Universidade Estadual de Maringá

Pós-graduação em Física

Gisele Strieder Philippsen

MÉTODOS FOTOTÉRMICOS APLICADOS AO ESTUDO DA PENETRAÇÃO E DA EFICIÊNCIA NO PROCESSO DE PIGMENTAÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DO VITILIGO

Orientador: **Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso**

Maringá-Pr, Março de 2006.

Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos se não fora
A mágica presença das estrelas!

Mario Quintana

Ao Gabriel, por ter trazido tamanha alegria a este mundo.

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlito e Melita, pela presença imprescindível em todos os momentos de minha vida, com muito amor;

Às minhas queridas irmãs Adriana e Juliana, por serem as manas "codornas" tão especiais que são;

Ao Fábio, cuja presença tão afetuosa foi essencial para a realização deste;

Aos meus amigos Elizandra, Fabiana, Francielle, Ivan, Kelly, Manoel e Maria, pelo companheirismo e amizade não somente na caminhada acadêmica, mas principalmente na caminhada da vida;

À Claudia, Fernanda e Iara, pela amizade eterna;

Ao Marcos Cesar Danhoni Neves, pela amizade e pelos ensinamentos;

Ao professor Celso Vataru Nakamura e à mestranda Cecília Valente Rodrigues Truite, pelas amostras cedidas para a realização deste estudo e pelas longas conversas acerca dos conceitos biológicos;

Aos professores Antonio Carlos Medina Neto e Antonio Carlos Bento, pelas contribuições a este trabalho;

Aos funcionários do DFI, especialmente a Akiko Nisida;

Ao professor Mauro, pela confiança e oportunidade a mim concedidas e, principalmente, pelos ensinamentos sempre presentes no decorrer da concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO V

CAPÍTULO 1 13

INTRODUÇÃO 13

CAPÍTULO 2 15

ASPECTOS HISTÓRICOS E TEÓRICOS DA TEORIA FOTOACÚSTICA 15

2.1 Revisitando a descoberta do efeito fotoacústico 15

2.2 Introdução conceitual 17

2.3 Conceitos relativos à caracterização das amostras 19

2.4 Mecanismos de interação entre luz e matéria 21

CAPÍTULO 3 25

EFEITO FOTOACÚSTICO: DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO MATEMÁTICO 25

3.2 A equação de difusão do calor 26

3.3 Produção de calor na amostra 28

3.4 Solução para a temperatura 30

3.5 O sinal fotoacústico 32

3.6 Amplitude e fase 34

CAPÍTULO 4 36

ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA 36

4.1 Um breve histórico 36

4.2 Conceito 38

4.3 Desenvolvimento teórico para ELT no arranjo descasado 39

4.3.1 Análise do gradiente de temperatura 40

4.3.2 Variação da fase do laser de prova devido à formação da lente térmica 42

4.3.3 Propagação do feixe de prova 43

CAPÍTULO 5 47

CAUSAS E EFEITOS DO VITILIGO E MORFOLOGIA DA PELE 47

5.1 Vitiligo 47

5.2 Estrutura da pele 50

5.2.1 A epiderme 50

5.2.2 A derme 51
5.3 Os melanócitos e o processo melanogênico 51
CAPÍTULO 6 55
ARRANJOS EXPERIMENTAIS E PREPARO DAS AMOSTRAS 55
6.1 Montagem experimental da Espectroscopia Fotoacústica 55
6.2 Análise da permeação cutânea utilizando a Espectroscopia Fotoacústica em modelo experimental 57
6.3 Montagem experimental da Espectroscopia de Lente Térmica 60
6.4 Análise da produção de melanina utilizando a Espectroscopia de Lente Térmica em modelo in vitro 61
CAPÍTULO 7 63
RESULTADOS E DISCUSSÃO 63
7.1 Avaliação da permeação dos medicamentos 63
7.1.1 Análise das amostras do medicamento VitiSTV-02S 73
7.1.2 Análise das amostras do medicamento VitiSTV-02A 76
7.1.3 Estudo comparativo da permeação dos medicamentos em função do número de aplicações 78
7.2 Avaliação da produção de melanina em culturas de célula em função de diferentes concentrações e formulações do princípio ativo 84
CAPÍTULO 8 92
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 94

Índice de Figuras

Fig. 2.1: Experimento de Bell[7]. 15
Fig. 2.2: Geometria do modelo[4]. 18
Fig. 2.3: A absorção da amostra é determinada pela distância l_β *que a luz consegue penetrar na mesma[4].* 20
Fig. 2.4: "O célebre fenômeno das cores"[17]. 21
Fig. 2.5: Espectro eletromagnético[17]. 22
Fig. 3.1: Elemento dV *sobre o qual incide um fluxo de calor[4].* 27
Fig. 4.1: Transiente que representa a mudança de intensidade no centro do laser He-Ne durante a formação de lente térmica[28]. 36
Fig. 4.2: Arranjo experimental para ELT no modo descasado[28]. 37
Fig. 4.3: Formação de lente térmica na amostra[28]. 38
Fig. 4.4: Comportamento do sinal de lente térmica para os dois casos de dn/dT *[28].* 38
Fig. 4.5: Arranjo experimental com dois feixes descasados[28]. 39
Fig. 5.1: As áreas despigmentadas da pele apresentadas na figura caracterizam o vitiligo[31]. 49
Fig. 5.2: Cultivo da Macadamia integrifolia (A); as figuras B, C e D apresentam, respectivamente, as folhas, os frutos – dos quais é extraído o princípio ativo – e as flores desta planta[33]. 49
Fig. 5.3: Estrutura da pele e subcutâneo[35]. 53
Fig.5.4: Unidade epidermo-melânica, na qual podem ser identificados o melanócito (B) e os queratinócitos (A)[35]. 53
Fig. 5.5: Processo bioquímico concernente à produção de melanina nos melanócitos[34]. ... 54
Fig. 6.1: Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica[4]. 55
Fig. 6.2: Célula fotoacústica fechada[4]. 56
Fig. 6.3: Preparo da pele de coelho para realização da leitura fotoacústica. 59
Fig. 6.4: Comprimentos de difusão térmica na amostra de pele. 59
Fig. 6.5: Arranjo experimental da Espectroscopia de Lente Térmica (ELT)[28]. 60
Fig. 7.1: (A) Espectro do princípio ativo; (B) espectro do princípio ativo ajustado. 63
Fig. 7.2: (A) Espectro do medicamento VitiSTV-02S; (B) espectro apresentado em (A), porém ajustado por uma curva teórica composta pela superposição das gaussianas com centros x_{c1} *= 188 nm,* x_{c2} *= 250 nm e* x_{c3} *= 276 nm.* 64
Fig.7.3: (A) Espectro do ácido salicílico; (B) espectro do ácido ajustado, com gaussianas centradas em 184, 304 e 342 nm. 65

Fig. 7.4: (A) Espectro do medicamento VitiSTV-02A; (B) o mesmo espectro ajustado. Os centros das gaussianas evidenciadas são x_{c3} = 276 nm e x_{c4} = 304 nm..... 66
Fig. 7.5: Espectro de absorção da pele de coelho, com incidência na superfície da amostra; abaixo o ajuste gaussiano com quatro picos..... 67
Fig. 7.6: Leitura realizada na face inferior da pele de coelho..... 67
Fig. 7.7: Espectros relacionados aos componentes da pele (figura extraída da referência 42). 68
Fig. 7.8: Espectro do sangue. No presente ajuste verificam-se quatro gaussianas centradas em 204, 289, 343 e 412 nm..... 69
Fig. 7.9: Espectros realizados em uma freqüência de 40 Hz, nas faces superiores da pele controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02S (B)..... 73
Fig. 7.10: Espectros realizados em 20 Hz: incidência superior, controle (A) e tratado com o medicamento VitiSTV-02S (B)..... 74
Fig. 7.11: Espectros realizados em 40 Hz, nas faces inferiores do controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02S (B)..... 75
Fig. 7.12: Espectros realizados em 20 Hz nas faces inferiores das amostras controle (A) e tratada com o medicamento VitiSTV-02S (B)..... 75
Fig. 7.13: Espectros resultantes da iluminação modulada superficial das amostras controle (A) e tratada com o medicamento VitiSTV-02A (B), na freqüência de 40 Hz..... 76
Fig. 7.14: Incidência superior, em 20 Hz, do controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02A (B). 77
Fig. 7.15: Espectros de absorção obtidos através da iluminação das faces inferiores, em 40 Hz, do controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02A (B). 77
Fig. 7.16: Incidência inferior do controle (A) e tratado VitiSTV-02A (B) em 20 Hz..... 78
Fig. 7.17: Análise da evolução do princípio ativo em função do número de aplicações dos medicamentos em diferentes profundidades da pele..... 79
Fig. 7.18: Análise linear referente à permeação do princípio ativo para os medicamentos VitiSTV-02S e VitiSTV-02A nas profundidades de 25 e 475 µm..... 80
Fig. 7.19: Rotas de permeação intrínsecos à estrutura epitelial[44]..... 81
Fig. 7.20: Observações macroscópicas e histológicas dos efeitos dos medicamentos dotados de diferentes concentrações de ácido salicílico: 0% (A e B), 2,5% (C e D), 3% (E e F), 5% (G e H) e 7,5% (I e J)[33]. Barra = 100µm..... 82
Fig. 7.21: (A) Corte histológico da orelha controle; (B) Corte histológico da orelha tratada com a formulação com concentração de 7,5% de ácido salicílico; nesta pode ser observada a acantose (*), espessamento da epiderme em virtude da reação inflamatória[33]. Barra = 20 µm..... 83

Fig. 7.22: Sinal de LT do NaOH – em uma potência de 100 mW – e das amostras concernentes às culturas celulares controle, tratada com óleo 3% e tratada com a fração óleo 500, em uma potência de 90 mW. 84
Fig. 7.23: Sinal da LT obtido para uma amostra controle, em 90 mW. 85
Fig. 7.24: Estudo da difusividade para o NaOH (A), culturas de célula controle (B), tratada com óleo 3% (C) e com a fração óleo 500 (D). 86
Fig. 7.25: Evolução do parâmetro θ *em função da potência para o NaOH (A), para as culturas celulares controle (B), tratadas com óleo 3% (C) e fração óleo 500 (D).* 87
Fig. 7.26: Índices conexos às razões θ/P_e*, que traduzem as absorções apresentadas pelas amostras.* 88
Fig. 7.27: Análise da produção de melanina, comparada àquela verificada no controle, realizada no espectrofotômetro[33]. 89
Fig: 7.28: Imagens obtidas através da microscopia óptica efetuadas na cultura celular controle (A) e na cultura em que fora aplicado o óleo 3% (B); barra = 30 µm. As imagens C e D foram obtidas por meio da microscopia eletrônica de transmissão, sendo a primeira relacionada ao controle (C) e a segunda à amostra em que fora aplicado o óleo 3% (D); barra = 1 µm. Nestas últimas é possível a observação dos melanossomas, indicados pelas setas, evidenciando a maior presença de melanina naqueles cultivados na presença do óleo 3%. N identifica o núcleo celular [33]. 90
Fig. 7.29: Resultados obtidos por meio do espectrofotômetro para a comparação da produção melânica nas células controle e naquelas em que fora aplicada a fração óleo 500. 91

Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Parâmetros fototérmicos utilizados no modelo RG.....26
Tabela 6.1: Parâmetros ópticos e geométricos do arranjo experimental da ELT.....61
Tabela 7.1: Valores pertinentes aos centros (nm) e larguras (nm) das gaussianas utilizadas nos ajustes das amostras correspondentes à incidência superior em 20 Hz - $\mu_s = 25\mu m$ *...71*
Tabela 7.2: Valores pertinentes aos centros (nm) e larguras (nm) das gaussianas utilizadas nos ajustes das amostras correspondentes à incidência inferior em 20 Hz - $\mu_s = 475\mu m$ *...71*

Resumo

Neste trabalho a Espectroscopia Fotoacústica foi empregada em modelo experimental ex vivo para quantificar a propagação de duas formulações de creme, VitiSTV-02S e VitiSTV-02A, na pele de coelho. A diferença entre as duas composições, ambas a serem utilizadas no tratamento do vitiligo, é a presença de ácido salicílico como promotor de permeação na segunda. A análise do perfil de profundidade foi realizada para determinar a presença do princípio ativo, um óleo extraído da *Macadamia integrifoila*, ao longo da espessura da pele. O estudo mostrou que as duas formulações se propagaram através da pele, sugerindo que o uso do ácido salicílico pode ser dispensado. Além disso, a Espectroscopia de Lente Térmica foi utilizada para quantificar a eficiência do princípio ativo no processo melanogênico, mensurando-se o coeficiente de absorção óptica em 476 nm. Os resultados mostraram que este parâmetro apresentou diferentes comportamentos em função do preparo das amostras quando comparado aos resultados obtidos por meio do espectrofotômetro convencional, provavelmente, devido à influência do espalhamento de luz resultante da presença de células na solução. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que a Espectroscopia Fotoacústica e a Espectroscopia de Lente Térmica foram utilizadas no estudo de propriedades ópticas e espectroscópicas de formulações desenvolvidas para o tratamento do vitiligo.

Abstract

In this work the Photoacoustic Spectroscopy was employed to evaluate ex-vivo the propagation of two cream formulations, VitiSTV-02S and VitiSTV-02A, in rabbit skin. The difference between the two compositions, both intended to be used for vitiligo treatment, is that one of them contains salicylic acid as the permeation promoter. A depth profile analysis was performed in order to determine the presence of the active principle, extracted from the M*acadamia integrifolia,* along with the skin thickness. The measurements showed that both formulations propagated through the skin, suggesting that the salicylic acid may not be needed. In addition, the Thermal Lens Spectrometry was used to evaluate the M*acadamia integrifolia* extract melanogenic power, by measuring the optical absorption coefficient at 476 nm. The results showed that this parameter presented different behavior as a function of the sample preparation as compared to those data obtained by a conventional spectrophotometer, probably due to the influence of the high level of light scattering induced by the cells present in the solution. As far as we know, this is the first time that Photoacoustic Spectroscopy and the Thermal Lens Spectrometry were used to study the optical and spectroscopic properties of formulations developed for vitiligo treatment.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O vitiligo é uma doença que atinge de 0,5 a 2% da população mundial[1], sendo identificado pela ocorrência de máculas brancas na pele devido à inexistência de melanina – pigmento cutâneo intrínseco – nessas regiões. Embora sua etiologia não seja totalmente conhecida, pode-se afirmar que tal disfunção não seleciona etnias, sexo ou idade, e que entre suas prováveis causas, citam-se os fatores genético, auto-imune e a autodestruição dos melanócitos[2].

A origem do vitiligo, bem como sua terapêutica, não é totalmente elucidada, de modo que a busca por novos tratamentos e medicamentos é uma constante no campo da pesquisa. Devido ao fato de que muitas drogas existentes provocam sérias lesões na pele, já fragilizada pela ausência do fotoprotetor natural, os pesquisadores têm voltado sua atenção para agentes naturais que, segundo o conhecimento popular, são capazes de estimular a produção de melanina. Este é o foco desta dissertação, que tem como meta investigar um creme para pigmentação, denominado VitiSTV-02, cujo princípio ativo é um óleo extraído da *Macadamia integrifolia*.

Os testes de segurança para novos medicamentos são realizados primeiramente em animais – teste *in vivo*, ou em culturas de célula – *in vitro*, sendo permitido somente após a concretização destes a aplicação em seres humanos. Em nosso estudo foram utilizados coelhos como modelos para a avaliação dos efeitos do medicamento.

Tão importante quanto avaliar o grau do potencial comedogênico, da reação inflamatória e das variáveis envolvidas no estudo da toxicidade do creme, é o estudo da penetração cutânea do mesmo para que o princípio ativo possa atingir os melanócitos e aí produzir seus efeitos. Para tanto, utilizou-se a Espectroscopia Fotoacústica (PAS), técnica não invasiva que permite a avaliação da permeação de substâncias na pele *in vivo*[3] [4], resultando no estudo do perfil de profundidade atingido pelo creme na pele.

Foram estudadas duas formulações designadas por: VitiSTV-02S e VitiSTV-02A. A diferença entre as mesmas reside na concentração do ácido salicílico, substância utilizada com o objetivo de intensificar a permeação do princípio ativo: enquanto a segunda apresenta em sua composição 2,5% deste veículo, a primeira é totalmente desprovida do mesmo.

Em virtude da elevada ocorrência de medicamentos aplicados topicamente, torna-se evidente a relevância de um método não invasivo capaz de avaliar qualitativamente e quantitativamente a permeação dos mesmos.

Outro aspecto de suma importância a ser investigado é aquele relacionado à eficiência do princípio ativo no aumento da produção de melanina por parte das células. Com esse objetivo foram analisadas, através da Espectroscopia de Lente Térmica (ELT), amostras obtidas a partir de meios celulares cultivados sob a regência de duas diferentes formulações do óleo da *M. integrifolia*: a primeira remete a uma diluição em que o mesmo encontra-se em um percentual de 3% e a segunda a uma fração lipídica – 500 µg/ml , produto este resultante de uma reação de extração envolvendo o referido princípio ativo. As leituras mencionadas foram realizadas através da incidência de um laser de comprimento de onda compatível com a faixa do espectro de absorção da melanina – 476 nm, o que nos permitiu avaliar os índices de absorção pertinentes à mesma em cada uma das culturas concernentes às diferentes diluições do óleo, finalizando, portanto, em uma análise que retratou a eficiência de tais agentes no processo de produção do pigmento. O uso da ELT para a determinação de diferentes concentrações de uma substância em meio a uma solução já é conhecido e referendado na literatura[5] [6].

Capítulo 2

ASPECTOS HISTÓRICOS E TEÓRICOS DA TEORIA FOTOACÚSTICA

2.1 Revisitando a descoberta do efeito fotoacústico

A atmosfera científica do século XIX era aquela resultante de diversas descobertas, principalmente no ramo do eletromagnetismo. Os avanços decorridos do desenvolvimento de tal ciência acabaram por influenciar as várias ramificações do conhecimento.

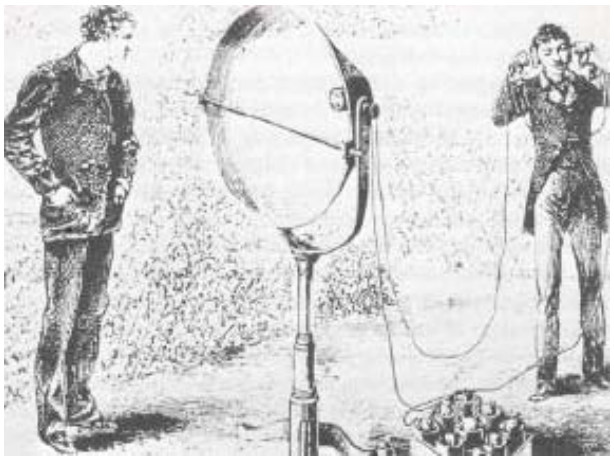

Fig. 2.1: Experimento de Bell[7].

No decorrer de seus experimentos com o fotofone, Alexander Graham Bell descobriu que, através da modulação da luz em altas freqüências, o aparato produzia sons naturalmente audíveis, em outras palavras, distintos daqueles produzidos pelos sinais

elétricos. O fenômeno descrito ocorria se a luz fosse focalizada sobre substâncias sólidas, na forma de diafragmas, conectadas a tubos de audição. E foi justamente através desta trajetória que se deu, de maneira acidental, a descoberta do efeito fotoacústico, sendo publicado em 1880 o primeiro artigo que veio a relatar brevemente a descoberta.

No ano seguinte, Bell publica um segundo artigo sobre o tema, agora mais amplo na exposição dos conceitos descobertos. Neste, descreve resultados de sua investigação: "sinais mais altos eram obtidos a partir de substâncias porosas, esponjosas, e dentre estas, aquelas mais escuras ou de cores mais absorvedoras" [7]. Através de uma série de experimentos, demonstrou que o efeito fotoacústico em sólidos depende da absorção da luz, sendo a intensidade do sinal obtido diretamente proporcional a tal absorção. Assim sendo, concluiu que "a natureza dos raios que produzem efeitos sonoros em diferentes substâncias depende da natureza das substâncias que estão expostas ao raio, e que os sons são em todos os casos devidos àqueles raios do espectro que foram absorvidos pelo corpo" [8]. O autor deduz então a dependência intrínseca do efeito fotoacústico com a absorção óptica.

Além dos estudos realizados em sólidos, Bell e seu colaborador, Summer Tainter, dedicaram-se às investigações do efeito em líquidos e gases. E foi através deste trabalho que puderam observar que somente sinais de baixa intensidade eram obtidos quando a célula fotoacústica estava preenchida por um líquido absorvedor de luz, ao passo de que, quando preenchida por gases absorvedores, o sinal apresentava-se bem pronunciado. Este comportamento deve-se ao fato de que o coeficiente de expansão volumétrico de líquidos e sólidos é de 10 a 100 vezes menor do que aquele relacionado aos gases, o que acabava por minimizar a perturbação na coluna de ar no interior do tubo de audição, dificultando ainda mais a percepção do efeito fotoacústico. Tratava-se, portanto, de uma dificuldade experimental, uma vez que na época ainda não havia sido desenvolvida a tecnologia do microfone. Esta realidade acabou por restringir os pesquisadores, em sua maioria, ao estudo de gases absorvedores.

Bell, que não possuía formação em Física, apoiou-se nos estudos de Lord Rayleigh[9] para explicar o efeito observado em amostras sólidas. Este havia concluído que a fonte primordial do fenômeno fotoacústico seria a vibração mecânica da amostra como conseqüência de um aquecimento desigual da mesma em função da incidência da luz modulada. Todavia, tal entendimento não seria totalmente adequado ao resultado obtido, uma vez que as vibrações ora mencionadas são de pequena intensidade para serem consideradas como causa exclusiva do efeito fotoacústico.

As hipóteses sugeridas na época que mais se aproximam da concepção contemporânea acerca da fotoacústica foram as sugeridas por Mercadier e Preece[10]. O primeiro sugeriu que o sinal observado devia-se ao "movimento de vibração determinado por

alterações de quente e frio produzidos pela radiação intermitente, principalmente na camada gasosa próxima à superfície do sólido" [11]. Já o segundo, por sua vez, afirmou que o efeito fotoacústico "é puramente um efeito de calor radiante, e é essencialmente devido às mudanças no volume de vapores ou gases produzidos através da degradação e absorção deste calor em um espaço confinado" [12].

As investigações do fenômeno fotoacústico ficaram adormecidas por cerca de cinqüenta anos quando, em 1938, a invenção do microfone propiciou condições mais adequadas ao estudo deste fenômeno. Foi neste ano que Viengerov começou a estudar a absorção do infravermelho em gases com o objetivo de quantificar diferentes concentrações de um determinado gás em misturas gasosas. Como exemplo, cita-se o estudo da concentração de CO_2 em N_2, na qual variações de até 0.2 % do volume poderiam ser detectadas[7].

Em relação aos estudos utilizando fotoacústica para matéria não gasosa, é de grande surpresa que estes só foram continuados por volta de 1970, cerca de 90 anos após a descoberta de Alexander Graham Bell!

2.2 Introdução conceitual

O efeito fotoacústico em sólidos, em sua concepção moderna, surge em decorrência do aquecimento da amostra devido à incidência de luz modulada, interação esta que será descrita em maiores detalhes na próxima seção. Ao ser aquecida, a amostra acaba por irradiar fluxos de calor que aquecem a camada gasosa com a qual encontra-se em contato. Esta passa a ter seus parâmetros termodinâmicos – temperatura e pressão – alterados em uma freqüência bem definida, sensibilizando, portanto, o microfone que se encontra acoplado à célula fotoacústica, como demonstrado na figura 2.2.

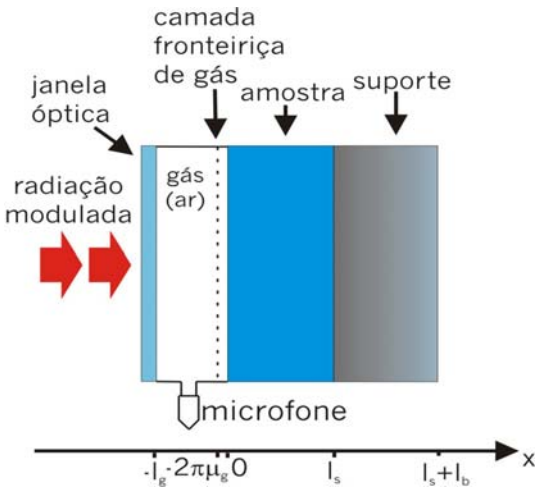

Fig. 2.2: Geometria do modelo[4].

A explicação apresentada remete-nos à *teoria da difusão térmica*, cujo modelo matemático será exposto mais adiante. No entanto, apesar de ser este o efeito dominante no processo de decaimento não radioativo da energia absorvida da radiação luminosa[13], é necessário ressaltar que existem ainda três outros processos desencadeadores do efeito fotoacústico:

i. Expansão térmica da amostra: neste caso o calor absorvido causa uma dilatação periódica do meio analisado, atuando o próprio como um pistão;
ii. Flexão termoelástica: a absorção da radiação modulada tem como efeito a geração de um gradiente de temperatura perpendicular à superfície da amostra, gradiente este que acarreta uma expansão proporcional à profundidade na mesma, flexionando-a.
iii. Efeito fotobárico: característico de amostras fotoquimicamente ativas, ocorre em virtude de trocas gasosas provenientes de tais reações e da camada gasosa da célula fotoacústica, resultando em variações da pressão interna da mesma.

A primeira hipótese apresentada deve-se ao mecanismo de difusão térmica, sendo o parâmetro físico relacionado à velocidade de propagação do calor na amostra denominado *difusividade térmica* α (cm^2/s). Esta relaciona-se com a *condutividade* κ $(W/s.K)$ – fluxo de calor em função da temperatura – de acordo com a expressão

$$\alpha = \frac{\kappa}{\rho C_p} \qquad (2.2.1)$$

Assim sendo, se um determinado ponto da amostra for aquecido, o calor difundirá para outras regiões da mesma. Considerando que a incidência luminosa na fotoacústica é

modulada, também o será o processo de difusão. A intensidade da modulação térmica não dependerá somente da distância entre os referidos pontos amostrais, mas também da freqüência de modulação da luz. Define-se, portanto, um novo parâmetro: o *comprimento de difusão térmica*, μ (cm):

$$\mu = \sqrt{\frac{2\alpha}{\omega}} = \sqrt{\frac{\alpha}{f\pi}} \qquad (2.2.2)$$

Este expressa a profundidade em que está sendo verificada a formação do fenômeno fotoacústico em função da freqüência f de modulação da luz. Desta forma, variando-se a referida freqüência, torna-se possível a análise em diferentes profundidades da amostra, edificando-se, portanto, o estudo do perfil de profundidade da mesma[14].

2.3 Conceitos relativos à caracterização das amostras

À medida que a luz interage com um determinado meio, tem sua intensidade diminuída exponencialmente, comportamento este decorrente da absorção dos fótons incidentes por parte das moléculas. Define-se, portanto, o *comprimento de absorção óptica* l_β, que traduz a distância que o feixe penetra até ter sua intensidade inicial reduzida a $1/e$. Assim sendo:

$$l_\beta = \frac{1}{e} l_0 = \frac{1}{\beta} \qquad (2.3.1)$$

sendo β o *coeficiente de absorção óptica* (cm^{-1}).

A partir da definição apresentada, é possível estabelecer um critério de classificação para as amostras em função de sua absorção óptica l_β e sua espessura l [14]:

i. *Amostra opaca*: apresenta espessura consideravelmente maior do que o comprimento de absorção óptica ($l_\beta << l$);

ii. *Amostra absorvedora*: o valor da espessura corresponde àquele associado ao comprimento de absorção óptica ($l_\beta \approx l$);

iii. *Amostra transparente*: neste caso, o comprimento de absorção óptica é muito maior que a espessura da amostra ($l_\beta >> l$).

As relações descritas são evidenciadas na figura 2.3.

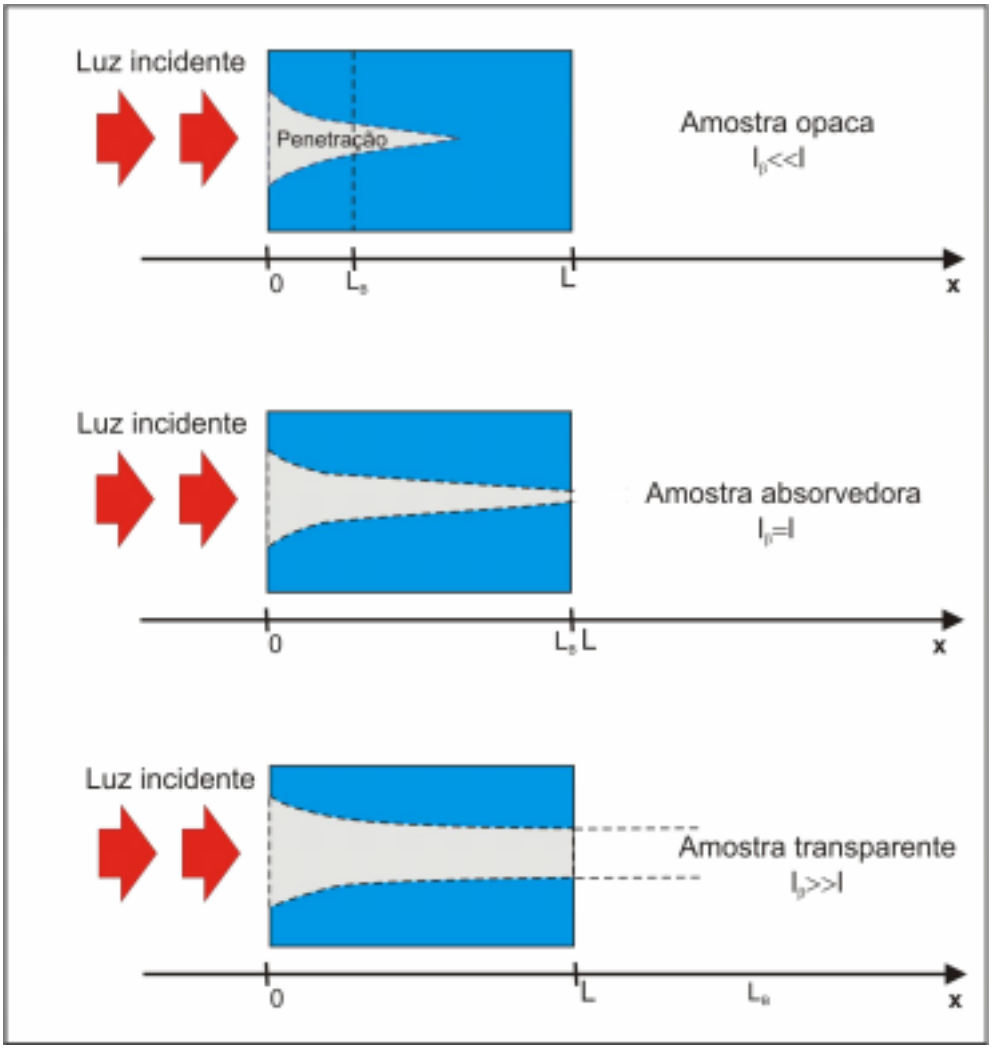

Fig. 2.3: A absorção da amostra é determinada pela distância l_β que a luz consegue penetrar na mesma[4].

Outro critério utilizado para classificar as amostras é aquele relativo às características térmicas que lhe são conexas. Retomando o conceito de comprimento de difusão térmica apresentado na seção anterior, tem-se, para uma determinada amostra em uma freqüência estabelecida, um μ_s característico. Diante da comparação entre este parâmetro e a espessura l da amostra, obtêm-se duas classificações:

i. *Amostra termicamente grossa*: apresenta espessura l muito maior que μ_s (convenciona-se $l >> 2\pi\mu_s$);

ii. *Amostra termicamente fina*: neste caso, o comprimento de difusão térmica é muito maior do que a espessura l ($l << \mu_s$).

2.4 Mecanismos de interação entre luz e matéria

A luz do sol, segundo o que se acreditava até meados do século XVII, era "pura", sendo as diferentes colorações observadas quando a mesma atravessava um vidro atribuídas a impurezas deste meio. O entendimento das cores, até então, era restrito àquele resultante do estudo experimental de misturas de pigmentos realizados por artistas, a exemplo de Leonardo da Vinci. Quando em 1666 Isaac Newton elaborou uma teoria para a decomposição da luz utilizando em seu experimento um prisma, permitiu avanços imensuráveis nas mais diversas áreas científicas. Embora tenha arquitetado sua hipótese a partir da idéia da luz como partícula, o que o fez postular a existência de uma força interna do meio que as atraía para o interior deste na tentativa de explicar a refração, a observação e estudo das propriedades do que ele denominou *spectrum* foram os pontos iniciais para uma revolução dos conceitos da óptica.

Fig. 2.4: "O célebre fenômeno das cores"[17].

O desenvolvimento da teoria ondulatória da luz deve ser atribuído à conjunção de várias idéias derivadas de observações de comportamentos físicos concernentes à mesma cuja explicação não reside na teoria corpuscular: a exemplo, citam-se a difração e a

interferência[15]. Tal entendimento, inerente ao paradigma quântico, permitiu a edificação de diversos axiomas como a correlação das características ondulatórias das propagações eletromagnéticas e a energia associada às mesmas.

A origem da luz reside nas oscilações eletromagnéticas ou nas oscilações de cargas elétricas, sendo a energia associada à mesma diretamente proporcional à freqüência de oscilação, comportamento este descrito pela relação Planck-Einstein[16]

$$E = h\nu \qquad (2.4.1)$$

na qual h é a constante de Planck. A freqüência difere de acordo com a fonte que a originou, sendo sua proporcionalidade em relação à energia evidenciada na figura 2.5.

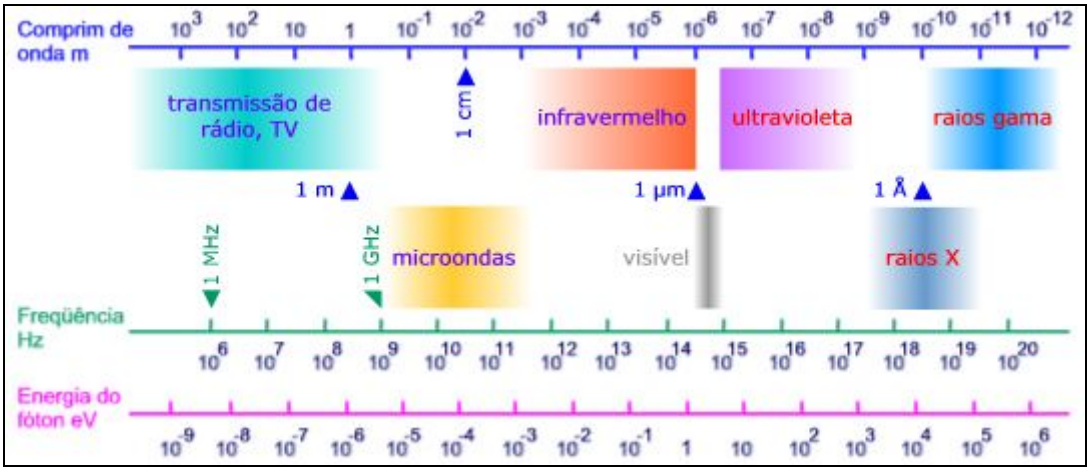

Fig. 2.5: Espectro eletromagnético[17].

As freqüências mais baixas são originárias da oscilação de elétrons em fios condutores, a exemplo das ondas de rádio AM. Já o intervalo de 10^4 a 10^{10} Hz deve-se a oscilações de circuitos ou transmissores de rádio e televisão. No intervalo seguinte, que finda em 10^{12} Hz, encontram-se as microondas produzidas em válvulas especiais. As radiações de calor e infravermelhas são efeito da oscilação de elétrons exteriores a átomos e moléculas e localizam-se na região de 10^{11} a 4.10^{14} Hz. O curto intervalo de 4.10^{14} a 8.10^{14} Hz é pertinente à porção do espectro denominado *espectro visível*, que assim como o intervalo em que estão contidas as radiações ultravioletas – limitado pela freqüência de 10^{17} Hz – é resultante de transições de elétrons entre as camadas mais externas dos átomos. Na região que segue, delimitada pela freqüência de 10^{20} Hz, destaca-se e evidência dos raios X, efeitos da desaceleração intensa de partículas carregadas eletricamente altamente energéticas ou de transições mais internas dos átomos. Por fim, encontramos os raios gama, provenientes de transições de partículas no interior do núcleo atômico[17].

O conhecimento acerca da energia da radiação incidente, bem como da amostra a ser estudada, permite-nos avaliar o processo através do qual se dará a interação entre ambas[18]:

i. Radiações de altas energias, a exemplo dos raios gama, acarretam o processo de *produção de pares*, no qual um fóton de alta energia perde-a completamente em uma colisão com um núcleo, criando um par elétron-pósitron, com uma determinada energia cinética. Além da conservação da energia e do momento, existe também a conservação da carga elétrica, uma vez que o fóton não possui carga elétrica e a soma das cargas do par elétron-pósitron também é nula.

ii. No caso de energias da faixa dos raios X, o efeito dominante é o *Compton*, no qual existe a colisão de um fóton com um elétron ligado a um núcleo. A energia do fóton é suficiente para que ocorra, após a colisão, além do íon e do elétron livre, um fóton rebatido, de menor energia, que emerge da colisão. Este, por sua vez, poderá continuar ainda desencadeando outras interações com o meio.

iii. A energia pertinente aos raios ultravioleta, de menor intensidade quando comparada àquelas anteriormente citadas, tem como principal conseqüência o *efeito fotoelétrico*, no qual o fóton incidente, ao interagir com um elétron ligado ao átomo, transfere-lhe energia suficiente para romper a ligação com o núcleo. Assim sendo, o fóton incidente deixa de existir, um íon é formado e o elétron livre resultante será colocado em movimento no caso de energia remanescente do fóton.

Para interações provenientes de energias mais baixas em relação àquelas ora apresentadas, a exemplo das relacionadas com freqüências contidas na faixa do ultravioleta, espectro visível e infravermelho, a energia existente, em geral, não é suficiente para romper ligações químicas; o que ocorre, de fato, são excitações do estado eletrônico, no caso dos dois primeiros intervalos citados, e alterações no modo vibracional, no caso deste último. Ao ser excitado, o elétron retorna rapidamente ao estado fundamental e a não ser que uma reação fotoquímica seja iniciada ou um novo fóton emitido, a energia envolvida no processo será transferida para os estados vibracionais moleculares, acarretando um aumento de temperatura da amostra[14].

No entendimento quântico da estrutura atômica, os elétrons encontram-se em regiões “delimitadas” por níveis de energia. Estes, por sua vez, são obtidos teoricamente através da analogia do elétron em questão com o oscilador harmônico. Assim sendo,

modela-se o potencial que o mantém nas proximidades do núcleo e a partir deste especifica-se a energia a ele então associada:

$$E_n = (n + 1/2)h\nu \qquad (2.4.2)$$

O princípio estabelecido através deste tratamento e condizente com as observações de Planck dirigem-se à quantização da energia: assim sendo, transições entre os diferentes níveis especificados pelos sub-índices n são possíveis somente no caso de incidência de fótons de energia coincidente com aquela apresentada pelo referido elétron, comportamento este que acaba estabelecendo a existência das chamadas bandas de absorção, através das quais torna-se possível a identificação do material que compõe uma determinada amostra, objeto de estudo.

Capítulo 3

EFEITO FOTOACÚSTICO: DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO MATEMÁTICO

Como já foi exposto na seção 2.1, o efeito fotoacústico para o estudo da matéria não gasosa só foi "redescoberto" em 1973, sendo o modelo matemático que o descreve, denominado pela abreviação RG, publicado em 1976, por Allan Rosencwaig e Allen Gersho[10] [19]. Torna-se necessário apresentar, neste momento, alguns parâmetros fototérmicos usuais que serão empregados constantemente no decorrer da presente dissertação, conforme exposto na Tabela 1. O sub-índice i, utilizado para designar material, é a representação genérica dos sub-índices g, s e b que, por sua vez, são utilizados para mencionar, respectivamente, gás, amostra e suporte.

Tabela 3.1: Parâmetros fototérmicos utilizados no modelo RG.

Parâmetro	Denominação	Unidade(CGS)
l_s	Espessura da amostra	cm
l_b	Espessura do suporte	cm
l_g	Espessura do gás	cm
κ_i	Condutividade térmica	W / cm.K
ρ_i	Densidade de massa	g / cm^3
c_i	Calor específico	J/ g.K
$\alpha_i = \kappa_i / \rho_i c_i$	Difusividade térmica	cm^2 / s
$a = (\omega / 2\alpha_i)^{\frac{1}{2}}$	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 da 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 A equação de difusão do calor

A obtenção de um modelo matemático que traduza os mecanismos através dos quais dá-se a condução de calor inicia-se com o desenvolvimento da equação de difusão do mesmo.

Para tanto, considera-se, inicialmente, um elemento de volume $dV = Sdx$ através do qual atravessa um fluxo de calor ϕ, definido como a quantidade de calor que flui através de uma superfície – perpendicularmente à essa – em um determinado intervalo de tempo.

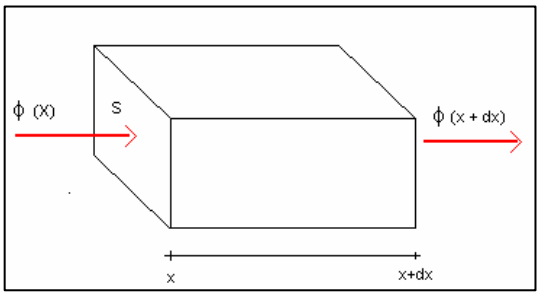

Fig. 3.1: Elemento dV sobre o qual incide um fluxo de calor[4].

A equação linear do fluxo de calor, proposta primeiramente por Fourier[20], considera uma densidade de corrente de calor q conexa com a temperatura da seguinte maneira:

$$\vec{q} = -\kappa \nabla T \qquad (3.2.1)$$

lembrando que κ é a condutividade térmica e T a temperatura. O sinal negativo deve-se ao comportamento termodinâmico segundo o qual o calor flui da região de maior temperatura para aquela em que a temperatura é menor, o que resulta em um fluxo no sentido contrário ao do gradiente de temperatura.

Se houver ainda uma geração de calor a uma taxa dada por $F(x, y, z; t)$, a exemplo de um processo exotérmico, definido para uma unidade de volume, então o calor total recebido pelo volume V em um intervalo de tempo Δt será:

$$Q = \left[-\oint_S \left(\vec{q} \cdot \overrightarrow{dS} \right) + \int_V F(x, y, z; t) dV \right] \Delta t \qquad (3.2.2)$$

O sinal negativo no primeiro termo do lado direito da igualdade exposta na expressão acima é conseqüência da definição convencional da normal externa $\overrightarrow{dS}$.

Da calorimetria, têm-se a seguinte relação:

$$Q = \int_V (c\rho \Delta T) dV \qquad (3.2.3)$$

na qual ρ é a densidade de massa (g/cm^3), c o calor específico $(J/g.K)$ e ΔT a variação de temperatura.

Igualando as expressões (3.2.2) e (3.2.3):

$$-\oint_S \left(\vec{q} \cdot \overrightarrow{dS} \right) + \int_V F(x, y, z; t) dV = \int_V \left(c\rho \frac{\Delta T}{\Delta t} \right) dV \qquad (3.2.4)$$

Considerando Δt muito pequeno, de modo que $\frac{\Delta T}{\Delta t} \approx \frac{\partial T}{\partial t}$, obtêm-se:

$$-\oint_S \left(\vec{q}\cdot\overrightarrow{dS}\right)+\int_V F(x,y,z;t)dV=\int_V\left(c\rho\frac{\partial T}{\partial t}\right)dV \qquad (3.2.5)$$

De acordo com o teorema da divergência:

$$\oint_S \vec{B}\cdot\overrightarrow{dS}=\int_V\left(\nabla\cdot\vec{B}\right)dV \qquad (3.2.6)$$

O teorema ora exposto pode ser empregado para reescrever o primeiro termo da expressão (3.2.5), o que nos conduz a:

$$-\int_V\left(\nabla\cdot\vec{q}\right)dV+\int_V F(x,y,z;t)dV=\int_V\left(c\rho\frac{\partial T}{\partial t}\right)dV \qquad (3.2.7)$$

$$-\nabla\cdot\vec{q}=c\rho\frac{\partial T}{\partial t}-F(x,y,z;t) \qquad (3.2.8)$$

Substituindo a equação (3.2.1) em (3.2.8):

$$\kappa\left(\nabla\cdot\nabla T\right)=c\rho\frac{\partial T}{\partial t}-F(x,y,z;t) \qquad (3.2.9)$$

$$\nabla^2 T-\frac{c\rho}{\kappa}\frac{\partial T}{\partial t}+\frac{F(x,y,z;t)}{\kappa}=0 \qquad (3.2.10)$$

Deparamo-nos, finalmente, com a equação de difusão térmica, sendo $\frac{c\rho}{\kappa}=\frac{1}{\alpha}$ e $\frac{F(x,y,z;t)}{\kappa}=f(x,y,z;t)$ a densidade de calor gerado no elemento dV. Para o caso unidimensional, a expressão (3.2.10) pode ser escrita como demonstrado a seguir:

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2}-\frac{1}{\alpha}\frac{\partial T}{\partial t}+f(x,t)=0 \qquad (3.2.11)$$

3.3 Produção de calor na amostra

A intensidade da luz modulada incidente na amostra obedece à seguinte lei matemática:

$$I(t)=\frac{1}{2}I_0(1+\cos\omega t) \qquad (3.3.1)$$

sendo I_0 o fluxo de luz inicial $\left(W/cm^2\right)$ e ω a freqüência de modulação do mesmo.

A lei que rege a absorção da luz pela amostra é aquela proposta por Beer, segundo a qual a intensidade do feixe incidente reduz-se exponencialmente à medida que este penetra o meio:

$$I(x,t) = I(t)e^{-\beta x} \qquad (x \geq 0) \tag{3.3.2}$$

lembrando que β é o coeficiente de absorção óptica da amostra (cm^{-1}) para um determinado comprimento de onda e $I(x,t)$ é a intensidade absorvida pelo meio em função do tempo e da distância atingida pela luz. Substituindo a relação expressa por (3.3.1) em (3.3.2):

$$I(x,t) = \frac{1}{2} I_0 e^{-\beta x}(1 + \cos \omega t) \tag{3.3.3}$$

A densidade de potência absorvida é obtida através de:

$$s(x,t) = -\frac{dI(x,t)}{dx} \tag{3.3.4}$$

o que implica na derivação da equação (3.3.3), fornecendo-nos:

$$s(x,t) = \frac{1}{2} \beta I_0 e^{-\beta x}(1 + \cos \omega t) \tag{3.3.5}$$

O elemento de calor gerado na amostra é justamente expresso pela relação $\frac{F(x,y,z;t)}{\kappa} = f(x,y,z;t)$, o que permite a seguinte equivalência, no caso unidimensional:

$$f(x,t) = \frac{1}{2\kappa} \beta I_0 \eta e^{-\beta x}(1 + \cos \omega t) \tag{3.3.6}$$

sendo η a eficiência segundo a qual a luz é absorvida e convertida em calor sem a ocorrência de relaxação radioativa.

Substituindo (3.3.6) em (3.2.11):

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T(x,t)}{\partial t} + \frac{\beta}{2\kappa} I_0 \eta e^{-\beta x}(1 + \cos \omega t) = 0 \tag{3.3.7}$$

A equação ora apresentada é aquela anteriormente obtida para a condução de calor, porém agora com o termo pertinente à produção do mesmo especificado.

3.4 Solução para a temperatura

O modelo de Rosencwaig e Gersho baseia-se na avaliação da absorção da luz por meio da detecção da variação de pressão no interior da célula fotoacústica através do microfone acoplado à mesma. No entanto, para que seja possível obter uma equação pertinente à referida absorção, faz-se necessário o estabelecimento, por meio da equação de difusão do calor, de uma expressão matemática que descreva o comportamento da temperatura. E é justamente com esse intuito que procederemos à análise da equação (3.3.7) para as distintas regiões internas à célula fotoacústica (ver figura 2.2). Tem-se, portanto, as seguintes relações:

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_s}\frac{\partial T(x,t)}{\partial t} + \frac{\beta}{2\kappa} I_0 \eta e^{-\beta x}\left(1+\cos\omega t\right) = 0 \qquad 0 \le x \le l_s \qquad (3.4.1)$$

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_g}\frac{\partial T(x,t)}{\partial t} = 0 \qquad -l_g \le x \le 0 \qquad (3.4.2)$$

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_b}\frac{\partial T(x,t)}{\partial t} = 0 \qquad l_s \le x \le l_s + l_b \qquad (3.4.3)$$

A primeira equação acima retrata a região ocupada pela amostra; a segunda é pertinente à camada gasosa; a terceira, por sua vez, refere-se ao suporte. Nas equações (3.4.2) e (3.4.3) o termo de fonte é inexistente pelo fato de que nessas regiões não há absorção da luz, não havendo, conseqüentemente, geração de calor.

A parte real das soluções das equações (3.4.1), (3.4.2) e (3.4.3) é de interesse físico para a obtenção de uma expressão matemática, escrita em função da posição e do tempo, que modele a temperatura no interior da célula em relação à temperatura ambiente T_0. Em função do fato de que as dimensões da célula são suficientemente pequenas, possibilitando, torna-se possível que o efeito de convecção térmica no gás possa ser desprezado[10]. Diante dos argumentos expostos assume-se:

$$\mathrm{T}(x,t) = \mathrm{Re}\left(T(x,t)\right) + T_0 \qquad (3.4.4)$$

Em conseqüência de que a absorção de luz e a flutuação térmica apresentam dependência temporal conexa com a parte real de $e^{j\omega t}$, torna-se possível reescrever a equação (3.4.1) através da substituição do $\left(\cos\omega t\right)$ pelo termo apresentado. Esse procedimento remete-nos às seguintes soluções para as equações que serão utilizadas para o estudo das condições de contorno (3.4.1 – 3):

$$T_s(x,t) = \left(Ue^{\sigma_s x} + Ve^{-\sigma_s x} - Ee^{\beta x}\right)e^{j\omega t} \qquad (3.4.5)$$

$$T_g(x,t) = \theta e^{-\sigma_g x} e^{j\omega t} \quad (3.4.6)$$

$$T_b(x,t) = B e^{[\sigma_b (l_s - x)]} e^{j\omega t} \quad (3.4.7)$$

Efetuando-se as derivadas parciais das soluções (3.4.6) e (3.4.7) em relação à posição e ao tempo e substituindo-as nas equações (3.4.2) e (3.4.3), obtêm-se a seguinte relação genérica:

$$\sigma_i^{\,2} = \frac{j\omega}{\alpha_i} \quad (3.4.8)$$

que por sua vez, pode ser reescrita:

$$\sigma_i = (1 + j) a_i \quad (3.4.9)$$

A relação expressa por (3.4.9) é o coeficiente complexo de difusão térmica. As variáveis U, V, B e θ serão especificadas mediante o estudo das condições de contorno. Tem-se, para E:

$$E = \frac{\beta}{2\kappa_s \left(\beta^2 - \sigma_s^{\,2}\right)} I_0 \eta \quad (3.4.10)$$

Para a resolução das equações de difusão nas regiões da amostra, do gás e do suporte, é necessária a aplicação das condições de contorno. Através deste procedimento tornar-se-á possível a obtenção da temperatura na interface amostra-gás $(x = 0)$. O modelo RG propõe:

i. A temperatura na interface entre dois meios deverá ser contínua, consideração esta verdadeira para uma interface gás-sólido, mas não entre sólidos. Pode-se concluir que tal premissa é resultado da desconsideração da resistência térmica entre os meios, cujo significado físico reside na transferência instantânea de calor. Assim sendo:

$$T_i = T_j \quad (3.4.11)$$

ii. O fluxo de calor na referida interface também deverá ser contínuo:

$$\kappa_i \frac{d}{dx} T_i = \kappa_j \frac{d}{dx} T_j \quad (3.4.12)$$

Aplicando as condições de continuidade ora apresentadas às soluções das equações diferenciais para as diferentes regiões de estudo, torna-se possível a determinação dos coeficientes U, V, B e θ. Através destes, por fim, estabelece-se a distribuição de temperatura na célula em função de parâmetros ópticos, térmicos e geométricos conexos com o sistema. Na interface gás-amostra a temperatura é dada por:

$$T_s = \frac{\beta I_0}{2\kappa_s \left(\beta^2 - \sigma_s^{\,2}\right)} \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right] \quad (3.4.13)$$

sendo os coeficientes b, g e r iguais a:

$$b = \frac{\kappa_b a_b}{\kappa_s a_s}$$

$$g = \frac{\kappa_g a_g}{\kappa_s a_s}$$

$$r = (1 - j)\frac{\beta}{2a_s}$$

Através da identificação dos parâmetros fototérmicos da amostra, torna-se possível a simplificação da equação (3.4.13).

3.5 O sinal fotoacústico

A variação periódica da temperatura no gás, expressa por meio da equação (3.5.1), tem como efeito uma variação, também periódica, da pressão da camada gasosa adjacente à amostra.

$$T_g(x,t) = T_s(0)e^{-\sigma_g x}e^{j\omega t} \qquad (3.5.1)$$

A oscilação térmica ocorre na camada de gás compreendida pelo intervalo $x = 0$ a $x = 2\pi\mu_g$, fora do qual não ocorre difusão de calor. Assim sendo, pode-se especificar a média espacial dessa temperatura dentro da camada especificada:

$$\psi(x,t) = \frac{1}{2\pi\mu_g}\int_0^{2\pi\mu_g} T_g(x,t)dx \qquad (3.5.2)$$

Aplicando-se a relação apresentada em (3.5.1) em (3.5.2) e efetuando-se a aproximação $e^{-2\pi}$ <<1:

$$\psi(x,t) = \frac{1}{2\pi\mu_g}\int_0^{2\pi\mu_g} T_s(0)e^{-\sigma_g x}e^{j\omega t}dx = \frac{T_s(0)}{2\pi(1+j)}e^{j\omega t} \qquad (3.5.3)$$

Lembrando que um número complexo $(a + bi)$ pode ser reescrito na forma exponencial, têm-se

$$(1 + j) = \sqrt{2}e^{j\frac{\pi}{4}}$$

o que acaba por conduzir-nos à seguinte forma da equação (3.5.3):

$$\psi(x,t) = \left[\frac{1}{2\sqrt{2}\pi}\right] T_s(0) e^{j\left(\omega t - \frac{\pi}{4}\right)} \tag{3.5.4}$$

Na região limitada por $2\pi\mu_g$, o gás é suposto ideal e a pressão constante, fato este que nos permite, através da lei correlata aos gases ideais, estimar o deslocamento do gás em virtude do aquecimento periódico. A expressão ora apresentada é escrita em função da média espacial da temperatura $\psi(t)$ e da temperatura média da amostra T_0.

$$\delta x(t) = 2\pi\mu_g \frac{\psi(t)}{T_0} \tag{3.5.5}$$

Utilizando o estabelecido em (3.5.4):

$$\delta x(t) = \frac{T_s(0)\mu_g}{\sqrt{2}T_0} e^{j\left(\omega t - \frac{\pi}{4}\right)} \tag{3.5.6}$$

Assumindo a condição pertinente à lei do gás adiabático:

$$PV^{\gamma} = constante \tag{3.5.7}$$

Nesta, a variável P refere-se à pressão do gás na célula, V ao volume então ocupado pelo mesmo e γ à razão dos calores específicos (c_p/c_v). Efetuando-se a derivação da relação acima:

$$\delta P = -\frac{\gamma P_0 \delta v}{V_0} \tag{3.5.8}$$

Para o caso unidimensional:

$$\delta P = -\frac{\gamma P_0 \delta x(t)}{l_s} \tag{3.5.9}$$

Substituindo a igualdade proposta em (3.5.6) na (3.5.9):

$$\delta P(t) = -\frac{\gamma P_0 \mu_g}{l_g \sqrt{2}T_0} T_s(0) e^{j\left(\omega t - \frac{\pi}{4}\right)} \tag{3.5.10}$$

o que nos permite denominar $Q = \gamma P_0 \frac{T_s(0)\mu_g}{\sqrt{2}T_0 l_g}$, de forma que (3.5.10) possa ser reescrita:

$$\delta P(t) = -Q e^{j\left(\omega t - \frac{\pi}{4}\right)} \tag{3.5.11}$$

Através da análise detalhada da variável Q, tornam-se possíveis algumas conclusões:

i. O sinal fotoacústico diminui com o aumento do comprimento da coluna de ar na célula fotoacústica;

ii. No caso em que a coluna de ar é termicamente grossa, ou seja, $l_g > 2\pi\mu_g$, a intensidade do sinal fotoacústico torna-se bem reduzida, tendendo a anular-se;

iii. O sinal máximo é obtido para o caso em que $l_g \approx \mu_g$.

É evidente, portanto, a dependência direta entre o sinal fotoacústico e a intensidade de luz absorvida pela amostra. O primeiro é conexo com a componente não temporal da variação da pressão, sendo composto por uma intensidade $S_f = \left\| \tilde{S}_f \right\|$ e uma fase, $\Phi_f = \left[\mathrm{Im}\left(\tilde{S}_f\right) \Big/ \mathrm{Re}\left(\tilde{S}_f\right) \right]$, o que possibilita sua representação vetorial no plano complexo.

$$\delta P(t) = \tilde{S}_f e^{j\omega t} \tag{3.5.12}$$

sendo $\tilde{S}_f = S_f e^{j\Phi_f}$.

A equação (3.5.12) pode ser reescrita como $\tilde{S}_f = \delta P(t) e^{-j\omega t}$ e através da substituição de $\delta P(t)$ pelo estabelecido em (3.5.10), obtem-se:

$$\tilde{S}_f = \frac{\gamma P_0 \mu_g T(0)}{\sqrt{2} T_0 l_g} e^{-j\frac{\pi}{4}} \tag{3.5.13}$$

com $T(0) = |T(0)| e^{j\varphi}$. A equação (3.5.13) pode ser escrita, finalmente, como:

$$\tilde{S}_f = \frac{\gamma P_0 \mu_g |T(0)|}{\sqrt{2} T_0 l_g} e^{j\phi} \tag{3.5.14}$$

na qual $\phi = \varphi - \frac{\pi}{4}$.

3.6 Amplitude e fase

A amplitude e fase pertinentes ao sinal fotoacústico constituem-se nos principais parâmetros experimentais a serem obtidos em um determinado estudo. A intensidade relaciona-se diretamente com as propriedades de absorção da amostra – difusão e profundidade a ser analisada – uma vez que a variação na pressão a ser detectada pelo microfone depende do perfil de temperatura, diretamente relacionado com a radiação

absorvida e então convertida em calor. De acordo com este argumento, é importante que as equações (3.5.14) e (3.4.13) sejam reescritas evidenciando-se a dependência destas com as características da radiação luminosa.

$$S(\omega,\lambda) = \frac{\gamma P_0 \mu_g(\omega)}{\sqrt{2} T_0 l_g} T(\omega,\lambda) e^{j\phi} \tag{3.6.1}$$

$$T(\omega,t) = \frac{\beta(\lambda) I_0}{2\kappa_s \left[\beta^2(\lambda) - \sigma^2(\omega)\right]} \left\{ \frac{\left[r(\omega,\lambda)-1\right](b+1)e^{\sigma_s(\omega)l} - \left[r(\omega,\lambda)+1\right](b-1)e^{-\sigma_s(\omega)l} + 2\left[b - r(\omega,\lambda)\right]e^{-\beta(\lambda)l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s(\omega)l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s(\omega)l}} \right\} \tag{3.6.2}$$

De acordo com a equação (3.6.1), que por sua vez, é estritamente relacionada com a (3.6.2), o sinal fotoacústico depende tanto do comprimento de onda da luz incidente quanto da freqüência de modulação da mesma. E é justamente através destes parâmetros ópticos que se torna possível o estudo acerca da absorção da amostra – em um determinado intervalo de variação do comprimento de onda – bem como do perfil de profundidade apresentado pela mesma.

Capítulo 4

ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA

4.1 Um breve histórico

A descoberta do laser em 1960[21] permitiu grandes avanços nos estudos pertinentes à interação da radiação com a matéria, possibilitando, conseqüentemente, progressos grandiosos em áreas científicas relacionadas com a aplicação desses conhecimentos, a exemplo da medicina.

Ao estudar o espectro Raman de líquidos posicionados no interior da cavidade de um laser He-Ne – $\lambda = 632{,}8nm$, em 1964, um grupo de pesquisadores observou uma variação na intensidade no centro do laser na escala de mili-segundo[22]. Esta foi a primeira vez que o fenômeno de formação de *lente térmica* foi observado em laboratório, originando a técnica de *Espectroscopia de Lente Térmica* (ELT). Dentre os pesquisadores do referido grupo estavam os brasileiros Sérgio P. S. Porto e Rogério C. C. Leite.

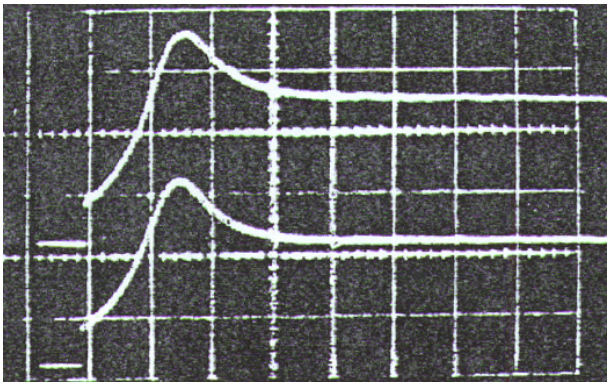

Fig. 4.1: Transiente que representa a mudança de intensidade no centro do laser He-Ne durante a formação de lente térmica[28].

A técnica da ELT passou por diversas modificações até chegar à montagem experimental hoje utilizada: a primeira variação em relação ao experimento inicial de 1964 foi o posicionamento da amostra no exterior da cavidade do laser, em 1966, por Rieckhoff[23]; em 1973 Whinnery e Hu[24] demonstraram que o tratamento teórico do experimento extracavidade era mais simples quando comparado ao intracavidade. Posteriormente, em 1976, Long e *outros*[25] passaram a utilizar dois feixes de laser: um para desencadear a formação da lente térmica na amostra e o outro para detectá-la. Este modelo foi denominado *casado* pelo fato de que os diâmetros de ambos os feixes deveriam ser os mesmos na amostra. E finalmente, em 1983, Higaishi e *outros*[26] propuseram o modelo de lente térmica de arranjo *descasado*, no qual os feixes não apresentam igualdade em seus diâmetros na amostra: o feixe de excitação tem sua cintura, na qual a densidade de potência é máxima, situada na amostra, ao passo de que o segundo feixe serve de prova da formação da lente.

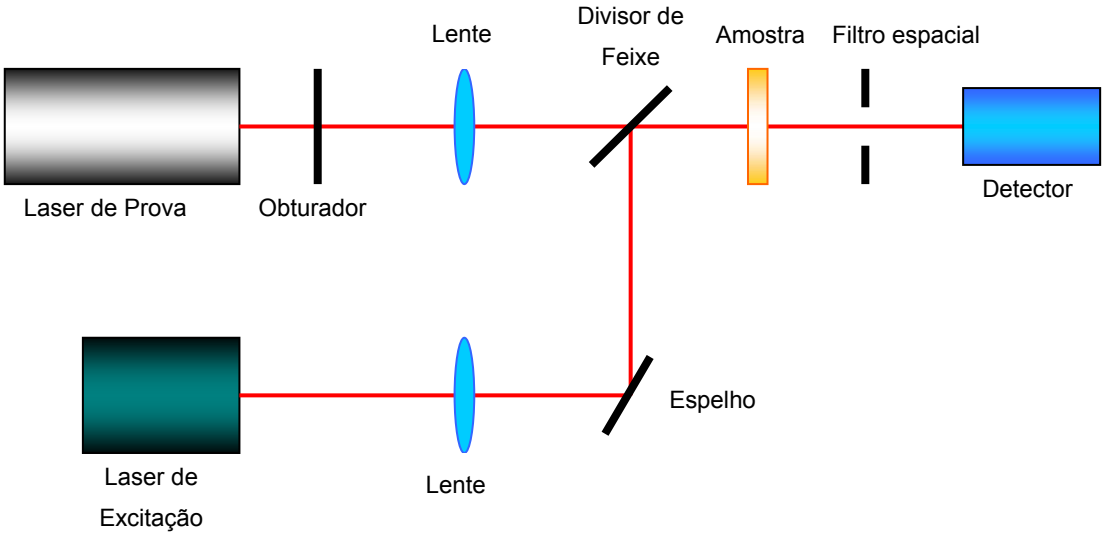

Fig. 4.2: Arranjo experimental para ELT no modo descasado[28].

Este método, por sua vez, apresenta maior sensibilidade quando comparado ao de feixe único e ao de arranjo casado, sendo seu modelo teórico estabelecido em 1992 por Shen e *outros*[27].

4.2 Conceito

O mecanismo de formação da lente térmica na amostra tem início na absorção de parte da energia do laser de excitação, energia esta que será convertida em calor. Este, por sua vez, tem como efeito uma variação de temperatura na amostra, o que acaba por modificar o índice de refração da mesma em uma geometria espacial gaussiana análoga à de uma lente[28]. A variação do índice de refração será demonstrada pelo feixe denominado *feixe de prova* que, ao passar pela amostra, terá sua trajetória inicial modificada, como demonstra a figura 4.3.

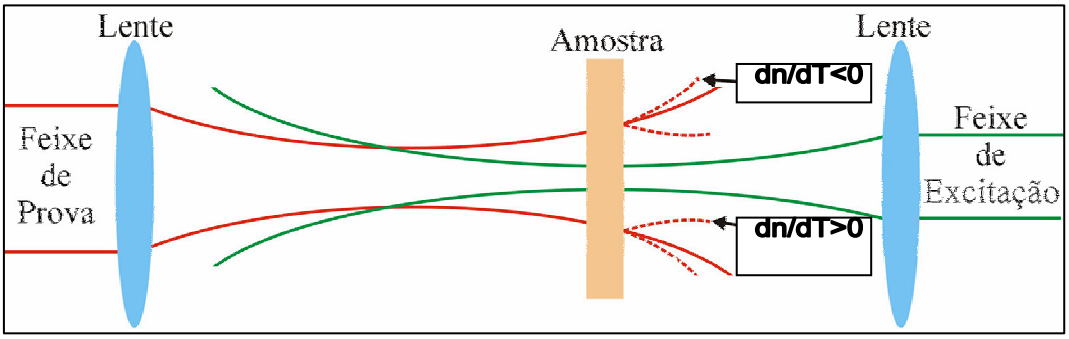

Fig. 4.3: Formação de lente térmica na amostra[28].

No caso de dn/dT <0, a lente formada apresenta caráter divergente; para dn/dT >0, o comportamento da mesma será convergente. A correspondência entre a variação do índice de refração em função da temperatura e o sinal da lente térmica pode ser verificada na figura 4.4.

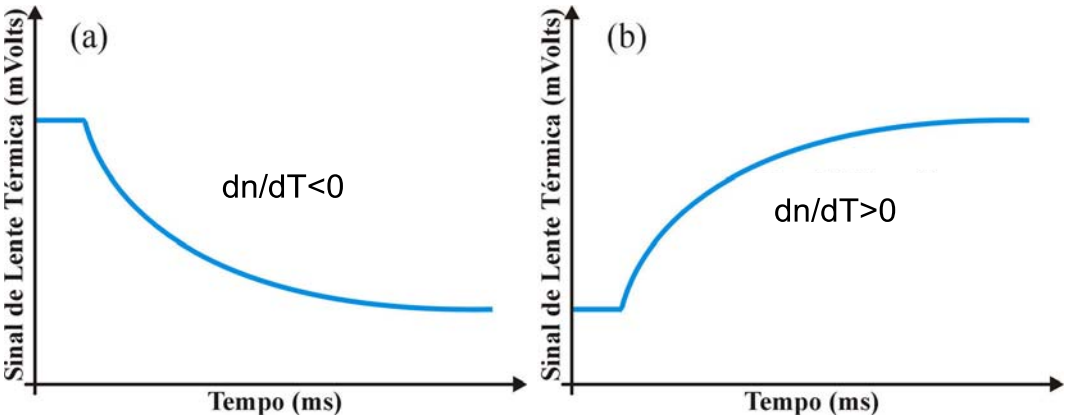

Fig. 4.4: Comportamento do sinal de lente térmica para os dois casos de dn/dT [28].

4.3 Desenvolvimento teórico para ELT no arranjo descasado

Inicialmente, é necessária a definição de algumas abreviações, relativas à configuração experimental demonstrada na figura 4.5, que serão freqüentemente utilizadas no transcorrer deste capítulo.

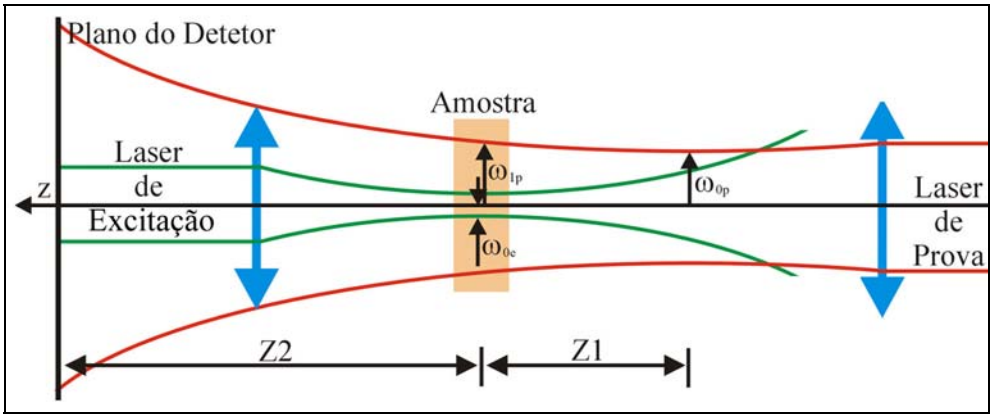

Fig. 4.5: Arranjo experimental com dois feixes descasados[28].

Como já fora descrito, no modelo descasado apenas a cintura do feixe de excitação encontra-se situado na amostra. Já a cintura do feixe de prova, por sua vez, é tomada como origem no eixo z: a partir deste, localiza-se a amostra, a uma distância Z_1, e o detector, a uma distância $Z_1 + Z_2$ da mencionada referência. Em relação às cinturas dos feixes, denomina-se ω_{0p} o raio pertinente à cintura do laser de prova e ω_{1p} o raio deste na amostra; já o laser de excitação, por sua vez, tem seu raio na amostra simbolizado por ω_{0e}.

Para a efetivação de uma equação que modele a perturbação na trajetória do laser de prova detectada pelo fotodiodo são necessárias três etapas: o estudo do aumento local da temperatura $\Delta T(r,t)$, a partir deste a determinação de dn/dT e, finalmente, o cálculo do campo elétrico resultante no detector utilizando a teoria da difração proposta por Fresnel.

4.3.1 Análise do gradiente de temperatura

O processo de formação da lente térmica encontra-se intimamente relacionado com a absorção da energia luminosa e transformação desta em calor, cuja difusão obedece à equação apresentada na segunda seção do capítulo 2.

$$\kappa\left[\nabla^2\left(\Delta T(r,t)\right)\right] = c\rho\frac{\partial}{\partial t}\left(\Delta T(r,t)\right) - Q(r) \qquad (4.3.1)$$

Multiplicando a igualdade acima por $(1/c\rho)$:

$$\alpha\nabla^2\left(\Delta T(r,t)\right) = \frac{\partial}{\partial t}\left(\Delta T(r,t)\right) - f(r) \qquad (4.3.2)$$

sendo $f(r) = Q(r)/c\rho$.

As condições de contorno a serem consideradas são:

$$\Delta T(r,0) = 0 \qquad (r < \infty) \qquad (4.3.3)$$

$$\Delta T(\infty,t) = 0 \qquad (t > 0) \qquad (4.3.4)$$

A primeira condição estabelecida deve-se ao fato de que no momento inicial do experimento, em $t = 0$, não há incidência do laser de excitação na amostra, não havendo, portanto, variação de temperatura. A segunda condição afirma que o calor gerado na amostra no limite radial já foi totalmente atenuado.

A variação da intensidade do laser ao atravessar a amostra é indicada pela expressão (4.3.5):

$$\Delta I(r) = I_e(r) - I_s(r) \qquad (4.3.5)$$

sendo $I_e(r)$ a intensidade do feixe de excitação incidente na amostra e $I_s(r)$ a intensidade do feixe no momento em que este emerge da mesma. No entanto, a última intensidade pode ser escrita por:

$$I_s(r) \approx I_e(r)\left(1 - \beta L\right) \qquad (4.3.6)$$

na qual L é a espessura da amostra e β o coeficiente de absorção óptica para o comprimento de onda do laser de excitação. Substituindo esta relação em (4.3.5) obtém-se uma nova expressão para a variação da intensidade do laser incidente em função da absorção da amostra:

$$\Delta I(r) = I_e(r) - I_s(r) \approx I_e(r)\beta L \qquad (4.3.7)$$

o que acaba por conduzir-nos à seguinte expressão para o calor gerado no meio de incidência[29]:

$$Q(r) = \frac{\Delta I(r)}{L} = I_e(r)\beta \tag{4.3.8}$$

O laser de excitação utilizado para desencadear o efeito possui perfil Gaussiano, fato este que permite que sua intensidade seja descrita pela relação que segue:

$$I_e(r) = \frac{2P_e}{\pi\omega_{0e}^2}\exp\left(-2r^2/\omega_{0e}^2\right) \tag{4.3.9}$$

Nesta, P_e é a potência total do feixe laser de excitação. Substituindo-a na (4.3.8) tem-se:

$$Q(r) = \frac{2P_e\beta}{\pi\omega_{0e}^2}\exp\left(-2r^2/\omega_{0e}^2\right) \tag{4.3.10}$$

$$f(r) = \frac{1}{c\rho}\frac{2P_e\beta}{\pi\omega_{0e}^2}\exp\left(-2r^2/\omega_{0e}^2\right) \tag{4.3.11}$$

A solução proposta para a equação 4.3.2 neste caso é[29]:

$$\Delta T(r,t) = \int_0^\infty\int_0^t Q(r')G(r,r',t,t')dt'dr' \tag{4.3.12}$$

sendo $G(r,r',t,t')$ uma função de Green para o problema,

$$G(r,r',t,t') = \frac{1}{4\pi\kappa(t-t')}\exp\left[-\frac{r^2+r'^2}{4\alpha(t-t')}\right]I_0\left[\frac{rr'}{2\alpha(t-t')}\right] \tag{4.3.13}$$

na qual α corresponde à difusividade térmica da amostra e I_0 é a função modificada de Bessel de ordem zero, lembrando que $I_n(x) = i^{-n}J_n(ix)$. A dedução detalhada pertinente à solução acima pode ser verificada na referência [29].

Substituindo as igualdades estabelecidas em (4.3.10) e (4.3.13) em (4.3.12), torna-se possível a obtenção da seguinte equação para a distribuição espacial e evolução temporal da temperatura na amostra:

$$\Delta T(r,t) = \frac{2P_e\beta}{\pi c\rho\omega_{0e}^2}\int_0^t \frac{1}{1+2t'/t_c}\exp\left(-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2t'/t_c}\right)dt' \tag{4.3.14}$$

Nesta expressão surge um novo parâmetro físico, t_c, mais precisamente uma *constante de tempo térmica característica da amostra*. Esta governa o processo de formação da lente térmica e relaciona-se com a difusividade térmica e com ω_{0e} da seguinte forma:

$$t_c = \frac{\omega_{0e}^2}{4\alpha} \tag{4.3.15}$$

A equação (4.3.14) baseia-se no princípio de que toda a energia absorvida é convertida em calor na amostra; nos casos em que ocorrer o fenômeno de fluorescência, deve-se acrescentar à mesma o fator $\left(1-\Phi_f\lambda_e/\langle\lambda\rangle\right)$, no qual Φ_f corresponde à eficiência

quântica radiativa, λ_e ao comprimento de onda do laser de excitação e $\langle\lambda\rangle$ o comprimento de onda médio da emissão fluorescente. A superposição proposta conduz-nos à equação final para a distribuição de temperatura para o caso em que ocorra fluorescência:

$$\Delta T(r,t) = \frac{2P_e\beta}{\pi c\rho\omega_{0e}^2}\left(1-\Phi_f\lambda_e/\langle\lambda\rangle\right)\int_0^t \frac{1}{1+2t'/t_c}\exp\left(-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2t'/t_c}\right)dt' \qquad (4.3.16)$$

4.3.2 Variação da fase do laser de prova devido à formação da lente térmica

As equações (4.3.14) e (4.3.16) traduzem a mudança de temperatura na amostra. E é justamente através destas que se torna possível a determinação da modificação do caminho óptico (ds/dt)[28], análise esta que requer um estudo acerca do comportamento do índice de refração n pertinente à mesma. Tal alteração pode ser descrita por uma primeira aproximação:

$$n(r,t) = n_0 + \frac{dn}{dT}\Delta T(r,t) \qquad (4.3.17)$$

na qual n_0 é o índice de refração inicial e dn/dT a taxa de variação do índice de refração com a temperatura (K^{-1}). A referida variação provoca uma alteração na frente de onda do feixe de prova, alteração esta que pode ser determinada a partir da teoria de difração de Fresnel e do princípio de Huygens[29].

O deslocamento na fase do laser de prova, $\Phi(r,t)$, é obtido pela diferença dos caminhos ópticos percorridos pelo feixe multiplicado pelo número de ondas:

$$\Phi(r,t) = \frac{2\pi}{\lambda_p}L\left(n(r,t)-n(0,t)\right) = \frac{2\pi}{\lambda_p}L\frac{dn}{dT}\left(\Delta T(r,t)-\Delta T(0,t)\right) \qquad (4.3.18)$$

sendo λ_p o comprimento de onda do laser de prova. Substituindo a equação (4.3.14) na (4.3.18):

$$\Phi(r,t) = \frac{\theta}{t_c}\int_0^t \frac{1}{1+2t'/t_c}\left[1-\exp\left(\frac{-2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2t'/t_c}\right)\right]dt' \qquad (4.3.19)$$

Nesta equação define-se um novo parâmetro físico, θ, o qual relaciona-se diretamente com a potência do laser de excitação, a absorção da amostra e a variação do índice de refração em função da temperatura:

$$\theta = -\frac{P_e \beta L(dn/dT)}{\kappa \lambda_p} \tag{4.3.20}$$

Um feixe Gaussiano *TEM*$_{00}$, em frente à amostra, possui a amplitude complexa do campo elétrico escrita da seguinte forma[30]:

$$U_p(r, Z_1) = \sqrt{\frac{2P_p}{\pi}} \frac{1}{\omega_{1p}} \exp\left(-\frac{r^2}{\omega_{1p}^2}\right) \exp\left[-j\frac{\pi}{\lambda_p}\left(2Z_1 + \frac{r^2}{R_{1p}}\right)\right] \tag{4.3.21}$$

Nesta equação P_p e R_{1p} são, respectivamente, a potência total e o raio de curvatura do feixe de prova em Z_1. Imediatamente após a passagem através da amostra, o laser de prova, após ter sofrido o deslocamento de fase $\Phi(r,t)$, apresenta a seguinte amplitude para o campo elétrico:

$$U_p(r, Z_1) = B \exp\left(-\frac{r^2}{\omega_{1p}^2}\right) \exp\left[-j\left(\frac{\pi}{\lambda_p}\frac{r^2}{R_{1p}} + \Phi(r,t)\right)\right] \tag{4.3.22}$$

com

$$B = \sqrt{\frac{2P_p}{\pi}} \frac{1}{\omega_{1p}} \exp\left(-j\frac{2\pi}{\lambda_p} Z_1\right) \tag{4.3.23}$$

É importante ressaltar o fato de que a absorção da amostra em relação ao laser de prova é considerada desprezível quando comparada àquela sofrida pelo feixe de excitação. Isso pode ser verificado experimentalmente modulando-se o laser de prova de forma semelhante ao que é realizado nas medidas com feixe único.

4.3.3 Propagação do feixe de prova

O feixe de prova, ao incidir no detector, tem sua intensidade diversa daquela isenta de efeitos da LT. Essa variação pode ser quantificada através da interpretação do fenômeno sob a perspectiva da teoria de difração de Fresnel. No entanto, para que seja possível uma simplificação deste estudo, considera-se para a mencionada análise somente o centro da mancha luminosa no plano sobre o qual dá-se a incidência do laser. Considera-se a amplitude complexa do feixe de prova no centro do detector como sendo a superposição

das amplitudes complexas que emanam de todos os pontos do plano de saída da luz na amostra[27]. Em coordenadas cilíndricas:

$$U_p(Z_1+Z_2,t)=\frac{j}{\lambda_p Z_2}\exp\left(-j\frac{2\pi}{\lambda_p}Z_2\right)\int_0^\infty U_p(r,Z_1)\exp\left(-j\frac{\pi}{\lambda_p}\frac{r^2}{Z_2}\right)2\pi r dr \tag{4.3.24}$$

Definindo as variáveis

$$g=\left(\frac{r}{\omega_{1p}}\right)^2 \tag{4.3.25}$$

$$C=B\left(\frac{j\pi\omega_{1p}^2}{\lambda_p Z_2}\right)\exp\left(-j\frac{2\pi}{\lambda_p}Z_2\right) \tag{4.3.26}$$

e substituindo-as na equação (4.3.24), com posterior inserção da equação (4.3.22) na mesma, tem-se:

$$U_p(Z_1+Z_2,t)=C\int_0^\infty \exp\left\{-g-j\left[\frac{\pi}{\lambda_p}\left(\frac{\omega_{1p}^2}{R_{1p}}+\frac{\omega_{1p}^2}{Z_2}\right)g+\Phi\right]\right\}dg \tag{4.3.27}$$

Em relação ao feixe de prova de perfil Gaussiano, existem as seguintes expressões matemáticas concernentes aos parâmetros ópticos[27]:

$$\omega_{1p}^2=\omega_{0p}^2\left[1+\left(Z_1/Z_c\right)^2\right] \tag{4.3.28}$$

$$R_{1p}=\left(Z_1^2+Z_c^2\right)/Z \tag{4.3.29}$$

A nova variável existente nas últimas relações apresentadas, denominada distância confocal do feixe de prova Z_c, é expressa por:

$$Z_c=\frac{\pi\omega_{0p}^2}{\lambda_p} \tag{4.3.30}$$

Nesta etapa do desenvolvimento teórico do modelo da ELT, foi definido um novo parâmetro físico V:

$$V\equiv\frac{\pi}{\lambda_p}\omega_{1p}^2\left(\frac{1}{R_{1p}}+\frac{1}{Z_2}\right)=\frac{Z_1}{Z_c}+\frac{Z_c}{Z_2}\left[1+\left(\frac{Z_1}{Z_c}\right)^2\right]=V'+\frac{Z_c}{Z_2}\left(V'^2+1\right) \tag{4.3.31}$$

sendo

$$V'=\frac{Z_1}{Z_c} \tag{4.3.32}$$

No caso em que $Z_2 >> Z_c$, tem-se a seguinte aproximação:

$$V \approx V' = \frac{Z_1}{Z_c} \tag{4.3.33}$$

A inserção das simplificações e relações ora apresentadas acabam por conduzir-nos à seguinte forma da equação (4.3.27):

$$U_p(Z_1 + Z_2, t) = C\int_0^\infty \exp[-(1+jV)g]\exp(-j\Phi)dg \tag{4.3.34}$$

Considerando o fato de que Φ <<1, torna-se possível efetuar a aproximação $\exp(-j\Phi) \approx 1 - j\Phi$, o que conduz a equação (4.3.34) a uma forma simplificada:

$$U_p(Z_1 + Z_2, t) = C\int_0^\infty (1 - j\Phi)\exp[-(1+jV)g]dg \tag{4.3.35}$$

Definindo um novo parâmetro, designado por m, que relaciona os feixes de prova e de excitação, tem-se:

$$m = \left(\frac{\omega_{1p}}{\omega_{0e}}\right)^2 \tag{4.3.36}$$

No caso em que $m = 1$, o sistema estará configurado no modo casado.

Reescrevendo a equação pertinente à fase do feixe de prova em função da nova variável m:

$$\Phi(r,t) = \frac{\theta}{t_c}\int_0^t \frac{1}{1+2t'/t_c}\left[1 - \exp\left(\frac{-2mg}{1+2t'/t_c}\right)\right]dt' \tag{4.3.37}$$

A obtenção de uma equação final para a intensidade do feixe de prova no centro do detector torna-se possível a partir do cálculo do módulo ao quadrado de $U_1(Z_1 + Z_2, t)$:

$$I(t) = \left|U_1(Z_1 + Z_2, t)\right|^2 \tag{4.3.38}$$

E é justamente com esse objetivo que se aplica a relação (4.3.37) na equação (3.4.35), efetuando-se, em seguida, as integrações em g e t', para posterior efetivação do cálculo do módulo ao quadrado que, por sua vez, acaba por conduzir-nos à seguinte expressão para a intensidade do sinal:

$$I(t) = I(0)\left\{1 - \frac{\theta}{2}\tan^{-1}\left[\frac{2mV}{\left[(1+2m)^2 + V^2\right](t_c/2t) + 1 + 2m + V^2}\right]\right\}^2 + I(0)\left\{\frac{\theta}{4}\ln\left[\frac{\left[1 + 2m/(1+2t/t_c)\right]^2 + V^2}{(1+2m)^2 + V^2}\right]\right\}^2$$

(4.3.39)

Nesta equação, $I(0)$ corresponde ao sinal a ser registrado no detector quando $t = 0$, sendo expresso por:

$$I(0) = \left| C/(1 + jV) \right|^2 \qquad (4.3.40)$$

O segundo termo da expressão (4.3.39) é desprezado[29], de modo que a equação final para o sinal da ELT passa a ser:

$$I(t) = I(0)\left\{1 - \frac{\theta}{2}\tan^{-1}\left[\frac{2mV}{\left[(1+2m)^2 + V^2\right](t_c/2t) + 1 + 2m + V^2}\right]\right\}^2 \qquad (4.3.41)$$

Apresenta-se, portanto, a equação final a ser utilizada para o ajuste do sinal detectado em virtude da formação da lente térmica, equação esta que relaciona parâmetros pertinentes à configuração experimental com as características fototérmicas da amostra a ser estudada, em especial e de interesse neste trabalho, ao coeficiente de absorção óptica inserido em θ.

Capítulo 5

CAUSAS E EFEITOS DO VITILIGO E MORFOLOGIA DA PELE

5.1 Vitiligo

Caracterizado pela ocorrência de máculas brancas de diferentes tamanhos (ver figura 5.1), o vitiligo é uma doença que acomete 0,5 a 2% da população mundial[1]. Atinge todas as etnias, ambos os sexos e todas as faixas etárias, sendo a idade média de ocorrência em torno de 20 anos.

As áreas despigmentadas são decorrentes da ausência de melanina em determinados segmentos da pele. A melanina é um pigmento intrínseco da pele, cuja função é absorver a energia proveniente da radiação ultravioleta, atuando, portanto, como o mecanismo fotoprotetor natural. A interrupção da melanogênese tem como causa a diminuição ou inexistência dos melanócitos, células especializadas na produção de melanina e no processo de pigmentação da pele.

Diversos são os estudos que buscam a explicação da ausência dos melanócitos ou de sua atuação. Além da hipótese relacionada ao fator genético – cerca de 20% dos pacientes com vitiligo possuem pelo menos um parente de 1º grau com a doença[32] – existem três teorias que buscam sua etiologia: auto-imune, neurogênica e autodestruição dos melanócitos[2].

De acordo com a primeira, os melanócitos seriam destruídos por mecanismos imunológicos. Esta idéia decorre do fato de que freqüentemente verifica-se associação do vitiligo com doenças imunológicas e com a presença de anticorpos antimelanócitos.

Já a teoria neurogênica atribui a inibição da melanogênese a fatores neuroquímicos, como por exemplo, o efeito tóxico do acetilcolina sobre os melanócitos. E

por último, a autodestruição dos melanócitos decorrente da ação de substâncias envolvidas na formação da melanina (quinonas, fenóis e outras).

Como a etiologia da doença ainda não é totalmente elucidada, sua cura apresenta diversos segmentos terapêuticos. A principal linha para o tratamento desta patologia baseia-se na tentativa de estimular a repigmentação das áreas lesadas, adotando-se com este intuito o emprego de corticóides, aplicados topicamente, e de psoralênicos, utilizados topicamente ou oralmente associados com subseqüente exposição à radiação ultravioleta (320-400 nm). Este tratamento é denominado PUVA e apresenta como principal efeito colateral o aparecimento de bolhas fototóxicas nos pacientes.

Na falta de um tratamento ideal, as terapias são aplicadas de acordo com a extensão da área afetada: menos de 10%, de 10 a 25%, de 25 a 50% e superior a 50%[2]. Nos casos em que a doença manifesta-se em regiões isoladas e a evolução da mesma encontra-se estagnada têm sido realizados enxertos de pele não lesada ou então o transplante de melanócitos cultivados *in vitro*. Apesar de apresentarem bons resultados estéticos, estas técnicas se restringem a casos amenos, em que pequenas regiões são afetadas. Já nos casos em que ocorre despigmentação superior a 50% da pele, a possibilidade de repigmentação é mínima, sendo uma alternativa extrema a despigmentação total, na qual utiliza-se como princípio ativo o monobenzil éter de hidroquinona, de uso tópico. Este acarreta a destruição dos melanócitos, processo este irreversível, condicionando o paciente a cuidados intensos relacionados à luz solar, uma vez que toda sua defesa ao ultravioleta torna-se inexistente por toda a vida.

Na tentativa de encontrar tratamentos efetivos e menos agressivos, a comunidade científica tem voltado sua atenção para princípios ativos extraídos de plantas que, segundo o conhecimento popular, têm como efeito o aumento da atividade melanogênica. A exemplo, citam-se a mamica de cadela, o confrei e *Angelica sinensis*.

Em nosso estudo, foi utilizado o óleo extraído da *Macadamia integrifolia*, planta esta originária da Austrália à qual também é popularmente atribuída atividade melanogênica (ver figura 5.2).

Fig. 5.1: As áreas despigmentadas da pele apresentadas na figura caracterizam o vitiligo[31].

Fig. 5.2: Cultivo da *Macadamia integrifolia* (A); as figuras B, C e D apresentam, respectivamente, as folhas, os frutos – dos quais é extraído o princípio ativo – e as flores desta planta[33].

5.2 Estrutura da pele

O corpo humano é revestido externamente por um órgão, a pele, cuja principal função é proteger as estruturas internas das possíveis agressões provenientes de qualquer agente externo[34]. Em função de sua arquitetura e propriedades físicas, químicas e biológicas, é responsável pela execução de diversas atividades, tais como a *proteção imunológica*, *a termorregulação*, através da sudorese, *a percepção*, que se processa através da complexa rede nervosa cutânea (codificando sensações de frio, calor, dor e sensações pertinentes ao tato), *secreção* e *proteção contra os raios UV*. A camada mais externa da pele é dotada de impedância elétrica elevada, dificultando, portanto, a passagem de corrente elétrica através da mesma.

Em relação à sua estrutura, pode ser dividida em duas grandes camadas de tecidos: a camada superior, denominada *epiderme* e a *derme*. As estruturas ora apresentadas podem ser visualizadas na figura 5.3 inserida no final deste capítulo.

5.2.1 A epiderme

A epiderme é constituída por epitélio estratificado cuja espessura apresenta variações contidas no intervalo de 0,04 mm a 1,6 mm[34]. É composta por queratinócitos que, de acordo com seus estados de diferenciação, acabam por dividi-la em camadas, assim denominadas *basal, espinhosa, granulosa* e *córnea*.

A camada basal é a mais profunda porção da epiderme e é constituída por dois tipos de células: células basais e os melanócitos. As células da camada basal dão origem às demais camadas da epiderme, através do contínuo processo de proliferação e diferenciação celular. Estudos realizados através do emprego de radioisótopos demonstram que o tempo de maturação de uma célula basal, tempo este computado a partir do momento da divisão celular até a eliminação das lâminas córneas, encontra-se entre 52 e 75 dias[2]. Os melanócitos, ao contrário das demais células da camada basal, não se renovam em função de sua origem embrionária, a partir do neuroectoderma. Uma vez estabelecidos na pele, sua morte acarreta em despigmentação local.

Dentre as funções da camada basal, destacam-se a aderência dermo-epidérmica, suporte mecânico e a função barreira, uma vez que esta região oferece restrições à penetração de moléculas de peso molecular elevado, fato este de extrema importância na proteção relacionada a moléculas imunologicamente ativas[34].

No decorrer do texto que segue, mais especificamente na seção 5.3, os melanócitos serão descritos mais detalhadamente, uma vez que a compreensão dessas estruturas apresenta grande importância para o estudo apresentado.

5.2.2 A derme

A derme é a camada na qual diversos tipos celulares encontram-se dispersos em abundante material fibrilar, constituído predominantemente por fibras colágenas e elásticas[34].

No interior de sua espessura, variável entre 1 e 4 mm, abriga as estruturas anexas da epiderme, as glândulas sudoríparas e os folículos pilossebáceos. Nesta região também são encontradas células de origem sangüínea, leucócitos e plasmócitos, assim como em quantidades inconstantes, vasos sangüíneos, linfáticos e estruturas nervosas.

5.3 Os melanócitos e o processo melanogênico

Localizados na camada basal da epiderme, em uma profundidade média de 120μm[36], os melanócitos são células dendríticas responsáveis pela produção de melanina, pigmento cuja função é absorver o ultravioleta. No tecido epitelial da região da cabeça e antebraços, os melanócitos encontram-se na proporção de 2.000 células/mm^2, ao passo de que nas demais regiões do corpo, este número é estimado em torno de 1.000 células/mm^2[34]. Em relação às diferentes colorações de pele, pode-se afirmar que estas não são decorrentes de variações do número dessas células, mas sim de sua capacidade funcional.

Juntamente com os queratinócitos, em relação aos quais são encontrados na proporção de 1 melanócito para 10 queratinócitos[2], constituem as denominadas unidades epidermo-melânicas da pele, evidenciadas na figura 5.4.

No citoplasma dos melanócitos verifica-se a existência de organelas exclusivas, denominadas melanossomas, nas quais ocorre a síntese e a deposição da melanina devido à ação da tirosinase produzida pelos ribossomas. O processo bioquímico de produção de melanina está apresentado na ilustração esquemática da figura 5.5. Após o mesmo, os

melanossomas, repletos de melanina, são transferidos ao interior dos queratinócitos das unidades epidermo-melânicas via prolongamentos dendríticos. Estima-se que cada melanócito esteja interligado a cerca de 36 queratinócitos através dessas estruturas[2].

No tocante ao índice de produção melânica, sabe-se que os queratinócitos exercem controle sobre a proliferação, diferenciação, o número de dendritos e atividade dos melanócitos através de fatores mitogênicos e inibidores de mitose, sendo o fator solúvel mais ativo o Fator de Crescimento dos Fibroblastos (FGV – Fibroblasts Growth Factor), produzido pelos queratinócitos em processos de divisão celular intensos. Em condições normais, os melanócitos não proliferam e não migram, equilíbrio este quebrado em condições especiais, em geral, desencadeadas pela exposição ao ultravioleta. Esta, por sua vez, estimula a ação da tirosinase resultando na produção de melanossomas maiores e mais numerosos.

Pouco é descrito na literatura acerca dos mecanismos envolvidos na absorção da radiação pelo pigmento melânico: sabe-se que a maior parte da radiação visível é absorvida e convertida em calor através do acoplamento fônon-fônon, diretamente relacionado à energia vibracional; a despeito das radiações de energias mais elevadas, não existem evidências que provem a dissociação da molécula da melanina em virtude de tais absorções[37].

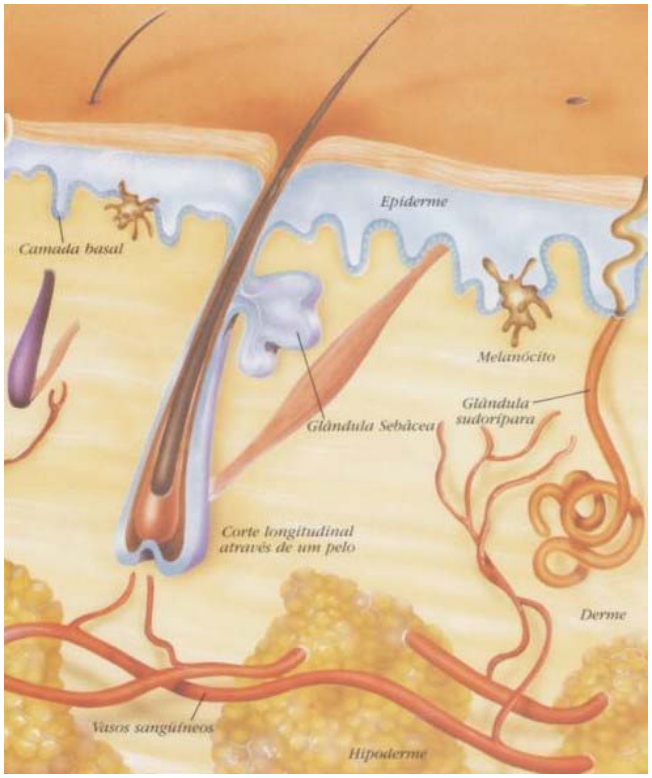

Fig. 5.3: Estrutura da pele e subcutâneo[35].

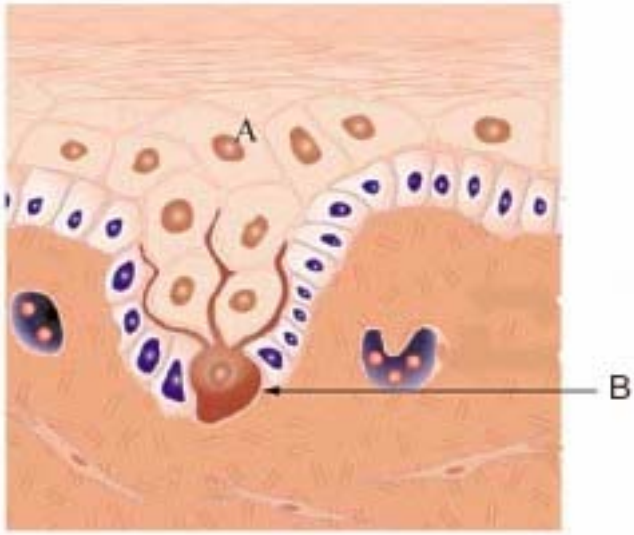

Fig.5.4: Unidade epidermo-melânica, na qual podem ser identificados o melanócito (B) e os queratinócitos (A)[35].

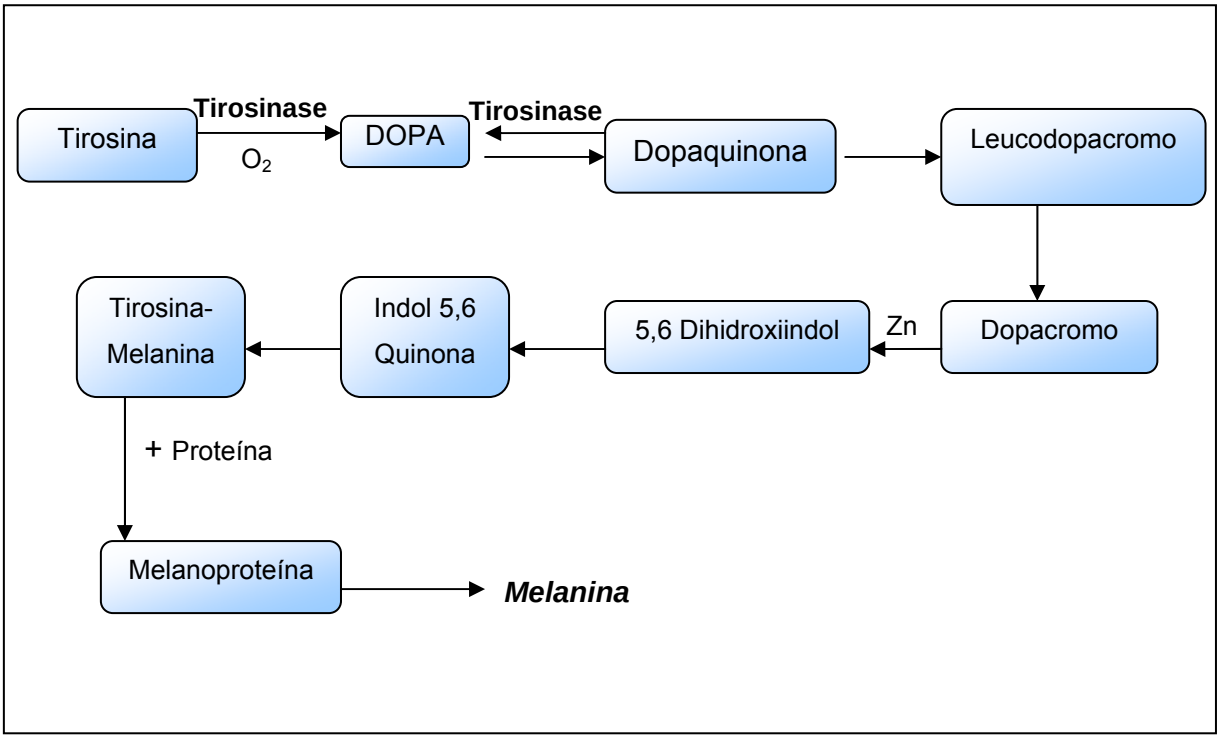

Fig. 5.5: Processo bioquímico concernente à produção de melanina nos melanócitos[34].

Capítulo 6

ARRANJOS EXPERIMENTAIS E PREPARO DAS AMOSTRAS

6.1 Montagem experimental da Espectroscopia Fotoacústica

O aparato para realização das medidas com a fotoacústica é apresentado na figura 6.1.

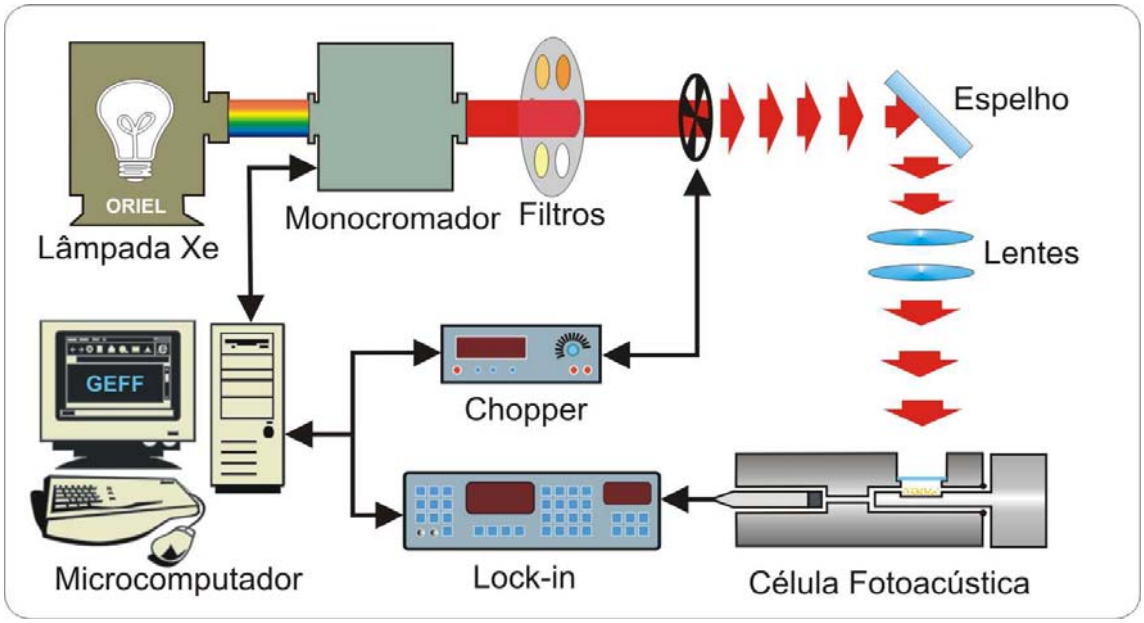

Fig. 6.1: Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica[4].

Uma lâmpada de arco Xenônio, da marca Oriel Corporation – modelo 68820 – foi utilizada como fonte de luz branca, em uma potência de 700 Watts. No entanto, a intensidade de emissão da lâmpada não é a mesma para todos os comprimentos de onda,

tornando necessária a normalização dos espectros de absorção. Em nosso caso, a normalização foi realizada utilizando-se uma amostra de carvão como referência.

Ao ser emitida pela lâmpada, a luz propaga-se ao interior do monocromador através da fenda de entrada, sendo então refletida para a grade de difração por meio do primeiro espelho fixo. A grade dispersa a luz decompondo-a espacialmente em seus diferentes comprimentos de onda; apenas o comprimento de onda selecionado volta a submergir através da fenda de saída do monocromador. As fendas utilizadas em nosso estudo foram de 3 mm, marca Oriel – modelo 77213.

No entanto, alguns comprimentos de onda indesejáveis podem permanecer no feixe de luz final, o que exige que sejam utilizados filtros com a finalidade de bloquear a passagem dos mesmos. Através do emprego deste recurso óptico, torna-se possível a unicidade do comprimento de onda que acabará por incidir na amostra.

Após a passagem pelo filtro, a luz é modulada utilizando-se um modulador mecânico – modelo SR 540 da Stanford Research Systems – devidamente conectado ao amplificador síncrono ao qual fornece um sinal de referência por meio de um fotodiodo. As freqüências utilizadas para a realização dos espectros das amostras estudadas foram 20 e 40 Hz.

Continuando a descrição da trajetória da luz, percebe-se que esta, já modulada, incide em um espelho que, por sua vez, acaba por refleti-la a uma associação de duas lentes convergentes**,** cuja finalidade é focalizar o feixe sobre a amostra. Assim sendo, a intensidade luminosa será máxima neste ponto.

A célula fotoacústica utilizada é aquela denominada *fechada*, demonstrada na figura 6.2. A mesma é isolada das possíveis variações de pressão provenientes do ambiente externo através de um anel de vedação (“o-ring”).

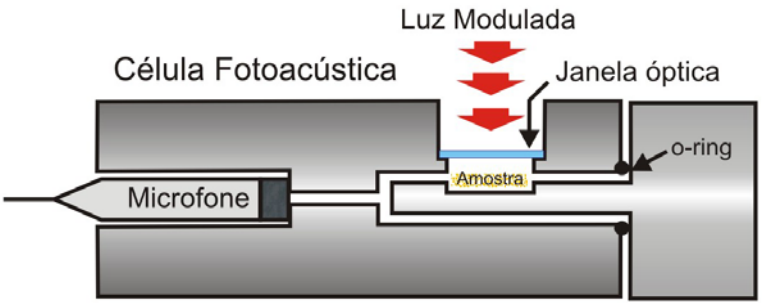

Fig. 6.2: Célula fotoacústica fechada[4].

De acordo com o esquema apresentado, a luz atinge a amostra após atravessar uma janela óptica de quartzo, transparente para todo o espectro da luz branca, de modo que o referido feixe não tenha sua intensidade diminuída.

Conectado ao compartimento ocupado pela amostra encontra-se o microfone, da marca Brüel & Kjaer – modelo BK 2669. A finalidade deste é a detecção do sinal fotoacústico e transmissão do mesmo para o Lock-in – modelo 5110 da marca EG & G Instruments – que, por sua vez, transmite as informações para o sistema operacional que registra os dados. Estes serão finalmente trabalhados por meio de um programa específico – Origin® 7.0 SRO, Origin Lab Corporation.

6.2 Análise da permeação cutânea utilizando a Espectroscopia Fotoacústica em modelo experimental

Neste estudo foram utilizados coelhos albinos da raça New Zealand, com peso médio de 2,5 Kg, provenientes da Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá. Estes foram mantidos durante 16 dias no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, em gaiolas individuais, com luz artificial e alternância de claro e escuro de 12 horas, à temperatura de 20º C, recebendo ração e água à vontade, sendo o procedimento experimental aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob protocolo CEEA nº 022/2005.

O creme utilizado neste experimento para o tratamento do vitiligo, denominado VitiSTV-02, possui como princípio ativo o óleo extraído da *M. integrifolia* e foi produzido pela Steviafarma Industrial S/A (Maringá-PR). Foram utilizadas duas formulações – VitiSTV-02S e VitiSTV-02A – sendo o diferencial entre as mesmas a variação da concentração de ácido salicílico: a primeira era desprovida desta substância, ao passo de que a segunda a possuía em uma concentração de 2,5%.

As formulações foram aplicadas diariamente nas áreas côncavas das orelhas esquerdas dos animais durante 15 dias (6 animais para cada formulação). Nas orelhas direitas utilizou-se água destilada como controle.

Os animais foram anestesiados e sacrificados por dose letal do anestésico Tiopental sódico – Thionembutal®. Após a coleta das orelhas, estas eram preparadas

através da remoção da cartilagem, como mostra a figura 6.3, resultando em amostras de aproximadamente 500 µm de espessura, que permitiam o estudo da região interna da pele.

Conhecendo-se o valor da difusividade térmica da pele, $\alpha_{pele} = 4.10^{-4} cm^2 s^{-1}$ [38], torna-se possível, por meio da equação (2.2.2), o cálculo do comprimento de difusão térmica em função das freqüências de modulação da luz utilizadas. Têm-se, portanto, para a freqüência de 40 Hz, $\mu_s = 17{,}8 \mu m$, ao passo de que para a freqüência de 20 Hz, $\mu_s = 25 \mu m$. A figura 6.4 mostra as regiões monitoradas nas amostras durante a realização dos espectros.

Através da inversão da superfície de iluminação da amostra no interior da célula fotoacústica, torna-se possível um estudo acerca da penetração dos medicamentos também nas camadas mais profundas da pele, mais especificamente, em profundidades correspondentes a $475 \mu m$ e $482{,}2 \mu m$.

Paralelamente à análise da PAS, a mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, Cecília Valente Rodrigues Truite, realizou análises macroscópicas e histológicas da pele após a aplicação dos medicamentos, com o objetivo de verificar a tolerância local em relação aos mesmos. Dentre os fatores observados, pode-se citar a ocorrência de eritema, descamação e formação de comedos, acantose epidérmica, hiperqueratose, além da análise de possíveis reações inflamatórias. Observações como esta são realizadas desde a década de 50 em orelhas de coelho pelo fato de que as mesmas apresentam resposta rápida à ação do medicamento aplicado[39]: enquanto reações foliculares poderiam levar seis meses para se manifestar na pele humana, em orelhas de coelho podem ser observadas em duas semanas. Análises como esta têm sido recomendadas pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (Anvisa)[40] em técnicas para avaliar a irritabilidade de um produto cosmético na pele.

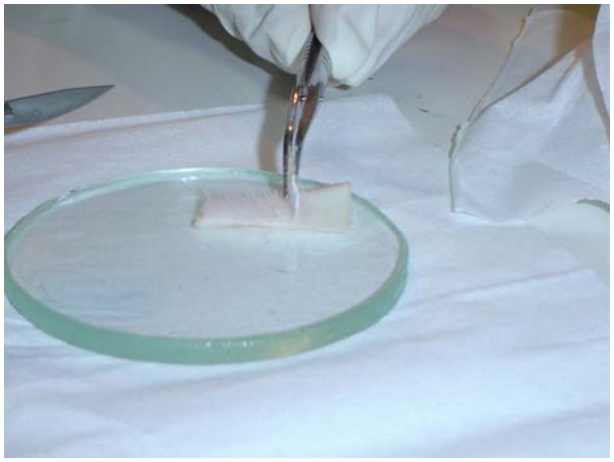

Fig. 6.3: Preparo da pele de coelho para realização da leitura fotoacústica.

Fig. 6.4: Comprimentos de difusão térmica na amostra de pele.

6.3 Montagem experimental da Espectroscopia de Lente Térmica

Para a realização das medidas na ELT utilizamos o arranjo experimental apresentado na figura 6.5.

Primeiramente, a amostra era posicionada em uma cubeta de quartzo de 2 mm de espessura indicada pela sigla UA no esquema.

O laser de Argônio de marca Coherent – modelo Innova 90 Plus – com 6 Watts de potência nominal e comprimento de onda de 476 nm foi utilizado como feixe de excitação (LE). Este teve sua incidência na amostra controlada por meio de um obturador de luz, da marca Melles Griot, acionado por comandos provenientes do programa de aquisição de dados. Como feixe de prova (LP) empregou-se o laser de He-Ne, *JDS Uniphase*, cuja potência nominal corresponde a 1mW, no comprimento de onda de 633 nm.

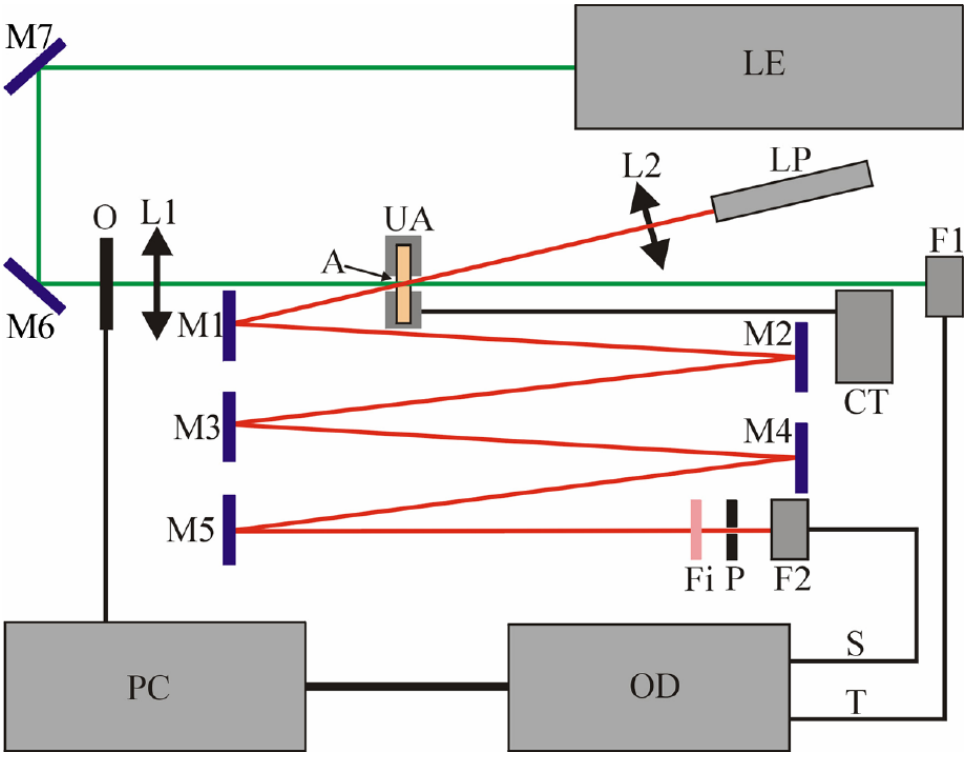

Fig. 6.5: Arranjo experimental da Espectroscopia de Lente Térmica (ELT)[28].

As lentes convergentes L1 e L2 foram dispostas sobre transladores que permitiam a modificação das posições dos mesmos, proporcionando, dessa forma, o alinhamento adequado do sistema.

Os fotodiodos F1 e F2 foram inseridos na configuração experimental de modo que o primeiro viesse a ativar a transferência do sinal a ser detectado pelo segundo. Ambos apresentam resposta linear para a variação da intensidade da luz em μs. O osciloscópio utilizado foi Hewlet Packard – modelo 54615B, 500MHz – equipado com memória de armazenamento de dados, que eram transferidos para um microcomputador, onde posteriormente seriam ajustados no programa OriginPro 7.0.

Os parâmetros geométricos do sistema são apresentados na tabela 6.1, lembrando que *V* e *m* foram estabelecidos no capítulo 4 por meio das equações (4.3.33) e (4.3.36), respectivamente.

Tabela 6.1: Parâmetros ópticos e geométricos do arranjo experimental da ELT.

Comprimento de onda do feixe de excitação	476 nm
Comprimento de onda do feixe de prova	633 nm
Raio do feixe de excitação na amostra (ω_{0e})	49,2 ± 0,5 μm
Raio do feixe de prova na amostra (ω_{1p})	208,5 ± 0,5 μm
V	2,65 ± 0,01cm
m	17,9 ± 0,1 cm

6.4 Análise da produção de melanina utilizando a Espectroscopia de Lente Térmica em modelo in vitro

A eficácia do óleo de *M. integrifolia* na produção de melanina foi avaliada por meio da ELT. Neste experimento foram utilizadas culturas de melanoma de ratos da linhagem $B_{16}F_{10}$, nas quais fora aplicado o princípio ativo, cedidas pela mestranda Cecília Valente Rodrigues Truite.

Duas formulações do óleo extraído da *M. integrifolia* foram testadas:

1ª - Uma diluição do óleo, cuja concentração final remete ao percentual de 3% do princípio ativo. Esta é a diluição presente nos medicamentos VitiSTV-02S e VitiSTV-02A.

2ª - Fração óleo 500: resultante de um processo de extração do próprio óleo, no qual utiliza-se uma solução composta por clorofórmio, etanol e água (cujas proporções são, respectivamente, 8:4:1), cujo produto final resulta em uma fração lipídica do mesmo.

Estas foram adicionadas em meios celulares, em poços separados, após 24 h de incubação dos mesmos. Posteriormente, os referidos meios tratados foram comparados com o controle – cultura de célula em que não fora aplicado o princípio ativo.

Passadas 72 h de incubação após a aplicação das formulações do princípio ativo, as células foram retiradas dos poços e solubilizadas em 1 ml de PBS (tampão salina fosfato, de concentração 0,01N). Após contagem em câmara de Neubauer, foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm durante 10 min. O sedimento obtido foi então solubilizado em NaOH 1N – processo este no qual as células são rompidas, solubilizando a melanina – e deixado em repouso por trinta minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por um tempo de dez minutos para clarificação do sobrenadante, que por sua vez, foi depositado em uma cubeta de quartzo de 2 mm de espessura a fim de que se realizasse a ELT. O protocolo ora especificado, envolvendo o cultivo celular e tratamento deste para as leituras das concentrações de melanina, foi realizado pela Cecília Valente Rodrigues Truite de acordo com o método Naeyaert et al.[41], porém com algumas modificações.

As leituras da ELT foram realizadas com potências de 40 mW a 120 mW, de modo que o parâmetro θ das amostras, pertinente à absorção óptica, pudesse ser quantificado por meio do ajuste proposto na equação (4.3.41) para as diferentes concentrações do princípio ativo.

Capítulo 7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Avaliação da permeação dos medicamentos

No presente estudo foram obtidos os espectros de absorção dos componentes dos medicamentos VitiSTV-02S e VitiSTV-02A. O espectro apresentado na figura 7.1 refere-se ao princípio ativo dos mesmos: o óleo extraído da *Macadamia integrifolia*.

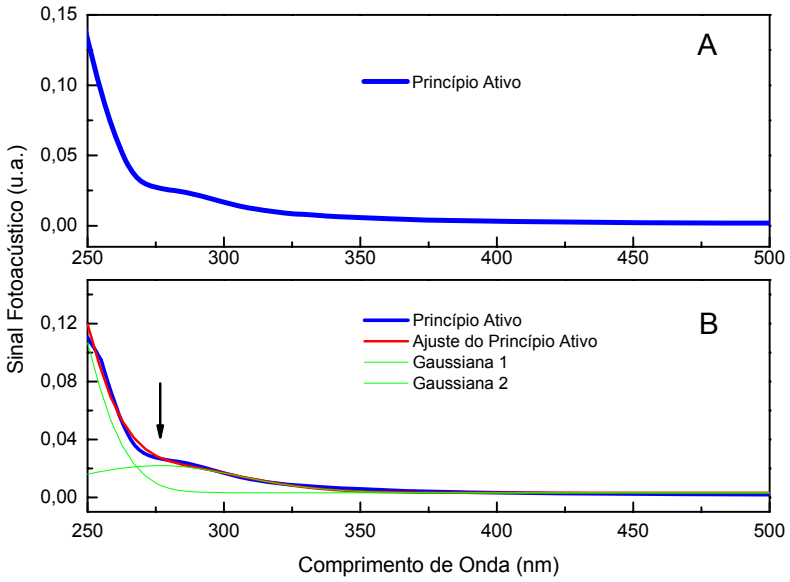

Fig. 7.1: (A) Espectro do princípio ativo; (B) espectro do princípio ativo ajustado.

De acordo com o espectro apresentado, a absorção do princípio ativo pode ser representada por uma curva teórica composta pela soma de duas gaussianas, sendo a gaussiana com centro definido em λ = 276 nm a utilizada para identificar e quantificar a presença dos cremes em diferentes profundidades da pele.

O medicamento VitiSTV-02S é constituído por uma base e pelo princípio ativo. A absorção do mesmo pode ser verificada na figura 7.2.

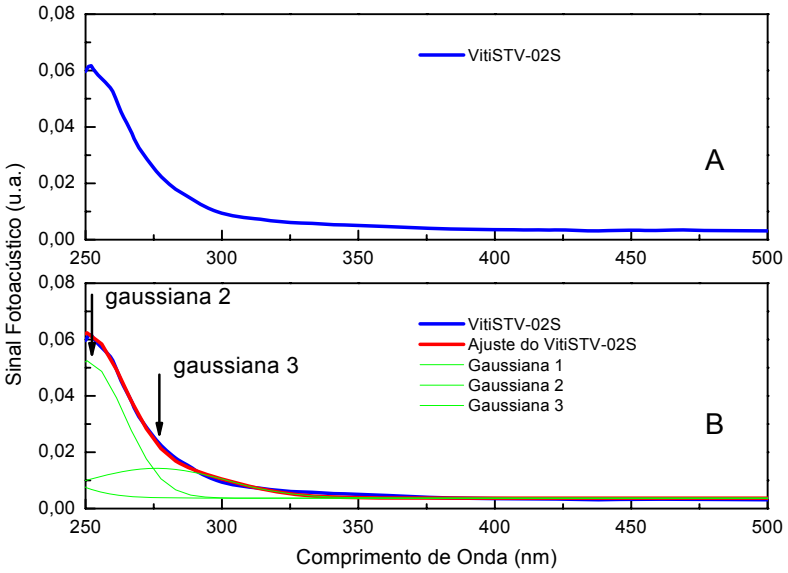

Fig. 7.2: (A) Espectro do medicamento VitiSTV-02S; (B) espectro apresentado em (A), porém ajustado por uma curva teórica composta pela superposição das gaussianas com centros x_{c1} = 188 nm, x_{c2} = 250 nm e x_{c3} = 276 nm.

Neste caso, a curva relacionada à absorção pode ser constituída pela superposição de três gaussianas, tendo a primeira centro em 188 nm e largura de 50 nm, a segunda em 250 nm e largura de 27 nm e a terceira em 276 nm e largura de 50 nm, gaussiana esta relacionada ao princípio ativo. Para a análise da penetração do medicamento a primeira gaussiana não será relevante, uma vez que o intervalo de comprimento de onda a ser utilizado para a obtenção do espectro da pele será de 250 a 500 nm. Para que estes valores pudessem ser considerados foram realizados no mínimo três repetições do espectro de absorção de cada amostra. Considerando o fato de que os centros das gaussianas mencionadas, bem como suas respectivas larguras, constituem parâmetros fixos, torna-se possível o estabelecimento de uma relação matemática entre as áreas das mesmas, relação

esta que será de grande valia no momento do ajuste das amostras de pele com medicamento. Assim sendo:

$$\frac{A_2}{A_3} = \frac{1{,}679}{0{,}665} \approx 2{,}5 \qquad (7.1.1)$$

com A_2 corresponde à área sob a gaussiana 2 e A_3 à área sob a gaussiana 3.

Analisaremos agora o segundo medicamento, VitiSTV-02A. Este apresenta em sua formulação, além da base e do princípio ativo, uma porcentagem de 2,5% de ácido salicílico, cuja finalidade é aumentar a penetração do creme na pele.

O espectro do ácido salicílico também pode ser arquitetado a partir de três gaussianas, sendo seus centros estabelecidos em 184, 304 e 342 nm, respectivamente.

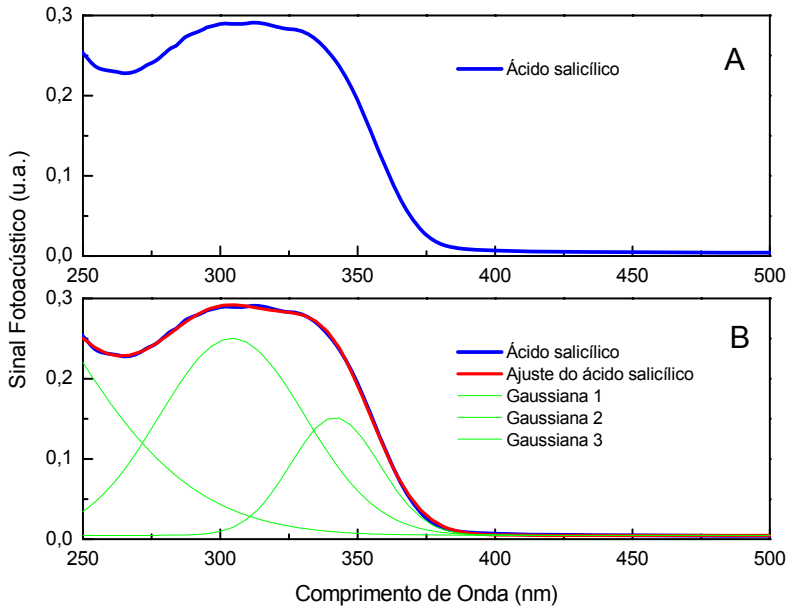

Fig.7.3: (A) Espectro do ácido salicílico; (B) espectro do ácido ajustado, com gaussianas centradas em 184, 304 e 342 nm.

Tendo como base essas informações, foi possível o estudo do espectro do creme VitiSTV-02A (figura 7.4). Este apresenta, além das gaussianas já anteriormente identificadas no creme VitiSTV-02S (centradas em 250 e 276 nm), uma quarta gaussiana, centrada em 304 nm cuja largura corresponde a 40 nm. Esta foi atribuída à presença do ácido salicílico em sua formulação. No entanto, um fato curioso: a gaussiana cujo centro se apresenta em 342 nm no espectro do ácido salicílico não aparece no espectro do medicamento VitiSTV-02A, resultado este que pode ser explicado por alterações químicas relacionadas a mudanças no pH deste creme.

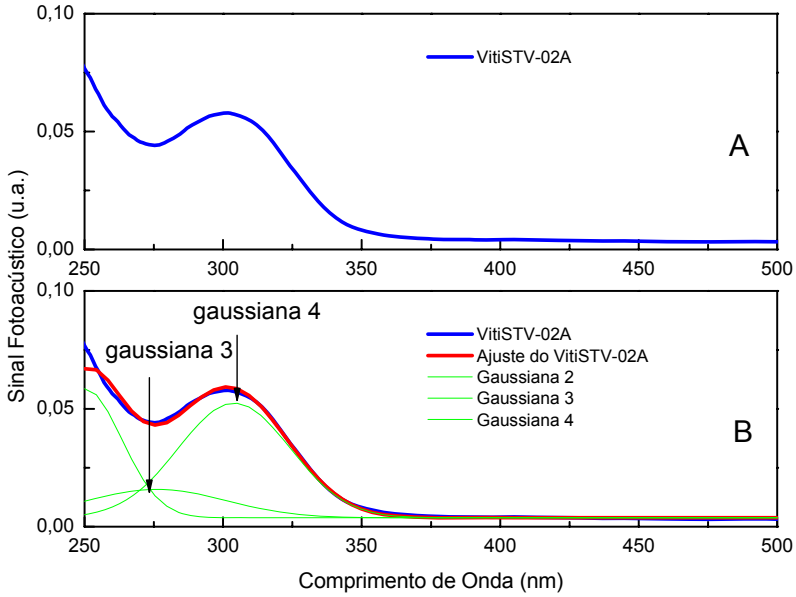

Fig. 7.4: (A) Espectro do medicamento VitiSTV-02A; (B) o mesmo espectro ajustado. Os centros das gaussianas evidenciadas são x_{c3} = 276 nm e x_{c4} = 304 nm.

Também para esta segunda formulação estabelece-se uma relação matemática entre as áreas A_i sob as gaussianas com centros $x_{c\,i}$ definidos em 276 nm e 304 nm:

$$\frac{A_4}{A_3} = \frac{2{,}466}{0{,}757} \approx 3{,}3 \qquad (7.1.2)$$

A obtenção das informações relacionadas às absorções dos cremes é de suma importância para o estabelecimento das equações a serem utilizadas nos ajustes das amostras: é justamente a partir das primeiras que foi possível a realização das segundas.

No entanto, para que estas pudessem ser estabelecidas completamente, fez-se necessário um estudo relacionado à absorção da pele dos coelhos. As próximas duas figuras que seguem retratam o espectro realizado nas referidas amostras em uma freqüência de 40Hz.

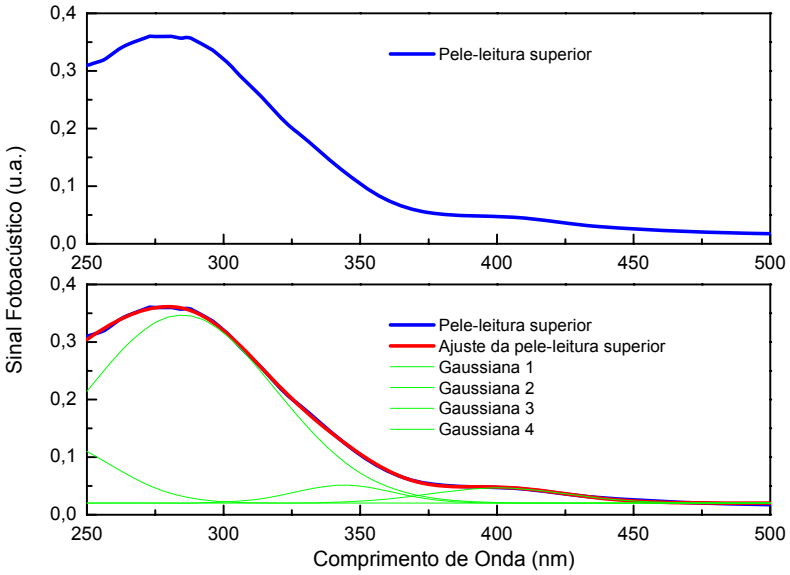

Fig. 7.5: Espectro de absorção da pele de coelho, com incidência na superfície da amostra; abaixo o ajuste gaussiano com quatro picos.

O espectro da leitura realizada na face inferior da amostra de pele – figura 7.6 – apresenta variações nos centros e larguras das gaussianas quando comparada à realizada na face superior.

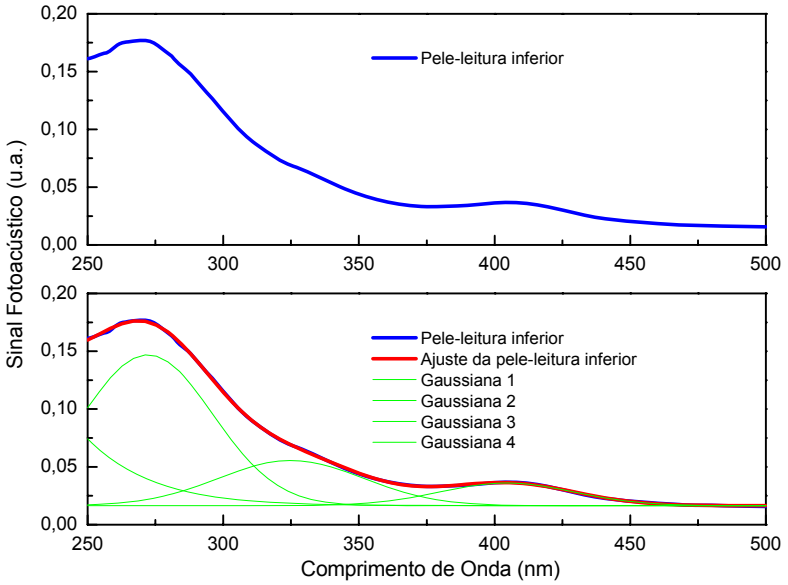

Fig. 7.6: Leitura realizada na face inferior da pele de coelho.

O estudo de amostras biológicas requer um extremo cuidado na interpretação de seus resultados. Já nas primeiras leituras constatou-se uma dificuldade que seria constante em nosso estudo: uma pequena variação na posição dos centros das gaussianas utilizadas nos ajustes, bem como de suas respectivas larguras. Tal comportamento pode ser explicado como sendo resultado da complexidade da estrutura da pele, uma vez que esta apresenta seus componentes distribuídos de forma não homogênea, acarretando, portanto, pequenas alterações de uma amostra para outra. Alguns desses componentes foram estudados em amostras de pele humana[42], sendo suas absorções características apresentadas na figura 7.7.

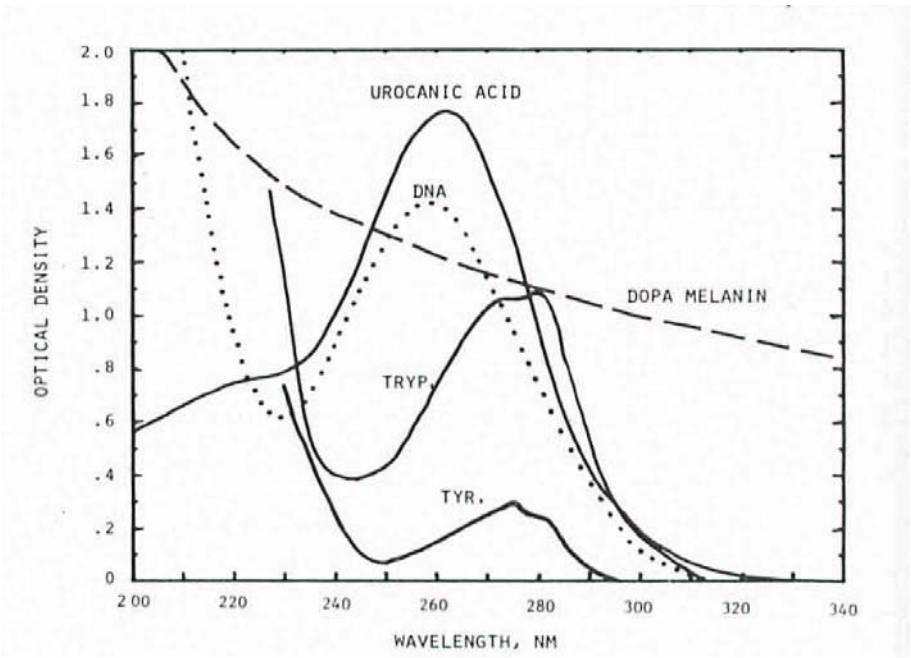

Fig. 7.7: Espectros relacionados aos componentes da pele (figura extraída da referência 42).

Baseado no estudo de ANDERSON & PARRISH[42], sugerimos que as três primeiras gaussianas constituintes do ajuste apresentado nas figuras 7.5 e 7.6 relacionam-se às absorções dos componentes da pele como o ácido urocânico (~260 nm), a tirosina (~275 nm), o trifosfato e o DNA. Já a quarta gaussiana pode ser atribuída à presença de sangue (~400 nm) nas amostras, cujo espectro encontra-se expresso na figura 7.8, o que justifica a grande variação da área sob esta curva de uma amostra para outra.

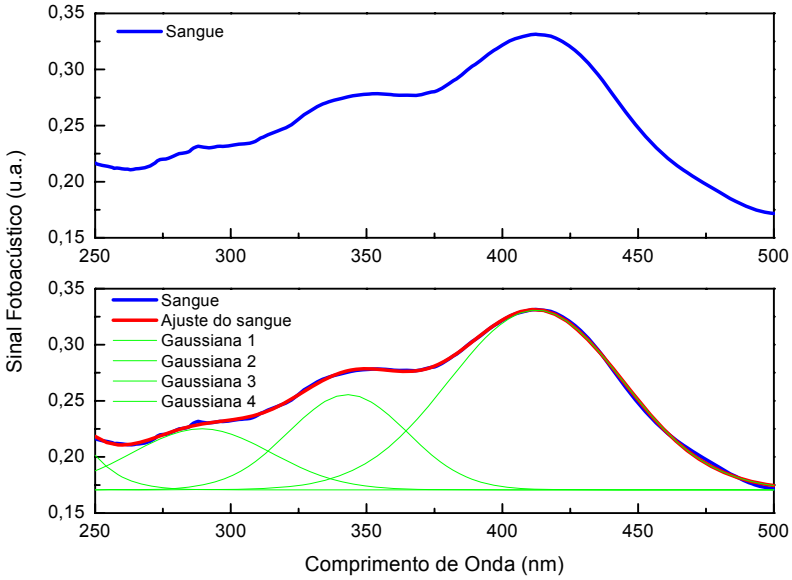

Fig. 7.8: Espectro do sangue. No presente ajuste verificam-se quatro gaussianas centradas em 204, 289, 343 e 412 nm.

Após terem sido identificados os parâmetros relacionados aos componentes dos medicamentos e da pele de coelho, tornou-se possível o estabelecimento de equações de ajuste para as amostras. Tendo em vista que os espectros obtidos poderiam ser ajustados utilizando-se gaussianas, assumimos expressões matemáticas resultantes da superposição das mesmas como possíveis soluções.

Lembrando que a equação da gaussiana é dada por

$$y = y_0 + \left[\frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_c}{w} \right)^2 \right) \right] \tag{7.1.3}$$

na qual A corresponde ao valor da área sob a curva, x_c o centro da mesma e w relaciona-se com a sua largura, têm-se, portanto, para o VitiSTV-02S (vide figura 7.2-B):

$$y = y_0 + \left\{ \left[\frac{(2{,}5A_3)}{27\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - 250}{27} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_3}{50\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - 276}{50} \right)^2 \right) \right] \right\} \tag{7.1.4}$$

A equação acima é o resultado da superposição de duas gaussianas, nas quais foram substituídos os valores referentes aos centros e larguras característicos deste medicamento. É importante ressaltar neste momento o fato de que a área sob a gaussiana 2 encontra-se relacionada com a área sob a gaussiana 3 de acordo com a proporção estabelecida na relação matemática (7.1.1).

Já para o VitiSTV-02A, faz-se necessário, de acordo com o demonstrado anteriormente, a superposição de três gaussianas (vide figura 7.4-B).

$$y = y_0 + \left\{ \left[\frac{(2{,}5A_3)}{27\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-250}{27} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_3}{50\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-276}{50} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{(3{,}3A_3)}{40\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-304}{40} \right)^2 \right) \right] \right\} \quad (7.1.5)$$

Neste caso, além dos valores relacionados aos centros e larguras dos dois primeiros picos de absorção, foram adicionadas informações pertinentes à banda decorrente da presença do ácido salicílico neste medicamento, sendo que sua área foi expressa em função de A_3 de acordo com o estabelecido em (7.1.2). Através do tratamento matemático ora apresentado obtêm-se uma equação para a intensidade do sinal fotoacústico, para ambos os medicamentos, relacionada apenas à variável x e A_3, sendo esta segunda, por sua vez, pertinente exclusivamente ao princípio ativo, cuja presença em diferentes profundidades da pele pretende-se analisar qualitativamente e quantitativamente.

No caso de amostras biológicas não existe tamanha linearidade, uma vez que, de acordo com o que já fora descrito e justificado, parâmetros como centro e largura das gaussianas costumam apresentar variações de uma amostra para outra. Tal fato fica evidenciado pelos dados referentes a um grupo de semelhança com 12 elementos – coelhos – que são apresentados nas tabelas 7.1 e 7.2, referentes às leituras realizadas em 20 Hz, com incidências nas faces superiores e inferiores, respectivamente.

Tabela 7.1: Valores dos centros (nm) e larguras (nm) das gaussianas utilizadas nos ajustes das amostras correspondentes à incidência nas faces superiores em 20 Hz – $\mu_s = 25\mu m$.

	X_{c1}	w_{c1}	x_{c2}	w_{c2}	x_{c3}	w_{c3}	x_{c4}	w_{c4}
Coelho 1	-	-	272	80	344	72	412	52
Coelho 2	-	-	277	80	344	72	412	50
Coelho 3	235	32	284	67	344	54	406	39
Coelho 4	235	35	284	65	344	61	412	47
Coelho 5	235	35	287	57	344	39	412	50
Coelho 6	235	32	290	60	344	47	407	50
Coelho 7	235	47	284	69	344	54	405	50
Coelho 8	235	47	285	68	344	36	401	50
Coelho 9	249	24	297	52	344	44	410	50
Coelho 10	249	21	290	55	344	49	410	50
Coelho 11	235	47	290	57	344	45	406	45
Coelho 12	235	47	294	52	344	55	410	42
Valor Médio Aproximado	238	37	286	64	344	52	409	48

Tabela 7.2: Valores dos centros (nm) e larguras (nm) das gaussianas utilizadas nos ajustes das amostras correspondentes à incidência nas faces inferiores em 20 Hz – $\mu_s = 475\mu m$.

	X_{c1}	w_{c1}	x_{c2}	w_{c2}	x_{c3}	w_{c3}	x_{c4}	w_{c4}
Coelho 1	-	-	262	69	340	42	405	50
Coelho 2	-	-	267	51	330	50	406	47
Coelho 3	235	47	279	41	340	44	408	47
Coelho 4	235	47	283	43	339	44	408	50
Coelho 5	230	36	280	52	344	40	405	50
Coelho 6	235	47	284	38	333	60	409	46
Coelho 7	235	47	272	57	340	45	403	50
Coelho 8	235	47	272	63	340	40	404	50
Coelho 9	249	22	284	42	340	50	410	44
Coelho 10	248	23	285	43	340	43	408	48
Coelho 11	235	47	282	37	330	55	408	49
Coelho 12	235	51	285	37	336	55	409	45
Valor Médio Aproximado	237	41	278	48	338	47	407	48

Assim sendo, tem-se um valor médio aproximado para os centros das gaussianas e suas respectivas larguras. Outro aspecto notável e de extrema relevância observável nos valores expostos é a variação dos centros nas leituras realizadas na superfície da amostra em relação àqueles obtidos para as leituras realizadas na face inferior da mesma, comportamento este que pode ser explicado pela arquitetura da pele: na iluminação superior analisa-se, além do estrato córneo, camadas tangentes à epiderme; já a iluminação inferior, por sua vez, refere-se a camadas mais profundas, pertinentes à derme e hipoderme. Tendo em vista que tais camadas diferem em sua composição, observa-se, portanto, respostas diferentes à incidência luminosa.

Após terem sido estabelecidos critérios para o estudo da pele controle, obtêm-se uma expressão matemática composta pela superposição de quatro gaussianas, sendo seus centros e larguras estabelecidos de acordo com o observado nas tabelas 7.1 e 7.2 e dada por:

$$y_p = y_0 + \left\{ \left[\frac{A_{1'}}{w_{1'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c1'}}{w_{1'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{2'}}{w_{2'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c2'}}{w_{2'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{3'}}{w_{3'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c3'}}{w_{3'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{4'}}{w_{4'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c4'}}{w_{4'}} \right)^2 \right) \right] \right\} \tag{7.1.6}$$

As amostras de pele com medicamento são analisadas tendo como base a amostra controle, ou seja, a pele sem medicamento. O sinal fotoacústico decorrente da iluminação modulada das primeiras é resultado da resposta da pele e do medicamento então aplicado nas mesmas, o que implica em equações de ajuste resultantes da superposição da expressão matemática do medicamento a ser estudado e da pele controle. Finalmente, apresenta-se:

i. Para o ajuste das amostras concernentes ao VitiSTV-02S, a superposição das equações 7.1.4 e 7.1.6:

$$y = y_0 + \left\{ \left[\frac{(2{,}5A_3)}{27\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - 250}{27} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_3}{50\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - 276}{50} \right)^2 \right) \right] \right\} +$$
$$+ \left\{ \left[\frac{A_{1'}}{w_{1'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c1'}}{w_{1'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{2'}}{w_{2'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c2'}}{w_{2'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{3'}}{w_{3'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c3'}}{w_{3'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{4'}}{w_{4'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x - x_{c4'}}{w_{4'}} \right)^2 \right) \right] \right\} \tag{7.1.7}$$

ii. Para o ajuste das amostras em que fora aplicado o VitiSTV-02A, tem-se uma expressão decorrente das equações 7.1.5 e 7.1.6:

$$y = y_0 + \left\{ \left[\frac{(2{,}5A_3)}{27\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-250}{27} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_3}{50\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-276}{50} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{(3{,}3A_3)}{40\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-304}{40} \right)^2 \right) \right] \right\} +$$

$$+ \left\{ \left[\frac{A_{1'}}{w_{1'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-x_{c1'}}{w_{1'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{2'}}{w_{2'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-x_{c2'}}{w_{2'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{3'}}{w_{3'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-x_{c3'}}{w_{3'}} \right)^2 \right) \right] + \left[\frac{A_{4'}}{w_{4'}\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\left(\frac{x-x_{c4'}}{w_{4'}} \right)^2 \right) \right] \right\}$$

(7.1.8)

7.1.1 Análise das amostras do medicamento VitiSTV-02S

Os gráficos apresentados a seguir referem-se aos estudos das amostras nas quais aplicou-se a formulação sem ácido salicílico – VitiSTV-02S, nas freqüências de 40 e 20 Hz, nas faces superiores. De acordo com o que fora exposto no capítulo 6, seção 6.2, o comprimento de difusão térmica para essas freqüências é, respectivamente, $\mu_s = 17{,}8\mu m$ e $\mu_s = 25\mu m$. As gaussianas de coloração laranja, gaussianas 2 e 3, referem-se à absorção deste medicamento.

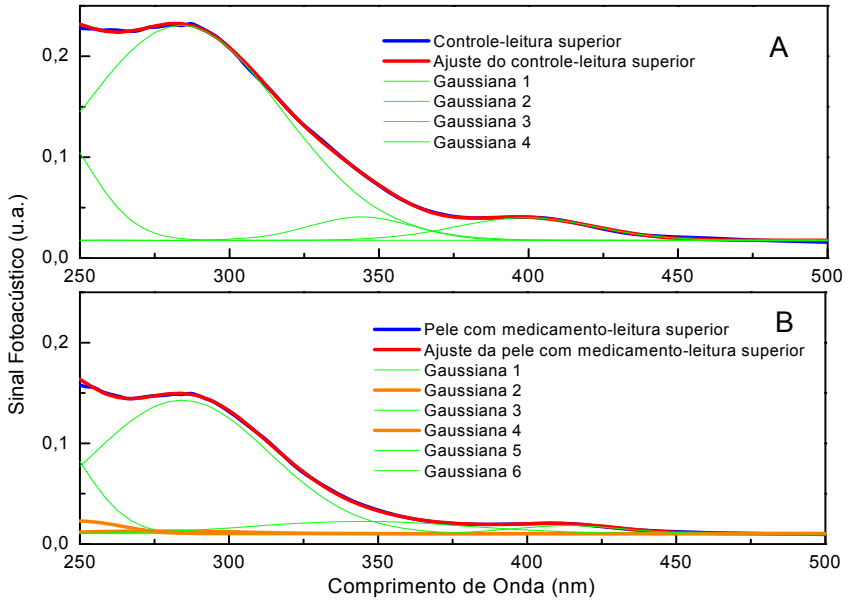

Fig. 7.9: Espectros realizados em uma freqüência de 40 Hz, nas faces superiores da pele controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02S (B).

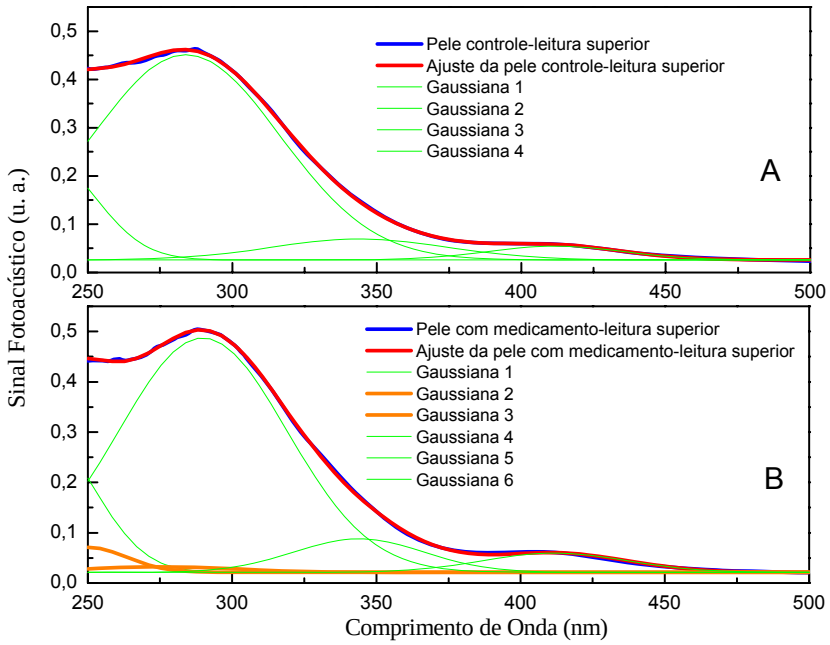

Fig. 7.10: Espectros realizados em 20 Hz: incidência superior, controle (A) e tratado com o medicamento VitiSTV-02S (B).

Para as leituras realizadas nas faces inferiores das amostras, nas freqüências de 40 e 20 Hz, as profundidades analisadas – $\mu_s = 17{,}8\mu m$ e $\mu_s = 25\mu m$ – correspondem ,de fato, a análises acerca da penetração do medicamento em $482.2\mu m$ e $475\mu m$ em relação à superfície na qual o medicamento fora aplicado. As figuras 7.11 e 7.12 remetem ao estudo dessas regiões.

As amostras de pele com medicamento VitiSTV-02S foram ajustadas através do estabelecido pela equação (7.1.7), tomando-se como base os parâmetros – centros e larguras das gaussianas – verificados em seus respectivos controles. Os valores então obtidos para a variável A_3, pertinente à absorção deste creme, serão apresentados após a exposição do estudo da permeação da segunda formulação.

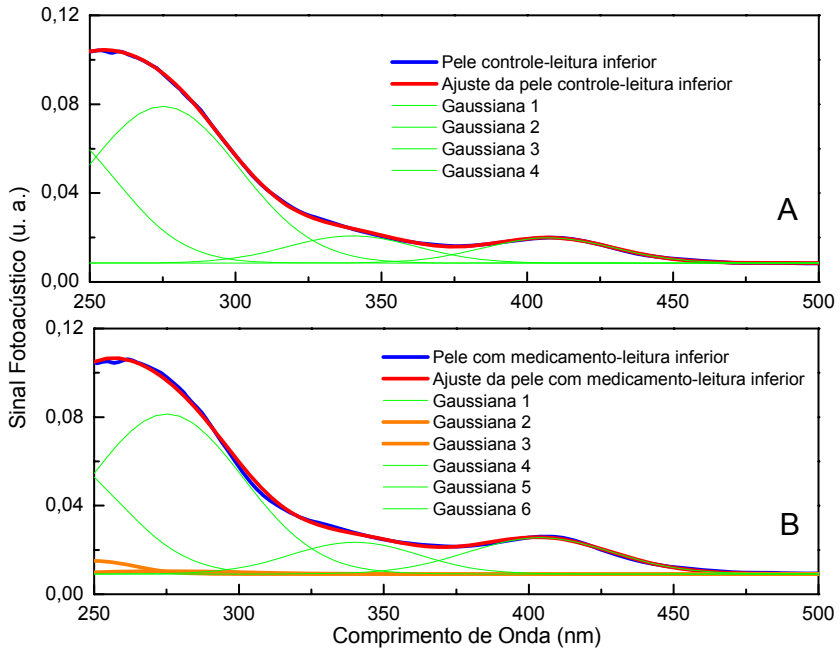

Fig. 7.11: Espectros realizados em 40 Hz, nas faces inferiores do controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02S (B).

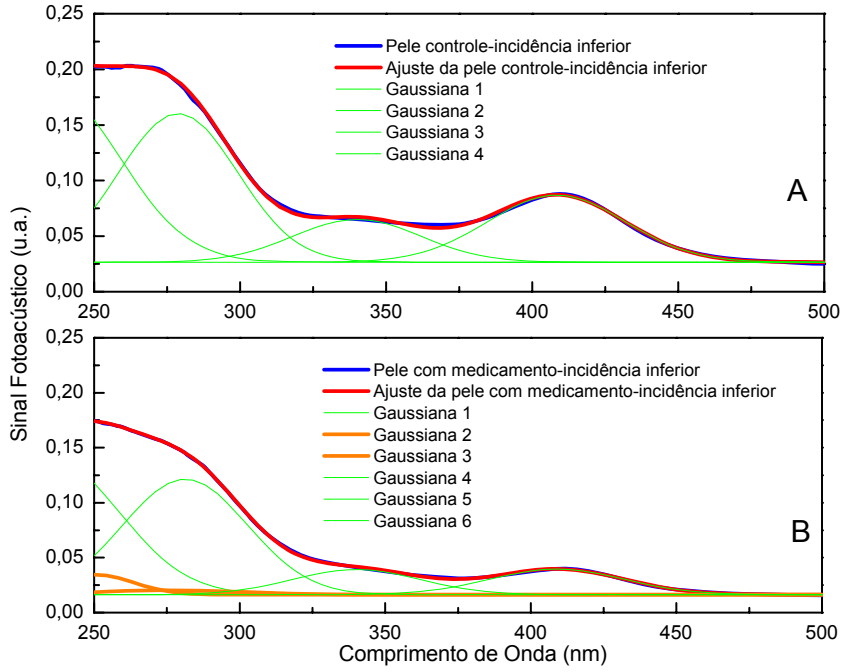

Fig. 7.12: Espectros realizados em 20 Hz nas faces inferiores das amostras controle (A) e tratada com o medicamento VitiSTV-02S (B).

7.1.2 Análise das amostras do medicamento VitiSTV-02A

Os gráficos que seguem apresentam espectros do estudo do medicamento VitiSTV-02A. Estes foram ajustados por meio do estabelecido na equação (7.1.8), sendo as figuras 7.13 e 7.14 correspondentes às leituras nas faces superiores das amostras, ao passo de que as de numeração 7.15 e 7.16 expõem resultados obtidos através da iluminação das faces inferiores das mesmas. As gaussianas de coloração lilás referem-se à absorção do medicamento.

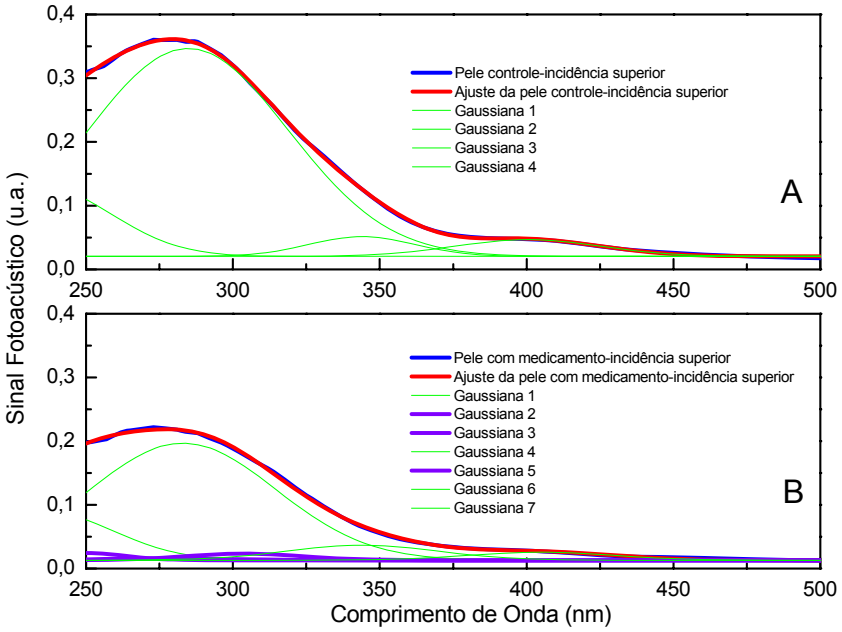

Fig. 7.13: Espectros resultantes da iluminação modulada superficial das amostras controle (A) e tratada com o medicamento VitiSTV-02A (B), na freqüência de 40 Hz.

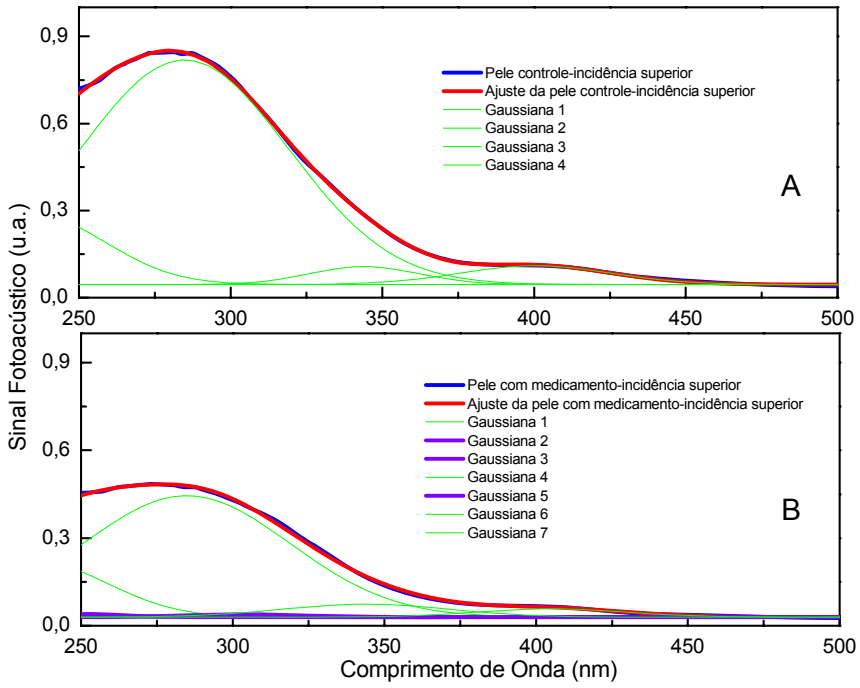

Fig. 7.14: Incidência superior, em 20 Hz, do controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02A (B).

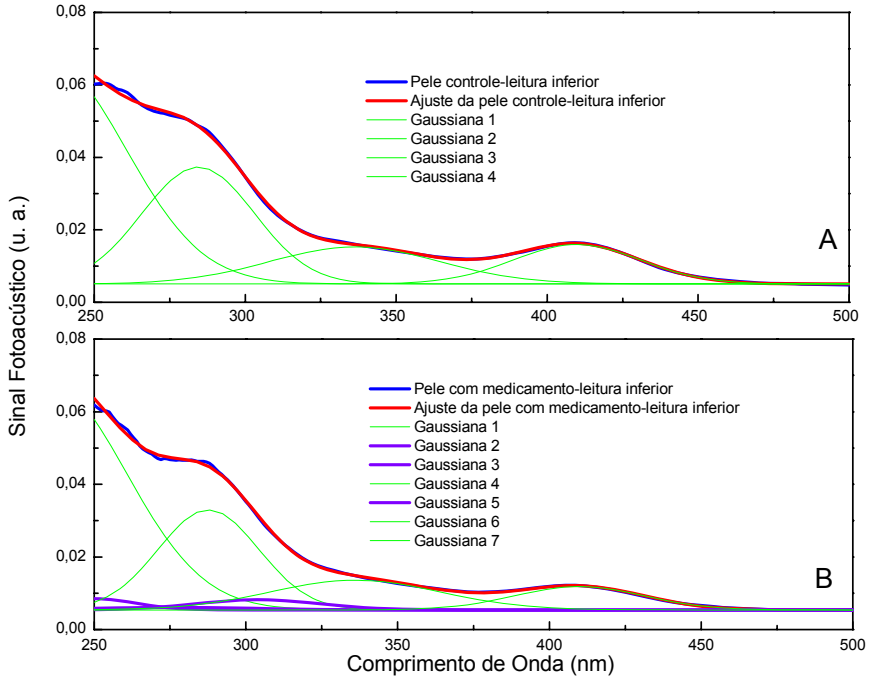

Fig. 7.15: Espectros de absorção obtidos através da iluminação das faces inferiores, em 40 Hz, do controle (A) e da pele com medicamento VitiSTV-02A (B).

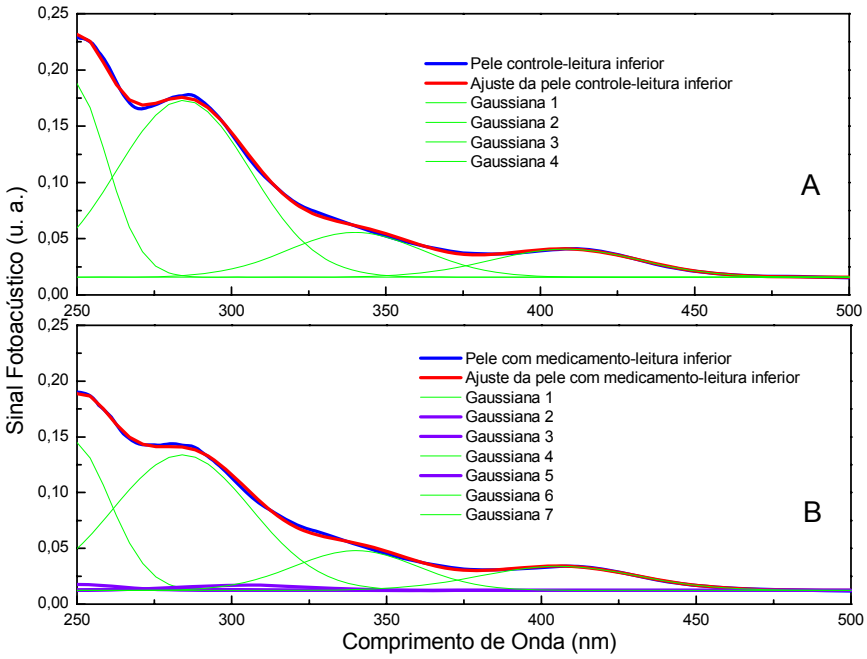

Fig. 7.16: Incidência inferior do controle (A) e tratado VitiSTV-02A (B) em 20 Hz.

7.1.3 Estudo comparativo da permeação dos medicamentos em função do número de aplicações

A partir dos dados obtidos nas diferentes freqüências e incidências para as absorções das duas formulações testadas, tornou-se possível a elaboração de um estudo em torno da evolução quantitativa da penetração do medicamento ao longo dos dias, mais especificamente em função do número de aplicações, em quatro regiões da pele da orelha. Este se fundamentou na análise dos valores obtidos através dos ajustes para as áreas sob a curva da gaussiana do princípio ativo dos medicamentos - A_3. O estudo de cada formulação foi realizado com seis coelhos e cada ponto dos gráficos apresentados na figura 7.17 foi obtido através da média dos resultados de dois coelhos.

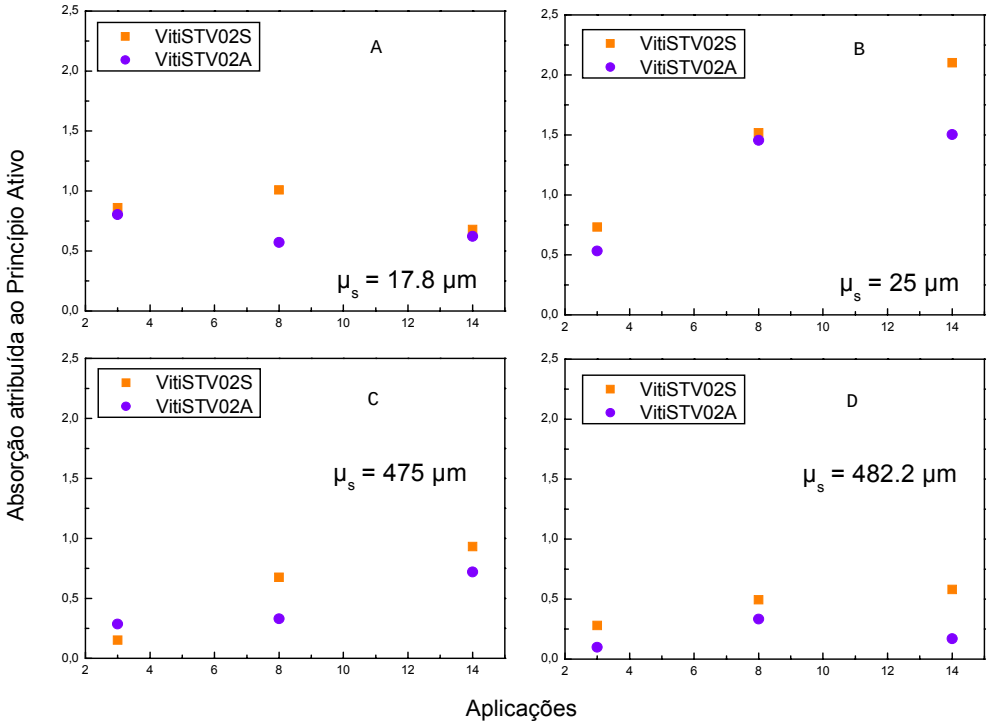

Fig. 7.17: Análise da evolução do princípio ativo em função do número de aplicações dos medicamentos em diferentes profundidades da pele.

A figura 7.17-A expressa a avaliação da presença do princípio ativo em uma profundidade de 17,8 µm, tratando-se da camada mais superficial analisada. Através da mesma percebe-se que o índice encontrado para o medicamento VitiSTV-02S é maior do que o relacionado ao VitiSTV-02A, o que vem a indicar que a formulação com ácido salicílico realmente apresenta maior velocidade ou potencial de penetração. No entanto, devido ao fato de ser esta camada muito superficial, o resultado pode ter sido comprometido por fatores externos que resultam em erros, a exemplo do fato de que deveras os coelhos retiravam o medicamento que lhes havia sido aplicado.

Em condição semelhante encontra-se o resultado demonstrado na figura 7.17-D. A região epitelial cujo estudo é descrito encontra-se muito próxima à estrutura ramificada de artérias, sendo o fluxo sangüíneo um possível fator de interferência nos dados obtidos.

Restam-nos portanto, as leituras realizadas nas profundidades de 25 e 475 µm – figuras 7.17-B e 7.17-C. Estas retratam regiões mais internas das amostras, mais "protegidas" de influências externas. De maneira geral, pode-se observar que ambos os medicamentos apresentaram aumento de tendência linear da presença do princípio ativo.

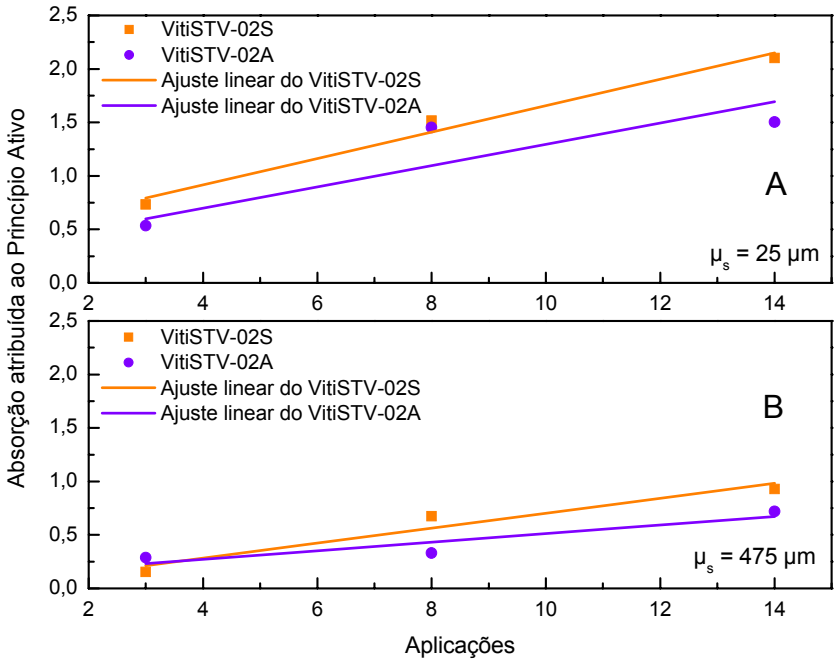

Fig. 7.18: Análise linear referente à permeação do princípio ativo para os medicamentos VitiSTV-02S e VitiSTV-02A nas profundidades de 25 e 475 µm.

No entanto, nota-se um comportamento curioso: a formulação destituída de ácido salicílico, com exceção dos valores relacionados à primeira aplicação contidos na figura 7.18-B, apresenta níveis pertinentes à presença do princípio ativo maiores do que o creme VitiSTV-02A. O resultado ora apresentado, aparentemente desconexo, pode ser explicado pela hipótese de que o creme com ácido salicílico, devido ao seu grande potencial queratolítico[43], pode ter "arrastado" o princípio ativo até as camadas mais internas, provocando perda do mesmo para a corrente sangüínea. Desta forma, o índice de princípio ativo remanescente na estrutura interna da pele seria menor quando comparado àquele obtido para o VitiSTV-02S.

Além disso, o potencial de penetração do medicamento mesmo na ausência do ácido salicílico pode ser explicado pela existência de estruturas epiteliais através das quais a permeação pode ocorrer de maneira natural[44]:

1. Transporte através dos folículos pilosos associados com glândulas sebáceas;
2. Através dos dutos das glândulas sudoríparas;
3. Permeação através do estrato córneo.

As vias de permeação encontram-se ilustradas na figura 7.19.

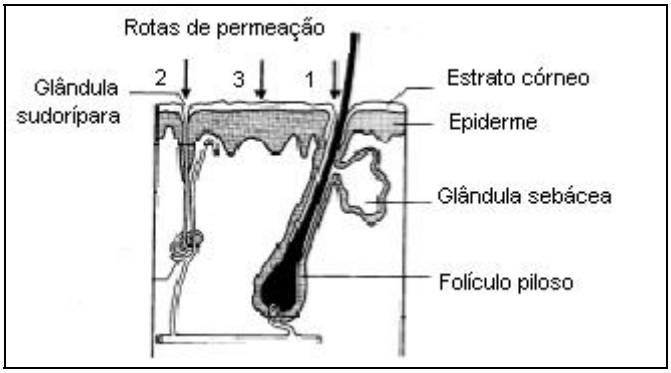

Fig. 7.19: Rotas de permeação intrínsecos à estrutura epitelial[44].

Outro fator que pode explicar a penetração do princípio ativo mesmo na ausência do ácido é uma característica da base constituinte do creme, emulsão água-óleo, que minimiza a perda de água na pele, aumentando, portanto, a hidratação. Este aumento da hidratação acaba por contribuir na abertura da estrutura compacta do estrato córneo, permitindo um aumento da penetração[45].

Os resultados obtidos remetem-nos a uma questão de extrema importância: seria o emprego de ácido salicílico realmente necessário? De acordo com o exposto no capítulo 5, seção 3, os melanócitos encontram-se distribuídos na camada basal da epiderme em uma profundidade equivalente a 120 μm. O estudo do medicamento VitiSTV-02S indica que o mesmo efetivou a penetração do princípio ativo em profundidades equivalentes a esta, viabilizando a ação deste nos melanócitos. A questão que se apresenta é de suma importância em virtude das conseqüências de tal agente intensificador de penetração na pele: devido ao seu potencial queratolítico, resultante de um efeito solubilizador direto do estrato córneo via dissolução do cimento intercelular[43], acaba desencadeando lesões na pele: a exemplo, citam-se a descamação, observada macroscopicamente, e o desencadeamento de processo inflamatório, proporcional à concentração do ácido, evidenciado nas análises microscópicas realizadas em paralelo pela Cecília Valente Rodrigues Truite[33] (ver figura 7.20).

Na figura 7.20 torna-se evidente a relação dose dependente entre a concentração de ácido salicílico e o processo inflamatório, processo este verificado também através da análise microscópica apresentada na figura 7.21. Nesta imagem observa-se a acantose (espessamento da epiderme) em virtude da reação inflamatória.

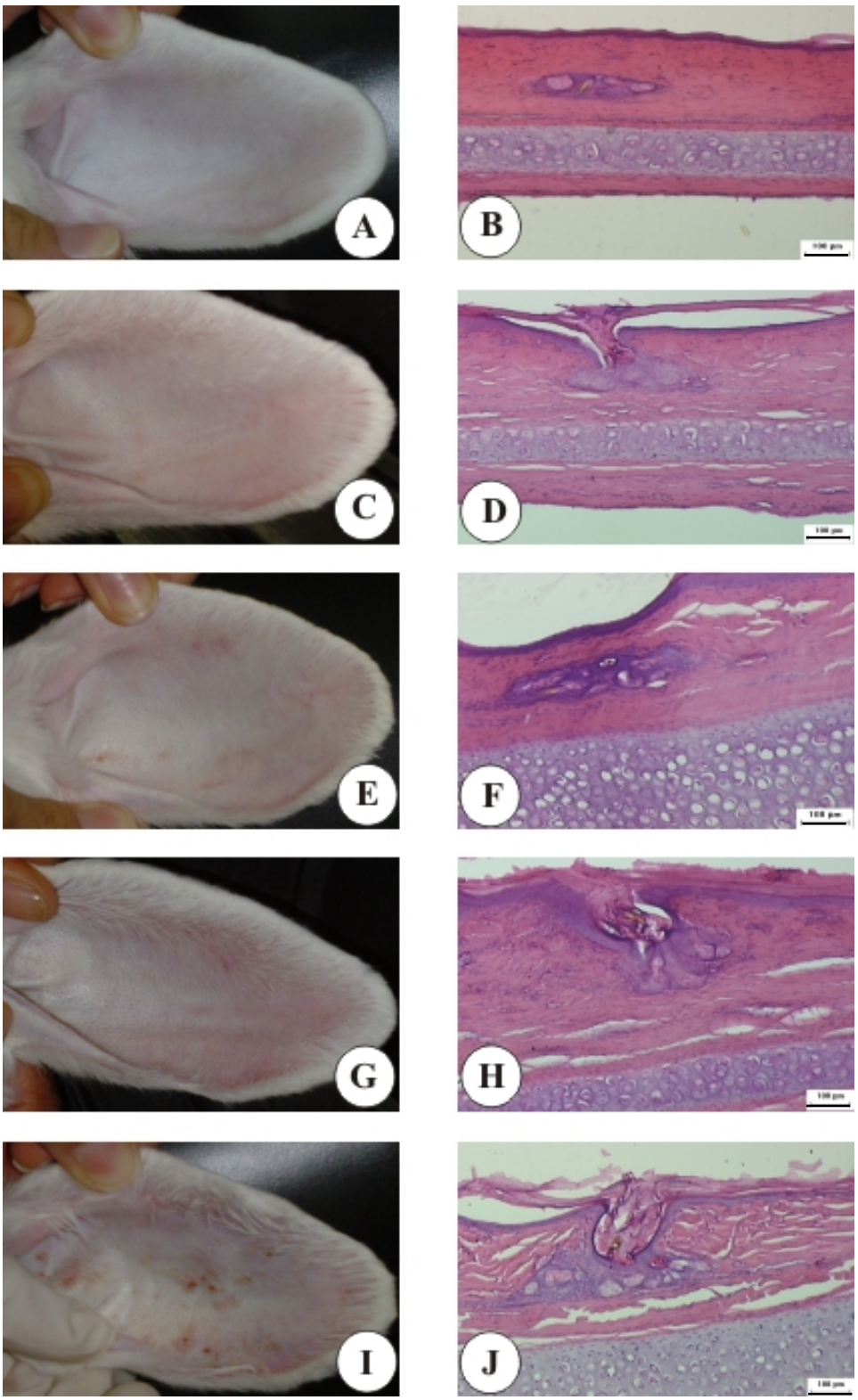

Fig. 7.20: Observações macroscópicas e histológicas dos efeitos dos medicamentos dotados de diferentes concentrações de ácido salicílico: 0% (A e B), 2,5% (C e D), 3% (E e F), 5% (G e H) e 7,5% (I e J)[33]. Barra = 100µm.

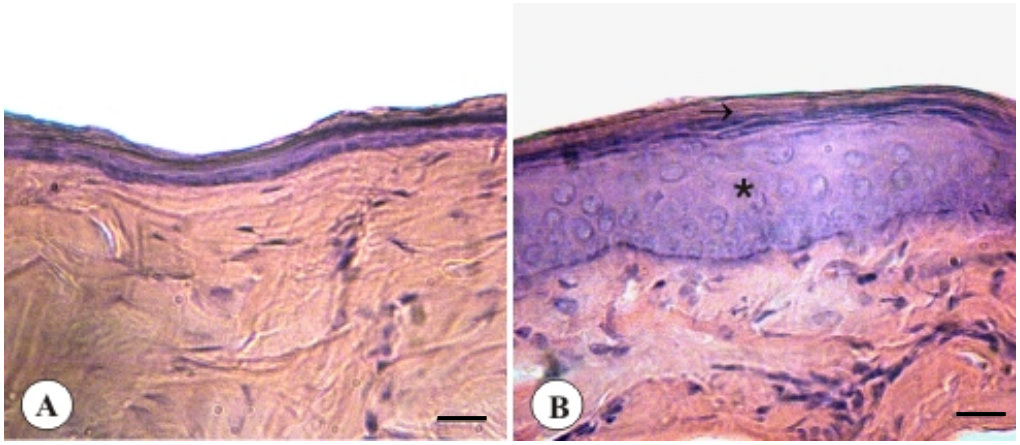

Fig. 7.21: (A) Corte histológico da orelha controle; (B) Corte histológico da orelha tratada com a formulação com concentração de 7,5% de ácido salicílico; nesta pode ser observada a acantose (*), espessamento da epiderme em virtude da reação inflamatória[33]. Barra = 20 µm.

7.2 Avaliação da produção de melanina em culturas de célula em função de diferentes concentrações e formulações do princípio ativo

Quantificar o índice pertinente à produção de melanina nos testes realizados em culturas celulares em função de diferentes presenças do princípio ativo é de grande relevância para a investigação acerca da eficiência deste no processo de pigmentação. Análises como esta são realizadas, tanto na área biológica quanto farmacêutica, através de espectrofotômetros; em nosso estudo, utilizamos a Espectroscopia de Lente Térmica na tentativa de aplicar conhecimentos relacionados às características termo-ópticas das amostras para a determinação do índice de absorção da luz por parte das mesmas em função da quantidade de melanina existente.

A figura 7.22 apresenta transientes de lente térmica para o NaOH e amostras de culturas celulares controle, bem como aquelas em que fora aplicado o óleo em uma concentração de 3% e a fração óleo 500.

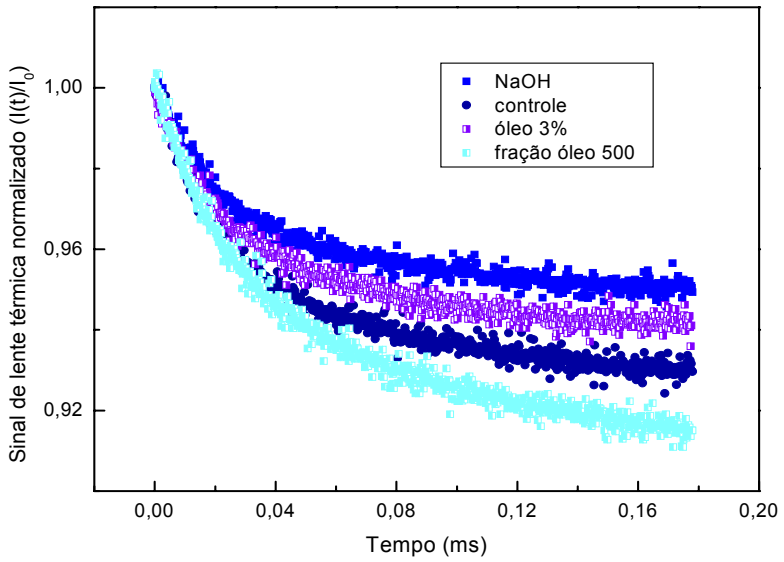

Fig. 7.22: Sinal de LT do NaOH – em uma potência de 100 mW – e das amostras concernentes às culturas celulares controle, tratada com óleo 3% e tratada com a fração óleo 500, em uma potência de 90 mW.

Os transientes obtidos para a amostra controle, em diferentes potências do laser de excitação, foram realizados com o objetivo de identificar a absorção por parte da melanina naturalmente produzida pela célula, uma vez que nessas culturas não foi aplicada nenhuma

diluição do princípio ativo. Constituiria-se, portanto, um referencial a ser utilizado para a análise das demais amostras. A figura 7.23 apresenta um exemplo de tais leituras, em uma potência de 90 mW, na qual efetuou-se um ajuste – curva em vermelho – através da equação 4.3.41: os parâmetros *m* e *V* foram mantidos fixos, ao passo de que os valores para I_0, t_c e θ foram ajustados livremente pela mesma, sendo os valores obtidos para as duas últimas variáveis, respectivamente, $t_c = 0{,}004 \pm 0{,}001\,ms$ e $\theta = 0{,}071 \pm 0{,}005$.

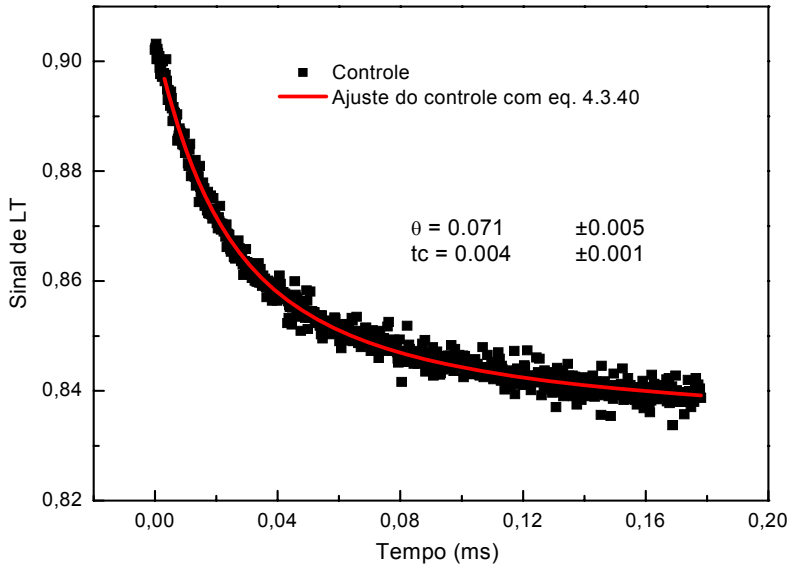

Fig. 7.23: Sinal da LT obtido para uma amostra controle, em 90 mW.

Através da definição pertinente à constante de tempo térmica característica da amostra, $t_c = \left(\omega_{0e}^2 / 4\alpha\right)$, torna-se possível a obtenção do valor da difusividade da mesma: $\alpha = 1{,}59 \pm 0{,}08$ cm^2/s.

Considerando-se o fato de que o estudo pertinente à ELT foi efetuado através de transientes obtidos em diferentes potências do laser de excitação e não através da variação da temperatura da amostra, a análise das difusividades concernentes às mesmas constitui-se em um importante artefato para investigação do comportamento destas: este deve manter-se constante com a variação da potência. Assim sendo, após a realização dos ajustes para as demais amostras obtêm-se o quadro das diferentes difusividades, bem como de suas respectivas evoluções em função da variação da potência, apresentado na figura 7.24.

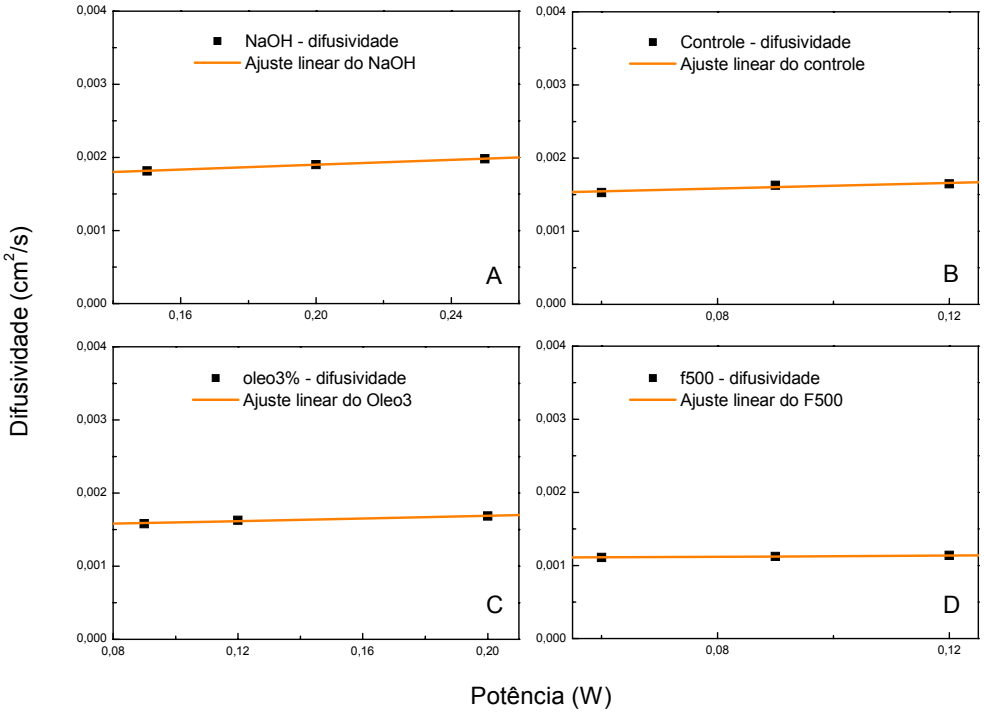

Fig. 7.24: Estudo da difusividade para o NaOH (A), culturas de célula controle (B), tratada com óleo 3% (C) e com a fração óleo 500 (D).

Através dos dados apresentados na figura 7.24 verifica-se um comportamento para a difusividade térmica compatível com o previsto pela teoria da ELT.

Além da análise pertinente à difusividade ora abordada, existe um segundo aspecto a ser examinado com o objetivo de verificar se o comportamento das amostras, conseqüente da incidência do laser de excitação, encontra-se de acordo com a teoria: a avaliação da relação entre a variação da potência e dos valores de θ então obtidos. Segundo a equação 4.3.20 apresentada no capítulo 4 e que ora se faz novamente presente

$$\theta = -\frac{P_e \beta L (dn/dT)}{\kappa \lambda_p} \qquad (7.2.1)$$

o parâmetro θ apresenta-se diretamente proporcional em relação à potência do laser de excitação. Dessa forma, efetua-se um gráfico de θ em função da potência para as amostras, como demonstrado na figura 7.25.

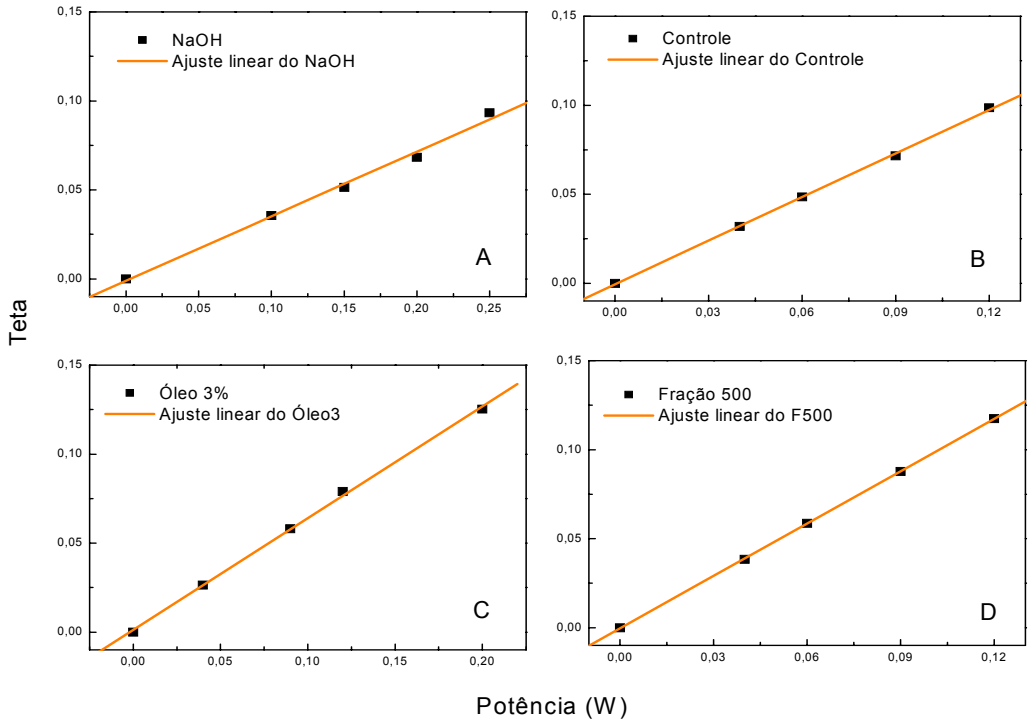

Fig. 7.25: Evolução do parâmetro θ em função da potência para o NaOH (A), para as culturas celulares controle (B), tratadas com óleo 3% (C) e fração óleo 500 (D).

Novamente verifica-se, nesta análise, a ocorrência de um comportamento concernente às amostras em consonância com o presumido teoricamente: a evolução linear para os valores de θ em função da variação da potência.

Retornando ao objetivo inicial desta etapa de nosso estudo, mais precisamente, à investigação acerca da absorção das amostras, faz-se necessário uma reflexão em torno da equação 7.2.1. Na referida expressão os parâmetros λ_p e L são inerentes ao arranjo experimental selecionado e mantidos invariáveis; a condutividade κ, estreitamente relacionada com a difusividade, permanecem constantes; (dn/dT), por sua vez, também assim pode ser considerado pelo fato de que é governado pela solução e não pelo princípio ativo, o que conduz-nos à seguinte simplificação matemática:

$$\frac{\theta}{P_e} = -\beta \frac{L(dn/dT)}{\kappa\lambda_p} = \mathrm{K}\beta \qquad (7.2.2)$$

sendo $\mathrm{K} = -\dfrac{L(dn/dT)}{\kappa\lambda_p}$.

Assim sendo, edifica-se uma relação direta entre a variação do índice de absorção e o quociente entre θ e a potência do laser de excitação, o que permite a concretização de um quadro no qual são apresentados os índices de absorção pertinentes às amostras, como apresentado na figura 7.26.

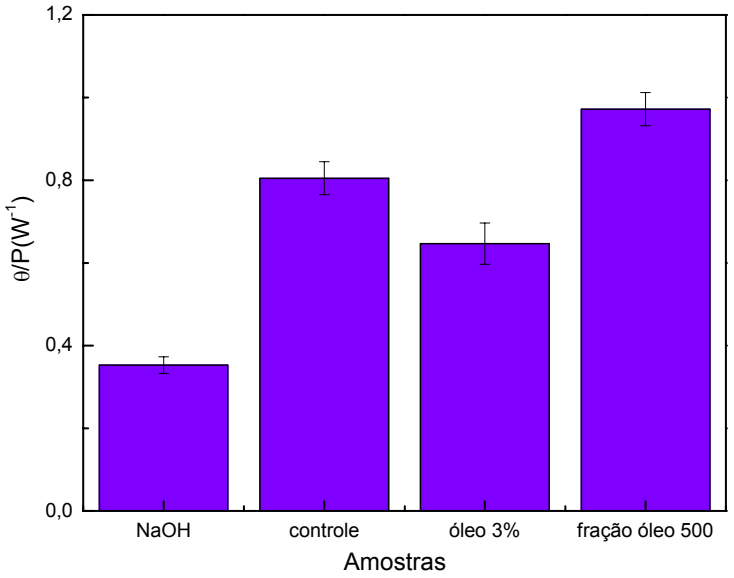

Fig. 7.26: Índices conexos às razões θ/P_e, que traduzem as absorções apresentadas pelas amostras.

A interpretação dos resultados expostos exige um entendimento do protocolo envolvido no preparo das amostras: a absorção concernente ao NaOH apresenta importância para a análise dos resultados pelo fato de que o mesmo encontra-se também nas demais amostras, uma vez que é utilizado nestas com o intuito de aí provocar o rompimento das estruturas celulares, solubilizando, portanto, a melanina. Assim sendo, o índice de absorção atribuído a tal solução não remete à produção pigmentar. As amostras pertinentes às culturas celulares controle e àquelas cultivadas com o emprego do óleo 3% e da fração óleo 500 apresentam em seus resultados, portanto, índices sumariamente constituídos pela absorção do NaOH e da melanina.

Ao serem comparados entre si, os valores relacionados à absorção apresentados pelas dissoluções do meio celular controle e daquele em que fora inserido o óleo 3% remetem-nos a uma realidade, aparentemente incoerente, em que tal diluição do princípio ativo teria provocado uma inibição do processo de pigmentação em nível celular. O referido resultado apresenta-se em oposição àquele obtido em análises realizadas em paralelo

através do espectrofotômetro, efetuadas pelo Professor Dr. Celso Vataru Nakamura[33], apresentado na figura 7.27.

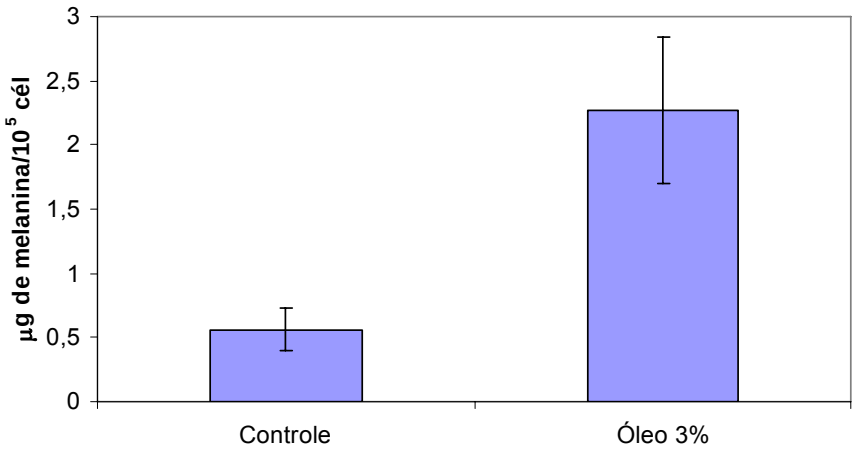

Fig. 7.27: Análise da produção de melanina, comparada àquela verificada no controle, realizada no espectrofotômetro[33].

O resultado obtido através da ELT pode ser explicado pelo fato de que, nos momentos em que as amostras concernentes às culturas de célula nas quais havia sido aplicado o óleo 3% eram iluminadas, observávamos sempre espalhamento de luz atribuído à existência de partículas em suspensão no meio. Tal parcela de energia radiante, não sendo absorvida pela amostra, deixa de provocar na mesma o efeito de LT, atenuando o índice referente à absorção que constitui o resultado final[46]. Em relação ao resultado apresentado na figura 7.27, é fato que tal comportamento dispersivo pode tê-lo afetado; neste caso, porém, a luz que é espalhada deixa de atingir o sensor no espectrofotômetro, indicando uma absorção possivelmente maior do que aquela realmente efetivada pelo meio.

A dúvida remanescente de ambos os resultados obtidos, mais especificamente acerca do potencial de produção pigmentar do óleo 3%, pode ser sanada por meio de imagens obtidas através da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de transmissão, figura 7.28, também realizadas pelo Professor Dr. Celso Vataru Nakamura[33] para meios celulares na ausência e na presença de tal diluição do princípio ativo.

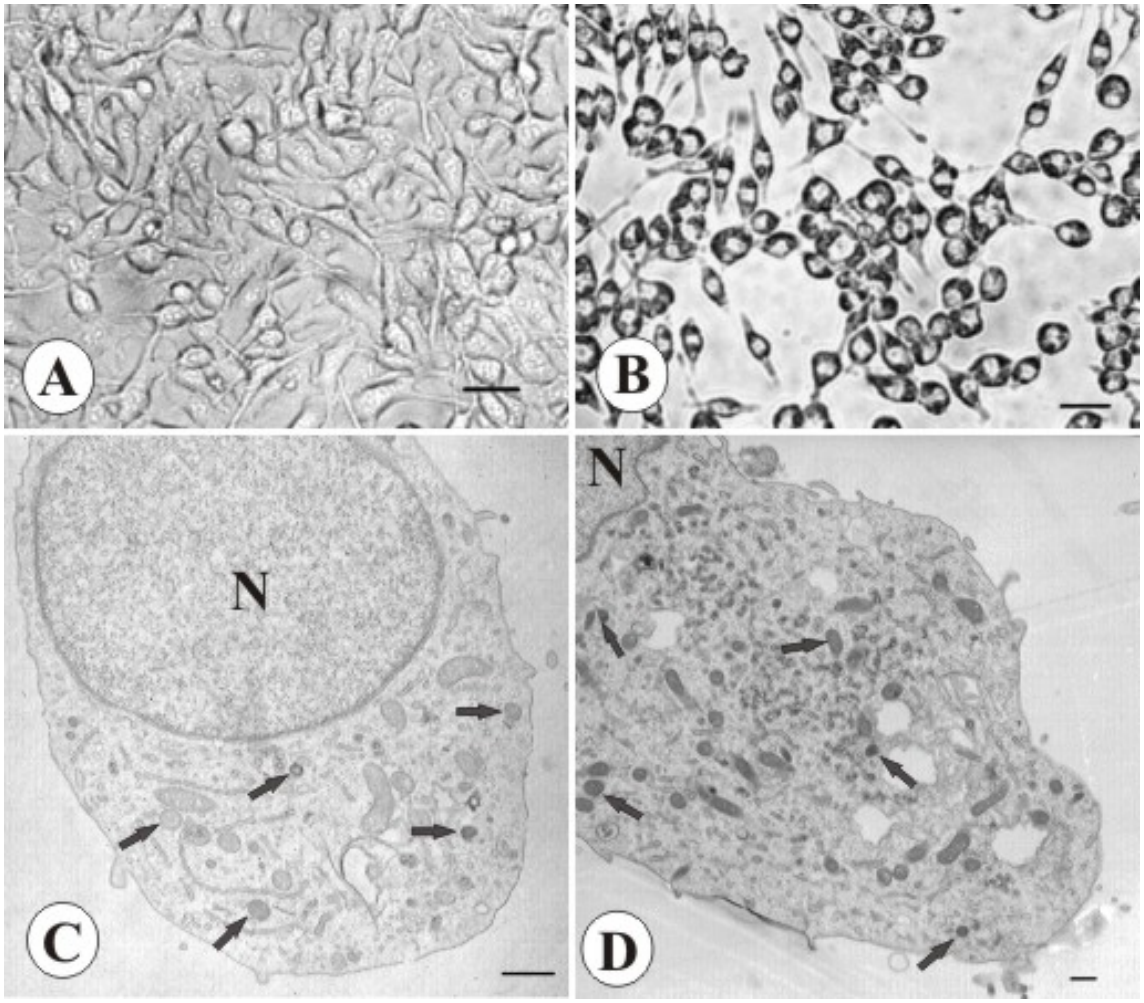

Fig: 7.28: Imagens obtidas através da microscopia óptica efetuadas na cultura celular controle (A) e na cultura em que fora aplicado o óleo 3% (B); barra = 30 µm. As imagens C e D foram obtidas por meio da microscopia eletrônica de transmissão, sendo a primeira relacionada ao controle (C) e a segunda à amostra em que fora aplicado o óleo 3% (D); barra = 1 µm. Nestas últimas é possível a observação dos melanossomas, indicados pelas setas, evidenciando a maior presença de melanina naqueles cultivados na presença do óleo 3%. N identifica o núcleo celular [33].

Evidencia-se, portanto, através das imagens ora expostas, a eficácia do óleo 3% no processo de pigmentação, uma vez que as células cujo cultivo deu-se sob a regência do mesmo apresentaram maior número de melanossomas, por sua vez, mais pigmentados, ao passo de que nas células controle as referidas organelas encontravam-se em estágio inicial de desenvolvimento. Essas observações estão em consonância com a análise obtida por meio do espectrofotômetro, embora os índices de produção apontados pelo mesmo não sejam inteiramente confiáveis em virtude do fenômeno de dispersão da luz.

Em relação à fração óleo 500, observa-se na figura 7.26 que o índice de absorção apresentado pelas culturas celulares em que este se encontrava presente foram superiores em relação ao controle. Neste caso, não houve processo de espalhamento da luz incidente, e o resultado então obtido concorda qualitativamente com o obtido pela Cecília Valente Rodrigues Truite através do emprego do espectrofotômetro – apresentado na figura 7.29.

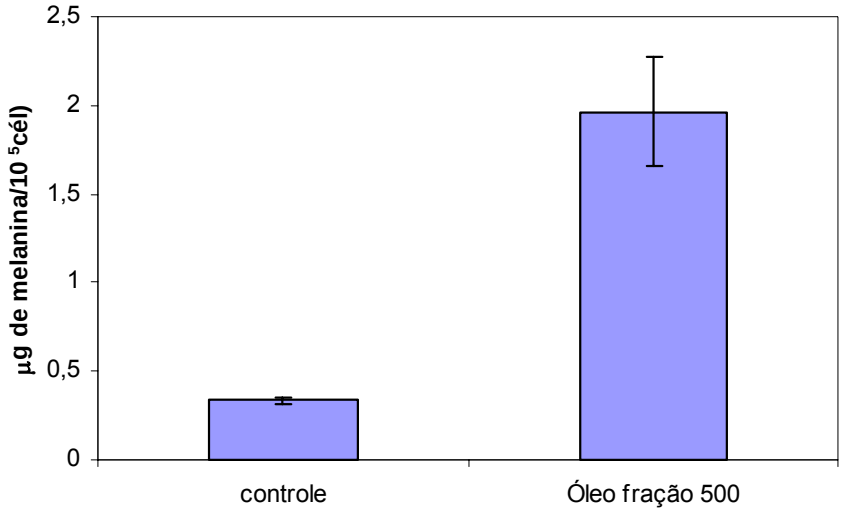

Fig. 7.29: Resultados obtidos por meio do espectrofotômetro para a comparação da produção melânica nas células controle e naquelas em que fora aplicada a fração óleo 500.

A análise das razões entre os índices de produção melânica observado nas células tratadas e em seus respectivos controles – figuras 7.27 e 7.29 – conduz-nos aos valores de 4,06 para o estudo pertinente ao óleo 3% e 5,78 para aquele em que fora utilizada a fração óleo 500, indicando, portanto, um potencial de pigmentação maior para a fração óleo 500.

Capítulo 8

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No decorrer dos estudos pertinentes à permeação dos medicamentos *VitiSTV-02S* e *VitiSTV-02A*, nos quais empregou-se a Espectroscopia Fotoacústica, constatou-se que ambas as formulações atingiram profundidades na pele equivalentes àquelas nas quais se encontram os melanócitos – 120 μm, viabilizando, portanto, a ação do princípio ativo no processo melanogênico nessas estruturas. No entanto, ao serem comparadas as quantidades deste agente nas diferentes camadas epiteliais monitoradas, percebe-se que o índice conexo ao mesmo atribuído à primeira formulação mostrou-se maior do que aquele encontrado para a formulação VitiSTV-02A, resultado este que indica que o uso do ácido salicílico pode ser dispensado.

Diante da concretização dos objetivos inicialmente propostos para o estudo da permeação dos cremes para pigmentação a serem utilizados no tratamento do vitiligo, pode-se concluir que a PAS obteve grande êxito no que havia sido proposto. Comprova-se mais uma vez sua eficiência, já relatada na literatura, em pesquisas relacionadas às propriedades ópticas de amostras de natureza biológica, principalmente no aspecto que tange a arquitetura do perfil de profundidade para amostras de pele, de suma importância em nosso trabalho. Como perspectiva, ressalta-se a possibilidade de um estudo futuro relacionado à permeação do medicamento VitiSTV-02S em humanos.

Já em relação às análises pertinentes à eficiência do princípio ativo em duas formulações diversas, *óleo 3% e fração óleo 500*, os resultados obtidos na ELT indicam que a primeira teria provocado uma minimização do processo melanogênico, quando comparada ao controle, e a segunda o teria aumentado. No entanto, o baixo índice concernente à produção de melanina obtido para a cultura celular em que fora aplicado o óleo 3% é justificado pelo espalhamento da luz proveniente do feixe de excitação, observado no

decorrer da realização das leituras. Os experimentos ora mencionados devem ser repetidos medindo-se simultaneamente a dispersão luminosa por meio de um sensor que possa ser deslocado ao redor da amostra.

Referências bibliográficas

[1] STEINER, D., VILLAS, R. T., BEDIN V., STEINER, T. e MORAES, M. B. Anais Brasileiros de Dermatologia 79(3): 335, 2004.

[2] AZULAY, R. D. e AZULAY, D. R. *Dermatologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004.

[3] SENH, E., PEDROCHI, F., MEDINA, A. N., et al. *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin in vivo*. Journal de Physique, 4 (125): 757, 2005.

[4] 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, 2004.

[5] PEDREIRA, P. R. B., HIRSH, L. R., et al. Chemical Physics Letters, 396: 221, 2004.

[6] MAWATARI, K., NAGANUMA, Y. e SHIMOIDE, K. Anal. Chemeistry, 77: 687, 2005.

[7] ROSENCWAIG, A. *Photoacoustics and photoacoustic spectroscopy*. Canada: John Wiley & Sons, 1980.

[8] BELL, A. G. Philos. Mag. 11(5): 510, 1881.

[9] RAYLEIGH. Nature. 23: 274, 1881.

[10] ROSENCWAIG, A. e GERSHO A. Journal Appl. Physics,47 (64): 2905, 1976.

[11] MERCADIER, M. E. Serv. Acad. Sci. 92: 409, 1881.

[12] PREECE, W. H. Proc. R. Soc. London. 31: 506, 1881.

[13] MANSANARES, M. A. *Caracterização fotoacústica de materiais: difusividade térmica e perfil de profundidade*. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas, 1991.

[14] PESSOA, O. J. *Aplicações de medidas de fase do efeito fotoacústico*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Física Gleb Wataghin da Universidade Estadual de Campinas, 1985.

[15] JAUCH, J. M. *São os quanta reais? Um diálogo Galileano*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1986.

[16] COHEN-TANNOUDJI, C. *Quantum mechanics*. França: Hermann e John Wiley & Sons, 1977.

[17] GASPAR, A. *Física: ondas, óptica e termodinâmica*. São Paulo: Ática, 2000.

[18] EISBERG, R. e RESNICK, R. *Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas*. Rio de Janeiro: Campus, 1979.

[19] CESAR, C. L. *Efeito fotoacústico em sólidos*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Física Gleb Wataghin da Universidade Estadual de Campinas, 1979.

[20] BUTKOV, E. *Física Matemática*. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, 1988.

[21] MAIMAN, T. H. Nature, 187: 493, 1960.

[22] GORDON, J. P., LEITE, R. C. C., MOORE, R. S., PORTO, S. P. S. e WHINNERY, J. R. Journal Appl. Physics, 36 (3) 1965.

[23] RIECKHOFF, K. E. App. Phys. Letters, 9: 87, 1966.

[24] HU, C. e WHINNERY, Appl. Opt., 12: 72, 1973.

[25] LONG, M. E., SWOFFORD, R. L. e ALBRECHT, A. C. Science, 191: 183, 1976.

[26] HIGAISHI, T., IMASAKA, T. e ISHIBASHI, N. Anal. Chem., 55: 1907, 1983.

[27] SHEN, J. e SNOOK, R. D. Journal Appl. Physics, 73: 5286, 1993.

[28] SATO, F. *Estudo da bebida do café utilizando a espectroscopia de lente térmica e a interferometria óptica.* Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, 2005.

[29] PEDREIRA, P. R. B. *Desenvolvimento de um protótipo de lente térmica resolvida no tempo para estudos de líquidos em condições transitórias em tempo real*. Tese

de Doutorado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, 2005.

[30] MURA, J. *Espectroscopia de lente térmica e técnicas convencionais aplicadas no estudo de biopolímeros e do PVA em função da temperatura*. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, 2005.

[31] American Vitiligo Research Foundatiion. Disponível em http://www.avrf.org. Março/2006.

[32] NATH, S. K., MAJUMDER, P. P., NORDLUND J. J. Am J Hum Genetic, 55: 981, 1994.

[33] TRUITE, C. V. R. *Atividade melanogênica de extratos de plantas medicinais "in vitro" e avaliação histológica e absorção cutânea de um creme para pigmentação.* Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, 2006.

[34] SAMPAIO, S. A. P. e RIVITTI, E. A. *Dermatologia*. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

[35] Dermatologia. Disponível em www. apele.com.br/imagens/estrutura. Março/2006.

[36] GARTNER, L. P. e HIATT, J. L. *Tratado de Histologia em Cores*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001.

[37] RILEY, P. A. Journal Biochem. Cell. Biology, 11: 1235, 1997.

[38] BAESSO, M. L., SHEN, J. and SNOOK, R. D. Analyst, 119: 361, 1994.

[39] HILLS, O. H. e KLIGMAN, A. M. Archives of Dermatology, 118: 417, 1982.

[40] Agência Nacional de Vigilância Sanitária – resolução – RDC 79, de 31 de agosto de 2000.

[41] NAEYAERT, J. M., GORDON, P. R., PARK, H. Y., GILEHREST, B. A. British Journal of Dermatology, 125: 297, 1991.

[42] ANDERSON, R. R., PARRISH, J. A. Journal of Investigative Dermatology, 77: 13, 1981.

[43] GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A., 2003.

[44] BARRY, B. W. European Journal of Pharmaceutical Scienses, 14: 101, 2001.

[45] MENON, G. K., BOMMANNAN, D. B., ELIAS, P. M. Skin Pharmacology, 7: 130, 1994.

[46] OLIVARES, J. A., CURIEL, F. et al. Journal Physique, 125: 153, 2005.