



Universidade Estadual de Maringá  
Pós-graduação em Física

---

---

**Franciana Pedrochi**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS FOTOTÉRMICAS NO ESTUDO DE  
BIOMATERIAIS**

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

---

---

Maringá-Pr, Abril de 2008

**Franciana Pedrochi**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS FOTOTÉRMICAS NO ESTUDO DE  
BIOMATERIAIS**

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

Tese apresentada ao Departamento  
de Física para obtenção do título de  
Doutor em Física do programa de  
doutorado UEM/UEL

Dedicado aos meus pais...

(...“Pessoalmente gosto do céu cor de chocolate. Chocolate escuro, bem escuro. As pessoas dizem que ele condiz comigo. Mas procuro gostar de todas as cores que vejo – o espectro inteiro.”...)

Morte, em “A menina que roubava livros” de Markus Zusak

## **Agradecimentos**

Ao Alysson Steimacher por compartilhar comigo todos os momentos, inclusive o de escrever a tese, por toda dedicação, amizade e amor;

Aos meus pais por me educar com liberdade, e aos meus irmãos por me acharem mais inteligente do que eu realmente sou;

Ao Prof. João C. P. Mello, à Prof<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandez e à Juliana C. B. Rocha pelo trabalho em colaboração;

À Prof<sup>a</sup>. Mirian M. Hidalgo e às alunas Daniela S. Fernandes e Isabela N. Bonilha pela colaboração e pela convivência;

Ao Prof. Celso Nakamura e à Jackeline T. Guinoza Siraichi pelo trabalho em colaboração e pela amizade;

Ao Prof. Sandro M. Lima pelo fornecimento das amostras de óleo e a realização das medidas de difusividade térmica;

À Prof<sup>a</sup>. Graciette Matioli pelo fornecimento de amostras e pela contribuição neste trabalho;

À Aline Milan Farias pela ajuda na realização deste trabalho;

Aos Professores Antonio Medina Neto e Antonio Carlos Bento, pela amizade e pela grande ajuda em tantos momentos;

Ao Marcos C. Danhoni Neves pela orientação durante a graduação, pelas divagações e pela amizade de longa data;

Aos amigos do GEF, em especial aos caríssimos: Nelson, Otávio (Jaca), Jurandir, Fran Sato, Paulo Pedreira (Pedreirinha), Márcio (Merci), Andressa Novatski, RRRoni, Daniel (Carioca), Nilson (Sinho), pelas conversas inúteis...e pelas úteis também;

À minha grande amiga Sabrina, pelas conversas diárias, todo carinho e amizade sincera;

Aos professores membros da “Diretoria” Arlindo A. Savi, Paulo Udo e Wilson Weinand;

Aos funcionários do DFI, em especial, à Akikinho;

Às agências Capes, Fundação Araucária e CNPq, pelo apoio financeiro;

Em especial ao Professor Mauro Luciano Baesso, pela orientação, dedicação, amizade e por confiar em mim e no meu trabalho.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

Neste trabalho técnicas fototérmicas e convencionais foram aplicadas no estudo de biomaterias. A espectroscopia fotoacústica foi utilizada para avaliar a penetração de um fitofármaco, de um fotoprotetor e de uma infusão aplicados topicamente na pele e na mucosa bucal. Como a ação do fitofármaco depende de sua penetração através da pele até a derme, foi necessário um estudo de perfil de profundidade para que se pudesse acompanhar o comportamento do referido medicamento na pele em função do tempo de tratamento. A espectroscopia fotoacústica também foi aplicada para a avaliação da ação de uma infusão conhecida popularmente e até mesmo indicada por médicos e dentistas no tratamento de processos inflamatórios dento-alveolares. Um estudo adicional da penetração da infusão foi realizado para melhor avaliar sua possível ação. No terceiro estudo a técnica foi empregada na caracterização de um extrato bruto de um fitofármaco e de suas frações que apresentaram uma possível ação fotoprotetora. A análise dos espectros de absorção e transmissão dessas substâncias levou à formulação de um fotoprotetor. Este teve sua ação, tempo de permanência e taxa de penetração avaliados em experimentos realizados “*ex vivo*”. Na segunda etapa do trabalho, foram estudadas as propriedades ópticas e térmicas de óleos submetidos ao processo de fritura, utilizando-se as técnicas fototérmicas, a calorimetria de relaxação térmica, técnicas interferométricas e medidas de densidade de massa. Avaliar fatores que possam contribuir para definir limites para reaproveitamento destes óleos, assim como diferenciar os dois tipos de óleos empregados nortearam a análise dos parâmetros obtidos. Um estudo adicional foi realizado com a espectroscopia fotoacústica com o objetivo de comprovar a capacidade de complexação da  $\beta$ -ciclodextrina no processo de remoção do colesterol da manteiga. Os resultados deste trabalho demonstraram mais uma vez que as técnicas fototérmicas são ferramentas tecnológicas que podem auxiliar no processo de controle de qualidade de medicamentos e para a análise de alimentos *in natura* e processados. A validação destes estudos, assim como sua ampliação para outros sistemas, pode resultar no estabelecimento de novos padrões para serem utilizados na certificação de conformidade de biomaterias utilizados pela população.

## ABSTRACT

In this work photothermal and conventional techniques were employed to study biomaterials. The photoacoustic spectroscopy technique was used to evaluate the penetration rate of a phyto-pharmaco, a sunscreen, and an infusion topically applied onto skin and oral mucosa surfaces. As the phyto-pharmaco effectiveness depends on its penetration throughout the skin up to the dermis, it was necessary to perform a depth profile analysis in order to monitor the behavior of the mentioned formulation over the skin as a function of time interval of treatment. Photoacoustic spectroscopy was also applied to evaluate the action of an infusion popularly known to be effective in the treatment of dentoalveolar inflammatory processes. An additional study of the penetration rate of the infusion was performed to investigate its expected action. The third study with this technique was the characterization of an extract obtained from a phyto-pharmaco and its fractions that presented properties of sunscreens against UV radiation. The analysis of the optical transmission and absorption spectra of these substances suggested that they may be suitable for photoprotection against UVB and UVA radiation. The formulation characteristics and penetration rate throughout the skin were evaluated in “*ex vivo*” experiments in rats. In the second phase of the work, the thermo-optical properties of oils heated and reused for frying were measured using photothermal, calorimetric, interferometric and mass density methods. The focus of the study was the evaluation of factors that can contribute both to define limits to reuse these oils and to differentiate types of oils. A final study was performed with the photoacoustic spectroscopy to verify the ability of the  $\beta$ -cyclodextrin to remove cholesterol from butter. The results of this work showed once again that the photothermal techniques are technological tools that can be helpful in the quality control of medicaments and foods *in natura* and industrialized. The validation of these studies with further application in other systems may result in the establishment of novel indexes to be used in the certification of biomaterials used by the population.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
SUMÁRIO .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
<b>CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 2 – AMOSTRAS .....</b>	<b>16</b>
2.1 PELE .....	16
2.1.1 Estrutura da pele .....	16
2.1.2 Rotas de permeação de substâncias através da pele .....	18
2.2 ÓLEOS E GORDURAS .....	20
<b>CAPÍTULO 3 - TÉCNICAS E MONTAGENS EXPERIMENTAIS UTILIZADAS .....</b>	<b>22</b>
3.1 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA .....	22
3.1.1 O efeito fotoacústico .....	23
3.1.2 Montagem experimental .....	25
3.2 ÍNDICE DE REFRAÇÃO .....	26
3.3 COEFICIENTE TÉRMICO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO .....	27
3.4 DENSIDADE E COEFICIENTE DE EXPANSÃO TÉRMICA VOLUMÉTRICO .....	29
3.4 A REFRAATIVIDADE E O COEFICIENTE TÉRMICO DA POLARIZABILIDADE ELETRÔNICA .....	30
3.4 CALORIMETRIA DE RELAXAÇÃO TÉRMICA .....	31
3.5 ESPECTROMETRIA DE LENTE TÉRMICA .....	32
3.6 CONDUTIVIDADE TÉRMICA .....	32
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I .....</b>	<b>33</b>
4.1 ESTUDOS <i>EX VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DA PENETRAÇÃO DE FITOFÁRMACOS NA PELE DE ANIMAIS UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA .....	33
4.1.1 ANÁLISE <i>EX VIVO</i> DA PENETRAÇÃO PERCUTÂNEA DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DA PLANTA <i>GUAZUMA ULMIFOLIA</i> , UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA .....	33
4.1.1.1 Procedimento Experimental .....	35
4.1.1.2 Resultados e discussão .....	36
4.1.1.3 Conclusão .....	41
4.1.2 CAPACIDADE EMOLIENTE DA INFUSÃO DE FOLHAS DE BATATA DOCE ( <i>IPOMOEA BATATAS</i> ) EM ABSCESSOS EM RATOS .....	42
4.1.2.1 Procedimento Experimental .....	43
4.1.2.2 Resultados e discussão .....	45
4.1.2.3 Conclusão .....	52
4.1.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DO EXTRATO OBTIDO DAS FOLHAS DE <i>ARRABIDEA CHICA</i> .....	53
4.1.3.1 Procedimento Experimental .....	53
4.1.3.2 Resultados e discussão .....	54
4.1.3.3 Conclusão .....	62
<b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2 .....</b>	<b>63</b>
5.1 APLICAÇÃO DE TÉCNICAS FOTOTÉRMICAS E CONVENCIONAIS PARA ESTUDOS DE ÓLEOS E GORDURAS .....	63
5.1.1 ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES ÓPTICAS E TÉRMICAS DE ÓLEOS VEGETAIS SUBMETIDOS A PROCESSO DE FRITURA .....	63
5.1.1.1 Procedimento Experimental .....	64
5.1.1.2 Resultados e Discussão .....	65
5.1.1.3 Conclusão .....	85
5.1.2 ESTUDO DA COMPLEXAÇÃO DA $\beta$ -CICLODEXTRINA NA EXTRAÇÃO DE COLESTEROL DA MANTEIGA .....	86
5.1.2.1 Procedimento Experimental .....	87
5.1.2.2 Resultados e Discussão .....	88
5.1.2.3 Conclusão .....	92
<b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
Perspectivas de Estudos .....	94



<b>APÊNDICE A – ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA .....</b>	<b>95</b>
A.1 – Efeito Fotoacústico .....	95
A.2 – Caracterização óptica das amostras .....	97
A.3 – Caracterização térmica das amostras .....	99
A.4 – Dependência do sinal fotoacústico com a frequência de modulação .....	100
<b>APÊNDICE B – ÍNDICE DE REFRAÇÃO E POLARIZABILIDADE ELETRÔNICA .....</b>	<b>102</b>
B.1 - O índice de refração ( $n$ ) .....	102
B.2 - O índice de refração ( $n$ ) e a polarizabilidade .....	103
B.3 - O coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) .....	107
REFERÊNCIAS .....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Camadas estruturais da pele e hipoderme.....	16
Figura 2: Diagrama simplificado da estrutura da pele e das rotas de penetração: (1) via ductos sudoríparos; (2) através do estrato córneo; (3) por meio de folículos pilosos e glândulas sebáceas associadas <sup>[11]</sup> .....	19
Figura 3: Diagrama simplificado do estrato córneo e suas micro-rotas de penetração (em detalhe) <sup>[11]</sup> .....	20
Figura 4: Arranjo experimental da Espectroscopia Fotoacústica.....	25
Figura 5: Interferômetro de Michelson-Morley modificado utilizado para as medidas do índice de refração <sup>[19]</sup> .....	26
Figura 6: Representação da montagem experimental utilizada para as medidas de $dn/dT$ <sup>[20]</sup> .....	27
Figura 7: Montagem experimental para medidas de $C_p$ , com detalhes do calorímetro.....	31
Figura 8: Representação estrutural da procianidina B2 [epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina].	34
Figura 9: Representação de uma amostra de pele dentro da câmara fotoacústica.....	36
Figura 10: Espectros de absorção óptica: a) do extrato bruto da <i>Mutamba</i> obtido com a PAS, b) e c) das loções controle e teste respectivamente, medidos em um espectrofotômetro UV-VIS.....	37
Figura 11: Espectros de absorção óptica dos componentes do extrato bruto da <i>Mutamba</i> obtidos em espectrofotômetro UV-VIS.....	38
Figura 12: Espectros obtidos com a espectroscopia fotoacústica de duas amostras de pele tratadas por 13 dias com as loções teste e controle, respectivamente. A curva que mostra a subtração entre os dois espectros evidencia as bandas do extrato.....	39
Figura 13: Valores normalizados das áreas sob os espectros de absorção das amostras teste e controle (curvas a e b)). Os valores de $c(t)$ calculados são mostrados na curva c).....	40
Figura 14: Média das medidas das lesões (cm) dos grupos experimentais ao longo do tempo. Sendo BA48h: animais banhados em água a partir de 48h após a inoculação; BI0h: animais banhados na infusão desde o dia da inoculação; BI48h: animais banhados na infusão a partir de 48h após a inoculação; SB: animais não banhados.....	46
Figura 15: Espectros de absorção das amostras de pele do dorso dos animais tratados e espectro da infusão realizado em espectrofotômetro.....	47
Figura 16: Valores das áreas calculadas, na região espectral entre 325 e 370 nm.....	48
Figura 17: Espectros de absorção óptica das amostras tratadas e controle, de pele e da mucosa. Espectro de absorção óptica da infusão com a adição do corante de cor rosa cereja na proporção 1000:1.....	49
Figura 18: Valores das áreas entre 470 e 608 nm, calculadas por integração.....	50
Figura 19: Diferença entre espectros controle e chá.....	51
Figura 20: Espectros de absorção da base não iônica, do extrato bruto (5%), da fração com acetato de etila (5%), da fração com hexano (5%), da fração com diclorometano (5%), da fração com n-butanol (5%) e do fotoprotetor comercial.....	55
Figura 21: Espectros de transmissão do extrato bruto (5%), da fração com acetato de etila (5%), da fração com hexano (5%), da fração com diclorometano (5%), da fração com n-butanol (5%) e do fotoprotetor comercial.....	56
Figura 22: Espectros de absorção (cima) e de transmissão (baixo) do fotoprotetor comercial e da formulação com 5% (fração acetato de etila 2,5% + fração hexano 2,5%).....	58
Figura 23: Espectros das amostras tratadas por 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. No detalhe tem-se o espectro da pele controle e da pele após aplicação da formulação para 0, 60, 120 e 180 min.....	59

Figura 24: Áreas dos espectros de absorção das amostras em função do intervalo de tempo após a aplicação da formulação.....	60
Figura 25: Espectros obtidos do lado inferior das amostras de pele, com frequência de modulação de 11 Hz. ....	61
Figura 26: Índice de refração para as amostras de óleo de soja e girassol em função do número de frituras ( erro de 2%). As linhas pontilhadas são guias visuais. ....	65
Figura 27: Coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) em função da temperatura para as amostras de óleo de girassol, para diferentes números de fritura.....	67
Figura 28: Coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) em função da temperatura para as amostras de óleo de soja, para diferentes números de fritura.....	68
Figura 29: Valores das áreas dos picos de transição dos óleos de girassol e de soja determinados a partir dos resultados de $dn/dT$ , no intervalo entre 20 e 45° C. ....	69
Figura 30: Intervalos de tempo de estabilidade oxidativa para amostras de óleo de soja e de girassol <sup>[67]</sup> .....	70
Figura 31: Densidade em função da temperatura para os óleos de girassol. ....	71
Figura 32: Densidade em função da temperatura para os óleos de soja. ....	71
Figura 33: Densidade na temperatura de 45°C para os óleos de girassol e de soja em função do número de frituras.....	72
Figura 34: Índice de peróxidos para amostras de óleo de soja e girassol, em função do número de frituras. Obtido da ref. <sup>[67]</sup> .....	73
Figura 35: Coeficiente de expansão térmica em função da temperatura para as amostras de óleo de girassol para a temperatura aumentando (a) e diminuindo (b). ....	74
Figura 36: Coeficiente de expansão térmica em função da temperatura para os óleos de soja com a temperatura aumentando (a) e diminuindo (b).....	75
Figura 37: Valores calculados para a refratividade molar para as amostras de óleo de soja e de girassol.....	76
Figura 38: Teor de compostos polares totais. Estes dados foram obtidos da ref. <sup>[67]</sup> .....	77
Figura 39: Coeficiente térmico da polarizabilidade para os óleos de girassol (a) e de soja (b) para diferentes números de frituras. ....	78
Figura 40: Calor Específico (Cp) para as amostras de óleo de soja e girassol em função do número de frituras. A linha é apenas um guia visual.....	79
Figura 41: Difusividade térmica (LT) (a) e condutividade térmica (b) para as amostras de óleo de soja e de girassol em função do número de frituras; as linhas são apenas guias visuais. ....	81
Figura 42: Espectros de absorção óptica (PAS) das amostras de óleo de soja (a) e de girassol (b) em função do número de frituras. ....	82
Figura 43: Valores calculados das áreas sob os espectros de absorção óptica (PAS), no intervalo de 230 a 350 nm (a) e porcentagem de dienos conjugados <sup>[67]</sup> (b), das amostras de óleo de soja e girassol em função do número de frituras.....	84
Figura 44: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial e das amostras preparadas com e sem $\beta$ -ciclodextrina.....	88
Figura 45: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial, amostras de manteiga padrão acrescidas de 10% e 15% (em massa) de colesterol e espectros simulados de manteiga padrão com 10%, 30% e 50% de colesterol.....	89
Figura 46: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial e dos resíduos da extração com $\beta$ -ciclodextrina; No detalhe é mostrado a comparação entre o espectro de absorção do resíduo líquido e o espectro simulado colesterol: $\beta$ -ciclodextrina (7:3). ....	90

Figura 47: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial, dos resíduos da extração com $\beta$ -ciclodextrina e do resíduo de extração sem o uso da $\beta$ -ciclodextrina. ....	91
Figura 48: Mecanismos de geração de ondas acústicas: a) difusão térmica, b) expansão térmica e c) flexão termoelástica. ....	97
Figura 49: A absorção óptica é determinada pela distância $l_{\beta}$ que a radiação luminosa penetra na amostra. ....	98
Figura 50: Mecanismos de polarização <sup>[69]</sup> .....	104

### CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO

O comportamento humano vem sendo constantemente influenciado pelas inovações tecnológicas da ciência moderna. Principalmente no que se refere aos alimentos e medicamentos, a sociedade busca cada vez mais estar informada sobre a origem, a qualidade e a segurança dos produtos, sem que isso acarrete em aumento de preços. É ainda crescente o interesse mundial por questões ambientais e o aproveitamento dos recursos naturais locais, levando-se em consideração o conhecimento popular e agregando valores a partir da utilização de tecnologias avançadas para a certificação de conformidade dos produtos *in natura* e processados.

Atualmente a Organização Mundial da Saúde tem recomendado aos países em desenvolvimento a adoção de medicamentos à base de plantas medicinais nativas para doenças ou enfermidades mais simples, principalmente nas regiões em que a precariedade da medicina preventiva e curativa é causada pelo difícil acesso.

No Brasil, uma parcela significativa da população já faz uso de plantas medicinais, seja na manutenção ou na recuperação da saúde. Deste modo, a implantação do uso da fitoterapia vem sendo incentivada em busca de alternativas aos altos preços dos medicamentos e à dependência externa deste setor.

Do ponto de vista industrial, a produção de fitofármacos representa uma perspectiva importante, considerando-se o potencial da biodiversidade brasileira. O uso de extratos naturais padronizados vem ganhando força não só no setor de fármacos, como também de cosméticos, como os produtos destinados à proteção solar, que é cada vez mais necessária devido à diminuição da camada de ozônio. O uso de produtos naturais, com esta propriedade, vem ganhando importância econômica devido ao desenvolvimento de substâncias cada vez mais seguras e efetivas<sup>[1, 2]</sup>.

Um protetor solar deve fornecer proteção contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta, UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm), do Sol e para isso a fotoestabilidade é um requisito primordial. Normalmente os fotoprotetores comerciais são constituídos de filtros químicos, que são compostos orgânicos responsáveis pela absorção da radiação UVB e UVA, e filtros físicos, compostos inorgânicos com a propriedade de

bloquear a radiação UVB/UVA a partir da reflexão e espalhamento da luz. Os compostos inorgânicos para proteção solar mais conhecidos e usados são o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e o óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ )<sup>[2, 3]</sup>.

Um fotoprotetor deve impedir a incidência da radiação UVB/UVA na pele, para que assim essa radiação não atinja o núcleo das células e conseqüentemente chegue ao DNA. Estudos recentes vêm mostrando que muitos dos protetores solares comerciais não apresentam estabilidade fotoquímica, o que traz conseqüências diretas e negativas ao fator de proteção solar (FPS) e na eficácia dos mesmos em oferecer proteção à pele humana contra os danos causados pela radiação solar (UVB/UVA)<sup>[3]</sup>. Um outro fato relevante é que a presença de óxidos metálicos nos fotoprotetores pode causar danos ao DNA das células, uma vez que essas partículas sob ação da radiação ultravioleta podem induzir processos de oxidação e conseqüente morte celular<sup>[2]</sup>. Portanto, estudos detalhados são necessários para garantir tanto a ação, quanto a estabilidade e não-toxicidade de novos fotoprotetores, especialmente aqueles obtidos a partir de plantas medicinais que podem ser uma alternativa mais segura e de menor custo para a população.

Obter um produto final a partir de uma planta nunca antes estudada é um processo demorado e minucioso, tanto do ponto de vista do controle de qualidade, quanto da comprovação de sua eficácia e segurança. Para isto é necessário o envolvimento de diferentes áreas do conhecimento, a utilização de novas ferramentas tecnológicas e conhecimento científico sobre as propriedades físico-químicas dos compostos derivados e conseqüentemente das formulações obtidas.

A Espectroscopia Fotoacústica é uma das técnicas que têm mostrado grande potencial neste tipo de estudo, uma vez que possibilita a realização dos experimentos em amostras não homogêneas, como é o caso da maioria destes sistemas. Em nosso grupo de pesquisa (Grupo de Estudos dos Fenômenos Fototérmicos - GEFF), além de análises espectroscópicas de caracterização, a Espectroscopia Fotoacústica tem sido aplicada em diversos estudos para a determinação “*in vivo*”, “*ex vivo*” ou “*in vitro*” da taxa de penetração de medicamentos e/ou protetores solares na pele humana ou em anexos, como a unha, ou em estudos em animais<sup>[1, 4-6]</sup>. A possibilidade da realização de medidas de perfil de profundidade ao longo da amostra é uma característica única desta técnica, devido ao fato da detecção ser realizada a partir do calor gerado na amostra via relaxação não radiativa e não a partir da transmitância, refletância ou fluorescência.

Além de medicamentos e protetores solares obtidos a partir de plantas medicinais, outros tipos de biomateriais têm sido amplamente estudados em nosso grupo, como biopolímeros, biodiesel e em especial para este trabalho, os óleos vegetais comestíveis e a manteiga. Da mesma forma, as análises demandam a combinação de técnicas que possam contribuir para uma melhor avaliação no processo de certificação de conformidade desses materiais. Dentre tais técnicas destacamos aquelas existentes em nosso grupo: as que

podem ser aplicadas no estudo de materiais pastosos, como a Espectroscopia Fotoacústica e a calorimetria de relaxação térmica, e as técnicas Espectrometria de Lente Térmica e Interferometria Óptica, que só podem ser utilizadas para experimentos em meios transparentes, como é o caso da maioria das amostras líquidas.

A mudança dos hábitos alimentares provocou um aumento significativo no consumo de óleos, resultado de uma combinação de profundas mudanças sociais, econômicas e tecnológicas, associadas ao grande desenvolvimento dos setores de restaurantes, sistemas de alimentação coletiva e alimentos de consumo imediato<sup>[7]</sup>. Uma das maneiras mais utilizadas para preparar alimentos, principalmente por restaurantes “fast food” e pela indústria é a fritura por imersão. Durante este processo, óleos e gorduras podem sofrer a ação da umidade dos alimentos, do oxigênio do ar e da temperatura. Esses fatores induzem alterações hidrolíticas, reações oxidativas e alterações estruturais que impõem dúvidas sobre a reutilização da gordura/óleo utilizado<sup>[8]</sup>. Conhecer melhor tal processo e suas conseqüências se faz necessário, assim como definir limitadores para o reaproveitamento e quais seriam os óleos mais apropriados e mais estáveis a tais alterações são questões importantes e ainda em aberto.

A introdução dos ácidos graxos insaturados de origem vegetal à dieta do homem atual se deu em grande parte devido à tentativa de substituição dos ácidos graxos de origem animal. Embora mais estáveis às alterações físico-químicas, os ácidos graxos saturados podem contribuir para o aumento do risco de alterações cardio-vasculares. Assim, a extração do colesterol da manteiga pode ser uma alternativa viável na busca por alimentos mais saudáveis. Estudos recentes têm demonstrado que a  $\beta$ -ciclodextrina é um complexador economicamente viável para o processo de extração do colesterol da manteiga comercial<sup>[9]</sup>. Assim, é importante avaliar a eficiência de extração a partir da detecção da taxa de remoção de colesterol em função da concentração de  $\beta$ -ciclodextrina utilizada durante o processo de extração.

Os objetivos deste trabalho estão divididos em três tópicos: caracterizar e avaliar “*ex vivo*” a taxa de penetração de fitofármacos na pele de animais; determinar as propriedades ópticas e térmicas de óleos vegetais submetidos ao processo de fritura; avaliar a eficiência de complexação da  $\beta$ -ciclodextrina no processo de remoção do colesterol da manteiga. Para cumprir estas metas utilizamos as técnicas fototérmicas como métodos principais, além de medidas complementares com a interferometria óptica, a calorimetria de relaxação térmica e a espectrometria UV/VIS.

## CAPÍTULO 2 – AMOSTRAS

### 2.1 PELE

Neste trabalho amostras de pele foram estudadas para a avaliação de formulações obtidas a partir de plantas medicinais em função de suas características espectroscópicas e da taxa de penetração na pele. A seguir será feita uma breve descrição da estrutura da pele e das rotas de permeação de substâncias aplicadas topicamente.

#### 2.1.1 Estrutura da pele

A pele é um órgão de grande importância para o corpo humano, uma vez que recobre sua superfície e pode atingir até 16% do peso corporal. É formada por uma porção epitelial, a epiderme, e por uma porção conjuntiva, a derme. A junção da epiderme com a derme é irregular e se faz por meio das papilas dérmicas, projeções da derme que se encaixam em reentrâncias da epiderme e aumentam a coesão entre as camadas. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que serve como união com os órgãos subjacentes e não é considerada parte da pele<sup>[10]</sup>.

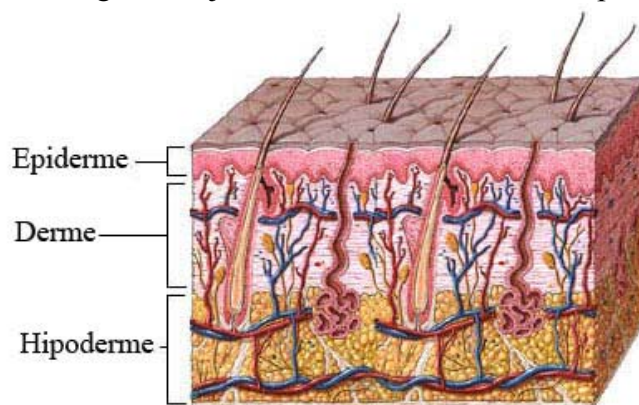


Figura 1: Camadas estruturais da pele e hipoderme.



Além do revestimento, a pele desempenha múltiplas funções. Na epiderme se encontra a camada córnea que protege o organismo contra a perda de água, microorganismos, radiação eletromagnética e contra o atrito. Através de suas terminações nervosas sensitivas, a pele recebe constantemente informações sobre o ambiente, que são enviadas para o sistema nervoso central. Participa da termorregulação do corpo por meio de seus vasos sanguíneos, das glândulas e do tecido adiposo. Além da termorregulação, as glândulas sudoríparas possuem o papel de excretar várias substâncias. A melanina é um pigmento produzido e acumulado na epiderme e sua função principal é de proteção contra a radiação ultravioleta.

A epiderme é constituída por epitélio de revestimento estratificado pavimentoso e queratinizado. Quatro tipos de células são encontrados no epitélio: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merkel, sendo os queratinócitos os mais abundantes, constituindo cerca de 95% das células da epiderme. Outros tipos de epitélio de revestimento podem ser encontrados em cavidades úmidas, como boca e esôfago, por exemplo, sendo chamado de epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado. Ao contrário do epitélio queratinizado em que as células são mortas, no epitélio não queratinizado as células superficiais retêm os núcleos e boa parte de suas organelas<sup>[10]</sup>.

A estrutura e a espessura da epiderme variam de acordo com sua posição no corpo, atingindo uma maior espessura na palma das mãos e na planta dos pés (até 1,5 mm). Possui até cinco camadas (do interior para a superfície): camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea. A camada basal é responsável, junto com a camada espinhosa, pela constante renovação da epiderme, a camada espinhosa possui ainda um importante papel na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito. Caracteristicamente, uma das funções das células da camada granulosa é a formação de uma barreira contra a penetração de substâncias e a perda de água pelo organismo, impedindo assim sua desidratação. A camada lúcida é mais evidente na pele espessa, sendo constituída por uma camada delgada de células que apresentam numerosos filamentos de queratina. A camada córnea apresenta espessura muito variável e é formada por células achatadas, mortas e sem núcleo, repletas de queratina. Essa constituição confere à camada córnea o importante papel de proteção, uma vez que durante o processo de diferenciação os queratinócitos formam placas funcionando com uma barreira protetora para as demais camadas da pele. Essa camada sofre descamação contínua<sup>[10]</sup>.

Os melanócitos são responsáveis pela produção da melanina, um pigmento de cor marron-escuro, e se encontram na junção da derme com a epiderme ou entre os queratinócitos da camada basal. Os melanócitos apresentam prolongamentos que penetram em reentrâncias da camada basal e espinhosa e transferem os grânulos de melanina para as células dessas camadas. Embora as células das camadas mais

superficiais da epiderme não apresentem o pigmento, os queratinócitos funcionam como depósitos de melanina e a contêm em maior quantidade do que os melanócitos. Nas células epiteliais os grânulos de melanina estão localizados de maneira que ofereçam máxima proteção ao DNA contra os efeitos prejudiciais da radiação solar. O escurecimento (bronzeamento) da pele devido à exposição aos raios ultravioleta ocorre inicialmente devido ao escurecimento e à aceleração da transferência da melanina já existente para os queratinócitos, havendo posteriormente um aumento na síntese do pigmento<sup>[10]</sup>.

A derme é o tecido conjuntivo que oferece sustentação à epiderme e a une ao tecido subcutâneo ou hipoderme. Sua espessura varia de acordo com a região do corpo, sendo mais espessa nas plantas dos pés (máximo de 3 mm). A região de contato com a derme é irregular, com a presença das papilas dérmicas, mais freqüentes nas zonas sujeitas a pressão e atrito. Essas saliências acompanham as reentrâncias da epiderme, aumentando a área de contato e assim reforçando a união entre as duas camadas. A derme possui muitas fibras do sistema elástico e colágeno sendo responsável em parte pela elasticidade e resistência da pele. Ao contrário da epiderme, a derme é uma camada vascularizada e com terminações nervosas. Além dos vasos sangüíneos e linfáticos, e dos nervos, a derme apresenta algumas estruturas derivadas da epiderme: os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas.

A hipoderme une a derme aos órgãos subjacentes e é responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas de apoio, sendo constituída por tecido conjuntivo frouxo. A hipoderme pode apresentar uma camada variável de tecido adiposo, o panículo adiposo. O panículo adiposo modela o corpo, é uma reserva de energia e oferece proteção contra o frio.

### **2.1.2 Rotas de permeação de substâncias através da pele**

A permeação cutânea pode ocorrer por três rotas de penetração principais, conforme ilustrado na Figura 2<sup>[11, 12]</sup>:

- Por meio dos folículos pilosos com glândulas sebáceas associadas;
- Via ductos de glândulas sudoríparas;
- Diretamente através do estrato córneo.

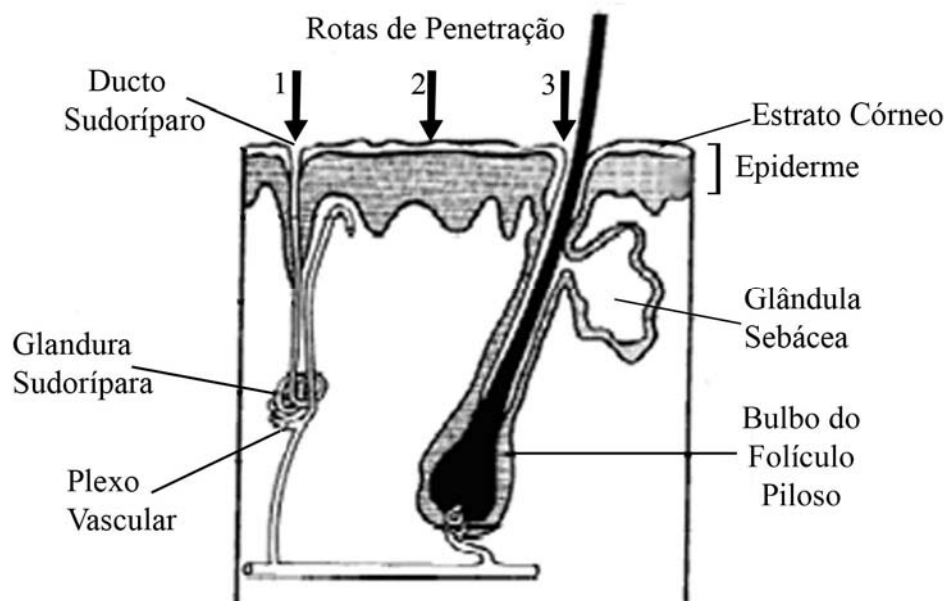


Figura 2: Diagrama simplificado da estrutura da pele e das rotas de penetração: (1) via ductos sudoríparos; (2) através do estrato córneo; (3) por meio de folículos pilosos e glândulas sebáceas associadas<sup>[11]</sup>.

Os folículos pilosos são invaginações da epiderme responsáveis pela origem dos pelos e se encontram presentes em praticamente toda a superfície corporal, com exceção de algumas regiões bem delimitadas. O folículo maduro é composto por uma haste pilosa e um bulbo germinativo (raiz do pelo). As glândulas sebáceas situam-se na derme e os seus ductos geralmente desembocam nos folículos pilosos<sup>[10]</sup>.

As glândulas sudoríparas merócrinas são muito numerosas e encontradas em quase toda a pele. São glândulas tubulosas cujos ductos se abrem na superfície da pele e seguem um curso em hélice ao atravessar a epiderme. Existem ainda as glândulas sudoríparas apócrinas que se localizam na derme e na hipoderme, cujos ductos desembocam em um folículo piloso.

Devido à função de barreira exercida pelo estrato córneo, a permeação através dele merece atenção. Barry<sup>[11]</sup> faz uma analogia de sua estrutura com uma parede (“brick and mortar”). Os queratinócitos são comparados aos tijolos envoltos em um “cimento” formado de múltiplas camadas lipídicas de ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres. As micro-rotas de penetração (Figura 3) através do estrato córneo podem ser, portanto, por vias intercelulares que se dão entre os queratinócitos e por vias transcelulares, as quais ocorrem quando há um aumento da hidratação da pele, aumento da temperatura cutânea e exposição a solventes de lípidos.

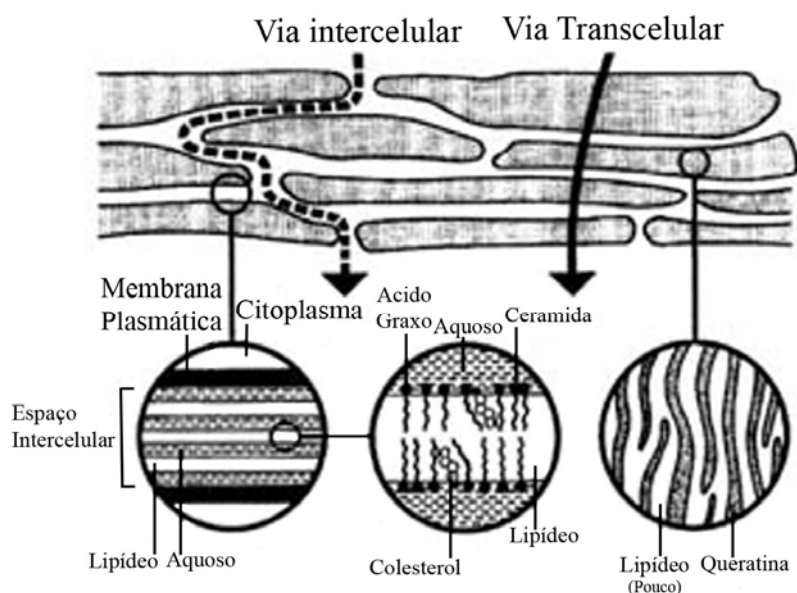


Figura 3: Diagrama simplificado do estrato córneo e suas micro-rotas de penetração (em detalhe)<sup>[11]</sup>.

Para minimizar o problema de baixa permeação devido à barreira formada pela pele, principalmente o estrato córneo, compostos químicos são comumente adicionados às formulações, sendo conhecidos como promotores químicos de permeação<sup>[13]</sup>. Existem ainda os promotores físicos para o mesmo fim que combinam o tratamento tópico com uso de ultra-som e iontoforese.

## 2.2 ÓLEOS E GORDURAS

Um ácido graxo consiste em uma cadeia de hidrocarboneto (hidrofóbico) com um grupo carboxila terminal (-COOH) (hidrofílico). Estas cadeias podem não conter ligações duplas, ou seja, serem saturadas (ácido palmítico); ou podem conter uma ou mais ligações duplas, sendo assim, insaturadas (ácido oléico). Os ácidos graxos saturados são mais resistentes à oxidação, enquanto os ácidos graxos insaturados são espontaneamente oxidados pela presença do ar, o que leva a rancificação. Em geral, quanto maior for o comprimento da cadeia, maior será a temperatura de liquefação (tl) do ácido graxo, mas a adição de ligações duplas ajuda a diminuir a tl. Um, dois ou três ácidos graxos podem ser esterificados em uma molécula de glicerol tornando-se um glicerídeo (di ou triglicerídeo) ou acilglicerol. Este glicerídeo, sólido em temperatura ambiente, recebe a denominação de “gordura”; se estiver na forma líquida será denominado de “óleo”. Dois ácidos graxos são

essenciais ao ser humano, o ácido linolênico (ômega-3) e o ácido linoléico (ômega-6). A deficiência destes ácidos graxos caracteriza-se pela ocorrência de dermatite descamativa, perda de cabelo e má cicatrização de ferimentos<sup>[14]</sup>.

A gordura é um dos três macronutrientes da dieta do ser humano. Além da gordura, os carboidratos e as proteínas fornecem praticamente toda a energia obtida a partir da alimentação. Do ponto de vista do fornecimento energético, a classe mais importante de gorduras da dieta é o triacilglicerol (ou triglicerídeo), que corresponde a mais de 90% dos lipídeos (glicerídeos, ácidos graxos, vitaminas A, D, E e K, dentre outros) totais da dieta. Por meio destes compostos também são supridos os ácidos graxos essenciais ao corpo. Além disso, a gordura dos alimentos pode aumentar a sua palatabilidade, produzindo uma sensação de saciedade e sua presença é necessária para a absorção de vitaminas lipossolúveis<sup>[14]</sup>.

Os triacilgliceróis de origem vegetal normalmente contêm mais ácidos graxos insaturados que os de origem animal. Os ácidos graxos insaturados podem ser monoinsaturados ou poliinsaturados e geralmente são líquidos à temperatura ambiente. Óleos como o de milho e o de soja, por exemplo, são exemplos de gorduras ricas em ácidos graxos poliinsaturados, enquanto que óleos como o de oliva e o de canola são exemplos de gorduras ricas em ácidos graxos monoinsaturados. Com exceção do peixe, cujos ácidos graxos são na maioria insaturados, os triacilgliceróis obtidos de animais em geral contêm proporcionalmente mais ácidos graxos saturados que os encontrados nos vegetais<sup>[14]</sup>.

Tem sido amplamente recomendado pelos profissionais de saúde que os ácidos graxos saturados devem ser substituídos pelos insaturados na dieta. O consumo de ácidos graxos poliinsaturados n-6, ou ômega-6, em substituição às gorduras saturadas, diminui a incidência de doença arterial coronária (reduzem o colesterol plasmático - LDL e HDL). Esses ácidos graxos são encontrados em óleos vegetais como o de milho, soja e girassol, por exemplo. Assim como os ácidos graxos ômega-6, os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (ômega-3) também promovem a redução do risco de doença cardíaca (redução dos triglicerídeos plasmáticos), além de apresentar atividade antitrombogênica. Eles podem ser encontrados nos óleos de peixe, de soja e de canola. As gorduras monoinsaturadas, o mesmo ocorrendo com as poliinsaturadas, em substituição aos ácidos graxos saturados, apresentam eficácia na redução do colesterol no sangue. Entretanto, ao contrário dos ácidos graxos poliinsaturados n-6, não reduzem o HDL. Os alimentos ricos em gorduras monoinsaturadas incluem os óleos de oliva e canola<sup>[14]</sup>.

### CAPÍTULO 3 - TÉCNICAS E MONTAGENS EXPERIMENTAIS UTILIZADAS

Neste capítulo as técnicas utilizadas para a realização deste trabalho serão brevemente apresentadas.

#### 3.1 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

O efeito fotoacústico foi descrito pela primeira vez em 1880, quando Alexander Graham Bell apresentou à *American Association for the Advancement of Science* seu trabalho no fotofone. Em seu artigo, ele descreveu brevemente a descoberta acidental do efeito fotoacústico em sólidos<sup>[15]</sup>. Nos anos seguintes, o referido efeito foi investigado por cientistas como Lord Rayleigh, Roentgen e Tyndall, mas limitações práticas, como o uso do próprio ouvido como detector, tornaram o efeito uma mera curiosidade científica. Algumas dessas limitações foram superadas após o desenvolvimento do microfone, mas ainda assim o interesse pelo efeito foi pequeno até meados da década de 1970. Até então as aplicações na área de fotoacústica foram em amostras na forma de gases, nas quais a absorção da luz por meios gasosos era detectada pela variação da temperatura/pressão usando-se um microfone<sup>[16]</sup>. Allan Rosencwaig foi o pioneiro na utilização do efeito fotoacústico para o estudo de sólidos, contribuindo de forma decisiva sobre a compreensão atual dos princípios deste efeito e de várias outras técnicas que formam a ciência fototérmica. A teoria de Rosencwaig-Gersho sobre o efeito fotoacústico para uma amostra em uma célula fotoacústica estruturou uma base teórica, a qual levou a um rápido desenvolvimento e aplicações do referido efeito<sup>[16-18]</sup>.

### 3.1.1 O efeito fotoacústico

O efeito fotoacústico é gerado ao incidir-se um feixe de luz modulada na amostra que se quer analisar<sup>[15, 16]</sup>. Esta amostra deve estar dentro de uma célula fotoacústica fechada que contenha um gás, este podendo ser o próprio ar. A incidência da luz na amostra e sua consequente absorção fazem com que haja uma excitação dos níveis de energia da amostra. Por processos de relaxação não radiativa, a radiação absorvida é transformada em energia térmica, ou seja, causa aquecimento periódico local em razão da modulação da luz incidente. Este aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com ela. Acoplado à câmara, há um microfone que detecta a variação da pressão no gás, o que resulta no sinal fotoacústico.

A obtenção de espectros de absorção óptica gerados pelo sinal fotoacústico devido à interação da matéria com uma radiação modulada de comprimento de onda conhecido caracteriza a técnica Espectroscopia Fotoacústica.

A amostra não absorve totalmente a radiação eletromagnética que incide sobre ela. A luz que não é absorvida será refletida ou transmitida. Da parte absorvida, uma fração interage imediatamente com as moléculas da superfície do material e o restante é absorvido gradativamente, interagindo com as camadas moleculares cada vez mais profundas. À medida que penetra na amostra o feixe luminoso tem sua intensidade diminuída. Essa diminuição da intensidade do feixe obedece à lei exponencial de Beer, e a distância de penetração do feixe na amostra, até que sua intensidade inicial se reduza ao valor de  $1/e$ , caracteriza a “absorção óptica do material”. O parâmetro  $l_\beta$  mede a absorção óptica da amostra, especificando seu caráter óptico, e é denominado de “comprimento de absorção óptica”.

Além das propriedades ópticas da amostra, o sinal fotoacústico depende das propriedades térmicas e geométricas da mesma. Uma das mais importantes é a difusividade térmica  $\alpha_i = k_i / \rho_i c_i$  [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ], que mede a velocidade com que o calor se propaga num meio, caracterizando-o fisicamente, pois é específica para cada material. A difusão de calor para um ponto da amostra, de acordo com a frequência de modulação da luz,  $f = \omega / 2\pi$ , será na forma de ciclos. E somente os pontos da amostra dentro do comprimento da absorção óptica,  $l_\beta$ , geram calor, sendo que a análise dessa transmissão periódica de calor é feita pelo comprimento de difusão térmica  $\mu_i = (2\alpha_i / \omega)^{1/2}$ . Este parâmetro é definido como sendo o ponto da amostra onde a magnitude da oscilação térmica se atenua a  $1/e$ .

Analisando os parâmetros ópticos e térmicos dos materiais, pode-se classificá-los:

**Classificação óptica:** classificam-se as amostras opticamente comparando sua espessura ( $l_s$ ) com o comprimento de absorção óptica ( $l_\beta$ ):

Se  $l_\beta \ll l_s$  : amostra opticamente opaca;

Se  $l_\beta \sim l_s$  : amostra absorvedora;

Se  $l_\beta \gg l_s$  : amostra opticamente transparente.

**Classificação térmica:** classificam-se termicamente as amostras a partir da comparação de sua espessura 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.

Mesmo uma amostra opaca pode ter seu espectro resolvido, desde que  $\mu_s < l_\beta$ . Caso contrário, a amostra se diz saturada, o que indica que 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 e devido à dependência do comprimento de difusão  $\mu_s$  com a 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.

É importante salientar, quanto à classificação térmica, que o comprimento de difusão térmica, equação (3.1), não é um parâmetro intrínseco do material, porque depende da frequência de modulação da luz incidente:

$$\left( \mu_s = \sqrt{\frac{\alpha_s}{\pi f}} \right) \quad (3.1)$$

Deste modo, variando-se a frequência  $f$ , uma mesma amostra pode passar de termicamente fina para termicamente grossa. O valor de  $f$ , para o qual ocorre a transição é chamado de frequência de corte ( $f_c$ ). Obtém-se ( $f_c$ ), portanto, igualando-se o comprimento de difusão térmica com a espessura da amostra:

$$\mu_s = l_s \Rightarrow f_c = \frac{\alpha_s}{\pi l_s^2} \quad (3.2)$$

Devido à relação direta de ( $f_c$ ) com a espessura, pode-se escolher convenientemente a região de espessura térmica pela faixa de frequência ou pela alteração da espessura da amostra.



### 3.1.2 Montagem experimental

O arranjo experimental para as medidas com a Espectroscopia Fotoacústica está esquematizado na Figura 4:

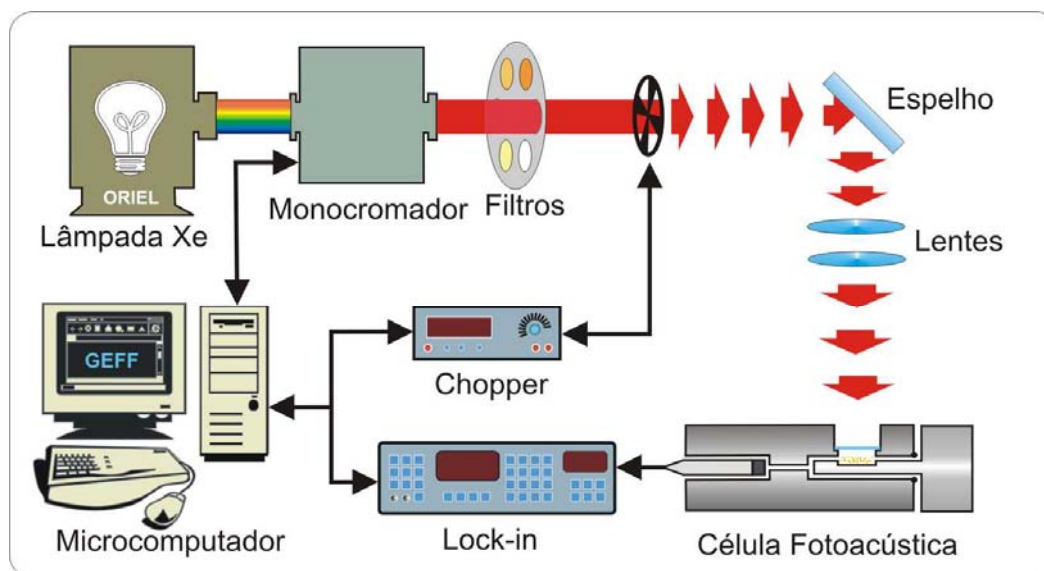


Figura 4: Arranjo experimental da Espectroscopia Fotoacústica.

Nesta montagem a fonte de luz é uma lâmpada de arco de Xenônio da marca Oriël, modelo 68820, com potência de 1000 Watts [W], e emissão no intervalo entre 180 e 4000 nm. O monocromador, modelo 77250 (1/8 m) da Oriël, pode ter suas fendas de entrada e saída ajustadas em 3,16 mm ou 1,56 mm. A frequência de modulação da luz é 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. Antes de passar pelo modulador de frequência, o feixe de luz passa ainda por filtros de banda larga para que sejam eliminadas ordens superiores de difração. 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 emissão da lâmpada. 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 sintonizado) 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.

### 3.2 ÍNDICE DE REFRAÇÃO

As medidas de índice de refração apresentadas neste trabalho foram realizadas em um interferômetro de Michelson-Morley modificado a partir da introdução de uma mesa giratória em um de seus braços, conforme representado esquematicamente na Figura 5.

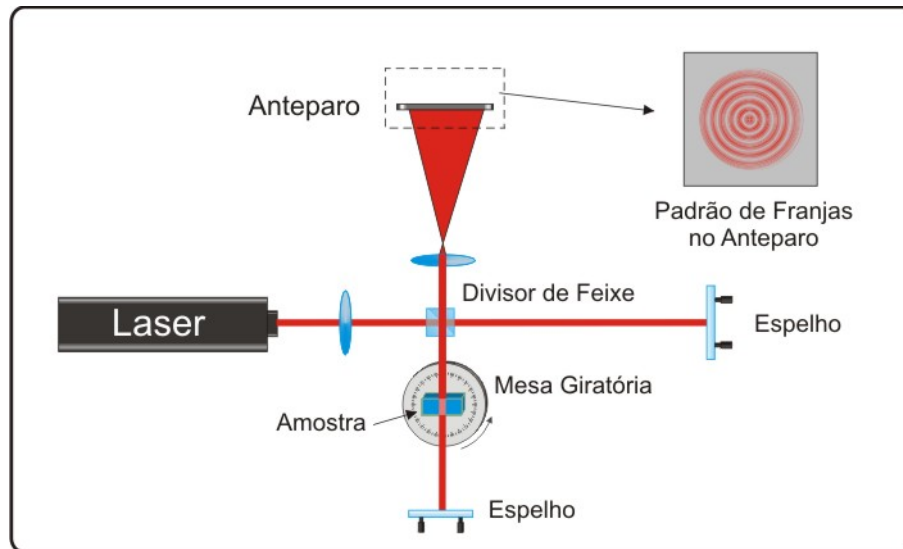


Figura 5: Interferômetro de Michelson-Morley modificado utilizado para as medidas do índice de refração<sup>[19]</sup>.

Nesta montagem a amostra é confinada em um porta-amostra (cubeta) fixado sobre uma mesa giratória localizada em um dos braços do interferômetro. O feixe de luz laser (He-Ne,  $\lambda = 632,8$  nm) é dividido em dois ao passar por um divisor de feixe. Um dos feixes percorre um caminho livre até um espelho, no qual incide perpendicularmente, retornando ao divisor de feixe. O segundo feixe é submetido a um desvio de  $90^\circ$ , com relação ao feixe incidente, passa através da amostra e é refletido perpendicularmente por um segundo espelho, que faz com que ele atravesse novamente a amostra e retorne ao divisor de feixe. Os dois feixes refletidos interferem entre si e são expandidos por uma lente, de forma que um padrão de interferência pode ser observado no anteparo. Quando a amostra é girada, provoca-se uma mudança no caminho percorrido pela luz no interior da mesma. Esta mudança no caminho óptico gera uma diferença de fase entre os feixes de luz, fazendo com que haja uma alteração no padrão das franjas de interferência, alternando os máximos e mínimos centrais.

Desta forma, conhecendo-se o número de franjas  $N(\theta)$  deslocado para um determinado ângulo  $\theta$ , o comprimento de onda do laser ( $\lambda$ ), a espessura da amostra ( $L$ ), a

espessura das paredes do porta-amostra e o índice de refração do material do porta-amostra ( $n_c$ ), pode-se obter o índice de refração da amostra a partir da equação

$$n = \frac{(1 - \cos \theta)(2L - F\lambda) + (F\lambda)^2 / 4L}{2L(1 - \cos \theta) - F\lambda} \quad (3.3)$$

Sendo a contribuição do porta-amostra, o termo  $F(\theta)$ , definido por:

$$F(\theta) = N(\theta) - \frac{4l}{\lambda} \left[ \frac{n_c - \cos(\theta - \theta_1)}{\cos \theta_1} - n_c + 1 \right] \quad (3.4)$$

Em que  $\theta_1$  é o desvio do feixe na primeira parede da cubeta e  $l$  a espessura da parede da cubeta.

### 3.3 COEFICIENTE TÉRMICO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

As medidas do coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) em função da temperatura foram realizadas em um interferômetro de múltiplas reflexões, cuja montagem está esquematizada na Figura 6.

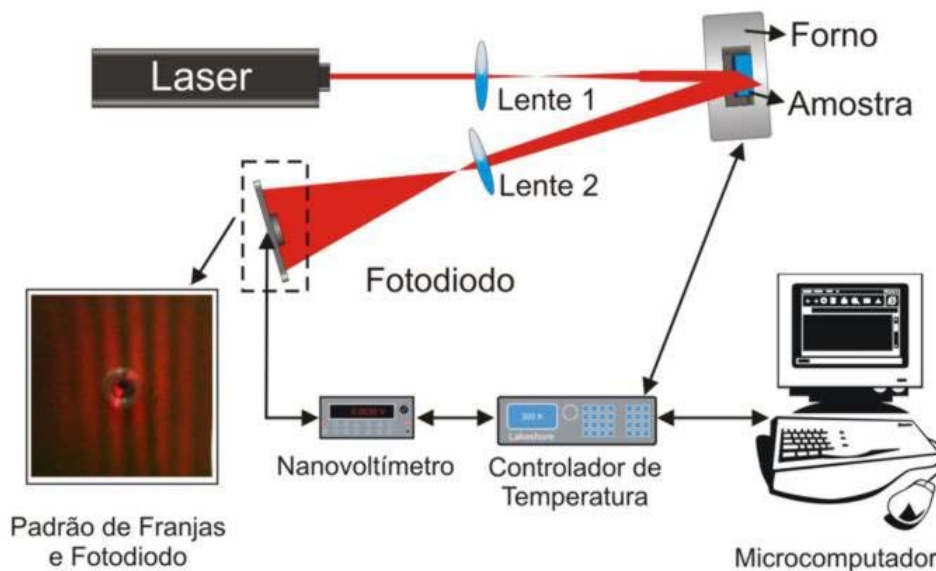


Figura 6: Representação da montagem experimental utilizada para as medidas de  $dn/dT$ <sup>[20]</sup>.

Nesta montagem é utilizado um Laser de He-Ne ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ), não polarizado, de potência de 3 mW (Coherent), como fonte de luz. O feixe laser é expandido ao passar por uma lente convergente (lente 1), de distância focal de 15 cm que é posicionada a 10 cm do laser, e incide na amostra que se encontra no interior de um forno resistivo, a uma distância de aproximadamente 30 cm da lente 1. O feixe incide de forma quase perpendicular na amostra ( $\approx 0,8^\circ$  em relação ao ângulo normal à superfície da amostra), para que a reflexão da primeira superfície da amostra interfira com a da segunda. As reflexões são expandidas por uma lente convergente, de foco 3 cm (lente 2), até atingirem o fotodiodo, de 3 mm de diâmetro, localizado a uma distância de aproximadamente 20 cm da lente 2.

Ao se variar a temperatura do forno, e conseqüentemente da amostra, ocorre um deslocamento dos máximos e mínimos das franjas de interferência, que é detectado pelo fotodiodo. Um nanovoltímetro (Keithley – mod.2182) detecta o sinal gerado pelo fotodiodo e o transfere para o microcomputador por meio de uma interface IEEE488. O controle da temperatura do forno é realizado com resolução melhor do que  $0,01^\circ\text{C}$ , utilizando-se um controlador de temperatura Lakeshore Cryonics Inc. – mod.340 e um sensor calibrado PT100.

Nesta técnica interferométrica, amostras líquidas são medidas em cubetas de quartzo, cujas paredes se comportam como semi-espelhos de um interferômetro de Fabry-Perot. Ao incidir o laser praticamente normal à superfície da cubeta, ocorre interferência da luz refletida nas duas paredes paralelas. A partir da posição dos máximos e mínimos de interferência tem-se a variação do caminho óptico. De sua derivada com relação à temperatura obtém-se o coeficiente térmico do caminho óptico ( $dS/dT$ ), que pode ser escrito como<sup>[21]</sup>:

$$\frac{dS}{dT} = n\alpha + \frac{dn}{dT} = \frac{\lambda}{2l} \frac{dm}{dT} \quad (3.5)$$

na qual  $n$  é o índice de refração do material da cubeta,  $\alpha$  é o coeficiente de expansão térmica linear da cubeta e  $dn/dT$  é o coeficiente térmico do índice de refração do líquido estudado, no comprimento de onda do laser utilizado. Uma vez que a expansão térmica linear do quartzo ( $\alpha$ ) é muito pequena ( $6 \times 10^{-7} \text{K}^{-1}$ ) quando comparada com os valores de  $dn/dT$  encontrados para líquidos ( $\sim 10^{-4} \text{K}^{-1}$ ), a expansão na direção de propagação do feixe pode ser desprezada e assim:

$$\frac{dS}{dT} \sim \frac{dn}{dT} = \frac{\lambda}{2l} \frac{dm}{dT} \quad (3.6)$$

A partir da diferença de temperatura entre dois máximos sucessivos ( $dm/dT$ ), do comprimento de onda da luz (laser) utilizada e da espessura da amostra, no caso o

caminho óptico da cubeta, pode-se determinar o coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ).

Mais detalhes sobre a teoria envolvida nesta técnica estão descritos no Apêndice B.

#### 3.4 DENSIDADE E COEFICIENTE DE EXPANSÃO TÉRMICA VOLUMÉTRICO

As medidas de densidade em função da temperatura para os óleos vegetais foram realizadas utilizando-se um densímetro comercial (Anton Paar modelo DMA 5000), que tem uma resolução da ordem de  $10^{-5}$  g/cm<sup>3</sup>.

O valor da densidade para cada temperatura é definido como a razão entre a massa e o volume ocupado pelo material:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (3.7)$$

Sabe-se que ao variar a temperatura de um determinado material, este apresenta variação de volume, que corresponde à variação do espaçamento interatômico médio do material. A partir da razão entre a variação volumétrica e o volume inicial ocupado pelo material em um dado intervalo de temperatura pode-se determinar o coeficiente de expansão térmico volumétrico do material ( $\beta$ ):

$$\beta = \frac{1}{V} \left( \frac{dV}{dT} \right)_p \quad (3.8)$$

E este, por sua vez, pode ser escrito em função dos valores obtidos para a densidade em função da temperatura, assim obtendo-se os valores para o coeficiente de expansão térmico volumétrico ( $\beta(T)$ ) em função da temperatura via equação:

$$\beta(T) = -\frac{1}{\rho} \frac{d\rho}{dT} \quad (3.9)$$

### 3.4 A REFRAATIVIDADE E O COEFICIENTE TÉRMICO DA POLARIZABILIDADE ELETRÔNICA

Para a análise do comportamento do índice de refração em função da temperatura define-se uma quantidade chamada de refatividade molar ( $A$ ). Tal quantidade é essencialmente a polarizabilidade total de um mol de uma determinada substância e pode ser escrita explicitamente em função da densidade e do índice de refração<sup>[22]</sup>:

$$A = \frac{W}{\rho} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) = \frac{RT}{p} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \quad (3.10)$$

A mudança no índice de refração com a temperatura é controlada por dois fatores que normalmente competem entre si. Primeiro, o volume do meio muda com a temperatura, normalmente aumentando com o aumento da temperatura, o que causa uma diminuição no número de espécies polarizáveis por unidade de volume e, portanto um decréscimo no índice de refração. Segundo, a polarizabilidade eletrônica ou atômica também muda com a temperatura, normalmente aumentando em função desta, resultando num aumento do índice de refração<sup>[23]</sup>.

$$\frac{dn}{dT} = \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 2)}{6n} (\varphi - \beta) \quad (3.11)$$

Pode-se verificar, portanto, que o coeficiente térmico do índice de refração é dominado pelo coeficiente térmico da polarizabilidade e pelo coeficiente de expansão térmica.

A partir dos valores previamente determinado para o índice de refração ( $n$ ), da densidade ( $\rho$ ), do coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) e do coeficiente de expansão térmica ( $\beta$ ), pode-se utilizar as equações (3.10) e (3.11) para determinar os valores da refatividade em temperatura ambiente e do coeficiente térmico da polarizabilidade eletrônica para o intervalo de temperatura, da temperatura ambiente ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) até  $50^\circ\text{C}$ .

Pode-se observar que o índice de refração (e sua variação com a temperatura) pode fornecer, através de sua relação com a polarizabilidade, informações microscópicas sobre o material estudado. Mais detalhes sobre este tema estão apresentados no Apêndice B.

### 3.4 CALORIMETRIA DE RELAXAÇÃO TÉRMICA

Para a realização das medidas de calor específico foi utilizado um calorímetro baseado no método de relaxação térmica construído em nosso grupo. O referido método consiste em determinar a variação da temperatura na amostra, em função do tempo, após a aplicação de um pulso de calor no substrato onde a amostra é fixada<sup>[24]</sup>. O substrato está conectado no reservatório térmico por fios de cobre. Uma representação esquemática da montagem experimental utilizada é apresentada na Figura 7.

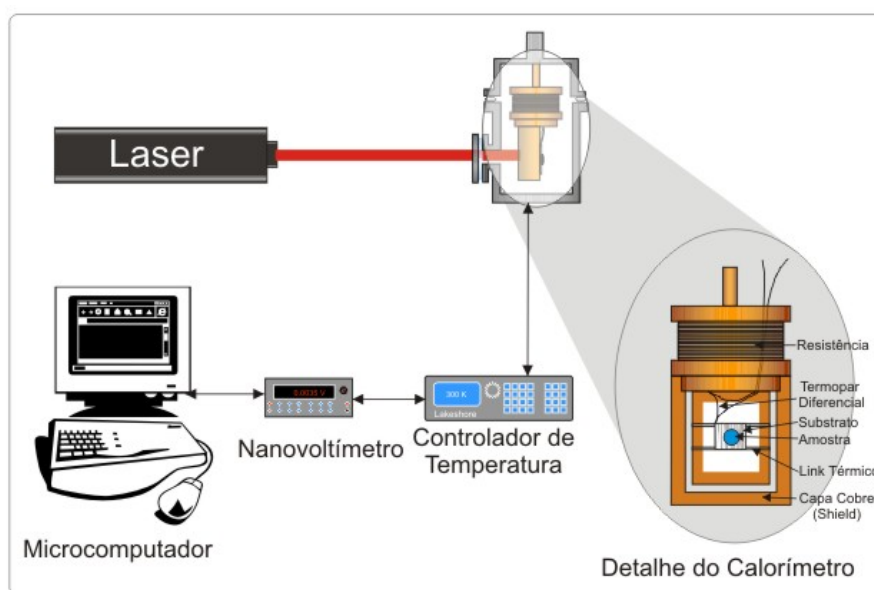


Figura 7: Montagem experimental para medidas de  $C_p$ , com detalhes do calorímetro.

Para gerar a diferença de temperatura entre o sistema (substrato+amostra) e o reservatório térmico é utilizado um laser de diodo (Coherent, modelo 31-1050, 635nm, potência de até 10mW). Essa diferença de temperatura é medida com um termopar diferencial conectado a um nanovoltímetro da marca Keithley, modelo 2182. Um controlador de temperatura é responsável pela leitura da temperatura do reservatório térmico e pelo controle de temperatura deste. Todo o processo é controlado por um microcomputador equipado com uma interface GPIB. O ajuste das curvas de relaxação térmica permite obter o valor da capacidade térmica do sistema, e assim o valor do calor específico da amostra a partir da equação(3.12):

$$C_{amostra} = \frac{C_{sistema} - C_{substrato}}{Massa_{amostra}} = \frac{\frac{P\tau_{sistema}}{\Delta T_{sistema}} - \frac{P\tau_{substrato}}{\Delta T_{substrato}}}{Massa_{amostra}} \quad (3.12)$$

sendo  $P$  a potência absorvida pelo substrato previamente determinada em medida com amostra padrão;  $\tau$  e  $\Delta T$  são o tempo de relaxação e a variação da temperatura entre o substrato e o reservatório térmico, respectivamente, obtidos a partir do ajuste das curvas de relaxação.

### 3.5 ESPECTROMETRIA DE LENTE TÉRMICA

As medidas com a técnica Espectrometria de Lente Térmica foram realizadas pelo Prof. Sandro M. Lima, do Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul<sup>[25]</sup>. Estes experimentos foram feitos com o objetivo de se determinar a difusividade térmica das amostras de óleos vegetais em função do processo de fritura. O arranjo experimental utilizado foi a configuração de dois feixes no modo descasado e o procedimento de medida foi o modo resolvido no tempo. Esta técnica já vem sendo utilizada em nosso grupo desde 1995, portanto, aspectos teóricos e experimentais da mesma podem ser obtidos em teses e artigos já publicados<sup>[26, 27]</sup>.

### 3.6 CONDUTIVIDADE TÉRMICA

Com os valores previamente determinados da difusividade térmica ( $D$ ), da densidade de massa ( $\rho$ ) e do calor específico ( $C_p$ ), pode-se determinar os valores correspondentes para a condutividade térmica ( $K$ ) a partir da relação:

$$K = D\rho C_p \quad (3.13)$$



## CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I

### 4.1 ESTUDOS *EX VIVO* E *IN VITRO* DA PENETRAÇÃO DE FITOFÁRMACOS NA PELE DE ANIMAIS UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Neste capítulo serão apresentados resultados em que a Espectroscopia Fotoacústica foi utilizada para estudos *ex vivo* e *in vitro* da penetração de fitofármacos pela pele de animais. Em cada estudo serão apresentados uma breve descrição das características das plantas utilizadas e o protocolo de tratamento adotado.

#### 4.1.1 ANÁLISE *EX VIVO* DA PENETRAÇÃO PERCUTÂNEA DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DA PLANTA *GUAZUMA ULMIFOLIA*, UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

A *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae), de nome popular “mutamba”, é uma árvore encontrada desde o México até a América do Sul<sup>[28]</sup>. Dos seus extratos podem ser identificados e isolados polissacarídeos; epicatequina e proantocianidinas oligoméricas, tais como procianidinas B2 e B5, três trímeros [procianidina C1, epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina, epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina] e um tetrâmero<sup>[29, 30]</sup>. Atualmente estas substâncias são conhecidas como proantocianidinas e têm sido usadas como cosméticos para proteção da pele<sup>[31]</sup>, e como medicamentos<sup>[32]</sup>. No caso da procianidina B2, estudos recentes mostram sua presença nos

folículos pilosos, promovendo o crescimento e estimulando o ciclo de progressão capilar<sup>[33]</sup>. A estrutura da procianidina B2 é mostrada na Figura 8.

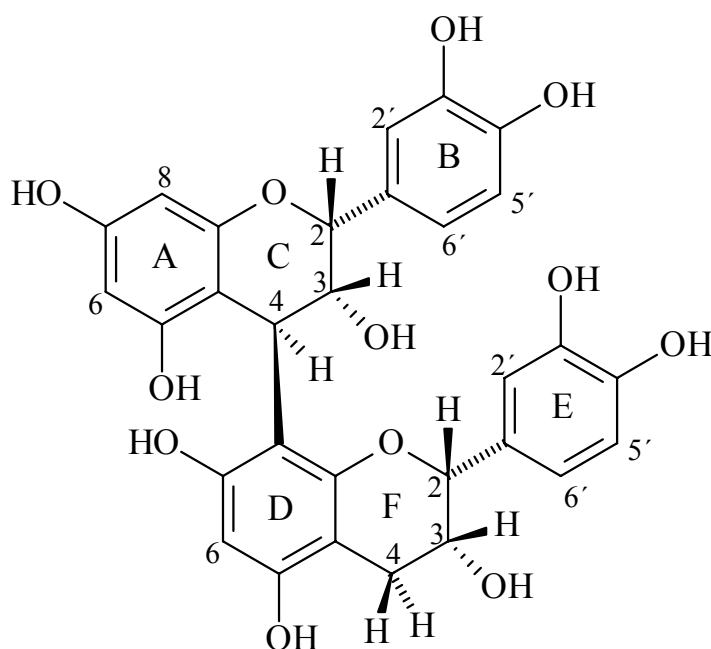


Figura 8: Representação estrutural da procianidina B2 [epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina].

O fato do principal interesse nesses compostos ser o uso dos mesmos na forma tópica faz com que seja crucial o conhecimento da eficiência dos agentes promotores de permeação usados nas formulações, para que assim se possa avaliar e controlar os mecanismos de interação entre a pele e as substâncias, além de suas atividades. Embora a penetração e a interação de substâncias aplicadas na pele venham sendo o objeto de estudos tanto com propósito médico, quanto cosmético, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não são bem compreendidos<sup>[34-40]</sup>. A Espectroscopia Fotoacústica ainda não é um método rotineiro neste tipo de análise, mas tem se mostrado uma técnica valiosa para avaliar a penetração e a distribuição de substâncias através da pele tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>[5, 34-42]</sup>.

Neste estudo a Espectroscopia Fotoacústica foi empregada para a determinação *ex vivo* da taxa de penetração das proantocianidinas extraídas da *Guazuma ulmifolia* em pele de rato. Os experimentos foram realizados em função do tempo de tratamento em um grupo bem controlado de animais. A espectrometria convencional foi utilizada para obter o coeficiente de absorção óptica das soluções usadas no preparo da formulação aplicada e das substâncias isoladas dos extratos.

### 4.1.1.1 Procedimento Experimental

As cascas da planta *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella* foram coletadas e o procedimento de extração foi realizado no grupo de pesquisa do Prof<sup>o</sup> João C. P. Mello do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM.

A extração foi realizada a partir de 1000 g de cascas da planta que foram secadas em ar. A extração foi feita com diferentes concentrações de solução acetona:água (7:3, 9:1 e 10:1), processada pelo método de turbo extração (Ultra-turrax ® UTC115KT; 20 min.;  $t \leq 40$  °C). Os extratos brutos (EB) foram filtrados, evaporados e então liofilizados (115 g). A seguir, duas loções capilares foram preparadas seguindo o procedimento descrito por Takahashi e colaboradores<sup>[33]</sup>. Uma das loções foi adotada como controle, sem o extrato bruto (EB), e a outra com 3% de extrato bruto, o que corresponde a 0,0663mg de procianidina B2/dia/animal), foi a loção teste com a presença do princípio ativo a ser avaliado.

O procedimento experimental envolvendo o uso de animais foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Maringá sob o protocolo de número 014/2004. Os animais, ratos Wistar® adultos e machos, foram divididos em dois grupos, um tratado com a loção controle e o outro com a loção teste. Os animais foram anestesiados para permitir a depilação manual e a assepsia, realizada na região próxima à área cervical. Os dois grupos foram tratados diariamente com a loção controle e teste, respectivamente. Após 7, 10 e 13 dias cinco animais de cada grupo foram sacrificados com overdose de tiopental.

As medidas de permeação percutânea foram realizadas com amostras dissecadas com espessuras no intervalo entre 1,19 e 1,74 mm, o que compreende a epiderme e a derme. Com este procedimento, os experimentos foram realizados cerca de 20 minutos depois dos animais serem sacrificados. As amostras dissecadas dos animais tratados com a droga foram então chamadas de “amostras teste” e as do grupo de animais submetidos ao tratamento com loção controle chamadas de “amostras controle”.

As medidas com a Espectroscopia Fotoacústica foram realizadas na montagem experimental descrita no Capítulo 2. Todos os espectros das amostras dissecadas foram obtidos com frequência de modulação de 15 Hz no intervalo de 400 a 700 nm. Considerando a frequência de modulação utilizada e a difusividade térmica da pele como  $3.0 \pm 0.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ <sup>[41]</sup>, o comprimento de difusão térmica, no qual o sinal fotoacústico está sendo gerado é da ordem de 25  $\mu\text{m}$ . Certamente esta profundidade não deve ser constante para todos os comprimentos de onda do espectro analisado, uma vez que  $l_{\beta}$  e provavelmente o tempo de relaxação não radiativo,  $\tau$ , podem mudar com o comprimento de onda, especialmente na região das bandas de absorção óptica da pele ou das

substâncias. Assim, para avaliar se a substância ativa se propagou através da espessura da pele, as amostras foram iluminadas pelo lado interno, ou seja, pelo lado oposto ao estrato córneo, conforme mostra a Figura 9. Desta maneira, as bandas de absorção da formulação aplicada topicamente na pele só serão detectadas se houver a propagação da referida formulação através da pele.

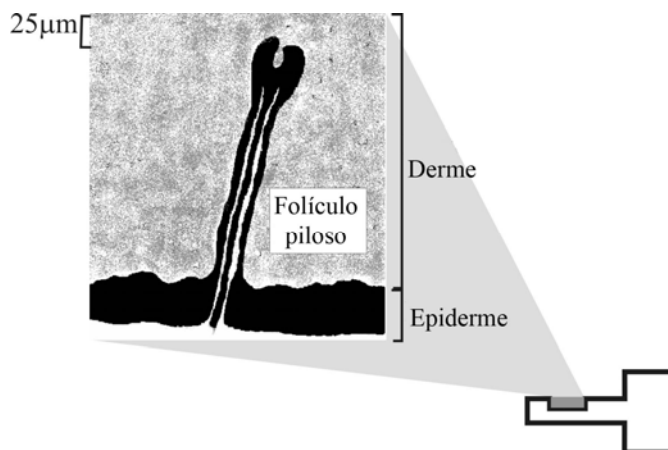


Figura 9: Representação de uma amostra de pele dentro da câmara fotoacústica.

Inicialmente, o extrato bruto da Mutamba, na forma liofilizada, foi medido com a Espectroscopia Fotoacústica. Adicionalmente, para obter a resposta espectral das formulações usadas e de seus componentes, o extrato bruto (EB) e suas frações, foram dissolvidos na mesma loção controle. Os espectros de absorção óptica destas soluções foram obtidos com a espectrofotometria, na região do UV-VIS, para uma melhor identificação destes componentes na pele.

### 4.1.1.2 Resultados e discussão

O espectro de absorção óptica do extrato bruto da *Mutamba* (na forma pastosa) foi obtido via Espectroscopia Fotoacústica e está mostrado na Figura 10, curva a). Devido à forte absorção óptica em toda a região do espectro visível, é possível identificar apenas três bandas de absorção óptica, que são largas, centradas em torno de 465, 565 e 650nm. As curvas b) e c) representam os espectros de absorbância da loção controle e da formulação farmacêutica (loção teste) respectivamente obtidos por espectrofotometria. Como pode ser observado, o espectro da loção controle não apresenta bandas de absorção nesta região, enquanto que a formulação farmacêutica apresenta bandas nas mesmas posições do espectro se comparado ao extrato bruto, evidentemente com uma diminuição de intensidade em algumas regiões em razão da baixa concentração de extrato utilizada na formulação.

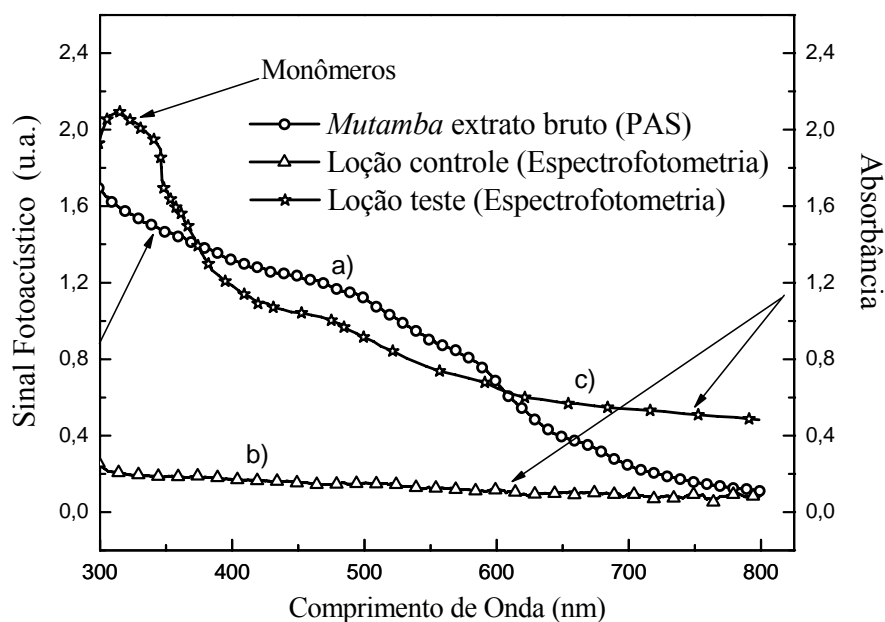


Figura 10: Espectros de absorção óptica: a) do extrato bruto da *Mutamba* obtido com a PAS, b) e c) das loções controle e teste respectivamente, medidos em um espectrofotômetro UV-VIS.

A Figura 11 mostra os espectros de transmitância de dois componentes do extrato bruto da *Mutamba*. De acordo com Galina<sup>[43]</sup> e Rocha<sup>[44]</sup> que isolaram e identificaram nove componentes deste extrato, todos derivados de flavonóides (monômeros e dímeros), as bandas de absorção centradas em 450 e 470 nm podem ser atribuídas aos dímeros epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina e procianidinas-B2, respectivamente, enquanto que, de acordo com Hör et al.<sup>[32]</sup>, os trímeros ou tetrâmeros são responsáveis pelas bandas de absorção em torno de 565 e 650 nm. Portanto, esses resultados indicam que os compostos fenólicos (taninos condensados) estão presentes na formulação aplicada (loção teste) e são responsáveis pelas bandas de absorção centradas em 465 e 565 nm. A banda na região de 650 nm provavelmente se deve à presença de trímeros e tetrâmeros, embora esses componentes não tenham sido isolados neste trabalho.

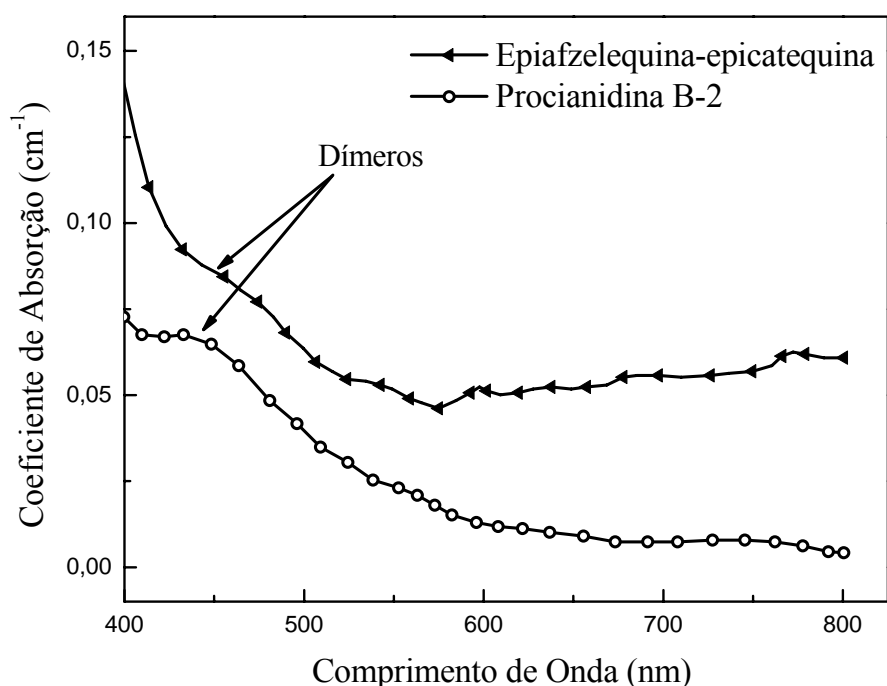


Figura 11: Espectros de absorção óptica dos componentes do extrato bruto da *Mutamba* obtidos em espectrofotômetro UV-VIS.

Posteriormente à identificação dos componentes da formulação, foram realizadas medidas em amostras de pele de ratos que receberam a aplicação tópica das loções teste e controle. A Figura 12 mostra exemplos de espectros determinados pela Espectroscopia Fotoacústica em amostras de pele de animais tratados durante 13 dias. A banda de absorção óptica centrada em torno de 406 nm é devida à presença de sangue na área excitada, as bandas cujos centros estão em torno de 550 e 600 nm estão também presentes na amostra controle, sendo, portanto, associadas à presença de gordura no tecido dissecado, por exemplo. Como nessa região também há a presença de bandas de componentes da formulação (565 nm), toda a região do espectro (~ 450 a 700 nm) foi considerada no ajuste. Pode ser visto que o espectro da amostra teste apresenta duas bandas de absorção óptica em torno de 475 e 640 nm, as quais não estão presentes no espectro da amostra controle. Este resultado é relevante, uma vez que confirma a propagação da formulação através da pele. Esta observação pode ser reforçada pelo fato da baixa concentração de extrato utilizado na formulação ter sido detectada pela Espectroscopia Fotoacústica no lado interno da pele, ou seja, no lado oposto ao da aplicação da loção. Isto confirma a penetração da procianidina-B2 através da pele até atingir a derme e conseqüentemente os folículos pilosos.

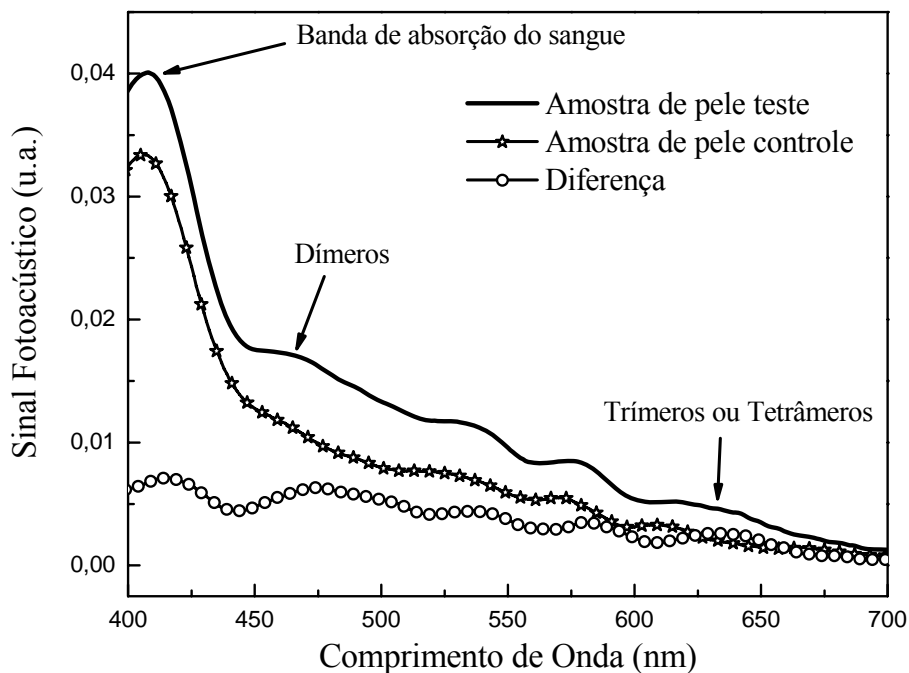


Figura 12: Espectros obtidos com a espectroscopia fotoacústica de duas amostras de pele tratadas por 13 dias com as loções teste e controle, respectivamente. A curva que mostra a subtração entre os dois espectros evidencia as bandas do extrato.

Em seguida, realizamos um ajuste matemático para quantificar as bandas de absorção óptica da procianidina-B2 em função do tempo de tratamento, ou seja, para avaliar a taxa de penetração da formulação. Este ajuste consistiu no cálculo, por integração, da área dos espectros no intervalo entre 450 e 700 nm, uma vez que neste intervalo estão as bandas de absorção referentes aos componentes da Mutamba. Os valores das áreas dos espectros das amostras teste foram normalizados em relação aos calculados para as amostras controle no respectivo tempo de tratamento. Isto para garantir que a normalização fosse realizada entre animais de mesma idade (crescimento e quantidade de gordura). Os dados das amostras controle também foram normalizados para facilitar a comparação e a interpretação dos resultados. Os resultados em função do tempo de tratamento são mostrados nas curvas a) e b) da Figura 13. O aumento em função do tempo dos valores das áreas calculadas para as amostras teste, devido a presença das bandas de absorção associadas à loção aplicada e conseqüentemente à procianidina-B2, reforça a capacidade do promotor usado na formulação de promover a propagação desta através da pele, atingindo a região onde os folículos pilosos, responsáveis pelo crescimento capilar, estão localizados.

Adicionalmente, foi realizado um procedimento similar ao adotado por I. Notingher e colaboradores<sup>[39]</sup> para determinar a concentração da formulação aplicada em função do tempo de tratamento, conforme a equação:

$$c(t) = \frac{[A_t(t) - A_c(t)]}{[A_l - A_c(t)]} \quad (4.1)$$

Os termos  $A_t(t)$  e  $A_c(t)$  são os valores das áreas sob os espectros, entre 450 e 700 nm, das amostras teste e controle, respectivamente, enquanto que  $A_l$  é o valor da área (no mesmo intervalo) sob o espectro da loção teste, o qual foi tomado como constante. Nota-se um comportamento linear dos valores de  $c(t)$  em função do tempo, similar ao observado na curva b da Figura 13, embora com coeficiente angular diferente. Isto evidencia a eficácia da formulação aplicada.

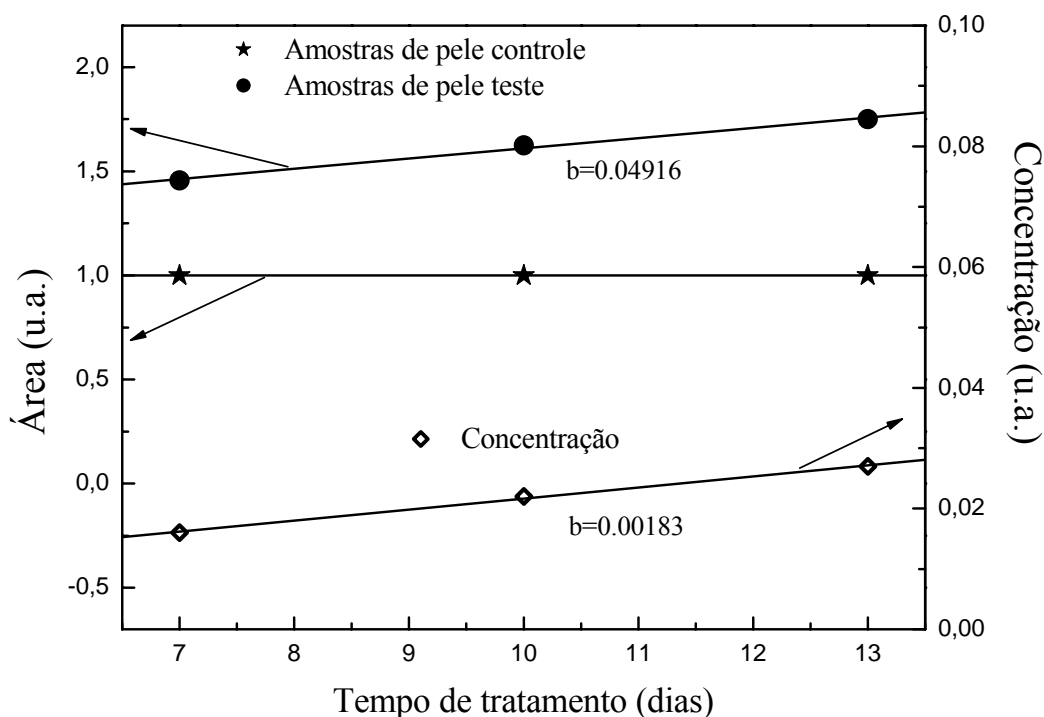


Figura 13: Valores normalizados das áreas sob os espectros de absorção das amostras teste e controle (curvas a) e b)). Os valores de  $c(t)$  calculados são mostrados na curva c).



### 4.1.1.3 Conclusão

Neste estudo a espectroscopia fotoacústica demonstrou ser uma técnica adequada para determinar *ex vivo* a penetração em pele de ratos de extratos de prociadinas obtidos da planta *Guazuma ulmifolia*, popularmente conhecida como mutamba. Os experimentos foram realizados em função do intervalo de tempo de aplicação tópica, a partir dos quais obteve-se a taxa de penetração da prociadina B2 através da pele. O procedimento de se realizar a excitação no lado oposto ao da aplicação da formulação se mostrou eficaz para demonstrar que as substâncias penetraram através da pele e atingiram a região onde se localizam os bulbos dos folículos pilosos, responsáveis pelo crescimento capilar. Este estudo é relevante porque testes anteriores já demonstraram a eficácia desta formulação para promoção do crescimento capilar, e especialmente porque a detecção das substâncias foi realizada mesmo com a concentração do princípio ativo na formulação muito baixa, da ordem de 3%. É provável que a espectroscopia fotoacústica seja o único método para se realizar este tipo de estudo em amostras pastosas e/ou líquidas da área de fitofármacos.

#### 4.1.2 CAPACIDADE EMOLIENTE DA INFUSÃO DE FOLHAS DE BATATA DOCE (*IPOMOEA BATATAS*) EM ABSCESSOS EM RATOS.

A batata doce, cientificamente denominada *Ipomoea batatas*, é uma planta herbácea supostamente originária da Índia e característica de climas subtropicais, e em tais regiões se desenvolve espontaneamente. Apresenta, segundo o senso comum, propriedades emolientes, sendo empregada na forma de bochechos em casos de inflamações da boca e garganta, facilitando, inclusive, a drenagem de abscesso dentoalveolar agudo<sup>[45]</sup>. O abscesso dentoalveolar agudo é um processo inflamatório que afeta os tecidos da região apical e/ou periapical do dente, apresentando formação de coleção purulenta, dor intensa e concentração/difusão de mediadores químicos inerentes ao processo reacional. Seu tratamento consiste, dentre outras medidas, na indução da drenagem da coleção purulenta, que pode se dar, nos casos evoluídos, por intervenção clínica ou naturalmente através da formação de fístula<sup>[46]</sup>.

A ação da *Ipomoea batatas* para o tratamento de problemas bucais tem sido alvo de poucos estudos científicos encontrados na literatura<sup>[47, 48]</sup>. Um destes trabalhos<sup>[47]</sup> descreve o uso da folha da batata doce na forma de chá, utilizada como bochecho, para sanar dores de dente e inflamações bucais. Já no modelo experimental de um segundo estudo<sup>[48]</sup>, o extrato hidroalcoólico de *Ipomoea batatas* foi utilizado no tratamento de edema da pata de ratos, não apresentando efeito antiinflamatório. No entanto, muitos componentes foliáceos já foram isolados e apresentaram, comprovadamente, atividades antifúngica, vaso-relaxante e antibiótica; além de efeitos citotóxicos<sup>[49-51]</sup>.

Diante dos relatos dos pacientes que indicam o uso de infusão de folha de *Ipomoea batatas* para a resolução de casos de abscesso dentoalveolar agudo baseados na medicina popular e da ausência de informações científicas sobre o assunto, buscou-se comprovar, experimentalmente, a veracidade desta prática. Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram numa primeira etapa, verificar se a infusão das folhas de *Ipomoea batatas* (batata doce) apresenta capacidade emoliente, *in vivo*, em modelo animal, na resolução de abscesso agudo, e se há a permeação de suas substâncias; e numa segunda etapa avaliar e comparar a permeação, *in vitro*, da infusão destas folhas entre a pele do dorso e a mucosa bucal do animal. Este trabalho foi desenvolvido em parceria com a Professora Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo e as alunas Daniele S. Fernandes e Isabela N. Bonilha do Departamento de Odontologia da UEM

### 4.1.2.1 Procedimento Experimental

#### *Primeira etapa*

Na primeira etapa do estudo foram utilizados 35 ratos Wistar, machos e adultos (60 dias). Para tal o projeto de pesquisa foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Maringá parecer número 054/2005. Inicialmente abscessos agudos foram induzidos no dorso dos animais. Para isso eles foram anestesiados, tricotomizados e inoculados intradermicamente com 0,8 ml de solução de *Staphylococcus sp.* Para o tratamento, os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo SB: ratos (n=5) controle que não foram banhados;
- Grupo BA48h: ratos (n=10) banhados apenas em água, na mesma temperatura da infusão (~42°C), a partir de 48h após a inoculação (tempo médio correspondente ao abscesso em sua máxima dimensão, observado em estudo piloto);
- Grupo BI48h: ratos (n=10) banhados na infusão a partir de 48h após a inoculação;
- Grupo BI0h: ratos (n=10) banhados na infusão desde o primeiro dia da inoculação dos microorganismos.

A infusão para o banho dos animais foi preparada utilizando-se um litro de água fervente que foi depositada sobre 50 g de folhas de *Ipomoea batatas*, frescas e lavadas, obtidas sempre do mesmo produtor, permanecendo durante 10 min em recipiente fechado. Após este período, as folhas foram removidas e se aguardou até que a infusão atingisse a temperatura aproximada de 42°C. Os animais recebiam banhos com duração de dois minutos três vezes ao dia, em horários padronizados. Foram realizadas medidas da circunferência do local da inoculação antes de sua execução e da mesma forma foram realizadas as subseqüentes medidas logo após a inoculação, 4 h depois e diariamente até o sétimo dia. Após este período os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico e um fragmento de pele correspondente ao local da lesão foi retirado cuidadosamente para análise com a Espectroscopia Fotoacústica. Esta por sua vez, foi realizada no lado interno da pele, ou seja, no lado oposto ao submetido aos banhos. Todos os espectros das amostras de pele foram obtidos com frequência de modulação de 15 Hz no intervalo de 280 a 700 nm.

#### *Segunda etapa*

Nesta etapa do estudo, apenas nove animais foram sacrificados. Estes, por sua vez, não passaram por nenhum tipo de tratamento prévio ou inoculação de microorganismos. Nesta etapa, portanto, foram realizados apenas medições via

Espectroscopia Fotoacústica. Além de fragmentos da pele da região do dorso foram coletadas também amostras da mucosa bucal para utilização nos testes.

A infusão de folhas para aplicação nas amostras de pele foi preparada da mesma forma que na primeira fase do estudo, apenas com a adição de um corante à infusão, o que permitiu uma melhor identificação das bandas de absorção óptica da infusão na pele (dorso ou mucosa). Como era necessário manter as propriedades da infusão das folhas de *Ipomoea batatas*, foi utilizado um corante artificial utilizado pela indústria de alimentos, Mix Coralim® (São Bernardo do Campo, Brasil), de cor rosa cereja à base de eritrosina, na concentração 1:1000. Neste estudo, a concentração do corante foi de 2 gotas/5mL, de modo a permitir uma melhor análise do espectro de absorção padrão da infusão.

As amostras dos tecidos foram divididas inicialmente em três grupos maiores, referentes ao tempo de tratamento e estes em subgrupos de amostras teste e controle:

- Grupo 1: simulação de três dias de banho, ou seja, 18 min (soma do tempo total dos banhos recebidos: 3 diários durante 3 dias, com duração de 2 min);  
PI3 - amostras de pele (n=3) imersas na infusão (chá+corante);  
PA3 - amostras de pele (n=3) imersas em água destilada;  
MI3 - amostras de mucosa (n=3) imersas na infusão (chá+corante);  
MA3 - amostras de mucosa (n=3) imersas em água destilada;
- Grupo 2: simulação de cinco dias de banho, 30 minutos (soma do tempo total dos banhos recebidos: 3 diários durante 5 dias, com duração de 2min);  
PI5 - amostras de pele (n=3) imersas na infusão (chá+corante);  
PA5 - amostras de pele (n=3) imersas em água destilada;  
MI5 - amostras de mucosa (n=3) imersas na infusão (chá+corante);  
MA5 - amostras de mucosa (n=3) imersas em água destilada;
- Grupo 3: simulação de sete dias de banho, 42min (soma do tempo total dos banhos recebidos: 3 diários durante 7 dias, com duração de 2min);  
PI7 - amostras de pele (n=3) imersas na infusão (chá+corante);  
PA7 - amostras de pele (n=3) imersas em água destilada;  
MI7 - amostras de mucosa (n=3) imersas na infusão (chá+corante);  
MA7 - amostras de mucosa (n=3) imersas em água destilada.

Os espectros fotoacústicos foram realizados, como na primeira etapa do estudo, no lado oposto ao da aplicação da formulação, seja ela, água ou chá (chá+corante). Deste modo os lados da amostra que receberam a aplicação foram: estrato córneo, no caso das amostras de dorso e mucosa jugal, no caso das amostras extraídas da cavidade bucal dos animais. A espessura média das amostras de pele tratadas com a infusão foi de 1,25 mm, variando entre 0,97 e 1,4 mm. Para as amostras de mucosa a espessura média foi de 1,35 mm, com valores entre 1,02 e 1,48 mm.

Como na primeira etapa, a frequência de modulação utilizada foi de 15 Hz e os espectros foram obtidos no intervalo de 200 a 700 nm, assim como o carvão utilizado na normalização dos dados. Deste modo, considerando a frequência de modulação utilizada e a difusividade térmica da pele como  $3.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ <sup>[41]</sup>, o comprimento de difusão térmica, no qual o sinal fotoacústico está sendo gerado é da ordem de 25  $\mu\text{m}$ . Como mencionado anteriormente, esta profundidade pode não ser constante em função do comprimento de onda utilizado, uma vez que  $l_{\beta}$  e provavelmente  $\tau$  podem ser diferentes ao longo do espectro, especialmente na região das bandas de absorção óptica.

### 4.1.2.2 Resultados e discussão

#### *Primeira etapa*

Os experimentos conduzidos pela aluna Daniele S. Fernandes do Departamento de Odontologia foram planejados de forma que se aproximassem dos procedimentos utilizados pelos pacientes. Para isso foi realizada a inoculação de *Staphylococcus sp* que desencadeou o desenvolvimento de abscessos agudos em todos os animais, especialmente após 48 horas. As medidas médias da circunferência do dorso obtidas ao longo do tempo experimental são apresentadas na Figura 14. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste *One-way Anova*, que integra o programa *Microcal Origin*, com grau de significância  $p < 0,05$ . Para o grupo sem tratamento (sem banho) a média dos dados foi estatisticamente maior que para os demais grupos submetidos a tratamento, seja com infusão ou com água morna, apresentando valores de  $p = 0,0002$  (SB-BA48h),  $p = 0,0002$  (SB-BI0h) e  $p = 0,00001$  (SB-BI48h). Entre os grupos banhados com infusão (BI48h e BI0h) e água morna (BA48h), embora não se tenha verificado diferença estatística, observou-se uma leve tendência a favor da capacidade antimicrobiana da infusão de *Ipomoea batatas* em relação à água morna na mesma temperatura, em especial quatro dias após a inoculação. Isto porque as lesões tratadas não se desenvolveram de forma exuberante, exibindo medidas menores ou resultando em fistulização.

A utilização da infusão de maneira profilática, ou seja, antes do surgimento da lesão no intuito de que esta não viesse a se desenvolver, não alcançou o resultado esperado, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos banhados com infusão desde o primeiro dia (BI0h) e após 48h (BI48h) da inoculação. Em contrapartida, observou-se que os animais banhados, em especial com infusão, apresentaram maior indução à formação de fistulas que promoveram a drenagem da coleção purulenta. Este fato foi observado em cinco dos animais tratados com infusão, um com água morna e nenhum do grupo controle (SB). Este ocorrido permite inferir que não apenas o fator calor foi determinante neste processo, mas que a ação das folhas de *Ipomoea batatas* podem também ter colaborado de forma terapêutica.

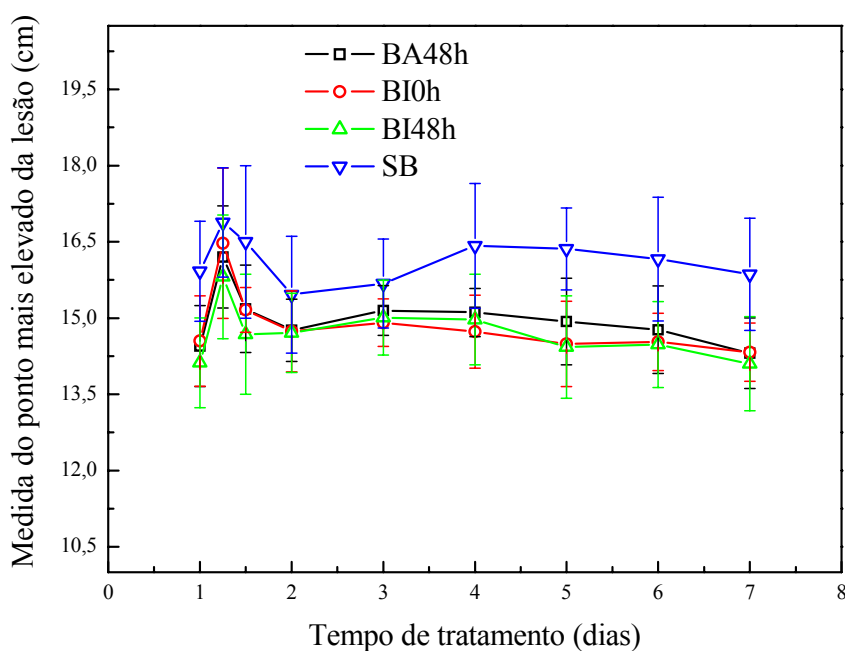


Figura 14: Média das medidas das lesões (cm) dos grupos experimentais ao longo do tempo. Sendo BA48h: animais banhados em água a partir de 48h após a inoculação; BI0h: animais banhados na infusão desde o dia da inoculação; BI48h: animais banhados na infusão a partir de 48h após a inoculação; SB: animais não banhados.

A espectroscopia fotoacústica foi utilizada para verificar se os efeitos limitados da infusão, conforme descrito anteriormente, poderiam ser atribuídos a uma baixa taxa de penetração da infusão na pele. O espectro de absorção óptica da infusão utilizada no tratamento dos ratos foi obtido em um espectrofotômetro UV-VIS. Na Figura 15 estão representados os espectros de absorção óptica referentes à infusão utilizada para o tratamento dos animais, na concentração de 50g folha/1 litro de água; e um espectro referente a uma das amostras de pele do dorso de cada grupo (SB, BA48h, BI48h e BI0h).

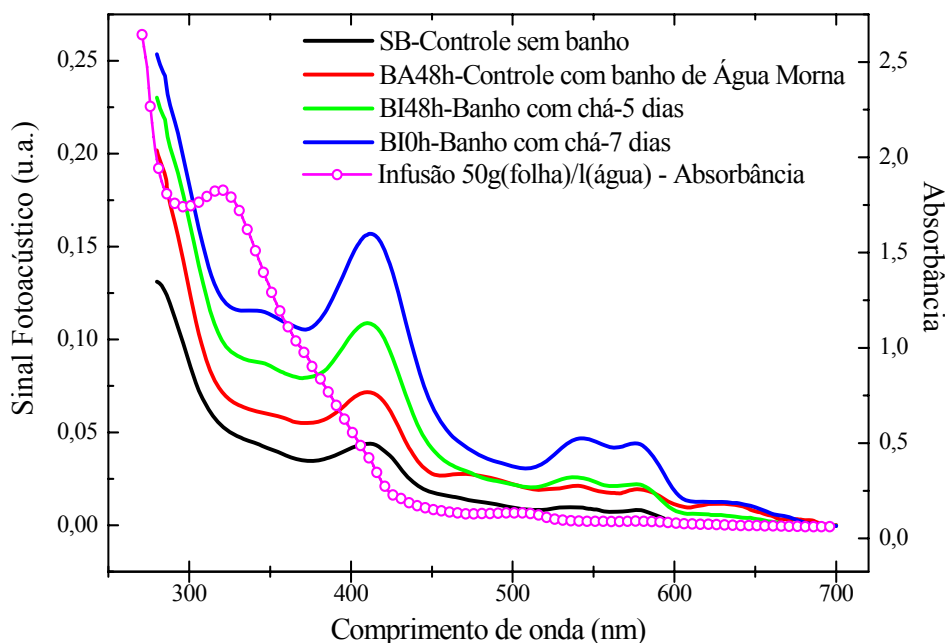


Figura 15: Espectros de absorção das amostras de pele do dorso dos animais tratados e espectro da infusão realizado em espectrofotômetro.

Nota-se no espectro que a infusão apresenta uma banda de absorção centrada em torno de 320 nm. Nos espectros das amostras utilizadas como controle dos grupos SB e BA48h, não houve evidência da existência de bandas de absorção óptica centradas nesta região espectral, o que não significa que não haja componentes absorvedores nesta região do espectro. Isto porque em se tratando de radiação ultravioleta e visível as bandas de absorção são largas e se somam com aquelas de outros componentes. Como por exemplo, a banda de absorção óptica centrada em ~410nm, que é atribuída à presença de sangue nas amostras, é muito intensa e em alguns dos espectros superpõe-se a aquele da infusão, dificultando a análise dos dados. Pode-se também verificar que, em média, esta banda se mostrou mais intensa nas amostras tratadas durante sete dias, o que pode ser devido ao aumento do fluxo sanguíneo provocado pelos banhos na região, ou seja, um aumento da resposta inflamatória. Ainda assim, nos espectros referentes às amostras dos grupos BI48h e BI0h é evidente a presença de uma região de absorção coincidente com a da banda da infusão. Além desta análise visual, foi realizada uma integração numérica da região do espectro referente a esta absorção, 325-370 nm. Os valores da área sob a curva experimental da região analisada são apresentados na Figura 16. Nota-se que os dados apresentam uma tendência de diferenciação entre os grupos tratados com a infusão e os grupos controle (animais banhados com água e grupo sem banho), porém, ao se analisar o desvio padrão, principalmente para o grupo BI48h, a distinção fica prejudicada. Isso fica

mais uma vez evidenciado com a aplicação do teste estatístico *One-way Anova* com nível de significância  $p < 0,05$ , o qual não mostrou significância estatística entre os diferentes valores médios das áreas para cada grupo, ou seja aqueles banhados com infusão com relação ao grupo SB, quanto ao grupo banhado com água.

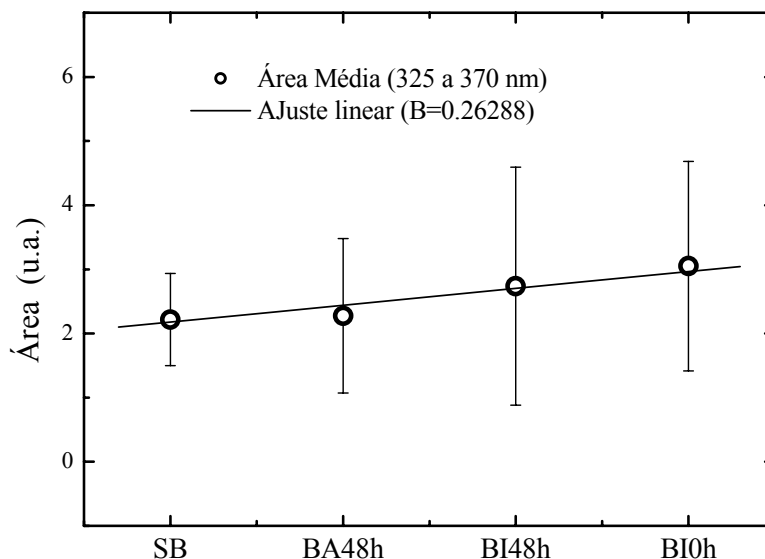


Figura 16: Valores das áreas calculadas, na região espectral entre 325 e 370 nm.

#### *Segunda etapa*

Sendo preconizado pela medicina popular o uso da infusão de *Ipomoea batatas* na forma de bochechos e assim, diretamente em contato com a mucosa bucal e sendo este o ambiente no qual normalmente se desenvolve o abscesso dentoalveolar, surge a necessidade de verificar o comportamento da permeação da infusão diretamente neste tipo de tecido e até mesmo compará-lo com o estudo em peles de dorso. Para isso, espectroscopia fotoacústica foi utilizada para as medidas em pele de dorso e em mucosa bucal que receberam então a aplicação da infusão simulando-se os períodos de 3, 5 e 7 dias de banho, ou bochecho.

O uso do corante alimentício junto à infusão teve o efeito esperado, uma vez adicionado ao chá, induz uma banda de absorção óptica centrada em  $\sim 526$  nm, como pode ser observado na Figura 17. Nesta mesma figura estão representados ainda espectros de amostras de mucosa e de pele referentes a sete dias de tratamento, com infusão (chá+corante) e com água (amostras controle). Pode-se observar nos espectros um aumento da absorção na região da banda de absorção óptica da infusão. Verifica-se também algumas pequenas diferenças entre os espectros de absorção das amostras controle, principalmente na região de  $\sim 510$ – $600$  nm. O fato das amostras de mucosa serem



mais absorvedoras nessa região causa dificuldade para a avaliação dos espectros, fato que foi notado posteriormente ao início do estudo, já que os testes iniciais com a utilização do corante foram realizados em amostras de pele de dorso. Há de ser mencionado que existe dificuldade para se remover a mucosa bucal dos animais, que são muito delgadas, e para que não se rompessem inevitavelmente foram retiradas com a presença de possíveis porções do tecido adiposo subjacente. No caso das amostras de pele, a facilidade de remoção permitiu obter apenas o tecido a ser analisado, com maior exatidão dimensional e da constituição tecidual.

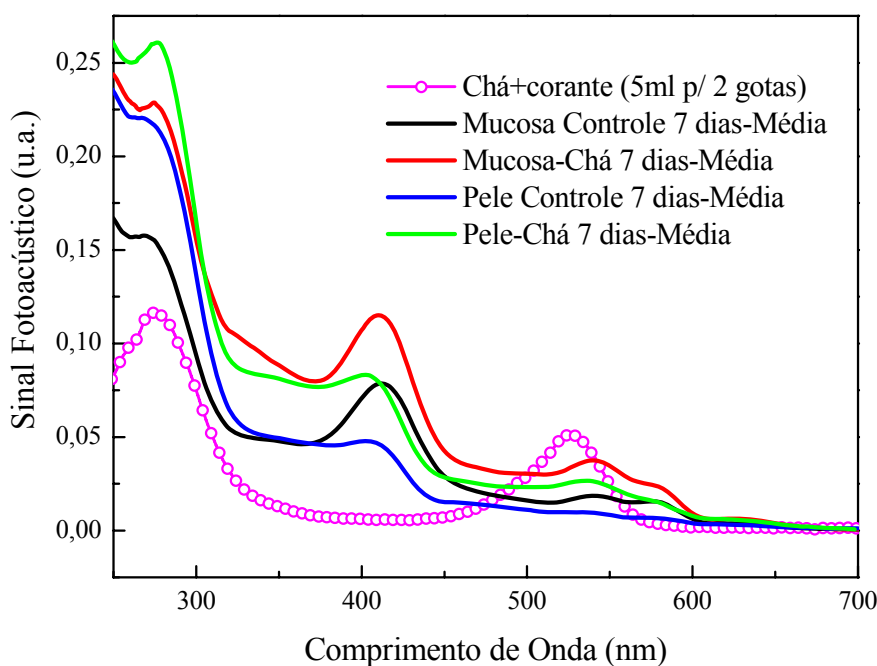


Figura 17: Espectros de absorção óptica das amostras tratadas e controle, de pele e da mucosa. Espectro de absorção óptica da infusão com a adição do corante de cor rosa cereja na proporção 1000:1.

Os valores das áreas sob a região de interesse nos espectros (470-608 nm) foram calculados por meio de integração e estão representados na Figura 18. A estes dados, como na primeira fase do estudo, foi aplicado o teste estatístico *One-way Anova*. Os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as amostras de pele controle e tratadas (infusão+corante) nos intervalos de tempo simulados de 5 (PI5) e 7 (PI7) dias, apresentando nível de significância  $p < 0,05$  ( $p = 0,048$  e  $p = 0,022$ , respectivamente). Para o intervalo de tempo de 3 (PI3) dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios das áreas das amostras controle e tratadas.

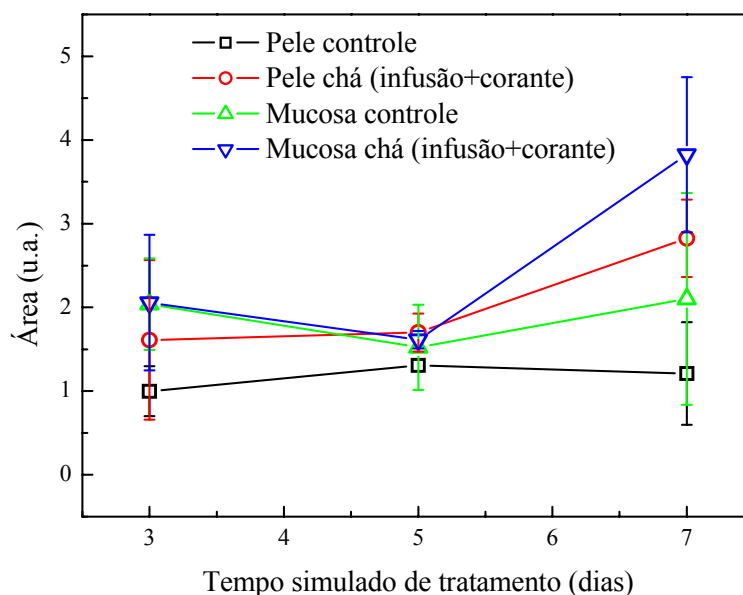


Figura 18: Valores das áreas entre 470 e 608 nm, calculadas por integração.

Para os valores relativos às absorções nas amostras de mucosa não foi encontrada diferença estatística entre os grupos de amostras tratadas (MI3, MI5 e MI7) e controle (MA3, MA5 e MA7) nos seus respectivos intervalos de tempo de tratamento. O mesmo ocorreu para a comparação entre os valores encontrados para as amostras de pele e mucosa. No entanto, destaca-se a tendência do grupo MI7 (mucosa bucal simulando infusão durante 7 dias) em mostrar-se superior em relação aos demais grupos. Isto pode ser melhor observado na Figura 19, na qual estão representadas as diferenças entre espectros de amostras tratadas e controles, tanto de pele quanto de mucosa. Pode-se constatar, portanto, que a variação da permeabilidade nas amostras de mucosa pode ter interferido nos resultados de maneira já esperada<sup>[52]</sup>.

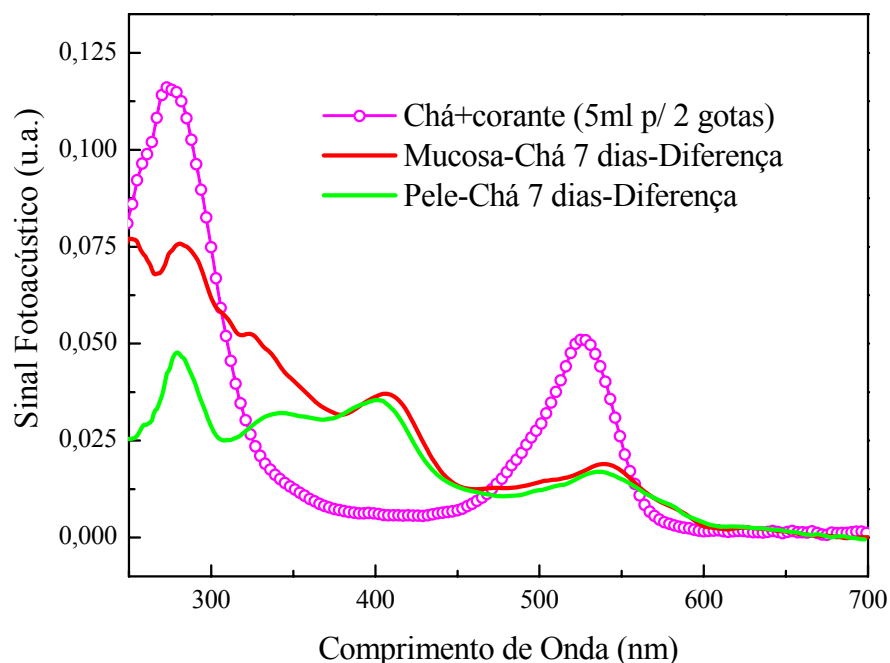


Figura 19: Diferença entre espectros controle e chá.

A ausência de diferença estatística nas amostras de mucosa bucal deve ser considerada com parcimônia. O fato deste estudo *in vitro* não reproduzir a real absorção da mucosa *in vivo* diante de abscesso dentoalveolar agudo deve ser ressaltado. Nesta situação, há um aumento do fluxo sanguíneo local que poderia permitir maior permeabilidade da infusão de *Ipomoea batatas* aos tecidos, ao mesmo tempo que, seus componentes foliares, comprovadamente, atuariam moléculas, células e citocinas que atuariam nas respostas inflamatória e imunológica desencadeadas<sup>[53]</sup>.

### 4.1.2.3 Conclusão

Em nossas condições experimentais, a infusão preparada a partir das folhas de *Ipomoea batatas* não apresentou, estatisticamente, capacidade emoliente *in vivo*, em modelo animal, para obter melhor resolução de abscesso agudo que aquela apresentada pela água morna em igual temperatura, embora indícios de sua ação tenham sido observados.

*In vitro*, as amostras de pele apresentaram absorções referentes à infusão, de forma estatisticamente diferentes em dois dos três intervalos de tempo de banho, coincidentemente os mesmo intervalos de tempo utilizados na primeira fase do estudo. O mesmo não aconteceu com as amostras de mucosa, para as quais, novas dificuldades experimentais surgiram. No entanto, os resultados obtidos indicam a necessidade de novos estudos, pois, apesar da inexistência de diferenças estatísticas, os sinais biológicos observados com o uso da infusão de folhas de *Ipomoea batatas* foram melhores do que os da água morna para a resolução de abscessos. Mais uma vez, foi demonstrado o potencial da espectroscopia fotoacústica para o estudo do processo de difusão de formulações na pele e na membrana bucal.

### 4.1.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DO EXTRATO OBTIDO DAS FOLHAS DE *ARRABIDEA CHICA*

A *Arrabidaea chica*, conhecida popularmente como cajuru, é a principal espécie estudada do gênero *Arrabidaea* da família *Bignoniaceae*<sup>[54]</sup>. Esta família de plantas ocorre no Brasil desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único, podendo ser encontrada nos cerrados, mata atlântica e região amazônica. Possui em torno de 120 gêneros e 800 espécies, existindo poucos relatos de estudos químicos do gênero *Arrabidaea*<sup>[55]</sup>. Popularmente a *Arrabidaea chica* é utilizada como anti-inflamatório, agente adstringente, fitoterápico nos tratamentos de cólica intestinal, diarreia, leucorréia, anemia e como pigmento<sup>[55-57]</sup>. Dela já foram isolados flavonóides, fitoesteróis e pigmentos utilizados em cosméticos como a carajurina, carajurona e 3-deoxiantocianidinas<sup>[55, 58]</sup>. Os extratos de plantas que contém flavonóides (cromóforos) são capazes de absorver a radiação ultravioleta, visto que o espectro de absorção ultravioleta de flavonóides geralmente apresenta duas bandas de absorção, uma entre 240 a 280 nm e a outra entre 300 a 550 nm. Estas bandas sugerem a possibilidade de utilização destes extratos na formulação de fotoprotetores contra a radiação UV<sup>[59]</sup>.

Neste trabalho, a espectroscopia fotoacústica foi utilizada para o estudo de formulações obtidas a partir da planta *Arrabidaea chica*. Os experimentos foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Celso Vataru Nakamura do Departamento de Análises Clínicas da UEM. O foco do estudo envolveu a avaliação dos extratos, da formulação de um protetor solar e da taxa de penetração *ex vivo* do mesmo na pele de coelhos.

#### 4.1.3.1 Procedimento Experimental

Após a coleta da planta, suas partes aéreas foram secadas e trituradas. O pó vegetal obtido foi submetido a extração com etanol:água (9:1). Em seguida, foi concentrado, liofilizado e armazenado em congelador. O extrato foi denominado de extrato bruto hidroalcoólico, obtendo-se 50 g do mesmo.

Para o fracionamento, o extrato bruto foi submetido à extração com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, até o esgotamento, originando as suas frações. Estas frações foram concentradas em

rotaevaporador para a eliminação dos solventes orgânicos. A identificação foi realizada a partir de espectros no UV e com a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Uma vez isoladas e identificadas, as frações foram adicionadas a uma base cremosa não iônica (Soilab®) e os espectros fotoacústicos foram então determinados. Esta análise foi repetida para diversas concentrações (1 a 5%) tanto para as frações, quanto para o extrato bruto. Os espectros realizados foram comparados ao de um protetor solar comercial de marca conhecida, com fator de proteção 15. Após a escolha das frações adequadas e das respectivas concentrações que seriam usadas, nenhuma outra substância foi adicionada à formulação.

Para avaliação da permeação cutânea do fotoprotetor, foi realizada uma análise *ex vivo* utilizando-se 14 coelhos da raça New Zealand provenientes da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá. O peso médio de cada animal era de 2,2 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais recebendo água filtrada e ração à vontade. Este procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal desta Universidade. Cada animal recebeu a aplicação do fotoprotetor na orelha esquerda, enquanto a orelha direita recebeu a aplicação de água destilada para ser usada como amostra controle. Após a aplicação, o primeiro animal foi sacrificado imediatamente (tempo 0) e assim sucessivamente para os intervalos de tempo de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min.

Para as demais análises (morfológica, histopatológica, hematológica e bioquímica) realizadas no Departamento de Análises Clínicas, foram utilizados outros 36 animais de mesma procedência e com as mesmas características. Estes foram divididos em 3 grupos que receberam a aplicação de protetor solar na orelha esquerda e de água destilada na direita durante 7, 14 e 60 dias. Algumas amostras destes grupos foram analisadas também por Espectroscopia Fotoacústica para verificar se houve permeação através da pele.

As amostras de pele foram dissecadas e tiveram cartilagem e colágeno removidos, permanecendo com uma espessura média de 315  $\mu\text{m}$ .

Neste estudo utilizamos 11 e 21 Hz para a frequência de modulação da luz, que equivalem a comprimentos de difusão térmica de aproximados 29 e 21  $\mu\text{m}$ , considerando-se o valor de difusividade térmica de  $\alpha = 3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [41].

### 4.1.3.2 Resultados e discussão

Inicialmente foi realizada a caracterização do extrato bruto e das frações com a espectroscopia fotoacústica. A Figura 20 mostra os espectros de absorção da formulação na concentração de 5% do extrato bruto, de suas frações, da base cremosa utilizada na formulação do fotoprotetor e do protetor comercial (fator 15) utilizado para comparação.

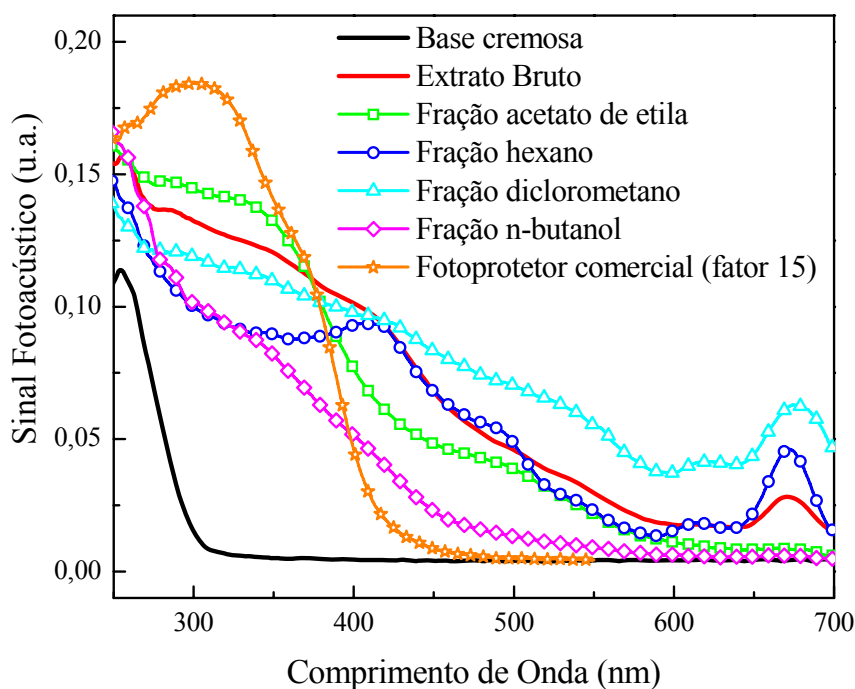


Figura 20: Espectros de absorção da base não iônica, do extrato bruto (5%), da fração com acetato de etila (5%), da fração com hexano (5%), da fração com diclorometano (5%), da fração com n-butanol (5%) e do fotoprotetor comercial.

Como pode ser observado na Figura 20, tanto o extrato bruto, quanto suas frações possuem características de protetor químico, ou seja, são absorvedores em toda a região espectral de radiação UVB (290 a 320 nm) e UVA (320 a 400 nm). Pode-se destacar a fração acetato de etila que se mostrou a mais absorvedora em toda a região de interesse. Outra característica que pode ser destacada nas frações hexano e diclorometano, além do extrato bruto, é a presença de uma banda bem definida em torno de 672 nm. Embora esteja fora da região espectral de interesse para atuar na fotoproteção, como esta banda ocorre em uma região de absorção na qual a pele é transparente, ela pode facilitar a análise da permeação da formulação através da pele porque esta banda no vermelho pode funcionar como um marcador.

Um fotoprotetor, além de absorver a radiação ultravioleta incidente, pode simplesmente refleti-la. Esta função é atribuída aos protetores físicos, substâncias opacas que atuam como barreira física (devido ao tamanho de suas partículas induzem espalhamento da radiação incidente), como ocorre para o dióxido de titânio e para o óxido de zinco, muito utilizados na formulação de bloqueadores e protetores solares. Sendo assim, medidas de transmissão foram realizadas com as mesmas amostras analisadas anteriormente. Os espectros de transmissão são mostrados na Figura 21. Pode-se ver que

mesmo sem a adição de nenhum tipo de protetor físico, todas as frações e o extrato bruto apresentam transmitâncias muito baixas. Mesmo a fração n-butanol, a que apresenta maior transmitância entre as frações, se comparada ao protetor comercial, possui uma boa resposta espectral como protetor solar.

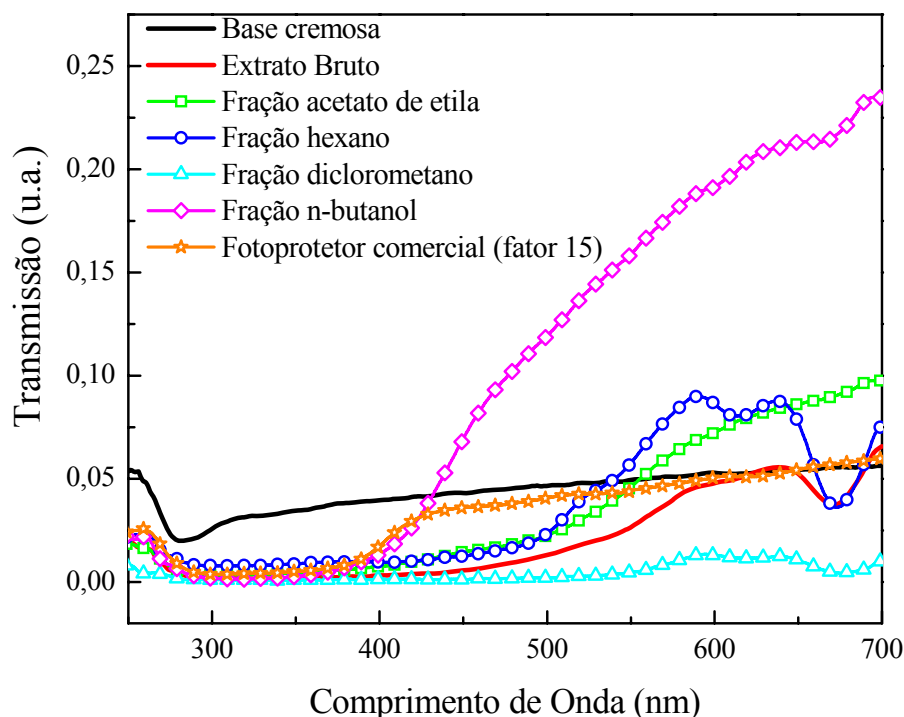


Figura 21: Espectros de transmissão do extrato bruto (5%), da fração com acetato de etila (5%), da fração com hexano (5%), da fração com diclorometano (5%), da fração com n-butanol (5%) e do fotoprotetor comercial.

Para que se possa chegar a uma combinação de frações ou mesmo utilizar o extrato bruto como princípio ativo para uma formulação fotoprotetora é preciso analisar também os níveis de toxicidade das substâncias. E ainda, como a planta apresenta atividade na indução de melanina (substância que atua como protetor solar natural no homem)<sup>[54]</sup>, é possível utilizar estes resultados para uma comparação adicional.

Nos estudos de toxicidade realizados anteriormente<sup>[54]</sup>, células B<sub>16</sub>F<sub>10</sub> (melanoma de rato) foram tratadas com 100 µL do extrato bruto e das frações da planta nas concentrações de 500, 400, 300, 200, 100 e 50 µg/ml e incubadas por 48 horas. Foram analisadas então as taxas de inibição do crescimento celular que estão diretamente relacionadas ao nível de toxicidade das substâncias. De acordo com a análise dos resultados das culturas, níveis toleráveis de toxicidade foram apresentados pela fração n-butanol em todas as concentrações, pelo extrato bruto até a concentração máxima de 300 µg/ml e



pelas frações hexano e acetato de etila para as duas concentrações mais baixas (50 e 100 µg/ml). Já a fração diclorometano apresentou-se tóxica em todas as concentrações testadas. Para a dosagem de melanina intracelular, o mesmo tipo de células (B<sub>16</sub>F<sub>10</sub>) foram tratadas com 2 mL das concentrações (500, 400, 300, 200, 100, 50 µg/mL) do extrato bruto e das frações da planta e incubadas por 48 horas. A dosagem de melanina é feita através de transmitância (475 nm) e para a construção da curva de calibração foi utilizada como padrão melanina sintética (Sigma Chemical Co., Missouri, USA). Das amostras testadas, as que apresentaram uma melhor atividade foram o extrato bruto e as frações acetato de etila e hexano. Já a fração n-butanol foi a que apresentou a menor atividade, sendo que nas concentrações de 50 e 100 µg/mL não induziu a produção de melanina. A fração dicloro metano apresentou incerteza da indução da produção de melanina, o que pode ser atribuído ao nível de toxicidade apresentado.

De acordo com estes resultados foram escolhidas as frações acetato de etila e hexano para a composição do fotoprotetor. Novos testes foram então realizados para a determinação da melhor concentração a ser usada e chegou-se a uma formulação com 5%, sendo 2,5% de acetato de etila e 2,5% de hexano, adicionados à base cremosa não iônica. Os espectros de absorção e transmissão para esta formulação foram comparados com os de um protetor comercial, conforme mostra a Figura 22.

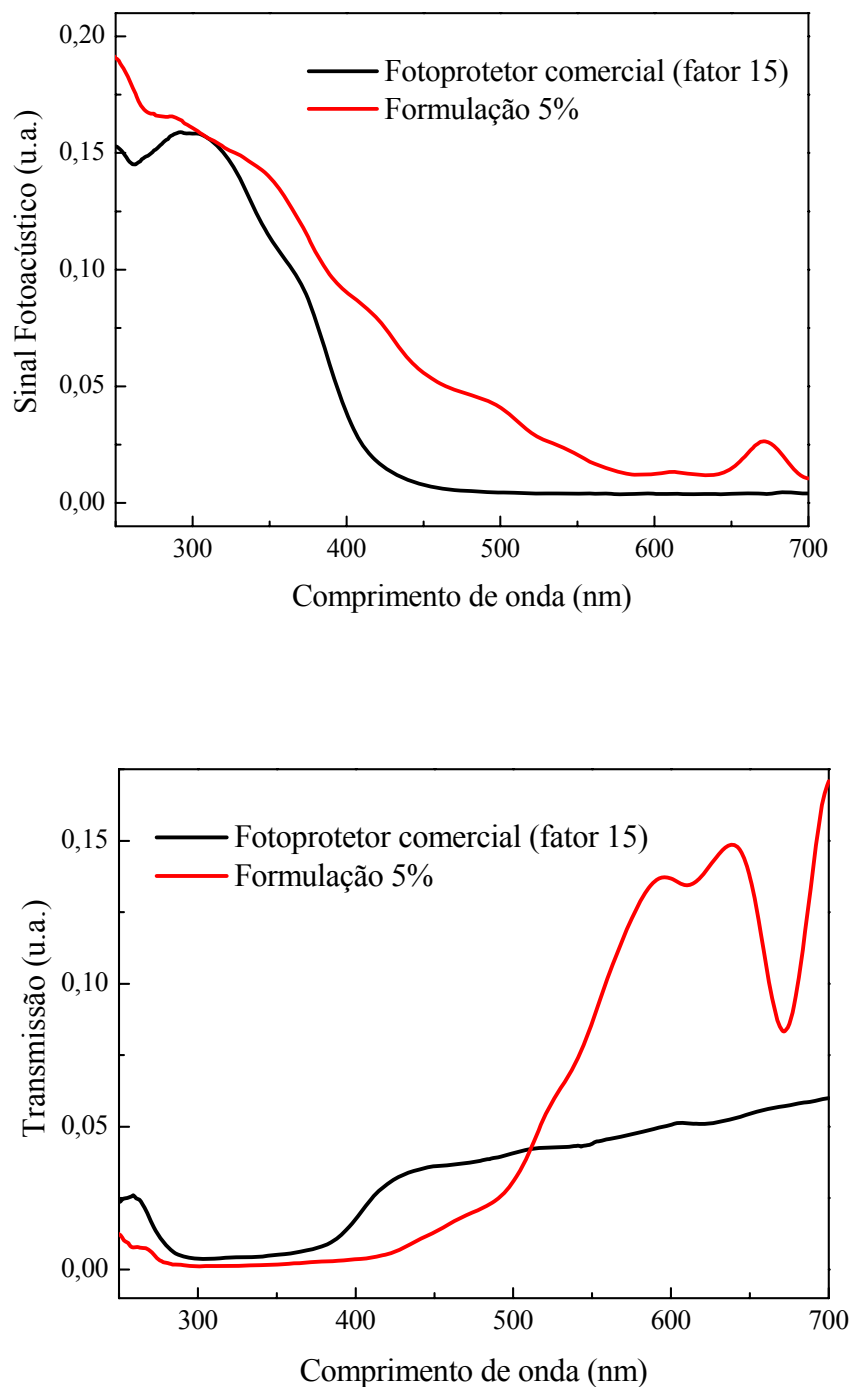


Figura 22: Espectros de absorção (cima) e de transmissão (baixo) do fotoprotetor comercial e da formulação com 5% (fração acetato de etila 2,5% + fração hexano 2,5%).

Nota-se que a formulação não apresenta perdas na absorção e mantém a banda de absorção óptica na região de 672 nm como era esperado. Os espectros de transmissão mostram a ocorrência de baixa transmitância da formulação, mesmo sem a adição de

protetor físico. A mesma formulação teve sua atividade melanogênica avaliada, resultando em uma produção de melanina ainda mais alta se comparada com cada uma das frações.

Uma vez formulado, o fotoprotetor foi então aplicado em animais para avaliação *ex vivo* de sua permanência sobre a pele. A presença da formulação foi monitorada logo após a aplicação (tempo 0), 30 minutos após a aplicação (tempo recomendado para os fotoprotetores comerciais antes da exposição ao Sol), 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Amostras em triplicata foram avaliadas para cada intervalo de tempo de aplicação. Como se pretende avaliar o intervalo de tempo de permanência da formulação sobre a pele, foi utilizada uma frequência de modulação de 21 Hz que permite o monitoramento de uma espessura da odem de 21  $\mu\text{m}$ , que é a parte superior da epiderme. Os espectros realizados estão mostrados na Figura 23 (um para cada intervalo de tempo).

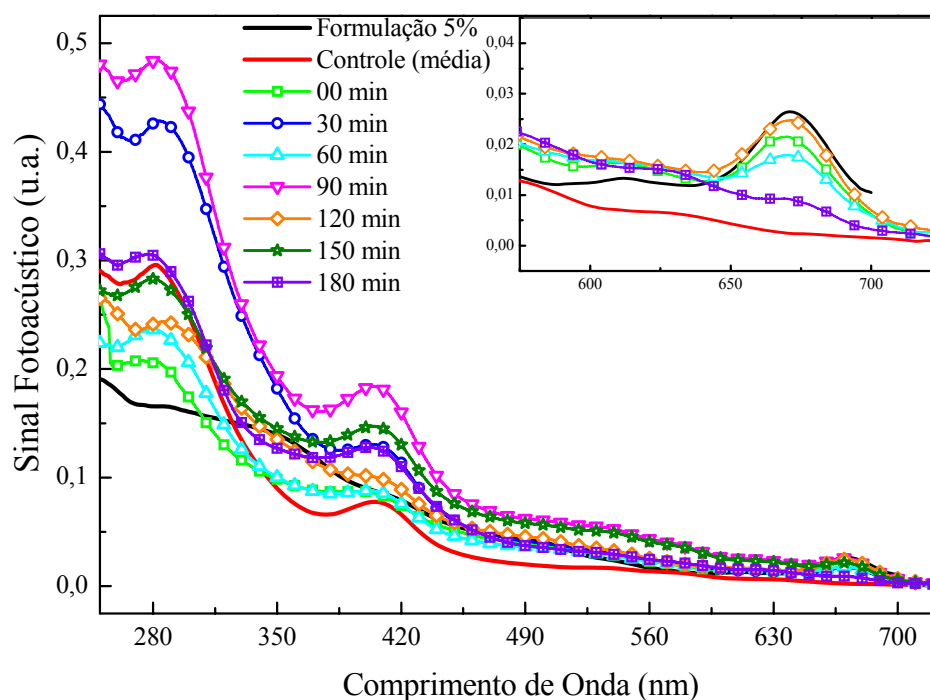


Figura 23: Espectros das amostras tratadas por 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. No detalhe tem-se o espectro da pele controle e da pele após aplicação da formulação para 0, 60, 120 e 180 min.

Uma simples avaliação visual permite a afirmação da presença do fotoprotetor sobre a pele após cada intervalo de tempo de aplicação. Mas em se tratando de um estudo de população, se faz necessária uma avaliação estatística dos dados. Para isso a banda de absorção centrada em  $\sim 672$  nm foi utilizada com um marcador da presença da formulação nas amostras de pele. A área sob os espectros foi calculada no intervalo de 640 a 715 nm e os dados estão mostrados na Figura 24. Após o cálculo dos valores das áreas, estes foram

utilizados para o tratamento estatístico com o método *One-way Anova* com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

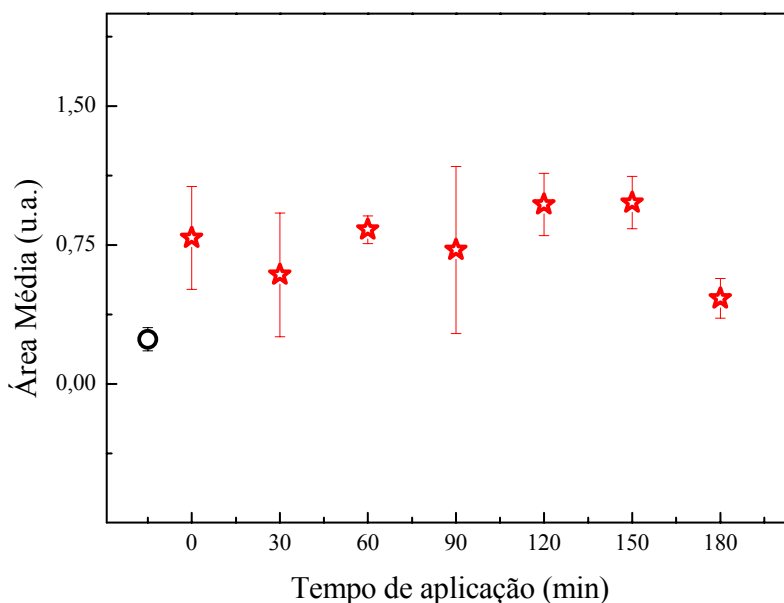


Figura 24: Áreas dos espectros de absorção das amostras em função do intervalo de tempo após a aplicação da formulação.

Nota-se que o fotoprotetor permanece sobre a pele até o intervalo de tempo de 150 minutos. Após este período observa-se uma leve tendência de queda até o tempo de 180 minutos, o que é perfeitamente esperado para a atividade de um protetor solar, que no geral recomenda-se aplicar a cada duas horas. Através da avaliação estatística pode-se confirmar esta interpretação, uma vez que não houve diferença com significância estatística entre os dados referentes às amostras controle e às de 180 minutos. As áreas para 30 e 90 minutos também não diferiram estatisticamente daquelas observadas no controle.

Adicionalmente, alguns exemplares dos grupos tratados por até 60 dias foram analisados com a incidência da luz realizada na face inferior, ou interna, da pele, semelhante ao procedimento realizado nas medidas apresentadas na seção 4.1. Isto foi realizado com o intuito de verificar uma possível permeação da formulação através da pele. Os espectros estão mostrados na Figura 25. Estes espectros referem-se à formulação; à amostra controle, que recebeu a aplicação de água destilada por 14 dias; uma amostra que recebeu a aplicação da formulação e medidas após 180 minutos; duas amostras tratadas por 14 dias e outras duas tratadas por 60 dias, que receberam a última aplicação do fotoprotetor 24 horas antes do animal ser sacrificado. Todos os espectros foram obtidos com uma frequência de modulação de 11 Hz, correspondendo a uma profundidade estimada de 29 $\mu$ m.

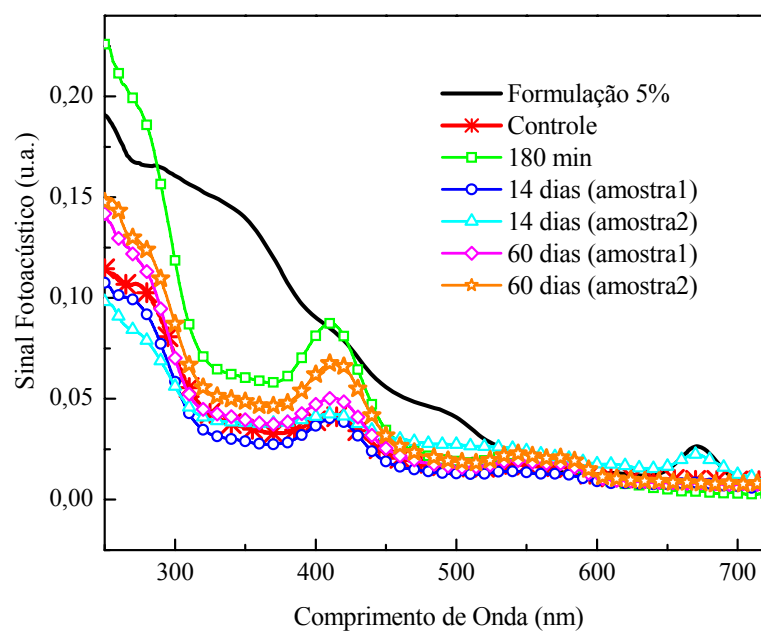


Figura 25: Espectros obtidos do lado inferior das amostras de pele, com frequência de modulação de 11 Hz.

Como pode ser observado, apenas uma das amostras tratadas por 14 dias apresenta a banda de absorção característica da formulação. Apenas com estes resultados torna-se inviável uma conclusão com relação à permeação, mas pode-se pensar inicialmente que após 180 minutos a formulação ainda não teria permeado através da pele, enquanto que após 24 horas, como é o caso das demais amostras, o seu princípio ativo já poderia ter atingido a região vascularizada da pele.

### 4.1.3.3 Conclusão

Em conclusão, a formulação proposta apresentou uma resposta espectral satisfatória tanto no que se refere à absorção óptica da luz ultravioleta, quanto no que se refere à sua baixa transmitância, mesmo sem a adição de um protetor físico conhecido, como é o caso do protetor solar comercial usado para comparação. No que se refere à permanência do fotoprotetor sobre a pele, os resultados também foram satisfatórios, apresentando duração de no mínimo 180 minutos. A avaliação foi positiva também para as demais análises realizadas pelo grupo do Prof. Celso Nakamura, uma vez que não houve a presença de alterações macroscópicas significativas na pele das orelhas dos coelhos tratados, e a formulação não apresentou efeito tóxico para os animais tratados, considerando os parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados.

## **CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2**

### **5.1 APLICAÇÃO DE TÉCNICAS FOTOTÉRMICAS E CONVENCIONAIS PARA ESTUDOS DE ÓLEOS E GORDURAS**

Neste capítulo técnicas fototérmicas, interferométricas, calorimétrica e de densidade de massa foram usadas no estudo de estabilidade e caracterização de óleos utilizados previamente em processo similar ao de fritura industrial e em estudo da complexação da  $\beta$ -ciclodextrina na extração de colesterol da manteiga.

#### **5.1.1 ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES ÓPTICAS E TÉRMICAS DE ÓLEOS VEGETAIS SUBMETIDOS A PROCESSO DE FRITURA**

Os óleos e gorduras vegetais podem ser extraídos de uma extensa variedade de frutos e sementes. Sua aplicabilidade, tanto na indústria como no uso doméstico, pode ser tão variada quanto sua fonte de obtenção, se estendendo desde o uso como lubrificante ao importante papel de combustível alternativo no setor de produção de energia, ocupando ainda lugar de destaque no setor de alimentos<sup>[60, 61]</sup>.

A fritura por imersão é um dos processos mais populares no preparo de alimentos, uma vez que é rápida e produz textura e sabor agradáveis. Além de serem largamente aceitos pelos consumidores, estes alimentos podem ter um aspecto nutricional importante, uma vez que a ingestão de óleos e gorduras é necessária tanto do ponto de vista energético quanto no transporte de vitaminas lipossolúveis e no fornecimento dos ácidos graxos essenciais ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6)<sup>[7, 14, 62]</sup>. Mudanças significativas na atitude

dos consumidores ao longo dos anos, como a busca por alimentos de fácil e rápida manipulação, fizeram com que as indústrias alimentícias passassem a oferecer produtos específicos para o processo de fritura, como os alimentos pré-preparados e congelados<sup>[7]</sup>.

A reutilização de óleos e gorduras no preparo de alimentos pode acarretar mudanças químicas e físicas indesejáveis nos mesmos, o que compromete não só a qualidade do alimento, como também pode produzir danos à saúde e à nutrição. Durante o processo de fritura o aquecimento contínuo e a interação com o ar, água e com os componentes do alimento podem levar a variadas reações químicas como hidrólise, oxidação e polimerização dos triglicerídeos, assim como mudanças nas propriedades físicas, como viscosidade, índice de refração e coeficiente de absorção óptica<sup>[7, 62, 63]</sup>. Como os óleos e gorduras utilizados no processo de fritura são incorporados aos lipídeos totais do alimento, conhecer as alterações provocadas, assim como definir os óleos e/ou gorduras mais apropriados e estabelecer regras para o seu reaproveitamento são questões importantes para o controle de qualidade de alimentos<sup>[7]</sup>.

Neste estudo, diversas técnicas foram empregadas para a análise de propriedades ópticas e térmicas de óleos vegetais com o objetivo de se avaliar o grau de degradação em função do processo de fritura.

### 5.1.1.1 Procedimento Experimental

As amostras foram cedidas pela prof<sup>ª</sup>. Dra. Neuza Jorge do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto, que foram preparadas a partir de óleos de girassol e de soja pela mestrandia Patrícia V. Del Ré. As frituras por sua vez foram realizadas em amostras de frango empanado pré-frito e congelado ou *snack*. Vinte e cinco lotes de 500 g cada foram preparados com cada tipo de óleo, utilizando-se uma fritadeira doméstica comercial, com capacidade de 3 litros. Após o volume ser preenchido com óleo, a temperatura foi controlada em  $180 \pm 2$  °C e a relação superfície/volume mantida em  $0,3 \text{ cm}^{-1}$  durante 10 minutos. Essa condição foi adotada para todo o período do experimento que teve uma duração total de 12 horas. Após o aquecimento inicial, a primeira amostra de óleo foi coletada e em seguida o processo de fritura foi iniciado com o primeiro lote de alimento. Após cinco minutos em temperatura de 180°C foi coletada nova amostra de óleo e o lote de empanado trocado. Nova amostra foi retirada após a fritura do quinto lote e a partir deste, a cada cinco ciclos, de um total de 25 repetições. A reposição de óleo foi realizada quando necessária para manter-se a relação superfície/volume constante. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro (8ml) com tampa de borracha e mantidas em congelador. Antes de cada experimento os frascos com as amostras foram deixados em temperatura ambiente por



aproximadamente 30 minutos. Para comparação, os óleos virgens foram mantidos e analisados nas mesmas condições de armazenagem dos demais <sup>[7]</sup>.

### 5.1.1.2 Resultados e Discussão

Diferentes tipos de óleos apresentam valores característicos de índice de refração. Este parâmetro está relacionado com o grau de insaturação das ligações, que aumenta em função do número de ligações duplas e com o tamanho da cadeia hidrocarbonada. Portanto o índice refração tem relação com os compostos gerados devido à oxidação e tratamento térmico, uma vez que as transformações ocorridas induzem a formação de dienos conjugados e polímeros, os quais podem também provocar aumento do índice de refração <sup>[8]</sup>. Muitos autores <sup>[8, 64-66]</sup> apresentam medidas de índice de refração quanto se trata de caracterização e certificação de óleos comestíveis, que de modo geral são determinados via Refratômetro de Abbé, em temperaturas entre 40 e 45 °C. Os valores medidos para os óleos virgens são 1.4679 para o de girassol e 1.4671 para o de soja <sup>[8]</sup>.

Para as medidas realizadas durante esta tese foi utilizado o Interferômetro de Michelson-Morley modificado, com as amostras na temperatura ambiente. Os resultados em função do número de frituras estão mostrados na Figura 26.

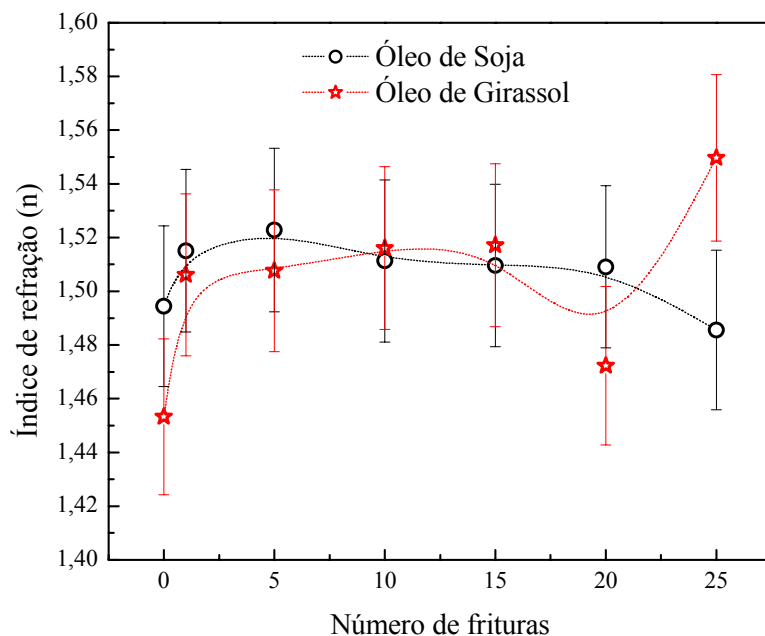


Figura 26: Índice de refração para as amostras de óleo de soja e girassol em função do número de frituras ( erro de 2%). As linhas pontilhadas são guias visuais.

A diferença nos valores de  $n$  para cada intervalo de fritura se deve essencialmente às dificuldades experimentais relacionadas ao espalhamento da luz, o que pode ser atribuído à presença de ácidos graxos saturados provenientes do alimento. Isto ocorre porque a temperatura de liquefação destes ácidos é acima da ambiente. O aumento do coeficiente de absorção óptica em função do número de frituras também contribui para a mudança observada nos valores de  $n$ .

Em estudo anterior realizado por N. Jorge e colaboradores<sup>[8]</sup>, óleos de girassol e soja foram analisados em processos de fritura de batatas e os valores do índice de refração em função do tempo de fritura apresentaram um máximo para o intervalo de 7,5 horas. O fato de ter sido utilizado outro tipo de alimento naquele estudo pode ter grande influência nos processos de oxidação, uma vez que, por ser rica em água, a batata provoca uma taxa maior de reações hidrolíticas e por ser um produto vegetal não induz troca lipídica entre o óleo e o alimento. As amostras analisadas naquele trabalho apresentaram aumento no índice de refração de aproximadamente 0,27% para o óleo de girassol e de 0,08% para o óleo de soja, quando as amostras submetidas a 0,5 e a 7,5 horas de processo foram comparadas. Adotando este intervalo, nossos resultados foram de diferenças de 0,72% para o óleo de girassol e -0,36% para o óleo de soja. Os resultados para o índice de refração apresentam uma tendência de aumento para o óleo de girassol, com comportamento semelhante ao ocorrido com os dienos conjugados nas mesmas amostras, como mostrado mais adiante na Figura 43. Além da influência sobre o índice de refração, estes compostos estão relacionados com o aumento da absorção na região espectral do ultravioleta. Estes resultados serão discutidos posteriormente. Os dados obtidos para o índice de refração serão ainda úteis para as análises do comportamento do parâmetro  $dn/dT$ , medidos com a interferometria óptica e apresentados a seguir.

As medidas do coeficiente térmico do índice de refração,  $dn/dT$ , realizadas com a interferometria óptica estão mostradas na Figura 27, para o óleo de girassol, e na Figura 28 para o óleo de soja.

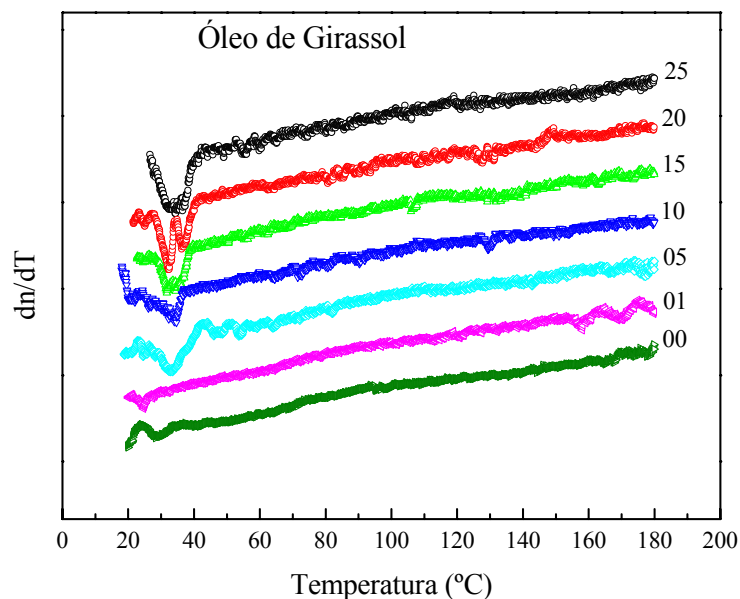


Figura 27: Coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) em função da temperatura para as amostras de óleo de girassol, para diferentes números de fritura.

Na Figura 27 pode-se visualizar o comportamento do  $dn/dT$  em função da temperatura para as amostras com diferentes números de frituras. Os valores absolutos para o coeficiente térmico do índice de refração nas temperaturas de 30 °C e 180 °C, para as amostras de óleo de girassol, estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de  $dn/dT$  medidos para as amostras de óleo de girassol referentes às temperaturas de 30 °C e 180 °C.

Amostras de óleo de girassol (nº de frituras)	$dn/dT$ ( $\times 10^{-4}$ )	
	30 °C	180 °C
00	-3,63697	-3,26166
01	-3,64558	-3,29945
05	-3,7007	-3,28014
10	-3,68523	-3,31121
15	-3,71656	-3,30322
20	-3,77858	-3,29758
25	-3,75601	-3,28605

Pode ser observado que para as amostras de óleo de girassol não há alterações de tendência nos valores de  $dn/dT$  para temperaturas acima de 50°C. Entretanto, ocorrem flutuações em torno de 35°C, com o aparecimento de picos, cujas intensidades aumentam

em função do número de lotes fritos por amostra. Este comportamento se repete para as amostras de óleo de soja, como pode ser observado na Figura 28, porém com um aumento no intervalo de temperatura do aparecimento dos picos, até 70°C.

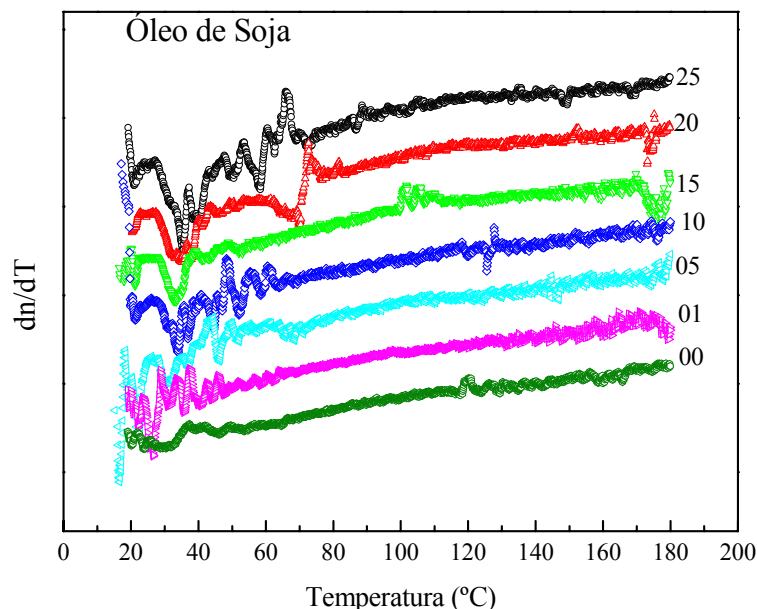


Figura 28: Coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) em função da temperatura para as amostras de óleo de soja, para diferentes números de fritura.

Na Figura 28 pode-se visualizar o comportamento do  $dn/dT$  em função da temperatura para as amostras com diferentes números de frituras. Os valores absolutos para o coeficiente térmico do índice de refração nas temperaturas de 30 °C e 180 °C, para as amostras de óleo de girassol, estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de  $dn/dT$  medidos para as amostras de óleo de soja referentes às temperaturas de 30 °C e 180 °C.

Amostras de óleo de soja (nº de frituras)	$dn/dT$ ( $\times 10^{-4}$ )	
	30 °C	180 °C
00	-3,64164	-3,30024
01	-3,61297	-3,34892
05	-3,77786	-3,22681
10	-3,69925	-3,289
15	-3,71596	-3,32437
20	-3,73913	-3,2901
25	-3,74902	-3,27712

Para uma melhor visualização da presença dos picos no  $dn/dT$  em função da temperatura, os valores das áreas sob os picos entre 20°C e 45°C, foram calculados por integração numérica em função do número de frituras, como mostra a Figura 29. De acordo com os valores calculados, pode-se observar claramente a tendência de aumento das áreas sob os picos com o aumento do número de frituras, mesmo sendo estes valores referentes somente ao intervalo de 20°C a 45°C, devido ao fato das amostras de óleo de girassol não apresentarem picos acima desta temperatura.

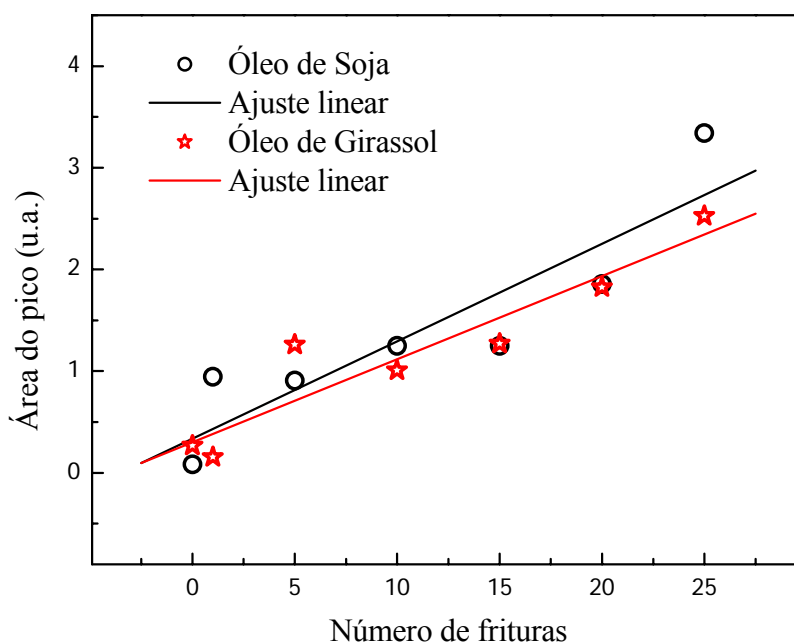


Figura 29: Valores das áreas dos picos de transição dos óleos de girassol e de soja determinados a partir dos resultados de  $dn/dT$ , no intervalo entre 20 e 45° C.

A presença desses picos foi atribuída ao processo de fusão (ou liquefação) de aglomerados esbranquiçados presentes nas amostras em temperatura ambiente. Estes se formaram provavelmente devido às trocas lipídicas que ocorrem durante o processo de fritura, ou seja, os ácidos graxos saturados, naturalmente presentes nas amostras de frango empanado, que passaram a fazer parte do óleo durante o processo. Uma outra possível explicação seria a realização da pré-fritura em gordura hidrogenada que também estaria presente nas amostras de óleo. Tanto a presença dos ácidos graxos saturados, quanto da gordura hidrogenada poderia explicar um aumento da temperatura de liquefação das amostras. Além disso, a presença dos ácidos graxos saturados poderia também provocar um aumento na resistência às reações termoxidativas dos óleos <sup>[14]</sup>

Para a comparação utilizamos os resultados da medida de estabilidade oxidativa realizadas anteriormente <sup>[67]</sup> com amostras dos mesmos lotes, apresentados na Figura 30.

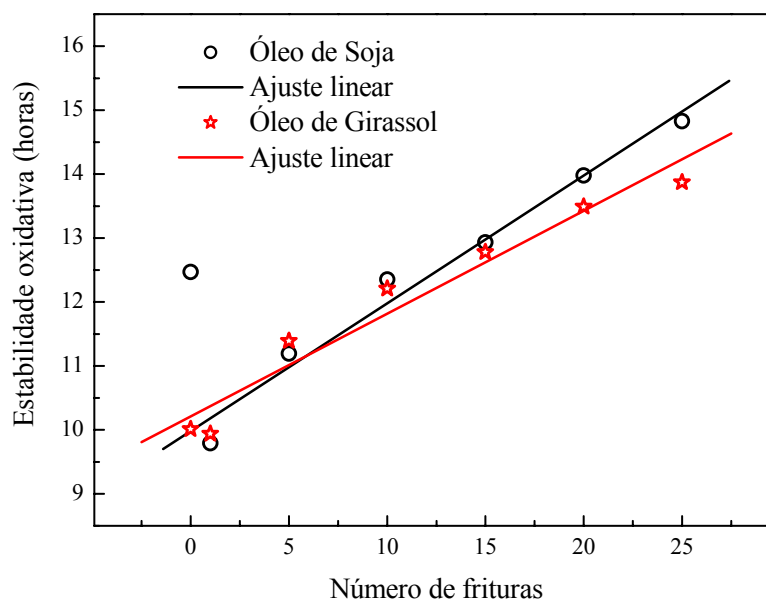


Figura 30: Intervalos de tempo de estabilidade oxidativa para amostras de óleo de soja e de girassol<sup>[67]</sup>.

Pode ser observado que o período de estabilidade oxidativa aumenta com o tempo de fritura, o que está relacionado à quantidade de ácidos graxos saturados liberados durante o processo de fritura. Este fato reforça a relação entre a estabilidade oxidativa e a insaturação do óleo ou gordura<sup>[67]</sup>.

Os resultados das medidas de densidade estão apresentados em duas figuras. A Figura 31 mostra os dados para as amostras de óleo de girassol virgem (sem pré-aquecimento), para a amostra utilizada na fritura de um lote e para a amostra utilizada na fritura de 25 lotes. Todas as medidas foram realizadas primeiramente aumentando-se a temperatura para em seguida diminuí-la, configurando um ciclo de subida e descida, no intervalo de 0 a 50°C.

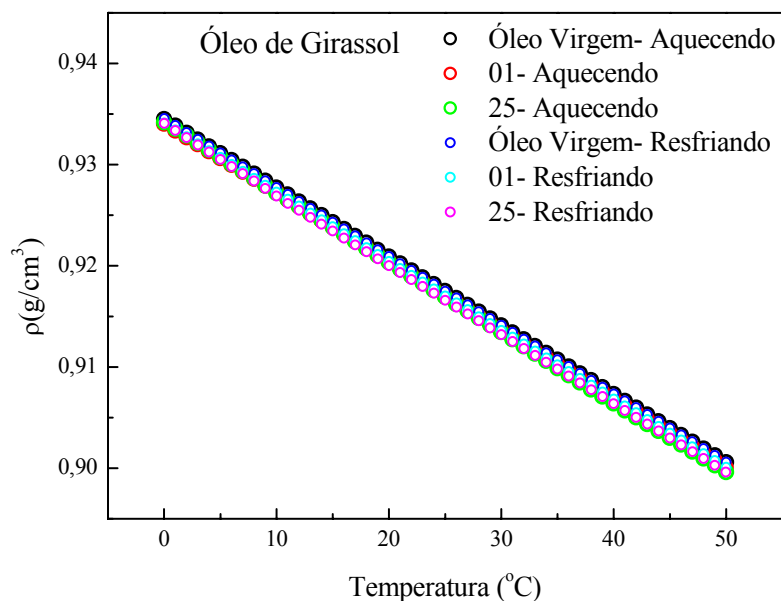


Figura 31: Densidade em função da temperatura para os óleos de girassol.

A Figura 32 mostra os resultados para as amostras de óleo de soja, nas mesmas condições utilizadas para as medidas nas amostras de óleo de girassol.

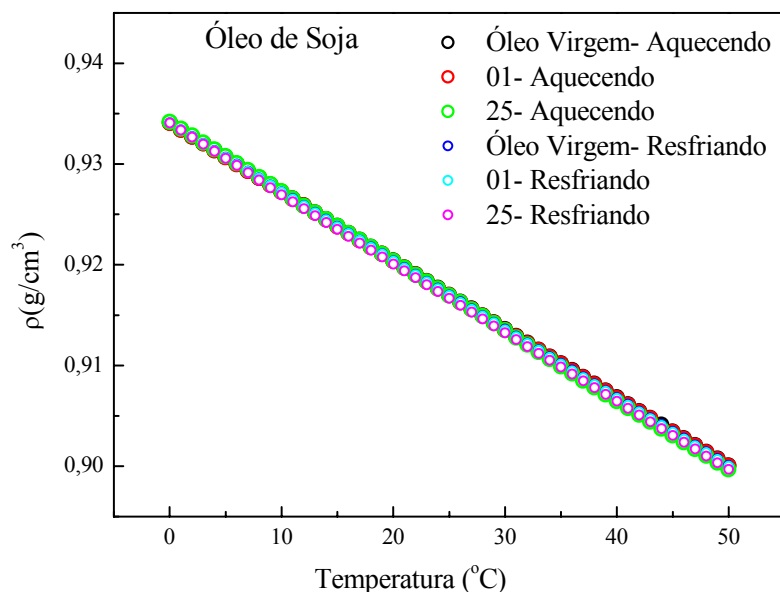


Figura 32: Densidade em função da temperatura para os óleos de soja.

Pode-se verificar que as variações nos valores da densidade para os óleos com diferentes números de frituras e também para a temperatura aumentando ou diminuindo, é

muito pequena. Na Figura 33 observa-se mais claramente este comportamento dos dados de densidade referentes à temperatura de 45°C.

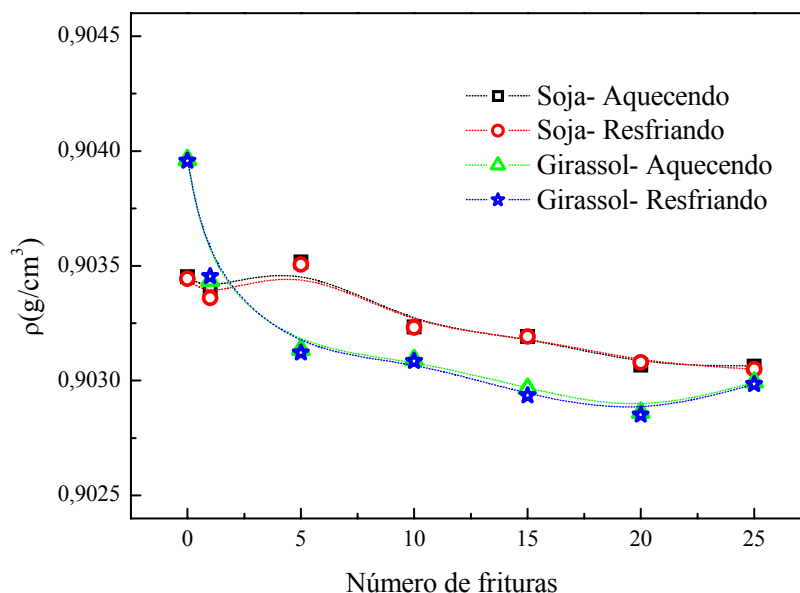


Figura 33: Densidade na temperatura de 45°C para os óleos de girassol e de soja em função do número de frituras.

É provável que esta diminuição no valor da densidade em função do número de frituras seja devido à polimerização térmica, porque estas moléculas são formadas por ligações carbono-carbono e/ou carbono-oxigênio-carbono que podem envolver vários ácidos graxos<sup>[67]</sup>. Assim, os polímeros formados tendem a aumentar a viscosidade do óleo devido ao tamanho e peso molecular, mas tendem a se formar na superfície do óleo e a depositar-se nas laterais do recipiente, formando uma película aderente de consistência plástica e, portanto, se separando do restante do óleo. Isto levaria a uma redução na densidade com o processo de fritura, como observado na Figura 33. Um outro fator seria a variação no índice de peróxidos, relacionada com a formação dos hidroperóxidos, produtos primários da oxidação que são instáveis nas condições do processo de fritura. Estes decompõem-se em misturas de combinações de aldeídos, principalmente voláteis, deste modo apresentando um comportamento semelhante ao da densidade, como pode ser visto na Figura 34.



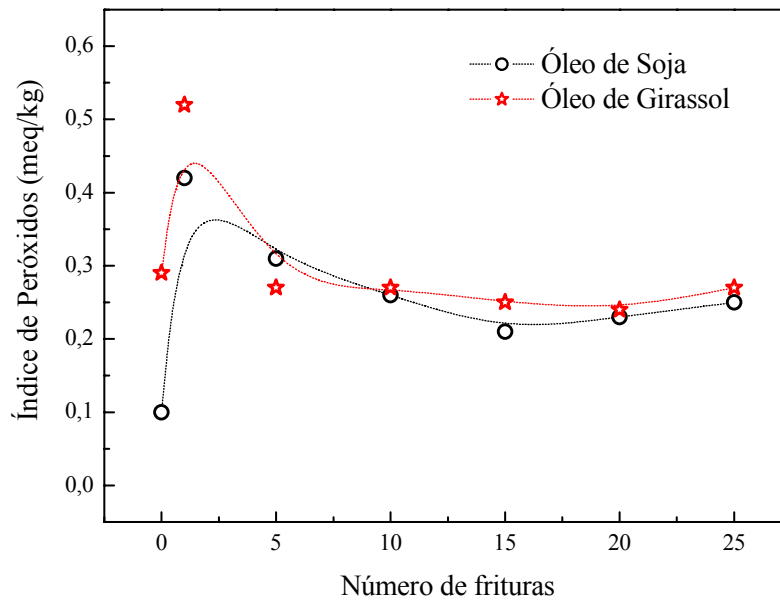


Figura 34: Índice de peróxidos para amostras de óleo de soja e girassol, em função do número de frituras. Obtido da ref.<sup>[67]</sup>.

A partir dos resultados obtidos para a densidade em função da temperatura, pode-se obter também o coeficiente de expansão térmica ( $\beta$ ) no mesmo intervalo. Os resultados para as amostras de óleo de girassol estão mostrados na Figura 35 e os do óleo de soja na Figura 36.

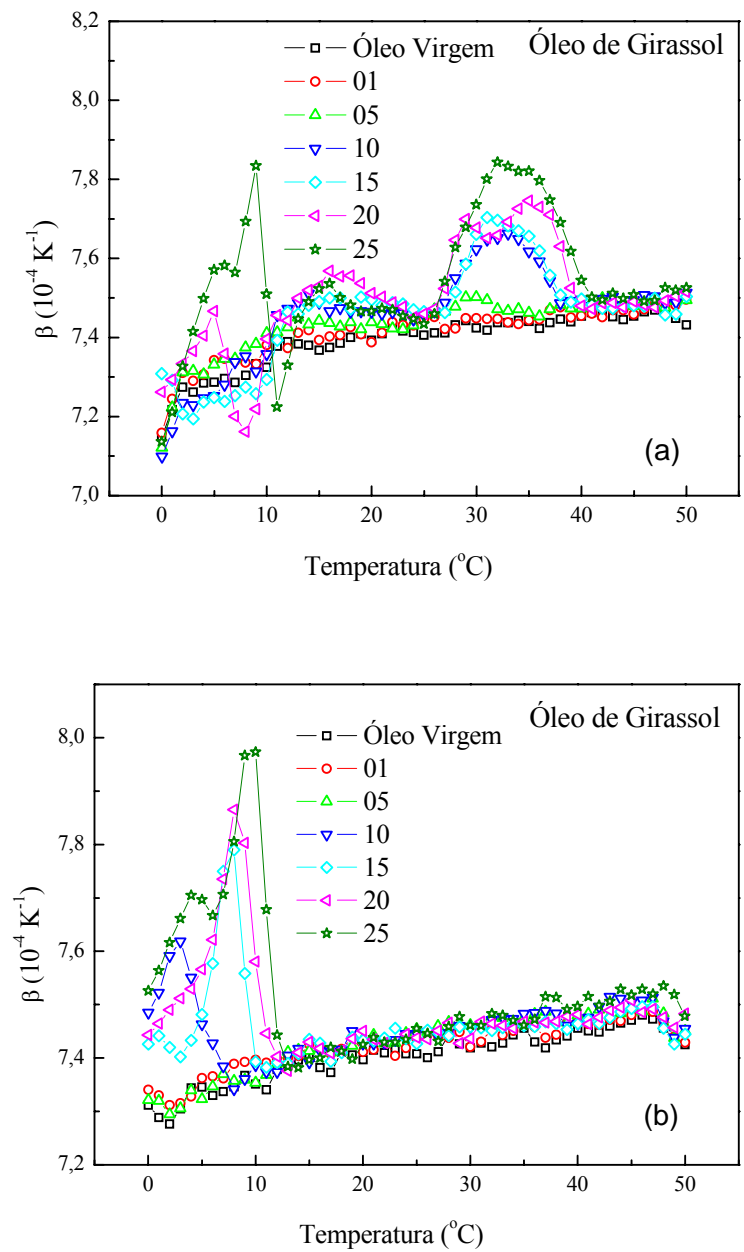


Figura 35: Coeficiente de expansão térmica em função da temperatura para as amostras de óleo de girassol para a temperatura aumentando (a) e diminuindo (b).

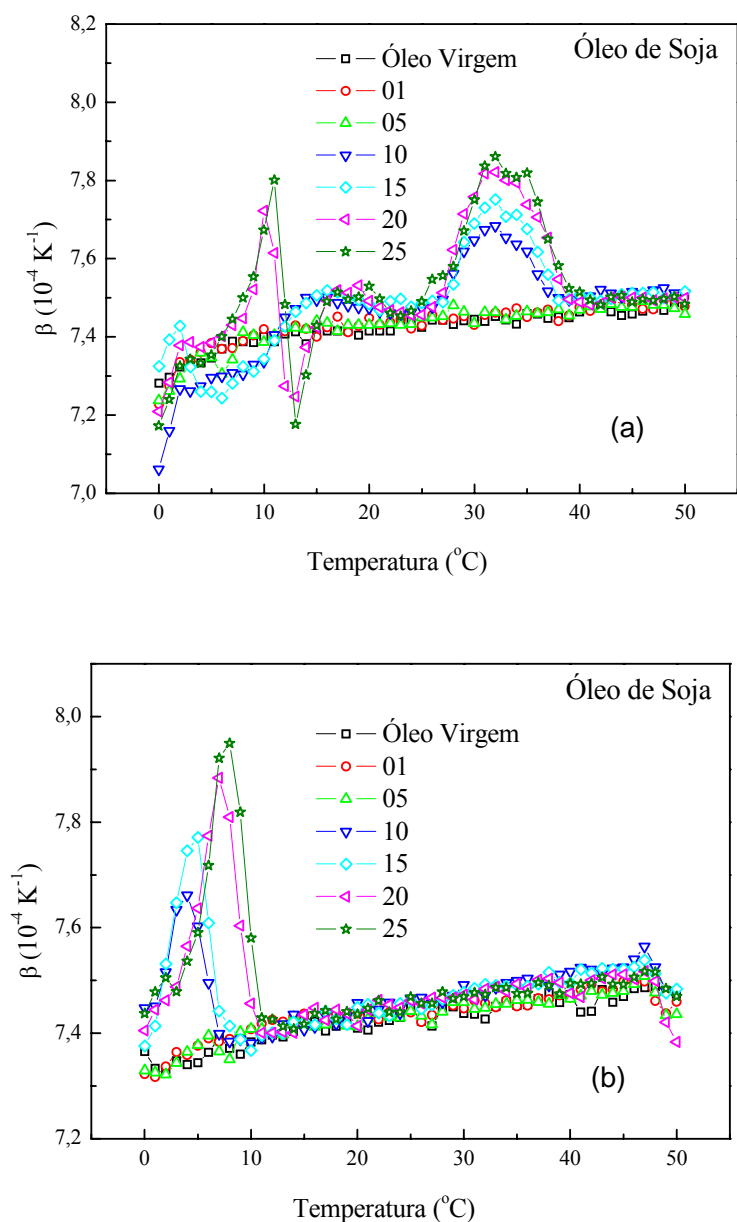


Figura 36: Coeficiente de expansão térmica em função da temperatura para os óleos de soja com a temperatura aumentando (a) e diminuindo (b).

Observando os dados calculados para o coeficiente de expansão térmica apresentados tanto para o óleo de girassol, na Figura 35, quanto para o óleo de soja, na Figura 36, pode-se verificar a presença de picos em torno de 7°C e em torno de 35°C. Estes picos apresentam um aumento de intensidade em função do número de frituras a que a amostra foi submetida, para as curvas de aumento de temperatura. No entanto, para os dados em que a medida foi realizada com a temperatura sendo reduzida, o pico em torno de 7°C fica melhor definido, enquanto que o de 35°C não aparece em nenhuma das

amostras. Isto sugere que este efeito apresenta uma grande histerese térmica, comportamento que pode ser atribuído a processos termodinâmicos com transições de fase de primeira ordem.

Estes resultados sugerem que o índice de refração do material, bem como sua dependência com a temperatura, é governado pela densidade e pela expansão térmica.

Conhecendo a relação entre o índice de refração (e sua variação com a temperatura) e a polarizabilidade através do estudo da refratividade molar ( $A$ ) e tendo em mãos os parâmetros já conhecidos das amostras, como o índice de refração, densidade, coeficiente de expansão térmica e coeficiente térmico do índice de refração  $dn/dT$ , é possível utilizar as equações (3.10) e (3.11) para se determinar a refratividade molar  $A$ , quantidade que é essencialmente a polarizabilidade total de um mol de uma determinada substância, e o comportamento térmico da polarizabilidade eletrônica em função da temperatura. Estes parâmetros fornecem informações importantes do ponto de vista microscópico das amostras, uma vez que refletem as mudanças estruturais ocorridas nas mesmas durante os processos de fritura. Os valores calculados para a refratividade molar são mostrados na Figura 37

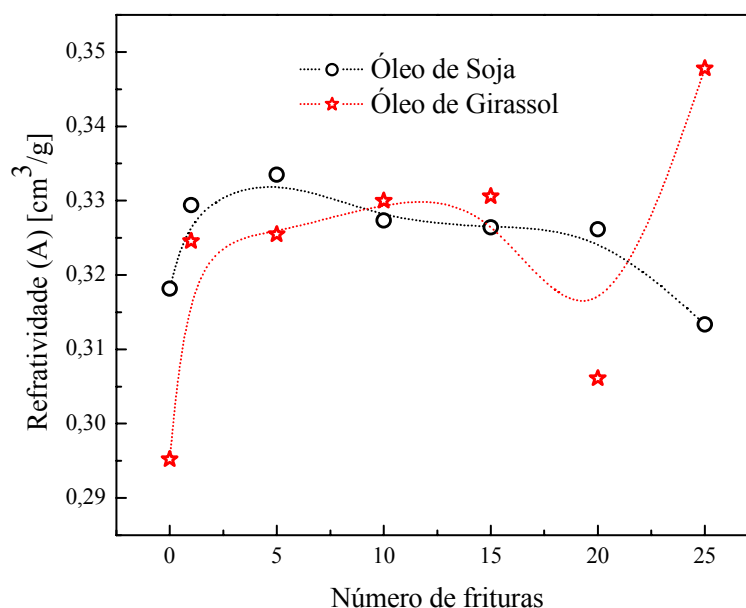


Figura 37: Valores calculados para a refratividade molar para as amostras de óleo de soja e de girassol.

O comportamento apresentado pelos dados da refratividade molar reflete o observado para o índice de refração, como esperado. Estes dados podem ainda ser associados ao teor de compostos polares e ao seu comportamento em função do número de frituras. Nesta análise entende-se por compostos polares totais todos aqueles que têm uma polaridade maior que os triglicerídeos, determinada via métodos cromatográficos<sup>[7, 67]</sup>.

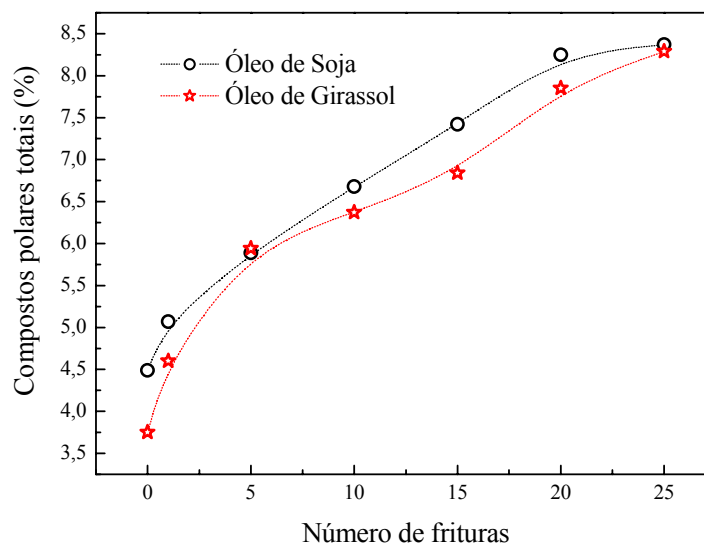


Figura 38: Teor de compostos polares totais. Estes dados foram obtidos da ref. [67].

O teor de compostos polares totais apresentados na Figura 38 é calculado a partir dos triglicerídios não alterados, considerando que possíveis compostos retidos estão inclusos na fração polar.

Na Figura 37 observa-se para as amostras de óleo de girassol uma tendência de aumento no valor da refatividade, ou seja, da polarizabilidade total, que no caso supõe-se que se deva à polarizabilidade eletrônica. Este mesmo comportamento de aumento se repete na análise do teor de compostos polares, como mostrado na Figura 38. Já para o óleo de soja o comportamento apresentado pela polarizabilidade eletrônica pode ser dito constante até o número de 20 frituras, com subsequente diminuição, o que não se observou para o teor de compostos polares totais.

Os resultados para o coeficiente térmico da polarizabilidade eletrônica  $\varphi$  para as amostras de óleo de girassol e de soja são mostrados na Figura 39.

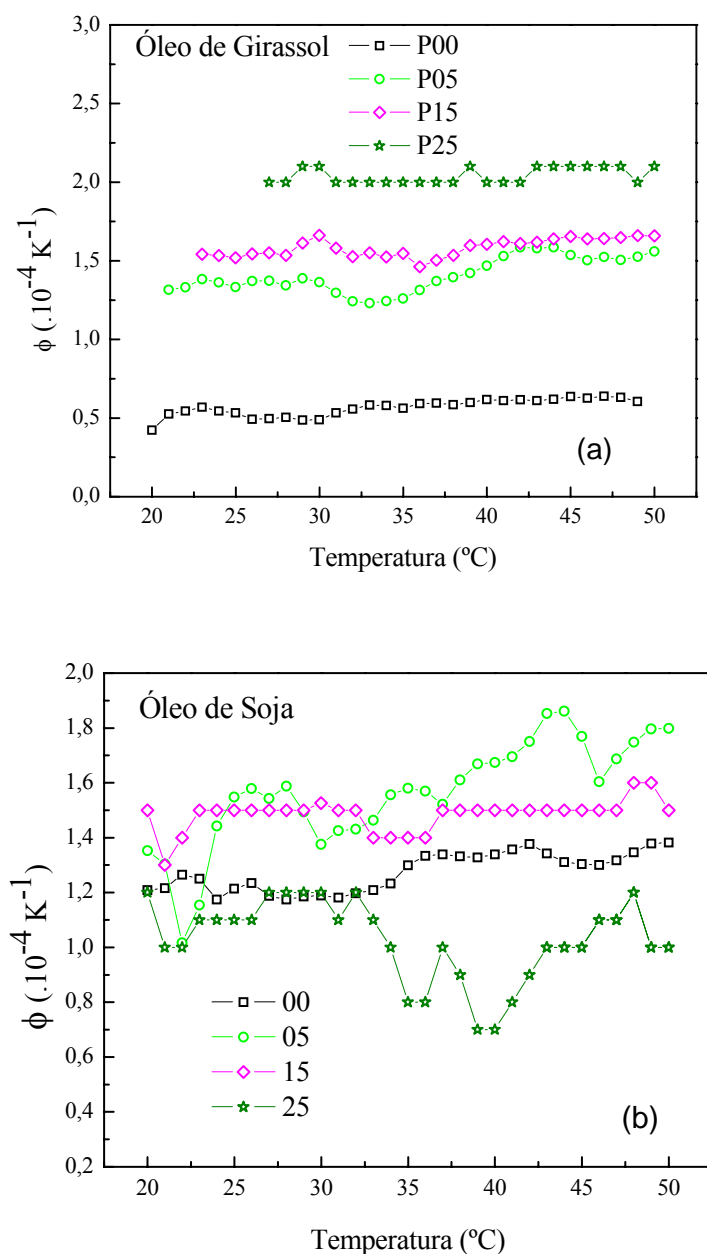


Figura 39: Coeficiente térmico da polarizabilidade para os óleos de girassol (a) e de soja (b) para diferentes números de frituras.

A partir dos resultados para o coeficiente térmico da polarizabilidade eletrônica das amostras de óleos virgens e de óleos utilizados nas frituras de número 05, 20 e 25, pode-se observar mudanças significativas nos valores de  $\phi$ . Para as amostras de óleo de girassol, a mudança foi de aproximadamente  $0,5 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ , enquanto que no caso do óleo virgem, estes valores variaram até  $2 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$  para 25 frituras. O comportamento do coeficiente térmico da polarizabilidade eletrônica em função da temperatura confirma que o coeficiente de expansão é fator dominante no comportamento do  $dn/dT$  e que ocorrem

mudanças estruturais nas amostras em função do número de frituras e da presença do alimento. Para as amostras de óleo de soja, ocorre uma variação menor, de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$  para a amostra 00 até aproximadamente  $1,5 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$  para a amostra 15. Aparentemente ocorre uma saturação do efeito de polarização eletrônica para a amostra 15 e uma aparente regressão deste efeito para a amostra 25. Pode ser observada ainda a presença de picos em torno de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  para a amostra 25, que reflete o comportamento do coeficiente de expansão e que pode também ser observada no parâmetro  $dn/dT$ .

A Figura 40 mostra os resultados para o calor específico em temperatura ambiente em função do número de frituras.

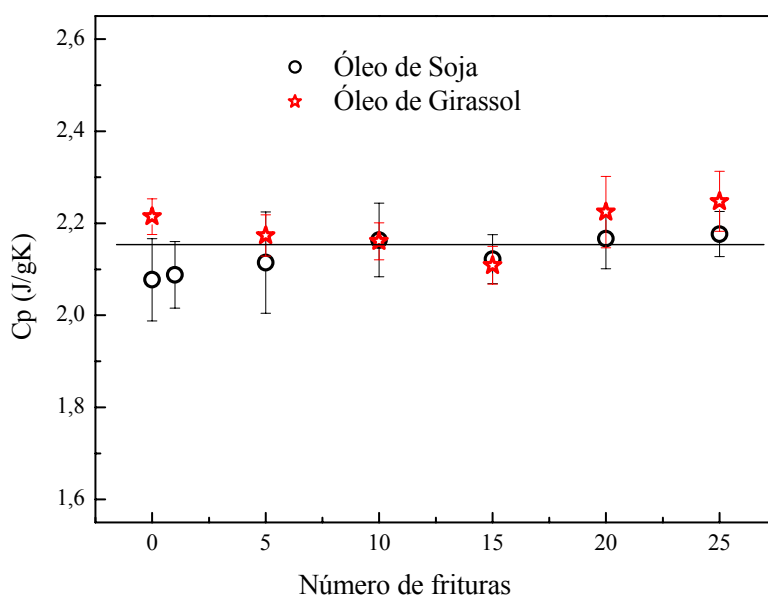


Figura 40: Calor Específico ( $C_p$ ) para as amostras de óleo de soja e girassol em função do número de frituras. A linha é apenas um guia visual.

Os valores obtidos para o calor específico permaneceram praticamente constantes para os dois lotes de amostras. Há apenas uma indicação de aumento no valor em função do número de frituras, o que pode ser induzido pela oscilação do teor de umidade do óleo de girassol que apresentou um aumento de aproximadamente 2,8% comparando-se a amostra 01 com a 25, enquanto que para o óleo de soja este aumento foi em torno de 1,6%<sup>[7]</sup>.

As medidas de difusividade térmica em temperatura ambiente foram realizadas pelo Prof. Sandro M. Lima do Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul. Caracteristicamente, a difusividade térmica está fortemente relacionada com as variações microestruturais e de composição e pode, portanto, ser comparada com parâmetros físico-químicos já estudados. Os valores

para a difusividade térmica para as amostras de óleo de soja e girassol são mostrados na Figura 41 (à esquerda)<sup>[25]</sup>.

Como pode ser observado nessa figura, os valores obtidos para a difusividade térmica para o óleo de girassol são praticamente constantes em relação ao número frituras. Já para o óleo de soja este comportamento se repete somente para as amostras com até 15 frituras, sendo que para as demais há uma redução no valor da difusividade térmica. Este comportamento pode estar relacionado com o aumento da quantidade de ácidos graxos livres nas amostras.

A partir dos valores já determinados para a densidade, o calor específico e a difusividade térmica, a condutividade térmica ( $K$ ) foi calculada e os dados estão mostrados na Figura 41 (b). O comportamento da condutividade térmica reproduz aquele da difusividade térmica, uma vez que as variações para a densidade e o calor específico foram muito pequenas.



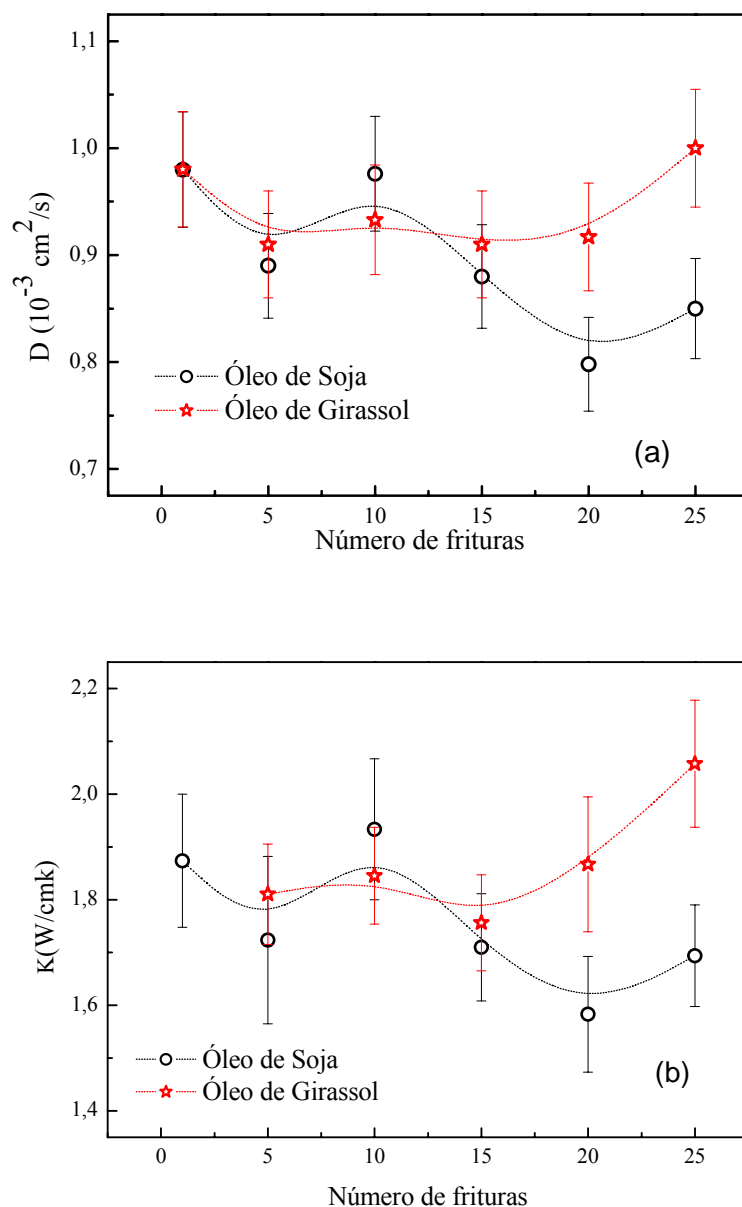


Figura 41: Difusividade térmica (LT) (a) e condutividade térmica (b) para as amostras de óleo de soja e de girassol em função do número de frituras; as linhas são apenas guias visuais.

A Espectroscopia Fotoacústica foi utilizada para a determinação dos espectros de absorção óptica das amostras de óleo de soja e de girassol na região do ultravioleta e do visível. Os espectros estão apresentados na Figura 42.

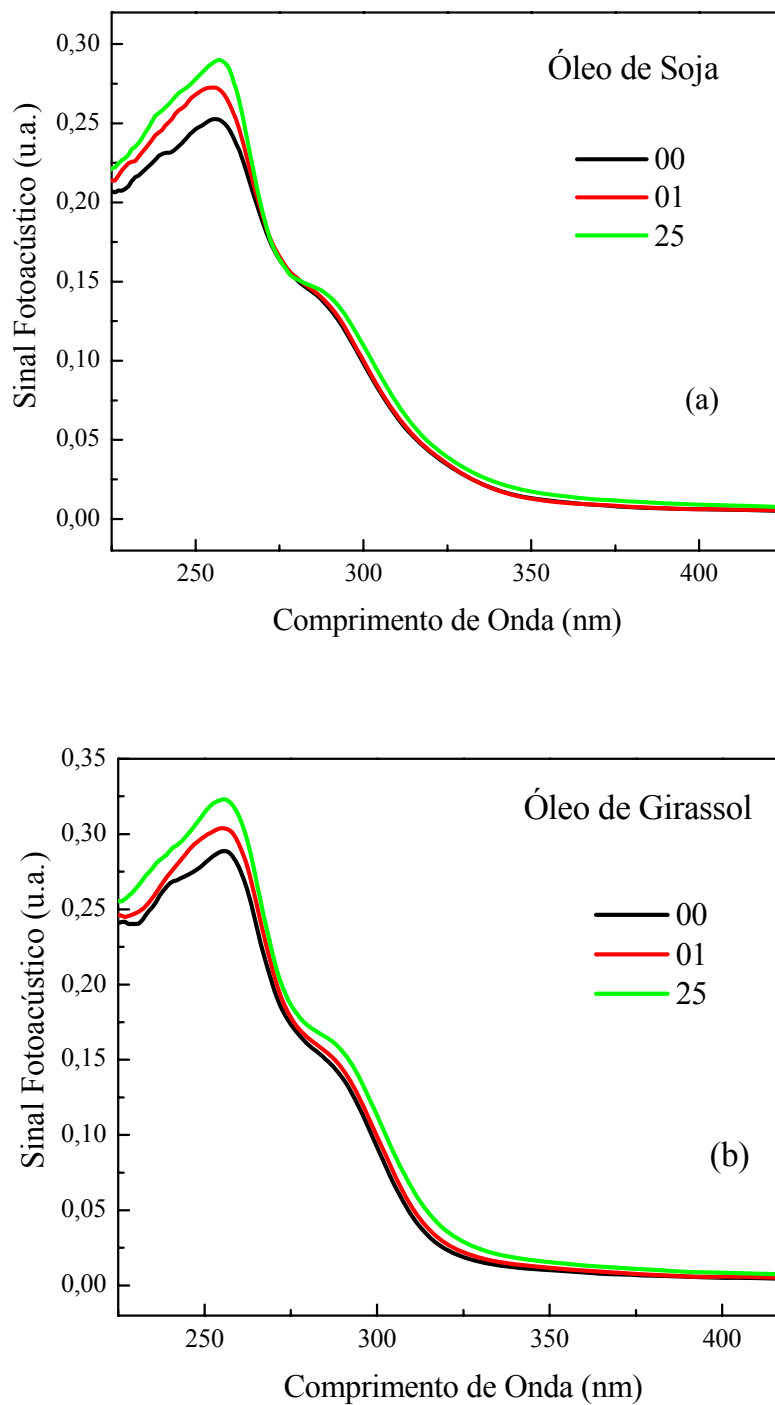


Figura 42: Espectros de absorção óptica (PAS) das amostras de óleo de soja (a) e de girassol (b) em função do número de frituras.

Nota-se um aumento na intensidade da banda de absorção centrada em aproximadamente 255 nm, com relação ao número de frituras, tanto para o óleo de soja,

quanto para o de girassol. Uma segunda banda de absorção que apresenta variação com relação ao número de frituras pode ser observada em  $\sim 285$  nm. Estas regiões de absorção podem ser atribuídas a alguns produtos da oxidação dos óleos analisados, como os compostos primários deste processo que apresentam centros absorvedores em torno de 220 nm e 234 nm (dienos conjugados). Além disso, os compostos secundários (trienos, aldeídos, cetonas) apresentam picos de absorção em torno 265 nm<sup>[63]</sup>. Deste modo, a região do ultravioleta pode ser usada para verificar a variação destes compostos. Isto foi realizado por meio de integração numérica, em que a área do intervalo espectral de interesse (230 a 350 nm) foi calculada. Os dados obtidos podem ser visualizados na Figura 43 (a). Pode-se observar claramente, portanto, a evolução da área das bandas. Os dados foram normalizados pelos valores obtidos para as amostras 00, para que só a evolução da oxidação fosse levada em consideração. Esses dados podem agora ser comparados com os valores encontrados para a porcentagem de dienos conjugados, um dos produtos da oxidação que provavelmente estão entre os centros absorvedores da região do UV, Figura 43 (b).

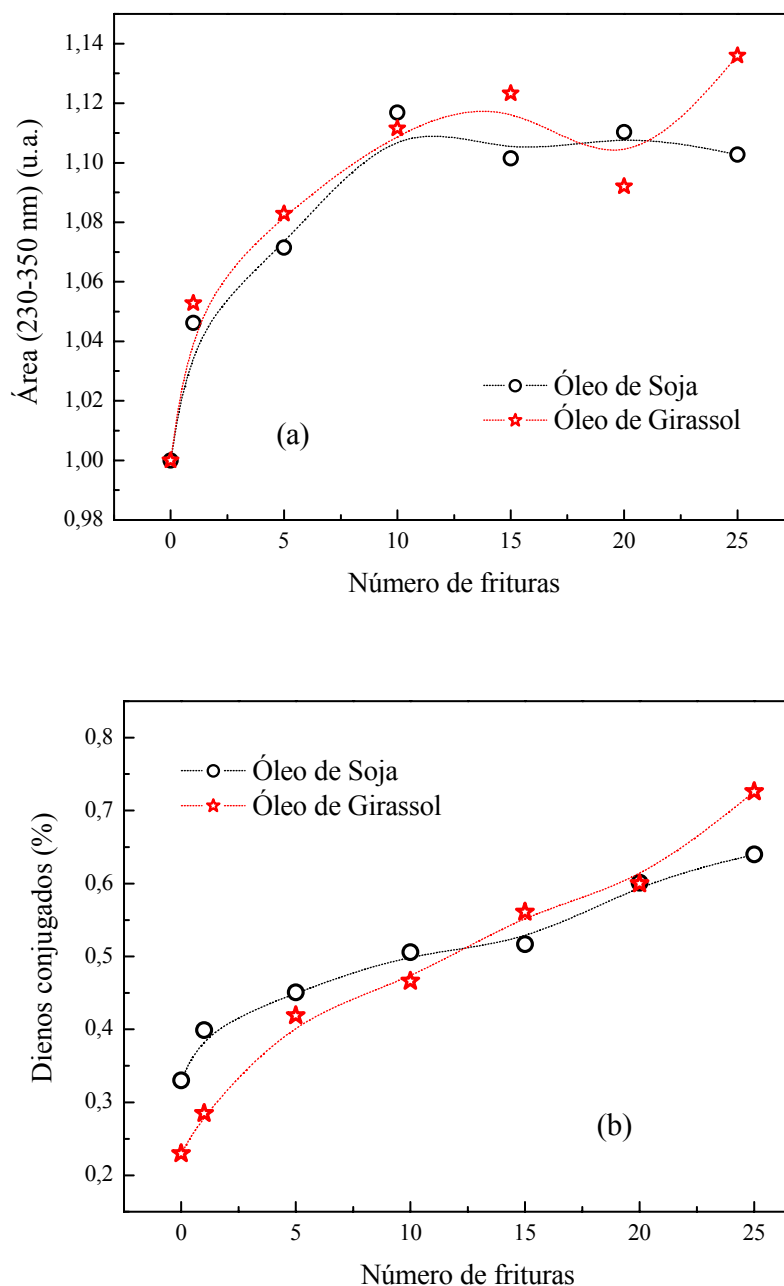


Figura 43: Valores calculados das áreas sob os espectros de absorção óptica (PAS), no intervalo de 230 a 350 nm (a) e porcentagem de dienos conjugados<sup>[67]</sup> (b), das amostras de óleo de soja e girassol em função do número de frituras.

Através da comparação entre os dados da área da região espectral entre 230 e 350 nm e o percentual de dienos conjugados, fica clara a dependência da evolução espectral com os produtos da oxidação induzida pelo processo de fritura. Este resultado merece ainda ser destacado porque em razão do alto coeficiente de absorção óptica nesta região

espectral, a espectroscopia convencional apresenta limitação de uso, exigindo diluição da amostra. No caso da fotoacústica, isto não ocorre porque o espectro pode ser obtido sem qualquer preparo prévio da amostra.

### 5.1.1.3 Conclusão

Neste estudo investigamos a partir de várias técnicas as alterações nas propriedades ópticas e térmicas de óleos de girassol e de soja que foram submetidos ao processo de fritura. Entre os resultados de destaque, podemos indicar os espectros de absorção óptica e os do coeficiente de expansão térmica que evidenciaram maiores variações em função do processo de degradação das amostras, com uma maior tendência à oxidação apresentada pelo óleo de girassol. Análises químicas requerem equipamentos de alto custo como cromatógrafos, diferentes reagentes e laboratórios preparados para tais análises. Estas análises requerem ainda longos períodos de medida para produzir resultados confiáveis, além de envolver reagentes tóxicos. Portanto, medir mudanças nas propriedades ópticas e térmicas das gorduras e correlacionar com suas mudanças na composição química pode ser uma alternativa confiável e barata<sup>[64]</sup>.

### 5.1.2 ESTUDO DA COMPLEXAÇÃO DA $\beta$ -CICLODEXTRINA NA EXTRAÇÃO DE COLESTEROL DA MANTEIGA

Como já foi visto no Capítulo 2 os triglicerídeos de origem animal em geral contém quantidades maiores de ácidos graxos saturados que aqueles de origem vegetal. Embora existam controvérsias quanto à ingestão de alimentos de fonte animal, eles ainda se encontram em lugar de destaque na pirâmide alimentar do homem. Possuem um papel importante no fornecimento de proteínas, uma vez que a carne, tanto vermelha quanto a de aves, o leite e o peixe fornecem proteínas com um elevado valor biológico, contendo todos os aminoácidos essenciais em proporções próximas àquelas necessárias para a síntese de proteínas dos tecidos do corpo humano. E também colaboram no fornecimento de gorduras necessárias ao organismo, sendo que os ácidos graxos saturados devem representar um terço do consumo diário total de gorduras, ou seja, 10% da ingestão calórica total<sup>[14]</sup>.

A manteiga integra esta classe e é um exemplo comum de alimento consumido quase que diariamente, embora tenha sido em muito substituída pela margarina. É rica em ácidos graxos saturados, possuindo uma quantidade proporcionalmente maior destes ácidos graxos até mesmo que a banha, e contém em média em torno de 0,2% de colesterol. Embora possua uma série de funções vitais, como componente essencial das membranas celulares e como precursor dos ácidos biliares, hormônios esteróides e vitamina D, o colesterol plasmático não é precisamente regulado e níveis altos podem elevar o risco de doença cardiovascular. O colesterol sanguíneo é moderadamente reduzido com a diminuição da quantidade de colesterol ingerido, o que faz necessária a identificação e a limitação de alimentos ricos em colesterol<sup>[14]</sup>.

Atualmente, alternativas vêm sendo buscadas para que determinados alimentos possam ser consumidos sem risco à saúde, como o favorecimento por carnes e laticínios magros na dieta. Procedimentos mais drásticos, como a extração do colesterol de alguns alimentos, como o ovo ou a manteiga, vêm sendo objeto de investigação.

Neste estudo, a espectroscopia fotoacústica foi empregada para avaliar a eficiência do processo de extração de colesterol da manteiga animal, que vem sendo realizado no grupo de pesquisa da Professora Graciette Matioli do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM. No procedimento de extração, a  $\beta$ -ciclodextrina é utilizada no processo de remoção de colesterol de uma manteiga comercial. A  $\beta$ -ciclodextrina é um oligossacarídeo cíclico formado por sete unidades de glucose<sup>[68]</sup>.

Apresenta uma cavidade apolar no centro da molécula e capacidade de formar complexos com vários compostos, como o colesterol, por exemplo. Estes compostos dentro da cavidade de uma molécula de  $\beta$ -ciclodextrina produzem uma mudança no comportamento eletrônico da molécula que pode ser usada para caracterizar o complexo. Através do processo de complexação a  $\beta$ -ciclodextrina pode ser utilizada na remoção do colesterol e seu uso já vem sendo empregado em indústrias devido ao baixo custo de operação se comparado a outros métodos<sup>[9]</sup>. No entanto, verificar a complexação tem sido um desafio e assim surge a necessidade do emprego de novos métodos de caracterização.

### 5.1.2.1 Procedimento Experimental

As amostras analisadas foram previamente preparadas, ou seja, passaram pelo processo de extração de colesterol no laboratório da Prof<sup>a</sup>. Graciette Matioli do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM. O procedimento de extração pode ser resumidamente descrito: para cada preparação foi utilizada manteiga comercial adicionando-se 10% (em massa) de  $\beta$ -ciclodextrina dissolvida em solução de água:etanol (30:70). A mistura é agitada em reator (com camisa) a uma temperatura de 35° C durante 12 horas, em seguida é centrifugada (1600 rpm) durante dez minutos. Após a centrifugação a mistura apresenta três fases das quais se retira então a manteiga com teor reduzido de colesterol, o resíduo mais espesso devido à presença da  $\beta$ -ciclodextrina e o resíduo líquido. Para comparação, esse processo foi também realizado simultaneamente sem a adição da  $\beta$ -ciclodextrina. Neste caso, após a centrifugação resultam somente duas fases, a manteiga e um resíduo líquido um pouco mais espesso do que o presente no processo com  $\beta$ -ciclodextrina.

Também foram preparadas amostras de manteiga com a adição de colesterol padrão na proporção de 10% e 15% (em massa) para caracterização. As amostras foram analisadas com a Espectroscopia Fotoacústica e através de dosagem direta de colesterol com o uso de um kit utilizado para amostras de sangue (método enzimático).

### 5.1.2.2 Resultados e Discussão

Inicialmente foram obtidos os espectros para a caracterização dos componentes, ou seja, do colesterol padrão (Sigma), da  $\beta$ -ciclodextrina em pó e da manteiga comercial padrão. Além dessas amostras foram analisadas também amostras da manteiga já tratada com  $\beta$ -ciclodextrina e da manteiga que foi processada sem a adição de  $\beta$ -ciclodextrina. Os espectros estão mostrados na Figura 44.

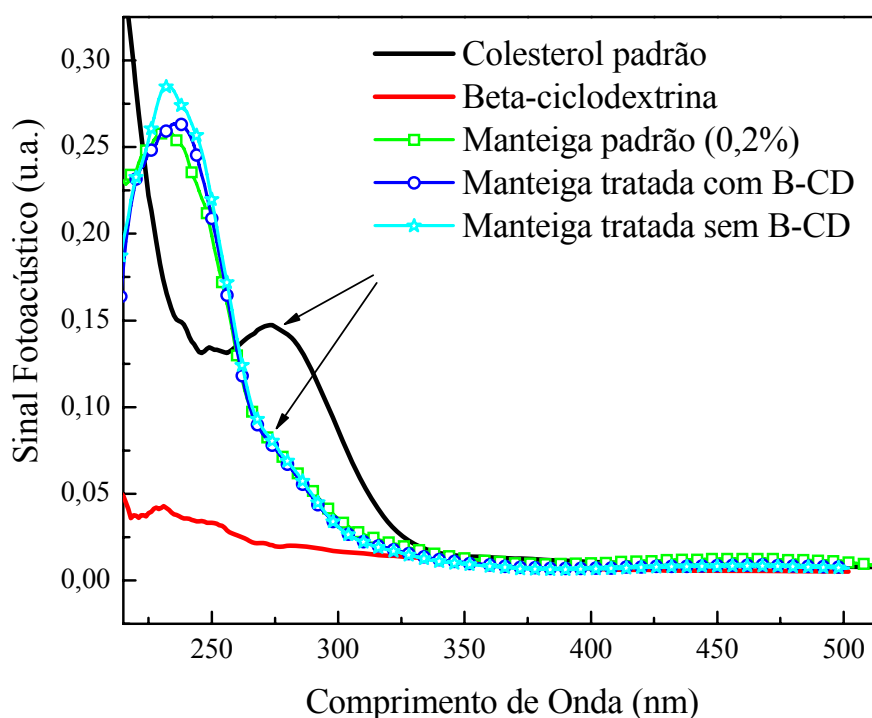


Figura 44: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da  $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial e das amostras preparadas com e sem  $\beta$ -ciclodextrina.

O colesterol padrão apresenta um pico centrado em  $\sim 274$  nm bem caracterizado e que pode ser usado como referência na identificação. Aparentemente este pico se apresenta também no espectro da manteiga padrão em proporção bem menor, o que pode ser atribuído à baixa concentração de colesterol na amostras (em torno de 0,2%). No entanto, pode-se notar também que nas demais amostras, incluindo a manteiga tratada com a  $\beta$ -ciclodextrina, ocorre absorção na mesma região e na mesma proporção. Essas amostras de manteiga foram avaliadas também pelo método enzimático e uma perda de  $\sim 88\%$  de colesterol foi detectada para a amostra tratada com a  $\beta$ -ciclodextrina, enquanto que para a manteiga tratada sem a  $\beta$ -ciclodextrina a perda de colesterol foi de menos de 10%. Uma hipótese que pode ser inferida é que além do colesterol, a absorção pode ser



devida à presença de outros lipídeos, uma vez que nesta região do espectro as bandas de absorção nem sempre são resolvidas. Uma maneira de se averiguar esta hipótese é acrescentar à manteiga padrão quantidades maiores de colesterol do que as encontradas naturalmente na manteiga. Foram preparadas então amostras com 10% e 15% (em massa) de colesterol e os espectros são mostrados na Figura 45.

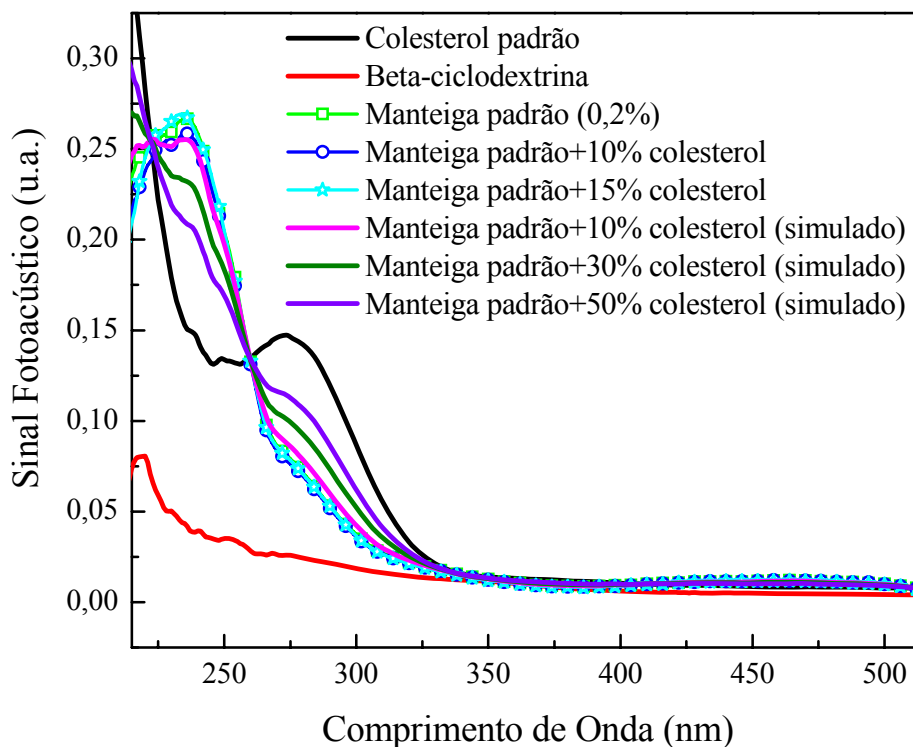


Figura 45: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da  $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial, amostras de manteiga padrão acrescidas de 10% e 15% (em massa) de colesterol e espectros simulados de manteiga padrão com 10%, 30% e 50% de colesterol.

Nota-se na Figura 45 que, mesmo após a adição de colesterol em pó na manteiga os espectros não se diferenciaram daquele da manteiga padrão. A simulação matemática do espectro da amostra de manteiga contendo 10% de colesterol foi realizada e a diferença observada ao espectro real não é significativamente diferente. A pequena diferença pode ser atribuída à rápida ligação do colesterol aos ácidos graxos da manteiga ou ainda reforça a hipótese da banda possuir mais de um centro absorvedor. Nesse caso, como apenas a quantidade de colesterol está sendo alterada, a intensidade de absorção da banda não evolui proporcionalmente a esta quantidade. A partir das simulações de 30% e 50% de colesterol pode-se observar que apenas para quantidades desta ordem haveria uma definição significativa da banda.

Para tentar contornar esta dificuldade de detecção do colesterol na manteiga, foi adotada a alternativa de tentar analisar os resíduos da extração, uma vez que nestes

poderia estar presente uma grande porção do colesterol extraído. Para isto, outro ensaio foi realizado, desde o processamento da manteiga com e sem  $\beta$ -ciclodextrina até a determinação do teor de colesterol via método enzimático. Deste ensaio apenas os resíduos do processo de extração com  $\beta$ -ciclodextrina foram analisados e os resultados são mostrados na Figura 46.

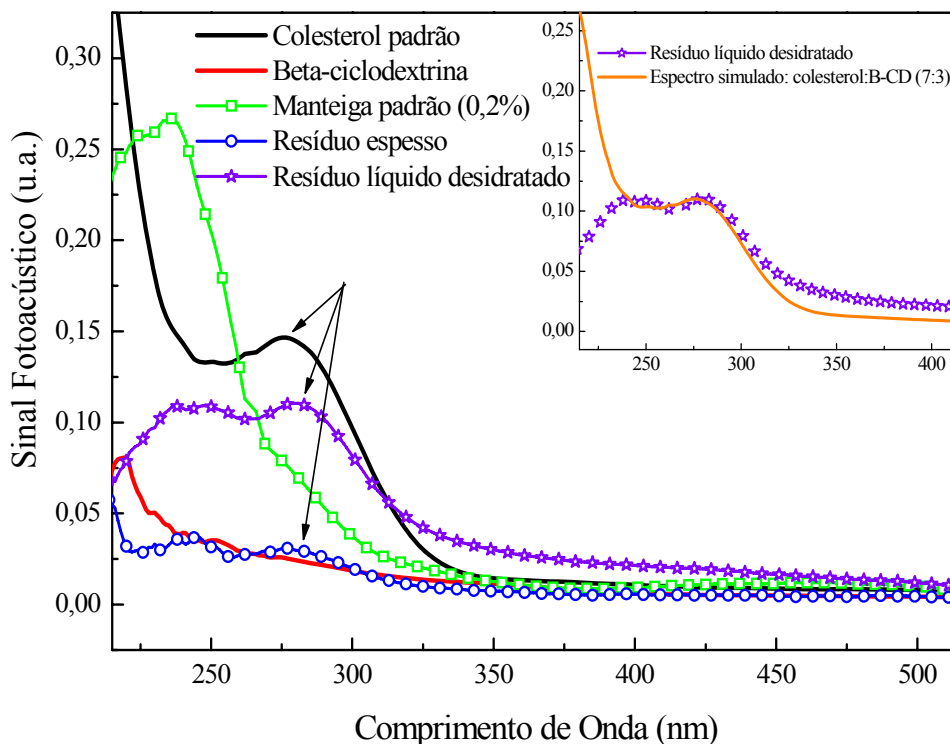


Figura 46: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da  $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial e dos resíduos da extração com  $\beta$ -ciclodextrina; No detalhe é mostrado a comparação entre o espectro de absorção do resíduo líquido e o espectro simulado colesterol: $\beta$ -ciclodextrina (7:3).

O espectro da amostra de resíduo líquido, que foi previamente desidratada apresentou um pico bem definido em torno  $\sim 274$  nm, que provavelmente pode ser atribuído à presença do colesterol extraído da manteiga, já que neste caso a quantidade proporcional de colesterol deve ser muito maior do que a encontrada na manteiga pura, principalmente devido ao fato do colesterol ser hidrofóbico, o que faz com que ao desidratar o resíduo o colesterol fique concentrado<sup>[68]</sup>. O resíduo espesso visualmente possuía grande quantidade de  $\beta$ -ciclodextrina ainda na forma de pó, ou seja, que não foi utilizada durante a complexação. O espectro comprovou isso porque embora bastante espesso, ele apresentava grande quantidade de água, podendo-se observar, a partir do espectro da Figura 46, a presença da banda de absorção do colesterol, ainda que com baixa intensidade. No detalhe pode-se comparar o espectro do resíduo líquido com um

espectro simulado da mistura colesterol e  $\beta$ -ciclodextrina na proporção de 7:3. O espectro simulado concorda razoavelmente com o espectro real, mesmo desprezando a presença de outros lipídeos que devem fazer parte desse resíduo. Essa simulação não apresenta um dado quantitativo, mas pode fornecer uma estimativa da proporção dos constituintes do resíduo.

Após a verificação da presença do colesterol no resíduo ser confirmada, novo ensaio foi realizado, para que agora pudessem ser analisados os resíduos tanto do processo de extração quanto sem a presença de  $\beta$ -ciclodextrina. Os espectros podem ser observados na Figura 47.

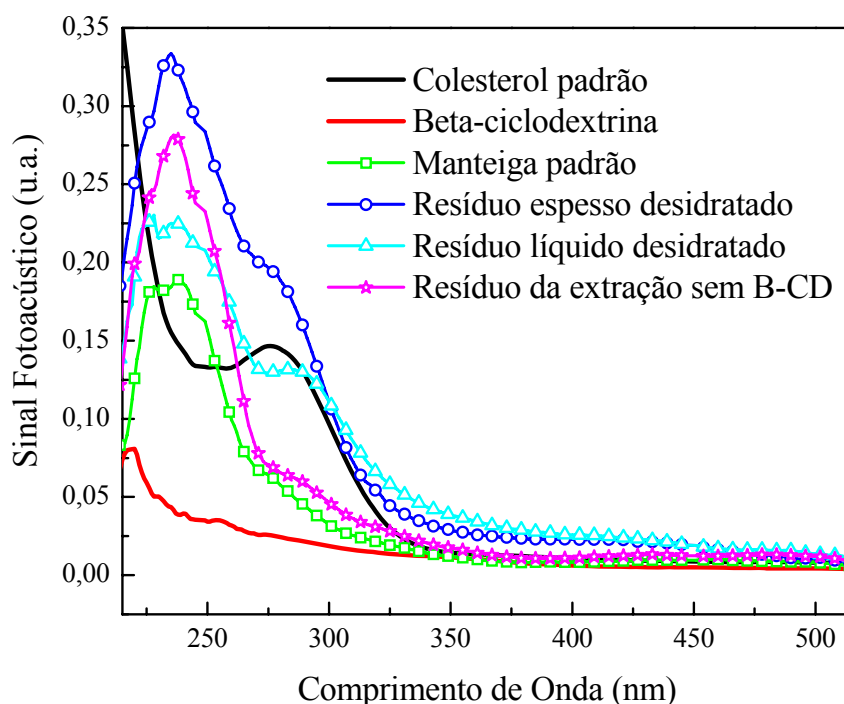


Figura 47: Espectros de absorção do colesterol padrão em pó, da  $\beta$ -ciclodextrina em pó, da manteiga padrão comercial, dos resíduos da extração com  $\beta$ -ciclodextrina e do resíduo de extração sem o uso da  $\beta$ -ciclodextrina.

O resíduo mais espesso desse ensaio apresentou uma quantidade menor de  $\beta$ -ciclodextrina em pó e este também foi desidratado para a medida de espectroscopia fotoacústica. Desta vez observou-se uma absorção significativamente maior com relação ao ensaio anterior. O resíduo líquido, também desidratado, apresentou novamente a presença do pico do colesterol, mas também apresentou uma maior absorção entre 215 e 270 nm, o que pode ser devido à presença de outros lipídeos. Já no espectro do resíduo do processo de extração sem a  $\beta$ -ciclodextrina, embora possa-se observar a banda de absorção característica do colesterol, esta possui uma intensidade muito menor em relação aos resíduos do processo com a  $\beta$ -ciclodextrina.

### 5.1.2.3 Conclusão

A partir dos dados apresentados foi possível verificar a complexação do colesterol pela  $\beta$ -ciclodextrina e, portanto, comprovar sua extração da manteiga. Embora ainda não tenha sido possível realizar uma análise quantitativa do processo de extração do colesterol, a comprovação da eficácia do processo é de grande importância e faz com que novas perspectivas quanto ao uso da Espectroscopia Fotoacústica neste tipo de análise sejam consideradas.

### CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

Neste trabalho a Espectroscopia Fotoacústica foi utilizada como ferramenta principal na caracterização e avaliação da taxa de penetração de fitofármacos na pele de animais.

No primeiro estudo realizado a espectroscopia fotoacústica demonstrou ser uma técnica adequada para determinação *ex vivo* da penetração em pele de ratos de extratos obtidos da planta *Guazuma ulmifolia*, mesmo em baixa concentração, da ordem de 3%.

No segundo estudo avaliou-se *in vivo* a capacidade emoliente da infusão preparada a partir das folhas de *Ipomoea batatas*. Embora nas condições experimentais apresentadas a capacidade emoliente da formulação não tenha sido possível demonstrar estatisticamente, a utilização da espectroscopia fotoacústica foi providencial para auxiliar no estudo do processo de difusão do produto na pele e na membrana bucal de ratos.

O estudo do fotoprotetor formulado a partir de extratos da planta *Arrabidaea chica* mostrou que a formulação apresenta uma resposta espectral satisfatória tanto no que se refere à absorção óptica da luz ultravioleta, quanto no que se refere à sua baixa transmitância, mesmo sem a adição de um protetor físico. No que se refere à permanência do fotoprotetor sobre a pele, os resultados também foram satisfatórios, apresentando duração de no mínimo 180 minutos.

As propriedades ópticas e térmicas de óleos vegetais submetidos ao processo repetido de fritura foram determinadas utilizando-se a espectroscopia fotoacústica, demais técnicas fototérmicas, além de interferometria óptica, calorimetria de relaxação térmica e de densidade. A partir de alterações ocorridas nestas propriedades pôde-se fazer uma correlação com mudanças na composição química das amostras e assim observar a presença de maior oxidação para o óleo de girassol, em comparação ao óleo de soja, relacionando-se com o número de reutilizações do óleo no processo de fritura.

Por fim, a avaliação da eficiência de complexação da  $\beta$ -ciclodextrina no processo de remoção do colesterol da manteiga foi realizada utilizando-se, mais uma vez, a espectroscopia fotoacústica. Os resultados obtidos comprovam a complexação e, portanto,

a extração do colesterol da manteiga, embora ainda não tenha sido possível uma quantificação do processo.

Finalmente, os resultados deste trabalho demonstraram mais uma vez que as técnicas fototérmicas são ferramentas tecnológicas que podem auxiliar no processo de controle de qualidade de medicamentos e para a análise de alimentos in natura e processados. A validação destes estudos, assim como sua ampliação para outros sistemas, pode resultar no estabelecimento de novos padrões para serem utilizados na certificação de conformidade de biomaterias.

### **Perspectivas de Estudos**

A relevância dos resultados obtidos neste trabalho de tese e de estudos prévios realizados com estes métodos indica que as técnicas aqui utilizadas podem tornar-se ferramentas importantes para a área de certificação de conformidade de biomateriais. Para tanto, é necessário que se ampliem os estudos para um número maior de sistemas, além da realização de validação dos métodos em termos das normas vigentes e/ou especialmente estabelecidas.

### APÊNDICE A – ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

#### A.1 – Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico é gerado ao incidir-se um feixe de luz modulada, de comprimento de onda conhecido, na amostra que se quer analisar. Esta amostra deve estar dentro de uma célula fotoacústica fechada que contenha um gás, este gás podendo ser o próprio ar. A incidência da luz e sua absorção fazem com que haja uma excitação dos níveis internos de energia da amostra. Por um processo de desexcitação não radiativo, a radiação absorvida é transformada em energia térmica, ou seja, causa um aquecimento periódico local. Este aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com ela, mas somente uma pequena camada responde termicamente às variações de temperatura na superfície do material. Acoplado à câmara, há um microfone que detecta a variação da pressão no gás que resulta no sinal fotoacústico. A variação de pressão na célula é proporcional à luz absorvida pelo material e isto implica no fato de que o sinal fotoacústico detectado está diretamente relacionado com a quantidade de luz absorvida pela amostra.

A obtenção de espectros de absorção óptica gerados pelo sinal fotoacústico devido à interação da matéria com uma radiação modulada de comprimento de onda conhecido caracteriza a Técnica Espectroscopia Fotoacústica.

Microscopicamente, a parte da radiação eletromagnética que é absorvida, no caso da luz visível ou ultravioleta, excita um estado eletrônico da molécula, e no caso da luz infravermelha, o estado excitado é o vibracional. O elétron excitado é promovido para os níveis mais elevados de energia, o que faz com que toda molécula seja excitada. O tempo de vida dos estados excitados de um átomo é muito curto. Em intervalos de tempo menores que  $10^{-8}$  segundos, o elétron retorna ao estado fundamental, ocorrendo assim a desexcitação do átomo, liberando a energia absorvida. O processo de decaimento térmico, no qual uma grande parcela da energia absorvida é transferida para estados vibracionais

das moléculas, eleva a temperatura em um ponto da amostra. Isto só não ocorre se houver reação fotoquímica estimulada, ou se um novo fóton for emitido (desexcitação radiativa).

Assim, em cada ponto da amostra ocorrem dois processos de transferência da energia térmica. Primeiro, por condução térmica, há uma transmissão dissipativa de calor para o resto da amostra. Em seguida, pela expansão térmica e excitação térmica não homogênea da amostra, ocorre a geração de ondas elásticas que se propagam de maneira não dissipativa para o resto da mesma.

Os diferentes mecanismos pelos quais os pulsos de calor produzidos na amostra geram ondas acústicas no gás são: difusão térmica, expansão térmica, flexão térmica e efeito fotobárico. Estes estão representados na Figura 48.

**Difusão Térmica:** Neste processo, a incidência da luz modulada sobre a amostra produz um fluxo térmico desde a amostra até o gás circundante, provocando neste uma variação de temperatura com a mesma frequência de modulação da luz. No entanto, apenas 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 irá sofrer um processo cíclico de expansão/contração funcionando como um pistão vibratório sobre o resto da coluna de gás, gerando uma onda de pressão que flexionará a membrana do microfone acoplado ao sistema, o que resulta em sinal fotoacústico. Neste mecanismo a transferência do calor gerado na amostra depende da difusividade térmica do material e pode receber também o nome de pistão simples.

**Expansão Térmica:** Neste mecanismo, o aquecimento periódico da amostra, devido à absorção da luz modulada, faz com que a mesma se expanda e se contraia. Deste modo o seu movimento se soma com a vibração daquela fina camada de gás e atua sobre o resto da coluna de gás como um pistão, o qual provoca a onda acústica no gás. Neste caso, a intensidade do sinal depende do coeficiente de expansão térmica do material. Este modelo também é conhecido como modelo do pistão composto.

**Flexão Termoelástica:** Este processo acontece quando há a formação de um gradiente de temperatura ao longo da espessura da amostra, e a mesma está com suas bordas presas. 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 desta na mesma direção do gradiente. Este processo é também periódico, gerando ondas de pressão no gás e conseqüentemente sinal fotoacústico.

**Efeito Fotobárico:** Este quarto efeito dá-se em amostras fotoquimicamente ativas, com troca gasosa entre a amostra e o gás da célula fotoacústica.



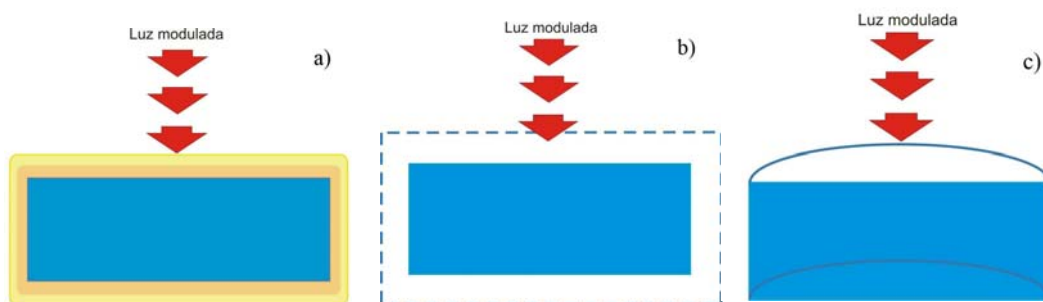


Figura 48: Mecanismos de geração de ondas acústicas: a) difusão térmica, b) expansão térmica e c) flexão termoelástica.

Como visto, para que um dos mecanismos fotoacústicos possa ocorrer é necessário que haja absorção da luz pelo material e condução do calor através do mesmo, ou seja, o aquecimento da amostra após incidência de radiação modulada depende não só da quantidade de calor que é gerado na amostra (coeficiente de absorção óptica  $\beta$ ), como também da eficiência de conversão fototérmica (conversão de luz em calor) e de como esse calor se difunde pelo material (difusão térmica). Assim, é de grande importância compreender as relações existentes entre as propriedades ópticas e térmicas dos materiais estudados com a geração do sinal fotoacústico, pois através de técnicas fotoacústicas, estudos espectroscópicos podem ser realizados devido à dependência do sinal fototérmico com relação ao coeficiente de absorção óptica. E ainda devido ao fato de o sinal fotoacústico depender de como o calor se difunde através do material, é possível realizar não só a caracterização térmica da amostra (medidas de difusividade, condutividade e expansão térmicas), como também fazer o mapeamento do comportamento térmico das mesmas. Isto se deve ao fato de que a geração de ondas térmicas, devido à absorção de pulsos de energia, pode sofrer reflexão e espalhamento ao encontrar defeitos e impurezas dentro da amostra, afetando o sinal detectado.

### A.2 – Caracterização óptica das amostras

Um determinado material pode não absorver totalmente um feixe de luz que incide sobre ele. Da parte absorvida, uma fração interage imediatamente com as moléculas da superfície do material e o restante é absorvido gradativamente, interagindo com as camadas moleculares cada vez mais profundas. À medida que penetra na amostra o feixe luminoso tem sua intensidade exponencialmente diminuída. Esse enfraquecimento do

feixe obedece a uma lei exponencial conhecida como Lei de Beer, e a distância de penetração do feixe na amostra, até que sua intensidade inicial se reduza ao valor de  $1/e$ , caracteriza a absorção óptica do material. Ou seja, de uma intensidade inicial  $I_0(x_0)$  que atinge um determinado material de coeficiente de absorção óptica  $\beta(\lambda)$  apenas uma intensidade  $I(x)$  atingirá a profundidade  $x$  da amostra:

$$I(x) = I_0 \left[ -\beta(x - x_0) \right] \quad (1)$$

O comprimento de absorção óptica  $l_\beta$  é definido como sendo a profundidade  $x$ , ou seja, a distância na qual a intensidade da radiação cai a  $1/e$  de  $I_0$ . Este parâmetro especifica o caráter óptico do material e é dado como

$$\beta(\lambda) l_\beta(\lambda) = 1 \Rightarrow l_\beta = \frac{1}{\beta(\lambda)} \quad (2)$$

Através deste parâmetro um determinado material, ou amostra de espessura total  $l$  pode ser definido como:

Se  $l_\beta \ll l$  : amostra opticamente opaca;

Se  $l_\beta \sim l$  : amostra absorvedora;

Se  $l_\beta \gg l$  : amostra opticamente transparente.

As três situações se encontram ilustradas na Figura 49.

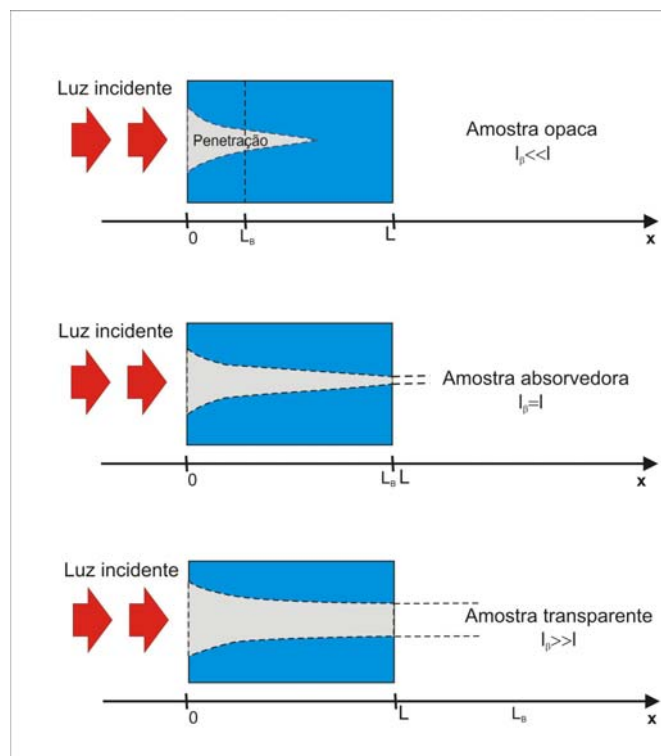


Figura 49: A absorção óptica é determinada pela distância  $l_\beta$  que a radiação luminosa penetra na amostra.

### A.3 – Caracterização térmica das amostras

Após a absorção da radiação, ocorrem processos de transferência da energia térmica que é gerada na profundidade atingida pela luz. A transmissão da energia térmica para o restante da amostra, através da condução, caracteriza a difusão térmica. Esta é monitorada através da medida da velocidade com que o calor se propaga no meio. A propriedade térmica medida é a difusividade térmica  $\alpha$  que descreve processos transientes ou periódicos de transmissão de calor. Outro parâmetro relacionado com a difusão térmica é a condutividade térmica, que descreve processos estacionários, dando o fluxo de calor em função do gradiente de temperatura no material.

De modo análogo ao comprimento de absorção óptica  $l_\beta$ , pode-se definir o comprimento de difusão térmica  $\mu_s$  como sendo a profundidade da amostra em que a magnitude da oscilação térmica se atenua a  $1/e$ . Uma determinada amostra de espessura  $l$  pode ser classificada termicamente através da comparação de sua espessura com o comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ):

Se  $\mu_s \gg l$  : amostra termicamente fina;

Se  $\mu_s \ll l$  : amostra termicamente grossa.

É importante salientar quanto à classificação térmica que o comprimento de difusão térmica não é um parâmetro intrínseco do material, pois depende da frequência de modulação da luz incidente:

$$\left( \mu_s = \sqrt{\frac{\alpha}{\pi f}} \right) \quad (3)$$

Deste modo, variando-se a frequência  $f$ , uma mesma amostra pode passar de termicamente fina para termicamente grossa. O valor de  $f$ , para o qual ocorre a transição é chamado de frequência de corte ( $f_c$ ). Obtém-se ( $f_c$ ), portanto igualando-se o comprimento de difusão térmica com a espessura da amostra:

$$\mu_s = l \Rightarrow f_c = \frac{\alpha}{\pi l^2} \quad (4)$$

Devido à relação direta de ( $f_c$ ) com a espessura, pode-se escolher convenientemente a região de espessura térmica pela faixa de frequência ou pela alteração da espessura da amostra.

#### A.4 – Dependência do sinal fotoacústico com a frequência de modulação

A intensidade do sinal fotoacústico depende da frequência de modulação. Por outro lado, a frequência de modulação varia com tipo de material estudado, de acordo com suas propriedades ópticas e térmicas. Esta relação entre sinal e frequência define o mecanismo dominante responsável pela geração do sinal fotoacústico.

Como por exemplo, em uma situação que se tenha sinal gerado através do processo de difusão térmica. Sendo a amostra termicamente fina com  $l_{\beta} > l$  (e transparente) ou termicamente grossa com  $l_{\beta} > \mu$ , para uma determinada região do espectro. Nestes casos obtém-se um espectro resolvido, uma vez que o sinal fotoacústico será gerado por uma camada de espessura constante, o que revela a capacidade da amostra em converter a radiação incidente em calor. No entanto sendo a amostra termicamente fina com  $l_{\beta} < l$  (amostra opaca), ou termicamente grossa e  $l_{\beta} < \mu$ , pode-se dizer que toda radiação incidente contribui para o sinal fotoacústico e o espectro é dito saturado. Neste caso o espectro obtido não se refere à capacidade da amostra em converter a radiação incidente em calor de forma diferenciada em função dos comprimentos de onda, mas sim ao espectro de emissão da fonte de radiação luminosa. Ou seja, mesmo uma amostra opaca pode ter seu espectro resolvido, desde que  $\mu_s < l_{\beta}$ . Em caso contrário a amostra se diz saturada, o que indica que toda luz absorvida gera sinal acústico. A saturação pode ser contornada diminuindo as dimensões da amostra (deixando de ser opaca), ou aumentando a frequência de modulação (a fim de reduzir  $\mu_s$ ). Pois com o aumento da frequência tem-se o sinal de camadas cada vez mais superficiais e devido à dependência do comprimento de difusão  $\mu_s$  com a frequência de modulação, é possível efetuar um perfil de profundidade no material. O que permite também fazer uma análise detalhada de uma amostra com duas camadas e espectros distintos e ainda, análises “*in vivo*” nas quais precisa-se controlar a profundidade a que a luz chega.

Quando se fala em amostras termicamente finas ou com espectros saturados, a intensidade do sinal é proporcional a  $\omega^{-1}$ , sendo  $\omega = 2\pi f$ . Já para amostras termicamente grossas, que apresentam espectros resolvidos, essa dependência é proporcional a  $\omega^{-3/2}$ . ambos os casos se referem para processo de difusão térmica. Já para os casos de expansão térmica e efeito termoelástico o sinal geralmente apresenta proporcionalidade a  $\omega^{-1}$ .

Na Tabela 3 tem-se de maneira resumida a dependência da amplitude do sinal fotoacústico com as propriedades ópticas e térmicas já comentadas.

Tabela 3: Casos limites do efeito fotoacústico.

Propriedades Térmicas	Termicamente Grosso		Termicamente Fino		
	$l \gg \mu_s$		$l \ll \mu_s$		
Propriedades ópticas	Transparente	Opaco		Transparente	Opaco
	$l_\beta \gg l \gg \mu_s$	$l \gg l_\beta \gg \mu_s$	$l \gg \mu_s \gg l_\beta$	$l \ll l_\beta \ll \mu_s$	$l \ll \mu_s \ll l_\beta$
Dependência com frequência	$\ S_f\  \propto \omega^{-3/2}$		$\ S_f\  \propto \omega^{-1}$	$\ S_f\  \propto \omega^{-1}$	
Definição do espectro	Resolvido		Saturado	Resolvido	

## APÊNDICE B – ÍNDICE DE REFRAÇÃO E POLARIZABILIDADE ELETRÔNICA

Neste apêndice alguns parâmetros e seus aspectos teóricos são brevemente discutidos. Toda a teoria apresentada neste texto foi previamente descrita por A. Steimacher em sua dissertação de mestrado<sup>[21]</sup>, portanto apenas os pontos principais para a compreensão da análise dos dados realizada serão abordados.

### B.1 - O índice de refração ( $n$ )

A refração é o desvio que a luz sofre ao se propagar de um meio isotrópico a outro devido à mudança da velocidade de propagação entre os meios. O exemplo mais comum de refração de uma onda é o do desvio da luz ao passar do ar para um líquido.

O índice de refração  $n$  é definido como a razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz no meio, ou seja:

$$n = \frac{c}{v} \quad (1)$$

na qual  $c$  é a velocidade da luz no vácuo e  $v$  é a velocidade da luz no meio. O índice de refração ainda pode ser dado em função da constante dielétrica  $\epsilon$  e permeabilidade magnética  $\mu$  do meio<sup>[22]</sup>

$$n = \sqrt{\epsilon\mu} . \quad (2)$$

Para materiais dielétricos, isotrópicos e não magnéticos, em que  $\mu \approx 1$ , o índice de refração pode ser escrito em termos apenas da constante dielétrica  $\epsilon$ , sendo esta a relação de Maxwell<sup>[22]</sup> para o índice de refração:

$$n = \sqrt{\epsilon} \quad (3)$$

Para melhor compreender o índice de refração e sua dependência com a temperatura é necessário estudar as relações macroscópicas e microscópicas dos materiais dielétricos, como a polarizabilidade, a susceptibilidade elétrica e suas dependências com o campo elétrico.

### B.2 - O índice de refração ( $n$ ) e a polarizabilidade

Sob ponto de vista microscópico, todo meio material é composto de átomos, os quais são constituídos de entidades carregadas (núcleos atômicos e elétrons) e assim são afetados pela presença de um campo elétrico  $E$ . Os materiais dielétricos diferem dos materiais condutores por não apresentarem cargas livres em sua estrutura e quando sofrem a ação de um campo elétrico estão sujeitos a ação do mesmo de duas maneiras: i) os momentos de dipolo intrínsecos dos constituintes do dielétrico, chamados de polares, podem ser orientados na direção do campo externo, ou seja, esses dipolos sofrem a ação de forças elétricas, o que causa torques orientando os momentos de dipolo na mesma direção e sentido que o do campo externo aplicado, fazendo com que a energia potencial de interação seja minimizada; ou ii) se o material não tem momentos de dipolo intrínsecos (materiais não-polares), o campo externo pode provocar o surgimento de dipolos elétricos induzidos. Assim, podemos distinguir quatro mecanismos básicos de polarização descritos a seguir e representados na Figura 50<sup>[69]</sup>:

- ❖ **Polarização eletrônica ( $\gamma_e$ ):** Quando o campo externo desloca o centro de carga da nuvem eletrônica de uma molécula em relação ao centro de carga de seu núcleo, resultando no aparecimento de momentos de dipolo induzidos;
- ❖ **Polarização atômica ( $\gamma_a$ ):** Quando átomos de diferentes tipos formam moléculas, normalmente não compartilham seus elétrons simetricamente e as nuvens eletrônicas são deslocadas excentricamente em torno dos átomos com maior poder de polarização. Assim, quando sujeitos a aplicação de um campo elétrico  $E$ , átomos (ou grupos de átomos) adquirem cargas de polaridades opostas que provocam deslocamentos em suas posições de equilíbrio;
- ❖ **Polarização de orientação ou polarizabilidade dipolar ( $\gamma_d$ ):** A distribuição assimétrica de cargas entre átomos distintos que constituem as moléculas proporciona o surgimento de momentos de dipolo permanente, mesmo na ausência de um campo externo. Quando um campo elétrico externo é aplicado, tais momentos de dipolo experimentam um torque que tende a orientá-los na direção do campo;

- ❖ **Polarização interfacial ( $\gamma_s$ ):** Diferente dos três tipos anteriores, nos quais a polarização decorre de cargas ligadas localmente aos átomos, moléculas ou nas estruturas de sólidos ou líquidos, usualmente podem existir portadores de carga que podem migrar de um ponto a outro na estrutura do material. Quando tais portadores são impedidos de se mover por ficarem presos na estrutura do material, nas interfaces, ou mesmo por não conseguirem se descarregar livremente, ocorre o surgimento de cargas espaciais ou interfaciais que provocam uma distorção do campo médio macroscópico aumentando a capacitância do material, como por exemplo, nos capacitores.

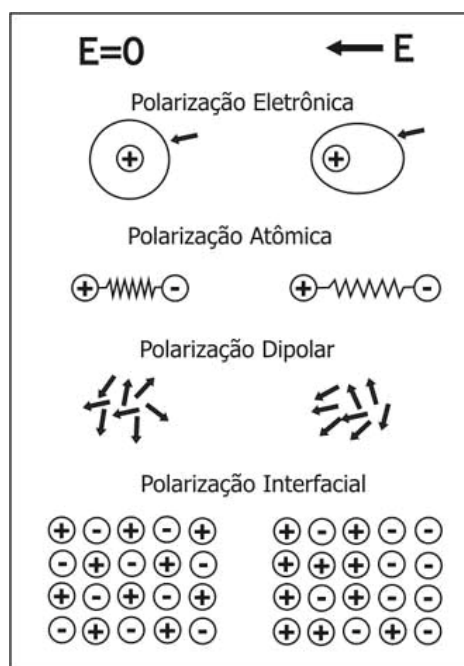


Figura 50: Mecanismos de polarização<sup>[69]</sup>.

Uma vez que cada mecanismo descrito atua de forma independente, a polarizabilidade total do meio material pode ser definida como a soma dos quatro parâmetros, caracterizada por  $\gamma$ , ou seja:

$$\gamma = \gamma_e + \gamma_a + \gamma_d + \gamma_s \quad (4)$$

Quando um campo elétrico  $\mathbf{E}$  é aplicado a um meio dielétrico, tornando-o polarizado, a polarização elétrica  $\mathbf{P}$  (momento de dipolo por unidade de volume) é dada por:

$$\mathbf{P} = \eta \mathbf{E} \quad (5)$$

na qual o fator  $\eta$  é chamado de susceptibilidade dielétrica. A susceptibilidade dielétrica  $\eta$  esta relacionada com a constante dielétrica  $\epsilon$  por:



$$\varepsilon = 1 + 4\pi\eta \quad (6)$$

O vetor polarização elétrica também pode ser definido como:

$$\mathbf{P} = N\mathbf{p} \quad (7)$$

sendo  $N$  o número de moléculas por unidade de volume e  $\mathbf{p}$  é o momento de dipolo.

Assumindo que o momento de dipolo  $\mathbf{p}$ , estabelecido sob influência de um campo  $\mathbf{E}$ , é proporcional ao campo interno  $\mathbf{E}'$  do material. Para um material dielétrico, isotrópico e uniforme o campo interno é dado por<sup>[69]</sup>:

$$\mathbf{E}' = \mathbf{E} + \frac{4\pi}{3} \mathbf{P} \quad (8)$$

O momento de dipolo  $\mathbf{p}$  por sua vez é aproximadamente proporcional ao campo elétrico que atua sobre a molécula. Para exibir esta dependência em relação ao campo elétrico a polarizabilidade do material pode ser definida como a razão entre o momento de dipolo  $\mathbf{p}$  e o campo  $\mathbf{E}'$ <sup>[70]</sup>

$$\mathbf{p} = \gamma\mathbf{E}' \quad (9)$$

Assim a polarização total pode ser escrita como:

$$\mathbf{P} = N\mathbf{p} = N\gamma\mathbf{E}' = N\gamma\left(\mathbf{E} + \frac{4\pi}{3} \mathbf{P}\right) \quad (10)$$

Usando a equação (5) chega-se a uma relação entre a susceptibilidade dielétrica (parâmetro macroscópico) e a polarizabilidade (parâmetro microscópico), escrita como:

$$\eta = \frac{N\gamma}{1 - \frac{4\pi}{3} N\gamma} \quad (11)$$

Através da relação entre a constante dielétrica e susceptibilidade dielétrica dada pela equação (6), a equação (11) pode ser reescrita

$$\varepsilon = \frac{1 + \frac{8\pi}{3} N\gamma}{1 - \frac{4\pi}{3} N\gamma} \quad (12)$$

ou ainda, a polarizabilidade média pode ser expressa em termos da constante dielétrica e do número de moléculas da amostra

$$\gamma = \frac{3}{4\pi N} \left( \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} \right) \quad (13)$$

Esta equação é conhecida como equação de Clausius-Mossoti, pois Mossoti (em 1850), e Clausius (em 1879) estabeleceram que, para qualquer material,  $(\varepsilon - 1)/(\varepsilon + 2)$  deveria ser proporcional à densidade. Utilizando a relação de Maxwell para o índice de refração, equação (3), Lorentz e Lorenz, mostraram independentemente e quase ao mesmo tempo (1880 e 1881, respectivamente) que a polarizabilidade média  $\gamma$  está relacionada com o índice de refração  $n$  pela seguinte equação<sup>[70]</sup>

$$\gamma = \frac{3}{4\pi N} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \quad (14)$$

esta ficou conhecida como equação de Lorentz-Lorenz.

Pode-se observar que o índice de refração (e sua variação com a temperatura) pode fornecer, através de sua relação com a polarizabilidade(14), uma visão microscópica do material estudado. Para a análise do comportamento do índice de refração com a temperatura, é comum definir uma quantidade chamada de refratividade molar (A). Tal quantidade é essencialmente a polarizabilidade total de um mol de uma determinada substância, sendo definida como<sup>[22]</sup>:

$$A = \frac{4\pi}{3} N_m \gamma \quad (15)$$

na qual  $N_m = 6,02 \times 10^{23}$  é o número de Avogadro, ou seja, o número de moléculas em um mol. Se  $W$  é o peso molecular,  $\rho$  a densidade,  $p$  a pressão e  $T$  a temperatura absoluta, o volume molar é definido por:

$$V = \frac{N_m}{N} = \frac{W}{\rho} = \frac{RT}{p} \quad (16)$$

Por meio das equações (14) e (16) a refratividade pode ser escrita explicitamente em função da densidade e do índice de refração<sup>[22]</sup>:

$$A = \frac{W}{\rho} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) = \frac{RT}{p} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \quad (17)$$

### B.3 - O coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ )

O conceito de invariância do índice de refração, introduzido por Gladstone<sup>[23]</sup> para gases e líquidos e estendido para sólidos isotrópicos por Lorentz e Lorenz (1880) postula a existência de uma relação linear entre o volume  $V$  do meio e o índice de refração, que pode ser escrita como:

$$A = V \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \quad (18)$$

Esta constante é definida como refratividade  $A$  da substância, ou seja, uma medida da polarizabilidade do meio<sup>[23]</sup>. Nesta primeira aproximação a polarizabilidade é assumida como sendo independente da temperatura. Assim, sob variação de temperatura, qualquer mudança no índice de refração seria devido a uma mudança na densidade do meio. Como a densidade do meio usualmente decresce com o aumento da temperatura, seria esperado que o índice de refração também sofresse um decréscimo<sup>[23]</sup>. No entanto, a polarizabilidade geralmente apresenta dependência com a temperatura. Assim, a mudança no índice de refração com a temperatura é controlada por dois fatores que normalmente competem entre si: Primeiro, o volume do meio muda com a temperatura, normalmente aumentando com o aumento da temperatura, o que causa uma diminuição no número de espécies polarizáveis por unidade de volume e, portanto um decréscimo no índice de refração. Segundo, a polarizabilidade eletrônica ou atômica também muda com a temperatura, normalmente aumentando em função desta, resultando num aumento do índice de refração<sup>[23, 71]</sup>.

Tais argumentos podem ser verificados quantitativamente isolando-se o índice de refração da equação de Lorentz-Lorenz (18), conforme Prod'Homme<sup>[23]</sup>

$$n^2 = \frac{V + 2A}{V - A} \quad (19)$$

e diferenciando tem-se que:

$$2n \, dn = \frac{3V \, dA - 3A \, dV}{(V - A)^2} = \frac{3AV}{(V - A)^2} \left( \frac{dA}{A} - \frac{dV}{V} \right) \quad (20)$$

Expressando o primeiro fator em termos de  $n$

$$\frac{3AV}{(V - A)^2} = \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 2)}{3} \quad (21)$$

Substituindo a equação (21) em (20) tem-se que

$$2n \, dn = \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 2)}{3} \left[ \frac{dA}{A} - \frac{dV}{V} \right] \quad (22)$$

Derivando a equação (22) em relação à temperatura:

$$\frac{dn}{dT} = \left[ \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 2)}{6n} \right] \left[ \frac{1}{A} \frac{dA}{dT} - \frac{1}{V} \frac{dV}{dT} \right] \quad (23)$$

podemos introduzir o coeficiente de expansão volumétrica  $\beta = \frac{1}{V} \frac{dV}{dT}$  e um coeficiente similar para polarizabilidade  $\varphi = \frac{1}{A} \frac{dA}{dT}$  lembrando que a refratividade  $A$  é proporcional a polarizabilidade. Assim, podemos reescrever a equação (23) como<sup>[23]</sup>:

$$\frac{dn}{dT} = \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 2)}{6n} (\varphi - \beta) \quad (24)$$

na qual podemos verificar que o coeficiente térmico do índice de refração é dominado pelo coeficiente térmico da polarizabilidade e pelo coeficiente de expansão térmica.

Pode-se, portanto analisar dois casos envolvendo o coeficiente térmico do índice de refração:

- Se  $\beta > \varphi$  teremos  $dn/dT < 0$ ; este caso ocorre em substâncias como líquidos, cristais iônicos como o fluoreto de lítio (LiF), vidros orgânicos, polímeros como metacrilatos, poliestireno etc. que possuem ligações mais fracas entre os átomos;
- Se  $\beta < \varphi$  e assim  $dn/dT > 0$ ; ocorre em substâncias com fortes ligação entre seus constituintes, o que implica em baixa expansão volumétrica, como cristais covalentes, vidros óxidos (silicatos, aluminatos, fosfatos), etc.

A partir do parâmetro termo-óptico  $dn/dT$  do meio pode-se estudar o comportamento microestrutural, o efeito da composição do material e de outras propriedades em termos da expansão volumétrica e da polarização.

## REFERÊNCIAS

1. E. Sehn, K.C. Silva, A.C. Bento, M.L. Baesso, and S.L. Franco, *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the potentiality of bee-propolis as UV protector: In vivo test in humans*. Journal de Physique IV, 2005. **125**: p. 681-683.
2. N. Serpone, D. Dondi, and A. Albini, *Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products*. Inorganica Chimica Acta, 2007. **360**: p. 794-802.
3. N. Serpone, A. Salinaro, A.V. Emeline, S. Horikoshi, H. Hidaka, and J. Zhao, *An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents*. Photochem. Photobiol. Sci., 2002. **1**: p. 970-981.
4. E. Sehn, *Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação de substâncias na pele humana in vivo*, in Departamento de Física. 2004, Universidade Estadual de Maringá: Maringá-PR. p. 59.
5. F. Pedrochi, E. Sehn, A.N. Medina, A.C. Bento, M.L. Baesso, A. Storck, and J.L. Gesztesi, *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin in vivo*. Journal De Physique Iv, 2005. **125**: p. 757-759.
6. L.E.R. Nuglisch, D.T. Dias, E. Sehn, A.C. Bento, M.L. Baesso, S.T.S. Santos, and M.Y. Fushimi, *Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail*. Journal De Physique IV, 2005. **125**: p. 631-633.
7. P.V. Del Ré and N. Jorge, *Comportamento dos óleos de girassol, soja e milho em frituras de produto cárneo empanada pré-frito congelado*. Ciência e Agrotecnologia, 2007. **31**(6): p. 1774-1779.
8. N. Jorge, B.B.P. Soares, V.M. Lunardi, and C.R. Malacrida, *Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras*. Química Nova, 2005. **28**(6): p. 947-951.
9. S.H. Chiu, T.W. Chung, R. Giridhar, and W.T. Wu, *Immobilization of  $\beta$ -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk*. Food Research International, 2004. **37**: p. 217-223.
10. L.C. Junqueira and J. Carneiro, *Histologia Básica*. 10<sup>a</sup> ed. 2004, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 488.
11. B.W. Barry, *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **14**(2): p. 101-114.
12. R.J. Scheuplein, *Mechanism of Percutaneous Absorption .2. Transient Diffusion and Relative Importance of Various Routes of Skin Penetration*. Journal of Investigative Dermatology, 1967. **48**(1): p. 79-&.
13. N. Kanikkannan, K. Kandimalla, S.S. Lamba, and M. Singh, *Structure-activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery*. Current Medicinal Chemistry, 1999. **6**.
14. P.C. Champe and R.A. Harvey, *Bioquímica ilustrada*. 2<sup>a</sup> ed. 1996, Porto Alegre: Artmed.

## REFERÊNCIAS

---

15. A. Rosencwaig, *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*. Vol. 54. 1980: John Wiley & Sons.
16. A. Rosencwaig and A. Gersho, *Theory of Photoacoustic Effect with Solids*. Journal of Applied Physics, 1976. **47**(1): p. 64-69.
17. A. Rosencwaig and A. Gersho, *Photoacoustic Effect with Solids - Theoretical Treatment*. Science, 1975. **190**(4214): p. 556-557.
18. A.C. Tam, *Applications of photoacoustic sensing techniques*. Reviews of Modern Physics, 1986. **58**(2): p. 381-431.
19. K.C. Silva, O.A. Sakai, A. Steimacher, F. Pedrochi, M.L. Baesso, A.C. Bento, A.N. Medina, S.M. Lima, R.C. Oliveira, J.C.S. Moraes, K. Yukimitu, E.B. Araujo, M. Petrovich, and D.W. Hewak, *Temperature and wavelength dependence of the thermo-optical properties of tellurite and chalcogenide glasses*. Journal of Applied Physics, 2007. **102**(7): p. 073507-1/6.
20. A. Steimacher, A.N. Medina, A.C. Bento, J.H. Rohling, M.L. Baesso, V.C.S. Reynoso, S.M. Lima, M.N. Petrovich, and D.W. Hewak, *The temperature coefficient of the optical path length as a function of the temperature in different optical glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2004. **348**: p. 240-244.
21. A. Steimacher, *Determinação de propriedades termo-ópticas de vidros e cristais utilizados como meio ativo para lasers de estado sólido utilizando técnicas de interferometria óptica*, in *Departamento de Física*. 2004, Universidade Estadual de Maringá: Maringá. p. 100.
22. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*. 1984, Cambridge: Pergamon Oxford.
23. L. Prod'homme, *A new approach to the thermal change in the refractive index of glasses*. Physics and Chemistry of Glasses, 1960. **1**(4): p. 119-122.
24. A.N. Medina, A.M.F. Caldeira, A.C. Bento, M.L. Baesso, J.A. Sampaio, T. Catunda, and F.G. Gandra, *Thermal relaxation method to determine the specific heat of optical glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2002. **304**: p. 299-305.
25. S.M. Lima, L.H.C. Andrade, F. Pedrochi, R. Constantino, A.N. Medina, A.C. Bento, and M.L. Baesso, *Evaluation of the thermal diffusivity of vegetable oils during frying by Thermal Lens Spectrometry*. European Physical Journal, 2007. **1**: p. 1-4.
26. T.A.S. Albuquerque, *Aplicação da Espectroscopia de Lente Térmica na investigação das propriedades ópticas e térmicas de óleos vegetais comestíveis*, in *Departamento de Física*. 2002, Universidade Estadual de Maringá: Maringá. p. 103.
27. T.A.S. Albuquerque, P.R.B. Pedreira, A.N. Medina, J.R.D. Pereira, A.C. Bento, and M.L. Baesso, *Time resolved thermal lens in edible oils*. Review of scientific instruments, 2003. **74**(1): p. 694-696.
28. J.C.B. Rocha, F. Pedrochi, L. Hernandes, J.C.P. de Mello, and M.L. Baesso, *Ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from Guazuma ulmifolia using photoacoustic spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, 2007. **587**(1): p. 132-136.
29. A. Camporese, M.J. Balick, R. Arvigo, R.G. Esposito, N. Morsellino, F. De Simone, and A. Tubaro, *Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America)*. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **87**: p. 103-107.
30. M.P. Corrêa, *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*. Vol. 5. 1974, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. 280-281.
31. Z. Wayne, L.L.C. Elementals, and A.Z. Scottsdale, *Pycnogenol and skincare*. Drug and Cosmetic Industry, 1996. **158**: p. 44-50.

## REFERÊNCIAS

---

32. M. Hör, M. Heinrich, and H. Rimpler, *Proanthocyanidin polymers with antisecretory activity and proanthocyanidin oligomers from Guazuma ulmifolia bark*. *Phytochemistry*, 1995. **42**(1): p. 109-119.
33. T. Takahashi, Y. Yokoo, T. Inoue, and A. Ishii, *Toxicological studies on procyanidin B-2 for external application as a hair growing agent*. *Food and Chemical Toxicology*, 1999. **37**(5): p. 545-552.
34. A. Rosencwaig, *Advances in Eletronics and Electron Physics*, 1978. **46**: p. 207.
35. K. Giese, A. Nicolaus, B. Sennhenn, and K. Kolmel, *Photoacoustic Invivo Study of the Penetration of Sunscreen into Human-Skin*. *Canadian Journal of Physics*, 1986. **64**(9): p. 1139-1141.
36. B. Sennhenn, M. Rohr, K. Giese, and K. Kölmel, *Penetration of Topically Applied Drugs Through Human Skin Investigated by Photoacoustic Spectroscopy*. *Photoacoustic and Photothermal Phenomena*, 1988. **58**.
37. R.D. Snook, R.D. Lowe, and M.L. Baesso, *Photothermal spectrometry for membrane and interfacial region studies*. *Analyst*, 1998. **123**(4): p. 587-593.
38. B. Muller, M. Kasper, C. Surber, and G. Imanidis, *Permeation, metabolism and site of action concentration of nicotinic acid derivatives in human skin - Correlation with topical pharmacological effect*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. **20**(2): p. 181-195.
39. I. Notingher and R.E. Imhof, *Mid-infrared in vivo depth-profiling of topical chemicals on skin*. *Skin Research and Technology*, 2004. **10**(2): p. 113-121.
40. L. Mitchem, C. Mio, and R.D. Snook, *Diffusion of transdermally delivered nitroglycerin through skin mimetics using photoacoustic and attenuated total reflectance spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **511**(2): p. 281-288.
41. S.M. Brown, M.L. Baesso, J. Shen, and R.D. Snook, *Thermal-Diffusivity of Skin Measured by 2 Photothermal Techniques*. *Analytica Chimica Acta*, 1993. **282**(3): p. 711-719.
42. M.L. Baesso, R.D. Snook, and J.J. Andrew, *Fourier-Transform Infrared Photoacoustic-Spectroscopy to Study the Penetration of Substances through Skin*. *Journal De Physique Iv*, 1994. **4**(C7): p. 449-451.
43. K.J. Galina, *Guazuma ulmifolia Lam., var. tomentella, Sterculiaceae*. 2003, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP: Araraquara - SP.
44. J.C.B. Rocha, *Chemical evaluation of the Guazuma ulmifolia Lam. var. tomentella, Sterculiaceae extracts*. 2005, Universidade Estadual de Maringá - UEM: Maringá - PR.
45. D. Alzugaray and C. Alzugaray, *Plantas que curam*. Vol. 6. 1998, São Paulo: Três.
46. R.T. Leonardo and R.C.C. Lia, *Semiologia e diagnóstico clínico/radiográfico das alterações periapicais de origem inflamatória*, in *Endodontia Tratamento de Canais Radiculares: Princípios técnicos e biológicos*, M.R. Leonardo, Editor. 2005, Artes Médicas: São Paulo. p. 67-98.
47. A.M. Borba and M. Macedo, *Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil*. *Acta Bot. Bras.*, 2006. **20**(4): p. 771-782.
48. A.C. Perez and L.Y. Hakumata, *Efeito antiinflamatório da folha de batata doce (Ipomoea batatas)*. *Revista de Odontologia da UNESP*, 1999. **28**(1): p. 147-60.
49. M. Perusquia, S. Mendoza, R. Bye, E. Linares, and R. Maria, *Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 1995. **46**(1): p. 63-69.

## REFERÊNCIAS

---

50. C.P. Locher, M.T. Burch, H.F. Mower, J. Berestecky, H. Davis, B. Van Poel, A. Lasure, D.A. Vanden Berghe, and A.J. Vlietinck, *Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology, 1995. **49**(1): p. 23-32.
51. W.F. Reynolds, M. Yu, R.G. Enriques, H. Gonzales, I. Leon, G. Magos, and M.L. Villareal, *Isolation and characterization of cytotoxic and antibacterial tetrasaccharide glycosides from Ipomoea stans*. Journal of Natural Products, 1995. **58**(11): p. 1730-1734.
52. V. Arana and E. Katchburian, *Histologia e embriologia oral*. 2ª ed. 2004: Guanabara Koogan.
53. C.M. Chen, S.C. Li, Y.L. Lin, C.Y. Hsu, M.J. Shied, and J.F. Liu, *Consumption of purple sweet potato leaves modulates human immune response: T-lymphocyte functions, lytic activity of natural killer cell and antibody production*. World Journal of Gastroenterology, 2005. **11**(37): p. 5777-5781.
54. J.T. Guinoza Siraichi, *Avaliação da atividade fotoprotetora utilizando extrato obtido das folhas de Arrabidaea chica*, in Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas. 2007, Universidade Estadual de Maringá - UEM: Maringá.
55. P.M. Pauletti, I. Catro-Gamboa, D.H.S. Silva, M.C.M. Young, D.M. Tomazela, M.N. Eberlin, and V.S. Bolzani, *New antioxidant C- Glucosylxanthones from the stems of Arrabidaea samydoides*. Journal Natural Product, 2003. **66**: p. 1384-1387.
56. O.S. Takemura, M. Inuma, H. Tosa, O.G. Miguel, E.A. Moreira, and Y. Nozawa, *A flavone from leaves of Arrabidaea chica*. Phytochemistry, 1995. **38**(5): p. 1299-1230.
57. B. Devia, G. Llabres, J. Wouters, L. Dupont, M.T. Escribano-Bailon, S. Pascual-Teresa, L. Angenot, and M. Tits, *New 3- deoxyanthocyanidins from leaves of Arrabidaea chica*. Phytochemical analysis 2002. **13**: p. 114-120.
58. T. Alcerito, F.E. Barbo, G. Negri, D.Y.A.C. Santos, C.I. Meda, M.C.M. Young, D. Chávez, and C.T.T. Blatt, *Foliar epicuticular wax of Arrabidaea brachypoda: flavonoids and antifungal activity*. Biochemical Systematics and Ecology, 2002. **30**: p. 677- 683.
59. T.M. Souza, L.E. Santos, R.R.D. Moreira, and V.L.B.I. Rangel, *Avaliação da atividade fotoprotetora de Achillea millefolium L. (Asteraceae)*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2005. **15**(1): p. 36-38.
60. J.A. Balderas-López and A. Mandelis, *Self-consistent photothermal techniques: Application for measuring thermal diffusivity in vegetable oils*. Review of Scientific Instruments, 2003. **74**(1): p. 700-702.
61. F. Karaosmanoglu, G. Kurt, and T. Özaktas, *Long term CI engine test of sunflower oil*. Renewable Energy, 2000. **19**: p. 219-221.
62. G.R. Takeoka, G.H. Full, and L.T. Dao, *Effect of Heating on the Characteristics and Chemical Composition of Selected Frying Oils and Fats*. J. Agric. Food Chem. , 1997. **45**: p. 3244-3249.
63. R.C.F. Cella, M.A.B. Regitano-D'arce, and M.H.F. Spoto, *Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal*. Ciência e Tecnologia em Alimentos, 2002. **22**(2): p. 111-116.
64. S. Paul and G.S. Mittal, *Dynamics of Fat/Oil Degradation during Frying Based on Optical Properties*. Journal of Food Engineering, 1996. **30**: p. 389-403.
65. C.R. Malacrida and N. Jorge, *Alterations of Soybean Oil and a Mixture of "Dendê" Oil and Soybean Oil (1:1) During the Discontinuous Frying of Chips*. Brazilian Journal of Food Technology, 2003. **6**(2): p. 245-249.



## REFERÊNCIAS

---

66. P.C. Damy and N. Jorge, *Physico-Chemical Determinations of Soybean Oil and Hydrogenated Vegetable Fat During the Discontinuous Frying Process*. Brazilian Journal of Food Technology, 2003. **6**(2): p. 251-257.
67. P.V. Del Ré, *Comportamento de óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados*, in *Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas*. 2003, Universidade Estadual Paulista júlio de mesquita Filho: São José do Rio Preto. p. 121.
68. S. Yamamoto, H. Kurihara, T. Mutoh, X. Xing, and H. Unno, *Cholesterol recovery from inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and cholesterol by aeration at elevated temperatures*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **22**: p. 197-205.
69. E.U. Condon and H. Odishaw, *Handbook of Physics*. 1958, Nova York: Oxford Univ. Press. .
70. J.D. Jackson, *Eletrodinâmica Clássica*. 1983, Rio de Janeiro: Guanabara Dois.
71. J.M. Jewell, *Model for the thermal-optic behavior of sodium borate and sodium aluminosilicate glasses*. Journal of Non-Cryst. Solids 1992. **146**: p. 145-153.