



**UNIVERSIDADE**  
**ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

---

**Leonice Elci Rehfeld Nuglisch**

**Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação e a distribuição de medicamentos na unha humana**

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

Dissertação apresentada ao curso  
De Mestrado em Física do  
Departamento de Física da  
Universidade Estadual de Maringá  
Para obtenção do título de Mestre em Física

---

Maringá - Fevereiro - 2004.

**LEONICE ELCI REHFELD NUGLISCH**

**Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação e a distribuição de medicamentos na unha humana**

***Orientador***

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

Dissertação apresentada ao curso  
De Mestrado em Física do  
Departamento de Física da  
Universidade Estadual de Maringá  
Para obtenção do título de Mestre em Física

Maringá, Fevereiro de 2004.

***Dedico este trabalho carinhosamente, ao meu filho em memória William Vilmar, e ao segundo filho Wesley Emanuel e especialmente ao meu esposo Vilmar Vilson Nuglisch.***

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus a toda honra e gloria.*

*Ao professor Mauro Luciano Baesso, pela orientação dedicada, seriedade, paciência e por ter acreditado neste trabalho;*

*Ao professor Antonio Carlos Bento, pelas contribuições no trabalho, e acompanhamento durante o curso;*

*Aos professores Antonio Medina Neto, Paulo Roberto Pedreira, João Mura, Paulo Toshio Udo, José Carlos de Souza, Wilson Ricardo Weinand, Jonas Teixeira e Arlindo Antonio Savi pelo incentivo;*

*Agradeço à funcionária da UEM Akiko e aos professores: Luiz Roberto Evangelista, Antonio José Palangana, Andréa Paesano, Rênio dos Santos Mendes, Luiz Carlos Malacarne, Maurício Antonio Custódio de Melo, que contribuíram para a conclusão deste curso;*

*Aos amigos e colegas, Tânia, Daniele, Carlos, Elizandra, Barco, Kelly, Laudilene, Francini, Enio, Franciana, Hercília, Shalimar, Wladimir, Tâmara, Célia, Roberto, Élder, Jurandir H., Nelson, Alysson, Ademar, Luiz, Fernando, Perseu, Evaristo, Alcir, Terezinha, Roseli, Newler, Oscar, Nivaldo, Sergio, Otavio, Luciana, Maria, Anderson, Aluisio, Edinalva, Dirlei, Sergio, Jurandir, Marcio, Kátia pelo companheirismo e convivência;*

*Agradeço à empresa Stiefel pelos produtos doados para a realização da pesquisa;*

*Agradeço aos amigos que doaram a bordas livres de suas unhas, pois sem elas não teríamos realizado este trabalho: Vilmar, Wesley, Alcir, Elizandra, Helena, Kátia, Jovenilda, Élder, Milene, Franciana, Valéria, Cristiane, Fernanda, Osmar, Luciana, Jaime, Solange, Guilherme, Cleudinete, Daniele, Débora, Gleici, Luzia, Idalina, Roberta, Isabel, Elizabeth, Mercedes;*

*Aos professores e funcionários da UNIJUÍ, pela minha formação;*

*Aos meus familiares, pelo apoio e aprendizado de vida;*

*Ao meu marido agradeço, pelo auxílio, incentivo, confiança, motivação, carinho e amor e pelos seus conselhos, que suavizaram as dificuldades;*

*Ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro.*

## Resumo

Nesta dissertação a Espectroscopia Fotoacústica foi utilizada para avaliar a taxa de propagação e a distribuição de medicamentos na unha humana. Foram avaliados dois agentes anti-fúngicos desenvolvidos para o tratamento da onicomicose da unha humana e fornecidos pelo Laboratório Stiefel Ltda. Os experimentos foram realizados “in vitro” em amostras de unha humana saudável doadas por 15 voluntários. Na primeira etapa do trabalho foi determinada a difusividade térmica de quatro unhas utilizando-se a técnica fotoacústica denominada “célula aberta”, obtendo-se como resultado o valor de  $(8 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Na segunda etapa foram obtidos os espectros de absorção óptica das amostras com e sem a aplicação dos produtos. Este procedimento envolveu uma série de testes experimentais para se encontrar o melhor método para obter o perfil de propagação e a distribuição dos produtos ao longo da unha. Os resultados mostraram que a melhor alternativa para se avaliar a taxa de propagação é determinar os espectros de absorção óptica iluminando inicialmente o lado interno da unha, ou seja, o lado oposto ao da aplicação do produto. Em seguida, removia-se uma camada de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  do lado interno da unha, e o espectro era repetido. Este procedimento foi sendo repetido até se atingir a superfície externa da unha. Os resultados para os dois produtos mostraram um perfil de distribuição de intensidade com dependência exponencial crescente em relação ao sentido de maior concentração das substâncias, ou seja, próxima a superfície externa da unha, que é a região onde os agentes foram aplicados. A partir de ajustes com exponenciais crescentes, os dados obtidos nas amostras dos 15 voluntários para os dois produtos mostraram que o medicamento codificado como G0291BL apresentou maior taxa de propagação ( $p=0,0036$ : estatisticamente significativa) se comparado ao produto G0291AC. Em conclusão, os resultados deste trabalho mostraram que a Espectroscopia Fotoacústica foi eficiente para se avaliar a taxa de propagação de dois agentes anti-fúngicos na unha humana. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que a fotoacústica é utilizada para avaliação da propagação de substâncias na unha humana, indicando que o uso desta técnica não destrutiva poderá ser ampliada para a avaliação da propagação de outros medicamentos na unha.

## Abstract

The aim of the present study was to evaluate the penetration of two antifungal agents through human nail by using Photoacoustic Spectroscopy. The experiments were performed using two different substances provided by the Stiefel Laboratory, coded as G0291AC and G0291BL. The measurements were performed in “in vitro” in 15 healthy human nail provided by different volunteers. The study was designed to be performed in two different steps. In the first one we measured the nail thermal diffusivity for the first time using the so-called Open Photoacoustic Cell and obtained the value  $(8 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ . After that we investigated whether the Photoacoustic Spectroscopy (PAS) can be used to determine both the penetration and the distribution profiles of the drugs through the nail thickness. After confirming this hypothesis, we investigated the best procedure to be used in the experiments and observed that by performing the spectrum illuminating the sample in their internal side, the opposite side where the drugs were applied, an exponential grow in the photoacoustic signal generated by the drugs was observed. The study was focused in terms of using the results to determine the propagation rate of these products. The statistical test “one way ANOVA” was used to discriminate the antifungal agents with higher penetration rate through the nails. The comparison between penetration rates of the two substances was performed and the results showed that G0291BL has the higher penetration rate. Finally, the results of this work showed the versatility of the Photoacoustic Spectroscopy to evaluate the penetration rate of substances through the human nail, indicating that this method may be useful in the study of the penetration and the distribution of a wide range of different drugs through the nail.

## Índice

<b>1. Introdução</b>	8
<b>2. Objetivos</b>	12
<b>3. Aspectos históricos da Espectroscopia Fotoacústica</b>	13
3.1. Introdução Histórica	13
3.2. A onda térmica	14
3.3. O Efeito Fotoacústico	15
3.4 Modelo da difusão térmica para o Efeito Fotoacústico	17
3.4.1. Absorção óptica	18
3.4.2. Difusão térmica: definição da difusividade térmica	19
3.4.3. Equação de difusão para o modelo de Rosencwaig e Gersho	20
3.4.4. Perfil de profundidade	22
<b>4. Materiais e métodos</b>	24
4.1. Medicamentos utilizados	24
4.2. Amostras	24
4.2.1. Estrutura da unha	24
4.2.2. Amostras estudadas	26
4.3. A técnica denominada Célula Fotoacústica Aberta (OPC)	27
4.4. Montagem experimental do Espectrômetro Fotoacústico	31
<b>5. Resultados</b>	33
5.1. Difusividade térmica	33
5.2. Espectro de absorção dos medicamentos e da unha	34
5.3. Espectros de absorção após a aplicação dos medicamentos	37
5.3.1. Medidas realizadas 30 minutos após a aplicação dos medicamentos e com a iluminação na superfície externa da unha	37
5.3.2. Medidas realizadas 24 horas após a aplicação dos medicamentos e com a iluminação na superfície externa da unha	43
5.4. Espectros de absorção com a fotoacústica 48 horas após a aplicação dos medicamentos e com a iluminação na superfície interna da unha	45
5.4.1. Resultados para o medicamento G0291AC e para G0291BL. Iluminação na superfície interna da unha	46
<b>6. Conclusão e perspectivas</b>	54
<b>Referências bibliográficas</b>	55

# Capítulo 1

## 1. Introdução

As unhas constituem uma das interfaces entre o corpo e o meio exterior e desempenham tarefa importante na defesa do organismo. Como consequência de contatos eventuais com agentes externos, como por exemplo, os fungos, a unha pode adquirir enfermidades provenientes do meio ambiente. Constituída por camadas, ela desempenha ainda papel relevante tanto na estética dos humanos, como na identificação de enfermidades, que pode ser realizada a partir de seu aspecto físico.

A micose da unha é denominada de onicomicose, que é uma infecção causada por fungos, observada em sua grande maioria em adultos e que incide em cerca de 18 % da população mundial [1,2]. Entre os trabalhadores que estão mais expostos aos fungos estão aqueles que atuam no campo médico, os trabalhadores rurais e os militares. As infecções causadas pelos fungos podem acarretar riscos para as pessoas que têm disfunções cardiovasculares e renais [2].

Os principais agentes responsáveis pela onicomicose são os fungos dermatófitos, particularmente *trichophyton rubrum*, que utilizam a queratina como fonte de subsistência. Além dos dermatófitos, *Candida spp* e fungos não dermatófitos também podem ser causadores de onicomicose. As lesões da unha se manifestam pelo acúmulo e/ou destruição da queratina, que deixa a unha mais grossa e com cor amarelada ou esbranquiçada [2]. Esta enfermidade pode induzir ainda outros sintomas como o descolamento da unha do seu leito, o aparecimento de linhas transversais e longitudinais e ainda a presença de escamas esbranquiçadas depositadas sob a mesma [3], conforme ilustra a figura 1.1.

Embora não se tenha demonstrado ainda que estes fungos sejam um risco à saúde da população, tem sido observado que um número cada vez maior de pacientes que são submetidos à ação de medicamentos imunossupressores, como os portadores do Vírus (HIV), têm apresentado uma incidência maior de infecções na unha causadas por estes fungos [2,4-7].





Figura 1.1.: Exemplos de onicomicoses. Esquerda: Paroníquia (unheiro); Direita: onicomicose causada por *Trychophyton rubrum*.

O corte indevido que resulta em traumas pode facilitar a entrada de microorganismos e é considerado como um dos grandes fatores causadores de infecções nas unhas. Além disso, a retirada da cutícula em demasia pode diminuir a proteção e como consequência pode permitir o aparecimento de micoses.

Os tratamentos contra a micose podem ser via cirurgia, ou a partir do uso de medicamentos tanto por ingestão oral quanto por uso tópico, em geral os esmaltes. Em muitos casos o tratamento pode ser longo, especialmente pela dificuldade de se atingir os fungos nas doses corretas [4]. Na ingestão oral podem ocorrer efeitos colaterais adversos, o que tem restringido o tratamento por esta via. *Griseofulvin* foi aprovado em 1958, sendo o primeiro agente oral com a finalidade de tratar infecções ocasionadas por fungos superficiais. Este agente possui desvantagem, pois não é indicado para tratar a unha do pé com onicomicose.

*Ketoconazole* foi aprovado em 1980 e foi o primeiro medicamento oral para o tratamento da unha do pé com onicomicose. Este medicamento possui esta vantagem sobre o griseofulvin e tem efetividade no ataque à *Cândida* spp. Infelizmente relatos na literatura têm sugerido a incidência de hepatite sintomática nos pacientes relacionada ao uso deste medicamento.

*Itraconazole* foi aprovado nos Estados Unidos em 1995 para o tratamento de dermatite e onicomicose das unhas das mãos e dos pés. Um ano depois a *Terbinafine* (contínua) foi aprovada para curar onicomicose, e atualmente é o medicamento mais prescrito como agente oral anti-fúngico.

Quando um agente oral como itraconazole, terbinafine, ou fluconazole é usado, a droga se difunde e pode ser encontrada não só no leito ungueal como em outras regiões da matriz e no sangue.

O tratamento com estas drogas orais tem um custo elevado e é de longo prazo. Durante o tratamento, os pacientes devem ser monitorados, pois em alguns casos pode haver vertigem, diarreia e indigestão, além da possibilidade de efeitos prejudiciais ao fígado. Este é um problema importante especialmente em pacientes diabéticos ou com doenças cardiovasculares [7,8].

A outra forma de tratamento é a partir de intervenção cirúrgica o que é também um procedimento agressivo.

Uma outra via de tratamento da onicomicose é o uso tópico de anti-fúngicos, dentre os quais pode ser citado o Ciclopirox olamina [8,9,10]. Foi demonstrado que este agente quando em solução de 8% pode penetrar por até aproximadamente 0,4 mm no leito da unha com apenas uma aplicação. Com aplicações diárias por duas semanas a droga pode alcançar a superfície ventral do leito da unha onde estaria a onicomicose. Foi observado ainda que o ciclopirox pode ser encontrado na unha até duas semanas após o término do tratamento [10,11].

Um fato importante relacionado a estes medicamentos é que todos são de alto custo. Cada tratamento é estimado em: ciclopirox, U\$ 620,5; fluconazole, U\$ 1.453,8; terbinafine, U\$ 7182,1; itraconazole, U\$ 2005,9; griseofulvin U\$ 4.193,2[12].

No caso de medicamentos de uso tópico, como os de interesse neste trabalho, um dos desafios é desenvolver medicamentos que contenham veículos capazes de proporcionar uma alta taxa de difusão do princípio ativo de modo que se possa atingir a região infectada e na dose adequada. Uma das dificuldades para se obter veículos eficientes para o transporte do princípio ativo através da unha é a natureza densa da estrutura ungueal que dificulta o processo de difusão. Além disso, em muitos casos os medicamentos de uso tópico atuais, por sua natureza agressiva, provocam modificações permanentes na estrutura da unha o que tem levado à remoção indesejada da mesma. Esta tem sido também uma motivação adicional para o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficientes e menos agressivos para o tratamento contra a presença de fungos na unha.

A procura por novos medicamentos passa ainda pela dificuldade de se avaliar se o processo de difusão é eficiente. Os métodos utilizados atualmente são os mais diversos e variam desde o acompanhamento clínico da evolução da doença durante o período da medicação até a análise do sangue do indivíduo submetido ao teste (por meio de radioisótopos como marcadores). Certamente, um procedimento que poderia ser adotado para se identificar às substâncias que compõem o

medicamento aplicado na unha seria utilizar as bandas de absorção óptica das referidas substâncias quando elas estão presentes na unha. No entanto, é difícil de se determinar os espectros de absorção óptica da unha por técnicas espectrocópicas convencionais: nas medidas via reflexão a penetração da radiação na amostra é da ordem de 1  $\mu\text{m}$ , o que é insuficiente para se realizar uma avaliação precisa da distribuição dos centros absorvedores ao longo da unha; enquanto que nas medidas via transmissão também não é possível avaliar o perfil de distribuição destes centros ao longo da amostra. Neste contexto, um dos desafios é encontrar novos métodos de investigação que possam avaliar a eficiência da difusão de medicamentos através da unha.

Nossa proposta neste trabalho é utilizar a Espectroscopia Fotoacústica (PAS)\* para determinar o perfil de propagação de medicamentos na unha humana. A hipótese do estudo está focalizada na característica única desta técnica de possibilitar a determinação da resposta da absorção óptica da amostra para diferentes profundidades ao longo de sua espessura. Ao contrário dos métodos espectrocópicos convencionais, como aqueles mencionados acima, a fotoacústica permite que se obtenha o espectro de absorção óptica das substâncias, mesmo que as mesmas estejam localizadas no interior da amostra. A espessura de prova depende da difusividade térmica da amostra e da frequência de modulação da luz a ser empregada para a geração do sinal fotoacústico. Em amostras com estruturas poliméricas, como é o caso da unha, profundidades de até 300  $\mu\text{m}$  podem ser avaliadas. Portanto, considerando a importância da avaliação da eficiência de propagação de medicamentos na unha e a potencialidade da espectroscopia fotoacústica para se determinar o perfil de profundidade de centros absorvedores ao longo da amostra, nossa hipótese neste trabalho é a de que a PAS pode ser utilizada para avaliar a taxa de propagação e a distribuição de medicamentos na unha humana.

\*Esta abreviatura "PAS" vem do nome da técnica em inglês "Photoacoustic Spectroscopy".

## Capítulo 2

### 2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é utilizar a Espectroscopia Fotoacústica para avaliar a propagação e a distribuição de dois medicamentos na unha humana. A composição das drogas usadas é conhecida somente pelos pesquisadores do laboratório que forneceu as mesmas. Os códigos adotados para a identificação de cada uma delas são: G0291AC e G0291BL.

Os objetivos específicos são:

- determinar a difusividade térmica da unha para que se possa estimar a profundidade na amostra onde o sinal fotoacústico é gerado;
- determinar os espectros de absorção óptica em função da espessura das amostras para se avaliar a potencialidade da espectroscopia fotoacústica na determinação do perfil de propagação dos medicamentos na unha. Estes experimentos foram realizados em 15 pares de unhas obtidas de diferentes voluntários;
- avaliar a reprodutibilidade do procedimento adotado repetindo-se o mesmo estudo em cinco pares de unhas obtidas do mesmo voluntário;
- empregar tratamento estatístico para analisar os dados experimentais obtidos para verificar se é possível diferenciar entre os dois medicamentos testados qual deles tem maior taxa de propagação ao longo da unha.

## Capítulo 3

### 3. Aspectos Históricos da Espectroscopia Fotoacústica

#### 3.1. Introdução Histórica

O efeito fotoacústico foi observado pela primeira vez em 1880 quando Alexandre Graham Bell trabalhava em seu “fotofone”. Ele percebeu que a incidência de luz solar modulada em um sólido, dentro de uma célula, gerava no ar à sua volta sons audíveis, que podiam ser amplificados e captados a partir de um tubo ligado à referida célula [13]. Em 1881 Bell apresentou sua descoberta à Associação Americana para o Desenvolvimento da Ciência, nos seguintes termos: “a natureza dos raios que produzem efeitos sonoros em substâncias diferentes depende da natureza das substâncias que são expostas à radiação, e que os sons são em cada caso devido aos raios do espectro que são absorvidos pelo corpo”. Segundo sua interpretação a intensidade do sinal fotoacústico dependia da quantidade de luz absorvida pelo material na célula e o efeito fotoacústico em sólidos era dependente da absorção da luz [13].

Em 1881, Alexandre G. Bell concordou com a afirmação de Lord Rayleigh que sugeria que: “a fonte primária do sinal fotoacústico em discos finos e flexíveis deveria ser devida à vibração mecânica do disco como consequência do aquecimento desigual do mesmo produzida pela iluminação intermitente”. A explicação dada por Mercadie e Preece, por outro lado, considerava que o sinal fotoacústico era causado pelo movimento vibratório do gás contido no tubo do fotofone, principalmente da coluna de ar que estava diretamente em contato com a superfície aquecida, devido ao aquecimento periódico da amostra [13]. É importante ressaltar que nos experimentos feitos por Graham Bell, o detector era o próprio ouvido e isto tornava difícil a obtenção de dados quantitativos, o que certamente contribuiu para que os experimentos envolvendo o efeito fotoacústico fossem

interrompidos por um período de mais de 50 anos. Com o advento do microfone o efeito fotoacústico voltou a despertar interesse, e em 1938 Viegorov começou a usar o referido fenômeno para estudar a absorção de luz por gases na região do infravermelho. Em seguida, foram desenvolvidos analisadores de gases baseados no efeito fotoacústico por Pfund em 1939 e por Luft em 1943. Entre 1950 e 1970 estes analisadores foram substituídos por técnicas mais sensíveis, e a novidade neste período foi o surgimento de fontes de luz laser que também foram empregadas para a geração do sinal fotoacústico [14].

O reaparecimento do efeito fotoacústico com o emprego de microfones ficou restrito para as aplicações em gases até em torno de 1970. Em 1973, Rosencwaig e Gersho [13] desenvolveram as bases teóricas para descrever o sinal fotoacústico, o que permitiu que a Espectroscopia Fotoacústica fosse empregada como técnica quantitativa para o estudo das propriedades ópticas e térmicas das amostras, inclusive para os materiais sólidos. No modelo desenvolvido os referidos autores tinham como hipótese que o mecanismo básico responsável pela geração do sinal fotoacústico era o fluxo periódico de calor entre a superfície da amostra e o gás contido na célula fotoacústica.

Desde então, a PAS vem sendo utilizada nas mais variadas áreas da ciência, e uma de suas características mais marcantes é a versatilidade do método para a realização de estudos de perfil de profundidade ao longo da amostra. Estes estudos têm sido realizados em um espectro amplo de materiais, inclusive nos materiais biológicos [14-25], como no estudo do processo de propagação de substâncias na pele humana “in vitro” e “in vivo” [16,17].

### **3.2. A onda térmica**

Antes de descrever os aspectos relevantes da teoria do efeito fotoacústico, é necessário estabelecer o conceito de ondas térmicas que surge em um dado material em decorrência da absorção de radiação eletromagnética. No processo de decaimento não radioativo a liberação de calor ocorre a partir dos pontos do material onde a luz foi absorvida. A propagação de calor faz surgir flutuações térmicas na superfície do material que dependem diretamente das propriedades ópticas e

térmicas da amostra. A soma dessas ondas, superpostas na superfície do material, resultará na variação da temperatura da superfície, caracterizando-se como a resposta térmica do material [18].

### 3.3. O Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico é gerado quando uma amostra posicionada no interior de uma célula fotoacústica ou em contato térmico com a mesma absorve energia luminosa modulada e converte parte desta energia em calor. A variação periódica da geração de calor provoca mudança na pressão do ar no interior da célula que pode ser detectada por um microfone acoplado a ela, gerando assim o sinal fotoacústico. A intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente. Após o trabalho pioneiro de Rosencwaig e Gersho, esforços têm sido feitos para se identificar os mecanismos responsáveis pela geração do sinal fotoacústico, para as mais diferentes condições experimentais, tanto em termos de posicionamento da amostra na câmara fotoacústica ou ainda em termos das diferenças entre os materiais. Entre esses mecanismos, três têm recebido especial atenção, são eles:

*Difusão térmica:* Este é o mecanismo proposto por Rosencwaig e Gersho que considera que os pulsos de calor produzidos na amostra são transmitidos ao gás, que ao expandir-se periodicamente gera ondas acústicas. A fina camada de gás que está em contato com a amostra se aquecerá, e passará a se expandir e contrair periodicamente, conforme ilustra a figura 3.1. gerando uma onda de pressão no interior da câmara fechada. O sinal fotoacústico resultará da variação de pressão detectada por um microfone acoplado ao corpo da célula [19,20].

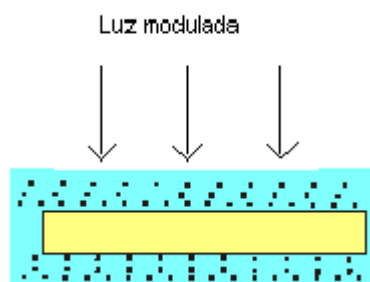


Figura 3.1.: Mecanismo de difusão térmica.

*Expansão térmica:* Neste mecanismo, o aquecimento da amostra como resultado da absorção da radiação modulada faz com que a mesma se expanda periodicamente, funcionando ela própria como um pistão vibratório. Isto faz com que ocorra o aparecimento de ondas acústicas no gás. O mecanismo de expansão térmica, ilustrado na figura 3.2. pode ser dominante em alta freqüência de modulação e para amostra com baixo coeficiente de absorção óptica. Uma de suas características é que o sinal fotoacústico depende da temperatura média da amostra.

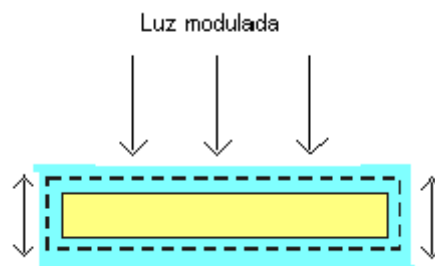


Figura 3.2.: Expansão térmica.

*Flexão Termoelástica:* Este mecanismo surge quando ocorre a existência de um gradiente de temperatura ao longo da espessura da amostra. Neste caso a absorção decresce na medida em que a luz penetra no material. Este gradiente de temperatura é perpendicular ao plano da amostra, uma vez que a intensidade da radiação decresce exponencialmente com a profundidade de penetração da luz no material e a absorção da radiação será maior na superfície. Logo, planos de diferentes profundidades apresentam diferentes dilatações térmicas e assim se as bordas da amostra estiverem presas no suporte, a superfície da mesma irá flexionar periodicamente, gerando uma onda de pressão no gás e conseqüentemente o sinal fotoacústico, conforme ilustra a figura 3.3.

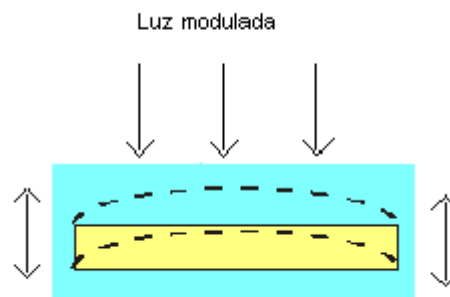


Figura 3.3.: Flexão Termoelástica



É importante ressaltar que embora estes mecanismos em geral estejam simultaneamente presentes durante a geração do sinal fotoacústico, existem condições experimentais que podem privilegiar um deles, e assim a análise quantitativa dos resultados pode ser facilitada.

### **3.4. Modelo da difusão térmica para o Efeito Fotoacústico**

Não é nosso objetivo neste trabalho apresentar todos os modelos atuais para a espectroscopia fotoacústica. Abordaremos apenas os aspectos principais do modelo de difusão térmica para o sinal fotoacústico de Rosencwaig e Gersho, conhecido como modelo do “pistão vibratório”. Desta forma, introduziremos as variáveis relevantes relacionadas às grandezas físicas que serão apresentadas posteriormente. Uma descrição completa dos modelos para a PAS pode ser encontrada em outros trabalhos [20-25].

Conforme descrito anteriormente, o modelo de difusão térmica para o sinal fotoacústico consiste em considerar uma pequena camada fronteira de gás adjacente à amostra capaz de responder termicamente às variações de temperatura induzidas pela absorção da luz incidente. Esse efeito baseia-se no fato de que todo calor gerado na amostra é transferido para o gás dando origem a flutuações de pressão no mesmo, que podem ser detectadas com o uso de um microfone sensível. O caráter modulado caracteriza essa variação de pressão como um “pistão vibratório”.

A Figura 3.4. mostra um desenho esquemático de uma célula fotoacústica. Ela consiste em uma amostra sólida colocada dentro de uma pequena célula com gás (ar) a uma distância “ $l_g$ ” de uma janela de vedação transparente, por onde se incide um feixe de luz modulado. Admite-se que o gás não absorve energia da radiação que emerge da janela e que atinge a amostra. Nas paredes laterais da célula é inserido um microfone capacitivo que detecta as conseqüentes flutuações de pressão no gás. O calor gerado no interior da amostra, após a absorção da

energia do feixe de luz gera ondas térmicas no seu interior que se propagam tanto para a interface entre a amostra e o gás quanto para a interface amostra-suporte.

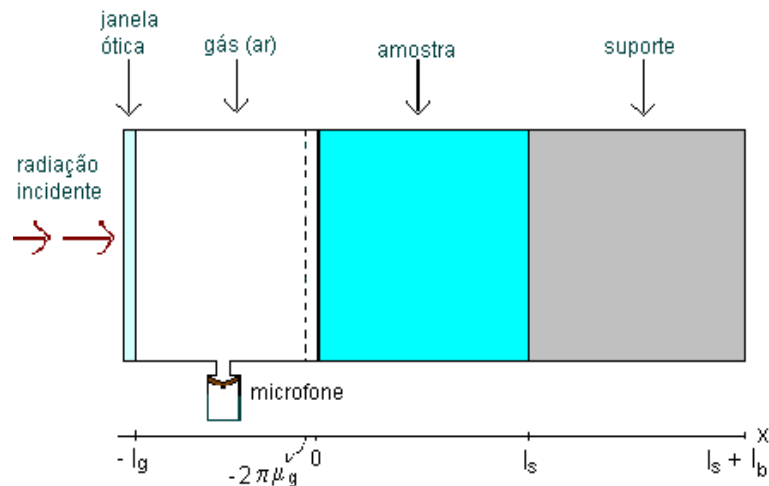


Figura 3.4.: Desenho esquemático unidimensional da célula fotoacústica

Em que:

- 0- origem do sistema unidimensional;
- $-2\pi\mu_g$  – é a espessura do gás que responde à variação de temperatura da amostra;
- $-l_g$  – espessura total da camada de gás;
- $l_s$  – espessura da amostra;
- $l_s+l_b$  – espessura da amostra + suporte.

### 3.4.1. Absorção óptica

Em materiais não opacos a profundidade onde a intensidade do feixe de luz diminui para  $1/e$  do valor incidente caracteriza a absorção óptica. O parâmetro que mede essa absorção é chamado comprimento de absorção óptica,  $l_\beta$ , e especifica o caráter óptico do material.

A figura 3.5. mostra o comportamento óptico de um material, de acordo com a relação entre o valor de  $l_{\beta}$  e o de sua espessura. Os casos de amostras transparentes, absorvedoras e opacas são ilustrados nesta figura.

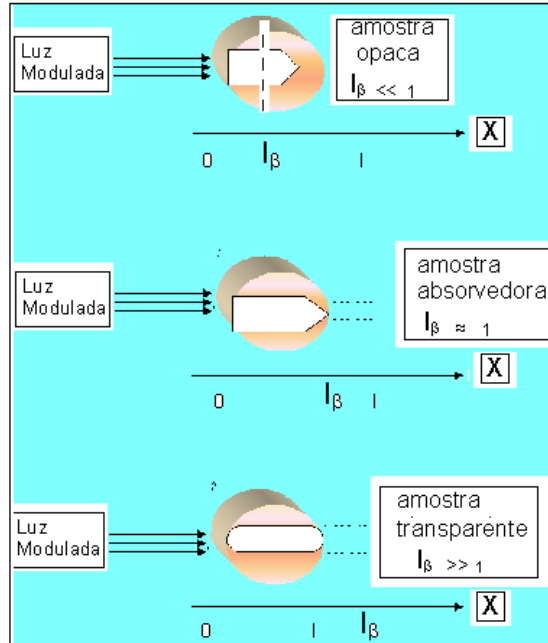


Figura 3.5.: Comportamento óptico para amostras transparentes, absorvedoras e opacas.

Microscopicamente, quando a onda eletromagnética interage com uma molécula, ela excita um estado eletrônico (no caso da luz visível ou ultravioleta) ou vibracional (no infravermelho). Quando o elétron é excitado, ele pode retornar ao estado fundamental transferindo energia para os estados vibracionais da molécula, induzindo conseqüentemente um aumento de temperatura na amostra. A transmissão da energia térmica gerada para o resto da amostra, por meio da condução, caracteriza a difusão térmica. Simultaneamente podem ocorrer expansões ou contrações que se propagam pela amostra na forma de ondas elásticas [9,22].

### 3.4.2. Difusão térmica: definição da difusividade térmica

A difusão térmica num dado material pode ser monitorada mediante a medida da velocidade com que o calor se propaga neste meio, sendo que a propriedade térmica medida é a própria difusividade térmica,  $\alpha$ , que descreve processos

transientes ou periódicos de transmissão de calor. Além desse parâmetro tem-se a condutividade térmica que é definida a partir do fluxo de calor na amostra.

Um pulso ocorre quando o calor gerado em um dado ponto da amostra se propaga para outros pontos, que sofrem uma elevação e subsequente queda na temperatura.

Somente os pontos que estão na amostra dentro do comprimento de absorção óptica,  $l_\beta$ , podem gerar calor.

Em analogia ao comprimento de absorção óptica  $l_\beta$  defini-se o comprimento de difusão térmica,  $\mu_i$ , como sendo a profundidade na amostra onde a magnitude da oscilação térmica se atenua a  $1/e$ . A expressão  $\mu_i = \sqrt{2\alpha/\omega}$  ( $\alpha$  é a difusividade térmica da amostra e  $\omega$  é a frequência de modulação da luz incidente) descreve a profundidade máxima na amostra, a partir da qual o calor gerado não atinge a superfície da mesma para contribuir para a geração do sinal fotoacústico. Em outras palavras, o parâmetro  $\mu_i$ , para uma dada frequência de modulação da luz, descreve a camada da amostra que contribui para a geração do sinal fotoacústico. Desta forma, ao se variar a frequência de modulação da luz pode-se obter o comportamento do sinal para diferentes profundidades da amostra e assim realizar estudos do perfil de profundidade da absorção óptica ao longo de sua espessura.

### 3.4.3. Equação de difusão para o modelo de Rosencwaig e Gersho

As equações para difusão térmica unidimensional para cada meio, de acordo com a figura 3.4, são escritas na forma [13,21]:

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial \theta(x,t)}{\partial t} + \frac{\beta}{2k} I_0 \eta e^{-\beta x} (1 + \cos \omega t) = 0, \quad 0 \leq x \leq l_s \quad (3.1)$$

(amostra)

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial \theta(x,t)}{\partial t} = 0, \quad -l_g \leq x \leq 0 \quad (3.2)$$

(gás)

$$\frac{\partial^2 \theta(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_b} \frac{\partial \theta(x,t)}{\partial t} = 0, \quad l_s \leq x \leq l_s + l_b \quad (3.3)$$

(suporte)

**Tabela 3.1.: Definição de parâmetros**

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

Onde os índices i referem-se: s = amostra; b = suporte; g = gás.

O modelo de Rosensewaig e Gersho considera que não há absorção da radiação incidente pelo gás nem pelo suporte. Portanto, o termo  $f(x,t)$  não aparece

nas equações (3.2) e (3.3), porque não há geração de calor nesses meios.

A solução para a temperatura  $\theta(x, t)$  de interesse é aquela na interface amostra-gás, dada por [13,21]:

$$\theta_s(\lambda, \chi) = \frac{\beta I_0}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left( \frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right) \quad (3.4)$$

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

Sendo  $b$  e  $g$  as constantes de acoplamento entre as interfaces amostra - suporte e gás – amostra.

A complexidade desta expressão impõe que para cada situação física seja necessário especificar simplificações para se obter a temperatura na amostra a partir de uma equação reduzida. Conhecendo as características do material que será estudado, pode-se simplificar bastante a equação, já que vários termos da equação (3.4) são parâmetros exclusivos da amostra.

### 3. 4.4. Perfil de profundidade

A difusão térmica em um dado material é governada pelo grau de cristalinidade e imperfeições na sua estrutura. Como mencionamos anteriormente, a grandeza física medida no processo de difusão térmica é a difusividade térmica  $\alpha (cm^2 / s)$ , que mede a velocidade com que o calor se propaga num meio, caracterizando fisicamente este meio [19,22] .

A frequência de modulação da luz,  $f = \omega/2\pi$ , define a difusão do calor para um dado ponto da amostra. O cálculo da transmissão periódica de calor é feito a partir do comprimento de difusão térmica  $\mu_i = (2\alpha_i / \omega)^{1/2}$ . O comportamento do

comprimento de difusão térmica dos materiais em função da freqüência de modulação luz caracteriza a amostra em duas condições:

$$\mu_s \ll l_s \text{ amostra termicamente grossa}$$

$$\mu_s \gg l_s \text{ amostra termicamente fina}$$

A amostra será termicamente grossa quando  $l \gg \mu_s$  (convenciona-se que  $l > 2\pi\mu_s$ ), assim as propriedades térmicas do suporte não interferem no sinal fotoacústico. Uma amostra será termicamente fina quando  $l \ll \mu_s$ , de modo que a atenuação da oscilação térmica é desprezível para o calor gerado em qualquer ponto da amostra [22].

No entanto, essa dependência de  $\mu_i$  com  $f$  possibilita a variação de  $\mu_s$  quando se faz variar a freqüência, logo, uma amostra pode passar de termicamente fina para termicamente grossa, ao se aumentar a freqüência de modulação da luz.

Tendo uma freqüência na qual ocorre a transição entre a amostra termicamente fina para a termicamente grossa, denomina-se esta freqüência como de corte (ou freqüência característica) pela equação:

$$f_c = \frac{\alpha}{\pi l_s^2} \text{ (freqüência de corte)}$$

Conforme a relação direta de  $f_c$  com a espessura, pode-se escolher convenientemente a região de espessura térmica a partir da faixa de freqüência ou da alteração da espessura da amostra.

A figura 3.6. ilustra o comportamento do comprimento de difusão térmica para diferentes freqüências de modulação da luz. Nota-se que quanto maior for a freqüência de modulação menor será a espessura da amostra que contribui para a geração do sinal fotoacústico.

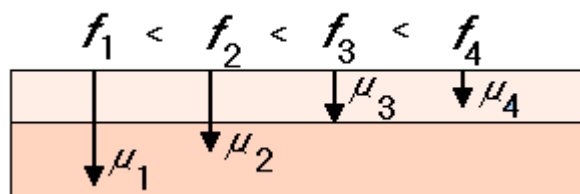


Figura 3.6.: Comportamento do comprimento de difusão térmica

Para focalizar a descrição dos conceitos da PAS apresentados anteriormente em termos dos objetivos deste trabalho, consideraremos dois pontos

principais: no primeiro, que se refere ao foco principal do trabalho de se obter o perfil de profundidade dos medicamentos aplicados na unha, a análise do comprimento de difusão térmica para cada espectro obtido será essencial; o segundo ponto é que para se determinar o valor de  $\mu_s$  é preciso medir a difusividade térmica da amostra. Especificamente para determinar a difusividade térmica apresentaremos o método denominado de Célula Fotoacústica Aberta que tem sido usado em nosso grupo para a medida da difusividade térmica de diversos materiais.



## Capítulo 4

### 4. Materiais e métodos

#### 4.1. Medicamentos anti-fúngicos utilizados

Os medicamentos utilizados foram o G0291AC, que tem forma líquida, e o G0291BL, na forma pastosa. A fórmula completa das amostras não foi fornecida, sendo informado apenas que os dois medicamentos contêm o Ciclopirox Olamina, que é o princípio ativo, a Uréia e o Ácido Salicílico. Estes três componentes foram também fornecidos para as análises.

#### 4.2. Amostras

##### 4.2.1. Estrutura da unha

A unha é formada por placas córneas que se localizam na superfície dorsal das falanges terminais dos dedos e artelhos. A superfície da falange, que é recoberta pela unha, recebe o nome de leito ungueal. A porção proximal da unha é chamada de raiz da unha ou matriz. É na matriz que se observa a sua formação, graças a um processo de proliferação e diferenciação das células epiteliais aí localizadas, que gradualmente se queratinizam, formando a placa córnea. A unha é constituída por camadas córneas fortemente compactadas e aderidas umas às outras. Estas camadas crescem no sentido distal dos membros, deslizando sobre o leito ungueal, que tem estrutura típica de pele e não participa na formação da unha. Portanto, a anatomia da lâmina ungueal é resultado da produção cutânea formada de queratina compactada, chamada de oniquina que é composta de proteínas, enxofre, cistina, argina, água (7 a 16%), cálcio e ferro. Ela tem baixa elasticidade, é translúcida e tem baixa flexibilidade.

A unha possui as funções de proteção sendo uma lâmina dura e flexível. Tem a função de proteger as extremidades dos artelhos e tem seu papel na sensibilidade táctil da popa digital. A unha normal é transparente, lisa e suave, permanecendo colada no leito e apresentando crescimento contínuo no indivíduo

em qualquer faixa etária. O crescimento das lâminas ungueais demora cerca de 6 meses para serem substituídos.

A unha é dividida em partes, conforme mostra a figura 4.1:

- Lâmina ungueal: é a própria unha, situada sobre o leito ungueal. Sua consistência varia de pessoa para pessoa e depende de fatores tanto genéticos como externos. É uma lâmina de células queratinizadas compactada e com espessura variável de (0,300 a 0,850) mm.
- Matriz ungueal: também chamada de raiz da unha é formada pôr células germinativas que vão se compactando a partir de mitoses permanentes. A nutrição da matriz é feita por pequenos vasos superficiais da derme.
- Leito ungueal: formado pela derme e epiderme, é fortemente aderido à lâmina e com grande quantidade de terminações nervosas.
- Eponíquio: conhecido como cutícula, liga a prega supra-ungueal à lâmina. Sua formação é de queratina e tem como função proteger a matriz ungueal contra a entrada de produtos químicos, agentes biológicos e outros.
- Lúnula: é uma área de forma convexa e esbranquiçada, localizada junto ao eponíquio e indica a posição da matriz.
- Hiponíquio: é formado por uma fina camada da epiderme e faz a ligação entre o leito ungueal e a polpa digital. Tem grande quantidade de terminações nervosas, sendo também uma região muito sensível.
- Prega supraungueal: localizada antes do eponíquio tem tamanho variável. É uma dobra de pele epitelial sobre a matriz ungueal. É constantemente lesada na retirada do eponíquio (cutícula).
- Prega periungueal: é a região localizada nas laterais da unha.
- Sulco ungueal: está localizado ao longo de toda a lâmina, e é uma faixa estreita de pele, formada na junção entre a lamina e a prega periungueal.

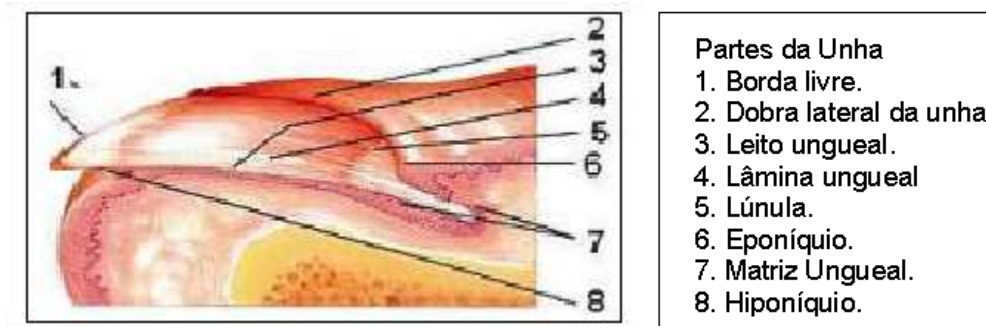


Figura 4.1.: Unha humana e suas partes:

#### 4.2.2. Amostras estudadas

Todas as unhas estudadas foram cortadas conforme mostra a figura 4.2. As espessuras foram medidas com o uso de um micrômetro Digimatic marca Mytutoyo. Cada unha foi dividida em duas amostras para que a mesma unha fosse utilizada para a aplicação das duas drogas estudadas. A dimensão de cada amostra era de aproximadamente 0,3 x 0,3 cm, sendo que a espessura é variável para cada voluntário. Nossas amostras tiveram espessuras variando no intervalo entre 250 até 800  $\mu\text{m}$ . Especificamente para as medidas da difusividade térmica, as amostras foram preparadas com um diâmetro da ordem de 6 mm e com espessuras em torno de 150  $\mu\text{m}$ .

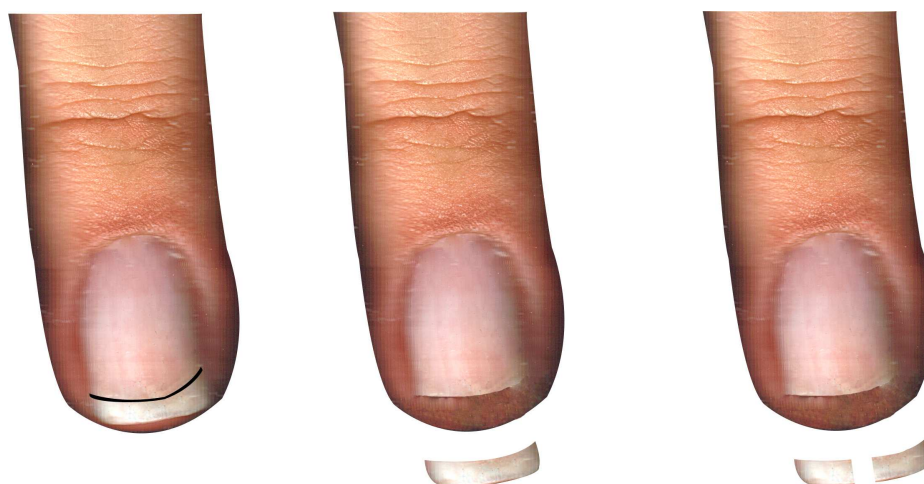


Figura 4.2.: Ilustração do procedimento experimental para o corte das unhas.

Todas as unhas utilizadas foram lixadas para a retirada da camada superficial externa, aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ , antes de se aplicar os medicamentos.

Este procedimento facilita a propagação das substâncias, e foi executado conforme recomendação do fabricante. Ou seja, este procedimento é o mesmo que deve ser utilizado pelos pacientes antes da aplicação dos produtos sobre a unha.

#### 4.3. A técnica denominada de dois feixes usando o sinal traseiro

A técnica OPC, cuja denominação vem de *Open Photoacoustic Cell*, empregada neste trabalho é baseada no método de Yasa e Amer que mediram a atenuação do sinal fotoacústico gerado por iluminação traseira em relação ao sinal induzido por iluminação dianteira. Neste método, a amostra é presa à célula fotoacústica pelas bordas, conforme ilustra a figura 4.3.

A célula aberta utiliza um microfone Sennheiser. A câmara não possui uma tampa por isso possui o nome “célula aberta”, sendo fechada pela própria amostra. Para selar hermeticamente a câmara é necessário aplicar graxa de silicone entre as bordas da célula e a amostra.

O microfone é composto por um diagrama de eletreto metalizado e uma placa de metal separada por uma camada de ar. Um resistor de  $8,2\text{ K}\Omega$  é usado para a formação do circuito. As oscilações de pressão na câmara defletem a membrana, gerando uma voltagem através do resistor. Esta voltagem alimenta um pré-amplificador montado na própria cápsula do microfone.

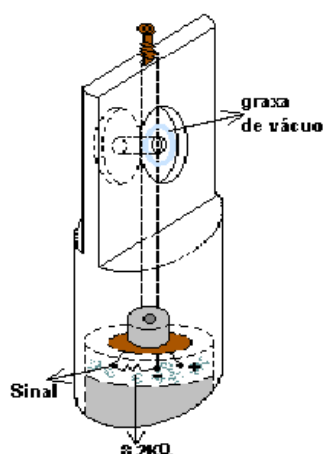


Figura 4.3.: Célula de Dois Feixes.

Neste arranjo, quando a luz modulada incide sobre a amostra a flutuação periódica da temperatura faz variar a pressão na câmara de ar e esta pressão é detectada pelo microfone.

O mesmo modelo teórico descrito por Rosencwaig-Gersho é usado para esta célula, onde as flutuações periódicas da pressão na célula são determinadas resolvendo-se as equações de difusão térmica acopladas.

Como usamos a iluminação traseira e a absorção ocorre na superfície da amostra (amostra opaca) a equação do sinal fotoacústico se transforma em [18]:

$$\delta P = \frac{\gamma P_0 I_0 (\alpha_s \alpha_g)^{1/2}}{2\pi l_g T_0 k_s f} \frac{e^{j(\omega t - \frac{1}{2})}}{\sinh(\sigma_s l)}$$

onde:  $\gamma$  = razão dos calores específicos ( $c_p/c_v$ );

$P_0$  = pressão ambiente

$I_0$  = fluxo de luz monocromática incidente

$\alpha$  = difusividade térmica

$l_g$  = espessura do gás

$T_0$  = temperatura média na amostra

$k$  = condutividade térmica

$f$  = a frequência de modulação da luz,  $f = \omega/2\pi$ .

Para uma amostra termicamente fina,  $l_s a_s \ll 1$  a amplitude do sinal fotoacústico varia com  $f^{-3/2}$ , ou seja, a amplitude decresce exponencialmente com a dependência  $f^{-1/2}$ . Por outro lado, se a amostra é termicamente grossa,  $l_s a_s \gg 1$ , o sinal é proporcional a  $S = \frac{A}{f} \exp(-b\sqrt{f})$ , e o decréscimo é  $f^{-1/2}$  sendo A um fator de amplitude.

Neste caso a difusividade térmica pode ser obtida do ajuste do sinal fotoacústico que é dado pela expressão:

$$S = \frac{A}{f} \exp(-b\sqrt{f}) \tag{4.1}$$

Em que:

$$b = \sqrt{\frac{\pi d^2}{\alpha_s}} \quad \text{com} \quad \alpha = \pi f \frac{l_s}{b^2} \quad (4.2)$$

Como a resposta do microfone em geral não é linear com a frequência, é preciso determinar a função resposta do mesmo. Utilizando-se uma lâmpada de tungstênio (fonte de luz branca), com radiação focalizada numa lâmina de alumínio, termicamente fina, obtém-se a função ajuste  $\chi$ , dada por  $\chi = \frac{S_{Al\text{exp}}}{S_{teor}}$ , como na figura

4.4. Utilizou-se a dependência  $S_{al} = \frac{K}{f^{1.5}}$ , em que  $K$  é uma constante.

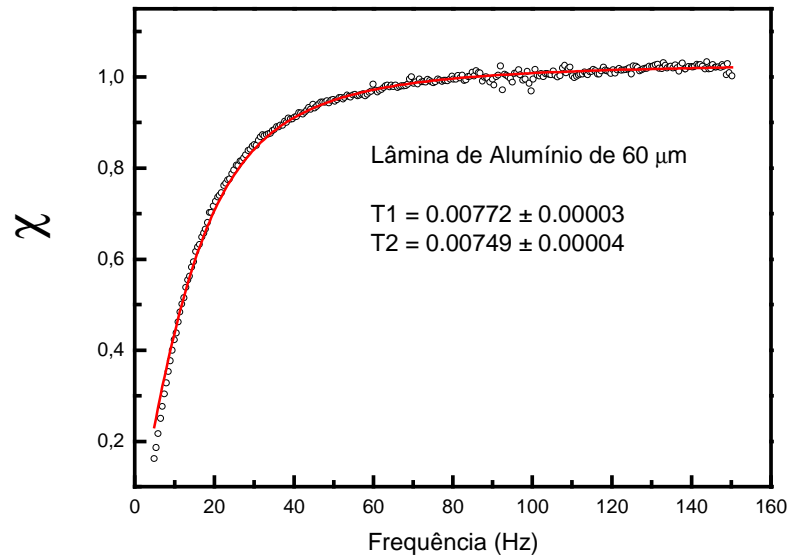


Figura 4.4.: Variação da função resposta normalizada versus a frequência de modulação.

A figura 4.5. ilustra o arranjo experimental adotado para os experimentos. Como mencionado anteriormente, este método é denominado de técnica da dependência do sinal traseiro porque avalia o sinal fotoacústico induzido na superfície da amostra a partir da detecção com um microfone posicionado atrás da mesma, onde está a câmara com gás.

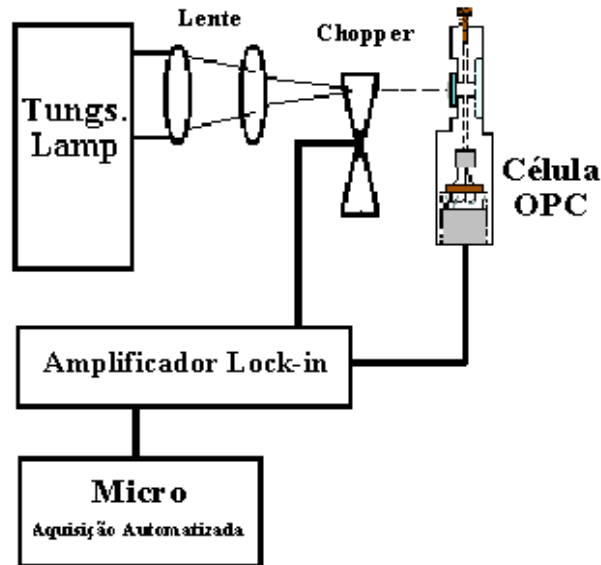


Figura 4.5.: Arranjo experimental utilizado para a medida da difusividade térmica

Neste experimento foi utilizada como fonte de luz uma lâmpada Philips de projetor tipo 7748 XHP de filamento de tungstênio com potência de 250W e tensão de 24V, alimentada por uma fonte de tensão estável da marca HP (Hewlett Packard) modelo 6653, capacidade de 0-35 V/ 0-15 A.

O modulador mecânico (chopper) utilizado foi o modelo SR540 da Stanford Research Systems. Este possui uma célula fotoelétrica que fornece ao amplificador o sinal de referência da modulação. A radiação modulada é focalizada na amostra, através de duas lentes, cujos focos são de  $f_1=150\text{mm}$  e  $f_2=50\text{mm}$ . O sinal é detectado por um microfone modelo Sennheiser e analisado pelo amplificador sintonizado (Lock-in) da marca Stanford Research Systems, modelo SR830 DSP.

As amostras foram lixadas até atingirem espessuras da ordem de  $150\mu\text{m}$ , e com diâmetro da ordem de 6 mm, conforme as dimensões da célula.

Com a função resposta corrigem-se os sinais experimentais obtidos das amostras, fazendo-se a dependência  $\ln(S.f / \chi) \times \sqrt{f}$ . Desta forma, obtém-se o coeficiente angular  $b$  como na figura 5.1, do capítulo 5.

A partir da equação 4.1 obtém-se a difusividade térmica da amostra. Para se obter uma melhor estatística para os dados experimentais, os experimentos foram repetidos três vezes para cada amostra.

#### 4.4. Montagem experimental do Espectrômetro Fotoacústico

O arranjo experimental utilizado para a realização das medidas espectroscópicas está demonstrado na figura 4.7.

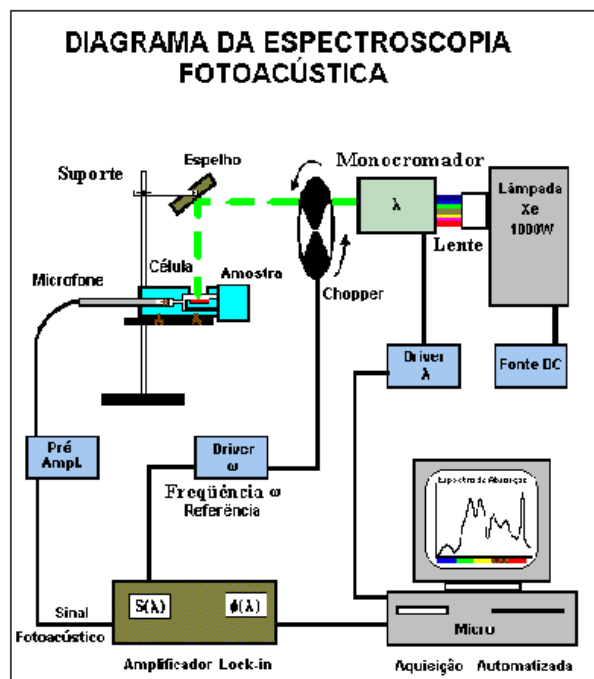


Figura 4.7.: Espectrômetro fotoacústico

A lâmpada de Xenônio utilizada é da marca Oriel Corporation, modelo 68820, de 1000 Watts de potência. A região de emissão espectral varia entre 180 nm e 3,2  $\mu$ m.

A luz emitida passa por um modulador mecânico, "chopper", modelo SR 540 da Stanford Research Systems, que por sua vez gera um sinal de referência da frequência de modulação por meio de uma pá giratória estável.

Este sinal é fornecido ao canal de referência do amplificador sintonizado "Lock-in". A luz modulada é difratada por um monocromador de varredura modelo 77250 também da Oriel. A luz passa por uma fenda de 1,5 mm de espessura chegando até a amostra, dentro da câmara fotoacústica. O feixe de luz é colimado por meio de duas lentes de quartzo  $f_1=100$  mm e  $f_2=150$  mm, sendo direcionado para passar por uma janela também de quartzo para atingir a amostra na câmara.

Acoplado à célula fotoacústica há um microfone da Brüel e Kjaer, modelo BK 2669, que também está conectado ao pré-amplificador Lock-in. O microfone é instalado no bloco metálico que contém a célula fotoacústica



A variação do sinal fotoacústico com o comprimento de onda da luz é obtida por um sistema computacional. Nesse sistema o sinal gerado a partir do processo de interação luz – amostra é normalizado pelo sinal do carvão, uma vez que a lâmpada não emite igualmente em todos os comprimentos de onda. Através de um microcomputador, que controla toda a instrumentação, os espectros de interesse são obtidos automaticamente. A aquisição de dados para os espectros fotoacústicos foi feita na frequência de modulação de 20 Hz, com a potência incidente de 800 watts.

## Capítulo 5

### 5. Resultados

#### 5.1. Difusividade térmica

As medidas para a determinação da difusividade térmica foram realizadas utilizando-se o método do sinal traseiro descrito no capítulo 4. Cada unha foi posicionada por três vezes na célula e em cada procedimento as medidas foram realizadas. Com estas três repetições obteve-se o valor médio da difusividade térmica para cada unha. A figura 5.1. mostra um exemplo das curvas obtidas para uma das medidas, ilustrando o procedimento adotado. Para avaliar a variabilidade entre unhas de diferentes voluntários, este procedimento foi repetido para quatro unhas de diferentes voluntários. A tabela 5.1. mostra os resultados obtidos. O valor médio encontrado foi de  $(8 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Este é o valor da difusividade térmica que utilizaremos para todas as estimativas a serem realizadas nas medidas espectroscópicas que apresentaremos na próxima seção. É importante enfatizar que até onde sabemos esta é a primeira vez que a difusividade térmica da unha de humanos é determinada.

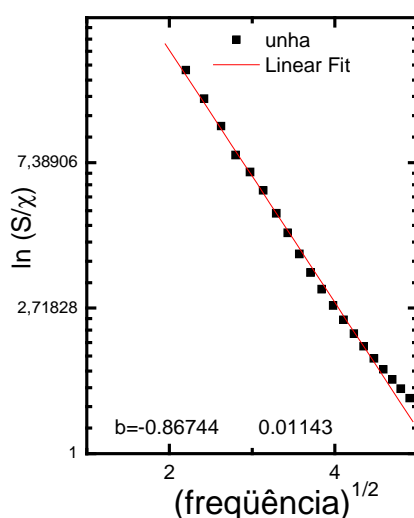


Figura 5.1.: Dependência do sinal fotoacústico traseiro com a frequência.

**Tabela 5.1.: Valores da difusividade térmica da unha humana medida pela fotoacústica.**

Amostra	Difusividade ( $\alpha$ ) $10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$	Difusividade Média
1	8.63	$(8 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$
2	5.54	
3	8.82	
4	7.61	

## **5. 2. Espectro de absorção dos medicamentos e da unha**

Antes de aplicarmos os medicamentos sobre a unha, fizemos os experimentos para determinar o espectro de absorção óptica de cada um deles em separado e ainda da unha sem a presença dos produtos a serem testados. Estas medidas foram realizadas com a espectroscopia fotoacústica convencional, utilizando-se a frequência de modulação da luz em 20 Hz. Uma pequena porção de cada produto foi aplicada no fundo da célula e o espectro determinado tanto na região do ultravioleta (UV) como no infravermelho próximo (IV). Os espectros estão mostrados na figura 5.2.A. Pode ser observado que a forma das bandas de absorção óptica são semelhantes, com exceção de variações nas intensidades quando os dois produtos são comparados. A banda de absorção em torno de 2.000 nm para o G0291AC é proveniente da molécula  $\text{OH}^-$  e indica que este produto tem maior hidratação. Salientamos que o G0291AC tem a forma líquida, enquanto o G0291BL é fornecido na forma pastosa. Para tentar escolher pelo menos uma banda de absorção que fosse atribuída somente ao princípio ativo que deveria penetrar na unha e pudesse ser utilizada como marcador, fizemos os espectros de três dos componentes utilizados na formulação dos produtos. Os resultados estão mostrados na figura 5.2.B. Os espectros na região do infravermelho não nos pareceram adequados para serem empregados na determinação da propagação dos dois agentes, principalmente porque as bandas de absorção nesta região em geral são influenciadas pelas absorções provenientes da presença de água, que podem ocorrer em 1200, 1400, 1900 e 2200 nm. Portanto, optamos por utilizar a região entre 250 e 500 nm uma vez que as bandas de absorção dos dois produtos nesta

região são intensas, indicando que possam ser detectadas quando os mesmos forem aplicados na unha. Pode ser notado na figura 5.2.B que a uréia não apresenta banda de absorção óptica na região entre 250 e 500 nm. Portanto a análise desta região espectral será feita em termos das bandas provenientes tanto do ciclopirox, que é o princípio ativo, quanto do ácido salicílico utilizados na formulação. É importante ressaltar que embora o fabricante tenha fornecido alguns componentes que foram utilizados nos dois medicamentos, não sabemos qual a real formulação de cada um deles.

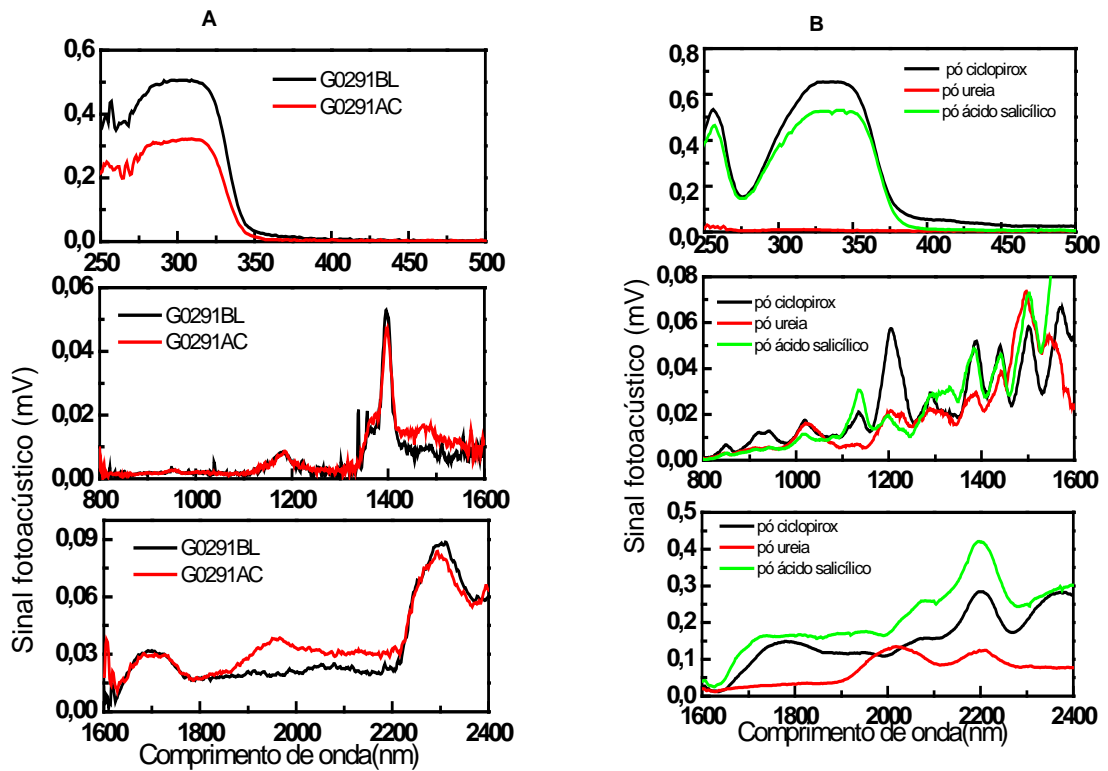


Figura 5.2.: Espectro de absorção óptica dos medicamentos: (220-500)nm, (800-1600) nm e (1600-2400)nm;  $f = 20$  Hz, A). G0291BL e G0291AC, B) pó ciclopirox, pó de uréia, pó do ácido salicílico.

Uma vez escolhida a região espectral UV-VIS, realizamos os espectros de absorção óptica da unha sem a presença dos medicamentos neste intervalo de comprimento de onda. Os espectros foram realizados em duas etapas, conforme ilustrado no desenho esquemático mostrado na figura 5.3. A primeira a amostra foi posicionada com a face interna da lâmina voltada para o fundo da célula de modo que a iluminação fosse na face externa. Ao contrário, na segunda etapa, a amostra foi posicionada de modo que a iluminação fosse realizada na face interna da unha. Os resultados estão mostrados na figura 5.4. na qual incluímos para comparação os espectros dos produtos mostrados na figura 5.2.A. A partir destes espectros pudemos estabelecer a estratégia para a realização das medidas com os medicamentos aplicados sobre a unha.

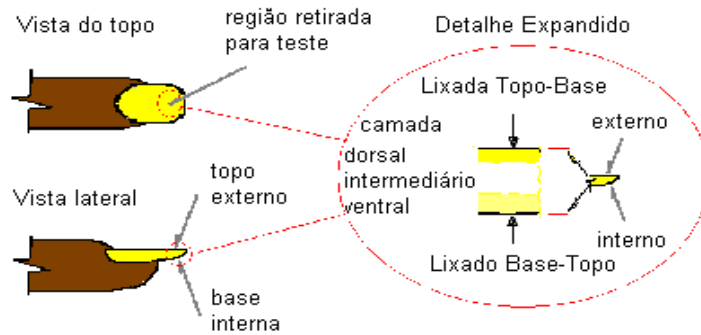


Figura 5.3.: Desenho esquemático das regiões testadas na unha.

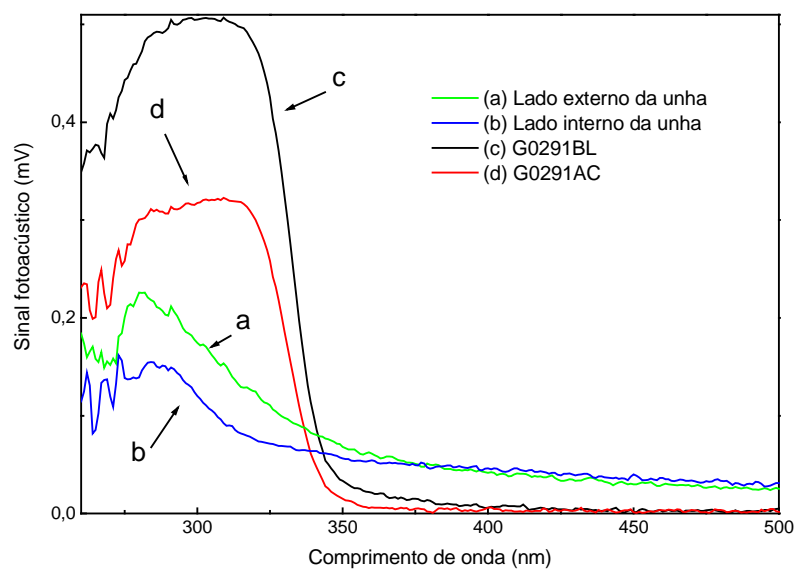


Figura 5.4.: Espectro de absorção fotoacústica para G0291AC, G0291BL, e para a unha com iluminação nos lados interno e externo respectivamente.

### **5.3. Espectros de absorção após a aplicação dos medicamentos**

#### **5.3.1. Medidas realizadas 30 minutos após a aplicação dos medicamentos e com a iluminação na superfície externa da unha**

Neste primeiro teste aplicou-se o agente G0291BL no lado externo de uma unha com espessura de 300  $\mu\text{m}$ . Após 30 minutos os resíduos da superfície da unha foram removidos com papel limpo e seco. Em seguida a amostra foi posicionada na célula para as medidas que foram realizadas em duas condições diferentes: na primeira o lado externo a ser iluminado ficou voltado para cima, de modo que a luz atingisse o mesmo lado em que o produto foi aplicado; em seguida a amostra foi posicionada de modo que a iluminação fosse no lado interno, oposto ao da aplicação do produto. Os resultados estão mostrados nas figuras 5.5. e 5.6. Para tentar identificar as bandas de absorção geradas pelos produtos, foram realizados ajustes teóricos com funções gaussianas a fim de se reproduzir o espectro total. Na figura 5.5. o processo de desconvolução mostra a presença de duas bandas bem definidas em torno de 269 e 306 nm, e uma terceira banda que é muito larga que está centrada em torno de 400 nm. A banda em 306 nm é intensa e pode ser atribuída ao G0291BL, como pode ser visto a partir da figura 5.4. A banda em torno de 270 nm é gerada pela contribuição do produto e da unha, enquanto aquela em torno de 400 nm é proveniente da unha. Portanto, utilizaremos apenas a banda de 310 nm para identificar as drogas na unha. Ao contrário do observado quando a iluminação foi realizada na face externa, a figura 5.6. mostra que com a iluminação no lado oposto ao da aplicação do produto, não foi possível detectar a contribuição do G0291BL no espectro.

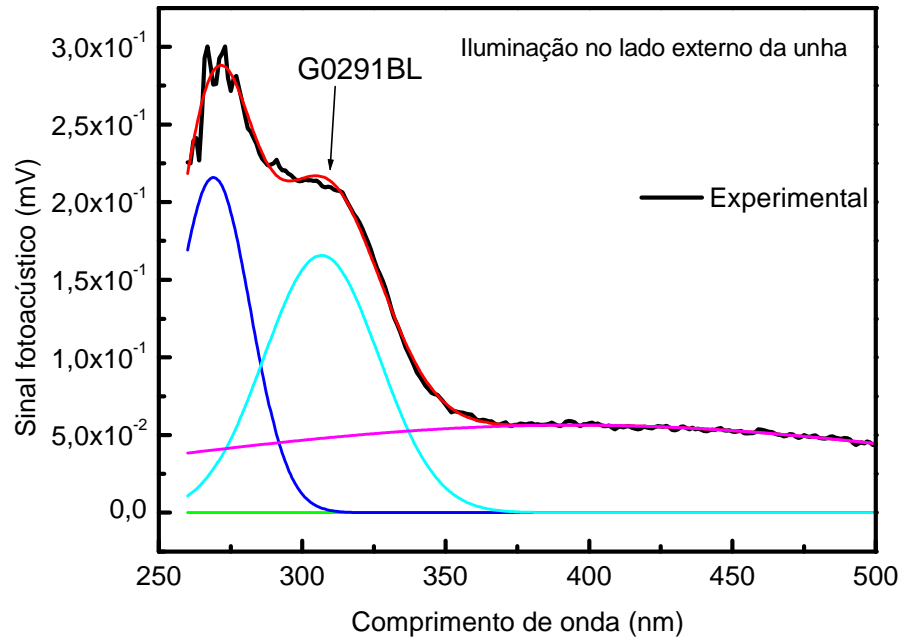


Figura 5.5.: Espectro fotoacústico 30 minutos após a aplicação do G0291BL sobre a unha e com a iluminação no lado externo. As bandas ajustadas estão centradas em torno de 269, 306 e 394 nm, com largura de 30, 47 and 360 nm, respectivamente.  $f = 20$  Hz.

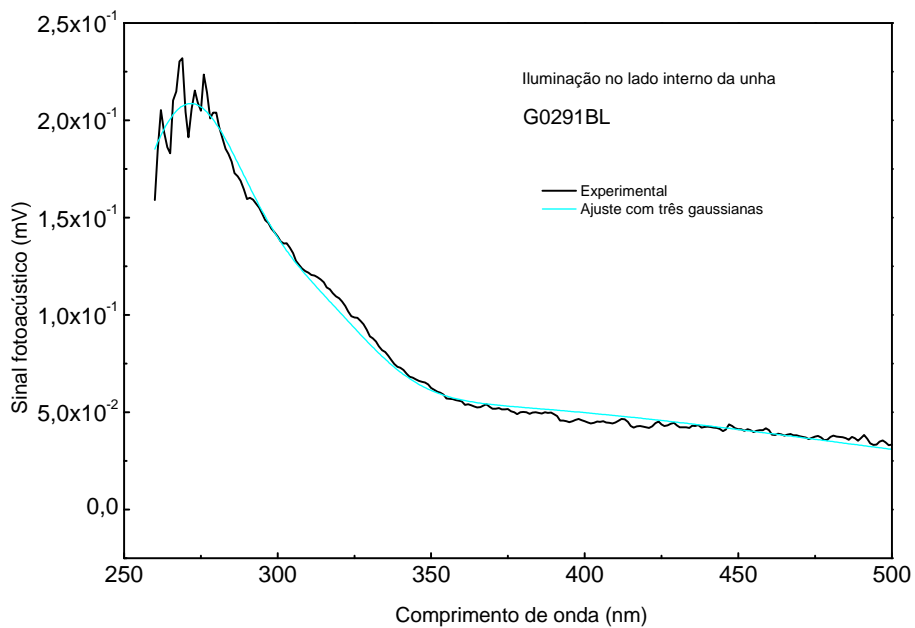


Figura 5.6.: Espectro fotoacústico 30 minutos após a aplicação do G0291BL sobre a unha e com a iluminação no lado interno. Devido à ausência da banda em torno de 310 nm, o ajuste não foi realizado.  $f = 20$  Hz

Para avaliar o procedimento adotado em termos de propagação do medicamento é necessário considerar que as medidas foram realizadas com uma frequência de modulação da luz de 20 Hz. Com esta frequência e utilizando o valor da difusividade térmica determinado anteriormente como sendo  $8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 / \text{s}$ , a equação para o comprimento de difusão térmica,  $\mu$ , fornece que o sinal fotoacústico é gerado, nos dois espectros, ao longo de uma profundidade de aproximadamente 35  $\mu\text{m}$  a partir da superfície que está sendo iluminada. Portanto, podemos concluir que na iluminação externa, embora o produto tivesse sido removido da superfície, a presença da banda de absorção do G0291BL indica que há uma fração do produto que pode ter penetrado pelo menos até 35  $\mu\text{m}$  na unha. No entanto, quando a iluminação foi no lado oposto, lado interno, ao se monitorar 35  $\mu\text{m}$  (deste lado interno) não foi possível detectar a presença do medicamento, mostrando que este intervalo de tempo de 30 minutos esperado para a realização do espectro não foi suficiente para o G0291BL se propagar até o lado oposto da unha, que como dissemos anteriormente tinha neste caso 300  $\mu\text{m}$  de espessura total.

Após adotar o procedimento anterior via iluminação externa, embora tivesse penetrado na unha, não foi possível determinar o perfil de distribuição do produto ao longo da unha. Decidimos então realizar novas medidas para tentar contornar este problema. O procedimento adotado foi de se fazer às medidas variando-se a espessura da unha, como segue: inicialmente, como no caso anterior, após 30 minutos de aplicação do produto, a superfície da amostra foi limpa e o espectro realizado com a iluminação atingindo o lado externo. Em seguida, utilizando-se uma lixa, cerca de 30  $\mu\text{m}$  da superfície da unha (que corresponde à espessura de prova da medida) foi removida e então o espectro foi realizado novamente. Este procedimento foi repetido até que a espessura final da amostra ficasse reduzida até um valor em torno de 30  $\mu\text{m}$ . Com este procedimento, obtivemos uma seqüência de espectros ao longo da espessura da unha. As figuras 5.7. e 5.8. mostram os espectros para a primeira etapa, em que foi removido 30  $\mu\text{m}$ , e após à remoção da sétima camada, equivalente a remoção de 375  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Este procedimento levava em torno de quatro horas para ser concluído. A figura 5.9. mostra os ajustes (espectro total) com funções gaussianas de todas as curvas, enquanto na figura 5.10. a evolução da intensidade da banda centrada em torno de 310 nm atribuída ao G0291BL é mostrada. As áreas das curvas da figura 5.10.



estão mostradas na figura 5.11. O decréscimo exponencial revela que ocorre uma diminuição da quantidade do produto à medida que a região de teste se aproxima do lado interno da unha.

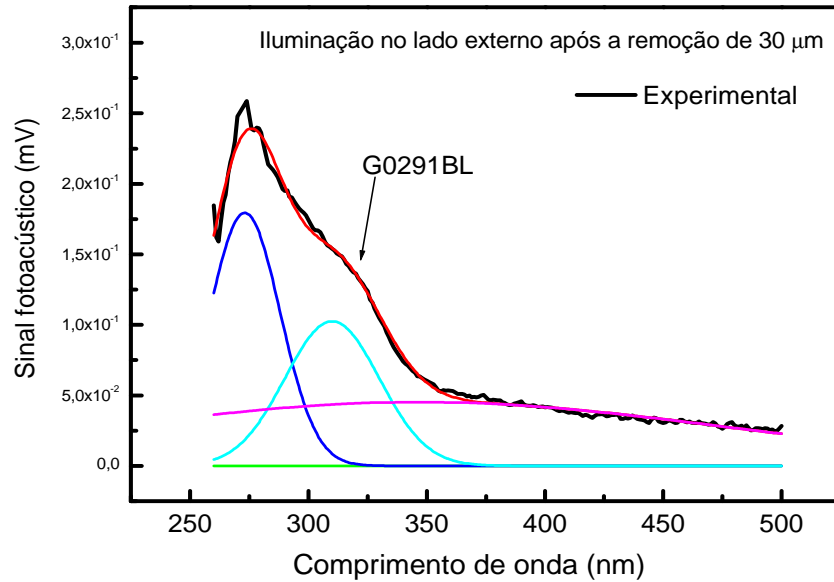


Figure 5.7.: Espectro fotoacústico do G0291BL com a iluminação na face externa e após a remoção de cerca de 30 µm da superfície. A banda centrada em torno de 310 nm pode ser atribuída ao G0291BL.

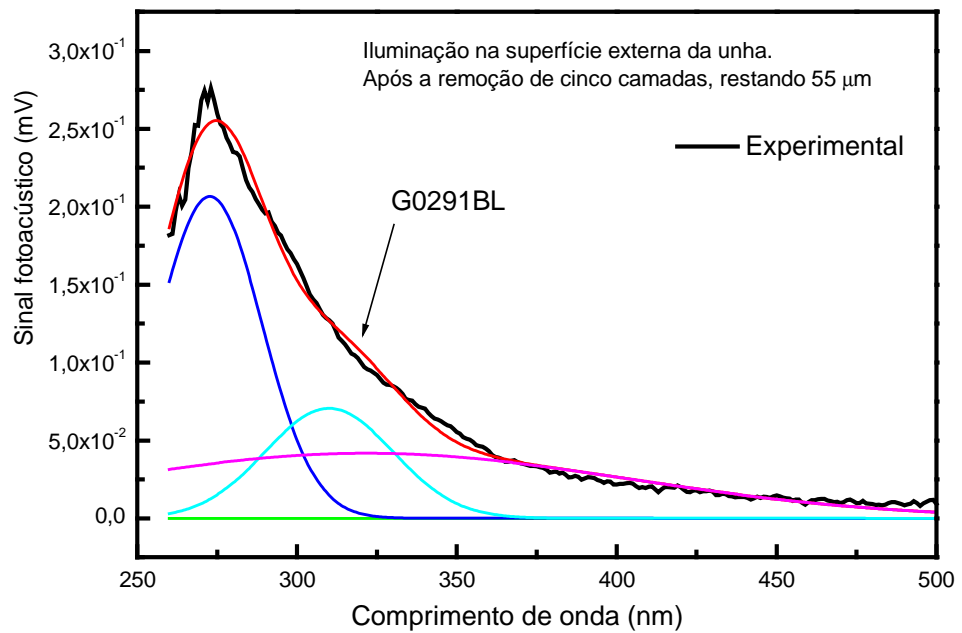


Figure 5.8.: Espectro fotoacústico do G0291BL com a iluminação na face externa e após a remoção de 375 µm da superfície. A banda centrada em torno de 310 nm pode ser atribuída ao G0291BL.

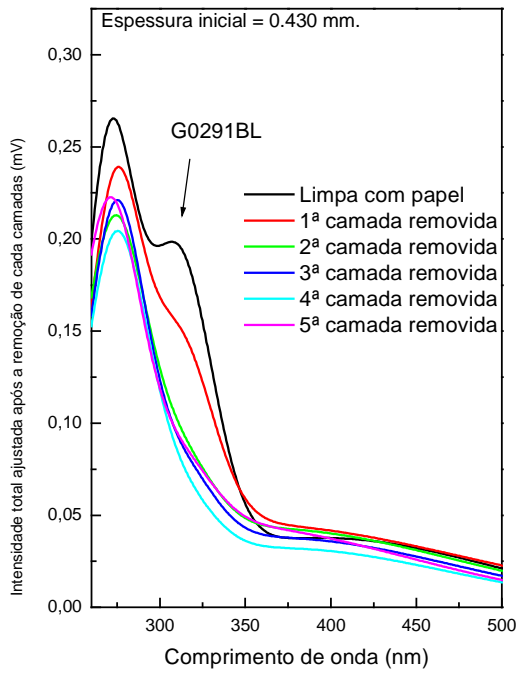


Figura 5.9.: Espectro total ajustado à medida que as camadas da amostra foram sendo removidas.

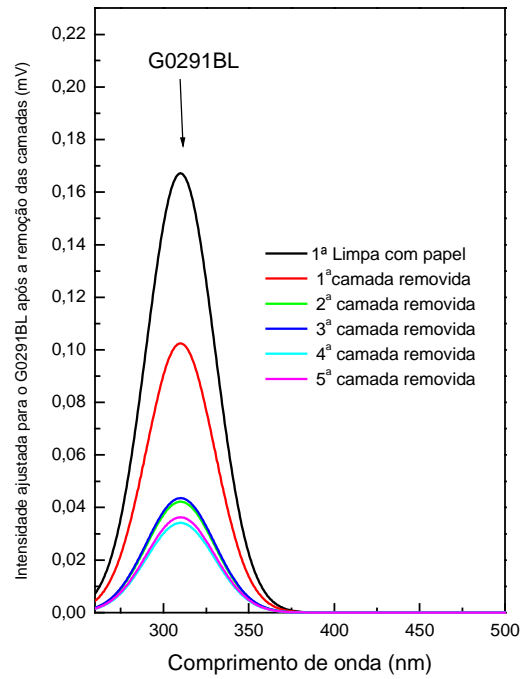


Figura 5.10.: Evolução da banda de absorção do G0291BL em 310 nm para as diferentes profundidades na amostra.

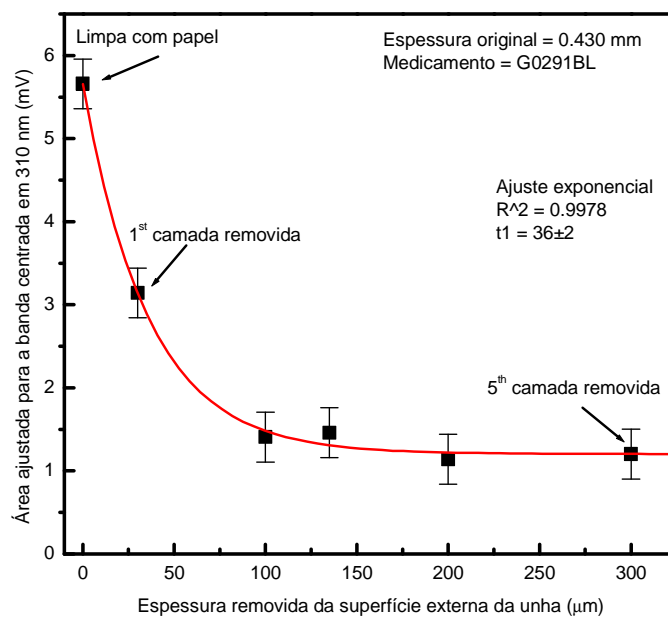


Figura 5.11.:Evolução dos valores das áreas da banda do G0291BL em 310 nm para as diferentes profundidades na amostra.

Este procedimento foi repetido para o G0291AC e o resultado da evolução das áreas em função da espessura está mostrado na figura 5.12.

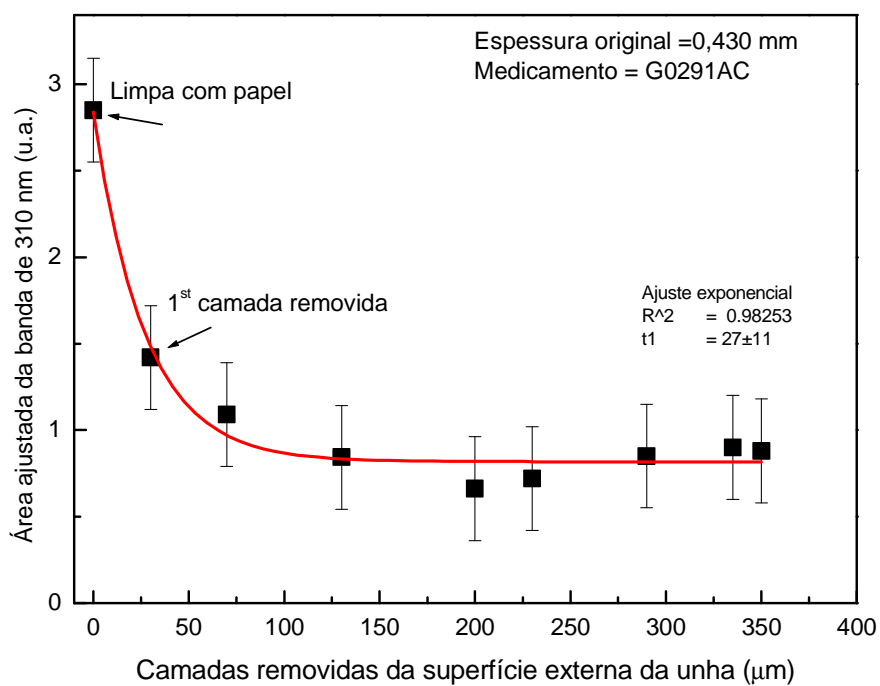


Figura 5.12.:Evolução dos valores das áreas da banda do G0291AC em 310 nm para as diferentes profundidades na amostra.

Os dois resultados mostram que o parâmetro de decaimento  $\tau$ , que aqui significa a espessura para a qual a intensidade decai para  $1/e$  do seu valor na superfície, foi de  $36 \mu\text{m}$  para o G0291BL e de  $27 \mu\text{m}$  para o G0291AC. Estes resultados mostram que após 30 minutos a propagação dos dois produtos foi pequena, atingindo em torno de 10 % da espessura total da unha.

Para verificar se a diminuição da intensidade das bandas pode ser atribuída à diminuição da concentração dos medicamentos nos pontos mais internos da unha, repetimos o mesmo procedimento na unha sem a aplicação do produto, cujo resultado é mostrado na figura 5.13. O resultado, neste caso para a área total das bandas, demonstra que as intensidades permaneceram constantes, conforme o esperado.

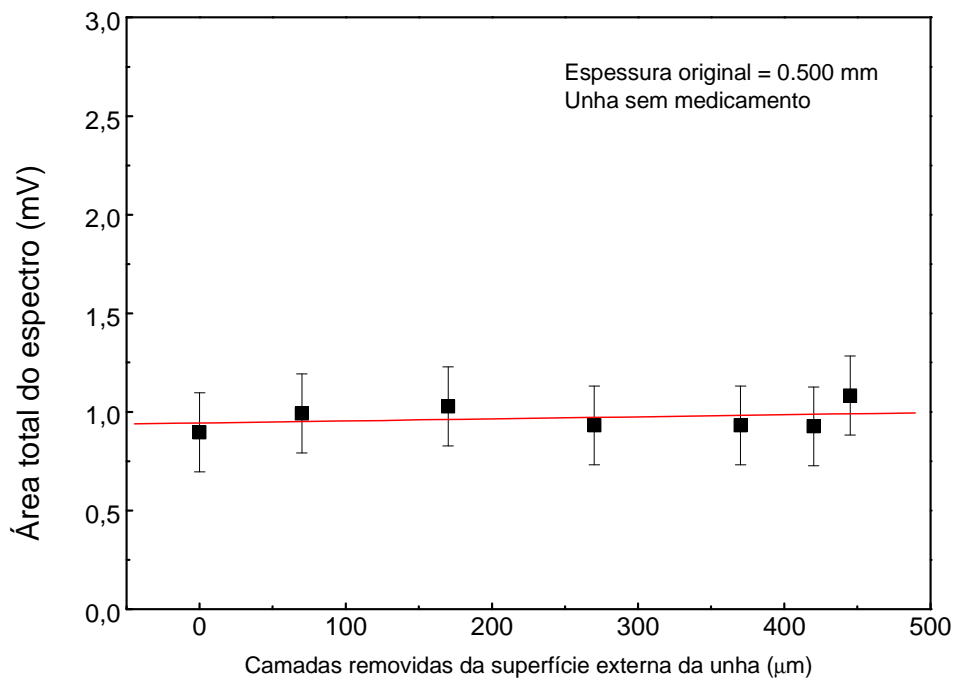


Figura 5.13.: Evolução dos valores das áreas do espectro total da unha para as diferentes profundidades na amostra.

### 5.3.2. Medidas realizadas 24 horas após a aplicação dos medicamentos e com a iluminação na superfície externa da unha

Nesta seção repetimos o mesmo procedimento anterior de se realizar as medidas em função da espessura da unha, porém o processo de lixamento foi iniciado 24 horas após a aplicação do produto. Os resultados estão mostrados na figura 5.14. Como pode ser notado, o parâmetro de decaimento embora tivesse aumentado para a espessura em torno de 50  $\mu\text{m}$ , revela que a propagação ainda está bem aquém da espessura total da amostra.

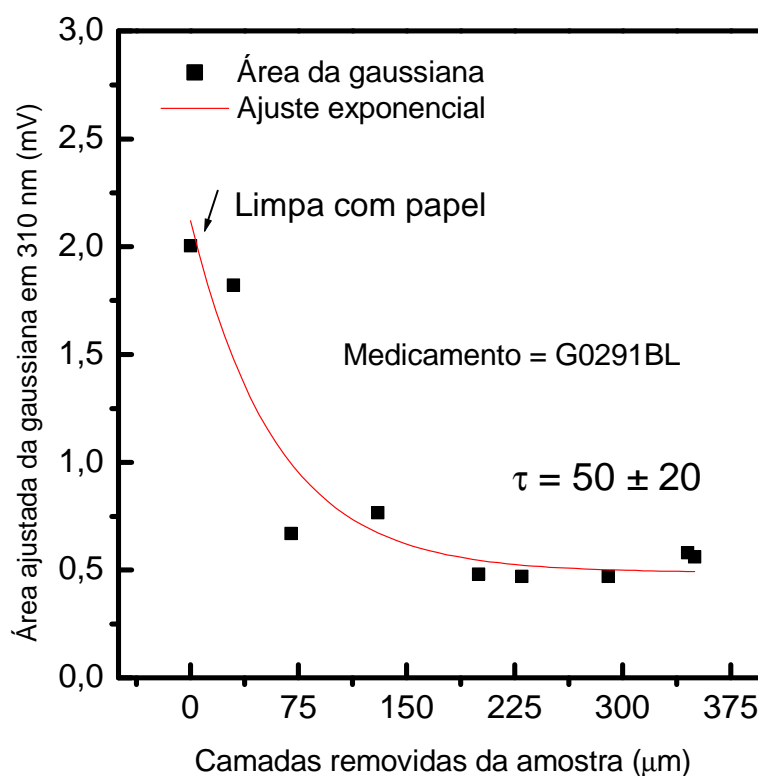


Figura 5.14.: Evolução dos valores das áreas da banda do G0291BL em 310 nm para as diferentes profundidades na unha que foi submetida a 24 horas de exposição ao medicamento.

Depois de realizados os testes anteriores duas observações importantes levaram à mudança do procedimento até então adotado:

1. A primeira foi que deveríamos avaliar as amostras 48 horas após a aplicação dos produtos, uma vez que 24 horas não pareceu ser suficiente para se obter uma fração significativa de propagação ao longo da espessura da unha. Esta

escolha vai também ao encontro do que é sugerido pelo fabricante de se manter os agentes antifúngicos sobre a unha por aproximadamente 48 horas. Adotamos, portanto, 48 horas como o tempo padrão para as medidas em todos os 15 pares de unhas que foram submetidas aos dois medicamentos.

2. A segunda observação a partir dos resultados anteriores foi de que como se trata de um estudo que demanda um intervalo de tempo longo para ser concluído, antes de se realizar as medidas em 15 pares de unhas seria importante considerar que embora os dados apresentados anteriormente demonstrassem a viabilidade da fotoacústica para se realizar uma avaliação satisfatória do perfil de propagação dos medicamentos, seria necessário que o parâmetro de decaimento,  $\tau$ , a ser ajustado para cada amostra pudesse ser empregado para se diferenciar a taxa de propagação dos dois medicamentos. A estratégia de se lixar a unha a partir da superfície em que o produto foi aplicado tem a desvantagem de ser difícil estabelecer a espessura em que não há mais produto contribuindo para o sinal, ou seja, o parâmetro de decaimento fica muito sensível em termos de comparação entre as amostras porque varia muito com a remoção da primeira camada de unha, o que poderia dificultar o tratamento estatístico dos dados. Nosso próximo passo foi mudar o procedimento, fazendo o lixamento a partir da superfície interna da unha, que é a superfície oposta à face em que o produto foi aplicado. Isto implica que à medida que a espessura da unha seja variada, a intensidade do espectro aumenta porque o processo de lixamento é agora em direção à superfície onde deve haver maior concentração dos medicamentos.

Os resultados obtidos com este novo procedimento de se iluminar o lado interno da amostra estão mostrados na próxima seção.

#### **5.4. Espectros de absorção óptica 48 horas após a aplicação dos medicamentos e com a iluminação na superfície interna da unha**

Nesta série de experimentos, 48 horas após a aplicação dos medicamentos iniciamos as medidas para a determinação dos espectros de absorção para as diferentes espessuras da unha, em que cada espectro foi realizado após a remoção

de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  da superfície interna. Neste procedimento, à medida que a região em que o produto está presente com maior concentração se aproxima, a banda em torno de 310 nm gradativamente começa a ser observada no espectro total com sua intensidade ficando cada vez maior. É importante mencionar que este procedimento diminui a possibilidade de contaminação durante o lixamento, uma vez que o mesmo é realizado na direção de maior concentração.

#### **5.4.1. Resultados para o medicamento G0291AC e para o G0291BL. Iluminação na superfície interna da unha**

A figura 5.15. mostra o espectro da unha tratada com G0291AC antes do lixamento. A figura 5.16. mostra o espectro obtido após a remoção da primeira camada do lado interno, enquanto a figura 5.17. mostra o resultado para a amostra após a remoção da sétima camada. Nota-se que embora a banda de absorção óptica em 310 nm atribuída ao G0291AC não seja tão evidente se comparada ao observado quando a iluminação externa foi adotada, figura 5.5. ela pode ser claramente observada na figura 5.18. que foi a última etapa do processo de lixamento. Esta intensidade menor para a banda em 310 nm já era esperada, uma vez que com a iluminação no lado oposto ao da aplicação do produto à região próxima à superfície iluminada e que gera o sinal fotoacústico tem menor concentração dos componentes absorvedores.

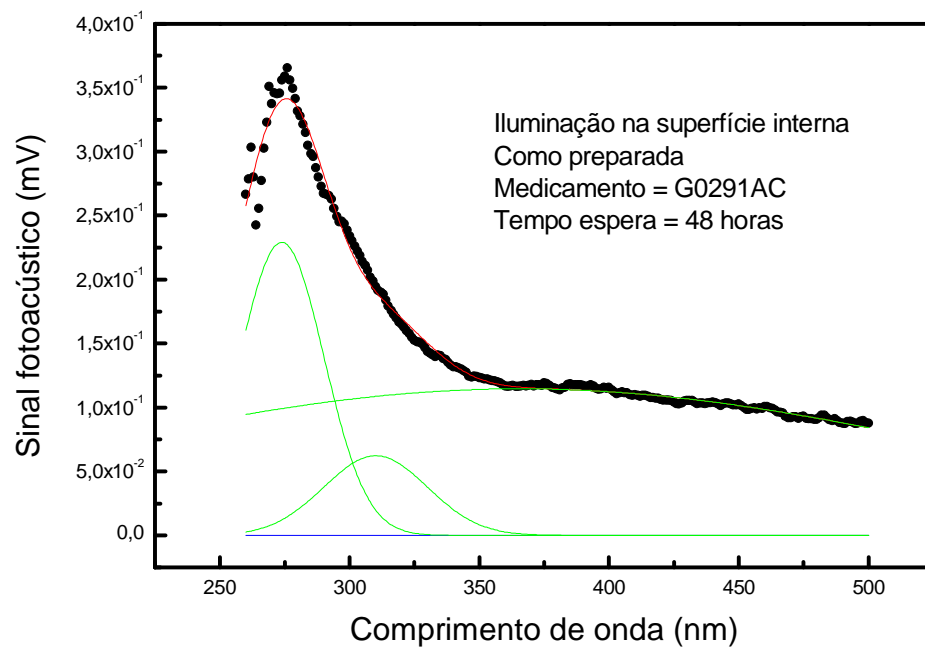


Figura 5.15.: Espectro fotoacústico da unha 48 horas após a aplicação do G0291AC. Iluminação interna.  $f = 20$  Hz.

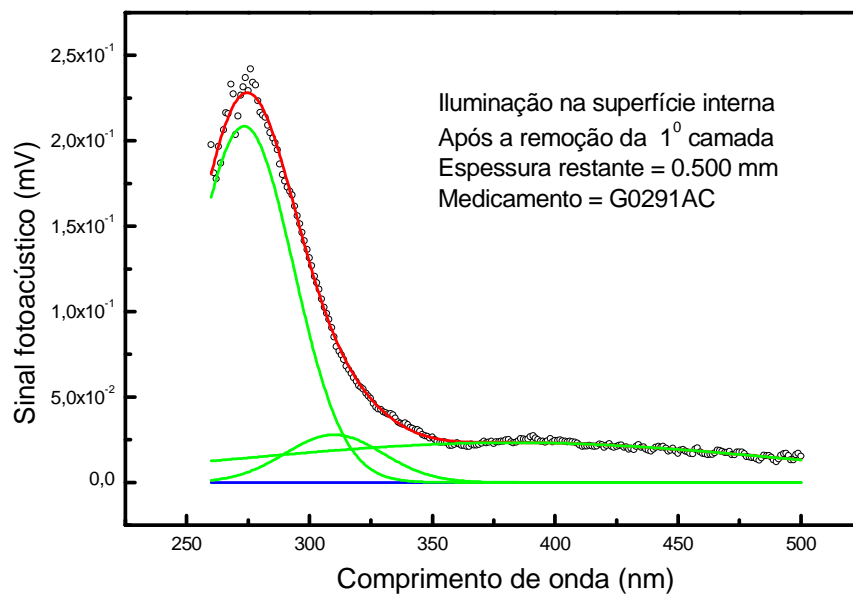


Figura 5.16.: Espectro fotoacústico da unha obtido após a remoção da primeira camada de  $30 \mu\text{m}$ . iluminação interna.  $f = 20$  Hz. Medicamento = G0291AC.



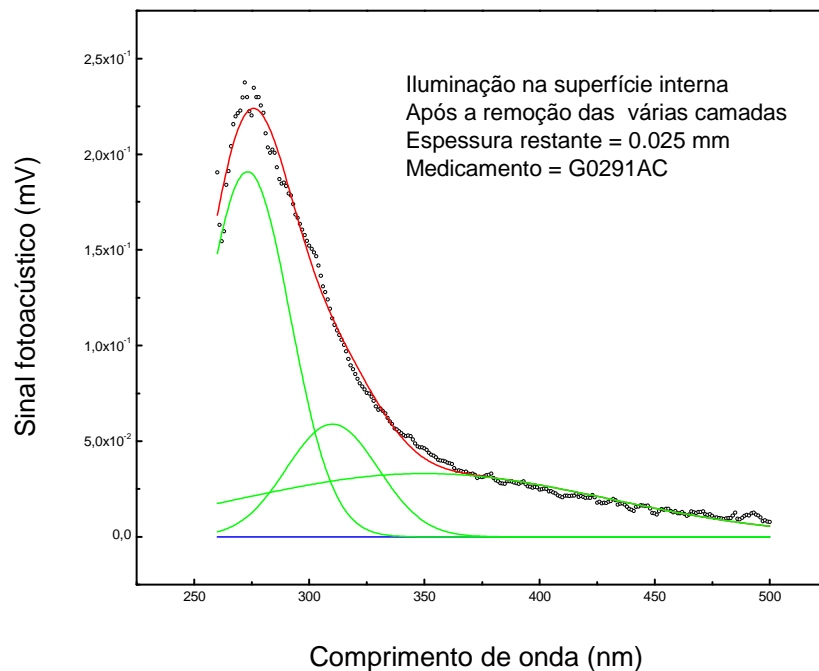


Figura 5.17.: Espectro fotoacústico da unha obtido após a remoção da sétima camada. Iluminação interna.  $f = 20$  Hz. As bandas estão centradas em 273, 310 e 349 nm com largura de 43, 47 e 187 nm, respectivamente. Medicamento = G0291AC.

É importante ressaltar que devido à baixa intensidade da banda do G0291AC se comparada às da unha, para o ajuste dos espectros com as três funções gaussianas foi necessário estabelecer restrições para as variações dos parâmetros, sob pena de não se obter um ajuste satisfatório. Como já observamos ser evidente que a banda dos produtos que têm menor superposição com as da unha é aquela em torno de 310 nm, a mesma foi então ajustada com seu centro fixo neste comprimento de onda. Além disso, havíamos notado quando fizemos os espectros com a iluminação realizada no lado externo da unha que a largura da banda em 310 nm era em torno de 60 nm. Como na iluminação interna a concentração do medicamento é bem menor, nos pareceu razoável que a largura de 60 nm poderia ser um limite superior para o ajuste. Com estas condições, foi possível realizar os ajustes adequadamente, conforme ilustrado nas figuras de 5.16. a 5.17. Para melhor evidenciar a presença em torno de 310 nm, subtraímos o valor ajustado para o produto do espectro total, resultando na curva vermelha da figura 5.18. Ao se

comparar com espectro experimental, curva preta, nota-se que a presença do produto é evidente.

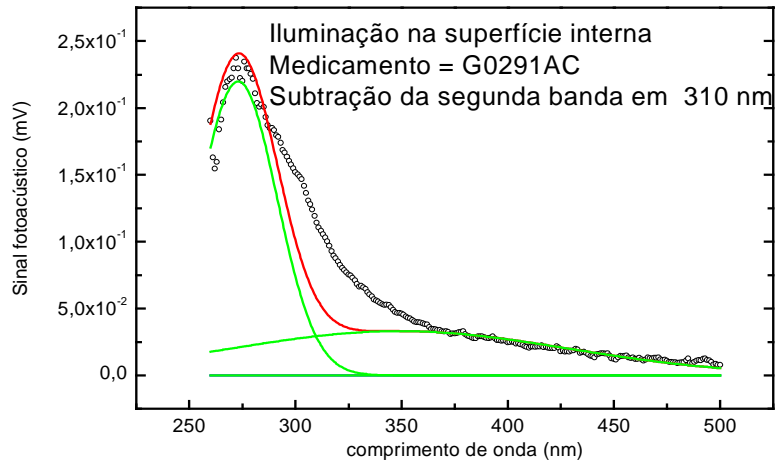


Figura 5.18.: Espectro fotoacústico da unha obtido após a remoção da sétima camada. Iluminação interna.  $f = 20$  Hz. As bandas estão centradas em 273, 0 e 349 nm com largura de 43, 0 e 187 nm, respectivamente. Medicamento = G0291AC.

Uma vez obtidos os ajustes, simulamos a evolução da intensidade da banda de absorção em 310 nm em função da profundidade, ou seja, as bandas para a amostra à medida que as camadas internas foram sendo removidas. Estas simulações estão mostradas na figura 5.19. Nota-se um aumento significativo da intensidade da referida banda conforme a realização da medida do espectro se aproxima da superfície da amostra onde o medicamento foi aplicado. Este resultado comprova que ao se aproximar da região na qual o G0291AC foi aplicado, a concentração do mesmo aumenta significativamente. Para quantificar esta variação de intensidade em função da espessura, a figura 5.20. mostra o comportamento da área ajustada em função da espessura, no sentido da face interna para a externa. Observa-se que a variação é do tipo exponencial crescente, e que há uma evidente contribuição do produto em até pelo menos 300  $\mu\text{m}$  de profundidade da unha. O ajuste com uma exponencial de primeira ordem crescente forneceu para o parâmetro  $\tau$  o valor de 72  $\mu\text{m}$ .

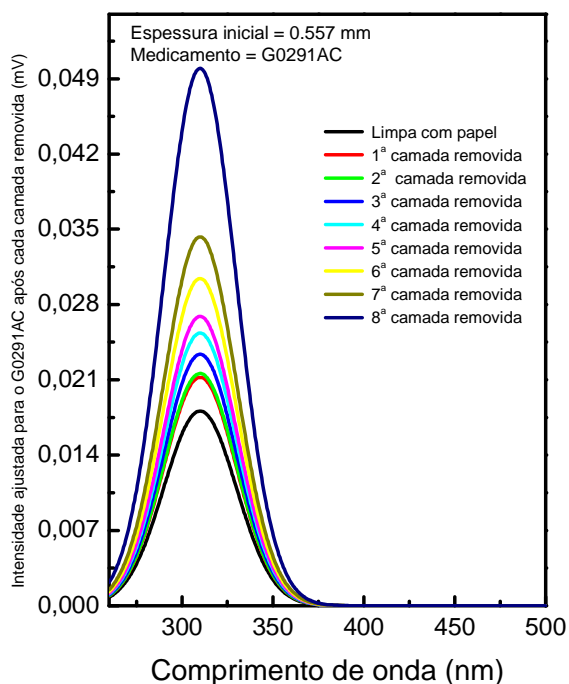


Figura 5.19.: Evolução da banda de absorção do G0291AC em 310 nm para as diferentes profundidades na amostra. Unha submetida a 48 horas de exposição ao medicamento.

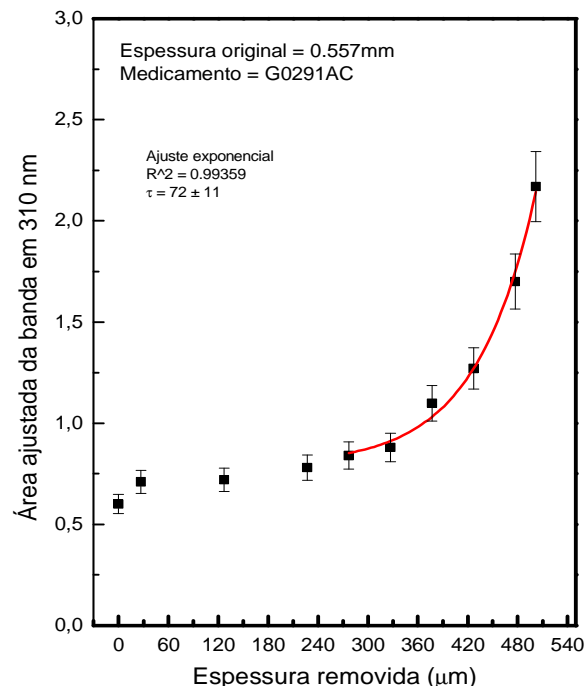


Figura 5.20.: Evolução dos valores das áreas da banda do G0291AC em 310 nm para as diferentes profundidades. Unha submetida a 48 horas de exposição ao medicamento.

O mesmo procedimento utilizado para o G0291AC foi adotado para o G0291BL. As figuras 5.20. e 5.21. mostram os resultados para a evolução da intensidade das bandas e para as áreas à medida que as camadas eram removidas, respectivamente. Neste caso o valor do parâmetro  $\tau$  foi 87  $\mu\text{m}$ .

Estes resultados para os dois produtos demonstram que o procedimento de se iluminar a amostra na face interna pode ser empregado para a determinação da distribuição dos medicamentos através da unha. Trata-se de um resultado relevante porque até onde sabemos esta é a primeira vez que a Fotoacústica é empregada para estudos de perfil de profundidade de substâncias na unha humana. Vale lembrar que se trata de um método não invasivo, diferente do que ocorre com a maioria dos procedimentos atualmente utilizados para este fim, que em geral são invasivos ou dependem da resposta do paciente ao tratamento da doença induzida pelo fungo, que tem alto grau de subjetividade porque deve supor que a droga é eficiente para se concluir que a propagação deva ter ocorrido.

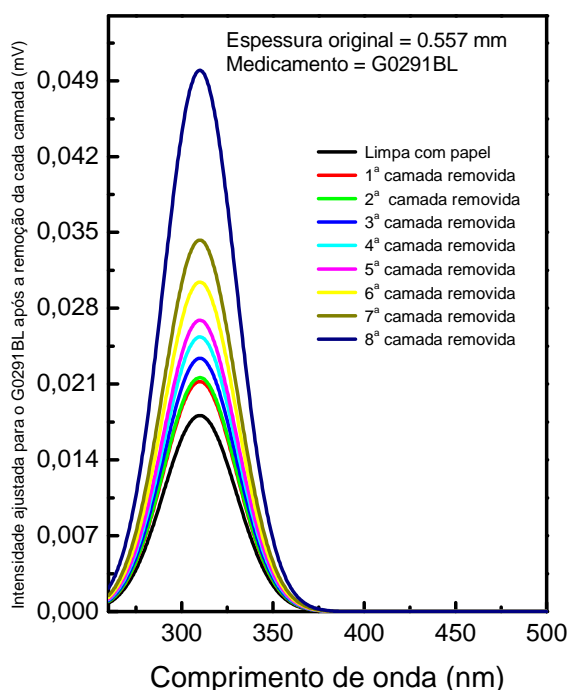


Figura 5.20.: Evolução da banda de absorção do G0291BL em 310 nm para as diferentes profundidades na amostra. Unha submetida a 48 horas de exposição ao medicamento.

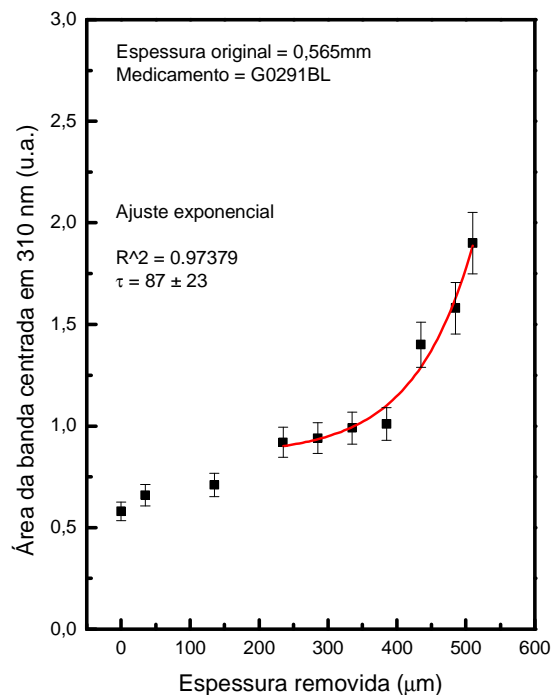


Figura 5.21.: Evolução dos valores das áreas da banda do G0291BL em 310 nm para as diferentes profundidades. Unha submetida a 48 horas de exposição ao medicamento.

Nosso próximo desafio no trabalho foi projetar um conjunto de experimentos que fornecesse dados suficientes para se verificar se os medicamentos estudados têm diferentes taxas de propagação na unha. Foram selecionadas 15 unhas de diferentes voluntários e cada uma foi dividida em duas partes aproximadamente iguais formando um par, conforme descrito no capítulo 4. De cada par uma das amostras era tratada com o G0291BL e a outra com o G0291AC. Para garantir as mesmas condições experimentais, as medidas foram feitas nas duas amostras simultaneamente. Foram necessários aproximadamente três dias para se concluir os experimentos em cada par de unhas selecionadas. A tabela 5.1. mostra a idade dos voluntários, os números das amostras de cada par, os valores do parâmetro  $\tau$  para cada amostra, assim como os valores médios dos mesmos. A figura 5.22. mostra o comportamento dos valores do parâmetro  $\tau$  para os dois produtos, assim como os respectivos valores médios com as suas barras de erro.

Com estes resultados foi possível utilizar o método para análise estatística “One way Anova” contido no pacote “Microcal Origin”. O referido método foi empregado para o tratamento estatístico a fim de se verificar se os dois conjuntos de

dados para cada medicamento estudado são estatisticamente diferentes. Este pacote é indicado para conjuntos de dados experimentais que apresentam grande variabilidade, numa comparação de conjunto para conjunto do tipo dois a dois. O resultado do teste estatístico forneceu um valor para o parâmetro  $p = 0,0036$ , que para o critério de uma variação de 5% ( $p < 0,005$ ) significa que os dois valores médios são estatisticamente diferentes. Em outras palavras, estes resultados mostram que os dois produtos têm taxas de propagação que, dentro de uma margem de erro de 5%, são diferentes.

Uma vez determinado que os dois produtos têm taxas de propagação diferentes, para verificar qual deles têm maior taxa de propagação, é necessário considerar que o ajuste com a função exponencial crescente significa que quanto menor for o parâmetro  $\tau$  maior será a concentração das substâncias absorvedoras do medicamento na região próxima à superfície onde o produto foi aplicado. Assim, quanto maior for o parâmetro  $\tau$ , maior será a taxa de propagação. Portanto, os resultados do teste estatístico e os valores médios do parâmetro  $\tau$  indicam que o G0291BL tem uma maior taxa de propagação ao longo da unha. Uma possível explicação para esta maior eficiência no processo de propagação para o G0291BL pode estar correlacionada ao tipo de veículo utilizado na formulação, que conforme mencionamos não nos foi informado.

**Tabela 5.1.: Idade dos voluntários e os valores dos parâmetros de crescimento exponencial,  $\tau$ , para os 15 pares de unhas.**

Idade (anos)	Amostra (nº)	G0291AC( $\tau$ )	G0291BL( $\tau$ )
15	37\38	72	87
16	43\44	57	48
18	31\32	50	26
18	47\48	128	153
18	49\50	33	46
22	9\8	34	175
24	23\24	80	180
27	45\46	57	238
30	41\42	53	41
30	29\30	43	134
34	15\14	94	110
35	33\34	52	61
36	17\7	52	158
45	39\40	58	127
51	35\36	36	138
<b>Média = 27,9</b>		<b>Média = 60 ± 25</b>	<b>Média = 115 ± 62</b>

$p = 0,0036$

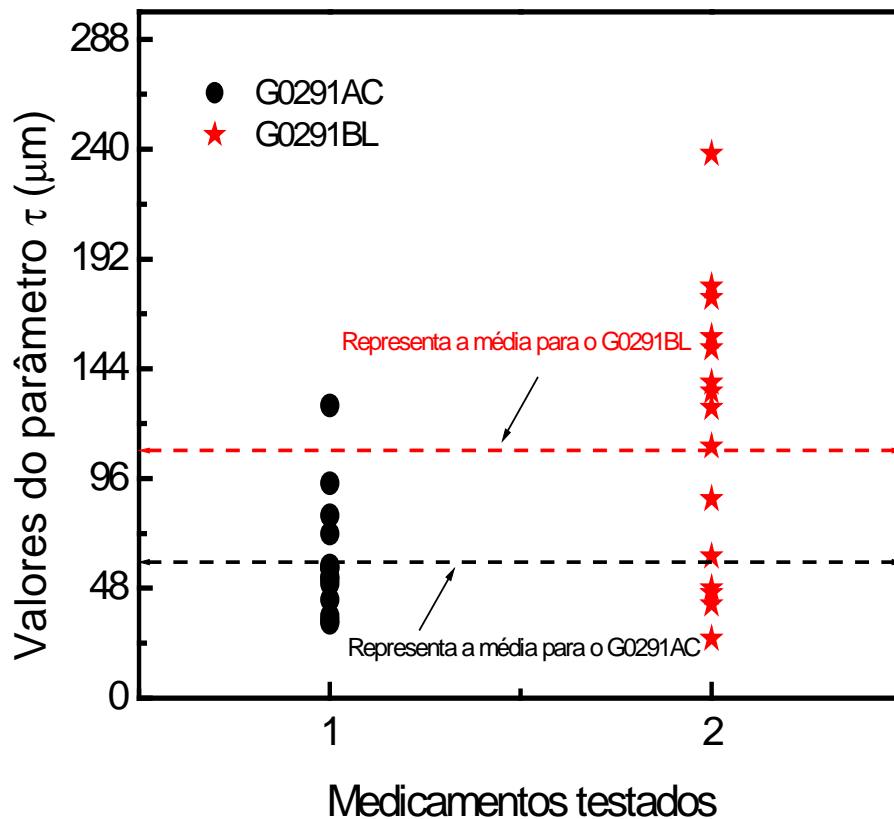


Figura 5.23.: Valores médios do parâmetro  $\tau$ , para os dois medicamentos aplicados nos 15 pares de unhas. Quanto maior o valor do parâmetro  $\tau$ , maior é a taxa de propagação do produto.

Uma outra observação que pode ser enfatizada é a variabilidade nos valores do parâmetro  $\tau$  mostrados na tabela 5.1. Para eliminar a possibilidade destas flutuações serem provenientes de erros sistemáticos durante as medidas, fizemos ainda um último teste para a avaliação da reprodutibilidade dos dados. Neste teste cinco novos pares de unha foram obtidos de um mesmo voluntário e as medidas repetidas de acordo com o procedimento adotado para os 15 pares anteriores de diferentes voluntários. Os resultados finais estão mostrados na tabela 5.2.

**Tabela 5.2.: Valores dos parâmetros de crescimento exponencial,  $\tau$ , para os cinco pares de unha de um mesmo voluntário.**

<b>Amostra (nº)</b>	<b>G0291AC(<math>\tau</math>1)</b>	<b>G0291BL(<math>\tau</math>1)</b>
49/50	33	46
51/52	51	45
53/54	42	97
55/56	23	79
57/58	26	88
<b>Média</b>	<b>35 ± 11</b>	<b>71 ± 24</b>

P = 0,017

Observa-se que embora tenhamos feito apenas cinco medidas, os resultados são bastante similares. Os valores médios são diferentes para os dois produtos e são suficientes para serem estatisticamente diferentes usando o nível  $p < 0,05\%$  um do outro em termos de propagação, repetindo que o medicamento G0291BL tem maior taxa de propagação se comparado ao G0291AC.

Portanto, nossos resultados mostram que a fotoacústica permite avaliar o perfil de propagação e a distribuição de substâncias aplicadas na unha. O procedimento de se analisar as áreas das bandas de absorção óptica pode ser empregado para comparações quantitativas da propagação entre diferentes medicamentos.

## Capítulo 6

### 6. Conclusão e perspectivas

Em conclusão, neste trabalho a Espectroscopia Fotoacústica foi utilizada para avaliar a taxa de propagação de dois agentes anti-fúngicos fornecidos pelo Laboratório Stiefel Ltda que são candidatos para serem empregados no tratamento da onicomicose da unha humana. Os experimentos foram realizados “in vitro” em amostras de unha humana saudável doadas por voluntários. As medidas foram realizadas em duas etapas: na primeira foi determinada a difusividade térmica de uma série de quatro unhas utilizando-se a técnica fotoacústica denominada de célula aberta, obtendo-se como resultado o valor de  $(8 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ ; na segunda parte do trabalho, foram realizados os espectros de absorção óptica das amostras com e sem a aplicação dos produtos. Foi observado que o melhor procedimento para se obter o perfil de propagação dos medicamentos foi quando os espectros de absorção óptica foram determinados iluminando-se a amostra no lado oposto ao da aplicação dos medicamentos. Os resultados mostraram um perfil de distribuição com dependência exponencial crescente se adotado o sentido a partir da face interna para a externa da unha, que foi onde os agentes foram aplicados. Observou-se ainda que a distribuição das substâncias atingiram aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  de profundidade ao longo das unhas, demonstrando a versatilidade da fotoacústica para se obter informações sobre o perfil de distribuição de substâncias na unha. Os ajustes com funções exponenciais crescentes mostraram que o medicamento codificado como G0291BL apresentou estatisticamente ( $p=0,0036$ ) maior taxa de propagação se comparado ao produto G0291AC. Finalmente, os resultados deste trabalho mostraram que a Espectroscopia Fotoacústica foi eficiente para se avaliar a taxa de propagação e a distribuição de dois agentes anti-fúngicos na unha humana. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que a fotoacústica é utilizada para a avaliação da propagação de substâncias na unha humana, indicando que o uso desta técnica não destrutiva poderá ser ampliado para a avaliação de outros medicamentos.



## Referências bibliográficas

- [1] Nicolopoulos C. S., Tsidoutis V. , Nicolopoulos N. S, Giannoudis P. V.; Clinical application of helium neon (632 nm) plus infrared diode laser GaAIAs (830 nm) and CO<sub>2</sub> laser in treatment of onychomycotic nails. Harcourt Publishers Ltd, 9,**181**,(1999).
- [2] Repka M. A, O'Haver J., See C. H., Gutta K., Munjal M.; Nail morphology studies as assessments for onychomycosis treatment modalities. International Journal of Pharmaceutics, 245, **25**, 2002.
- [3] Fraki J.E., Heikkila H. T., Kero M. O., Kuokkanen K. E., Oksman R. O., Rantanen T. T., Saari S. S., Sten . M. L., Stubb S. H. A., Uggeldahl P. E.; An open-label, Nan comparative, multicenter evaluation of Fluconazole with of without urea nail pedicure for treatment of onychomycosis. Current Therapeutic Reserch, 58,8, **481**, august 1997.
- [4] Ricketti, J. C.; Terbinafine/miconazole nitrate 2% tincture compound for the treatment of onychomycosis. Harcourt Publishers Ltd ,11, **21**, 2001.
- [5] Gupta A. K., Konnikov N., Lynde C. W.; Single-blind, randomized, prospective study on terbinafine and itraconazole for treatment of dermatophyte toenail onychomycosis in the elderly. J AM ACAD DERMATOL, 44, **480**, march 2001.
- [6] Robbins J. M.; Treatment of onychomycosis in the diabetic patient population. Journal of Diabetes and Its Complications, 17, **98**, 2003.
- [7] Gupta A. K. ; Pharmacoeconomic analysis of ciclopirox nail lacquer solution 8% and the new oral antifungal agents used to treat dermatophyte toe onychomycosis in the United States. J AM ACAD DERMATOL, 43, 4, **S82**, October 2000.
- [8] Gupta A. K.; Management of Toe Onychomycosis: What Is the Potential for Improving Efficacy of Treatment? Elsevier Science, Clinics in Dermatology, 20, **608**, 2002.
- [9] Effendy I.; Therapeutic strategies in onychomycosis. J. Eur. Acad. Dermatol. Vernereol. 4 (Suppl.1), **S5**, 1995.
- [10]Gupta A. K.; Ciclopirox nail lacquer solution 8% in the 21st century. J AM ACAD DERMATOL, 43, 4, **S96**, October 2000.
- [11]Bohn M.; Dermatopharmacology of Ciclopirox Nail Lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. J. AM. ACD. DERMATOL, 43, 4, **S57**, 2000.

- [12]Grupta A. K. ; Pharmaco-economic analysis of ciclopirox nail lacquer solution 8% and the new oral antifungal agents used to treat dermatophyte toe onychomycosis in the United States. J AM ACAD DERMATOL, 43,4, **S90**, October 2000.
- [13]Rosencwaig A.;1941-Photoacoustic and photoacoustic spectroscopy.EUA: John Wiley & Sons,Inc., 1980.
- [14]Olenka, L.; Espectroscopia Fotoacústica: Estudo das propriedades ópticas e térmicas da pele “in vivo”, monografia apresentada UEM, 1996.
- [15]Sowa M.G., Wnag J., Schultz C.P., Ahmed M.K.; Infrared spectroscopic investigation of vivo and ex vivo human nails. Vibrational Spectroscopy 10, 1995.
- [16]Sehn E., Silva K. C., Retuci V. S., Medina A. N., Bento A. C., Baesso M.L.; Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment. Review of scientific Instruments, 74, 1, **1**, January 2003.
- [17]Retuci V. S.; Estudo “in vivo” da propagação e interação de substância na pele através da Espectroscopia Fotoacústica. Monografia UEM, 1998.
- [18]Bento A. C.: Aplicações da espectroscopia fotoacústica em materiais transparentes, tese de mestrado IFGW-UNICAMP, 1987.
- [19]Dias, D. T.; Estudo da reticulação do polietileno/silano enxertado e copolimerizado usando métodos fototérmicas, dissertação de mestrado DFI-UEM-PR, 2001.
- [20]Pan Q., Qin S. Zhang S. Zhang J. e Zhu.; Application of photoacoustic spectroscopy in human blood: Springer Séries in Optical Sciences, 58, 1987.
- [21]Rosencwaig, A.; Gersho. A, Theory of the photoacoustic effect with solids, J. App. Phys., 47 (64), 1976.
- [22]Olenka, L.;Caracterização do Polietileno Teraflalato Tingido usando a Espectroscopia Fotoacústica: Monitoramento do Processo e Propriedades Térmicas, tese de Mestrado, apresentada na DFI-UEM-PR, 1999.
- [23]Marquezini V. M.; Aplicações da Espectroscopia Fotoacústica ao estudo “in vivo” da Toxidade das Plantas.Tese de Mestrado UNICAMP, 1990.
- [24]Vargas H., Miranda L.C.M.; Photoacoustic and Related Photothermal Techniques. Phys. Rep, **161**,1988.
- [25]Pereira A. C, Veto G. O, Vargas H., Cella N., Miranda L. C. M.; Rev. Sci. Instrum **65** (1512), 1994.