = 0 \quad (3.6)$$

Esta é a equação da difusão térmica, com $\frac{\rho c}{k} = \frac{1}{\alpha}$, sendo α a difusividade

$$\text{térmica, e } \frac{F(r,t)}{k} = f(r,t) \quad (3.7)$$

a densidade de calor gerado no elemento dV .

Para o caso unidimensional podemos reescrevê-la como:

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha} \frac{\partial \theta}{\partial t} + f(x,t) = 0 \quad (3.8)$$

3.2.1 Produção de calor na amostra

É assumido que o calor é gerado por uma fonte de luz monocromática com comprimento de onda λ modulada, que incide no sólido com intensidade dada por:

$$I(t) = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos \omega t) \quad (3.9)$$

onde I_0 é o fluxo de luz monocromática incidente (W/cm^2).

A amostra absorve a luz incidente, segundo a lei de Beer:

$$I(x,t) = I(t) e^{-\beta x} \quad (x \geq 0) \quad (3.10)$$

β é o coeficiente de absorção óptica da amostra (cm^{-1}) para o comprimento de onda λ e $I(x,t)$ é a intensidade da luz absorvida. Substituindo (3.9) em (3.10), temos:

$$I(x,t) = \frac{1}{2} I_0 e^{-\beta x} (1 + \cos \omega t) \quad (3.11)$$

Sendo a densidade de potência absorvida,

$$s(x,t) = - \frac{dI(x,t)}{dx} \quad (3.12)$$

derivando a equação (3.11):

$$s(x,t) = \frac{1}{2} \beta I_0 e^{-\beta x} (1 + \cos \omega t) \quad (3.13)$$

Da equação (3.7):

$$f(x,t) = \frac{\beta}{2k} I_0 \eta e^{-\beta x} (1 + \cos \omega t) \quad (3.14)$$

Substituindo (3.14) em (3.8):

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial \theta(x,t)}{\partial t} + \frac{\beta}{2k} I_0 \eta e^{-\beta x} (1 + \cos \omega t) = 0 \quad (3.15)$$

Em que θ é a temperatura e η a eficiência com que a luz absorvida para um comprimento de onda λ é convertida em calor, via processo de relaxação não radiativa.

3.2.2 Equação geral de difusão

Rosencwaig e Gersho desenvolveram um modelo (RG) unidimensional, baseado na condução de calor da amostra para o gás, para explicar o efeito fotoacústico em sólidos. A luz modulada a uma frequência angular $\omega = 2\pi f$ e comprimento de onda λ , incide na amostra de espessura l_s após ter passado pela câmara de gás de espessura l_g . Atrás da amostra encontra-se o suporte de espessura l_b . A câmara de gás é vedada por uma janela de quartzo (transparente à radiação incidente) e para detectar as variações de pressão no gás existe um microfone acoplado a esta câmara.

No modelo RG a expressão para o sinal fotoacústico é dada pela expressão para a variação de pressão na câmara fotoacústica, pois a equação de difusão térmica é aplicada ao meio analisado, para uma dada fonte de calor.

As equações para difusão térmica para cada meio são escritas na forma:

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial \theta(x,t)}{\partial t} + \frac{\beta}{2k} I_0 \eta e^{-\beta x} (1 + \cos \omega t) = 0, \quad 0 \leq x \leq l_s \quad (3.16)$$

(amostra)

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial \theta(x,t)}{\partial t} = 0, \quad -l_g \leq x \leq 0 \quad (3.17)$$

(gás)

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_b} \frac{\partial \theta(x,t)}{\partial t} = 0, \quad l_s \leq x \leq l_s + l_b \quad (3.18)$$

(suporte)

Como o modelo RG considera que não há absorção da radiação incidente pelo gás nem pelo suporte, o termo $f(x,t)$ não aparece nas equações (3.17) e (3.18), não havendo geração de calor nesses meios.

Somente a parte real das soluções é de nosso interesse, e é dada por $T(x,t) = \text{Re}(\theta(x,t)) + \theta_0$ que representa a temperatura na célula relativa à temperatura ambiente θ_0 como uma função da posição e do tempo $T(x,t)$. No presente caso a absorção de luz e a flutuação térmica têm uma dependência temporal de acordo com a parte real de $e^{j\omega t}$.

Substituindo em (3.16), $(\cos \omega t)$ por $e^{j\omega t}$, temos como solução para (3.16), (3.17) e (3.18):

$$\theta_s(x,t) = \left\{ Ue^{\sigma_s x} + Ve^{-\sigma_s x} - Ee^{\beta x} \right\} e^{j\omega t} \quad (3.19)$$

$$\theta_g(x,t) = \theta e^{-\sigma_g x} e^{j\omega t} \quad (3.20)$$

$$\theta_b(x,t) = Be^{[\sigma_b(l_b-x)]} e^{j\omega t} \quad (3.21)$$

$$\sigma_i^2 = \frac{j\omega}{\alpha_i} \quad (3.22)$$

$$\sigma_i = (1 + j)a_i, \quad (3.23)$$

σ_i é o coeficiente complexo de difusão térmica

$$E = \frac{\beta}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} I_0 \eta \quad (3.24)$$

As variáveis complexas U, V, θ e B são especificadas pelas condições de contorno apropriadas.

Em que : $\mu_i = \frac{1}{a_i}$ é o comprimento da difusão térmica.

Como se depreende da equação (3.20), a flutuação espacial da temperatura no gás é fortemente atenuada, tendendo a zero rapidamente com o aumento da distância "x" (relativa à superfície aquecida da amostra), de tal forma que, a uma distância igual a " $2\pi\mu_g$ " (comprimento de onda térmica no gás em que a flutuação de temperatura é praticamente inexistente).

O modelo RG propõe que somente uma fina camada de gás de espessura $2\pi\mu_g$ ($\approx 0,1$ cm, para $\omega/2\pi=100$ Hz) adjacente à superfície aquecida da amostra responde às flutuações periódicas de temperatura, agindo, desta forma, como se fosse um pistão acústico sobre o restante do gás na câmara.

É necessário conhecer a distribuição de temperatura no gás para se calcular a expansão térmica da camada fronteira de gás e conseqüentemente a variação de pressão desejada.

Para uma amostra termicamente fina a onda térmica originada numa de suas faces atinge a outra sem sofrer atenuação, enquanto que numa amostra termicamente grossa, uma onda térmica gerada numa de suas faces tem sua amplitude significativamente atenuada ao atingir a outra face.

Resolvendo-se as equações de difusão para os três meios (amostra, gás e suporte), pode-se encontrar a temperatura na interface amostra-gás ($x = 0$), usando-se o termo de fonte adequado para a região da amostra e as condições de contorno

nas interfaces $x = 0$ e $x = l_s$. As condições de contorno, para meios adjacentes i e j , usadas por RG são:

$$\theta_i = \theta_j \quad (\text{temperatura}) \quad (3.25)$$

Esta condição é a da continuidade da temperatura: supõe-se não haver perda de calor numa interface, despreza-se a resistência térmica de contato entre as superfícies, o que é válido no contato entre a amostra e um gás, mas não entre sólidos, ou entre um sólido e um líquido. Essa condição é muito restritiva, seu significado físico é que a transferência de calor na superfície de separação i e j é instantâneo.

$$k_i \frac{d}{dx} \theta_i = k_j \frac{d}{dx} \theta_j \quad (\text{fluxo de calor}) \quad (3.26)$$

Esta segunda condição garante a continuidade do fluxo de calor entre os dois meios, i e j .

Aplicando as condições de contorno em (3.19), (3.20) e (3.21) determinam-se os coeficientes U, V, B e θ , obtendo-se assim, a distribuição de temperatura na célula em termos de parâmetros ópticos, térmicos e geométricos do sistema.

A temperatura na interface gás amostra é dada por:

$$\theta_s(0) = \frac{\beta I_0}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left(\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right) \quad (3.27)$$

em que:
$$b = \frac{k_b a_b}{k_s a_s} \quad g = \frac{k_g a_g}{k_s a_s} \quad r = (1-j) \frac{\beta}{2a_s}$$

Para cada situação física é necessário especificar determinadas condições, devido à complexidade da expressão para as flutuações de temperatura na amostra. Conhecendo as características do material que será estudado, podemos simplificar bastante a equação, já que vários termos de (3.27) são parâmetros exclusivos da amostra.

3.2.3 O sinal fotoacústico

A principal fonte do sinal fotoacústico é a flutuação térmica periódica. A temperatura no gás oscila no tempo e depende do comprimento de difusão térmica do gás. Este processo periódico de difusão produz uma variação periódica da temperatura dada pela equação (3.20).

$$\theta_g(x,t) = \theta_s(0)e^{-\sigma_g x} e^{j\omega t} \quad (3.28)$$

A oscilação térmica é sentida em uma camada de gás de espessura $x = 2\pi\mu_g$, fora da qual nenhum efeito ocorre sobre o gás.

A média espacial da temperatura dentro desta camada pode ser determinada por:

$$\psi(x,t) = \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} \theta_g(x,t) dx \quad (3.29)$$

Substituindo (3.28) em (3.29) e usando a aproximação $\exp(-2\pi) \ll 1$, encontramos:

$$\psi(t) \cong \left(\frac{1}{2\sqrt{2\pi}} \right) \theta_s(0) e^{j(\omega t - \frac{\pi}{4})} \quad (3.30)$$

Nesta camada $2\pi\mu_g$, o gás é suposto ideal e a pressão constante.

Usando a lei do gás ideal pode-se estimar o deslocamento do pistão de gás para o aquecimento periódico.

$$\delta x(t) = 2\pi\mu_g \frac{\psi(t)}{T_0} \quad (3.31)$$

$$\delta x(t) = \frac{\theta_s(0)\mu_g}{\sqrt{2}T_0} e^{j(\omega t - \frac{\pi}{4})} \quad (3.32)$$

T_0 é a temperatura média na amostra. Assumindo a condição:

$$PV^\gamma = cte \quad (\text{lei da expansão adiabática}) \quad (3.33)$$

P ≡pressão do gás na célula; V ≡volume do gás na célula

γ ≡razão dos calores específicos (c_p/c_v); Derivando (3.33):

$$\delta P = \frac{\gamma P_0 \delta v}{V_0} \quad (3.34)$$

P_0 ≡pressão ambiente; V_0 ≡volume; δv ≡incremento de volume

Para o caso unidimensional:

$$\delta P(t) = \frac{\mathcal{P}_0}{l_g} \delta x(t) \quad (3.35)$$

Substituindo (3.32) em (3.35), temos:

$$\delta P(t) = \frac{\mathcal{P}_0 \mu_g}{l_g \sqrt{2T_0}} \theta_s(0) \cdot e^{j(\alpha x - \frac{\pi}{4})} \quad (3.36)$$

$$\text{denominando, } Q = \mathcal{P}_0 \frac{\theta_s(0) \mu_g}{\sqrt{2T_0} l_g} \quad (3.37)$$

$$(3.36) \text{ torna-se: } \delta P(t) = Q e^{j(\alpha x - \frac{\pi}{4})} \quad (3.38)$$

A equação (3.36) mostra que o sinal fotoacústico aumenta com a diminuição do comprimento da coluna de gás (l_g), e com a redução da temperatura T_0 . O movimento do pistão gera uma defasagem adicional de $\pi/4$ e esse efeito se propaga quase instantaneamente para o microfone.

Para o caso geral em que a coluna de gás é termicamente grossa ($l_g > 2\pi\mu_g$), ocorre alteração na contribuição do gás na dependência do sinal fotoacústico com a frequência, tornando-se aproximadamente nula. O sinal máximo é para $l_g \approx \mu_g$. Com a diminuição da coluna do gás, para $l_g < 2\pi\mu_g$, a defasagem constante de $\pi/4$ diminui progressivamente.

Dessa maneira se evidencia a existência de uma relação direta entre o sinal acústico e a intensidade de luz absorvida pela amostra. O sinal fotoacústico $\tilde{S}_f = \tilde{Q} \cdot e^{-j\pi/4}$ é tomado como sendo a componente não temporal da variação de pressão, contendo uma intensidade $S_f = \|\tilde{S}_f\|$ e uma fase ($\Phi_f = \arctan \left[\frac{\text{Im}(\tilde{S}_f)}{\text{Re}(\tilde{S}_f)} \right]$)

podendo ser representado como um vetor no plano complexo. Assim:

$$\delta P(t) = \tilde{S}_f e^{j\alpha x} \quad (3.39)$$

$$\text{onde: } \tilde{S}_f = S_f e^{j\Phi_f} \quad (3.40)$$

Portanto, das equações (3.38), (3.39), (3.40), tem-se a equação geral para o sinal fotoacústico:

$$\tilde{S}_f = \frac{\mathcal{P}_0 \mu_g \theta(0)}{\sqrt{2T_0} l_g} e^{-j\frac{\pi}{4}} \quad (3.41)$$

$$\theta(0) = |\theta(0)| e^{j\varphi} \quad (3.42)$$

$$\text{Então: } \tilde{S}_f = \frac{\mathcal{P}_0 \mu_g |\theta(0)|}{\sqrt{2T_0} l_g} e^{j\phi} \quad (3.43)$$

$$\phi = \varphi - \frac{\pi}{4}$$

3.2.4 Casos limites

A expressão para as flutuações de temperatura na amostra apresentada anteriormente, determinada por Rosencwaig-Gersho, é muito complicada para o tratamento de um caso geral. Pode-se simplificar a referida expressão analisando os parâmetros ópticos e térmicos do material. A tabela 3.2 apresenta os casos possíveis, de acordo com a opacidade óptica.

Tabela 3.2. Casos especiais, onde $\|S_f\|$ é a amplitude do sinal fotoacústico e $Y = (\mathcal{P}_0 \sqrt{\alpha_g} / \ell_g T_0)$ é um fator de amplitude.

| Propriedades | Termicamente Grosso | | Termicamente Fino | | | |
|--|--|-------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------|
| Térmicas | $l \gg \mu_s$ | | $l \ll \mu_s$ | | | |
| Propriedades ópticas | Transparente | Opaco | | Transparente | Opaco | |
| | $l_\beta \gg l \gg \mu_s$ | $l > l_\beta \gg \mu_s$ | $l \gg \mu_s \gg l_\beta$ | $l \ll l_\beta \ll \mu_s$ | $l \ll \mu_s \ll l_\beta$ | $l_\beta \ll l \ll \mu_s$ |
| Sinal Fotoacústico para fonte arbitrária | $\tilde{S}_f = \frac{(Y\omega^{-1/2} e^{-i\pi/4})}{\sigma_s (g+1)} \int_0^1 e^{\sigma_s x} f(x) dx$ | | | $\tilde{S}_f = \frac{(Y\omega^{-1/2} e^{-i\pi/4})}{\sigma (g+b)} \int_0^1 f(x) dx$ | | |
| Sinal Fotoacústico com absorção de Beer | $\tilde{S}_f = (Y\omega^{-1/2} e^{-i\pi/4}) \frac{\beta_0 (r-1)}{2k_s (\beta^2 - \sigma_s^2) (g+1)}$ | | | $\tilde{S}_f = (Y\omega^{-1/2} e^{-i\pi/4}) \frac{I_0}{(g+b)\sigma_s k_s} (e^{-\beta} - 1)$ | | |
| Fase | $\phi_F = 45^\circ$ | | $\phi_F = 90^\circ$ | $\phi_F = 90^\circ$ | $\phi_F = 90^\circ$ | |
| Dependência com frequência | $\ S_f\ \propto \omega^{-3/2}$ | | $\ S_f\ \propto \omega^{-1}$ | $\ S_f\ \propto \omega^{-1}$ | $\ S_f\ \propto \omega^{-1}$ | |
| Tipo de espectro | Resolvido | | Saturado | Resolvido | Saturado | |

3.2.5 Amplitude e fase

A amplitude e a fase são os principais parâmetros em medidas experimentais com a fotoacústica. A intensidade do sinal depende linearmente da potência luminosa, relacionando-se com o inverso da temperatura no meio, com o inverso do comprimento da coluna de gás, e é proporcional ao perfil de temperatura na interface amostra-gás. A intensidade relaciona-se diretamente com as propriedades de absorção, difusão e profundidade da amostra onde a radiação é absorvida, já que o perfil de temperatura depende da quantidade de radiação transformada em calor.

$$S(\omega, \lambda) = \frac{\mathcal{P}_0 \mu_g(\omega)}{\sqrt{2T_0} l_g} \theta(\omega, \lambda) e^{j\phi}$$

$$\theta(\omega, \lambda) = \frac{\beta(\lambda) I_0}{2k_s [\beta^2(\lambda) - \sigma^2(\omega)]} \left\{ \frac{[r(\omega, \lambda) - 1][b + 1]e^{\sigma_s(\omega)l} - [r(\omega, \lambda) + 1][b - 1]e^{-\sigma_s(\omega)l} + 2[b - r(\omega, \lambda)]e^{-\beta(\lambda)l}}{(g + 1)(b + 1)e^{\sigma_s(\omega)l} - (g - 1)(b - 1)e^{-\sigma_s(\omega)l}} \right\}$$

(3.44)

A equação 3.44 depende de λ e ω , logo o sinal fotoacústico depende do comprimento de onda utilizado e da frequência de modulação com que esta radiação chega até o material a ser estudado.

O sinal fotoacústico possui amplitude e fase. A fase independe da potência de iluminação, podendo ser explorada com vantagens sobre a medida da intensidade. Possíveis variações da potência modificam enormemente a intensidade, enquanto não influenciam a magnitude da fase do sinal. A fase é diferente para cada comprimento de difusão térmica, μ , variando com a profundidade da amostra, onde há geração de calor.

Capítulo 4

Características gerais da pele

4.1 Anatomia e fisiologia da pele

A pele, o maior órgão do corpo humano, reveste toda a superfície do corpo, além de realizar diversas funções, como proteção contra lesões, invasão bacteriana e dessecação. Ela ainda desempenha o papel de: regulação da temperatura do corpo; recepção contínua de sensações do meio ambiente (tato, temperatura e dor) e absorção da radiação ultravioleta solar para a síntese de vitamina D [47]. A espessura da pele pode variar de 0,5 a 4 mm dependendo da região do corpo. A espessura maior é geralmente encontrada em regiões sujeitas a maiores pressões e atrito, como a palma da mão e a planta dos pés.

A estrutura da pele é complexa, possuindo duas camadas principais, a epiderme e a derme, e também várias estruturas anexas em seu interior que são: pêlos, unhas e glândulas sudoríparas e sebáceas, como mostra a Figura 4.1.

A epiderme, avascular, é formada por várias camadas de células (queratinócitos) sobrepostas. A camada mais superficial é o estrato córneo, constituído por várias camadas de células achatadas, mortas, queratinizadas. A camada córnea atribui a função de barreira à pele. Logo abaixo encontram-se as camadas granulosa, espinhosa e estrato germinativo ou basal. O estrato germinativo é a camada mais profunda e importante, pois contém células capazes de divisão mitótica, responsáveis pela regeneração da epiderme, e os melanócitos, células que formam a melanina, pigmento que confere cor à pele [1].

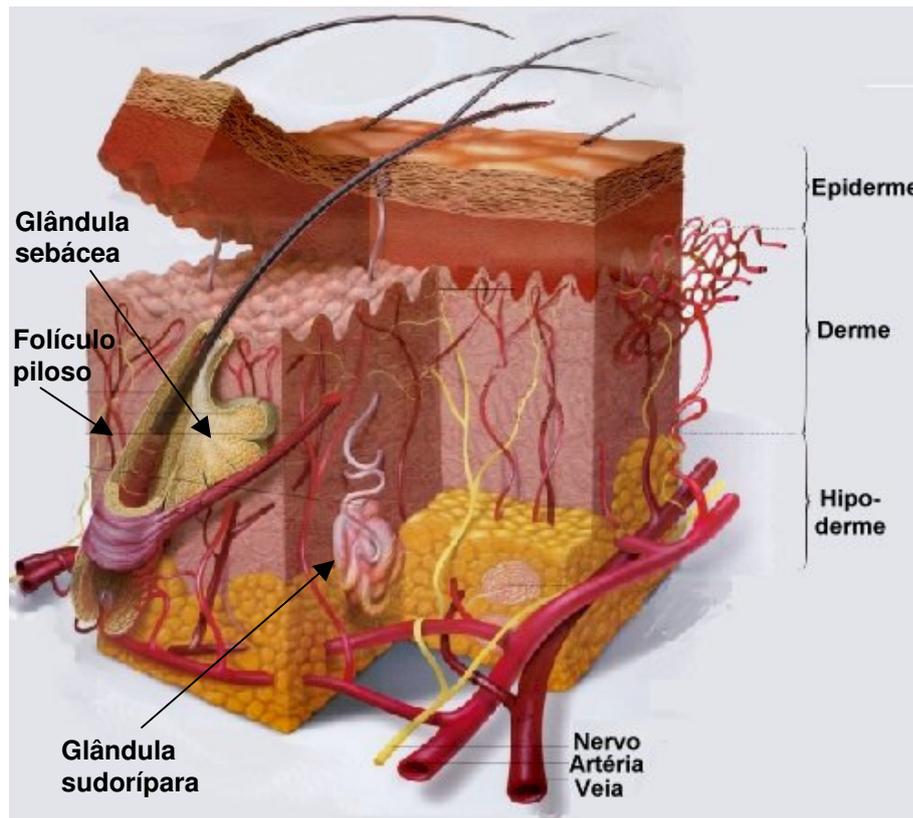


Figura 4.1. Representação das camadas da pele [48].

A derme, camada abaixo da epiderme é constituída de tecido conjuntivo fibroso, rico em fibras colágenas e elásticas, que conferem resistência e elasticidade, respectivamente, à pele. É na derme que se distribuem nervos e respectivas terminações nervosas de dor, tato, temperatura e pressão leve; vasos sanguíneos e linfáticos. A cor rósea da pele origina-se destes vasos sanguíneos existentes [49].

Abaixo da derme está a camada de tecido celular subcutâneo ou hipoderme, que não é parte da pele mas serve de suporte a ela. É rica em gordura e tecido conjuntivo colágeno. Sua espessura pode variar dependendo do grau de deposição de gordura, que pode ser mínima em algumas regiões do corpo e abundante em outras [1].

4.2 Rotas de permeação

A pele humana é uma barreira natural à penetração de partículas, microorganismos e substâncias estranhas, protegendo o corpo contra possíveis substâncias nocivas que se encontram no ambiente [47]. A camada da epiderme,

especificamente o estrato córneo, controla a difusão e a penetração de agentes através da pele. São três os principais vias de permeação na pele [50]:

- através dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas associadas;
- via glândulas sudoríparas;
- através da estrato córneo (Figura 4.2).

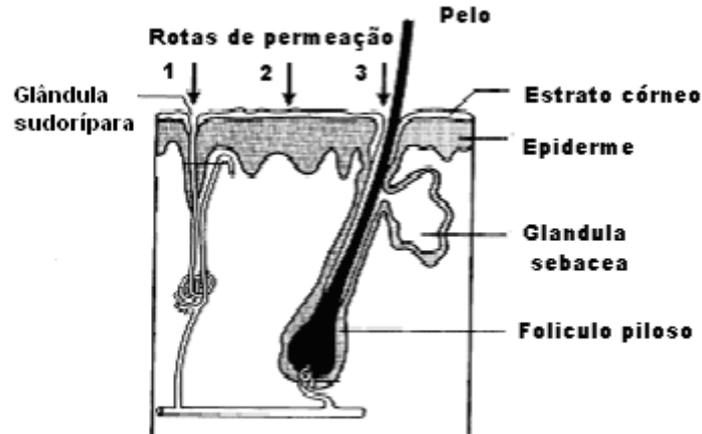


Figura 4.2. Rotas de permeação da pele: (1) via glândulas sudoríparas, (2) através do estrato córneo e (3) via glândulas sebáceas e folículo piloso [50].

O estrato córneo representa a mais importante via de permeação. O estrato córneo apresenta uma estrutura que pode ser comparada a um “muro”, onde os queratinócitos são os tijolos embebidos em um “cimento” composto de múltiplas bicamadas lipídicas de ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres de colesterol. A maioria das moléculas penetram através da pele via esta micro rota intercelular [49].

As moléculas também podem penetrar via transcelular, através dos queratinócitos, como ilustra a Fig. 4.3 [50].

Os anexos também são importantes na permeação, principalmente para a passagem de íons e moléculas polares, pois os mesmos apresentam dificuldade para atravessar o estrato córneo intacto [50].

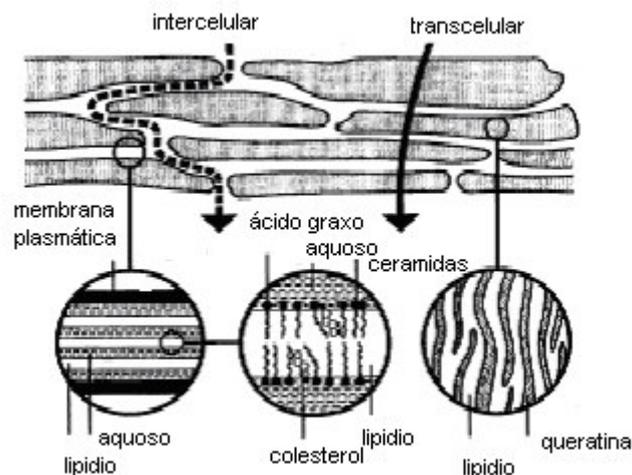


Figura 4.3. Diagrama simplificado do estrato córneo com duas rotas de penetração [50].

O processo de transporte do fármaco através da pele possui uma sistemática envolvendo vários passos. A droga aplicada sobre a pele é liberada da formulação até o estrato córneo. Daí, se difunde através do estrato córneo e a seguir através da epiderme chegando à circulação sistêmica, a partir da derme [50].

Existem alguns fatores que podem prejudicar a permeação de substâncias na pele, como a concentração do fármaco (quanto maior a concentração aumenta a quantidade absorvida), características físico-químicas (o fármaco deve migrar do veículo em favor da pele), integridade e presença de umidade [50].

4.3 Cicatrização

Pelo fato da pele agir como uma barreira protetora contra o ambiente externo, qualquer ruptura em sua integridade necessita ser rapidamente e eficientemente reparada. Tal reparo envolve uma seqüência de eventos coordenados, altamente complexos, que podem ser divididos em três fases que se sobrepõem – inflamação, contração da ferida e reconstituição e remodelação da matriz extracelular [45][46].

4.3.2 Processo da cicatrização

Pelo fato da pele agir como uma barreira protetora contra o ambiente externo, qualquer ruptura em sua integridade necessita ser rapidamente e eficientemente reparada. Tal reparo envolve uma seqüência de eventos coordenados, altamente complexos, que podem ser divididos em três fases que se sobrepõem – inflamação, contração da ferida e reconstituição e remodelação da matriz extracelular[43] [45][46].

Se a lesão é restrita à epiderme, seu reparo começa quase imediatamente e pode selar a ferida dentro de 24 horas. Contudo, quando a derme também é danificada, um reparo temporário, é obtido na forma de um coágulo e nos dias subseqüentes seguem-se as etapas para regenerar as partes perdidas. Estas etapas incluem a migração de células inflamatórias e fibroblastos, e o crescimento de capilares para o interior do coágulo. Estas células e capilares compõem um tecido de granulação contrátil, que puxa as margens da ferida. Paralelamente, a partir das margens da epiderme seccionada, os queratinócitos, das camadas basal e supra basal [44], migram no sentido da ferida para cobrir a superfície desnuda [2].

Este reparo envolve uma seqüência de fenômenos coordenados, que ocorrem de uma forma espaço-temporal altamente organizada [44].

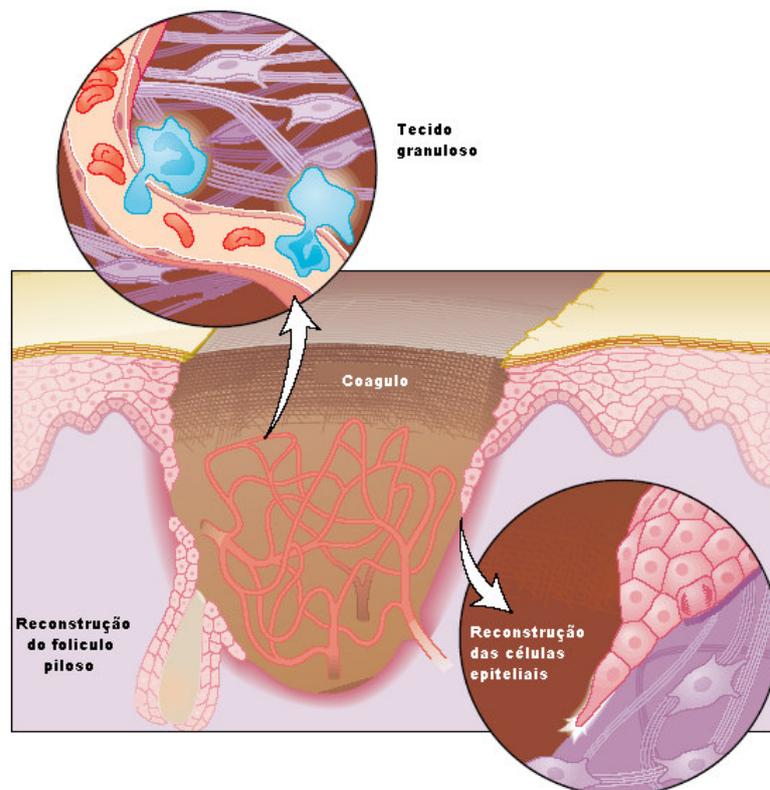


Figura 4.4. Esquema de cicatrização, reconstrução do epitélio [2].

Capítulo 5

Experimental

5.1 Pomadas

Foram usadas três pomadas diferentes cuja composição não será revelada por estarem em processo de patenteamento no INPI.

- Pomada A: contendo extrato.... de própolis.
- Pomada B: contendo extrato de própolis.
- Pomada base (controle): base da pomada, isenta de extrato de própolis.

Todas as pomadas foram manipuladas com a mesma base oleosa.

Para a obtenção dos espectros de referência, foram determinados os espectros de absorção óptica da própolis pura, da base oleosa e das pomadas A e B. Os experimentos foram realizados preenchendo-se o compartimento da amostra na célula fotoacústica com as referidas amostras.

5.2 Amostras de pele

Foram utilizados de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, pesando entre 180-200gramas.

Após tricotomia e assepsia do dorso de cada animal, na altura das patas dianteiras, sob anestesia com tiopental, foram feitas duas incisões circulares, paralelas uma a outra, com auxílio de um delimitador metálico com área conhecida. A seguir a pele demarcada foi excisionada e as feridas lavadas com solução salina.

Imediatamente após a excisão, as feridas do lado esquerdo de cada animal foram tratadas com pomada à base de própolis (pomada A ou B) e as feridas do lado

direito, consideradas controle, foram tratadas com uma base inócua. O tratamento foi diário, inclusive no dia do sacrifício. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais para tratamento, em biotério setorial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, com temperatura de 20° C, ciclo de claro/escuro de 12 horas e ração e água *ad libitum*.

Para as medidas “ex vivo”, inicialmente, foram obtidos os espectros de absorção da pele do rato com e sem ferida, a fim de se conhecer os centros absorvedores da pele.

Após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico e a pele foi removida para análise de permeação das pomadas. Nos dias de experimento as feridas foram tratadas pela manhã. A Figura 5.1 mostra a foto da pele com ferida, para 4 e 10 dias.

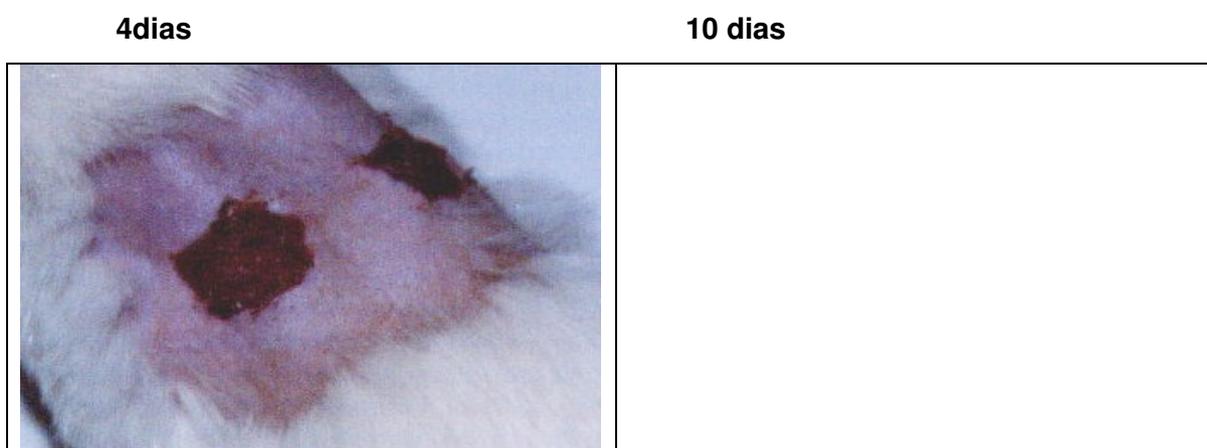


Figura 5.1. Pele com ferida, após 4 e 10 dias de tratamento.

Para a análise de permeação da pomada A foram utilizados dois animais por tempo de tratamento e para a pomada B, apenas um animal por tempo de tratamento.

Uma vez obtidas as amostras elas foram levadas ao Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica para a obtenção dos espectros de absorção em função da evolução da cicatrização.

Previamente à leitura, realizou-se a remoção de excesso de tecido conjuntivo subcutâneo remanescente, quando necessário para que a análise envolvesse somente a pele, excluindo o tecido subcutâneo.

As medidas foram feitas a partir da iluminação na face externa da ferida, ou seja, do lado em que as pomadas foram aplicadas, e também na face interna (dermal), oposta àquela da aplicação Fig. 5.2.

A frequência de modulação da luz foi ajustada em 40 Hz para a medida na face externa e em 10, 15 e 40 Hz quando a iluminação foi na face interna da pele e potencia da lâmpada de 700 W. O mesmo procedimento foi adotado para todos os tempos de tratamento. Além disso, foram obtidas as absorção da pele intacta e das respectivas pomadas usadas no tratamento da cicatrização.

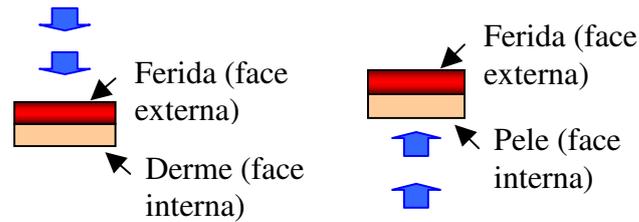


Figura 5.2. Esquema da realização dos espectros de absorção.

5.3 Espectrômetro Fotoacústico

O arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para a realização dos experimentos está mostrado na figura 5.3.

A iluminação foi produzida por uma lâmpada de Xenônio de 1000 W. A luz gerada pela lâmpada passa pelo monocromador onde é difratada em comprimentos de onda. Para eliminar o aparecimento de ordem superior de difração são usados filtros. O feixe de luz que sai do monocromador passa por um modulador mecânico, *chopper*, que tem uma “pá” que gira de maneira estável. Uma fotocélula acoplada ao modulador fornece ao amplificador sintonizado *Lock-in* o sinal de referência, que consiste numa onda quadrada, em relação à qual é estabelecida a fase do sinal fotoacústico.

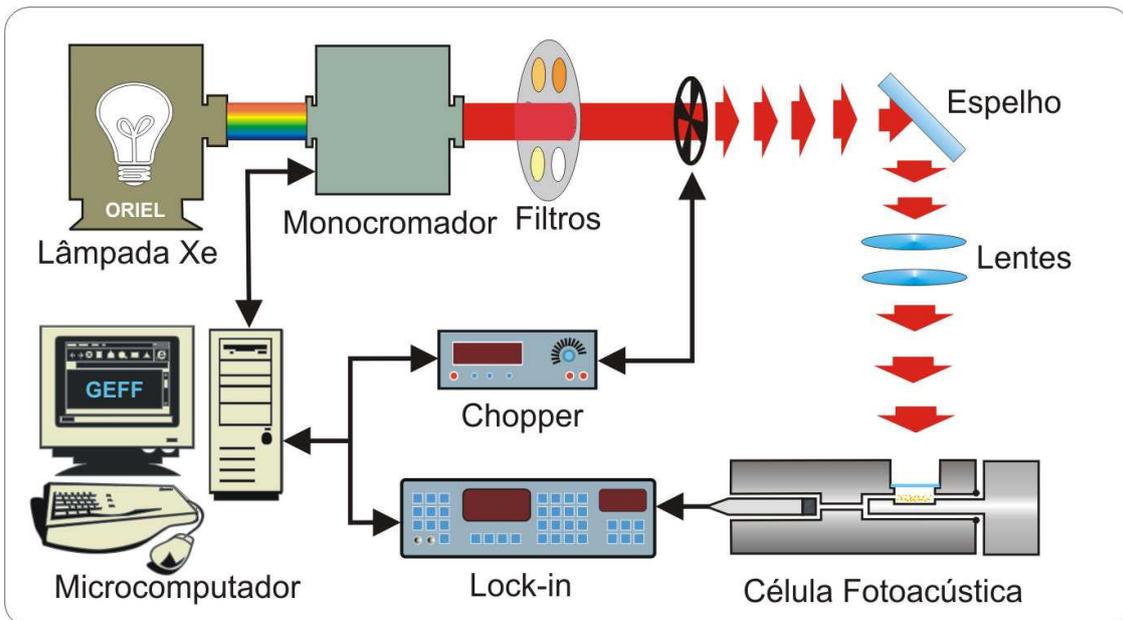


Figura 5.3. Espectrômetro Fotoacústico.

O feixe de luz modulado é focado por duas lentes côncavas, colocadas de forma que o feixe incida verticalmente na célula fotoacústica.

A célula fotoacústica utilizada apresenta forma cilíndrica e está representada na Figura 5.4. A janela óptica utilizada é de quartzo, que é transparente inclusive à radiação ultravioleta. Um microfone capacitivo marca BK acoplado à célula fotoacústica. O sinal gerado pelo microfone é transmitido ao amplificador *Lock-in*, o qual mede a amplitude e a fase de sinais que estão misturados com ruídos, recuperando o sinal fotoacústico. Esse instrumento mede sinais da ordem de alguns nanovolts até 1 volt. Os sinais são obtidos em quadratura, de maneira que se obtém tanto a intensidade quanto a fase do sinal fotoacústico.

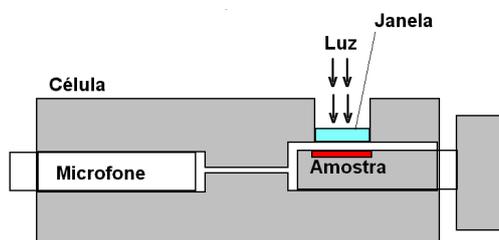


Figura 5.4. Corte lateral da célula fotoacústica convencional.

A variação do sinal fotoacústico com o comprimento de onda da luz é obtida a partir do sistema de aquisição de dados via interface GPIB em um microcomputador. Como a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos

de onda, o sinal é então normalizado pelo sinal de referência obtido em uma amostra de pó de carvão ultrapuro.

Capítulo 6

Resultados e discussão

A estratégia de estudo adotada neste trabalho foi a de utilizar os espectros de absorção óptica obtidos com a fotoacústica em feridas, após a aplicação tópica de pomadas de própolis para identificar as bandas de absorção associadas à própolis como sendo parte destes espectros totais. Desta forma, as bandas da própolis seriam utilizadas como indicadores para demonstrar a penetração ou não da mesma ao longo das feridas. Os resultados serão apresentados e discutidos nesta ordem cronológica.

6.1 Espectros de absorção óptica das pomadas

Os espectros de absorção das pomadas A e B e da base, na região do UV e do visível, foram obtidos entre 250 e 500nm, conforme mostra a Fig. 6.1. As curvas mostram que a pomada A apresenta maior absorção do que a B na região entre 275 e 375 nm. A ausência de absorção da base na região espectral acima de 275 nm evidenciou que foi possível diferenciar os espectros das pomadas A e B daquele da base

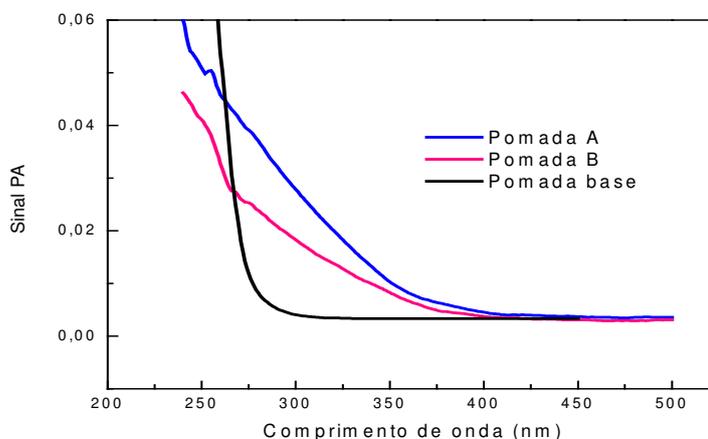


Figura 6.1. Espectro de absorção óptica das pomadas A e B e da pomada base.

Como pôde se observar nos espectros, a absorção da própolis ocorre em uma larga faixa de comprimento de onda superpondo-se com a absorção da base na região abaixo de 275 nm. Para avaliar a contribuição da própolis para os respectivos espectros das pomadas, realizamos ajustes com funções gaussianas conforme mostrado na Figura 6.2. Este procedimento permitiu estimar a área da absorção do princípio ativo presente nas pomadas, ou seja, as pomadas possuem um componente absorvedor a mais em relação à pomada base, que corresponde à própolis. A gaussiana verde representa a absorção da base e a lilás é a curva ajustada que descreve a absorção da própolis.

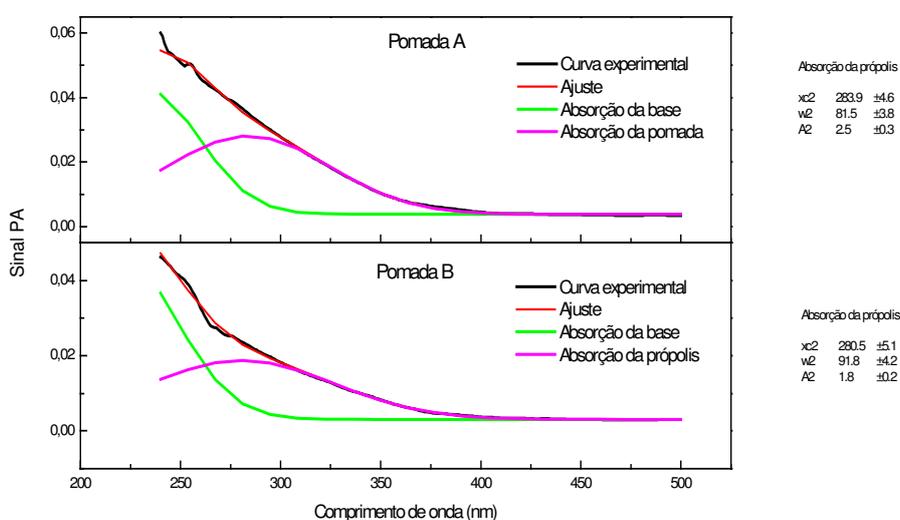


Figura 6.2. Ajustes gaussianos dos espectros de absorção das pomadas A, B e da pomada controle.

6.2 Medidas de absorção na pele *ex vivo*

A Figura 6.3 mostra os espectros de absorção *ex vivo* da pele do rato com e sem ferida, porém sem tratamento com pomada. Na pele com ferida pôde-se observar um pico de absorção em torno de 400 nm que foi atribuído à absorção do sangue. Esta banda não está presente nos dois espectros inferiores obtidos na pele normal. Embora não sejam essenciais para os objetivos deste trabalho é importante mencionar que as bandas de absorção da pele na região do ultravioleta, até em torno de aproximadamente 400 nm, são geradas pelos processos de transição eletrônica dos diversos constituintes que formam o estrato córneo. As bandas em torno de 260 nm são provenientes do DNA e do ácido urucânico e em 300 nm são proveniente da dopa melanina [51].

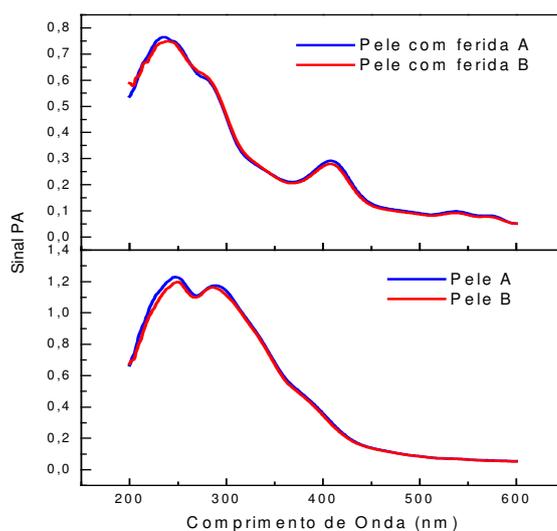


Figura 6.3. Espectro de absorção da pele de rato. (a) pele com ferida e (b) pele intacta.

O próximo passo foi realizar as medidas das feridas tratadas com as pomadas de própolis ou pomada base.

A última aplicação das pomadas ocorreu no dia da morte dos animais e os experimentos foram realizados logo após. Em experimentos piloto, com leituras realizadas após 12 horas de aplicação das pomadas, não foi detectada a presença de própolis, sugerindo que após este período as pomadas já teriam sido absorvidas.

Os valores estimados de comprimento de difusão térmica, que correspondem à profundidade em que o calor gerado contribui para o sinal fotoacústico, foram respectivamente de 36, 30 e 18 μm para as freqüências de modulação de 10, 15 e 40 Hz respectivamente. Levando em conta a difusividade térmica da pele da ordem de $4,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ [52] estes valores podem estar subestimados. Provavelmente este fato seja decorrente do menor grau de hidratação das amostras, em comparação com a pele intacta, portanto, como a difusividade térmica da água é pelo menos três vezes maior do que a da pele, os valores do comprimento de difusão térmica em nossas medidas podem ser maiores do que as apresentadas. A partir destas estimativas consideraremos em nossas análises que os comprimentos de difusão térmica serão sempre pelo menos 50% maiores do que os estimados acima.

A Figura 6.4 mostra os espectros de absorção óptica das feridas tratadas e controle obtidos após quatro dias de tratamento. Neste caso a freqüência de modulação foi de 40 Hz e a incidência da luz modulada foi na face externa da ferida.

O ajuste do espectro para a pomada B foi realizado utilizando-se quatro funções gaussianas, conforme mostram as curvas em verde e em lilás. As bandas em verde em torno de 275 e 400 nm foram atribuídas à absorção da pele e do sangue,

respectivamente, enquanto que a curva lilás foi associada à absorção da própolis. Para que o ajuste com as funções gaussianas reproduzisse o espectro experimental, que é o espectro total, tivemos que adicionar uma outra banda em torno de 340 nm. Esta banda também é proveniente da pele, uma vez que ela também é observada no espectro da amostra controle. Relembramos que a pomada base não apresenta absorção nesta região espectral, conforme mostrado na Fig. 6.1.

Ao se comparar estes espectros nota-se que a absorção gerada pela própolis ocorre em comprimentos de onda muito próximos àqueles onde a pele também absorve. Isto dificultou a decomposição do espectro principalmente porque a concentração de própolis nas pomadas é muito pequena (comunicação pessoal) e assim a intensidade do espectro é determinada majoritariamente pela absorção da pele e do sangue. Além disso, a leitura dos espectros de absorção dependeu da quantidade de pomada aplicada na ferida. Este critério não pôde ser estabelecido, considerando-se remoção da mesma pelo animal, que se coça e faz contato físico com as paredes da gaiola.

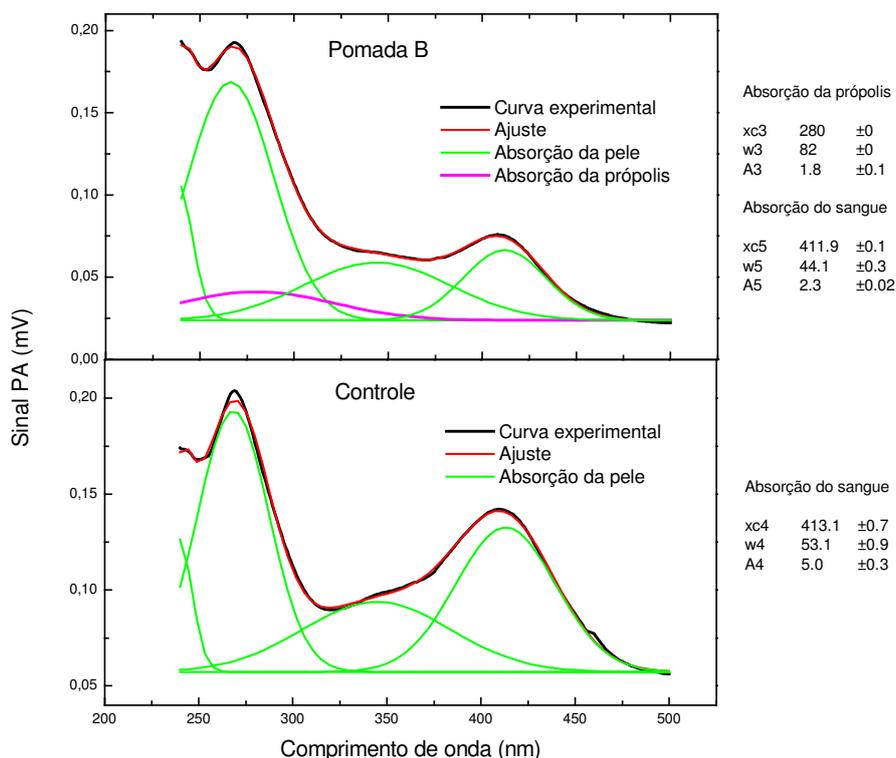


Figura 6.4 Espectro de absorção da pomada B e da pomada controle após quatro dias de tratamento. A frequência de modulação utilizada foi de 40 Hz e a iluminação na face externa das feridas, onde as pomadas foram aplicadas.

Para melhor ilustrar o comportamento dos espectros, as Figs. 6.5 e 6.6 mostram os espectros experimentais e ajustados das feridas tratadas com a pomada B e dos respectivos controles determinados após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento.

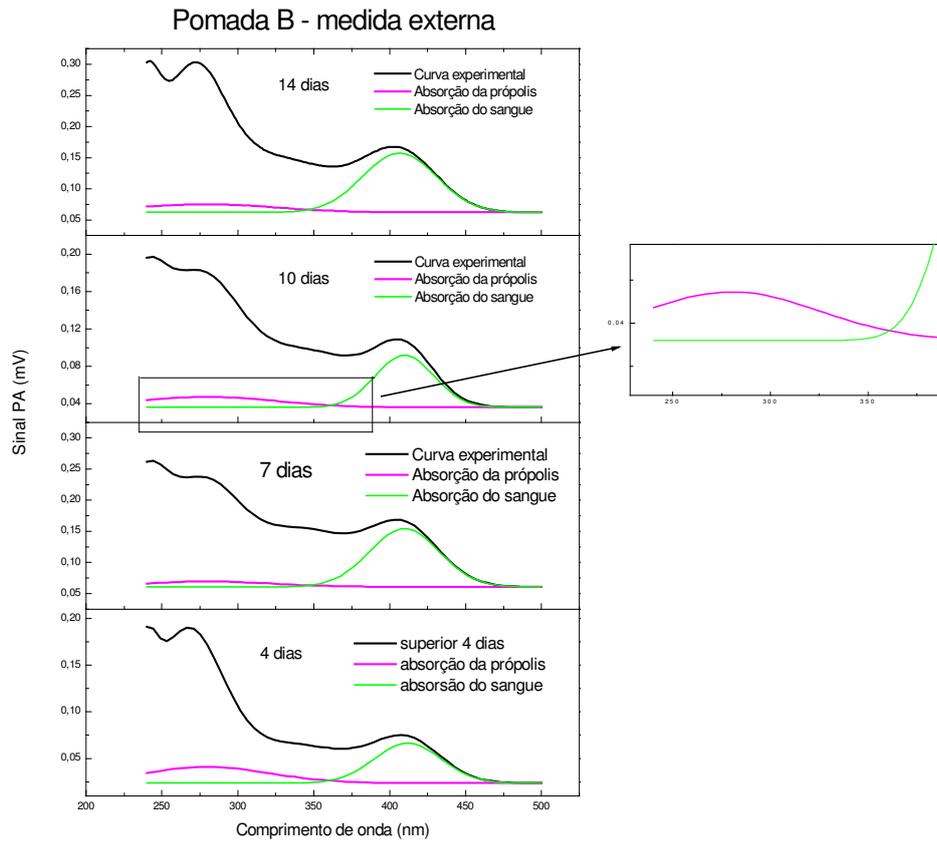


Figura 6.5 Espectros de absorção em função do tempo de tratamento das feridas com a pomada B. Só estão representadas as curvas ajustadas para a própolis e para o sangue.

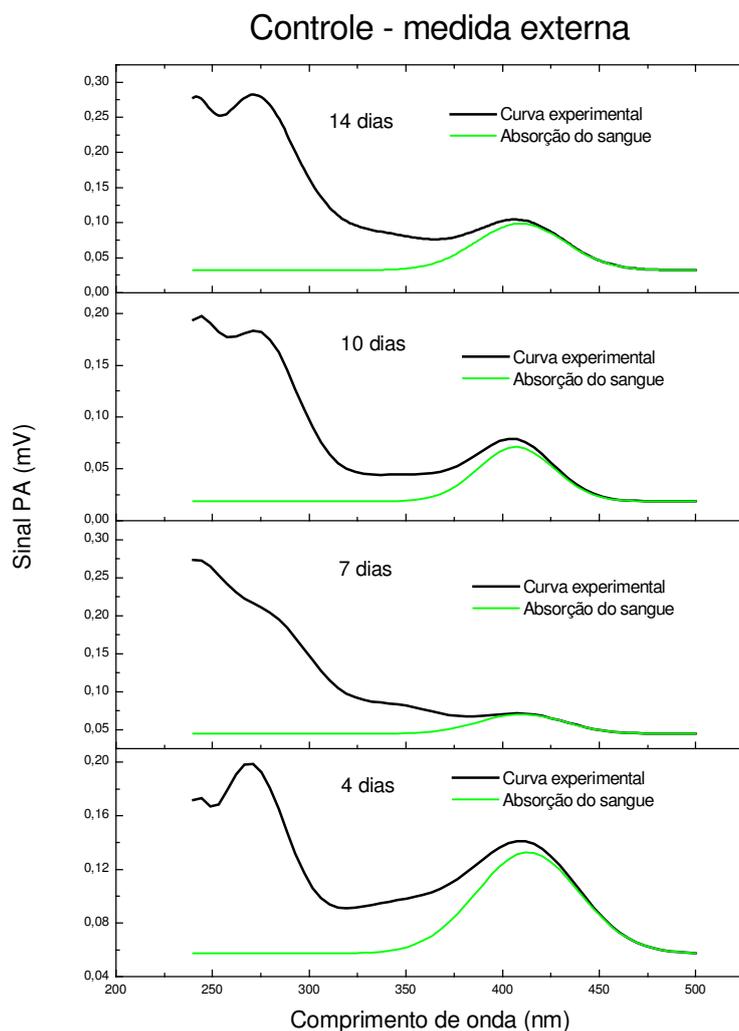


Figura 6.6 Espectros de absorção em função do tempo de tratamento da feridas com a pomada controle. A curva verde foi ajustada para descrever a absorção do sangue.

Outra forma de ilustrar os espectros foi realizando a subtração do espectro da ferida tratada com as pomadas, daquele das amostras controle. Um exemplo deste procedimento está ilustrado na Fig. 6.7. A curva na cor preta é o espectro da ferida tratada durante quatro dias, a azul é o da ferida controle, a lilás da pomada de própolis e a verde é a diferença entre as curvas preta e azul, mostrando a presença da própolis na ferida. Para realçar que a diferença revelou a presença da própolis, a curva foi mostrada novamente em uma escala ampliada na parte inferior da figura.

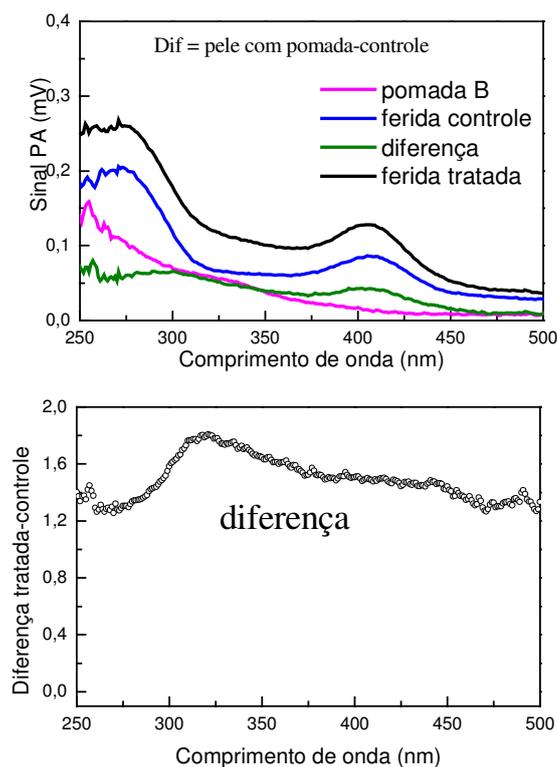


Figura 6.7. Espectro de absorção da ferida tratada com a pomada B, ferida controle, da pomada B e a diferença entre os espectros em destaque, na parte inferior da figura.

Apesar dos procedimentos de identificação da própolis, ajustando os espectros com funções gaussianas ou obtendo-se a diferença entre as curvas, terem se mostrado eficientes para detectar a presença da própolis nas feridas, os resultados das leituras externas, até agora, não permitem afirmar se ocorreu permeação da pomada através da ferida. Isto porque a partir da iluminação externa da ferida não é possível excluir a possibilidade de que o sinal fotoacústico atribuído à própolis seja gerado na superfície da ferida. Assim, os resultados anteriores foram suficientes apenas para detectar a presença da própolis nas feridas.

Nosso próximo passo foi então modificar o posicionamento das amostras no interior da célula fotoacústica de modo que o sinal fosse gerado na face interna (dermal), ou seja, do lado oposto ao que recebeu as pomadas. Com este procedimento, ao se considerar o comprimento de difusão térmica para as medidas nas frequências de 10, 15 e 40 Hz a aproximadamente 50 μm , qualquer evidência da presença da própolis nos espectros demonstraria assim permeação da pomada ao

longo da espessura da ferida, uma vez que as espessuras totais das amostras medidas foram sempre da ordem de 500 μm .

A figura 6.8 mostra os espectros obtidos para as feridas tratadas com a pomada B e pomada base, para o tratamento realizado durante dez dias.

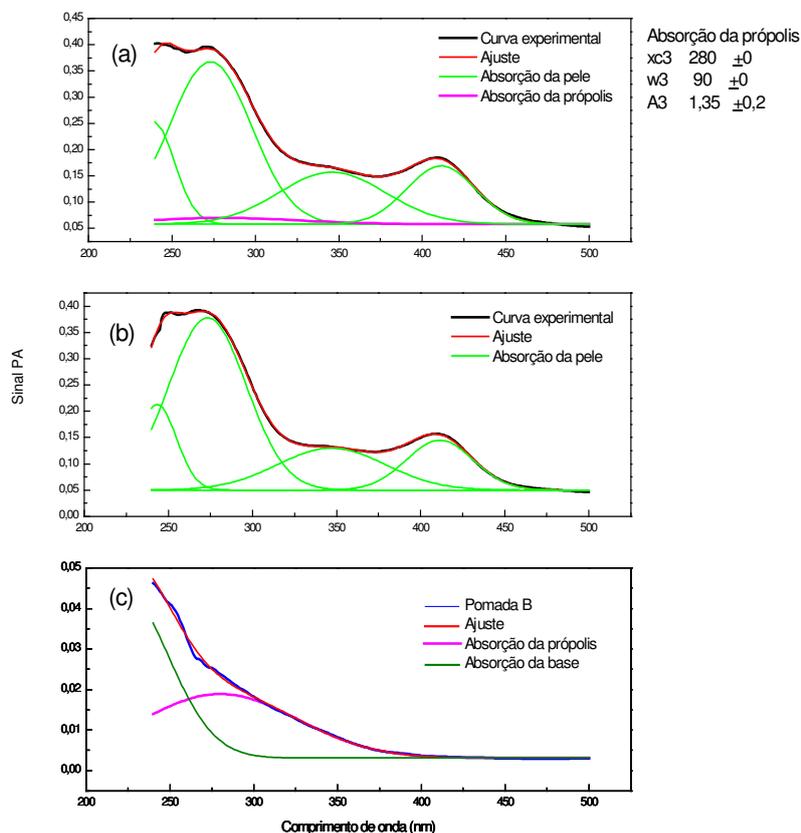


Figura 6.8. Espectro de absorção nas feridas tratadas por dez dias. Iluminação na face interna e freqüência de 15 Hz: (a) ferida tratada com pomada B; (b) ferida controle; e (c) ajuste da pomada B.

Nesta forma de medida, a contribuição da própolis para o espectro total foi menor se comparado ao experimento com a iluminação na face externa. Uma vez que o sinal fotoacústico é gerado na superfície do tecido, a presença da própolis neste local demonstra a eficiência dos componentes da formulação em possibilitar a permeação do componente ativo, ou seja, o extrato de própolis.

As curvas gaussianas verdes representam as absorções da pele, enquanto que a curva lilás se refere à absorção da própolis. Embora com muito baixa intensidade,

pôde-se observar a contribuição da própolis para o espectro total, indicando que a pomada se propagou através da ferida até atingir a derme superficial .

Para quantificar a penetração de cada produto em função dos dias de tratamento adotou-se o procedimento descrito a seguir: Os espectros da pomada controle foram ajustados com quatro gaussianas e os espectros das feridas tratadas com as pomadas A e B foram ajustadas com uma gaussiana a mais, que seria da absorção da própolis, como mostra a Fig. 6.8. Ao fixar a banda da própolis com o centro em 280 nm, minimizou-se as dificuldades de ajuste e assim quando presente a contribuição da própolis pôde ser estimada. Este procedimento foi adotado em todas as medidas que foram realizadas na face interna da pele, em todas as quatro etapas de tratamento, ou seja, após 4, 7 10 e 14 dias.

A Figura 6.9 mostra um outro exemplo do espectro de absorção, para o tratamento realizado com a pomada A e a pomada controle. Neste caso não foi possível observar a presença da própolis nesta região de profundidade (15Hz), pois a área da gaussiana lilás é praticamente nula.

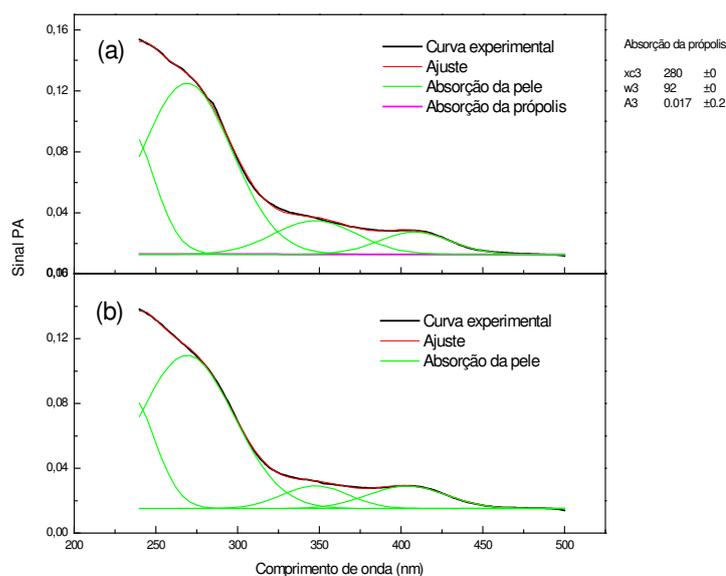


Figura 6.9. Espectro de absorção nas feridas tratadas por 7 dias. Iluminação na face interna com freqüência de 15 Hz: (a) ferida tratada com pomada A e (b) ferida controle.

Uma vez apresentados os exemplos sobre os principais resultados obtidos, é importante considerar que o comportamento óptico da pele depende de diversos fatores causadores de espalhamento de luz que podem interferir nos resultados finais.

Entre estes fatores está a falta de planicidade da pele, cuja rugosidade interfere no processo de absorção da radiação incidente e da propagação do calor.

Um esquema do comportamento óptico da pele está mostrado na Fig. 6.10. Entre 4% a 7% da radiação incidente é refletida devido à mudança do índice de refração do ar ($n_{ar} = 1,0$) e do estrato córneo ($n_p = 1,55$) [51]. Parte da radiação que penetra no interior da pele também é refletida devido à mudança do índice de refração entre o estrato córneo e a camada da epiderme e entre a epiderme e a derme. Além disso, a pele possui uma estrutura complexa e existe muita diferença entre as peles de diferentes animais. As espessuras da pele podem variar, podendo ter mais ou menos gordura. Estes são fatores que interferem nos resultados.

No caso das feridas é necessário considerarmos a evolução da estrutura da mesma durante o processo de cicatrização, conforme ilustram as fotos mostradas na Fig. 6.11. Nota-se que o crescimento do epitélio modifica a superfície da ferida que evolui para a restituição do estrato córneo. Dependendo estágio, a pomada pode penetrar mais ou menos.

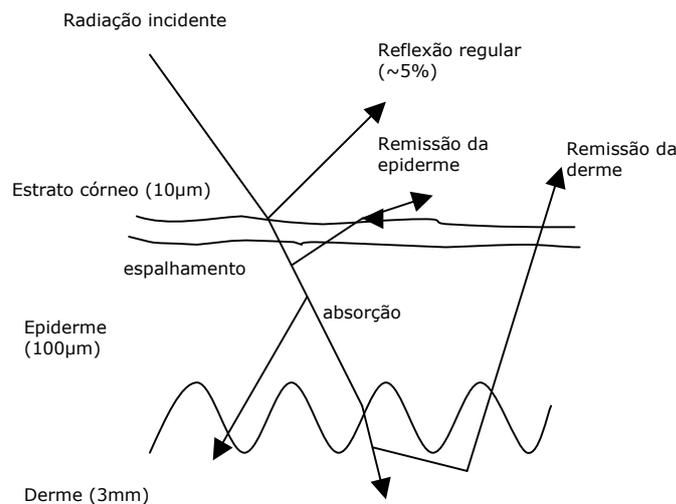


Figura 6.10. Diagrama esquemático da propagação da luz na pele [51].

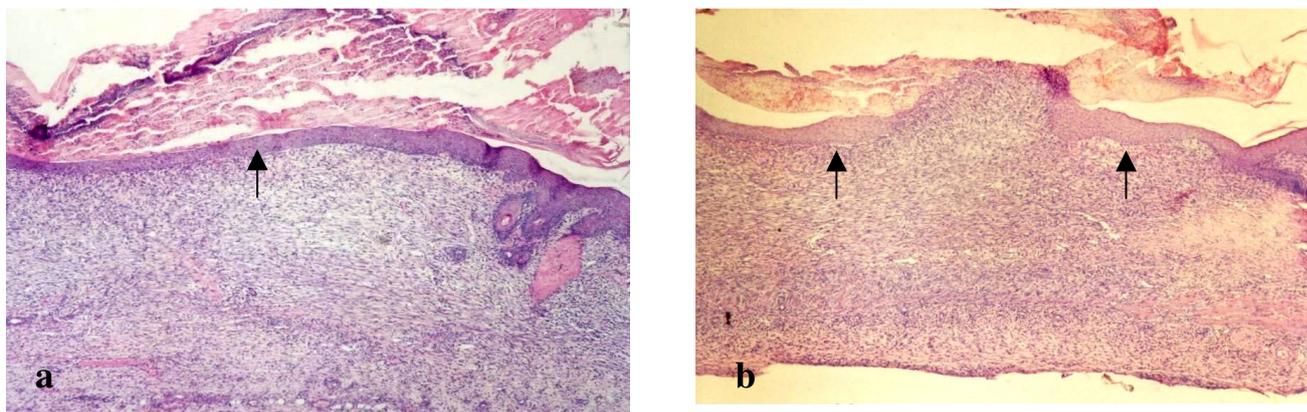


Figura 6.11. Corte histológico de feridas cutâneas após 14 (a) e 10 (b) dias de excisão da pele. Em (a), observar a integridade da epiderme (seta). Em (b) observar a presença de duas áreas de reepitelização (setas). Em ambas é possível observar a falta de homogeneidade da superfície. Coloração com Hematoxilina e Eosina. Objetiva de 10X.

6.3 Determinação da taxa de penetração em função do tempo de tratamento

O procedimento de ajuste com funções gaussianas foi adotado para os resultados obtidos em todas as quatro etapas de medidas e também para os espectros de absorção óptica obtidos em todas as frequências de modulação da luz utilizada. Os espectros de absorção da pomada A foram repetidos em uma nova seqüência de tratamento para verificar a reprodutibilidade dos dados. Observamos que, apesar das dificuldades enfrentadas para a realização das medidas em função das variáveis já mencionadas, o comportamento dos espectros foi repetitivo.

A Figura 6.12 mostra as intensidades de absorção da própolis em todas as frequências para os quatro dias e para as duas pomadas. Os resultados da repetição com a pomada A estão mostrados na parte inferior da figura.

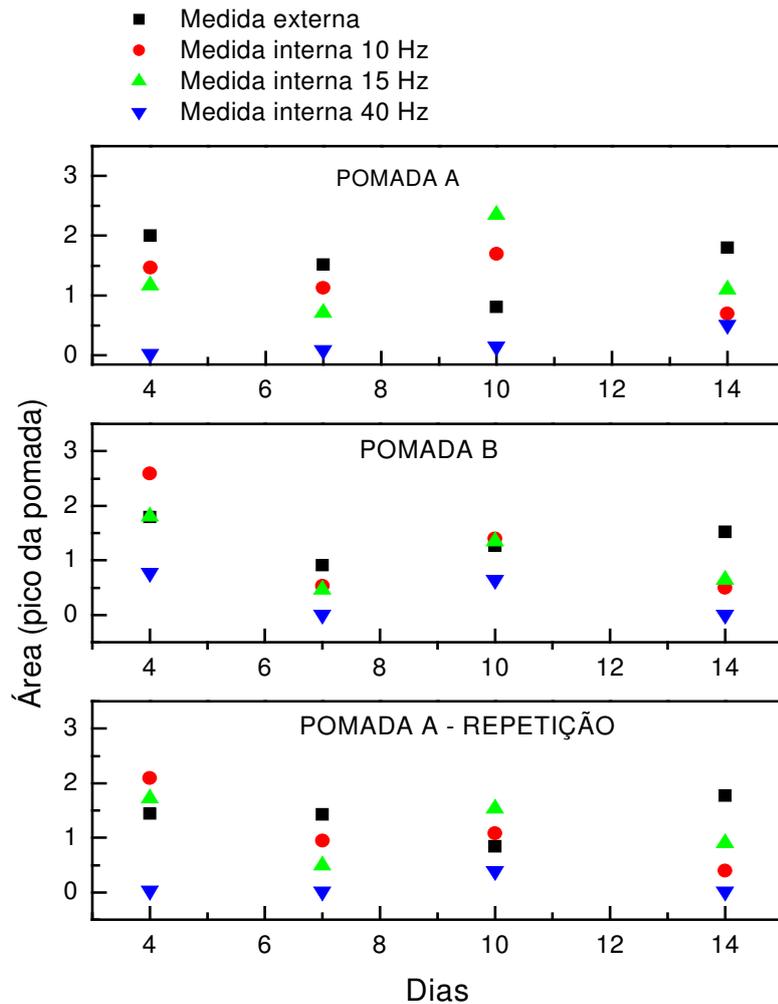


Figura 6.12 Área sob a gaussiana da absorção da própolis em função dos dias de leitura, para as pomadas A, B e repetição da pomada A.

As figuras acima demonstram que para ambas as pomadas de própolis, a menor absorção da própolis foi detectada com leituras realizadas em 40Hz, que representa a leitura realizada em região mais profunda da derme, em comparação com as leituras em 10 e 15 Hz. Este resultado sugere que provavelmente as pomadas foram absorvidas na derme superficial onde ocorre uma abundante rede capilar (autor).

A observação ao longo do tempo, com leituras em 10Hz, mostrou que as absorções das pomadas A, B e a repetição da pomada A evoluíram de forma semelhante. O mesmo foi constatado para 15 e 40Hz.

Também pudemos observar que a própolis teve maior penetração no 4º e 10º dias de tratamento (figura 6.13). As menores taxas foram observadas ao 7º e 14º dias.

Estes resultados podem ser explicados levando-se em consideração o processo de regeneração vascular e o reestabelecimento da camada córnea. Experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa em cicatrização cutânea demonstraram que aos 7 dias de tratamento, independentemente do fármaco utilizado, ocorre um aumento brusco no número de vasos sanguíneos neo-formados, com posterior degeneração, já observada aos 10 dias, visando a remodelação (comunicação pessoal). Correlacionando estes dados com nossos resultados, podemos supor que a menor taxa de permeação constatada aos 7 dias está relacionada com uma maior absorção vascular da própolis. Aos 14 dias, provavelmente a menor taxa de permeação possa ser atribuída ao reestabelecimento da função de barreira atribuída à camada córnea já reestruturada.

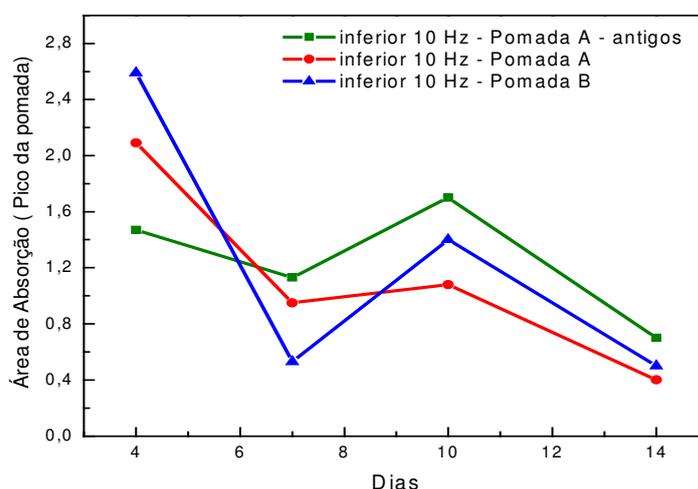


Figura 6.13 Evolução da penetração das pomadas de própolis para a freqüência de 10 Hz, para os quatro dias de medidas, ou seja, quatro, sete, dez e 14 dias de tratamento.

Portanto, a espectroscopia fotoacústica permitiu a realização do acompanhamento do processo de permeação das pomadas, demonstrando que a formulação utilizada foi eficiente para promover a penetração das pomadas A e B ao longo das feridas.

Para finalizar nosso estudo faremos uma comparação com os resultados previamente determinados pela Prof. Luzmarina Hernandez, que avaliou a evolução da cicatrização a partir da avaliação histológica das feridas, realizadas nas mesmas condições experimentais.

6.4 Comparação dos resultados obtidos com a fotoacústica com a evolução da cicatrização via estudo histológico

Nossos resultados podem ser correlacionados com os resultados obtidos nas figura 6.16 e 6.17 onde pode-se observar que o maior estímulo para o crescimento do epiderme, demonstrado através da análise da proliferação celular e do comprimento do epitélio de feridas tratadas com as pomadas A e B respectivamente, aconteceram nos 10 primeiros dias de tratamento. Aos 14 dias, os resultados não foram significativos em ambos os experimentos.

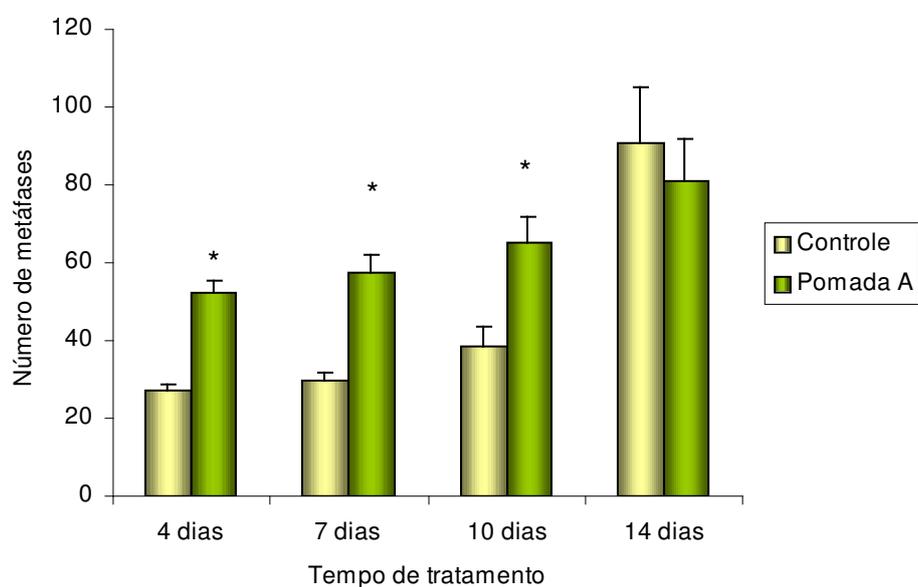


Figura 6.16. Proliferação celular nas feridas tratadas com a pomada A e com a pomada controle.

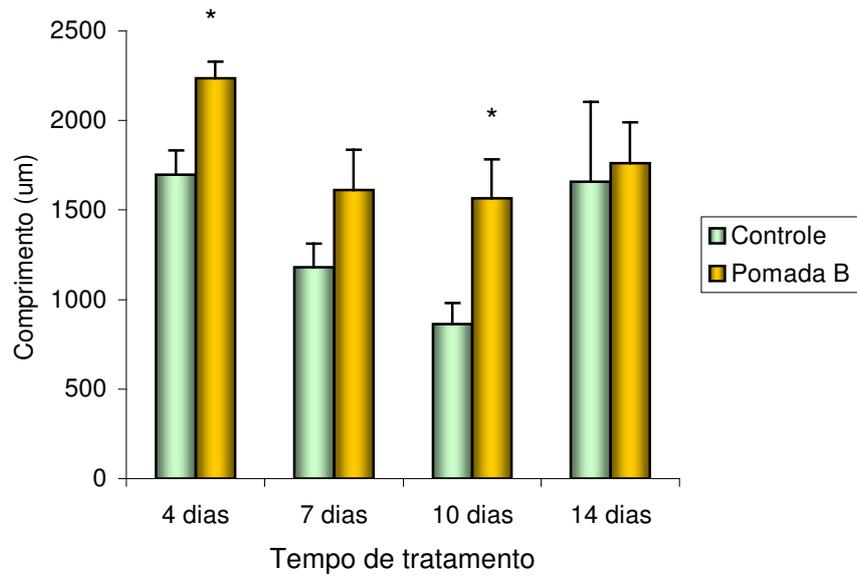


Fig. 6.16. Crescimento do epitélio nas feridas tratadas com a pomada B e com a pomada controle.

Capítulo 7

Conclusões

Concluimos que a Espectroscopia Fotoacústica é um método eficaz e viável para avaliar a penetração de fármacos durante o processo de cicatrização de feridas bem como o perfil de profundidade de substâncias em amostras não homogêneas.

Neste trabalho constatamos que :

- as pomadas A e B de própolis apresentaram semelhante evolução no perfil da taxa de permeação em feridas;
- em diferentes frequências de modulação, foi possível obter o perfil de distribuição das pomadas de própolis na pele;
- a estratégia de se incidir a luz modulada, que gera o sinal fotoacústico na face interna da pele, no lado oposto ao da ferida onde se aplicou o medicamento, permitiu assegurar que a própolis permeou através dos tecidos;
- fatores como a barreira física promovida pela da casca da ferida e pelo epitélio em regeneração, bem como os componentes utilizados na formulação das pomadas foram fatores determinantes para a obtenção da taxa de permeação:
- há uma coincidência entre a melhora no processo de cicatrização da ferida tratada com o processo de permeação da própolis.

Os resultados deste trabalho indicam que esta técnica pode ser ampliada para se estudar a penetração de fármacos na pele.

Os resultados deste trabalho indicam que esta técnica pode ser ampliada para se estudar a penetração em feridas de outras formulações de interesse na área farmacêutica

Referências Bibliográficas

- [1] KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e Biologia Celular*, Editora Eletrônica, (319-322), 2004.
- [2] MARTIN, P. *Wound Healing – Aiming for Perfect Skin Regeneration*, Science, vol. 276 1997.
- [3] BANKS, W.J. *Histologia Veterinária Aplicada*, Editora Manole Ltda, 2ª edição, 418-423, 1992.
- [4] CUTRONEO, K.R. *Gene therapy for tissue regeneration*. J Cell Biochem. 88(2) 418-25 2003.
- [5] BROWN, G.L., NANNEYM, L.B., GRIFFEN, J. et al. *Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor*. N Engl J Méd. 321(2) 76-80 1989.
- [6] THOMAZ, J.B., HERDY, C.D.C. *Cicatrização das feridas. Fundamentos de cirurgia vascular e angiologia*. 1ªed. São Paulo: F Ed Byk; 1997.
- [7] SEHN, E. *Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação de substâncias na pele humana in vivo*. Monografia apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá-PR, 2004.
- [8] NUGLISCH, L. E. R. *Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação e a distribuição de medicamentos na unha humana*, dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá-PR, 2003.
- [9] PEDROCHI, F. *Estudo de sistemas biológicos “in vitro” e “in vivo” utilizando a Espectroscopia Fotoacústica*, , dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá-PR, 2004.
- [10] SEHN E, SILVA KC, RETUCI VS, et al. *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment*, Review of Scientific Instruments 74 (1): 758-760 Part 2 JAN 2003.
- [11] SEHN E, SILVA KC, BENTO AC, et al. *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the potentiality of bee-propolis as UV protector: In vivo test in humans*, Journal de Physique IV 125: 681-683 JUN 2005.
- [12] NUGLISCH LER, DIAS DT, SEHN E, et al. *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail*, Journal de Physique IV 125: 631-633 JUN 2005.
- [13] PEDROCHI F, SEHN E, MEDINA AN, et al. *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin in vivo*, Journal de Physique IV 125: 757-759 JUN 2005.
- [14] ROSENCWAIG, A. *Biological studies with photoacoustic spectroscopy*, Bulletin of The American Physical Society 21 (3): 221-221 1976.
- [15] ROSENCWAIG, A. *Photoacoustic Spectroscopy of biological-materials*, Science 181 (4100): 657-658 1973.
- [16] POULET, P., CHAMBRON, J. *In vivo photoacoustic-spectroscopy of the skin*, Journal de Physique 44 (NC-6): 413-418 1983.
- [17] GIESE, K., KOLMEL, K. *A photoacoustic hydration study of human stratum-corneum*, Journal de Physique 44 (NC-6): 373-378 1983
- [18] PINES, E. J. Soc. Cosmetic Chem., 29, 559, 1978.

- [19] DOS ANJOS, F.H., ROMPE, P.C.B., MANSANARES, A. M., et al. *Sunscreen effects in skin analyzed by photoacoustic spectroscopy*, Journal de Physique IV 125: 797-799 JUN 2005.
- [20] BAESSO, M. L. SNOOK, R.D. ANDREW, J. J. *Fourier-transform infrared photoacoustic-spectroscopy to study the penetration of substances through skin*, DE PHYSIQUE IV 4 (C7): 449-451 JUL 1994
- [21] ALCANTARA, P. Jr.; *Espectroscopia Molecular*, 2002.
- [22] R. Eisberg, R. Resnick, *Física Quântica*, Cap. 11, Campus, RJ, 1979.
- [23] ATVARS, T.D.Z., MARTELY, C. *Espectroscopia eletrônica de absorção*, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Disponível em www.chemkeys.com, 2002.
- [24] INPE, *Interação da radiação com a matéria*, www.inpe.br, 2005.
- [25] BELL, A. G. *On the Production and Reproduction of Sound by light*: Am. J. Sci., 20, 305 (1880).
- [26] ROSENCWAIG, A. *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*, University of California, Vol. 57, 1980.
- [27] PFUND, A. H. Science 90, 326, 1939.
- [28] TYNDALL, J. Proc, R. Soc. London 31, 307 (1881).
- [29] RONTGEN, W. C., Philos. Mag. 11, 308 (1881).
- [30] BELL, A. G.; Philos Mag. 11, 308 (1881).
- [31] RAYLEIGH, L.; Nature 23, 274 (1881).
- [32] PREECE, W. H.; Proc. R. Soc. London 31, 506 (1881).
- [33] MERCANDIER, M. E. e HEBD, C. R. Serv. Acad. Sci., 92 (409) 1881.
- [34] ROSENCWAIG, A.; Phys. Today, 47, 592A (1975).
- [35] ROSENCWAIG, A; GERSHO, A. *Theory of Effect with solids*, J. Appl. Phys., 47, 64 (1976).
- [36] NERY, J.W., PESSOA, O., VARGAS, H., et al. *Photoacoustic-spectroscopy for depth-profile analysis and herbicide monitoring in leaves*, Analyst 112 (11): 1487-1490 NOV 1987
- [37] PESSOA JUNIOR, O. Aplicações de medidas de fase do efeito fotoacustico, Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 1985.
- [38] CESAR, C.L *Efeito Fotoacústico em sólidos*, Tese de Mestrado apresentada à UNICAMP, 1979.
- [39] MCDONALD, F.A., WETSEL, G. C. Jr., Appl. Phys., 49, 2313 (1978).
- [40] ROUSSET, G., LEPOUTRE, F., BERTRAND, L., J. Appl. Phys., 54, 2383 (1983).
- [41] BULTS, G., HORWITZ, B. A., MALKIN, S.; CAHEN, D., Biochim. Biophys. Acta, 679, 452 (1982).
- [42] KALIA, Y.N. GUY, R.H. *Modeling transdermal drug release*, Ad. Drug Delivery Reviews, 48 (159-179) 2001.
- [43] MARTIN, P. LEIBOVICH, J. *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*, Review Trends in cell Biology, 2005.
- [44] AGREN, M.: *Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds*. Dermatol. Res. 291: 583-590 (1999).

- [45] CHITHRA, P; SAJITHLAL, G.B. e CHANDRAKASAN, G.: *Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix oh healing dermal wounds in rats*. J. Ethnopharmacol., 59:179-186 (1998).
- [46] WEARING, H.J e SHERRAT, J.A.: *Keratinocyte growth factor sinalling: a mathematical model of dermal-epidermal interation in epidermal wound healing*. Math. Biosc. 165: 41-62 (2000).
- [47] TUCKER, I.G. *Transdermal Drug Delivery*. Australian Pharmacist., 1992.
- [48] WEN, C. L., *Conheça a sua pele*, <<http://www.saudeparavoce.com.br/prevensão>>
- [49] BLANK, I. H. *Cutaneous Barriers*. J Invest. Dermatol, v.4, 1965.
- [50] BARRY, B. W. *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery*. European Journal of Pharmaceutical Sceince, v.4, 2001.
- [51] ROX ANDERSON, R., *The Optics of Human Skin*, The Journal Investigative Dermatology, 77:13-19,1991.
- [52] BROWN SM, BAESSO ML, SHEN J, et al., *Thermal-diffusivity of skin measured by 2 photothermal techniques*, Analytica Chimica Acta 282 (3): 711-719 OCT 29 1993