



*Universidade Estadual de Maringá*

*Pós-Graduação em Física*

---

Gutierrez Rodrigues de Moraes

Espectroscopia fotoacústica para o estudo da difusão de um extrato de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. em feridas cutâneas e das mudanças estruturais de tecidos do pulmão infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*

Orientador: Mauro Luciano Baesso  
Co-orientadoras: Eneri Vieira de Souza L. Mello  
Luzmarina Hernandes

---

Maringá, Janeiro de 2012



*Universidade Estadual de Maringá*

*Pós-Graduação em Física*

Gutierrez Rodrigues de Moraes

Espectroscopia fotoacústica para o estudo da difusão de um extrato de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. em feridas cutâneas e das mudanças estruturais de tecidos do pulmão infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*

Orientador: Mauro Luciano Baesso  
Co-orientadoras: Eneri Vieira de Souza L. Mello  
Luzmarina Hernandes

Dissertação de mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá para a  
obtenção do título de mestre em Física

Maringá, Janeiro de 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR., Brasil)

M827e      Morais, Gutierrez Rodrigues de  
Espectroscopia fotoacústica para o estudo da difusão de um extrato de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. em feridas cutâneas e das mudanças estruturais de tecidos do pulmão infectados por *Paracoccidioides brasiliensis* / Gutierrez Rodrigues de Moraes. -- Maringá, 2012.  
74 f. : figs. col., tab.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso.  
Co-orientadoras: Eneí Vieira de Souza L. Mello, Luzmarina Hernandez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2012.

1. Espectroscopia fotoacústica. 2. *Caesalpinia peltophoroides* - Permeação - Pele. 3. *Paracoccidioides brasiliensis* - Mudanças estruturais - Pulmão. 2. Espectroscopia infravermelho. I. Baesso, Mauro Luciano, orient. II. Mello, Eneí Vieira de Souza Leite, co-orient. III. Hernandez, Luzmarina, co-orient. IV. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 21.ed. 535.84

GVS-000415

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida, pelo carinho, compreensão e estímulo, meus pais Daguiomar e Jandira e minha noiva Nayana.

## Agradecimentos

Esta dissertação é o resultado de um verdadeiro trabalho em equipe, que não seria possível sem a importante colaboração de algumas pessoas, agradeço em especial:

Primeiramente a Deus, por mais esta bênção alcançada, e pelo conforto encontrado nas orações durante os momentos difíceis.

Ao meu orientador, professor Dr. Mauro Luciano Baesso, por quem aprendi a ter imensa admiração. Sou muito grato por sua paciência, estímulo, conhecimento adquirido e principalmente pela confiança em meu trabalho.

A minha co-orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Eneri Vieira de Souza L. Mello, do Departamento de Ciências Morfológicas (UEM), ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello, do Departamento de Farmácia (UEM), e à doutoranda Fernanda Bueno, parceiros no estudo da cicatrização de feridas.

À minha co-orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandes, do Departamento de Ciências Morfológicas (UEM), a Professora Dr<sup>a</sup>. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (UEM), e à mestre Edilaine Martins Moratto, parceiras no trabalho com *Paracoccidiodes brasiliensis*. Agradeço por todo conhecimento adquirido durante este tempo de convívio e sobretudo pelo crédito depositado em mim e pela afetuosa atenção.

À professora Dr<sup>a</sup>. Francielle Sato, por toda ajuda, tanto nos experimentos quanto pela valiosa atenção e discussões. Jamais me esquecerei de todo esse carinho e amizade.

Aos amigos e amigas: Ana Cláudia, Giselly, Gustavo, Marcelo, Marcel, Rogério, José Renato e Vitor, pela ajuda, companheirismo e apoio;

Aos Professores do Mestrado, por todo conhecimento e ensinamento. Obrigado pela paciência e disponibilidade para ensinar.

Aos Professores do GEF, pela colaboração, sugestões e importantes discussões.

A todos os funcionários do DFI-UEM, e em especial à Akiko;

À Capes, CNPq, FINEP, Fundação Araucária e UEM pelo apoio financeiro.

*Muito obrigado a todos!*

## Resumo

Neste trabalho a Espectroscopia Fotoacústica (PAS) foi empregada na realização de dois estudos: no primeiro, utilizando-se as regiões espectrais do ultravioleta e do visível, para a determinação *ex-vivo*, em feridas cutâneas de ratos, da taxa de difusão de uma fórmula farmacêutica gel, na qual foi incorporado o extrato bruto a 1% obtido de cascas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (sibipiruna), para estudo de sua ação cicatrizante; no segundo estudo, a técnica de espectroscopia fotoacústica de infravermelho com transformada de Fourier (photoacoustic spectroscopy of the Fourier transform infrared – FTIR-PAS), foi empregada para a determinação *ex-vivo* das mudanças estruturais no pulmão de camundongos infectados por *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). O primeiro estudo foi realizado em feridas excisionais na pele de ratos Wistar após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com o gel de *C. peltophoroides*. No segundo, camundongos Swiss foram infectados com uma cepa de Pb18. Os pulmões infectados foram analisados após 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção. Os resultados do primeiro estudo mostraram que a taxa de difusão da formulação de *C. peltophoroides* foi dependente do estágio de cicatrização das feridas. A técnica PAS foi eficaz em demonstrar o potencial de permeação do gel de *C. peltophoroides* em feridas excisionais em diferentes etapas da cicatrização. A maior taxa de permeação ocorreu no 10<sup>o</sup> dia de tratamento, período em que também foi observado um aumento na banda de absorção óptica da meta-hemoglobina. No segundo estudo, a avaliação físico-química mostrou que os pulmões infectados com Pb apresentaram mudanças significativas nos grupos funcionais amida I, CH<sub>3</sub> e fosfato, e que as mudanças nas bandas de absorção óptica foram uma consequência das alterações morfológicas ocorridas no pulmão infectado. Em conclusão, os resultados deste trabalho mostraram mais uma vez que a espectroscopia fotoacústica é uma técnica muito importante para se determinar a difusão de formulações em sistemas biológicos, permitindo que se faça especificamente na cicatrização cutânea, uma correlação entre a taxa de difusão e os eventos biológicos do processo cicatricial. A técnica FTIR-PAS mostrou grande potencial para análise de alterações físico-químicas em sistemas biológicos sem a necessidade de reagentes ou manipulação da amostra, indicando que esta técnica pode tornar-se promissora para o estudo dos mecanismos físico-químicos envolvidos nos processos que resultam em apoptose.

## Abstract

In this work, the Photoacoustic Spectroscopy (PAS) was applied for two different studies: First, using the UV-Vis spectral region, to determine *ex vivo*, in rats cutaneous wound, the diffusion rate of a pharmaceutical gel, in which a 1% of extract of *Caesalpinia peltophoroides* Benth skin was incorporated, to study its healing properties; next, the technique in the infrared with Fourier transform set up and photoacoustic detection (FTIR-PAS) was employed for *ex-vivo* determination of tissue structural changes of infected Swiss mouse lungs with *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). The first study was performed in induced wounds in rats *Wistar* after 4, 7, 10 e 14 days of treatment with the gel of *C. peltophoroides*. In the second study, Swiss mouse lungs were infected with a strain of the Pb18. The infected lungs were investigated after 1, 2, 4 and 8 weeks of infection. The results of the first study showed that the *C. peltophoroides* formulation diffusion rate was dependent on the wound healing stages. The technique was able to demonstrate the penetration of the *C. peltophoroides* gel in induced wounds in different stages of the healing. The higher penetration rate occurred at the 10<sup>o</sup> day of treatment, period in which an increase in the meta-hemoglobin optical absorption bands was also observed. In the second study, the physico-chemical evaluation showed that the infected lungs with Pb presented significant changes in the optical absorption bands of the functional groups amide I, CH<sub>3</sub> and phosphate, and that the changes in the optical absorption bands occurred as a consequence of morphological alterations in the infected lungs. In conclusion, the results of this work showed once again that the photoacoustic spectroscopy is a technique useful to determine the diffusion of formulations in biological systems, allowing to perform, specially in cutaneous wound, a correlation between the diffusion rate with the biological events in the healing processes. The FTIR-PAS technique showed potential for physico-chemical alterations studies in biological systems without the need of using chemical reagents and sample manipulation, suggesting that this method is promising for the study of the processes involved in cellular apoptosis.

## Sumário

Resumo .....	VI
Abstract .....	VII
1. Introdução .....	9
1.1 Objetivos .....	11
2. Histórico e fundamentos teóricos sobre a espectroscopia fotoacústica .....	12
2.1 Espectroscopia óptica .....	12
2.2 Espectroscopia Fotoacústica.....	14
Histórico do efeito fotoacústico .....	14
Efeito fotoacústico: definição atual.....	15
Comportamento óptico e térmico das amostras .....	16
O sinal fotoacústico .....	19
2.3 Espectroscopia no infravermelho .....	21
Vibrações moleculares.....	22
3. Considerações gerais sobre as amostras e os sistemas estudados .....	27
<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.....	27
Morfologia da pele .....	27
Histofisiologia da cicatrização da pele .....	29
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb).....	33
Estrutura do pulmão .....	34
4. Procedimentos e montagens experimentais .....	36
4.1 <i>Estudo da taxa de permeação em feridas cutâneas de ratos</i> .....	36
Preparação das amostras para a avaliação da atividade cicatrizante .....	36
Montagem experimental da espectroscopia fotoacústica .....	37
4.2 <i>Estudo físico-químico e histológico de pulmão de camundongos infectados com Paracoccidioides brasiliensis.</i> .....	39
Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com detecção fotoacústica (FTIR-PAS) .....	40
5. Resultados e discussão.....	42
Parte I - Espectroscopia fotoacústica para o estudo da difusão de um extrato de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth em feridas cutâneas.....	42
Parte II - FTIR-PAS como método de estudo da Paracoccidioidomicose .....	52
6. Conclusões .....	60
Referências .....	60
ANEXO I.....	74



## 1. Introdução

Embora seja conhecida há mais de 30 anos como uma técnica que apresenta características especiais para estudos em sistemas biológicos *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* <sup>[1]</sup>, a Espectroscopia Fotoacústica (*Photoacoustic spectroscopy* - PAS) vem se consolidando como um método muito útil para se determinar a propagação e a distribuição espacial, em tecidos biológicos, de formulações de aplicação tópica <sup>[2-3]</sup>.

A princípio foi empregada essencialmente para a determinação da penetração de cosméticos na pele, entretanto, atualmente vem também sendo muito aplicada na avaliação da dinâmica de difusão e distribuição espacial de fármacos de aplicação tópica em outros sistemas biológicos, como pele <sup>[3]</sup>, unhas <sup>[4]</sup>, e dentes <sup>[5]</sup>. Isto vem ocorrendo em função de uma característica especial da técnica que é a de possibilitar a determinação da taxa de penetração das substâncias ao longo da espessura da amostra e também pelo crescente interesse nos medicamentos de uso tópico, que sabidamente podem minimizar a ocorrência de efeitos adversos nos indivíduos. Estes fatos vêm contribuindo para a consolidação da PAS para uso rotineiro na área farmacêutica.

Outras vantagens estão relacionadas às características da PAS: não é destrutiva, permite estudos em amostras semi-sólidas e é muito sensível na detecção dos componentes absorvedores da formulação no corpo de prova, mesmo quando estão em concentrações muito baixas.

Para cada estudo utilizando a fotoacústica é importante estabelecer previamente as regiões espectrais. Na região do ultravioleta e visível (UV-VIS), os mecanismos responsáveis pela absorção da luz são governados essencialmente por processos que envolvem transições eletrônicas. Nestes casos, o espectro fotoacústico permite obter as bandas de absorção óptica associadas às moléculas, aglomerados ou íons presentes na amostra. Nos espectros na região do infravermelho próximo e médio, os mecanismos envolvidos na absorção são as vibrações e/ou as rotações moleculares. Os espectros no infravermelho, em geral, permitem não só identificar as moléculas presentes, mas também acessar informações sobre a natureza das ligações químicas. Assim, a técnica FTIR-PAS é promissora para diagnóstico clínico, pois possibilita identificar alterações bioquímicas em amostras, além de permitir a análise de fenômenos biológicos <sup>[6]</sup>.

Neste trabalho foram realizados dois estudos utilizando a técnica da PAS. No primeiro avaliou-se a dinâmica de penetração de um fitofármaco em feridas excisionais da pele, durante o processo de cicatrização. Recentemente, avaliamos, com este mesmo objetivo, por meio de PAS no UV-VIS, a taxa de permeação de uma pomada de própolis em feridas excisionais na pele de ratos. Os resultados foram correlacionados com os eventos de reepitalização e re-vascularização, obtendo-se desta forma a dinâmica do processo <sup>[7]</sup>. Entre as justificativas para se ampliar este estudo está o grande interesse atual nos fitoterápicos <sup>[8-15]</sup>. A biodiversidade brasileira conta com aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas <sup>[16-18]</sup>, oferecendo um grande potencial para se obter moléculas com funcionalidades que possam caracterizá-las como princípios ativos de interesse farmacêutico. Embora tenha este potencial, só recentemente os definidores de política científica vêm imprimindo ações para o desenvolvimento de projetos voltados para a obtenção de novas formulações de interesse farmacêutico <sup>[19]</sup>.

Uma planta medicinal é aquela que contém substâncias bioativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas. Desde os períodos pré-históricos, há um grande número de espécies que são usadas na medicina popular por diversos povos. Com a evolução do conhecimento científico, novas ferramentas de análise e de extração dos princípios ativos foram desenvolvidas. Isto resultou na possibilidade de se isolar as substâncias que conferem propriedades medicinais, permitindo assim a produção de novos fármacos <sup>[20-21]</sup>.

No segundo estudo a técnica fotoacústica no infravermelho (FTIR-PAS) foi empregada numa avaliação físico-química de pulmão de camundongos *Swiss* infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Pb é um fungo dimórfico térmico, responsável pela paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica de natureza granulomatosa, autóctone da América Latina <sup>[22-23]</sup>. A principal porta de entrada deste fungo no organismo é a respiração, e os conídios produzidos por Pb podem causar infecção a partir de um foco pulmonar inicial <sup>[24]</sup>.

A importância da PCM para a saúde pública está relacionada não só com a atividade da doença, mas também com as lesões secundárias causadas por esta micose, que podem levar à morte se não tratadas <sup>[25-26]</sup>. As manifestações clínicas principais que ocorrem são tosse seca, aumento de secreções e dificuldade para respirar. No entanto, a consequência mais limitante desta micose é a ocorrência de insuficiência pulmonar crônica <sup>[27]</sup>, resultante do desenvolvimento de fibrose.

A infecção experimental de animais que são suscetíveis ao fungo em geral é capaz de mostrar o comportamento da doença [28-30]. O uso da fotoacústica no infravermelho parece ser promissor neste estudo, uma vez que os espectros de absorção podem fornecer informações sobre as mudanças conformacionais em moléculas que constituem o parênquima pulmonar.

### 1.1 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- Avaliar *ex-vivo*, com a espectroscopia fotoacústica nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível, a taxa de difusão de uma formulação contendo extrato bruto de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. em feridas cutâneas de ratos;
- Utilizar a fotoacústica no infravermelho médio, com o procedimento via transformada de Fourier, para a determinação das mudanças estruturais em pulmão de camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*;
- Associar os resultados das análises físico-químicas com aqueles obtidos a partir das análises histológicas.

## 2. Histórico e fundamentos teóricos sobre a espectroscopia fotoacústica

### 2.1 *Espectroscopia óptica*

Sir Isaac Newton (1643-1727), foi um dos pioneiros da espectroscopia óptica. Embora tenha se tornado famoso por sua obra das leis da mecânica, *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*, mais conhecida por *Principia*, publicada em latim em 1687 <sup>[31]</sup>, a óptica sempre esteve entre seus principais interesses. O primeiro curso dado por Newton na Universidade de Cambridge, em 1669, foi sobre óptica. Seu primeiro artigo publicado em 1672 e seu último livro, *Opticks*, publicado em inglês em 1704 <sup>[32]</sup>, foram estudos sobre a natureza da luz <sup>[33]</sup>. Newton foi o primeiro a descrever regras matemáticas para explicar o comportamento da refração da luz <sup>[34]</sup>.

A espectroscopia é a área da ciência dedicada ao estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Comprimentos de onda distintos transportam diferentes quantidades de energia, resultando em interações que podem ser analisadas para se obter informações sobre as características da estrutura molecular dos compostos e suas possíveis funcionalidades <sup>[35-36]</sup>.

Cada radiação eletromagnética pode ser caracterizada por um comprimento de onda, conforme ilustrado na Figura 2.1. Na ordem crescente de energia, mostra-se desde as ondas de rádio até radiações de alta energia, como os raios-X e os raios- $\gamma$  <sup>[7,37]</sup>. Embora não haja uma definição específica dos limites entre cada região espectral, suas denominações auxiliam na caracterização e no processo de entendimento dos mecanismos de interação de cada radiação com a matéria.

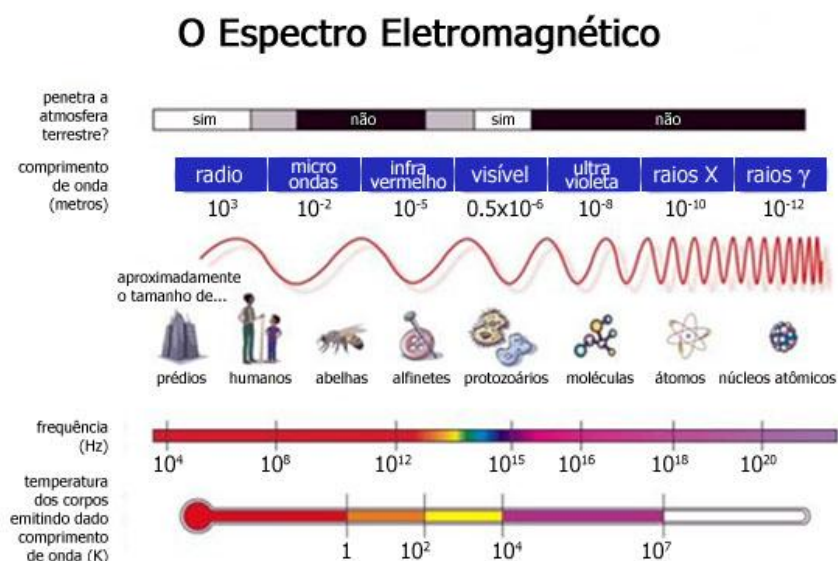


Figura 2.1. Representação esquemática do espectro eletromagnético <sup>[38]</sup>.

De modo geral, quando uma radiação com um determinado comprimento de onda interage com a matéria, ocorre um fenômeno espectroscópico, como por exemplo, absorção, transmissão, reflexão, espalhamento, luminescência, fluorescência, entre outros, os quais dependerão da energia da radiação incidente e do meio material considerado <sup>[35]</sup>. Os estudos espectroscópicos são tão eficientes para revelar as propriedades de um meio que suas informações podem ser consideradas como sua impressão digital do referido meio.

As frequências da região do visível correspondem a menos de 1% de todo o espectro eletromagnético, cujos comprimentos de onda estão compreendidos entre 400 e 700 nm. A radiação ultravioleta está compreendida entre 200 e 400 nm. As radiações do visível e do ultravioleta podem induzir excitações nos materiais a partir de transições de determinados elétrons de seu respectivo estado de menor energia para outros de maior energia, ou ainda podem provocar transferências de elétrons entre átomos ou moléculas <sup>[35-39]</sup>. Espectros no infravermelho próximo, médio e longínquo refletem transições entre os níveis rotacionais dos vários níveis vibracionais de um estado eletrônico e os níveis rotacionais e vibracionais de outro estado eletrônico <sup>[39]</sup>. Nesta região espectral pode-se avaliar as ligações químicas das moléculas a partir da detecção das vibrações ou rotações que elas apresentam. Isto é obtido, por exemplo, com a técnica fotoacústica no infravermelho via

transformada de Fourier, denominada de (photoacoustic spectroscopy of the Fourier transform infrared – FTIR-PAS).

Em outras palavras, dependendo da radiação utilizada, pode-se recorrer a uma técnica espectroscópica específica. Neste trabalho, destacamos as regiões espectrais do ultravioleta e do visível para o estudo da taxa de difusão do extrato de *C. peltophoroides* em feridas cutâneas e a região do infravermelho para a determinação das mudanças estruturais em tecidos do pulmão induzidas por Pb.

## 2.2 Espectroscopia fotoacústica

### *Histórico do efeito fotoacústico*

Em 1880, Alexandre Graham Bell utilizou sua própria voz para modular um feixe de luz solar que incidia em um sólido posicionado em uma câmara fechada. Neste experimento, ele observou a ocorrência de efeitos sonoros que podiam ser ouvidos por meio de um tubo ligado na referida célula, como ilustrado a Figura 2.2 [40].

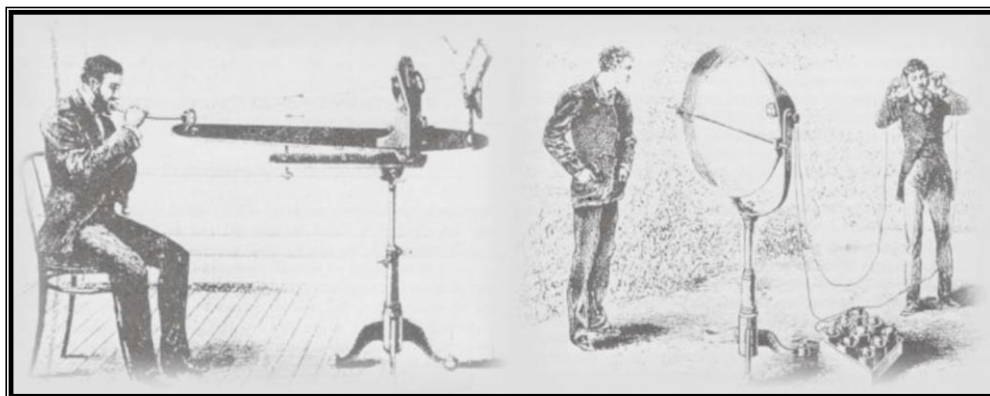


Figura 2.2. Foto da montagem experimental usada por Graham Bell para avaliar a transmissão de efeitos sonoros [41].

Bell fez experimentos subsequentes utilizando uma variedade de sólidos, líquidos e gases. Ele observou que os efeitos sonoros induzidos dependiam da natureza das substâncias expostas à radiação e ainda do respectivo comprimento de onda absorvido pelo corpo. Seu trabalho provocou grande interesse na época, sendo considerado o primeiro a relatar o efeito fotoacústico [40].

Em razão da inexistência de microfones sensíveis e sistemas de sincronização de sinais à época, o efeito fotoacústico foi negligenciado por um longo período de tempo. Na década de 40, com o surgimento dos primeiros microfones, o efeito foi utilizado para o estudo de amostras na forma de gás. No entanto, foi somente em 1973 que a espectroscopia fotoacústica, como a conhecemos hoje, foi estabelecida para o estudo de gases, sólidos e líquidos. Isto ocorreu graças ao trabalho pioneiro dos pesquisadores Allan Rosencwaig e Allen Gersho que desenvolveram as bases teóricas e experimentais da técnica, estabelecendo protocolos para estudos quantitativos que permitem a determinação de quantidades físicas de qualquer tipo de material <sup>[1,40,42]</sup>. Como consequência, a espectroscopia fotoacústica tornou-se uma ferramenta valiosa para a determinação de propriedades ópticas e térmicas de materiais. Entre outros fatores, os autores destacaram a possibilidade do método permitir a realização de análise do perfil de profundidade de centros absorvedores distribuídos ao longo da espessura da amostra sob teste <sup>[40]</sup>.

O referido modelo permitia a utilização de equações analíticas para descrever o comportamento do sinal fotoacústico tanto em termos da potência de luz incidente, como da frequência de sua modulação. Em seus experimentos, eles demonstraram que o sinal fotoacústico era o resultado do fluxo periódico de calor, induzido após a incidência de luz, entre a superfície da amostra e o gás contido na célula fotoacústica. Tratava-se, portanto, de um fenômeno fototérmico <sup>[40-41]</sup>.

### *Efeito fotoacústico: definição*

O efeito fotoacústico pode ser observado quando um feixe de luz modulada é absorvido por uma amostra posicionada dentro de uma célula fechada contendo gás, que pode ser o próprio ar. A absorção da radiação incidente resulta em excitação dos níveis de energia da amostra. Em seguida, se a relaxação é não radiativa haverá geração de calor de forma periódica na amostra. Haverá assim, ondas de pressão no gás que está em contato com a amostra. Um microfone acoplado à câmara fotoacústica detecta esta variação da pressão produzindo o sinal fotoacústico. Sua intensidade depende da potência e da frequência de modulação da luz incidente. Portanto, o sinal fotoacústico é o resultado da interação da radiação com a matéria. Sua natureza é definida pelas propriedades ópticas e térmicas das

amostras. A obtenção de espectros de absorção óptica gerados a partir do sinal fotoacústico caracteriza a técnica espectroscopia fotoacústica.

### *Comportamento óptico e térmico das amostras*

Em materiais transparentes ou semitransparentes, a atenuação da radiação ao longo de sua espessura depende do comprimento de onda desta radiação e ocorre de tal forma que a intensidade do feixe incidente diminui exponencialmente, conforme prevê a Lei de Beer-Lambert <sup>[42]</sup>. A distância de penetração do feixe na amostra até sua intensidade ser atenuada a 1/e (do valor  $I_0$  incidente na superfície) caracteriza a absorção óptica do material. O parâmetro que mede essa penetração é denominado de comprimento de absorção óptica,  $l_\beta$ , que é definido como:  $l_\beta = 1/\beta$ , sendo  $\beta$  o coeficiente de absorção óptica do material.

A Figura 2.3 mostra as três classificações que uma dada amostra pode receber em termos do seu comprimento de absorção óptica e de sua espessura,  $l_s$ .

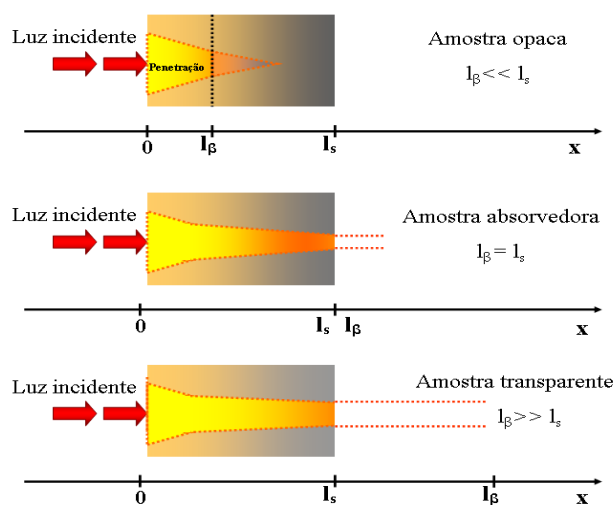


Figura 2.3. Classificação do comportamento óptico das amostras.

Uma vez que a amostra esteja classificada em termos do comprimento de absorção óptica, é necessário estabelecer como o calor gerado em uma determinada profundidade pode contribuir para o aumento de pressão na célula, ou seja, para a geração do sinal fotoacústico. Atualmente, sabe-se que o sinal fotoacústico pode ser gerado por pelo menos quatro mecanismos principais, sendo eles: difusão térmica, expansão térmica, efeito termoelástico e efeito fotobárico.



Difusão térmica: Neste processo, a incidência da luz modulada sobre a amostra produz um fluxo térmico no interior da mesma até o gás circundante, provocando neste uma variação de temperatura com a mesma frequência de modulação da luz incidente, como mostra a Figura 2.4. Uma fina camada do gás, a que está próxima à interface amostra-gás, é que responde termicamente às flutuações de temperatura da amostra. Esta camada de gás, que está em contato com a amostra, se aquecerá e passará a expandir e contrair periodicamente funcionando como um pistão, gerando uma onda de pressão no interior da câmara fechada. O sinal fotoacústico resultará dessa variação de pressão que é detectada por um microfone acoplado à célula. Este processo é conhecido como modelo de pistão simples.

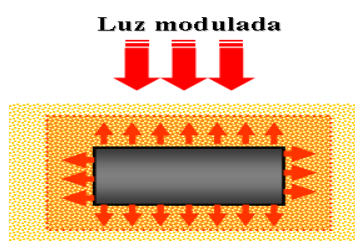


Figura 2.4. Representação esquemática do fenômeno de difusão térmica.

Expansão térmica: Neste mecanismo, a própria amostra se expande e contrai devido ao aquecimento periódico causado pela absorção da luz modulada, como ilustrado na Figura 2.5. Deste modo o movimento da superfície da amostra atua sobre a coluna de gás provocando uma onda acústica, no gás. Neste caso, a intensidade do sinal é governada pelo coeficiente de expansão térmica do material. Em geral, este mecanismo é dominante quando a amostra é de um material que apresenta alto valor para o coeficiente de expansão térmica.

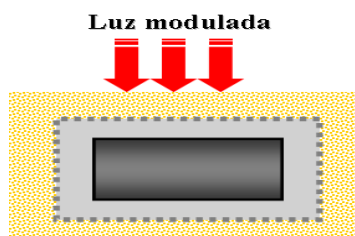


Figura 2.5. Representação esquemática do fenômeno de expansão térmica.

Flexão termoelástica: Este processo acontece quando há formação de um gradiente de temperatura ao longo da espessura da amostra. Este gradiente é

gerado devido ao decréscimo da absorção à medida que a luz penetra no material. Isto faz com que a expansão térmica seja diferente para diferentes planos da amostra (perpendiculares ao gradiente), o que induz uma flexão. Em especial isto ocorre quando as bordas da amostra estão presas, conforme ilustra a Figura 2.6. Este processo é também periódico, gerando ondas de pressão no gás e, conseqüentemente, sinal fotoacústico.

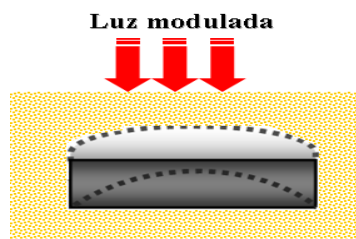


Figura 2.6. Representação esquemática do fenômeno de flexão termoelástica.

Efeito fotobárico: Este efeito é observado em amostras fotoquimicamente ativas, com troca gasosa entre a amostra e o gás da célula fotoacústica. É o que acontece, por exemplo, com folhas de plantas que liberam oxigênio quando realizam fotossíntese, conforme ilustrado na Figura 2.7.

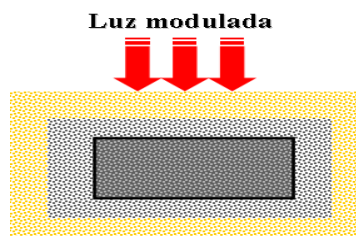


Figura 2.7. Representação esquemática do fenômeno de efeito fotobárico.

### *Comprimento de difusão térmica*

O comprimento de difusão térmica,  $\mu_s$ , tem unidade de comprimento (cm), e é definido pela expressão (2.1):

$$\mu_s = \sqrt{\frac{D}{\pi f}} \quad (2.1).$$

em que  $D$  é a difusividade térmica ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) e  $f$  é a frequência de modulação (Hz) do feixe de luz incidente. Escolhida uma dada frequência de modulação para o experimento, este parâmetro fornece a camada da amostra (no lado da incidência de luz) que a radiação absorvida é convertida em calor contribui para a geração do sinal fotoacústico.

Classificação térmica: classificam-se termicamente as amostras a partir da comparação de sua espessura ( $l_s$ ) com o comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ):

- Se  $\mu_s \gg l_s$ : amostra termicamente fina;
- Se  $\mu_s \ll l_s$ : amostra termicamente grossa.

É importante ressaltar que uma amostra opaca pode ter seu espectro resolvido, desde que  $\mu_s < l_s$ . Na fotoacústica, uma amostra é considerada saturada se toda luz absorvida gera sinal acústico. A saturação pode ser contornada diminuindo-se as dimensões da amostra (tornando-a não opaca), ou aumentando-se a frequência de modulação (o que reduz o valor de  $\mu_s$ ). Isto porque com o aumento da frequência o sinal é gerado em camadas cada vez mais superficiais. Assim, com a dependência do comprimento de difusão térmica,  $\mu_s$ , em função da frequência de modulação, é possível efetuar uma análise do perfil de profundidade no material. Ou seja, é possível obter espectros de absorção óptica das diferentes camadas da amostra em estudo.

A Figura 2.8 mostra um esboço do perfil de penetração numa amostra, ilustrando o que ocorre se a frequência angular de modulação da luz ( $\omega$ ) for modificada. As flechas representam as profundidades até onde o sinal PA é gerado, para a respectiva frequência de modulação. Nesta figura, a frequência cresce a partir de  $\omega_1$  até  $\omega_6$ . Quanto menor a frequência de modulação da luz maior será a profundidade de geração do sinal fotoacústico.

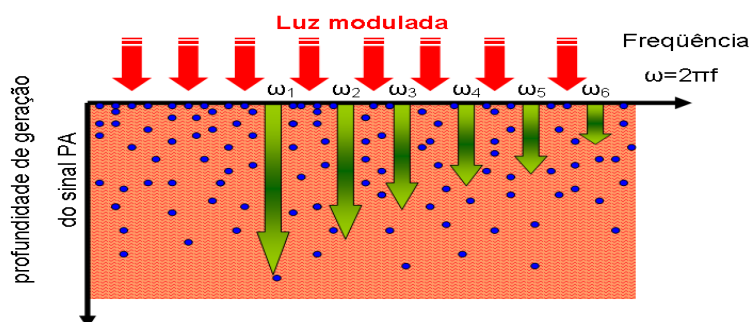


Figura 2.8. Diagrama do perfil de profundidade na geração do sinal fotoacústico.

### *O Sinal Fotoacústico*

Não é nosso objetivo neste trabalho apresentar todos os modelos teóricos para a espectroscopia fotoacústica. Mostraremos apenas os aspectos principais do modelo de difusão térmica para o sinal fotoacústico de Rosencwaig e Gersho.

Tratamentos mais completos dos modelos para outros mecanismos de geração do sinal ou arranjos experimentais podem ser encontrados em outros trabalhos [1,3,7,40,42].

O modelo de difusão térmica para o sinal fotoacústico consiste em considerar uma pequena camada de gás em contato com a superfície da amostra, a qual é capaz de responder termicamente às variações de temperatura provocadas pela absorção da luz incidente.

A configuração unidimensional padrão da célula fotoacústica está representada na Figura 2.9.

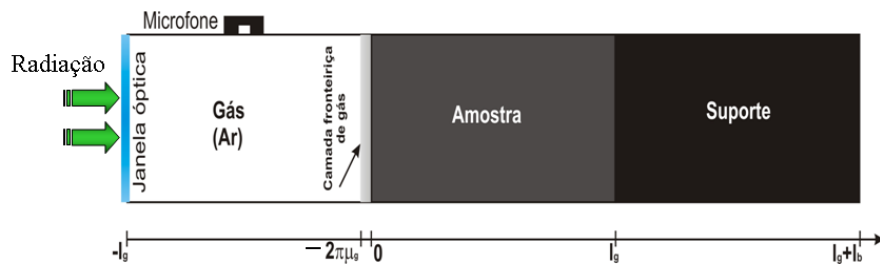


Figura 2.9. Geometria da célula fotoacústica convencional <sup>[42]</sup>.

Em que 0(zero) é a origem do sistema unidimensional;  $2\mu_g$  é a espessura do gás que responde a variação de temperatura da amostra;  $l_g$  é a espessura da amostra;  $l_g + l_b$  é a espessura da amostra mais a do suporte.

O sinal fotoacústico é gerado pela variação de pressão do gás no interior da célula. 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 se anular. A máxima intensidade do sinal é obtida quando  $l_g \approx \mu_g$ . Um fato importante é que o sinal fotoacústico é processado por um analisador síncrono, o Lock-in, que sincroniza os sinais elétricos provenientes do microfone e do modulador da luz. Isto significa que o sinal processado é a componente não temporal da variação de pressão na célula, sendo composto por uma intensidade e uma fase. A fase é o atraso temporal entre o sinal elétrico do modulador (referência que define o instante da incidência da radiação na amostra) e o sinal proveniente do microfone. Este atraso está ligado com o intervalo de tempo necessário entre a absorção da radiação pela amostra até a variação de pressão no gás ser detectada pelo microfone. Em outras palavras, está ligado ao valor do tempo de relaxação não

radiativa do centro absorvedor na amostra. Assim, o sinal fotoacústico pode ser representado por um fasor no plano complexo, como mostra a Figura 2.10.

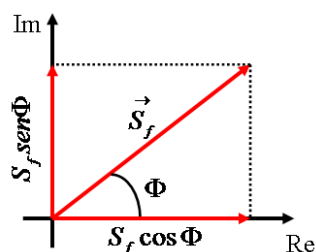


Figura 2.10. Representação fasorial do sinal fotoacústico.

Em que

$$S_f = S_f e^{j\Phi f} \quad (2.2).$$

A amplitude e a fase são os principais parâmetros em medidas experimentais com a fotoacústica. A intensidade do sinal depende linearmente da potência luminosa e do inverso do comprimento da coluna de gás. O sinal depende ainda do comprimento de onda utilizado e da frequência de modulação com que esta radiação chega até o material a ser estudado. Por outro lado, a fase do sinal fotoacústico independe da potência incidente. Ela é diferente para cada comprimento de difusão térmica,  $\mu_s$ , variando com a profundidade onde há geração de calor. Além disso, ela depende do tempo de relaxação não radiativa de cada centro absorvedor na amostra, ou seja, pode distinguir absorções geradas por diferentes moléculas ou estruturas moleculares nas amostras.

### 2.3 Espectroscopia no infravermelho

A descoberta da região espectral do infravermelho é atribuída a Friedrich Willian Herschel (1738–1882) que em 1800 investigou qual cor da radiação solar produzia mais calor. Para isto, ele utilizou um prisma de vidro, transparente à radiação, que decompõe a luz solar <sup>[43-44]</sup>. Com auxílio de um termômetro, Herschel verificou que ao posicioná-lo na região espacial após a vermelha do espectro, ocorria um aumento inesperado da temperatura. Descobria-se assim o que hoje se chama de radiação infravermelha <sup>[45]</sup>. A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da

molécula, como consequência das alterações nos seus movimentos vibracional ou rotacional [46-47].

A energia de vibração dos átomos no interior de uma molécula está na região do infravermelho, entre aproximadamente ( $10$  e  $12.500\text{ cm}^{-1}$ ) [47-48]. Esta região é subdividida em infravermelho próximo ( $4.000 - 12.500\text{ cm}^{-1}$ ), médio ( $400 - 4.000\text{ cm}^{-1}$ ) e longínquo ( $10 - 400\text{ cm}^{-1}$ ), ilustrado na Figura 2.11 [46-49].



Figura 2.11. Subdivisões do infravermelho no espectro eletromagnético [47].

### *Vibrações moleculares*

Mesmo em um sólido em temperaturas próximas do zero absoluto, os átomos estão em contínuas oscilações em torno de uma posição de equilíbrio. As amplitudes das oscilações são da ordem de  $10^{-11}$  a  $10^{-12}$  metros, enquanto suas frequências vibracionais correspondem às regiões das radiações infravermelhas.

As vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos, vibração de deformação axial (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*), conforme ilustrado na Figura 2.12. As deformações axiais ou por estiramento são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, enquanto que as deformações angulares envolvem mudanças nos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano de referência. Transições entre os níveis vibracionais podem ocorrer quando houver mudança do momento dipolar devida à variação da distribuição carga ao redor das ligações. Isto pode ser observado quando se aplica um campo elétrico no sistema. Alterações do momento dipolar podem ocorrer em moléculas diatômicas heteronucleares e para moléculas poliatômicas que apresentam vibrações assimétricas [48-50].

Se em um sistema há  $N$  átomos não combinados, livres para se movimentarem em três dimensões, o sistema teria  $3N$  graus de liberdade. Contudo, se estes átomos estão combinados, formando uma molécula, continua, ainda, existindo  $3N$  graus de liberdade, dos quais três são relacionados à translação do

centro de massa da molécula e três para a rotação da mesma em torno de três eixos perpendiculares. Logo restariam  $(3N-6)$  graus de liberdade para as vibrações <sup>[51]</sup>.

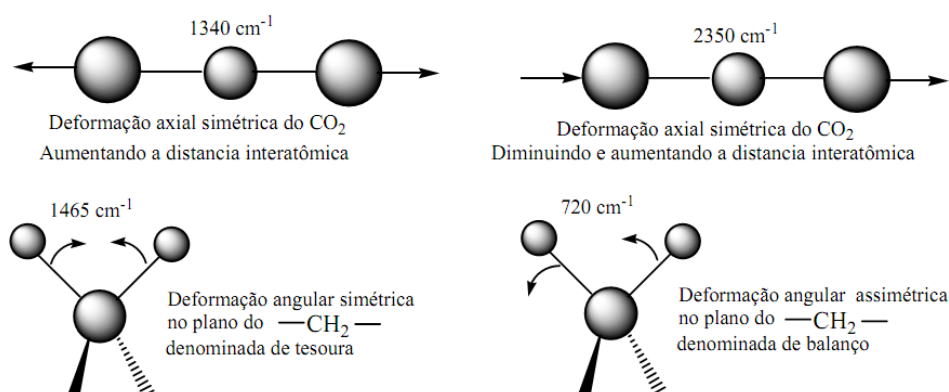


Figura 2.12. Ilustração da vibração por deformação axial (*stretching*) e por vibração de deformação angular (*bending*) <sup>[48]</sup>.

Para moléculas lineares não há rotação em torno do eixo internuclear e, em consequência, restam  $(3N-5)$  graus de liberdade para as vibrações. Estes graus de liberdade correspondem aos diferentes modos normais de vibração da molécula.

Um modo normal de vibração é aquele no qual cada núcleo realiza uma oscilação harmônica simples em torno de sua posição de equilíbrio e todos os núcleos se movem em fase com a mesma frequência. O centro de gravidade da molécula permanece inalterado.

Para explicar o comportamento vibracional das moléculas existem vários modelos. O mais utilizado é a descrição tipo oscilador harmônico por meio da teoria de perturbação para determinar os níveis de energia do sistema <sup>[52]</sup>. Neste modelo a energia vibracional do sistema é uma função quadrática da distância entre os átomos e a oscilação entre eles é simétrica. Considera-se que a ligação entre os átomos é descrita por um comportamento tipo massa-mola, no qual a frequência de vibração ( $\nu$ ) é descrita pela lei de Hooke, representada pela Equação 2.3. Aqui  $k$  representa a constante de força e  $\mu$  a massa reduzida do sistema, que se representa pela Equação 2.4. Em que  $m$  e  $M$  correspondem às massas dos átomos presentes na ligação.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.3).$$

$$\mu = \frac{mM}{m+M} \quad (2.4).$$

Este modelo só permite a transição entre níveis vibracionais adjacentes, dado que todos os níveis estão igualmente espaçados, e estas transições têm de respeitar os critérios de simetria <sup>[53]</sup>.

No caso de moléculas diatômicas, para o modelo do oscilador harmónico ideal, a energia potencial ( $E$ ) contém apenas um termo quadrático, sendo representada pela Equação 2.5. Em que  $r$  é a distância internuclear e  $r_e$  a distância internuclear de equilíbrio, representando-se esta diferença entre as distâncias por  $x$ .

$$E = \frac{1}{2}k(r - r_e)^2 = \frac{1}{2}kx^2 \quad (2.5).$$

A energia vibracional ( $E_{vib}$ ) de cada nível para este modelo é dada pela Equação 2.6, na qual  $v$  representa o número quântico vibracional e  $h$  a constante de Planck.

$$E_{vib} = hv \quad v + \frac{1}{2} \quad (2.6).$$

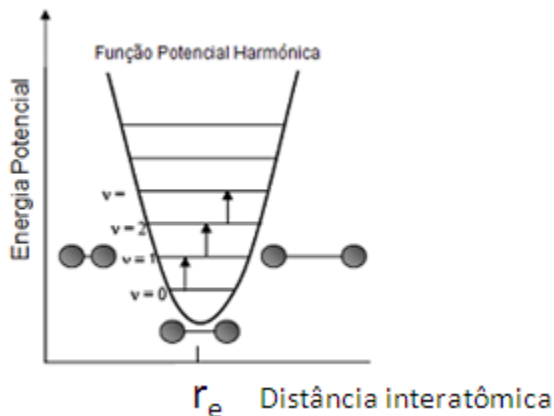


Figura 2.13. Perfil da energia potencial, no modelo do oscilador harmónico <sup>[54]</sup>.

Um modelo mais realista é o do oscilador anarmónico, uma vez que a ligação entre os átomos não é um oscilador perfeitamente harmónico e ainda podem ocorrer quebras de ligação se a molécula se estender além do regime elástico, podendo ocorrer dissociação. Assim, o oscilador anarmónico prevê níveis de energia separados por diferenças de energia decrescentes. Isto ocorre à medida que aumenta o número quântico vibracional (lei de Morse), resultando em transições



entre níveis não adjacentes, denominadas de sobreposições, e transições que envolvem duas vibrações diferentes, denominadas de combinações.

A energia potencial  $V$  no modelo anarmônico é descrita pela função de Morse, conforme apresentada na equação a seguir.

$$V = D_e \left[ 1 - e^{-a(r-r_e)} \right]^2 \quad (2.7).$$

em que  $a$  é uma constante molecular,  $D_e$  é a energia de dissociação,  $r_e$  é a distância interatômica de equilíbrio e  $r$  é a distância interatômica num dado instante.

A constante  $a$  está relacionada à constante  $K$  da molécula:

$$a = \frac{k}{2D_e} \quad (2.8).$$

Assim, a energia de um oscilador com potencial de Morse é quantizada e tem valores dados por:

$$E = h\nu_e \left( v + \frac{1}{2} \right) - h\nu_e x_e \left( v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (2.9).$$

em que  $\nu_e$  é a frequência vibracional harmônica,  $v$  é o número quântico vibracional, e  $x_e$  é uma constante sem dimensão, chamada de constante de não-harmonicidade.

A constante de anarmonicidade aparece como uma combinação de outras constantes vibracionais, definida como:

$$x_e = \frac{\nu_e}{4D_e} \quad (2.10).$$

em que as unidades de  $\nu_e$  e  $D_e$  são as mesmas, para que  $x_e$  não tenha unidade.

Nas Figuras 2.13 e 2.14 estão representadas as variações da energia potencial para o modelo do oscilador harmônico e para o anarmônico. Nota-se que as distâncias entre os níveis vibracionais são diferentes em cada modelo, isto é, no do oscilador harmônico a distância entre cada nível é sempre a mesma, enquanto que no anarmônico ela diminui à medida que a energia aumenta. As figuras demonstram também, que para elevadas distâncias nucleares entre os dois átomos presentes na ligação, o modelo do oscilador anarmônico prevê a dissociação da molécula, enquanto o harmônico não.

A explicação de uma molécula diatômica como sendo um oscilador com o potencial de Morse é plausível, pois correlaciona vários observáveis importantes, como: frequência clássica, energia de dissociação, constante de força, não-harmonicidade.

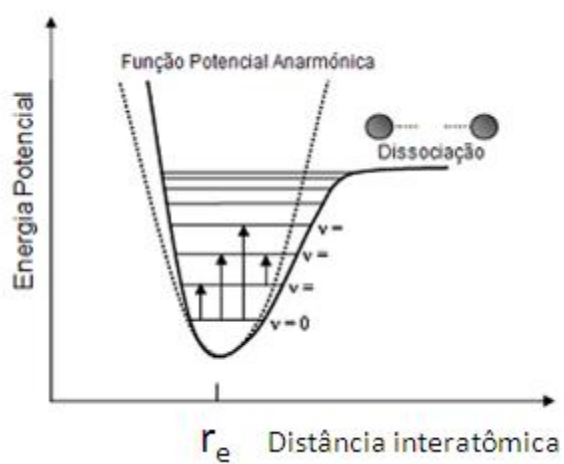


Figura 2.14. Perfil da energia potencial no modelo anarmônico <sup>[54]</sup>.

### 3. Considerações gerais sobre as amostras e os sistemas estudados

#### 3.1 *Caesalpinia peltophoroides* Benth.

A espécie *Caesalpinia peltophoroides* Benth., conhecida como sibipiruna ou “falso pau brasil”, é utilizada como planta ornamental e possui potencial madeireiro. No Brasil, é encontrada na região de mata atlântica e ainda na região do pantanal [55]. A madeira é muito utilizada na construção civil e na produção de móveis em geral, por ser pesada, dura e de média durabilidade [56].

*C. peltophoroides* possui sinonímia científica com *Caesalpinia pluviosa* DC. e na Bolívia é utilizada para tratamento de disenteria [56]. Extratos da casca de *C. pluviosa* apresentaram, em estudos *in vitro*, atividades contra o agente etiológico da malária, *Plasmodium falciparum* [57-59].

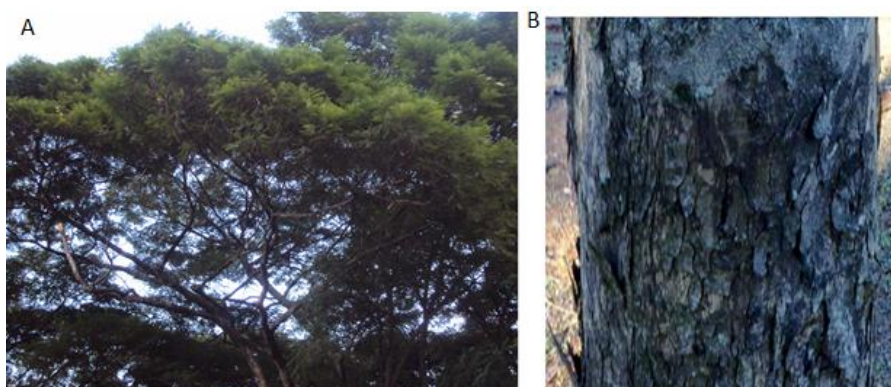


Figura 3.1. (A) Partes aéreas e (B) tronco de *Caesalpinia peltophoroides* [60].

#### 3.2 Morfologia da pele

A pele é um órgão multifuncional muito complexo, resistente, flexível e bastante impermeável que, moldando e revestindo o corpo, o isola do meio exterior [61]. Por sua inervação, vascularização e presença de neuromediadores, a pele é muito importante pelas inúmeras funções que desempenha, tais como: proteção, renovação e reparação, secreções sebáceas e sudoral, regulação da temperatura do corpo e absorção da radiação ultravioleta para a síntese de vitamina D [62].

Na composição química desse tecido o elemento mais importante é a água, com cerca de 70% da massa total. As substâncias de natureza proteica, como aminoácidos, proteínas (elastina, colágeno, melanina), azotados (ácidos graxos e uréia), representam 27,5% de seus constituintes químicos. Destacam-se ainda os

lipídeos simples como o colesterol, lipídios complexos como as ceramidas e fosfolipídios e ainda os lipídios de reserva. Na pele também são encontrados sais minerais, principalmente, sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco, ferro, fósforo, enxofre e iodo [63].

Estruturalmente é constituída por duas camadas, uma externa, a epiderme, constituída por tecido epitelial e logo abaixo a derme, de natureza conjuntiva. Abaixo da derme está a hipoderme que apesar de ter a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas serve de suporte e união com órgãos adjacentes, como mostra a Figura 3.2 [63].

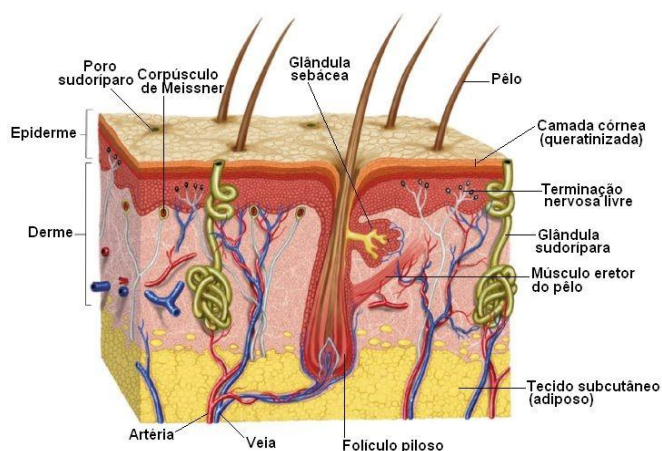


Figura 3.2. Representação das camadas e estrutura da pele e tecido subcutâneo [64].

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, formado por camadas sobrepostas de células sendo a mais comum os queratinócitos. Na epiderme também se encontram os melanócitos, que produzem a melanina, pigmento que confere cor a pele e absorve os raios ultravioletas (UV); as células de Langerhans, fagocitárias; e as células de Merkel, mecano-receptoras. A epiderme é um tecido avascular [64-66].

A derme, localizada abaixo da epiderme, é constituída por colágeno e elastina mergulhados em uma matriz extracelular vascularizada. O principal tipo celular da derme são os fibroblastos, mas também são encontrados macrófagos e outras células do sistema imune [64].

### 3.3 Histofisiologia da cicatrização da pele

Qualquer ruptura na integridade da pele deve ser rapidamente e eficazmente reparada num processo que se dá de forma espaço-temporal altamente organizada e envolvendo diversas etapas que incluem: inflamação, reepitelização, contração das feridas, fibroplasia e remodelação <sup>[67]</sup>.

#### *Fase inflamatória*

Injúria tecidual inicia uma resposta celular e vascular que limpa a ferida de tecidos desvitalizados e estranhos e dispara os eventos para a cicatrização e regeneração.

A primeira reação do organismo ao trauma é a vasoconstrição no local da ferida, para controlar a hemorragia. Segue-se a vasodilatação com extravasamento de sangue e formação de um coágulo de fibrina que tampona a lesão fornecendo assim uma matriz provisória para a migração das células responsáveis pelo processo de reparo <sup>[68-70]</sup>. O coágulo serve também como um reservatório de fatores de crescimento que são liberados a partir da desgranulação das plaquetas <sup>[68-60]</sup>.

Os grânulos das plaquetas se difundem pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração dos leucócitos, tanto da circulação como das regiões adjacentes <sup>[68]</sup>. Os capilares próximos da ferida tornam-se mais permeáveis e o exudato inflamatório infiltra-se nos tecidos circundantes e na área da ferida. Estas manifestações são todas locais, originando um aumento de sinais cardinais da inflamação (rubor, calor, tumor e dor) <sup>[66]</sup>.

Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células a migrarem para a superfície da ferida, para formar uma barreira contra a invasão de microorganismos.

Estudos recentes mostram que os neutrófilos são também uma fonte de citocinas pró-inflamatórias que provavelmente liberam os primeiros sinais para ativar fibroblastos e queratinócitos locais. A menos que a ferida esteja infectada, o infiltrado de neutrófilos cessa após alguns dias <sup>[68]</sup>.

Em seguida as células que surgem na região são os macrófagos (segundo ao quinto dia) que auxiliam os neutrófilos na eliminação de microorganismos pela fagocitose de debris teciduais. No entanto, sua participação mais relevante na inflamação é a produção e liberação local de diversos fatores de crescimento e citocinas amplificando os primeiros sinais liberados pelas plaquetas e neutrófilos. Os

macrófagos tornam-se predominantes e assim permanecem até o final do reparo [66,68,71].

A seguir os linfócitos começam a aparecer em grande número. Embora seu papel no processo de reparo não seja bem definido, parecem ter uma função na secreção de citocinas que são mitógenas e quimioatraentes para fibroblastos e participam na remoção de neutrófilos velhos [70].

Qualquer processo que retarde esta fase, como infecção, lesão física provocada durante a colocação do curativo ou movimento repetido, é nocivo para a cicatrização.

### *Fase de reepitelização*

O processo de reepitelização da ferida se inicia imediatamente após a lesão. Os estágios mais importantes desta etapa compreendem: a) migração das células através da área danificada; b) proliferação dos queratinócitos basais próximas ao leito da ferida.

Em uma pele normal os queratinócitos estão presos na lâmina basal por hemidesmossomos e ligados uns aos outros por desmossomos. No sítio da lesão, os hemidesmossomos são desmontados. Após perderem a inibição por contato as células adjacentes à ferida são estimuladas a migrar ao longo da matriz provisória [68].

São propostas duas estratégias diferentes para migração celular: 1) por um fenômeno denominado de “efeito de vizinhança livre”, as células basais próximas à região de ferida, são ativadas e rastejam de forma sequencial, por meio da formação de lamelipódios, envolvendo a contração de filamentos de actinmiosina intracelular [66]; 2) ou por um processo chamado “*leap-frog*” (“pulo do sapo”) na qual as células “rolam” umas sobre as outras (as células da camada supra basal sobre aquelas da camada basal) [68].

A migração das células epiteliais faz-se utilizando a disposição da fibrina como guia e dirigindo-se da margem para a zona central da ferida. Quando as células epiteliais provenientes de uma e outra margem se encontram no centro, a migração e a mitose param como resultado da inibição por contato [66,70-71].

Algumas horas depois do início da migração ocorre um *pool* proliferativo de células epiteliais na margem da ferida, para substituir aquelas perdidas durante o dano [68].

A superfície da ferida umedecida e oxigenada é um fator que acelera o processo de migração. À medida que a região da lesão vai sendo coberta, as células voltam ao seu estado normal e a membrana basal é refeita e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos [66].

### *Contração das feridas*

Durante o processo de contração, as margens das feridas se movem uma em direção à outra, como se houvesse uma força de atração. Isto ocorre devido à diferenciação de alguns fibroblastos dermais em miofibroblastos. Este fenômeno se chama contração e faz com que as feridas abertas na pele encolham e fechem, empurrando o tecido normal para a área lesada cobrindo o defeito [70-71].

### *Fase de fibroplasia*

A migração e ativação de fibroblastos é intensa devido à presença de macrófagos derivados de monócitos e à produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles. Com o aumento de fibroblastos ativados para a síntese de colágeno, inicia-se a fibroplasia. Os fibroblastos são estimulados a migrar através da matriz provisória formada e seguindo a orientação do gradiente químico de substâncias quimioatraentes [71-72]. Concomitante a esta fibroplasia, ocorre intensa proliferação vascular (angiogênese) a partir dos vasos pré-existentes nas bordas da ferida. O sucesso da fibroplasia depende da formação dos novos vasos uma vez que oxigênio e nutrientes são requeridos pelas células metabolicamente ativas [66].

Este tecido formado por fibroblastos, substâncias produzidas por eles e vasos sanguíneos é denominado tecido de granulação, clinicamente apresentando-se com aspecto granuloso e avermelhado.

A maior parte dos fibroblastos que surgem na área lesada parece se originar a partir de células precursoras que rodeiam os vasos sanguíneos. O sinal que leva à diferenciação destas células tem sido atribuído a fatores de crescimento derivados das plaquetas e dos macrófagos [71].

Na fase proliferativa precoce, a síntese e a lise de colágeno ocorrem simultaneamente, qualquer aumento na lise e atraso ou diminuição na síntese podem causar deiscência da ferida.

Feridas em locais altamente vascularizados, como na cabeça e pescoço, tornam-se seguras tão rápido que os pontos de sutura podem ser retirados entre o 3º a 5º dia. Em áreas menos vascularizadas como no tronco a cicatrização é mais lenta e os pontos de sutura devem ser retirados entre o 7º a 8º dia. As feridas nas extremidades cicatrizam ainda mais lentamente, devendo manter-se os pontos de sutura durante 10 a 15 dias <sup>[71-72]</sup>.

### *Fase de remodelação*

A última fase é a de remodelação ou maturação. Nesta, a estruturação do novo tecido da cicatriz é extensivamente remodelada. À medida que a angiogênese supre as necessidades metabólicas, a síntese de colágeno começa a decair, fibroblastos e macrófagos desaparecem e o colágeno excessivo é removido <sup>[66]</sup>. Uma grande parte do colágeno, originalmente distribuído ao acaso, será destruído e substituído por novas fibras colocadas de forma conveniente ao longo das linhas de tensão. A resistência da cicatriz aumenta gradualmente até ficar semelhante à do tecido normal, mas não é esteticamente nem funcionalmente perfeito, pois, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele. A elasticidade provavelmente nunca retornará ao normal e mesmo passados muitos anos, após um exame cuidadoso pode-se identificar o tecido da cicatriz <sup>[68,70-71]</sup>.



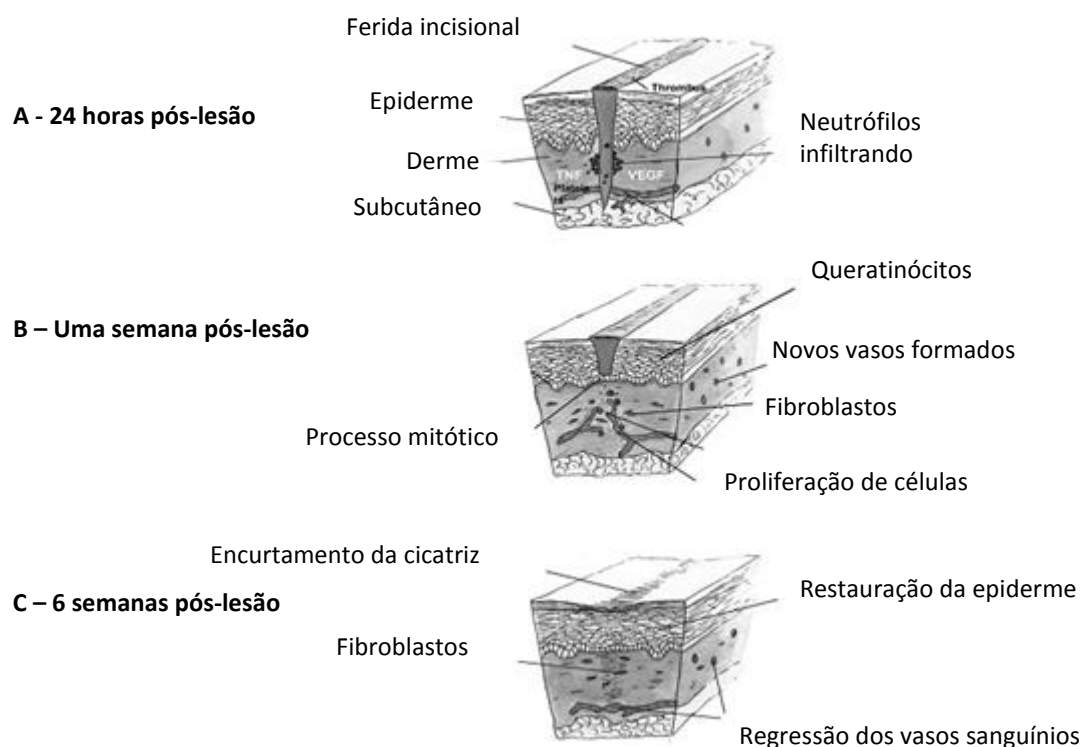


Figura 3.3. Fases de cicatrização: (A) fase inflamatória, (B) fase proliferativa e (C) fase de remodelação [73].

### 3.4 *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb)

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo dimórfico térmico [23], que na natureza, encontra-se na forma de filamento, que produz conídios, estrutura que pode induzir infecção em humanos [24].

Estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas são infectadas por *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) nas regiões endêmicas na América Latina [74]. A taxa de incidência anual da paracoccidioidomicose (PCM) entre a população brasileira é estimada de 1-3 por 100.000 habitantes e a mortalidade é de aproximadamente 0,14 por 100.000 habitantes, destacando-a como oitava causa de morte por doença predominantemente crônica ou repetitiva. Entre as doenças infecciosas e parasitárias, é a taxa de mortalidade mais elevada entre as micoses sistêmicas [75]. No Paraná, corresponde à quinta causa de óbitos por doenças dessa natureza e é onde está registrada a maior taxa de mortalidade por PCM do Sul e Sudeste, cerca de 3,52 óbitos por 1.000.000 de habitantes [75].

A virulência pode ser estudada pela infecção experimental de animais susceptíveis ao fungo, apresentando as mesmas características de cronicidade e generalização da doença observadas no homem. A influência da virulência de *P. brasiliensis* na relação parasita-hospedeiro pode ser evidenciada pelas diferentes manifestações clínicas da PCM, incluindo padrão de formação do granuloma e órgãos envolvidos <sup>[76]</sup>.

O pulmão é o órgão mais frequentemente acometido. A infecção causa severas modificações hemodinâmicas comprometendo anatomicamente o órgão <sup>[77]</sup>. A doença é caracterizada por uma inflamação granulomatosa crônica e fibrose, que visam isolar o agente infectante <sup>[76-77]</sup>.

### 3.5 Estrutura do Pulmão

Os pulmões são órgãos pares situados na cavidade torácica. Estão separados um do outro pelo coração e por outras estruturas situadas no mediastino. Os brônquios principais dão origem a brônquios secundários, ou lobares. O brônquio principal direito é mais largo, mais curto e mais vertical que o esquerdo <sup>[78]</sup>. Os brônquios lobares, três do lado esquerdo e dois do lado direito, dão origem a brônquios terciários, ou segmentares. Os brônquios terciários ramificam-se diversas vezes, formando os bronquíolos terminais. Por sua vez, estes se ramificam e transformam-se em bronquíolos respiratórios, que por sua vez dão origem a vários ductos alveolares que terminam nos alvéolos.

Cada pulmão é dividido em lobos por uma ou mais fissuras. O pulmão esquerdo tem uma fissura oblíqua e dois lobos; o pulmão direito tem duas fissuras, oblíqua e horizontal, e três lobos (figura 3.4) <sup>[79]</sup>. O pulmão é constituído por uma substância esponjosa leve, mas altamente elástica, denominada parênquima, que permite a expansão e contração dos mesmos e as trocas gasosas <sup>[78]</sup>.

Todos os lóbulos contêm um vaso linfático, uma arteríola, uma vênula e um ramo de um bronquíolo terminal. A pleura é uma membrana serosa de dupla camada que envolve e protege cada pulmão. É constituída por dois folhetos: visceral e parietal <sup>[80]</sup>. Entre a camada externa e a interna há um pequeno espaço, a cavidade pleural, que contém líquido pleural produzido por estas membranas.

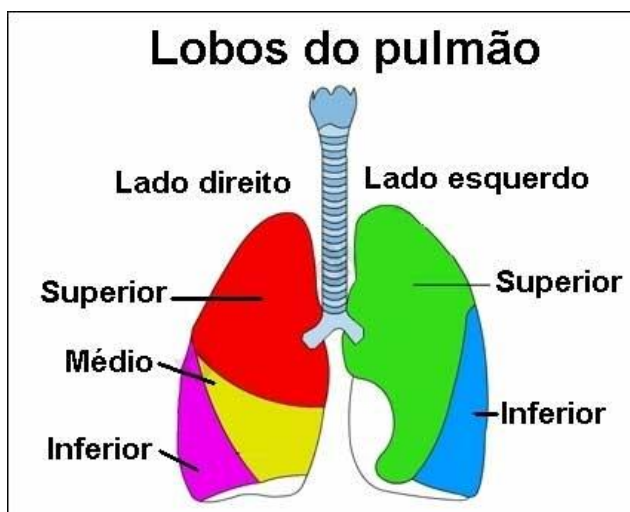


Figura 3.4. Esquema representativo da anatomia macroscópica do pulmão com seus lobos <sup>[79]</sup>.

## 4. Procedimentos e montagens experimentais

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (anexo I e II).

### 4.1 Estudo da taxa de permeação em feridas cutâneas de ratos

#### *Preparação das amostras para a avaliação da atividade cicatrizante*

Este estudo foi desenvolvido em parceria com os professores Dr<sup>a</sup>. Eneri Vieira de Souza L. Mello e Dr. João Carlos Palazzo de Mello e a doutoranda Fernanda Bueno do Departamento de Farmácia (UEM). O tema também fez parte da dissertação de mestrado da referida pós-graduanda [60].

Foram utilizados 20 ratos Wistar divididos em quatro grupos correspondente a 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento. Neste período os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) em condições laboratoriais padronizadas (temperatura de  $22\pm 1$  °C e umidade relativa de  $50\pm 10\%$ ) e, ciclo dia-noite de 12 h recebendo ração e água.

Para a epilação dos animais e realização das feridas, os mesmos foram anestesiados com Rompum/Ketamina 1:1 (1 mg/kg). Após a assepsia do local, utilizou-se um molde (*punch*) de 1 cm<sup>2</sup> para marcar na pele a área das feridas. Com auxílio de tesoura realizou-se duas feridas, ou seja, com remoção da epiderme e derme, como mostra a Figura 4.1.

Vinte e quatro horas após a realização das feridas, aquelas do lado esquerdo receberam uma aplicação diária de uma fórmula farmacêutica gel contendo 1% de extrato bruto obtido de cascas de *C. peltophoroides*. As feridas do lado direito receberam o gel base sem a adição de extrato.

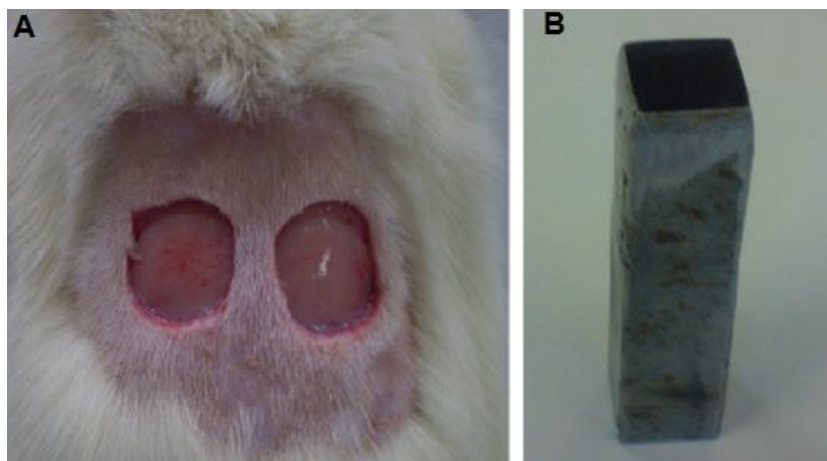


Figura 4.1. a) Feridas realizadas no dorso dos animais e b) *punch* utilizado para marcação no dorso.

Após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento, os animais foram injetados com 0,5mg/kg de sulfato de vincristina (Tecnocris<sup>®</sup> 1 mg/mL), um bloqueador do fuso mitótico, para estudo da proliferação celular. Duas horas após a injeção os animais foram mortos com uma sobre dose de anestésico.

#### *Montagem experimental da espectroscopia fotoacústica*

O arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para a região do UV-Vis está esquematizado na Figura 4.2.

As medidas foram realizadas posicionando-se as amostras na célula, conforme ilustrado na figura 4.2.a. Inicialmente a amostra foi posicionada com a superfície da ferida voltada para cima, onde a iluminação foi realizada e o espectro fotoacústico determinado. Em seguida, a amostra foi girada de modo que o feixe de luz atingisse a região da derme, lado oposto aquele onde a formulação foi aplicada. Esta estratégia garante detectar se houve penetração da formulação através da ferida.

Nesta montagem a fonte de luz é uma lâmpada de arco de Xenônio da marca Oriel, modelo 68820, com potência de até 1000 Watts [W], e emissão no intervalo entre 180 e 4.000 nanômetros (nm). O monocromador, modelo 77250 (1/8 m) da marca Oriel, foi utilizado com fendas de entrada e saída ajustadas em 3,16 milímetros. A grade de difração é da marca Oriel, modelo 77296. Filtros foram usados para se eliminar ordens superiores de difração. A frequência de modulação

da luz foi controlada por um modulador mecânico, modelo SR 540 da *Stanford Research Systems* que, com um fotodiodo, fornece um sinal de referência para o amplificador Lock-in. As lentes da montagem devem fazer com que a amostra seja excitada na região do foco do feixe de luz, para que esta receba o máximo de intensidade possível. A luz atinge o interior da célula fotoacústica após ser transmitida através de uma janela de quartzo, já que este material é transparente na região espectral de interesse, desde 190 nm até 4  $\mu\text{m}$ .

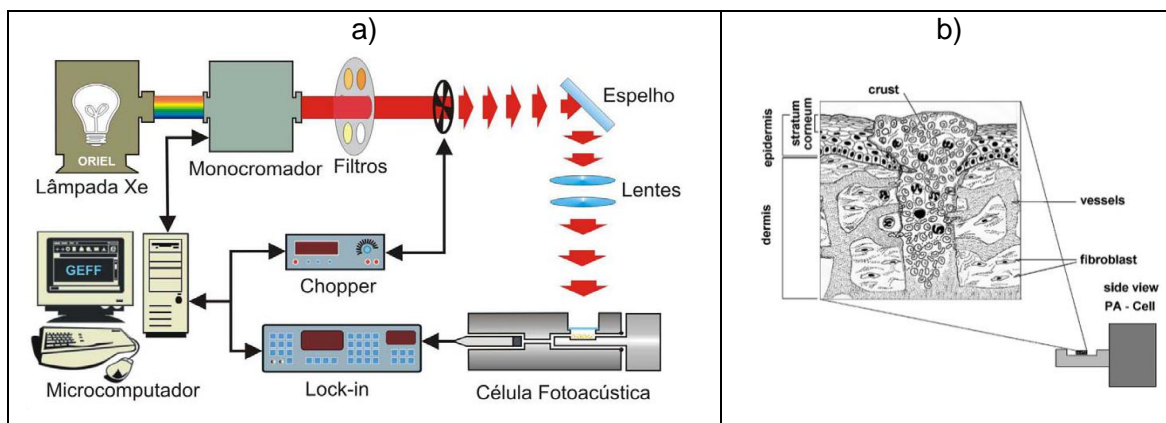


Figura 4.2. a) Representação do arranjo experimental da PAS para a região do UV-Vis; b) detalhe de um dos dois posicionamentos da amostra na célula, com a região da ferida voltada para cima. A medida também foi realizada com a excitação feita no lado da derme.

O microfone acoplado à célula fotoacústica é da marca *Brüel&Kjaer*, modelo BK 2669, e está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para o Lock-in (amplificador sincronizado) modelo 5110 da marca *EG & G Instruments*. O Lock-in fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador via interface GPIB. Como a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda, o sinal é normalizado pelo de referência obtido de uma amostra de pó de carvão ultra puro.

#### 4.2 Estudo físico-químico e histológico de pulmão de camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*.

Este estudo foi desenvolvido em parceria com as professoras Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandez do Departamento de Ciências Morfológicas (UEM) e Dr<sup>a</sup>. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski do Departamento de Análise Clínicas e Biomedicina (UEM) e com a mestre Edilaine Martins Moratto. O tema também fez parte da dissertação da referida mestre <sup>[81]</sup>.

Foi obtido um isolado de *P. brasiliensis* (Pb18) da coleção do Departamento de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e cultivado em meio de cultura Fava Neto a 35 °C no laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Foram utilizados 24 camundongos machos da linhagem Swiss e com um peso médio de 30 gramas. Com a idade entre 4 e 5 semanas os animais foram transferidos do Biotério Central de Animais da UEM para o Laboratório de Experimentação em Paracoccidioidomicose do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da UEM. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas, com uma temperatura de 23 a 24 °C e um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimento.

Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos de seis e cada grupo possuía 1 animal controle. Os animais foram infectados, por meio da veia caudal lateral, com 0,1 mL de suspensão fúngica, contendo  $2 \times 10^6$  células leveduriformes de Pb18. Os animais controle receberam 0,1 mL de PBS (pH 7,4).

Animais de ambos os grupos, infectados e controles, foram mortos 1, 2, 4 e 8 semanas após a inoculação, com uma sobre dose (3 vezes maior que a dose usual de 40 mg/ kg) de tiopental sódico (Cristal Pharma BR) na veia caudal lateral. Após a remoção dos pulmões, o lobo superior esquerdo foi separado e fixado em solução de *para-formaldeído* 4% por 24 horas e processado para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com H&E para avaliação histológica, com Gomori-Grocott para identificação do fungo e pelo método imunohistoquímico de detecção *in situ* da fragmentação do DNA (*terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP nickend labelling*, TUNEL) para avaliação da morte celular programada, utilizando o *kit* comercial *ApopTag plus*

peroxidase (Chemicon, Temecula CA, EUA). O lobo inferior e médio direito de cada pulmão foi encaminhado para análise por FTIR-PAS.

### *Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com detecção Fotoacústica (FTIR-PAS)*

A base de funcionamento desta técnica é o interferômetro de Michelson (Figura 4.3), contendo um espelho móvel e outro fixo. À medida que o espelho móvel se desloca, o divisor de feixe direciona o feixe para os dois espelhos, gerando uma diferença de caminho óptico para os feixes refletidos em ambos os espelhos, que ao atingirem o detector estarão em diferença de fase, originando assim um interferograma.

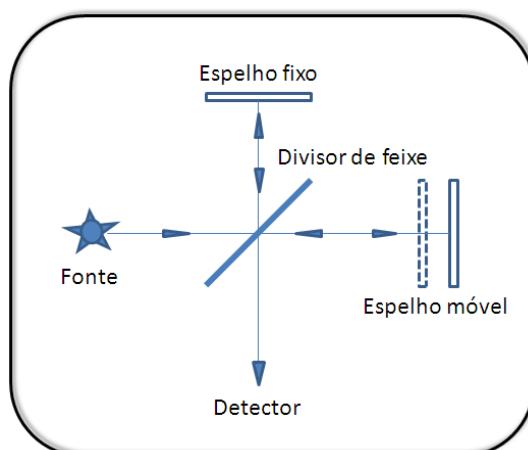


Figura 4.3. Modelo representativo do interferômetro de Michelson.

Nos Espectrômetros de Transformada de Fourier, o espelho móvel do interferômetro oscila sobre sua posição. No modo step scan, a velocidade do espelho é interrompida com determinada frequência de modulação e de amplitude. Desta forma, a modulação de fase do sinal fotoacústico é fornecida.



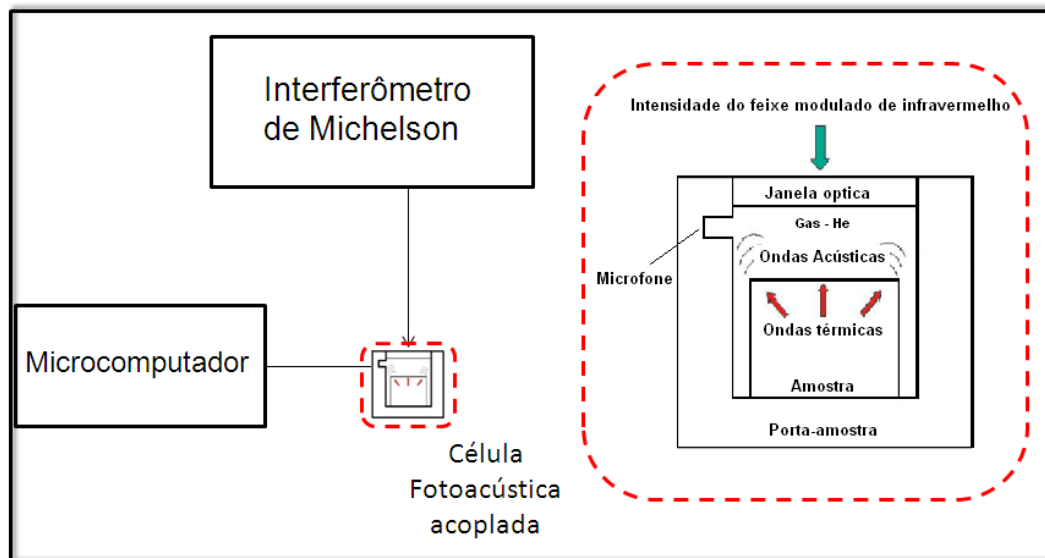


Figura 4.4. Representação esquemática da FTIR-PAS.

Uma transformada de Fourier converte o sinal obtido no domínio do tempo para o domínio de frequências. Como não se usam monocromadores em instrumentos FTIR, a totalidade da faixa de radiação chega simultaneamente na amostra com grande ganho de tempo, permitindo resoluções extremamente altas. O resultado de várias varreduras é combinado para diminuir o ruído, e espectros excelentes podem ser obtidos com pequena quantidade de amostra <sup>[48]</sup>.

A modulação do sinal Fotoacústico é assegurada pelo processador de aquisição, que realiza uma transformada de Fourier, via software, originando um espectro (Figura 4.4) <sup>[82]</sup>. Quando as ligações químicas dos componentes da amostra oscilam nas mesmas frequências da radiação IR incidente, uma banda de absorção pode ser detectada <sup>[82-84]</sup>. O fato de que a técnica fornece uma modulação uniforme de frequência para todos os números de onda e, conseqüentemente, uma inspeção uniforme de profundidade, representa a vantagem mais importante deste método. Ele dá a capacidade de realizar perfis de profundidade controláveis da amostra.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Parte I - Espectroscopia fotoacústica para o estudo da difusão de um extrato de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. em feridas cutâneas

A espectroscopia fotoacústica tem se mostrado um excelente método para avaliar a permeação de fitofármacos na pele íntegra ou lesionada <sup>[84]</sup>. Neste estudo avaliou-se por espectroscopia fotoacústica no UV-Vis se os componentes do extrato bruto obtido de cascas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (sibipiruna), incorporado a uma forma farmacêutica gel, foram capazes de atravessar a pele excisionada. Foram analisados vários períodos de tempo que caracterizam diferentes estágios morfológicos da cicatrização.

A figura 5.1 mostra os espectros de absorção óptica do extrato bruto de *C. peltophoroides*, do gel base, e do gel contendo 1% de extrato bruto. Nota-se que o extrato bruto apresenta absorção intensa, com uma estrutura de bandas superpostas em quase toda região do UV-Vis.

O gel base quase não apresentou absorção óptica nesta região espectral. Após a adição do extrato bruto de *C. peltophoroides*, 1%, ao gel, foram observadas duas bandas nas regiões de 280 e 380 nm. A partir de um tratamento matemático com ajuste utilizando funções gaussianas (Figura 5.2), foi possível mostrar a absorção do extrato bruto no gel base. Observa-se que existem três picos, em 249, 295 e em 353 nm. Esta análise possibilitou a identificação da formulação na pele, como demonstrado mais adiante.

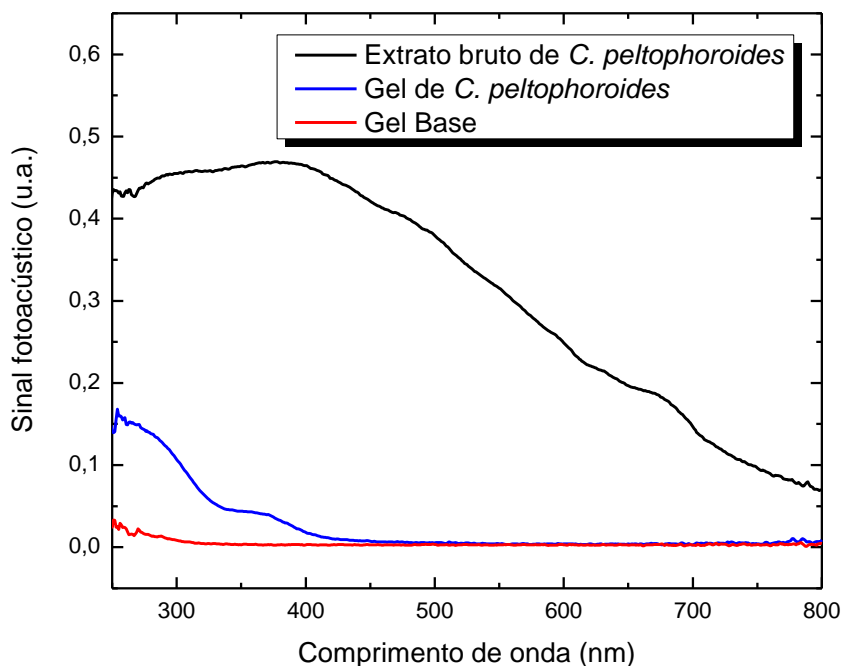


Figura 5.1. Espectro de absorção óptica do extrato bruto de *Caesalpinia peltophoroides* Benth., do gel base e do gel contendo 1% de extrato bruto.

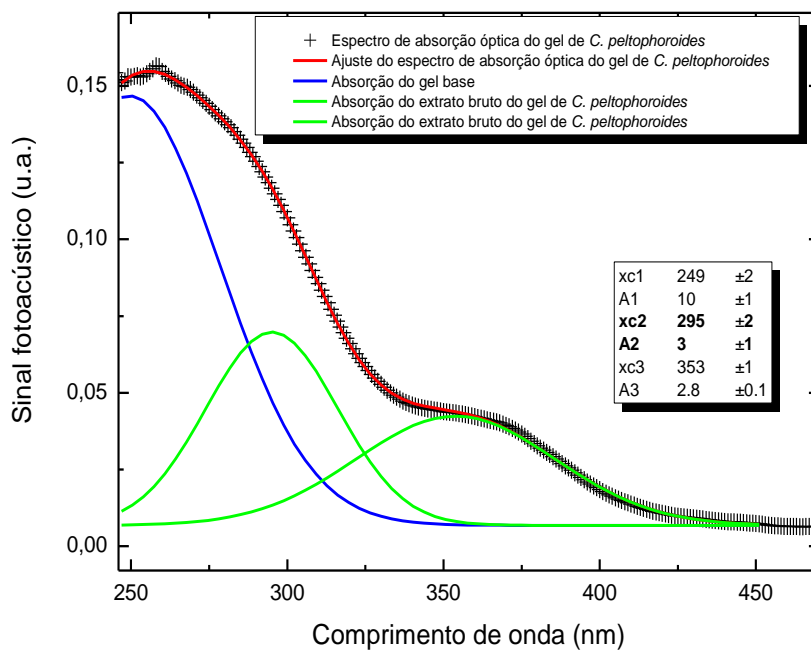


Figura 5.2. Espectro de absorção óptica do gel de *C. peltophoroides*. Curvas gaussianas ajustadas, associadas ao gel base (azul) e ao extrato bruto (verdes). A curva vermelha representa o espectro total ajustado.

Para as análises *ex-vivo*, as medidas foram realizadas nas amostras de pele com feridas cutâneas que receberam a aplicação tópica do gel base ou do gel de *C. peltophoroides*. As medidas foram feitas iluminando-se a face epidermal, onde a formulação foi aplicada, e também no lado da face dermal. A modulação da luz incidente foi de 22 Hz. Os resultados estão mostrados nas figuras 5.3 e 5.4.

Os espectros das figuras 5.3 e 5.4 mostram que a absorção gerada pelo extrato bruto ocorre em comprimentos de onda muito próximos daqueles que a pele também absorve, entre 260 e 410 nm <sup>[85]</sup>. Isto dificultou a decomposição do espectro principalmente porque a concentração do extrato bruto no gel é muito pequena, e assim a intensidade do espectro foi determinada majoritariamente pela absorção da pele e do sangue. Além disso, as leituras dos espectros de absorção das feridas cutâneas dependem das quantidades de formulação aplicadas nas feridas.

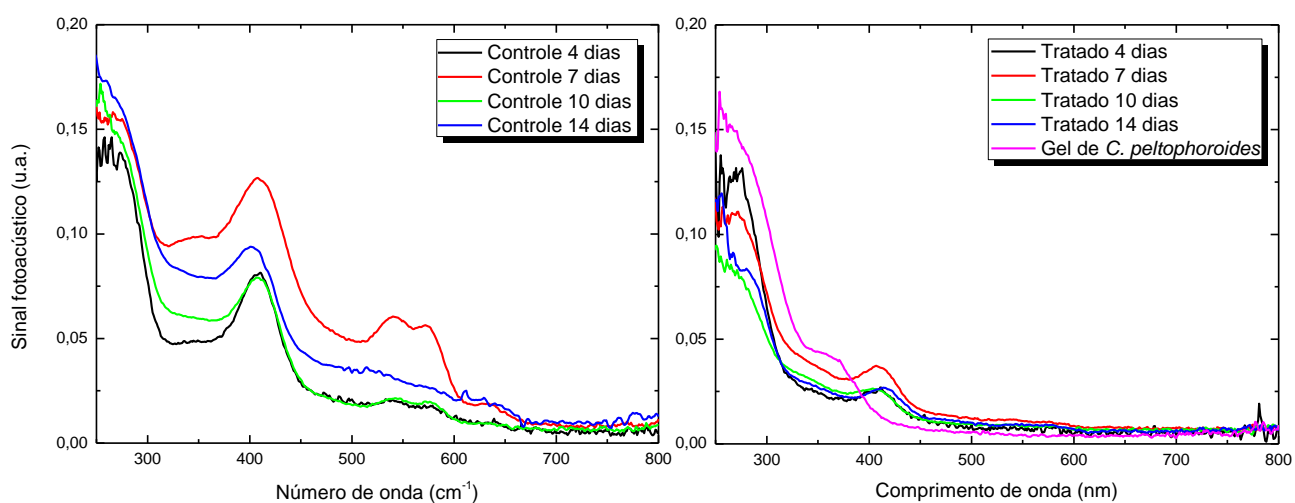


Figura 5.3. Espectros de absorção óptica da face epidermal: do lado esquerdo, as amostras controles com aplicação tópica do gel base; do lado direito, as amostras tratadas com aplicação tópica do gel de *C. peltophoroides*. A iluminação foi no lado da epiderme, com a frequência de modulação em 22 Hz.

A banda de absorção em torno de 400 nm, que não está presente no gel base, no extrato bruto e nem no gel de *C. peltophoroides*, é atribuída ao sangue remanescente na área lesada <sup>[85]</sup>.

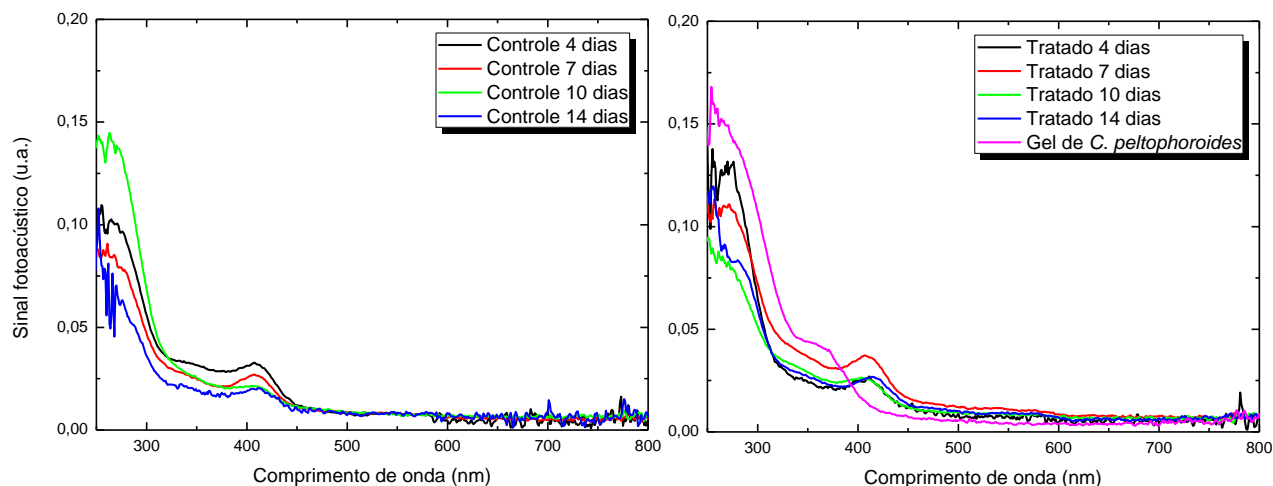


Figura 5.4. Espectros de absorção óptica da face dermal: lado esquerdo, amostras controles com aplicação tópica no lado epidermal do gel base; lado direito, amostras tratadas com aplicação tópica no lado epidermal do gel de *C. peltophoroides*. A iluminação foi no lado da derme, com a frequência de modulação em 22 Hz.

Para ilustrar o processo de permeação na pele, foi feita a subtração dos espectros da derme da pele tratada com o gel de *C. peltophoroides* daqueles da pele tratadas com gel base. Os resultados estão mostrados na Figura 5.5. Uma vez que estas medidas foram realizadas no lado oposto em relação aquele onde o gel de *C. peltophoroides* foi aplicado, a presença de bandas nos espectros subtraídos, em torno de 290 nm, indica que houve permeação da formulação através da ferida. Nota-se que isto ocorreu mesmo após 14 dias de tratamento.

Para quantificar a penetração da formulação em função dos dias de tratamento, as curvas subtraídas foram ajustadas com funções gaussianas, mostradas na figura 5.6. O cálculo da área foi realizado tomando-se como referência a banda em torno de 290 nm, uma vez que ela é proveniente do extrato bruto de *C. peltophoroides*. Este procedimento foi feito em duplicata para cada dia de tratamento. As áreas médias obtidas estão mostradas na figura 5.7, e revelam o comportamento da permeação do fármaco na ferida do animal em função do período de tratamento.

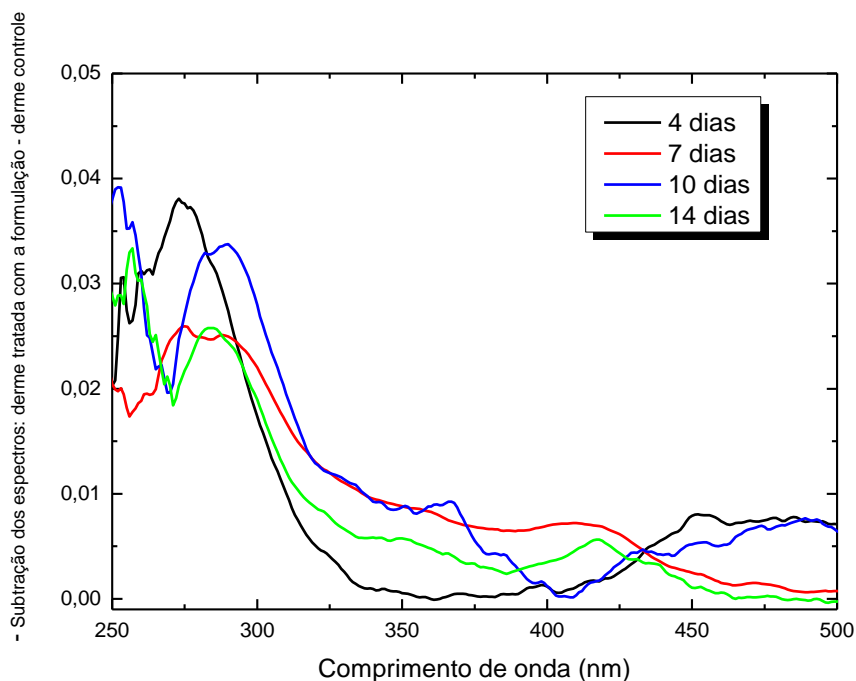


Figura 5.5. Subtração dos espectros da face dermal tratada com o gel de *C. peltophoroides* pela face dermal controle, que teve aplicação tópica do gel base no lado epidermal.

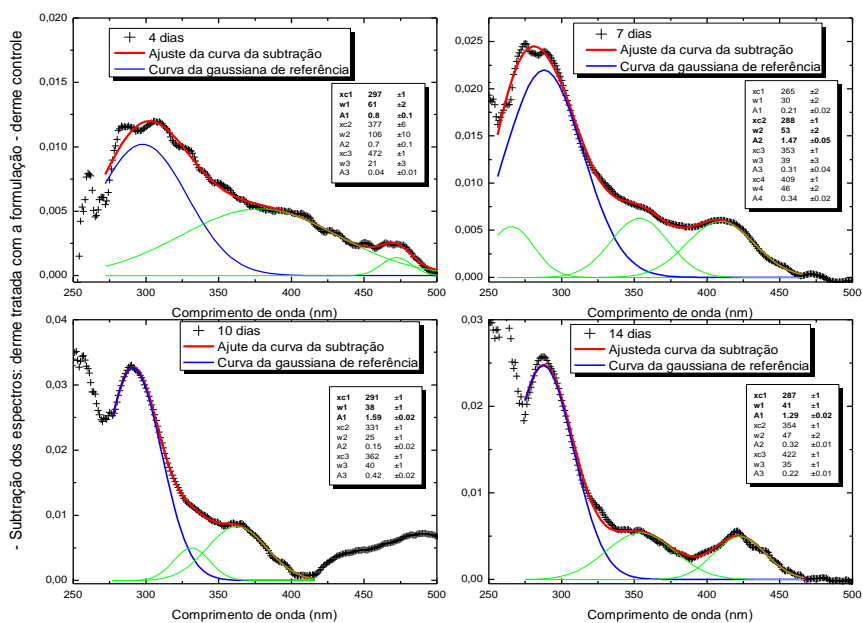


Figura 5.6. Curvas da subtração dos espectros da face dermal tratada com o gel de *C. peltophoroides* pela face dermal controle, ajustadas com funções gaussianas.

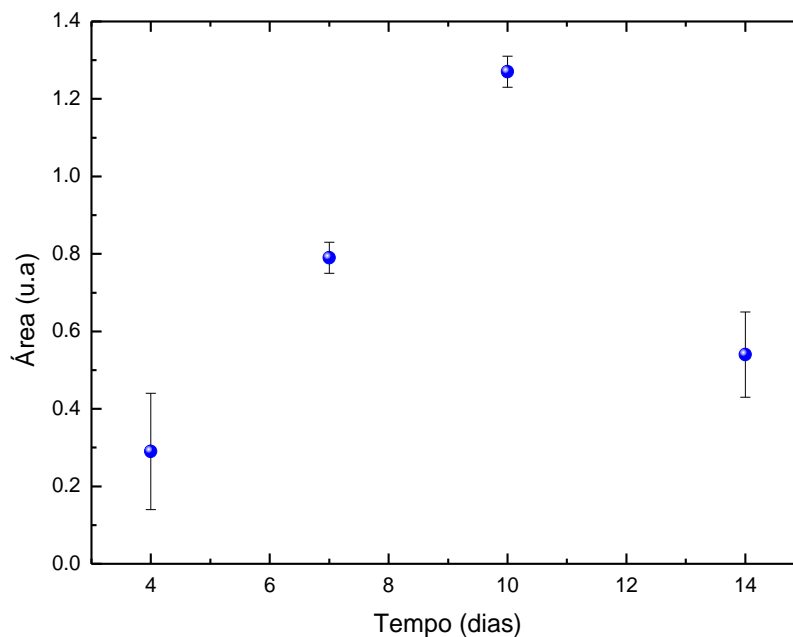


Figura 5.7. Comportamento da difusão do gel de *C. peltophoroides* nas feridas em função do período de tempo de tratamento.

As taxas de difusão de fármacos nas feridas são influenciadas pela evolução morfológica decorrente do reparo. A reepitelização é um dos eventos mais importantes da cicatrização da pele porque tem a finalidade de reestabelecer a função de barreira deste órgão. Para avaliar a influência de *C. peltophoroides* na reepitelização o número de mitoses bloqueadas em metáfase num período de duas horas foi determinado (Figura 5.8).

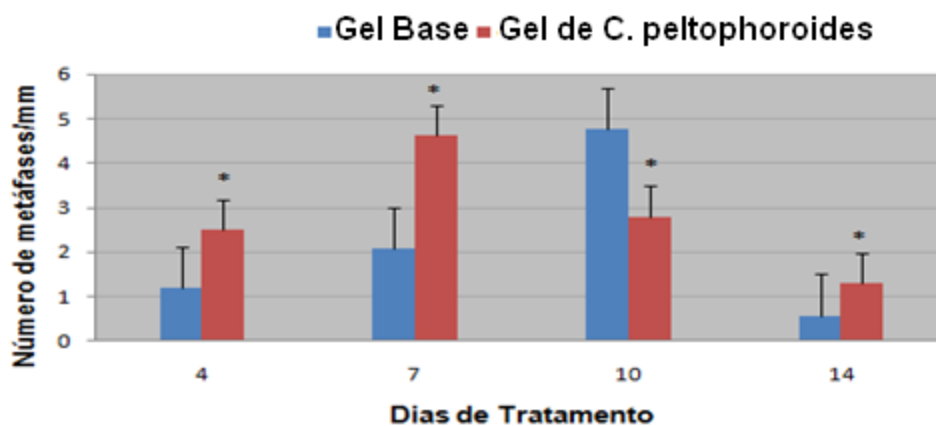


Figura 5.8. Representação da média±EPM do número de metáfases contadas na camada basal e suprabasal da área reepitelizada das feridas com tratamento aos 4, 7, 10 e 14 dias.

A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico ANOVA com  $*(P<0,05)$  em relação aos dados da amostra controle. Medidas realizadas pela doutoranda Fernanda Bueno<sup>[60]</sup>.

O número de metáfases aumentou significativamente e progressivamente após 4 e 7 dias de tratamento com o gel de *C. peltophoroides* em comparação com as feridas tratadas com o gel base. Paralelamente, nos períodos de 4, 7 e 10 dias a quantidade de gel de *C. peltophoroides* detectado na face dermal aumentou gradativamente e declinou após 14 dias de tratamento das feridas. No 10º dia, quando detectou-se a maior taxa de permeação, foi quantificado o menor número de metáfases ( $p<0,05$ ) nas feridas tratadas com o gel de *C. peltophoroides*.

No processo de reepitelização de feridas excisionais ocorre um *pool* inicial na atividade proliferativa, com a finalidade de repor as células perdidas<sup>[68]</sup>. Segue-se então uma diminuição da proliferação dos queratinócitos e aumento na atividade de migração, com a finalidade de cobrir o leito ferido<sup>[68]</sup>. Neste estudo, feridas tratadas e controles apresentaram a mesma curva na evolução da proliferação da epiderme.

O gel de *C. peltophoroides* apresentou um significativo efeito estimulatório sobre a proliferação epitelial. O maior pico proliferativo foi observado após 7 dias de tratamento, enquanto que nas feridas controle, sem estímulo medicamentoso, a proliferação epitelial progrediu até o 10º dia. Este resultado sugere que o gel de *C. peltophoroides* pode aumentar a velocidade de reepitelização.

A redução significativa no número de metáfases no mesmo período em que se observa a maior taxa de permeação do fármaco, 10º dia, conforme mostrado na Figura 5.7, mostra que mesmo na presença de maior concentração do fármaco, o epitélio parece não ter perdido seu equilíbrio cinético, ou seja, somente foram produzidos o número de células necessárias para a restauração da continuidade epitelial, uma vez que observa-se neste período, um declínio significativo no número de metáfases.

A reepitelização da pele é um evento que envolve proliferação e migração dos queratinócitos. Neste estudo a migração não foi avaliada e por esta razão não podemos afirmar se *C. peltophoroides* estimulou o processo de reepitelização como um todo. Mais estudos envolvendo a cinética da reepitelização e a expressão de fatores de crescimento contribuiriam para dar suporte aos nossos resultados.

Outra ponto que merece atenção neste estudo é a elevada taxa de permeação do extrato de *C. peltophoroides* detectada no 10º dia do reparo mesmo com o reestabelecimento quase completo da continuidade epitelial. Neste caso três



hipóteses podem ser implicadas: a primeira sugere que a formulação tem elevado poder de permeação; a segunda hipótese sugere que poderia ter ocorrido um atraso na diferenciação dos queratinócitos e conseqüentemente na queratinização da epiderme, permitindo desta forma que o gel permeasse com facilidade por um período maior de tempo; e a terceira sugere uma redução na vascularização, o que provocaria um retardo na absorção sistêmica do medicamento que seria detectado em maior concentração na região da ferida.

Pode-se observar na face epidermal (Fig. 5.3), nas amostras tratadas com o gel de *C. peltophoroides* e nas amostras com o gel base, a presença de bandas referentes à hemoglobina. A hemoglobina oxigenada, ou oxi-hemoglobina, se caracteriza pelo estado reduzido ou ferroso ( $Fe^{2+}$ ) do ferro inserido no grupo heme. Entretanto, as contínuas reações metabólicas do organismo, entre elas a cicatrização, do organismo, liberam produtos químicos com alto potencial oxidativo, mudando o ferro da hemoglobina para o estado férrico ( $Fe^{3+}$ ) e formando a meta-hemoglobina [86-88].

A oxi-hemoglobina tem absorções específicas em 540 e 577 nm, a meta-hemoglobina tem dois comprimentos de ondas com maior intensidade de absorção em 500 nm e em 630 nm [87-88].

A figura 5.9 mostra que os espectros das amostras controles e tratadas, após quatro dias de tratamento, apresentam três bandas de absorção óptica de baixa intensidade, em 540 e 570 nm atribuídas à oxi-hemoglobina e em 630 nm à meta-hemoglobina.

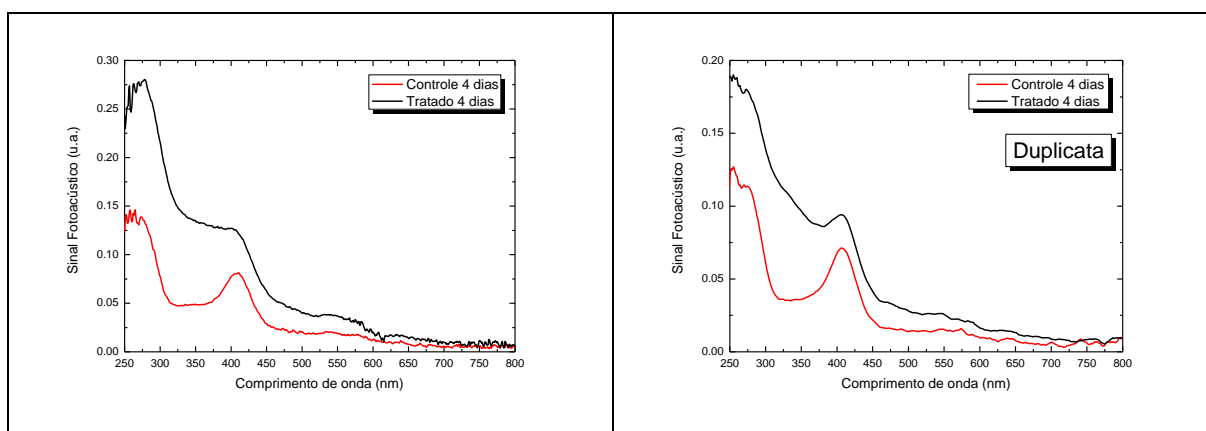


Figura 5.9. Espectro de absorção óptica da face epidermal controle e da tratada com o gel de *C. peltophoroides* após quatro dias de tratamento. Os espectros do lado direito referem-se às duplicatas.

Aos 7 dias, nas feridas controle, foram observadas as maiores bandas de absorção para oxi-hemoglobina (Figura 5.10). Este período do processo cicatricial se caracteriza pela ocorrência de um pico de vascularização na região da ferida [85]. As feridas controles e tratadas de 10 dias apresentaram bandas semelhantes de oxi-hemoglobina com destaque neste período, para um aumento na banda de absorção óptica em 630 nm, da meta-hemoglobina nas feridas tratadas com gel de *C. peltophoroides*. Aos 14 dias as bandas de absorção foram menos intensas do que aos 10 dias. Neste período as intensidades para oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina foram maiores nas feridas tratadas com o gel de *C. peltophoroides*.

A formação de meta-hemoglobina, como dissemos antes, está relacionada com a oxidação do  $Fe^{2+}$  da oxi-hemoglobina, que passa para  $Fe^{3+}$ . A maior presença de meta-hemoglobina nas feridas tratadas poderia estar relacionada com a formulação do gel de *C. peltophoroides*, sendo, provavelmente, induzida pelos nitratos presentes na planta, que absorve esta substância do solo, resultando no processo de nitrificação transformando nitrato em nitrito [89-90].

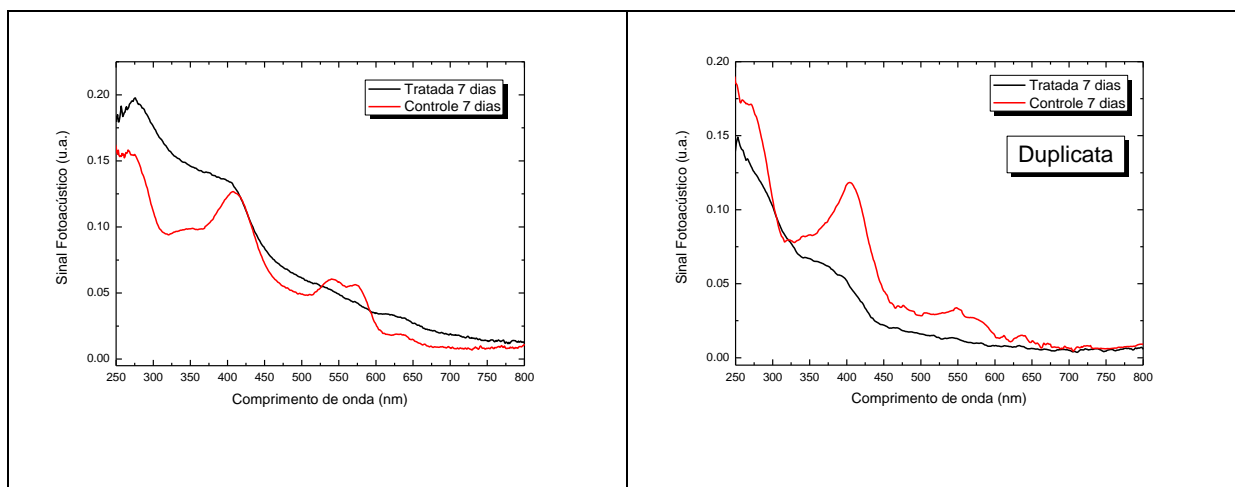
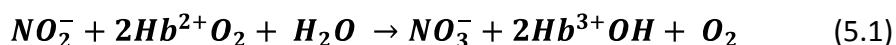


Figura 5.10. Espectro de absorção óptica da face epidermal controle e da tratada com o gel de *C. peltophoroides* após sete dias de tratamento. Os espectros do lado direito referem-se às duplicatas.

O mecanismo bioquímico de oxidação da hemoglobina pelo nitrito não está ainda totalmente esclarecido [91]. Provavelmente ocorra a passagem do nitrito a nitrato, juntamente com transformação da oxi-hemoglobina em hidróxido de meta-hemoglobina e redução da água, conforme a equação:



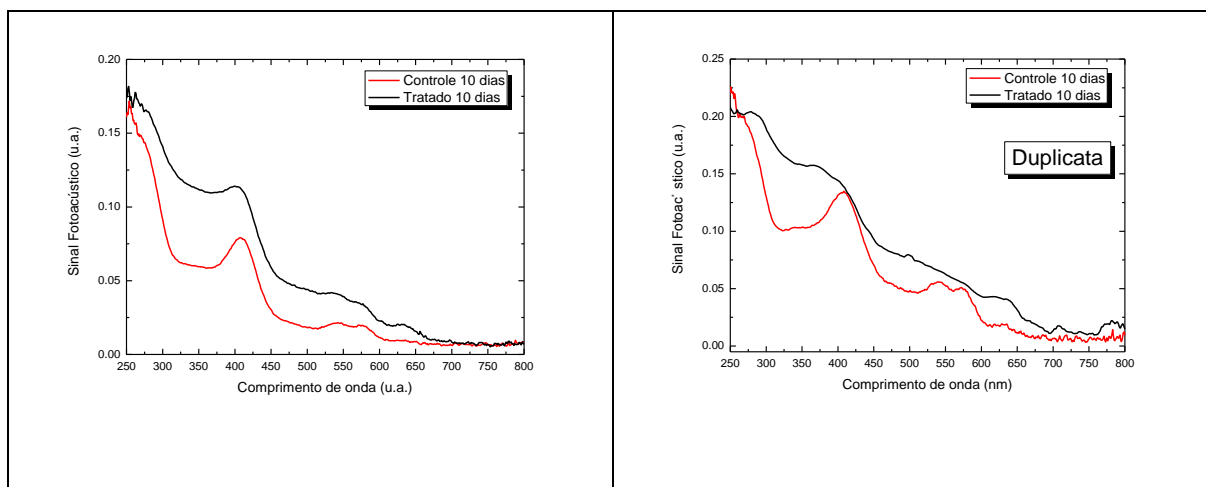


Figura 5.11. Espectro de absorção óptica da face epidermal controle e da tratada com o gel de *C. peltophoroides* após 10 dias de tratamento. Os espectros do lado direito referem-se às duplicatas.

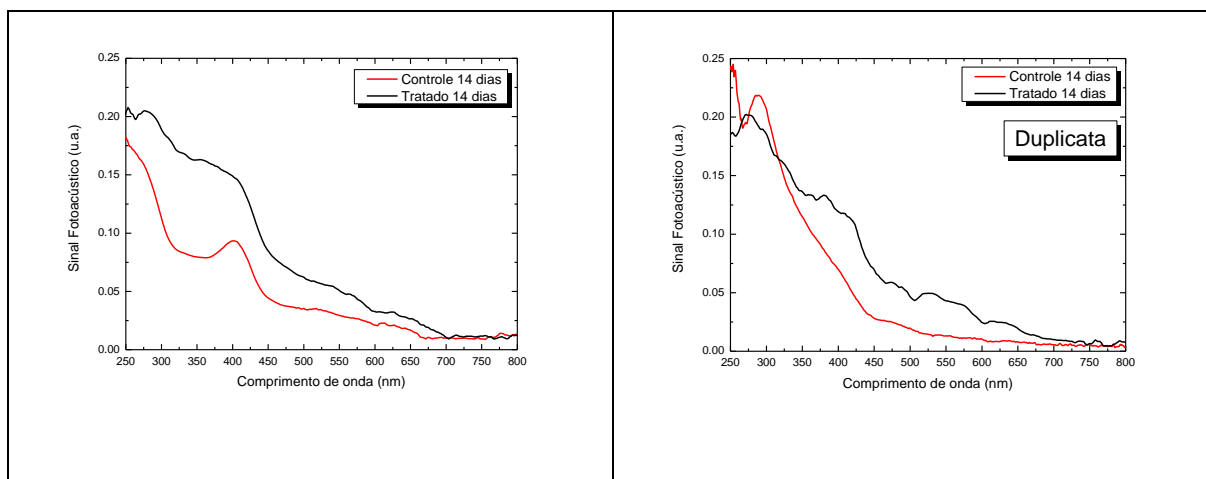


Figura 5.12. Espectro de absorção óptica da face epidermal controle e da tratada com o gel de *C. peltophoroides* após 14 dias de tratamento. Os espectros do lado direito referem-se às duplicatas.

Estes resultados sugerem que ao se monitorar as bandas do sangue, pode-se obter a informação da hemoglobina na transformação do seu estado oxigenado (oxi-hemoglobina) para o estado oxidado (meta-hemoglobina).

## 5.2 Parte II – FTIR-PAS como método de estudo da *Paracoccidioidomicose*

A Figura 5.13 mostra o espectro de absorção óptica do tecido do pulmão do camundongo *Swiss* sem infecção. A atribuição de cada banda de absorção óptica está indicada na tabela 5.1.

As bandas identificadas nos números de onda  $\sim 1087\text{ cm}^{-1}$  e  $1242\text{ cm}^{-1}$  são originadas, respectivamente, de ligações simétricas e assimétricas do estiramento das vibrações de íons dos grupos fosfato, que fazem parte do DNA. Para a amida I foi em  $1681\text{ cm}^{-1}$  e para a amida II em  $1527\text{ cm}^{-1}$ . No caso do grupo  $\text{CH}_3$  ocorre em  $\sim 1450, 2854, 2924\text{ cm}^{-1}$ , e para o C-C/C-O em  $\sim 972\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao grupo funcional da desoxirribose-ribose [92-94].

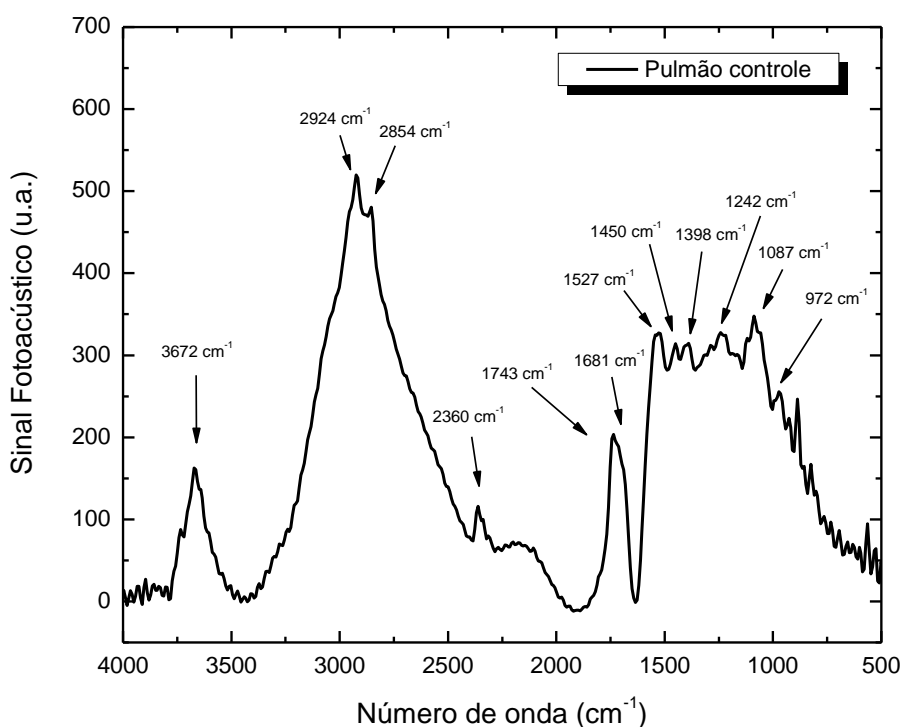


Figura 5.13. Espectro de absorção do pulmão do camundongo *Swiss* controle.

Tabela 5.1. Atribuições para as posições dos picos do espectro no infravermelho

Posição do Pico (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	Maior contribuição	Referências
3672	Amina, N-H, OH Livre	Proteínas	Karippalet <i>et al.</i> , 2010 <sup>[95]</sup> .
2924	CH <sub>2</sub> anti-simétrico	Proteínas e Lipídios	Wartewiget <i>et al.</i> , 2005 <sup>[96]</sup> .
2854	CH <sub>2</sub> simétrico	Proteínas e Lipídios	Wartewiget <i>et al.</i> , 2005 <sup>[96]</sup> .
2360	CO <sub>2</sub>	Proteínas	Taraschewskiet <i>et al.</i> , 2005 <sup>[97]</sup> .
1743	C=O Vibração em estiramento	Proteínas	Afanasyeva <i>et al.</i> , 2000 <sup>[98]</sup> .
1681	Amida I (C=O, C - N, C-C, N-H)	Proteínas	Brooks <i>et al.</i> , 1999 <sup>[99]</sup> . Afanasyeva <i>et al.</i> , 2000 <sup>[98]</sup> . Salman <i>et al.</i> , 2003 <sup>[100]</sup> . Yang <i>et al.</i> , 2009 <sup>[101]</sup> .
1527	Amida II (N-H, C-N, CN-H)	Proteínas	Brooks <i>et al.</i> , 1999 <sup>[99]</sup> . Afanasyeva <i>et al.</i> , 2000 <sup>[98]</sup> . Yang <i>et al.</i> , 2009 <sup>[101]</sup> .
1450	CH <sub>3</sub> anti-simétrico	Fosfolipídios	Yang <i>et al.</i> , 2009 <sup>[101]</sup> .
1398	Grupo COO <sup>-</sup>	Proteínas	Sindhuphak <i>et al.</i> , 2003 <sup>[102]</sup> . Yang <i>et al.</i> , 2009 <sup>[101]</sup> .
1234	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> anti-simétrico (grupo do fosfato)	Ácidos Nucléicos	Salman <i>et al.</i> , 2003 <sup>[100]</sup> . Yang <i>et al.</i> , 2009 <sup>[101]</sup> .
1087	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> simétrico	Ácidos Nucléicos	Salman <i>et al.</i> , 2003 <sup>[100]</sup> . Yang <i>et al.</i> , 2009 <sup>[101]</sup> .
972	C-C/C-O	Desoxirribos e-ribose	Zelig <i>et al.</i> , 2009 <sup>[103]</sup> . Di Giambattista <i>et al.</i> , 2011 <sup>[104]</sup> .

A Figura 5.14 mostra os espectros das amostras do pulmão após 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção com a fração Pb18. Os espectros estão normalizados pela banda da amida II, em 1527 cm<sup>-1</sup>, e que corresponde, principalmente, à flexão no

plano do grupo funcional N-H presente no grupo amida das proteínas <sup>[105]</sup>. Esta banda foi adotada como referência porque apresentou a menor variação ao longo do período de tempo após a infecção. Para minimizar fatores como o tamanho e umidade da amostra, que podem influenciar na amplitude do sinal fotoacústico, foram calculadas as razões entre as intensidades das bandas de absorção no próprio espectro. Paralelamente, as mudanças espectrais foram relacionadas com as observações histológicas.

Nos pulmões dos camundongos infectados com Pb foram encontradas mudanças conformacionais nas seguintes regiões do espectro de absorção: amida I ( $1681\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_3$  ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ), fosfato assimétrico ( $1242\text{ cm}^{-1}$ ) e grupo C-C/C-O ( $972\text{ cm}^{-1}$ ).

A razão amida I/amida II mostra as alterações ocorridas na amida I em função da amida II no decorrer do período experimental, caracterizada por uma redução na 2ª semana, seguido de um aumento até a 8ª semana (Figura 5.15). O aumento da razão amida I/amida II poderia estar relacionado com a maior quantidade de colectinas, que são proteínas do surfactante pulmonar que têm a capacidade de fazer ligação com moléculas de superfície expressas por microorganismos, e de modular várias funções do sistema mononuclear fagocitário, incluindo a internalização e morte dos microorganismos <sup>[106]</sup>.

Neste trabalho as colectinas não foram quantificadas, mas a resposta inflamatória foi monitorada e apresentou uma evolução temporal, na qual, a resposta imune foi levemente mais acentuada na segunda semana, em relação à primeira (Figura 5.16 - E.1). Nos dois períodos avaliados, a maior parte das leveduras se localizou no parênquima e uma menor quantidade de fungos fragmentados ocupava o interior de macrófagos (Figura 5.16 - E.2). A resposta inflamatória se intensificou ao longo da quarta e oitava semanas, com o aumento da celularidade localizados no parênquima pulmonar. Na oitava semana foram observados grandes números de macrófagos com fragmentos de Pb fagocitados (Figura 5.16 - E.3 e E.4).

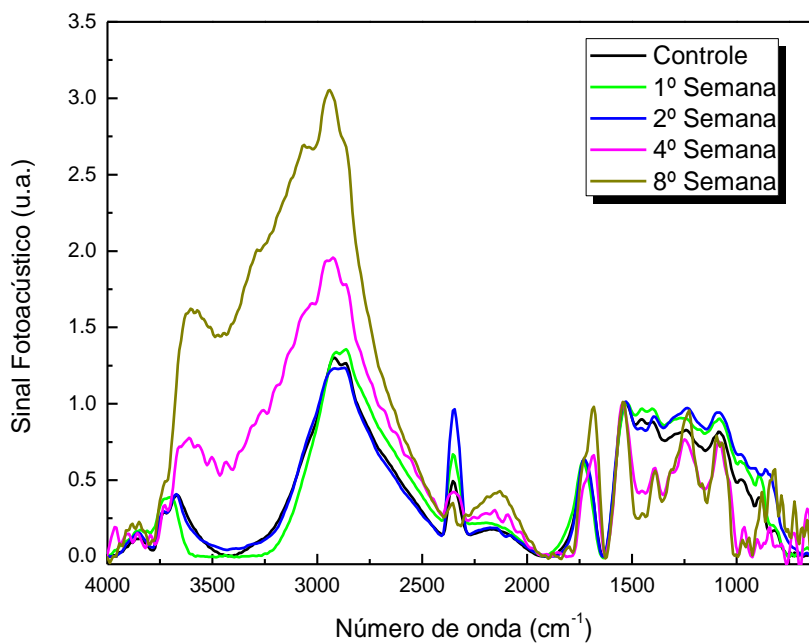


Figura 5.14. Espectro FTIR-PAS do pulmão de camundongo Swiss infectado com Pb18, após 1, 2, 4 e 8 semanas.

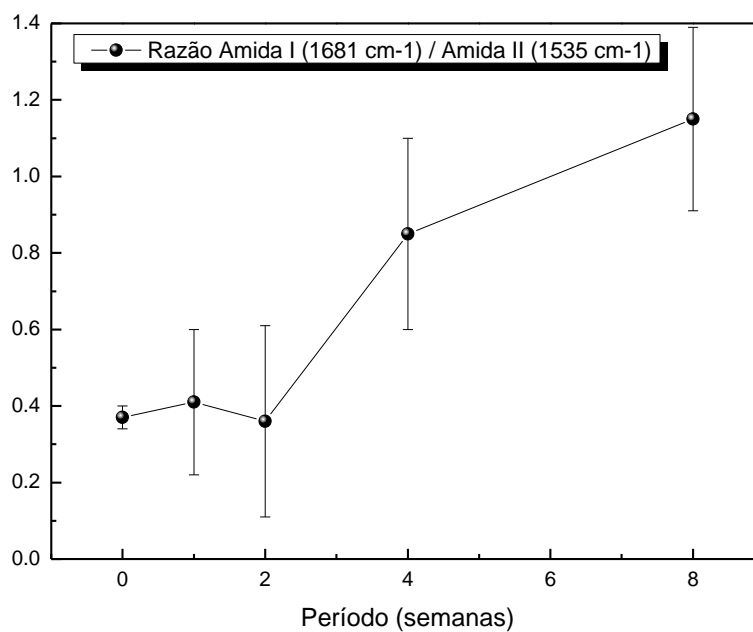


Figura 5.15. Razão entre as intensidades das bandas de absorção óptica: amida I/amida II.

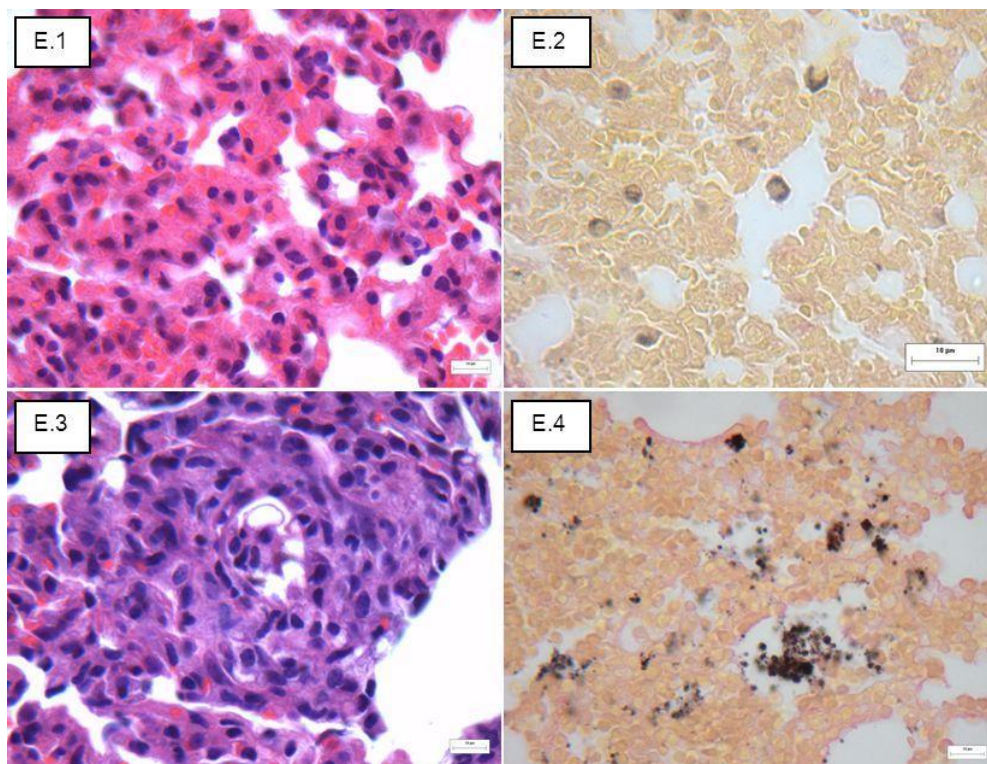


Figura 5.16. Fotomicrografia de pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb18. E.1 e E.2 após 2 semanas. E.3 e E.4 após 8 semanas. E.1 e E.3 corados por H&E, E.2 e E.4 corados por Gomori-grocott. Aumento Original: 100x. Estas medidas foram realizadas pela mestre Edilaine Martins Moratto <sup>[81]</sup>.

Dessa forma, considerando que os macrófagos são as células mais envolvidas na defesa contra Pb <sup>[107]</sup>, podemos inferir indiretamente que a evolução da razão amida I/amida II, que tem sido relacionada com o aumento do teor de proteínas <sup>[101]</sup>, acompanhou aquela do processo inflamatório, observado por meio das técnicas histológicas.

A Figura 5.17 mostra a razão  $\text{CH}_3$ /amida II na qual observa-se que houve um declínio do grupamento  $\text{CH}_3$  em função da amida II. Vibrações de estiramento em  $\text{CH}_3$  ( $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ ) correspondem aos fosfolipídios <sup>[101]</sup>. A redução dos fosfolipídios pode estar relacionada ao aumento da fosfolipase B, enzima que hidrolisa as ligações éster presentes nos fosfolipídios, um dos fatores de virulência de Pb necessário para eventos iniciais da infecção <sup>[108]</sup>. Entretanto, a fosfolipase está envolvida na modulação da resposta imune inata e adquirida <sup>[109]</sup>, contribuindo na regulação da ativação de macrófagos <sup>[108]</sup>. Dessa forma, a hipótese é a de que a redução progressiva do radical  $\text{CH}_3$  corresponderia à diminuição progressiva de



moléculas de fosfolipídios, resultante do contínuo aumento da fosfolipase, que por sua vez representa um reflexo direto da evolução da infecção e indireto da resposta inflamatória.

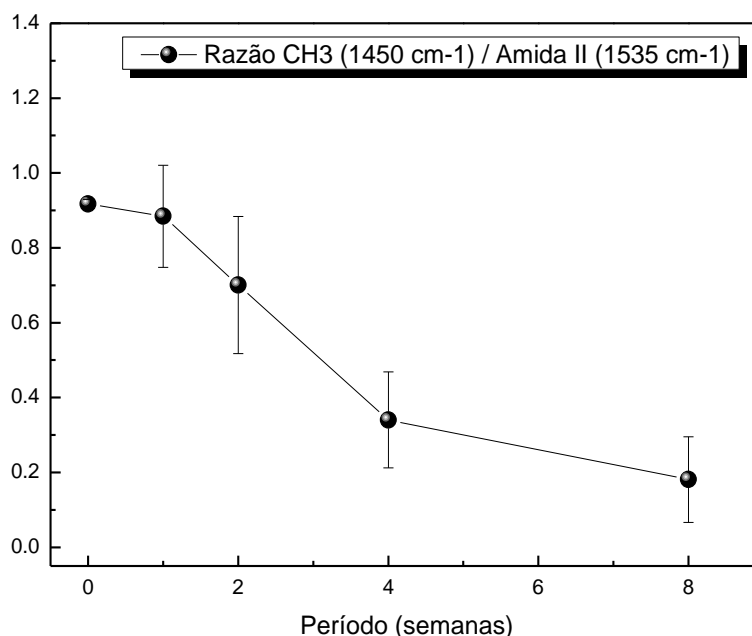


Figura 5.17. Razão da intensidade da banda do grupo CH<sub>3</sub> em relação a grupo da amida II.

A razão fosfato assimétrico (1234 cm<sup>-1</sup>) em função da amida II (1535 cm<sup>-1</sup>) está ilustrada na Figura 5.18. A diminuição do fosfato assimétrico foi relacionada anteriormente com o aumento de morte celular programada <sup>[110]</sup>. A avaliação qualitativa do pulmão corado para TUNEL demonstrou uma maior quantidade de células TUNEL-positivas nas 1<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas de infecção, períodos nos quais foram observadas as menores razões fosfato/amida II.

A intensidade de absorção nas vibrações de fosfato assimétrica permite avaliar mudanças qualitativas e quantitativas nos fosfolipídeos e ácidos nucleicos <sup>[111]</sup>. O estudo *in situ* de células cancerosas, por espectroscopia de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), tem revelado que no processo de apoptose ocorre um decréscimo na razão fosfato/proteína <sup>[101]</sup>. Além disso, a apoptose tem sido identificada por meio de observação da redução da quantidade de fosfato em fibroblastos malignos utilizando a razão da média das bandas de absorvância dos grupos fosfato assimétrico (1151-1350 cm<sup>-1</sup>) em relação à amida II <sup>[100]</sup>.

A diminuição dos grupamentos C-C/C-O ( $970\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 5.18) têm sido relacionada com a mudança na absorbância de DNA e aumento de morte celular programada <sup>[102]</sup>, a mesma forma, a diminuição na absorção de ribose (C-O) foi relacionada com o aumento na frequência de apoptoses <sup>[104]</sup>.

As oscilações na frequência de células TUNEL-positivas podem estar relacionadas com variações na intensidade de infecção, de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro. Observamos picos de infecção mais intensos com maior frequência de células em apoptose, na 1ª e 4ª semanas. Na 2ª e 8ª semanas, haviam menos células marcadas (Figura 5.19).

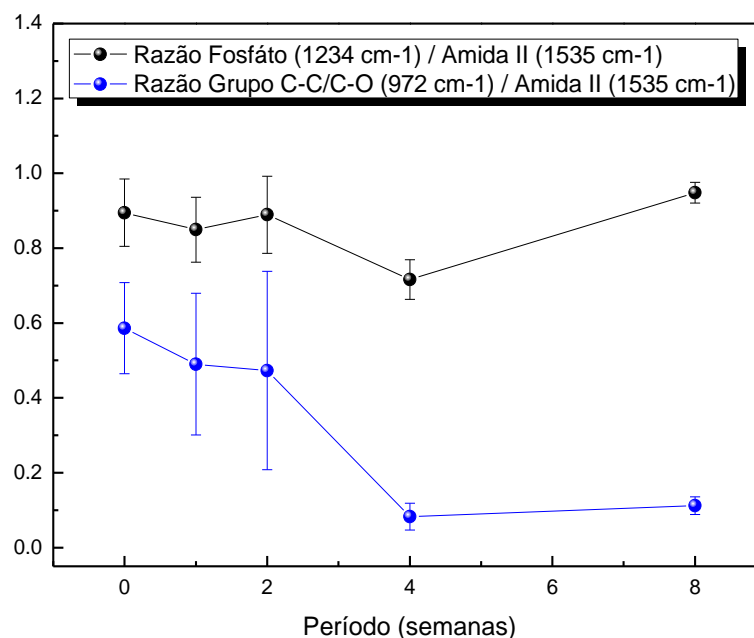


Figura 5.18. Em preto: razão do grupo fosfato pela Amida II; em azul: razão do grupo C-C/C-O pela Amida II.

Dessa forma, conclui-se que o pulmão infectado por Pb apresentou alterações estruturais que variaram de acordo com o período de tempo analisado e que as mudanças nas bandas de absorção óptica de vários grupamentos químicos foram uma consequência dessas alterações morfológicas. Até onde se sabe essa é a primeira vez que foi utilizado FTIR-PAS como método de estudo da paracoccidioidomicose experimental. Nossos resultados sugerem que este método pode se tornar uma técnica promissora para o estudo desta patologia.

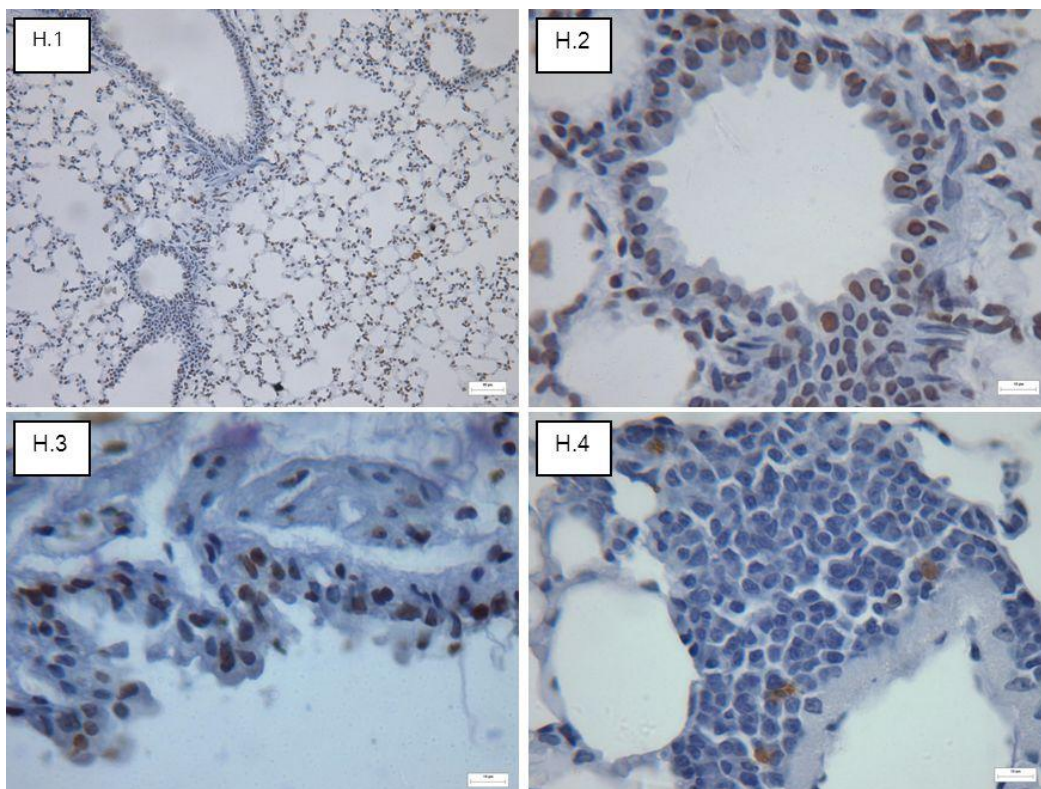


Figura 5.19. Fotomicrografia de cortes histológicos do pulmão de camundongos *Swiss* infectados por Pb18 corados por TUNEL e contra-corados por Hematoxilina de Meyer evidenciando células em apoptose. H.1(20x) e H.2(100x) na primeira semana e H.3(100x) e H.4(100x) na quarta e oitava semana, respectivamente. Estas medidas foram realizadas pela mestre Edilaine Martins Moratto <sup>[81]</sup>.

## Conclusões

Em conclusão, os resultados do primeiro estudo mostraram que a taxa de difusão da formulação de *C. peltophoroides* foi dependente do estágio de cicatrização das feridas. A técnica PAS foi eficaz em demonstrar o potencial de permeação do gel de *C. peltophoroides* em feridas excisionais em diferentes etapas da cicatrização. A maior taxa de permeação ocorreu no 10<sup>o</sup> dia de tratamento, período em que também foi observado um aumento na banda de absorção óptica da meta-hemoglobina. No segundo estudo, a avaliação físico-química mostrou que os pulmões infectados com Pb apresentaram mudanças significativas nos grupos funcionais amida I, CH<sub>3</sub> e fosfato, e que as mudanças nas bandas de absorção óptica foram uma consequência das alterações morfológicas ocorridas no pulmão infectado. Essas mudanças foram correlacionadas com a ocorrência de morte celular programada. Portanto, os resultados deste trabalho mostraram mais uma vez que a espectroscopia fotoacústica é uma técnica importante para se determinar a difusão de formulações em sistemas biológicos, permitindo que se faça, especificamente na cicatrização cutânea, uma correlação entre a taxa de difusão e os eventos biológicos do processo cicatricial. A técnica FTIR-PAS mostrou grande potencial para análise de alterações físico-químicas em sistemas biológicos sem a necessidade de reagentes ou manipulação da amostra, indicando que esta técnica pode tornar-se promissora para o estudo dos mecanismos físico-químicos envolvidos nos processos que resultam em apoptose.

## Referências

- [1] ROSENCWAIG, A. Biological studies with photoacoustic spectroscopy. *Bulletin of The American Physical Society*, 21 (3), 221-221, 1976.
- [2] ALLEN, J. R. L. V.; ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G. Formas Farmacêuticas&Sistemas de Liberação Modifica de Fármacos. *Ed. Artmed*, 8ª ed., 2007.
- [3] SEHN, E. *Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação de substâncias na pele humana in vivo*. Monografia. Departamento de Física. Universidade Estadual de Maringá-PR, 2004.
- [4] NUGLISCH, L. E. R. *Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação e a distribuição de medicamento na unha humana*. Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em Física. Universidade Estadual de Maringá-PR, 2004.
- [5] ASTRATH, A. C. N. *Espectroscopia Fotoacústica: avaliação da difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotossensibilizadores na dentina*. Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em Física. Universidade de Maringá-PR, 2011.
- [6] GASPARRI, F.; MUZIO, M.; Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochem. J.*, 369:239–248, 2003.
- [7] SEHN, E. *Utilização da Espectroscopia Fotoacústica na determinação da propagação das formulações de uso tópico utilizadas para a caracterização de lesões ulceradas da pele*. Dissertação de Mestrado. Programa de pós graduação em Física. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- [8] BARNES, P. M.; POWELL-GRINER E.; MCFANN K.; NAHIN R. L. Complementaryandalternative medicine use amongadults.*Adv Data*, United States, 343, 1-19, 2002.

[9] BLUMENTHAL, M.; FERRIER, G. K. L.; CAVALIERE, C. Total sales of herbal supplements in United States show steady growth. *HerbalGram*, 71, 64-66, 2006.

[10] MENNITI-IPPOLITO, F.; GARGIULO, L.; BOLOGNA, E.; FORCELLA, E.; RASCHETTI, R. Use of unconventional medicine in Italy: a nation-wide survey. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 58, 61-64, 2002.

[11] HARTEL, U.; VOLGER, E. Use and acceptance of classical natural and alternative medicine in Germany - findings of a representative population-based survey. *ForschKomplementarmedKlassNaturheilkd*, 11, 327-334. 2004.

[12] DE SMET, P. A. G. M. Herbal medicine: relaxing regulatory standards. *N.Engl. J. Med.*, 352, 1176-1178, 2005.

[13] MOMESSO, J. C. Análise do mercado nacional de fitoterápicos: Quais os passos, principais avanços, descobertas, capital movimentado e faturamento das indústrias de fitoterápicos. Palestra proferida em 27 de maio de 2002, São Paulo, SP, promovida pelo *Institute for International Research* do Brasil LTDA sobre o mercado de fitoterápicos.

[14] RIBEIRO, A. Q.; Leite, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 15, 65-70, 2005.

[15] SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16, 455-462. 2006.

[16] BARATA, L. E. S.; QUEIROZ, S. R. R. Contribuição Efetiva do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade. Campinas: MCT/PADCT/PGCT, 1995.

[17] BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 – Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos - de 16 de abril de 2010. Brasília, DF. 2010.

[18] GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.1,13-28, 2007.

[19] REIS, M. S. dos; MARIOT, A; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.3, 45-74, 2007.

[20] Site Wikipédia [http://pt.wikipedia.org/wiki/Planta\\_medicinal](http://pt.wikipedia.org/wiki/Planta_medicinal), acessado em 22/02/11.

[21] BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resultado da Consulta de Validação de Fitoterápicos: Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle\\_qualidade\\_extratos.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf). Acesso em: 20 de maio de 2011.

[22] CALICH, V. L.; VAZ, C. A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res. Immunol.*, 149, 407–417, 1998.

[23] LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. *Bras. Med.*, 22, 121–124, 1988.

[24] MCEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia, *J. Med. Vet. Mycol.*, 25, 165–175, 1987.

- [25] FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis, *J. Med. Vet. Mycol.*, 25, 5–18, 1987.
- [26] DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; SIQUEIRA, A. M. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood, 1984.
- [27] SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES, F.; de QUEIROZ, F.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L.; Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39, 297–310, 2006.
- [28] COCK, A. M.; CANO, L. E.; VÉLEZ, D.; ARISTIZÁBAI, B. H.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 42, 59–66, 2000.
- [29] VILANI-MORENO, F.; FECCHIO, D.; de MATTOS, M. C.; MOSCARDI-BACCHI, M.; DEFAVERI, J.; FRANCO, M. Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vs. susceptible mice. *Mycopathologia*, 141, 79–91, 1998.
- [30] NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E. Immunohistochemical demonstration of TGF- $\beta$  and decorin in paracoccidioidal granulomas. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36, 1073–1078, 2003.
- [31] HERIVEL. J. The Background to Newton's Principia: A study of Newton's dynamical researches in the years 1664-84. *Oxford: Clarendon Press*, 1965.
- [32] NEWTON, I. *Optica*. Trad. de André K. T. Assis. São Paulo, *EDUSP*, 1704. 294p.
- [33] FARA, P. Newton – the making of genius. New York: Columbia University Press, 2002.



[34] ALGAROTTI, F. Sir Isaac Newton's theory of light and colours, and his principle of attraction, made familiar to the ladies in several entertainments. V. 1. London: [s.n], 1742a. \_\_\_\_\_. Sir Isaac Newton's theory of light and colours, and his principle of attraction, made familiar to the ladies in several entertainments. V. 2. London: [s.n], 1742b.

[35] OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia molecular. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 4, 24-30, 2001.

[36] PHILIPPSEN, G. S. *Métodos fototérmicos aplicados ao estudo da penetração e da eficiência no processo de pigmentação de medicamentos para o tratamento do vitiligo*. Dissertação de Mestrado. Programa de pós graduação em Física. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

[37] HEWITT, P. G. Física Conceitual, *Editora Bookman*, 9ª edição, 2002.

[38] Disponível: [http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/63\\_lampadas/incand/](http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/63_lampadas/incand/) acessado em 11/2011.

[39] ALCANTRA, P. Jr. Espectroscopia Molecular. Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, 2002.

[40] ROSENCWAIG, A., GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. *J. Appl. Phys.*, 47, 64-69, 1976.

[41] ASTRATH, F. B. G. *Determinação de propriedades térmicas de materiais odontológicos utilizando a técnica fotoacústica com célula aberta*. Dissertação de Mestrado. Programa de pós graduação em Física. Universidade Estadual de Maringá-PR, 2007.

[42] ROSENCWAIG, A. Photoacoustic and Photoacoustic Spectroscopy. *University of California*, 57, 1980.

[43] HERSCHEL, F. W. *Philosophical Transactions Royal Society*. London 90, 49, 1800.

[44] INFRARED PROCESSING AND ANALYSIS CENTER (IPAC). *Herschel Discovers Infrared Light*. Disponível em: <[http://coolcosmos.ipac.caltech.edu/cosmic\\_classroom/classroom\\_activities/herschel\\_bio.html](http://coolcosmos.ipac.caltech.edu/cosmic_classroom/classroom_activities/herschel_bio.html)>. Acesso em: 19 out. 2011.

[45] NAES, T., ISAKSSON, T., FEARN, T., DAVIES, T.. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*, *NIR Publications*. 2002.

[46] SIESLER, H., W., OZAKI, Y., KAWATA, S., HEISE, H., M.. *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. Wiley-VCH. 2002.

[47] FEIST, P. *Handbook for Organic Chemistry Lab*, 6th Edition, CU Chemistry Department, chapter 15, 2002.

URL: <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/irtutor/IRtheory.pdf>

[48] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 5. Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994.

[49] SUN, D. *Infrared Spectroscopy: For Food Quality Analysis and Control*, *Academic Press*, 2009.

[50] STUART, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2005.

[51] SALA, O. *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, Cap. 2, 22-27, 1996.

[52] ALCÁCER, L. *Textos de apoio a Química-Física. Determinação da Estrutura Molecular. Métodos Espectroscópios*. AEIST. 2007.

[53] WILLIAMS, P.; NORRIS, K. Near-Infrared technology in the agricultural and food industries. Minnesota. AACC, 1998.

[54] PASQUINI, C.; NEAR Infrared Spectroscopy. Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. 2002.

[55] CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; VENTRELLA, M. C., LEITE, I. T. A.; BRAGA, J. T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. *Revista Árvore*, 32, 641-650, 2008.

[56] PONTES, C. A.; CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; SILVA, A. G.; BORGES, C. G. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Sibipiruna). *Revista Árvore*, 30, 43-48, 2006.

[57] DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUNOZ, V.; RUIZ, G.; SUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 91-98, 2001.

[58] BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUNOZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 271-275, 2000.

[59] DEL LAMA, M.A.; PERUQUETTI, R.C. Mortalidade de abelhas visitantes de flores de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (Leguminosae) no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 50 (4), 547-549, 2006.

[60] BUENO, F. G., *Controle de qualidade, desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação da atividade cicatrizante de caesalpinia peltophoroides Benth.*

Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade de Maringá-PR, 2010.

[61] PAESE, K. *Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e a avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

[62] CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R.; CUNHA, E. Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 79, 25-29, 2004.

[63] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Editora Guanabara Koogan S.A., 301-307, 1995.

[64] PRAÇA, F. S. G. *Liberção e permeação in vitro, de produtos transdérmicos: um estudo metodológico e aparatos e condições experimentais*. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 2010.

[65] SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, v.341, p.738-746, 1999 apud BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.27-51, 2005.

[66] BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, 27-51, 2005.

[67] HOWES S.; HARREY S.C. Healing of wounds as determined by their tensile strength. *JAMA*; 92, 42, 1929.

[68] MARTIN, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276, 75-81, Abril, 1997.

[69] FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina*, Ribeirão Preto, 34, 229-237, Jul/Dez, 2001.

[70] STADELMANN, W.K. et al. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American Journal Of Surgery*, 176, (Suppl 2A), 26S-38S, Aug, 1998.

[71] MAVIOSO, C. *Noções básicas sobre feridas e cicatrização*. Serviço de Cirurgia Plástica e Reconstructiva do Hospital de São José, Dezembro, 2003. Disponível em: <http://www.gaif.net/artigos-rev.html>, Acesso em: 09/04/2007.

[72] GOES, A.C.A.M. et al. Análise histológica da cicatrização da anastomose colônica, em ratos, sob ação de enema de aroeira-do-sertão (*Myracrodruonurundeuva fr. all.*) a 10%. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, 20, 2, Mar/Abr, 2005.

[73] BATES, D. O.; JONES, R. O. P. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Lower extremity wounds*, v.2, p.107-120, 2003.

[74] RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.*, 39 (3), 233-41, 2001.

[75] COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C., et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995), *Cad Saúde Pública*, 18 (5), 1441-1454, 2002.

[76] FRANCO, M.; PERACOLI, M. T.; SOARES, A.; MONTENEGRO, R.; MENDES, R. P.; MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993;5: 115–149.

[77] BITTERMAN, P. B.; ADELBERG, S.; CRYSTAL, R. G. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders, *J. Clin. Invest.*, 72, 1801–1813, 1983.

[78] BONTRAGER, K. Tratado de técnica radiológica, 4ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara/Koogan, 1997.

[79] SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. Anatomia e fisiologia, 1ª ed., Lisboa, Lusodidacta, 1997.

[80] CALHA, J. Tomografia computadorizada. In Pisco, J. Imagiologia Básica, 31-38, Lisboa, Lidel, 2003.

[81] MORATTO, E. M. *Espectroscopia fotoacústica como método de estudo da paracoccidiodomicose*. Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em Ciência Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá-PR. 2011.

[82] BAKEEV. Process Analytical Technology, *Blackwell PublishingLtd*, 2005.

[83] SIESLER, H.; OZAKI, W.; KAWATA, Y.; HEISE, S. H. M. Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications. *Wiley-VCH*, 2002.

[84] PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy. Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

[85] SEHN, E.; HERNANDES, L.; FRANCO, S. L.; GONÇALVES, C. C. M.; BAESSO, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Anal. Chim. Acta*, v.635, p.115-120, 2009.

[86] MARTIN, F. A.; ROJAS-DIAZ, D.; LUIS-GARCIA, L.; GONZALEZ-MORA, J.L.; CASTELLANO, M.A. Simultaneous monitoring of nitric oxide, oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin from small areas of the rat brain by in vivo visible spectroscopy and least-square approach. *Journal of Neuroscience Methods*, v.140, 75-80, 2004.

- [87] NAOUM, P. C.; RADISPIEI, J.; MORAES, M. S.; Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagents, *Rev. bras. hematol. hemoter.*, 26(1), 19-22, 2004.
- [88] NAOUM, P. C. Hemoglobinopatias e talassemias, Ed. Sarvier, São Paulo, 1997.
- [89] JOY, K. W.; HAGEMAN, R. H. The purification and properties of Nitrite Reductase from Higher Plants, and its Dependence on Ferridoxin. *Biochem.J.*, 100, 23, 1966.
- [90] TAKAHASHI, M.; SASAKI, Y.; IDA, S.; MORIKAWA, H. Nitrite Reductase Gene Enrichment Improves Assimilation of NO<sub>2</sub> in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 126, 731-741, 2001.
- [91] GOLDSTEIN, A. et al. Principles of drug action. New York, *Wiley Biomedical Health Publ.*, 2, 394- 423, 1974.
- [92] NAUMANN, D.; MEYERS, R. A. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, Chichester, 102–131, 2000.
- [93] KRAFFT, C.; CODRICH, D.; PELIZZO, G.; SERGO, V. *Vib. Spectrosc.*, DOI, 10, 1016, 2007.
- [94] CHIRIBOGA, L.; XIE, P.; YEE, H.; VIGORITA, V.; ZAROU, D.; ZAKIM, D.; DIEM, M.; *Biospectroscopy*, 4, 47–53, 1998.
- [95] KARIPPAL, J. J.; NARASIMHA, H. N.; RAI, K. S.; KRISHNA, M.; SREEJITH, M. Effect of amine functionalization of CNF on electrical, thermal, and mechanical properties of epoxy/CNF composites, *Poly Bull*, 65, 849–861, 2010.
- [96] DIEM, M.; ROMEO, M.; BOYDSTON-WHITE, S.; MILJKOVIC, M.; MAT-THAUS, C. A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994–2004), *Analyst (Lond.)*, 129, 880–885, 2004.

- [97] TARASCHEWSKI, M.; CAMMENGA, H. K.; TUCKERMANN, R.; BAUERECKER, S. FTIR study of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> nanoparticles and their temporal evolution at 80 K, *J. Phys. Chem. A*, 109(15), 3337-3343, 2005.
- [98] AFANASYEVA, N.; BRUCH, R.; KANO, A. V. Numerous Applications of Fiber Optic Evanescent Wave Fourier Transform Infrared (FEW-FTIR) Spectroscopy for Surface and Subsurface Structural Analysis, Subsurface Sensing Technologies and Applications, 1(1), 45-63, 2000.
- [99] BROOKS, A. L.; AFANASYEVA, N. I.; MAKHINE, V.; BRUCH, R. F.; MCGREGOR, B. FEW±FTIR spectroscopy applications and computer data processing for noninvasive skin tissue diagnostics in vivo, *Proc. SPIE*, 3596, 140-151, 1999.
- [100] SALMAN, A. et al., FTIR microspectroscopy of malignant fibroblasts transformed by mouse sarcoma virus, *J. Biochem.Biophys.Methods*, 55, 141-153, 2003.
- [101] YANG, W.; XIAO X.; TAN, J.; CAI, Q. In situ evaluation of breast cancer cell growth with 3D ATR-FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 49, 64-67, 2009.
- [102] SINDHUPHAK, R.; ISSARAVANICH, S.; UDOMPRASERTGUL, V.; SRISOOKHO, P.; WARAKAMIN, S.; SINDHUPHAK, S.; BOONBUNDARLCHAI, R.; DUSITSIN, N. A new approach for the detection of cervical cancer in Thai women. *Gynecol. Oncol.*, 90(1), 10-14, 2003.
- [103] ZELIG, U.; KAPELUSHNIK, J.; MOREH, R.; MORDECHAI, S.; NATHAN, I. Diagnosis of cell death by means of infrared spectroscopy. *Biophys J.*, Oct 7, 97(7), 2107-2114, 2009.
- [104] DI GIAMBATTISTA, L.; POZZI, D.; GRIMALDI, P.; GAUDENZI, S.; MORRONE, S.; CASTELLANO, A. C. New marker of tumor cell death revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.*, 399(8), 2771-2778, 2011.



[105] ALLEN, J. R.; ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G. Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação Modifica de Fármacos, *Ed. Artmed*, 8ª ed., 2007.

[106] CROUCH, E.; WRIGHT, J. R. *ANNU. Rev. Physiol.*, 63, 521-554, 2001.

[107] MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. *J. Med. Vet. Mycol.*, 27, 149-158, 1989.

[108] SOARES, D. A.; de ANDRADE, R. V.; SILVA, S. S.; BOCCA, A. L.; SOARES, S. M.; PETROFEZA, S. *B.M.C. Microbiol.*, 10, 241, 2010.

[109] NOVERR, M. C.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. *Infect. Immun.*, 71, 1538-1547, 2003.

[110] ZHOU, J.; WANG, Z.; SUN, S.; LIU, M.; ZHANG, H. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 33, 127-132, 2001.

[111] RAMESH, J.; KAPELUSHNIK, J.; MORDEHAIL, J.; MOSER, A.; HULEIHEL, M.; ERUKHIMOVITCH, V.; LEVI, C.; MORDECHAI, S. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 51, 251-261, 2002.

## ANEXO I



Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Condução Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 2 / 2 / 2010 Parecer nº 141/2010

Pesquisador: João Carlos Palazzo de Mello Setor: DFF  
Título: Protocolo nº 056/2009

**Caesalpinia peltophoroides e Stryphnodendron adstringens: Análise fitoquímica, tecnológica e biológica in vitro e in vivo**

Entrada: 18/11/2009 Início: 1/12/2009 Término: 30/11/2011

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final: **Aguarda finalização do projeto**

**ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.**

**Considerações e Parecer:**

Em 16.12.2009 foi protocolado a resposta a este parecer (119/2009-CEAE).

Considerando que os autores esclarecem todas as dúvidas, sou de parecer favorável a aprovação do mesmo.



*Vânia Antunes*  
Dr<sup>a</sup> Vânia Antunes  
Presidente do CEAE/UEM

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;



II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado



Parecer emitido após reunião realizada em: 9 /11/2010 Parecer nº 116/2010

Pesquisador: Luzmarina Hernandes	Setor: DCM	
Título:	Protocolo nº 042/2010	
<b>Expressão temporal de gp43 em granuloma pulmonar de camundongos Swiss infectados por Paracoccidioides brasiliensis e sua relação com a ocorrência de morte celular programada</b>		
Entrada: 11/8/2010	Início: 1/9/2010	Término: 28/2/2012
Situação do Projeto:	<b>Aprovado</b>	
Relatório Final:	Aguarda finalização do projeto	
<p><b>ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.</b></p>		
<b>Considerações e Parecer:</b> Por entender que os procedimentos experimentais não ferem os princípios éticos na experimentação animal sou de parecer favorável à execução do mesmo. Ressalta-se ainda que este Comitê aguarda o Relatório Final para a emissão do certificado desde que considerado conforme.		
		
 Dr <sup>a</sup> Vânia Antunes Presidente do CEAE/UEM		

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

- I - aprovado;
- II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
- III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
- IV - não aprovado