

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAIBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**

FABÍOLA LEITE FRANÇA DIAS DA SILVEIRA

**ANÁLISE FOTOACÚSTICA DA PENETRAÇÃO DO PIROXICAM GEL NA
PELE HUMANA *IN VIVO* POR SONOFORESE COM DIFERENTES TEMPOS
DE APLICAÇÃO**

São José dos Campos, 2006

FABÍOLA LEITE FRANÇA DIAS DA SILVEIRA

**ANÁLISE FOTOACÚSTICA DA PENETRAÇÃO DO PIROXICAM GEL NA
PELE HUMANA *IN VIVO* POR SONOFORESE COM DIFERENTES TEMPOS
DE APLICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientados: Prof. Dr. Daniel Acosta Avalos

São José dos Campos, SP

2006

S588a

Silveira, Fabiola Leite França Dias

Análise fotoacústica da penetração do piroxicam gel na pele humana *in vivo* por sonoforese com diferentes tempos de aplicação./Fabiola Leite França Dias da Silveira. São José dos Campos: Univap, 2006.

1 Disco laser: color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento-Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Pele 2. Géis 3. Absorção cutânea 4. Espectroscopia fotoacústica 5. Ultra-Som I. Avalos, Daniel Acosta, Orient. II. Título

CDU: 615.014.2

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno: *Fabiola*

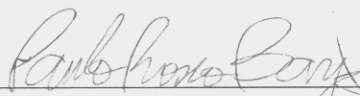
Data: *9/02/2007*

**“ANÁLISE FOTOACÚSTICA DA PENETRAÇÃO DE PIROXICAN GEL NA PELE HUMANA
IN VIVO POR SONOFORESE COM DIFERENTES TEMPOS DE APLICAÇÃO”**

Fabiola Leite França Dias da Silveira

Banca Examinadora:

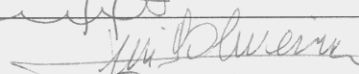
Prof. Dr. **PAULO ROXO BARJA** (UNIVAP)




Prof. Dr. **DANIEL ACOSTA AVALOS** (UNIVAP)



Prof^a. Dra. **CLAUDIA SANTOS OLIVEIRA** (UNIVAP)



Prof. Dr. **LUIZ CARLOS DE MOURA MIRANDA** (INPE)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

DEDICATÓRIA

**A Deus, a meus pais, ao meu marido e
ao meu filho.**

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, não só torcendo, me apoiando, mas jogando no meu time e me ajudando a realizar os méritos deste trabalho;

Agradeço em especial aos **meus pais** que embarcaram comigo nesta aventura, **minha mãe** pela amizade e cooperação nos dias frios no laboratório;

A **Fernanda Marciano, Ana Paula e Flávia** pelo exemplo prático de amizade, atenção, boa vontade e cooperação;

Agradeço a **meu marido** pela paciência;

Agradeço **ao orientador e co-orientador** do trabalho que me guiaram seguramente na jornada.

ANÁLISE FOTOACÚSTICA DA PENETRAÇÃO DO PIROXICAM GEL NA PELE HUMANA *IN VIVO* POR SONOFORESE COM DIFERENTES TEMPOS DE APLICAÇÃO

RESUMO

A técnica fotoacústica é baseada na absorção de luz modulada por uma amostra e na conversão desta energia luminosa em calor, gerando ondas térmicas que se propagam pelo meio em que está inserida a amostra. Esta técnica pode ser aplicada em estudos biológicos. Recentemente foi mostrado que a penetração de cremes através da pele humana, pelo uso da sonoforese, pode ser avaliada usando-se técnica fotoacústica. Foi mostrado que a quantidade de creme que penetra na pele é maior quando é usada a sonoforese do que quando é usada a massagem manual. No presente estudo foi avaliada a penetração do antiinflamatório piroxicam (gel) administrado pela via transdérmica em diferentes tempos de aplicação do US (1 minuto, 2 minuto e 3 minuto). Participaram deste estudo 4 voluntários. As medidas foram realizadas a 17 Hz, utilizando-se uma lâmpada halógena de tungstênio (24V, 250 W) como fonte luminosa e um disco de alumínio de 65 μ m de espessura para o vedamento da célula fotoacústica. Foram obtidos os sinais fotoacústicos do antebraço limpo e do antebraço após aplicação do piroxicam gel por US, e com estes sinais foi estimada a concentração do piroxicam que penetrou na pele. Com o esquema experimental usado, o sinal fotoacústico da pele limpa foi igual para todos os voluntários, em todas as situações, e sempre foi maior que o sinal da pele mais o piroxicam. Para todos os voluntários, foi observado que a concentração do gel não muda com os diferentes tempos de aplicação da sonoforese, implicando que o uso de tempos maiores a 1 min é desnecessário. Também foi observado que a quantidade de creme que penetra depende da pessoa, o que intrinsecamente implica numa dependência no tipo de pele.

Palavras-chave: pele humana, sonoforese, fotoacústica.

**“PHOTOACOUSTIC EVALUATION OF THE PENETRATION OF PIROXICAM
GEL THROUGH IN VIVO SKIN APPLIED WITH PHONOPHORESIS**

ABSTRACT

The photoacoustic technique is based on the absorption of modulated radiation by a sample, and its conversion in pulsed heat that creates thermal waves that propagate through the medium surrounding the sample. This technique can be used in biological studies. Recently it was shown that the penetration of creams through the human skin, by the phonophoresis technique, can be evaluated using photoacoustic techniques. In this way it was showed that the quantity of cream that penetrates the skin is higher when phonophoresis is employed than when manual massage is used. In the present study it was evaluated the penetration of the drug piroxicam (gel) administrated through the skin in different times of phonophoresis application (1 min, 2 min and 3 min). Four voluntaries participate of this study. The measurements were done at 17 Hz, using an halogen lamp of tungsten (24 V, 250W) as light source and an aluminum disk of 65 μm of thickness closing the photoacoustic chamber. The photoacoustic signals of the clean arm and of the same arm after application of piroxicam with phonophoresis were obtained, and with these signals it was estimated the concentration of the piroxicam that penetrates the skin. With the experimental setup used, the photoacoustic signal of the clean skin was the same for all voluntaries, in all situations, and is was always higher than that signal of skin plus piroxicam. In all voluntaries, it was observed that the concentration of the drug does not changed with the different phonophoresis application times, indicating that the use of times higher than 1 min is not necessary. It was also observed that the quantity of drug that penetrates depends of the person, intrinsically meaning a dependency in the type of skin.

Key words: human skin, phonophoresis, photoacoustic technique.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Deslocamento de uma partícula em função da distância e do tempo.....	16
FIGURA 2- Representação das camadas da pele e da tela subcutânea (hipoderme).....	21
FIGURA 3- As quatro camadas da epiderme.....	22
FIGURA 4- Aparelho de ultra-som utilizado (Sonopulse III, Ibramed).....	35
FIGURA 5- Esquema da célula fotoacústica utilizada.....	36
FIGURA 6- Montagem fotoacústica.....	37
FIGURA 7- Mão do voluntário em contato com a célula fotoacústica para a realização das medidas.....	39
FIGURA 8- Aplicação do medicamento por sonoforese.....	40
FIGURA 9- Box-plot para os dados referentes a sonoforese de 1 min do voluntário 1. Na legenda: min1P refere-se aos dados da pele limpa e min1PP refere-se aos dados da pele mais piroxicam.....	43
FIGURA 10- Box-plot para os dados referentes a sonoforese de 2 min do voluntário 1. Na legenda: min2P refere-se aos dados da pele limpa e min2PP refere-se aos dados da pele mais piroxicam.....	44
FIGURA 11- Box-plot para os dados referentes a sonoforese de 3 min do voluntário 1. Na legenda: min3P refere-se aos dados da pele limpa e min3PP refere-se aos dados da pele mais piroxicam.....	45
FIGURA 12- Box plot do $\ln(\text{sinalP}/\text{sinal PP}) \approx X$ em função do tempo de aplicação da sonoforese, para os dados do voluntário 1.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA I- Valores das Profundidades Média e Máxima para os diferentes tecidos nas frequências de 1 e 3 MHz.....	15
TABELA II- Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 1.....	41
TABELA III- Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 2.....	42
TABELA IV- Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 3.....	42
TABELA V- Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 4.....	43
TABELA VI- Valores médios aproximados de X, calculados usando a eq. 6.8, para cada voluntário e para cada tempo de aplicação da sonoforese.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

μt - Comprimento de difusão térmica

μm - Micrômetro

a - Difusividade térmica

e - Efusividade térmica

f - Frequência

Hz - Hertz

kHz - Quilohertz

ln - Logaritmo natural

MHz - Megahertz

mV – Milivolts

PA - Acrônimo para Photoacoustic (Fotoacústica)

PAS - Espectroscopia fotoacústica

PZT - Titanato zirconato de chumbo

US - Ultra-som

V - Volts

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

X – concentração relativa da substância na pele

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. ULTRA-SOM: ABORDAGEM HISTÓRICA E CONCEITUAL.....	14
2.1 Características Gerais das Ondas Ultrasônicas.....	15
2.2 Efeitos Físicos do Ultra-som.....	18
3. A PELE HUMANA.....	20
3.1 A Via Transdérmica para Penetração de Fármacos.....	24
4. SONOFORESE.....	25
5. FOTOACÚSTICA.....	26
5.1 Conceito Histórico e Aplicação da Técnica.....	26
5.2 Produção do Sinal Fotoacústico.....	28
5.3 Comprimento da Difusão Térmica.....	29
5.4 Efusividade Térmica.....	31
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
6.1 Voluntários.....	35
6.2 O Ultra-som.....	35
6.3 Montagem Fotoacústica.....	36
6.4 Metodologia Experimental.....	37
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
8. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXO.....	55

1. INTRODUÇÃO

A aplicação tópica de medicamentos tem sido utilizada para tratamento de diversas patologias. O sucesso e a rapidez do tratamento estão associados com a eficiência de penetração da droga nas camadas internas da pele. O Ultra-som (US) é um recurso terapêutico bastante utilizado na Fisioterapia para o tratamento de diversas condições patológicas, como redução de espasmo muscular e tendinoso, dor, entre outras patologias (KAHN, 2001; BENSON; ELNAY, 1988).

Para que a terapia ultrasônica seja eficaz, são necessários alguns cuidados importantes no que diz respeito à sua aplicação. A eficiência de transmissão de energia ultrasônica pelo ar é muito baixa, por isso, antes da aplicação do US na pele, é necessário que seja colocado um meio de acoplamento no local da incidência do US permitindo a transmissão das ondas do transdutor do aparelho para a pele. É possível otimizar ainda mais o tratamento adicionando drogas a esse meio de acoplamento, ou seja, realizando a Sonoforese, definida por Machet (2002) como “uso do ultra-som para aumentar a absorção percutânea de uma droga”.

Neste tipo de tratamento, uma questão essencial é saber o quanto a sonoforese favorece a penetração ou absorção da droga pela pele após sua aplicação.

Para avaliar este tópico, pode-se utilizar a Técnica Fotoacústica, que se baseia na produção de ondas acústicas numa câmara fechada (câmara fotoacústica). O som é produzido na câmara fotoacústica após algum material absorver radiação modulada. A intensidade do som depende das propriedades térmicas do material absorvedor de radiação e das propriedades térmicas do material que estiver em contato com o absorvedor e não com a radiação. Neste caso uma folha de alumínio é usada como o absorvedor de radiação e a pele humana *in vivo* ficava em contato com a folha no lado oposto ao irradiado. A técnica fotoacústica permite que se selecione a espessura de pele a ser estudada, conforme a frequência de modulação incidente. Nos últimos anos, esta técnica tem sido bastante aplicada em diversas áreas da ciência, particularmente no estudo de temas biológicos e biomédicos (SEHN *et al.*, 2003; BERNENGO *et al.*, 1998).

2. ULTRA-SOM: ABORDAGEM HISTÓRICA E CONCEITUAL

Considera-se US às ondas mecânicas longitudinais com frequências acima de 20 kHz que exigem um meio de propagação para que a energia produzida seja transmitida através de vibrações das moléculas desse meio, produzindo ondas de compressão e rarefação (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

A primeira aplicação prática do US foi em 1917 com a criação de sonares para a detecção de submarinos, utilizando o método pulso-eco. Alguns anos mais tarde, descobriram que o US produzia aumento da temperatura em tecidos biológicos, entre 1930 e 1940 ele foi introduzido na prática médica como um recurso terapêutico, usado particularmente para produzir calor em tecidos profundos.

De 1940 até os dias atuais, o US vem sendo extensamente usado em áreas médicas e industriais, e novos efeitos e aplicações do US vem sendo pesquisados.

O US pode ser classificado basicamente em dois tipos, considerando a frequência: Alta Frequência (de 1 a 3 MHz) e Baixa Frequência (de 20 a 100 kHz). Entretanto, no mercado nacional, o US terapêutico apresenta frequências de 1 ou 3 MHz e as intensidades mais utilizadas na prática clínica variam de 0,01 a 2,0 W/cm² (GUIRRO; GUIRRO, 2002). A duração da terapia não deve ultrapassar 15 minutos e preconiza-se um tempo de aplicação de 1 a 1,3 minutos por cm² (BUCALON, 1990).

Quanto maior a frequência do US, menor a profundidade de penetração das ondas pois a atenuação segue a lei exponencial $I = I_0 e^{-2ax}$, onde I_0 corresponde à intensidade inicial, I é a intensidade após atravessar uma espessura x do meio, e é a base logarítmica, e a , o coeficiente de atenuação do material que depende da frequência do US.

Portanto frequências mais baixas são capazes de atingir estruturas mais profundas e frequências mais altas atingem estruturas mais superficiais (Tabela I) (ROMPE *et al*, 2004; GUIRRO; GUIRRO, 2002; KAHN, 2001).

TABELA I – Valores das Profundidades Média e Máxima para os diferentes tecidos nas frequências de 1 e 3 MHz.

MEIO	Profundidade Média (mm)*		Profundidade Máxima (mm)**	
	1 MHz	3 MHz	1 MHz	3 MHz
Ar (20° C)	2,5	0,8	8,0	3,0
Tendão	6,1	2,0	21,0	7,0
Pele	11,1	4,0	37,0	12,0
Músculo	9,0	3,0	30,0	10,0
Gordura	50,0	16,5	165,0	55,0
Água	11500,0	3833,3	38330,0	12770,0

* Corresponde à profundidade onde se obtém a intensidade incidente (I_0) reduzida 50%

** Corresponde à profundidade onde se obtém a intensidade incidente (I_0) reduzida a 10%

Fonte: GUIRRO & GUIRRO, 2002.

2.1 Características gerais das ondas ultra-sônicas

As ondas US são geradas por transdutores ultra-sônicos, também chamados simplesmente de transdutores. De um modo geral, um transdutor é um dispositivo que converte um tipo de energia em outro. Esse tipo de onda apresenta as mesmas características dos demais tipos de ondas, como comprimento, amplitude, período e frequência (Fig. 1) (TER HAAR, 1987):

- Comprimento de onda (λ): corresponde à distância entre regiões adjacentes de compressão ou de rarefação máxima.
- Amplitude (A): corresponde ao deslocamento máximo que uma partícula experimenta a partir de sua posição de equilíbrio. Descreve a magnitude do distúrbio causado pela onda.
- Período (T): é o intervalo de tempo necessário para que uma partícula realize um ciclo completo de movimento.
- Potência (P): energia (E) total do feixe em um intervalo de tempo (t), expressa em Watts.

- Frequência (f): corresponde ao número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo.

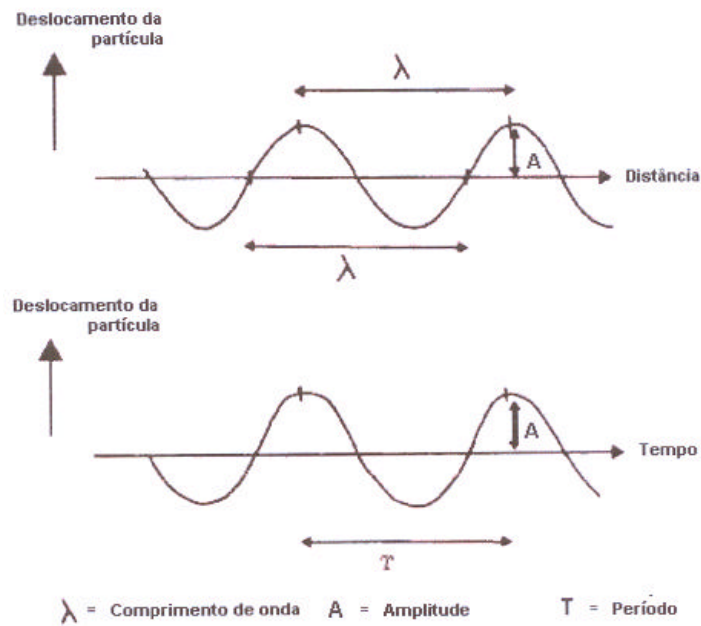


Figura 1. Deslocamento de uma partícula em função da distância e do tempo
 Fonte: Mitrageoti, (2001).

O US terapêutico é produzido por um transdutor composto por um cristal piezoelétrico que converte energia elétrica em energia mecânica sob a forma de oscilações que geram ondas acústicas (MACHET; BOUCAUD, 2002). É importante que as dimensões, principalmente a espessura, desse cristal sejam adequadas de maneira que o cristal possa ressoar na frequência selecionada, alcançando o máximo de vibração (LOW; REED, 2001).

O efeito piezoelétrico foi descoberto por Pierre e Jacques Curie em 1880 e consiste na variação das dimensões físicas de certos materiais sujeitos a campos elétricos. Por exemplo, pressões acústicas que causam variações nas dimensões de materiais piezoelétricos provocam o aparecimento de campos elétricos neles.

Segundo Rodrigues e Guimarães (1998, p.12):

O efeito piezoelétrico é um fenômeno observado em cristais anisotrópicos nos quais deformações mecânicas provocam polarizações elétricas, seguindo determinadas direções (piezo = que comprime, que pressiona). Na propagação longitudinal da onda, as

partículas do meio oscilam para frente e para trás na mesma direção em que a onda estiver trafegando.

Ao se colocar um material piezoelétrico¹ num campo elétrico, as cargas elétricas da rede cristalina interagem com o mesmo e produzem tensões mecânicas.

O cristal, para ser usado como transdutor, deve ser cortado de forma que um campo elétrico alternado, quando nele aplicado, produza variações em sua espessura. Dessa variação resulta um movimento nas faces do cristal, originando as ondas sonoras. Cada transdutor possui uma frequência de ressonância natural, tal que quanto menor a espessura do cristal, maior será a sua frequência de vibração.

O mesmo transdutor que emite o sinal ultra-sônico pode funcionar como detector, pois os ecos que voltam a ele produzem vibração no cristal, fazendo variar suas dimensões físicas que, por sua vez, acarretam o aparecimento de um campo elétrico. Esse campo gera sinais que podem ser amplificados e mostrados em um osciloscópio ou registrador.

Para fins fisioterápicos, segundo Fuirini e Longo (1996), o ultra-som dispõe de 2 formas de ondas geradas pelo transdutor – aplicador. São elas a onda contínua e a onda pulsada.

A onda contínua tem basicamente a finalidade de gerar calor e exercer micromassagem em profundidade. Quando a terapia é aplicada através de ondas contínuas a energia US produz o contínuo aquecimento dos tecidos e o tratamento pode tornar-se intolerável para o paciente, principalmente em casos de traumas mais agudos e recentes, onde o US pode ser bastante eficaz. Uma das causas do aquecimento excessivo é a aplicação feita próxima à superfície dos ossos, onde a vascularização sanguínea subperiosteal é pobre e portanto não contribui para dissipar o calor.

Na forma pulsada são geradas pelo transdutor - aplicador pulsos de ondas de período variável, os quais emitem energia de forma periódica. O uso do US pulsado em vez de US contínuo resulta numa redução média do aquecimento dos tecidos, porém,

¹ O quartzo e a turmalina, cristais naturais, são piezoelétricos.

conservando o mesmo nível instantâneo da estimulação mecânica. Isto permite o aumento dos efeitos não térmicos do US nos tecidos. Conclui-se que há efeitos fisiológicos resultantes de um processo não térmico. Um dos principais efeitos é a alteração da permeabilidade dos vasos (WU *et al*, 1998).

2.2 Efeitos físicos do ultra-som

No efeito mecânico, as ondas US ao penetrarem no tecido vão provocar uma vibração em nível celular (micromassagem ou agitação hidrodinâmica), acelerando a velocidade de difusão de íons e metabólitos através da membrana celular, aumentando a permeabilidade da membrana e causando uma aceleração dos processos osmóticos. O potencial da membrana é alterado, produzindo a sua despolarização. O tecido conectivo e membranas do plasma ficam submetidos ao movimento do fluido no campo US podendo causar efeitos terapêuticos benéficos. O US age como um catalisador físico, acelerando as trocas celulares e reações (FUIRINI; LONGO, 1996).

As vibrações da onda US causam alterações na estrutura molecular por promover compressão e rarefação no meio em que a onda se propaga. A pressão negativa no tecido durante a rarefação pode fazer com que os gases dissolvidos se juntem formando pequenas bolhas ou cavidades no meio líquido (SIMONIN, 1995). A esse fenômeno de geração de energia mecânica através da vibração ultrasônica dá-se o nome de *cavitação*.

Além da cavitação, o US produz outro efeito não-térmico importante, a *microcorrente acústica*, que consiste na circulação constante de fluidos induzida pelo US, através de turbilhões microscópicos ao redor das células, causando uma pressão que pode alterar a estrutura da membrana celular, tanto reversível quanto irreversivelmente, dependendo de sua magnitude. Esta microcorrente apresenta valor terapêutico quando não induz lesão à membrana celular, facilitando a difusão de íons e metabólitos através da membrana (DYSON, 1987; ROMPE, 2004).

O efeito térmico é decorrente da absorção das ondas US pelo tecido, transformando-se em calor. A vibração celular provoca um atrito entre elas, produzindo assim o efeito térmico. A produção de calor é maior nas áreas limítrofe músculo/osso (FUIRINI ; LONGO, 1996). Quando atravessa um tecido, a energia intrínseca do US ao ser absorvida eleva a temperatura local (GUIRRO; GUIRRO, 2002). A quantidade de calor gerado é diferente em cada tipo de tecido e depende de vários fatores como o coeficiente de absorção, a intensidade, a duração do tratamento, o modo ajustado (contínuo ou pulsado) e a técnica de aplicação (HOOGLAND, 1986). O aumento na temperatura promove alterações fisiológicas, como a dilatação de vasos sanguíneos e o conseqüente aumento do fluxo sanguíneo através dos tecidos. Também se pode observar um aumento na extensibilidade das fibras de colágeno (KAHN, 2001; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Tecidos com alto conteúdo protéico (como músculos e tendões) absorvem energia mais rapidamente que aqueles com alto conteúdo de gordura. O fluxo sanguíneo local também interfere no aquecimento, pois o calor produzido no tecido pela interação com o US pode ser dissipado por este fluxo (FUIRINI ; LONGO, 1996).

Entretanto, a produção de calor ocorre em maior parte na interface onde dois tecidos distintos entram em contato como, por exemplo, a região interna do periósteo e a superfície óssea.

No US com feixe contínuo prevalece o efeito térmico, o que não ocorre com o feixe de US pulsado.

Fuirini e Longo (1996) citam diversos efeitos biológicos e terapêuticos decorrentes da utilização das ondas US, dividindo-os em efeitos não-térmicos e térmicos.

- Efeitos não-térmicos

Dentre as mudanças biológicas citadas pelos autores estão: aumento da permeabilidade das membranas e difusão celular, aumento do transporte dos íons de cálcio através das membranas das células, aumento da síntese de colágeno, aumento da elasticidade do colágeno, aumento da taxa de síntese de proteínas, aumento da atividade enzimática das células, promoção da oscilação dos tecidos, movimento dos fluídos e

alterações da circulação nos vasos sanguíneos expostos às ondas estáveis. Dentre os efeitos terapêuticos não – térmicos podemos citar: regeneração tissular e reparação dos tecidos moles, aumento da taxa de síntese de proteínas em fibroblastos, estimulação do calo ósseo, aumento da circulação tissular provendo assim uma melhor drenagem das substâncias irritativas tissulares, normalização do tônus muscular, normalização do PH após a melhoria da circulação nos tecidos, ativação do ciclo do cálcio e estimulação das fibras nervosas aferentes.

- Efeitos térmicos

Mudanças biológicas: Aumento da taxa metabólica dos tecidos que propicia um aumento da necessidade de O_2 aumentando com isso o fluxo sanguíneo, a pressão hidrostática e a permeabilidade das membranas. O US produz também mudanças vasculares concomitantes, aumento da extensibilidade do colágeno, aumenta as propriedades viscoelásticas dos tecidos conjuntivos, diminui a sensibilidade dos elementos neurais, ou seja, eleva o limiar de dor. Diminui também o espasmo muscular e aumenta a taxa de atividade enzimática.

Efeitos terapêuticos: aumento da mobilidade da articulação, aumento da circulação sanguínea, aumento da extensibilidade em tecidos ricos em colágeno, redução de espasmos musculares, alívio da dor e resolução de processos inflamatórios crônicos.

3. A PELE HUMANA

A pele humana é constituída por duas camadas principais: a *epiderme* e a *derme*, apresentando várias funções como a de proteção contra agentes agressores do ambiente (químicos, físicos e biológicos), regulação da temperatura corpórea, percepção de sensações (devido à presença de receptores sensoriais), além de apresentar cerca de 20% do total de água existente no organismo humano. Sua espessura pode variar de acordo com a região do corpo. No abdômen, por exemplo, a epiderme é significativamente mais fina se comparada à pele da palma das mãos (Fig. 2).

A camada mais externa da pele, a epiderme, é composta por quatro camadas de células em diferentes estágios de diferenciação (Fig. 3). A camada mais profunda da epiderme corresponde ao estrato basal (ou camada germinativa), onde novas células são geradas apresentando atividade mitótica intensa. Essa camada é a responsável pela renovação da epiderme, pois as células produzidas nesta camada se deslocam para a superfície mais externa, num período de 21 a 28 dias (GUIRRO; GUIRRO, 2002). Outro papel importante da camada basal é prevenir contra a perda excessiva de água e a absorção de substâncias estranhas ao organismo (MORGANTI *et al.*, 2001).

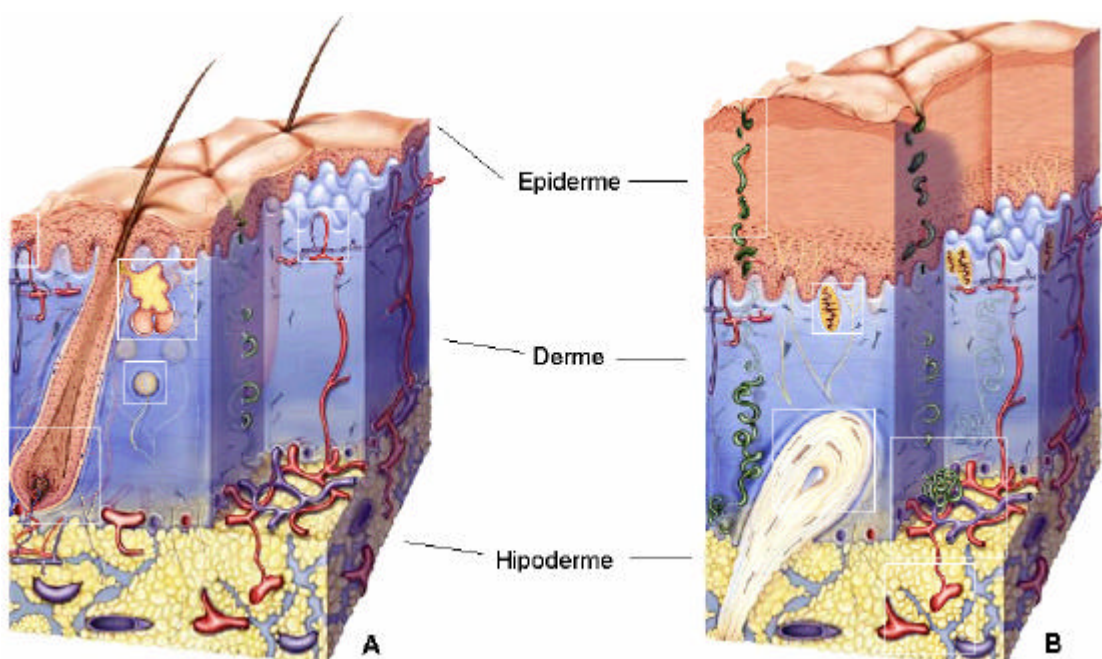


FIGURA 2 – Representação das camadas da pele e tela subcutânea (Hipoderme). Em A, região do abdômen. Em B, região palmar da mão (FONTE: adaptado do site http://www.skin-science.com/_int/_en/topic/topic_sousrub.aspx?tc=SKIN_SCIENCE_ROOT^AN_ORGAN_REVEALED^THE_SKIN_IN_3D&cur=THE_SKIN_IN_3D).

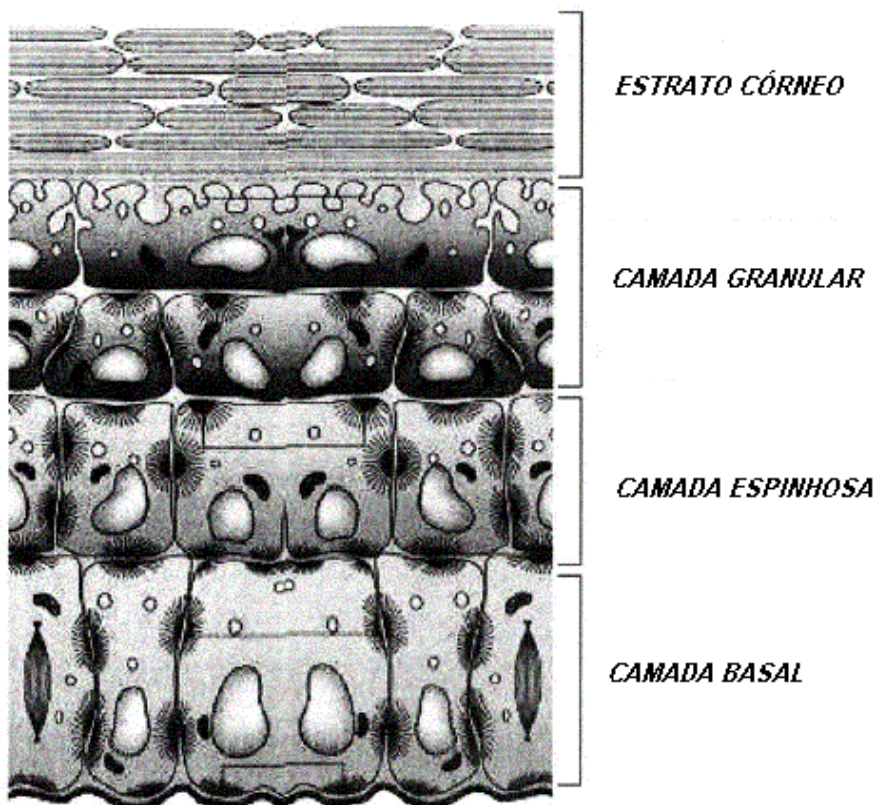


FIGURA 3 – As quatro camadas da epiderme. Fonte: adaptado de (MORGANTI et al., 2001)

A camada espinhosa é a responsável pela manutenção da coesão das células da epiderme o que lhe confere resistência às forças de atrito. Já a camada granulosa (ou granular) é composta por células em estágios iniciais de degeneração, com grânulos queratinosos ou de melanina no interior do citoplasma celular e núcleo celular atrofiado.

A camada granular é formada por várias células achatadas em camadas interligadas constituídas por fibrilas de queratina, sendo mais espessa em algumas regiões do corpo que sofrem maior exposição ao ambiente externo (como a palma das mãos e a planta dos pés) e recebe também a denominação de camada lúcida devido ao seu aspecto claro e homogêneo.

A camada mais externa da epiderme corresponde à camada córnea, ou estrato córneo. Esta camada tem uma espessura de aproximadamente 15 μm e cobre todo o corpo; nela encontram-se as células mortas (corneificadas) cujos citoplasmas foram substituídos por queratina e ceramidas, substâncias responsáveis pela proteção do organismo contra agentes agressores externos e pela regulação contínua da passagem de água de dentro para fora do corpo, mantendo a homeostase, ou seja, o equilíbrio da pele e de todo o corpo. As células desta camada são substituídas freqüentemente por células das camadas mais internas da epiderme, sendo que este processo de renovação celular dura aproximadamente 14 dias (MORGANTI *et al.*, 2001; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

A derme é a camada mais interna da pele. Conecta-se à epiderme através das papilas dérmicas, de delimitações irregulares. É composta por tecido conjuntivo (fibras elásticas e reticulares), glândulas especializadas e receptores sensoriais, sendo suprida por vasos sanguíneos (plexos arteriais e venosos), vasos linfáticos e nervos. Apresenta espessura média de 2 mm, mas varia consideravelmente nas diversas regiões do corpo (Fig. 2) (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Sabe-se que a água desempenha um importante papel químico quando presente na pele, devido a suas propriedades solventes. Nas camadas mais profundas da epiderme sua concentração é de cerca de 60%, participando das reações bioquímicas. Já no estrato córneo, a concentração de água chega a ser por volta de 15%, auxiliando a manter a rigidez e a elasticidade da pele.

Além da água, a pele apresenta aminoácidos e sais provenientes de secreções das glândulas sebáceas e sudoríparas contidas na derme e compostos resultantes da degradação da queratina. Essas substâncias são responsáveis por promover a formação de fatores hidratantes naturais e participam na regulação do pH cutâneo, mantendo-o entre 5,5 e 6,5. Este pH ácido característico da pele humana também auxilia na proteção contra fungos, bactérias e outros agentes passivos de causar infecções (MORGANTI *et al.*, 2001).

3.1 A Via Transdérmica para Penetração de Fármacos

A via transdérmica para aplicação de um fármaco consiste na administração de agentes terapêuticos através da pele saudável para a promoção de efeitos sistêmicos (KANIKKANNAN *et al.*, 2000). É uma via que oferece muitas vantagens quando comparada a outros meios de administração de drogas ao ser humano. Ela elimina a dor associada às injeções, por exemplo, diminuindo também a possibilidade de infecções. Se comparada à administração oral, exclui a possibilidade de degradação do fármaco pelo trato digestivo e a eliminação hepática, podendo manter a droga por mais de sete dias no organismo, além de ser facilmente aceita pelos pacientes (MITRAGOTRI, 2001; MACHET; BOUCAUD, 2002; JOSHI; RAJE, 2002).

Esse tipo de aplicação também apresenta desvantagens, pois a pele age como uma barreira, possuindo baixa permeabilidade, o que dificulta a penetração de substâncias (MITRAGOTRI *et al.*, 2001).

Segundo Morganti *et al* (2001), a função mais importante da pele humana é agir como uma barreira limitando a perda de água, eletrólitos e outros constituintes do corpo e barrar a absorção percutânea de moléculas nocivas ou indesejáveis do ambiente externo. Essa função é atribuída principalmente ao estrato córneo, impedindo a penetração de compostos altamente hidrofóbicos. Por outro lado, pelo fato do mecanismo de penetração ser difusivo, o papel do estrato córneo como uma barreira está intimamente relacionada ao grau de hidratação desta camada da pele. Um aumento na concentração de água na pele corresponde a um aumento na permeabilidade de compostos topicamente aplicados. Deste modo, o nível de hidratação do estrato córneo é um dos fatores que mais influencia na penetração de substâncias aplicadas e este nível pode variar devido a vários fatores como a idade, integridade cutânea e região do corpo.

Para otimizar a permeabilidade cutânea, favorecendo a penetração de drogas através desta, pode-se recorrer a métodos físicos, como a iontoforese (que consiste na utilização de uma corrente elétrica contínua para administrar drogas ionizadas a tecidos superficiais) e a sonoforese (utilização do US para otimizar a penetração de drogas através da pele íntegra) (KANIKKANNAN *et al.*, 2000).

4. SONOFORESE

A sonoforese (também conhecida por fonoforese) consiste na utilização do US para favorecer a penetração de agentes farmacologicamente ativos através da pele intacta (MACHET; BOUCAUD, 2002; JOSHI; RAJE, 2002). A sonoforese é um recurso amplamente utilizado na fisioterapia. É tida como um método eficiente no sentido de facilitar a introdução de substâncias de uso tópico (ROMPE *et al*, 2004)

Mas o mecanismo pelo qual o US pode otimizar a penetração percutânea de uma substância é complexo. Ao interagir com um tecido biológico, o US gera diversos mecanismos potenciais que podem favorecer a penetração transdérmica de uma substância, como aquecimento, cavitação e microcorrente acústica (MEIDAN *et al.*, 1999; HOOGLAND, 1986; ROMPE *et al*, 2004).

Segundo Machet e Boucaud (2002), vários estudos têm sido feitos com o intuito de quantificar o aumento na permeabilidade cutânea induzida pelo US. O que varia entre esses estudos são as condições do US e as amostras utilizadas, ou seja, o uso do modo contínuo ou pulsado, a duração e a intensidade da aplicação e as características das amostras (se são epidermes isoladas, de espessuras controladas, ou epiderme e derme juntas). Para avaliar a permeabilidade, os autores utilizaram técnicas diversas como a biopsia, a dosagem sanguínea do medicamento administrado, entre outras (ROMPE *et al*, 2004).

A eficiência da sonoforese depende das características da substância a ser aplicada. A absorção do US depende do peso molecular e das propriedades físicas da substância. Quanto maior o peso molecular, maior o conteúdo protéico e, portanto maior a atenuação do US (MEIDAN *et al.*, 1999). Benson e McElnay (1988) analisaram várias formulações tópicamente disponíveis (como corticoesteróides, analgésicos, anestésicos locais e vasodilatadores) em relação à capacidade de transmissão da energia ultra-sônica, sendo que as formulações na forma de gel apresentaram uma porcentagem de transmissão maior comparado ao medicamento e ao unguento.

A dosimetria do US adequada para a realização da sonoforese é bastante diversificada, variando de autor para autor. Em seu estudo, Meidan *et al* (1999) fazem um levantamento bibliográfico a respeito de trabalhos realizados com sonoforese. Eles

citam diversos autores, cada qual analisando a aplicação *in vitro* e *in vivo* de fármacos distintos (como, por exemplo, insulina, ácido salicílico, digoxina, hidrocortisona, manitol, entre outros). As intensidades utilizadas variaram de $0,17 \text{ W/cm}^2$ a 3 W/cm^2 e as frequências de US de 48 kHz a 16 MHz no modo contínuo, havendo poucos relatos utilizando o US no modo pulsado.

Outra observação feita por Meidan *et al* (1999) é o fato de que na maioria dos trabalhos publicados a respeito da sonoforese, os autores não trazem os valores de intensidade, preocupando-se apenas em citar a frequência e o modo do aparelho de US utilizado.

No presente estudo, optou-se por utilizar a intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ e frequência de 3 MHz no modo contínuo, o que permite atingir tecidos mais superficiais promovendo aquecimento satisfatório.

5. FOTOACÚSTICA

Para a caracterização de qualquer material, diversas propriedades físicas podem ser consideradas, incluindo as propriedades térmicas. As técnicas fototérmicas são utilizadas para a caracterização térmica de diversos materiais, como cristais, líquidos, gases e também materiais biológicos (MANDELIS *et al.*, 1997 *apud* GUTIÉRREZ-JUÁREZ *et al.*, 2002).

5.1 Contexto histórico e aplicações da técnica

Descoberto por Alexander Graham Bell em 1880, o efeito fotoacústico foi considerado apenas como uma curiosidade durante quase um século, tendo uma utilização limitada, na década de 1930, na detecção de poluentes em gases. A partir da década de 1970, a técnica fotoacústica (PA) ganhou impulso com a publicação do modelo de Rosencwaig e Gersho (1976) para o sinal fotoacústico em amostras sólidas (ROSENCWAIG, 1980).

Nas últimas décadas, a PA tem sido aplicada num amplo número de estudos em diversas áreas da ciência, sendo hoje considerada uma importante técnica de análise e caracterização de materiais (VARGAS; DA SILVA; MIRANDA, 2005)

A técnica fotoacústica baseia-se na produção de uma onda acústica em uma câmara (célula) fechada contendo ar em contato com uma amostra exposta à luz modulada ou pulsada. Para isso, a luz incidente passa por um modulador (*chopper*) que envia um sinal de referência a um amplificador síncrono (*lock-in*). Como a amostra é ciclicamente aquecida pela absorção da luz modulada, ocorre um fluxo de calor periódico para a camada de ar da célula, provocando nesta camada uma variação da temperatura com a mesma frequência de modulação da luz incidente (ROSENCWAIG, 1980).

De acordo com o modelo de Rosencwaig e Gersho para o efeito fotoacústico (o chamado *modelo do pistão acústico*), apenas uma fina camada de gás, na vizinhança da amostra, responde termicamente às flutuações de temperatura da amostra. Esta camada sofre um processo cíclico de expansão e contração, funcionando como um pistão vibratório sobre o resto da coluna de gás, gerando um sinal acústico, captado por um microfone no interior da célula. Este sinal é enviado para o amplificador síncrono (*lock-in*), cuja função é amplificar as componentes do sinal que possuem a mesma frequência de modulação do sinal de referência, eliminando, portanto os ruídos indesejáveis. A seguir, o sinal amplificado é enviado para um microcomputador onde é processado e analisado.

O sinal fotoacústico permite realizar medidas em função: I) do tempo (varredura temporal); II) do comprimento de onda da luz incidente (espectroscopia fotoacústica); e III) da frequência de modulação. A técnica também permite estudar o chamado perfil de profundidade de uma amostra (BERNENGO *et al.*, 1998). Além disso, a técnica fotoacústica oferece algumas vantagens se comparada a outras técnicas de análise existentes, pois permite o estudo de meios opacos, é um método não-invasivo e que não exige uma preparação trabalhosa e prolongada da amostra (ROSENCWAIG, 1980). A camada da amostra estudada por fotoacústica depende da frequência de modulação utilizada. Para uma frequência de 17 Hz, é possível realizar medidas correspondentes a uma profundidade de cerca de 30 μm nas medidas em pele (BERNENGO *et al.*, 1998).

Estudos aplicando técnicas fototérmicas na dermatologia são recentes e englobam pesquisas relacionadas à influência da hidratação do estrato córneo nas propriedades térmicas da pele bem como a aplicação de substâncias (como cosméticos e medicamentos) na pele humana e sua conseqüente penetração (BERNENGO *et al.*, 1998; SEHN *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2003).

Muitos materiais biológicos alvos de estudos como membranas, amostras ósseas ou estruturas de tecidos são insolúveis e biologicamente possuem função semelhante à de uma matriz sólida, o que dificulta a obtenção de dados ópticos por técnicas convencionais uma vez que, quando solubilizados, estes materiais são significativamente alterados.

A espectroscopia fotoacústica possibilita a obtenção de dados ópticos nestes tecidos biológicos intactos e também em amostras opticamente opacas, constituindo assim uma importante ferramenta de pesquisa e de diagnóstico na biologia e medicina (ROSENCWAIG, 1980).

Rosencwaig (1980) afirma que, para uma análise apropriada em tecidos biológicos, é preciso ter os dados espectrais do tecido normal – dados estes que não eram avaliados por métodos convencionais devido ao espalhamento da luz e aos efeitos da opacidade no tecido. Estas dificuldades levaram ao uso da técnica fotoacústica para obtenção de tais dados. Desde então, começou o estudo da epiderme e, em particular, do estrato córneo, com experimentos cujos resultados demonstram a importância potencial da espectroscopia fotoacústica (PAS) em estudos médicos de tecidos humanos.

Experiências mostram que a PAS pode ser utilizada para monitorar a cinética de desidratação da pele, através da análise do espectro fotoacústico em função do tempo (ROMPE *et al.*, 2003), bem como avaliar a cinética da absorção de radiação no sistema “pele + protetor solar” (ANJOS *et al.*, 2003).

5.2 Produção do sinal fotoacústico

A radiação modulada é absorvida pela amostra e convertida em calor. O calor modulado produzido na amostra difunde-se até o gás em contato com esta, dentro da célula fotoacústica. O modelo apresentado por Rosencwaig e Gersho para a difusão térmica (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976) assume que a camada de gás mais próxima da amostra sofre expansão e contração periódicas, atuando como um pistão vibratório no restante do gás. As variações de pressão assim produzidas geram ondas acústicas captadas pelo microfone acoplado à célula fotoacústica.

O modelo unidimensional de Rosencwaig-Gersho (RG) considera que as espessuras do gás e do suporte na célula fotoacústica são muitas maiores que seus comprimentos de difusão térmica. Como as ondas que propagam o fluxo de calor modulado são exponencialmente atenuadas ao longo da distância de propagação, a uma distância $2\pi\mu_g$ a modulação da temperatura no gás é desprezível. Assim, pode-se assumir que apenas a camada de gás localizada a uma distância x da amostra não superior a $2\pi\mu_g$ responderá termicamente à modulação da temperatura na superfície da amostra. Deste modo, segundo o modelo RG somente a camada de gás mais próxima da amostra sofre expansão e contração periódicas, atuando como um pistão vibratório no resto do gás (BARJA, 1996).

A variação de pressão na câmara fotoacústica é então calculada supondo-se que o gás é ideal e que a camada de gás com espessura $2\pi\mu_g$ sofre expansão isobárica, comprimindo adiabaticamente o resto do gás.

5.3 Comprimento de difusão térmica

Quando a luz incidente é absorvida pela amostra, parte dessa luz se converte em calor, que gera modulação de temperatura e, conseqüentemente, expansão e contração periódicas na camada de gás fronteira. Em amostras sólidas, o calor modulado produzido na amostra precisa atravessá-la e chegar até sua superfície antes de gerar as ondas sonoras (que serão propagadas pelo gás em contato com a amostra). Como a amplitude das ondas térmicas (que propagam o fluxo de calor modulado) diminui exponencialmente com a distância, só a parcela de radiação absorvida a uma distância de até um *comprimento de difusão térmica* (μ_s) da superfície será responsável pela componente térmica do sinal fotoacústico.

O comprimento de difusão térmica é dado por

$$m = \sqrt{\frac{a}{pf}}$$

(1.0)

onde α é a difusividade térmica e f a frequência de modulação.

Para se classificar uma amostra quanto ao regime térmico, pode-se comparar sua espessura l ao comprimento de difusão térmica:

- quando $l > \mu_s$, a amostra é termicamente grossa;
- quando $l < \mu_s$, a amostra é termicamente fina.

O efeito térmico será observado independente da frequência de modulação, mas a frequência determinará se a amostra é termicamente grossa ou fina. Para as frequências normalmente utilizadas em medidas de pele (dezenas de Hertz), o comprimento de difusão térmica é bem menor que a espessura das amostras; neste caso, temos amostras termicamente grossas.

Como o comprimento de difusão térmica varia conforme a frequência de modulação aplicada, pode-se estudar o perfil de profundidade de uma amostra avaliando o sinal fotoacústico para diferentes frequências de modulação; assim, a variação na permeabilidade de membranas biológicas pode ser avaliada através da técnica fotoacústica, analisando-se a resposta do tecido a diferentes frequências de modulação (BERNENGO *et al.*, 1998).

5.4 Efusividade térmica

A efusividade térmica (e) é o parâmetro físico mais relevante para estudos que envolvem processos de aquecimento ou resfriamento de uma amostra. Ela mede essencialmente a impedância da amostra, ou seja, a habilidade da amostra em trocar calor com o meio (BALDERAS-LOPEZ *et al.*, 1995).

A efusividade térmica e de uma amostra é definida pela equação

$$e = \sqrt{krc}$$

(1.1)

onde k , r e c são respectivamente condutividade térmica, densidade e calor específico.

Em nossa configuração experimental, a região sob estudo é posicionada sobre um disco fino de papel alumínio. O alumínio é opticamente opaco e termicamente fino na frequência usada. Neste caso, a amplitude do sinal fotoacústico pode ser escrita como (ROSENCWAIG, 1980):

$$\text{SINAL PA} \approx \frac{Ym_b}{2a_g k_b} = \frac{Y\sqrt{a_g}}{e_b p f} \quad (1.2)$$

Na equação acima, Y é uma constante, f é a frequência de modulação, μ_b é o comprimento de difusão térmica da base, a_g é o coeficiente de difusão térmica do gás, k_b é a condutividade térmica da base, a_g é a difusividade térmica do gás e e_b é a efusividade térmica da base. Entendemos aqui por base ao material que se encontra logo após a folha de alumínio que fecha a câmara fotoacústica e por gás ao ar dentro da câmara fotoacústica. Podemos observar na eq. 1.2 que neste caso o sinal PA não depende das propriedades térmicas do absorvedor de radiação, pelo qual este regime experimental é conhecido como fotoacusticamente opaco, pois o sinal só depende das propriedades térmicas da base e do gás.

Para analisar as propriedades térmicas da pele, é necessário um modelo de condução de calor para este sistema. Recentemente, Gutiérrez-Juárez *et al* (2002) propuseram um modelo para determinar a efusividade térmica de misturas binárias, assumindo que a efusividade térmica efetiva comporta-se como a condutividade térmica para um sistema de duas fases misturadas aleatoriamente. Isto significa que, se k_1 e k_2 são a condutividade dos meios 1 e 2, respectivamente, então a condutividade efetiva do sistema é:

$$k = k_1 (k_2 / k_1)^X \quad (1.3)$$

onde X é a concentração de 2 no meio 1.

No trabalho de Gutiérrez-Juárez *et al.* (2002), uma mistura de água e acetona foi usada. Assumindo que $(rc)_1$ e $(rc)_2$ são similares, a efusividade efetiva é obtida por

$$e = e_1 (e_2 / e_1)^X \quad (1.4)$$

onde e_1 e e_2 são as efusividades da água e da acetona, respectivamente, enquanto X é a concentração de 1 no meio 2.

No presente estudo, um modelo similar de fase dupla como o obtido em (1.4) foi utilizado. O sistema binário foi composto pela substância aplicada e a pele humana. A concentração relativa da substância utilizada na pele é então dada por

$$X = \frac{\log(e_m / e_p)}{\log(e_s / e_p)} \quad (1.5)$$

onde e_m é a efusividade térmica mensurada do sistema pele mais substância aplicada, e_p é a efusividade da pele limpa, e_s é a efusividade da substância aplicada e \log é a função logaritmo em qualquer base numérica. Neste trabalho vamos escolher o logaritmo decimal (base 10). Como e_s e e_p são constantes, e como $Sinal\ PA \approx 1/e_b$ então:

$$X \approx \log \left(\frac{SinalPA_P}{SinalPA_M} \right) \quad (1.6)$$

No presente trabalho, associou-se a mudança no nível do sinal fotoacústico a alterações na efusividade térmica do sistema pele + produto aplicado. De acordo com Gutiérrez-Juárez *et al.* (2002), tais alterações de efusividade térmica refletem a mudança na concentração relativa do produto na pele. Deste modo, foi realizado o monitoramento do nível de sinal fotoacústico para avaliar possíveis mudanças na concentração do produto na pele após a aplicação do medicamento, tanto por massagem quanto por terapia ultra-sônica.

Anjos (2004) realizou estudo que teve como objetivo avaliar a concentração de piroxicam na pele humana após sua administração por sonoforese nos modos contínuo e pulsado, utilizando a fotoacústica como técnica de diagnóstico. Neste estudo, a sonoforese foi ministrada na antebraço de cada voluntário: I) com o US no modo

contínuo numa frequência de 3MHz, intensidade de 1 W/cm², por um minuto; II) com o US no modo pulsado, mesmos valores de frequência e intensidade, por 5 minutos. O sinal fotoacústico do antebraço limpo foi coletado, com as demais medidas sendo realizadas logo após cada aplicação do piroxicam. O sinal fotoacústico pós-sonoforese, para ambos os modos de aplicação apresenta amplitude inferior à do sinal fotoacústico da pele limpa, além disso, a sonoforese no modo pulsado apresenta amplitude de sinal fotoacústico inferior à do sinal coletado após a sonoforese no modo contínuo. O cálculo das concentrações relativas indica maior concentração do produto na epiderme após realização da sonoforese no modo pulsado.

Rompe (2004) demonstrou a viabilidade do uso da fotoacústica na avaliação da penetração do antiinflamatório diclofenaco dietilamônio administrado pela via transdérmica e a verificação das possíveis diferenças na penetração deste medicamento aplicado: a) o US de 3MHz, intensidade de 0,5W/cm² no modo contínuo; b) por aplicação tópica (massagem) em amostras de pele *in vivo*, avaliando em qual dos dois tipos de aplicação (US contínuo e massagem) a concentração do fármaco no estrato córneo foi maior. Participaram do estudo três voluntários. As medidas foram realizadas a 17 Hz, utilizando uma lâmpada halógena de tungstênio (24V, 250W) como fonte luminosa e um disco de alumínio de 65µm de espessura para o vedamento da célula. O sinal era registrado através de uma varredura temporal de 100 pontos. Foram feitas seqüências de medidas na seguinte ordem: I) Alumínio; II) Mão limpa; III) Mão após aplicação manual do diclofenaco; IV) Mão após aplicação do diclofenaco por US. Para todos os voluntários, as medidas mostraram que o sinal referente à mão limpa apresentou maior amplitude, seguido do sinal referente à aplicação manual e do sinal obtido após sonoforese, o que corresponde a uma maior concentração relativa do medicamento após a aplicação por sonoforese.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Voluntários

Participaram do estudo 4 voluntárias, do sexo feminino, com idade entre 21 e 32 anos, sendo 3 de cor branca e uma de cor negra. As voluntárias eram membros do Grupo de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), e estavam cientes e de acordo com os procedimentos do estudo segundo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO), devidamente assinado.

Os critérios de inclusão para a participação no estudo foram:

- a) Não apresentar ferida, ulceração ou qualquer tipo de alteração dermatológica na região a ser aplicado o medicamento;
- b) Não apresentar alergia a qualquer um dos componentes da fórmula do medicamento utilizado;
- c) Não possuir implantes metálicos na região do braço;
- d) Não apresentar queixas álgicas estomacais (como azia, gastrite e/ou úlcera gástrica).

6.2 O Ultra-Som

Foi utilizado o aparelho de Ultra-som Sonopulse III (Fig. 4), da marca Ibramed (Brasil), microcontrolado com frequência de operação de 3 MHz, modo contínuo.



FIGURA 4: Aparelho de Ultra-som utilizado (Sonopulse III, Ibramed).

A intensidade foi mantida fixa em $0,5 \text{ W/cm}^2$ nas aplicações de US deste estudo. O tempo de aplicação foi fixado em um, dois ou três minutos, para posterior comparação. A área de aplicação do US foi de aproximadamente 3 cm^2 .

6.3 Montagem Fotoacústica

Foi utilizada na montagem uma lâmpada de tungstênio halógeno de 24 V – 250W, um ventilador para a lâmpada de 115 V, com uma fonte alimentadora para a lâmpada de 24 V. A luz da lâmpada foi modulada usando um modulador mecânico (Stanford Research Systems – SRS, modelo SR540). A luz modulada foi focada na posição da célula fotoacústica através de duas lentes. A célula fotoacústica usada foi uma célula convencional de latão (fabricada na UNIVAP), com microfone de eletreto comercial (Fig. 5). Um disco de alumínio de $65 \mu\text{m}$ de espessura foi usado para o vedamento de uma das faces da célula, e a outra face estava fechada com uma janela de vidro. O sinal do microfone foi lido num amplificador síncrono (*lock-in*, Stanford Research Systems – SRS, modelo SR530), separando o sinal em amplitude e fase. Estes parâmetros do lock-in eram lidos por um microcomputador onde os dados eram armazenados para posterior análise. A figura 6 mostra uma foto do esquema experimental.

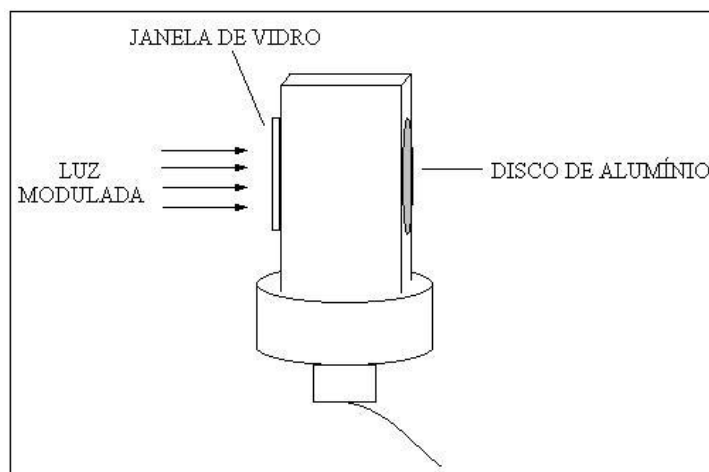


FIGURA 5: Desenho da célula fotoacústica usada neste trabalho.

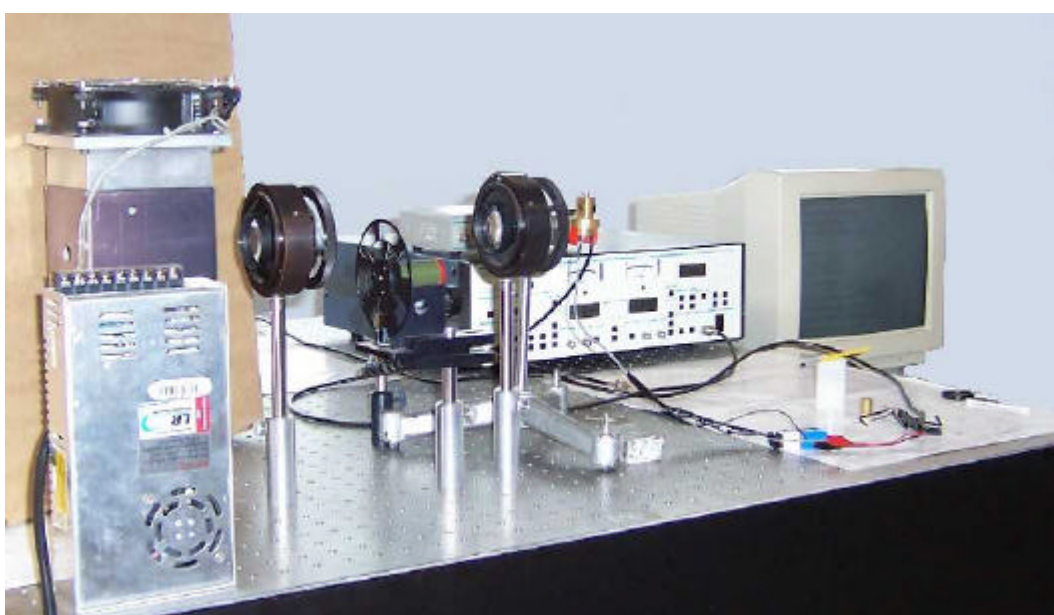


FIGURA 6: Fotografia do esquema experimental usado. Observa-se da esquerda para a direita: a lâmpada, o modulador mecânico, as lentes, a célula fotoacústica, o amplificador síncrono e o computador ligado ao amplificador.

FONTE: Grupo de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

6.4 Metodologia experimental

O fármaco utilizado no estudo foi o piroxicam gel 0,5 mg (Laboratório Pfizer®), conhecido no ambiente clínico por seus efeitos antiinflamatórios. A quantidade administrada foi de 3g de gel, segundo a bula do fármaco divulgada pelo fabricante.

Piroxicam é um agente antiinflamatório não esteróide (AINE) útil no tratamento de condições inflamatórias. Embora o modo de ação para este fármaco não seja precisamente conhecido, o piroxicam inibe a síntese e a liberação das prostaglandinas através da inibição reversível da enzima ciclooxigenase.

Baseado em vários estudos de farmacocinética e de distribuição tecidual em ratos e em cães, piroxicam gel 0,5% é contínua e gradualmente absorvido desde a pele até a musculatura ou líquido sinovial. Em adição, o equilíbrio de absorção entre a pele e o músculo ou líquido sinovial parece ser alcançado rapidamente em poucas horas após a aplicação. Em um estudo de doses múltiplas de piroxicam gel 0,5%, aplicado duas vezes ao dia (dose total diária equivalente a 20 mg) por 14 dias, os níveis plasmáticos aumentaram lentamente durante o decorrer do tratamento, chegando a 200 ng/mL no 4º dia. Os níveis plasmáticos de *steady state* (estado de equilíbrio) foram em média entre 300 e 400 ng/mL, e os valores médios permaneceram abaixo de 400 ng/mL, mesmo no 14º dia de tratamento. Os níveis de piroxicam gel observados no *steady state* (estado de equilíbrio) foram aproximadamente 5% daqueles observados em pacientes recebendo doses orais similares (20 mg/dia). A meia-vida de eliminação neste estudo foi calculada em aproximadamente 79 horas. Em humanos piroxicam gel demonstrou ser bem tolerado na pele de voluntários com sensibilidade cutânea.

A meia-vida sérica de piroxicam é de aproximadamente 50 horas. Feldene® Gel 0,5% (piroxicam) é indicado somente para uso externo.

Recomenda-se aplicar 1 (um) grama (aproximadamente 1 cm) de Feldene® Gel 0,5% (correspondente a 5 mg de piroxicam) na área afetada, de três a quatro vezes ao dia. Espalhar completamente o gel sobre a pele, sem deixar qualquer resíduo.

O sinal fotoacústico foi registrado através de uma varredura temporal de 100 pontos (correspondente a 300 segundos), numa frequência de 17 Hz, com a sensibilidade do amplificador síncrono ajustada de acordo com o nível de sinal (geralmente foi de 5 mV).

Para uma lâmina de alumínio com espessura de 65 µm, a frequência de corte é de aproximadamente 7 kHz. Ou seja: para frequências de modulação maiores, o sinal fotoacústico corresponderia somente à folha de alumínio. Neste estudo, a frequência utilizada foi mais baixa, de modo que a folha de alumínio pode ser considerada termicamente fina.

Após a observação do nível de sinal com a folha de alumínio, as medidas foram feitas com o antebraço limpo, ou seja. O voluntário lavou o antebraço com sabão em água corrente e depois o limpou com uma toalha de papel embebida em álcool, e era devidamente posicionado com o antebraço direito sobre a célula fotoacústica para que a medida do sinal fosse realizada (Fig. 7). Os cuidados com o posicionamento e o conforto do voluntário eram priorizados para que fosse mantida a estabilidade do braço na célula e a conseqüente redução do nível de ruídos durante a obtenção do sinal fotoacústico (ROMPE *et al*, 2004

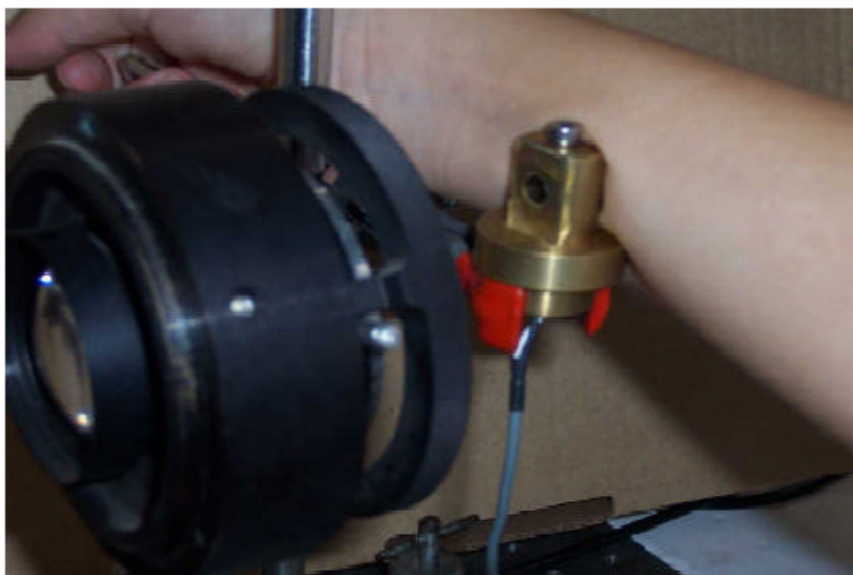


FIGURA 7 - Braço do voluntário em contato com a célula fotoacústica para a realização das medidas.

FONTE: Grupo de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

Para a aquisição do sinal foi utilizado o programa *Sinal530*, desenvolvido no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do INPE.

Após este procedimento, eram realizadas as aplicações da sonoforese, com a dosagem do piroxicam gel de 3 g, US de 3 MHz, modo contínuo, intensidade de 0,5 W/cm². O antebraço direito foi escolhido para a aplicação do fármaco. Três diferentes locais do antebraço foram escolhidos para a aplicação do US com 1, 2 e 3 min, através de movimentos circulares do cabeçote (Fig. 8). Após a aplicação com US, repetia-se o procedimento de medida do sinal fotoacústico. As medições dos três tempos de sonoforese foram feitas no mesmo dia em todos os voluntários. As repetições destas medidas eram feitas após 24 h. O intervalo de 24 h foi escolhido porque ele corresponde com o tempo de vida média do medicamento no organismo, segundo consta na bula do medicamento divulgada pelo fabricante.



FIGURA 8: Aplicação do medicamento por sonoforese (Ultra-Som Ibramed, 3MHz, modo contínuo, intensidade de 0,5 W/cm²).

FONTE: Grupo de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

Todos os sinais eram coletados pelo amplificador síncrono e enviados ao computador. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *Microcal Origin 6.0*[®].

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas quatro voluntárias foram feitas 10 repetições de cada medida, sendo que algumas foram excluídas por problemas experimentais após a medição. As tabelas II, III, IV e V mostram os sinais medidos para cada voluntária.

Tabela II: Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 1.

	Tempo					
	1 min (N=10)		2 min (N=10)		3 min (N=8)	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP
Pele limpa	0,0023	0,00053	0,0022	0,00052	0,0024	0,00057
Pele + Pir	0,0019	0,00034	0,0018	0,00037	0,0018	0,00039

N: número de medições feitas

Tabela III: Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 2.

	Tempo					
	1 min (N=10)		2 min (N=10)		3 min (N=9)	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP
Pele limpa	0,0020	0,00059	0,0022	0,00056	0,0022	0,00042
Pele + Pir	0,0017	0,00044	0,0019	0,00041	0,0020	0,00033

N: número de medições feitas

Tabela IV: Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 3.

	Tempo					
	1 min		2 min		3 min	
	(N=10)		(N=11)		(N=9)	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP
Pele limpa	0,0021	0,00059	0,0021	0,00062	0,0024	0,00059
Pele + Pir	0,0017	0,00044	0,0018	0,00042	0,0019	0,00031

N: número de medições feitas

Tabela V: Valor médio e desvio padrão do sinal fotoacústico (em V) na pele limpa e na pele + piroxicam, em função do tempo de aplicação da sonoforese, para o voluntário 4.

	Tempo					
	1 min		2 min		3 min	
	(N=7)		(N=6)		(N=5)	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP
Pele limpa	0,0025	0,00055	0,0024	0,00036	0,0022	0,0004
Pele + Pir	0,0020	0,00032	0,0022	0,00033	0,0019	0,00023

N: número de medições feitas

As figs. 9, 10 e 11 mostram a distribuição das medidas experimentais para cada tempo usado no voluntário 1, através de diagramas de caixa (box-plots).

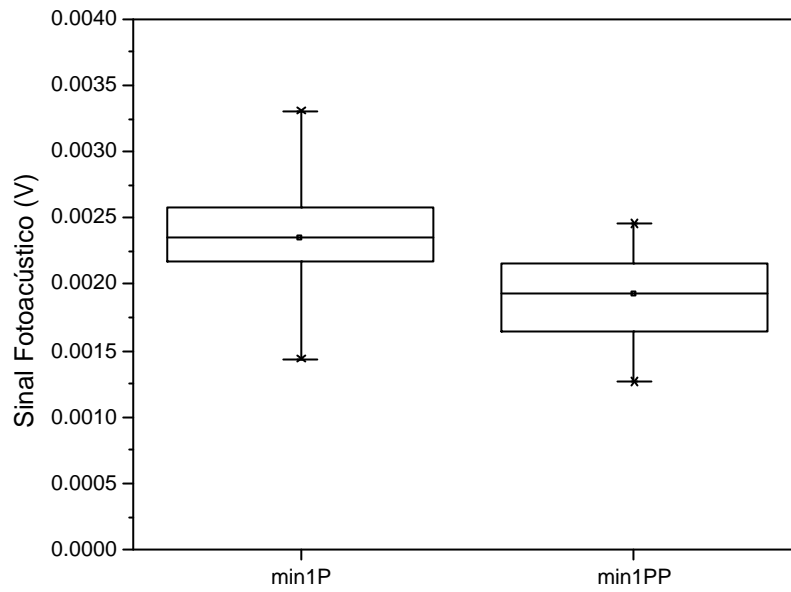


Figura 9: Box-plot para os dados referentes a sonoforese de 1 min do voluntário 1. Na legenda: min1P refere-se aos dados da pele limpa e min1PP refere-se aos dados da pele mais piroxicam.

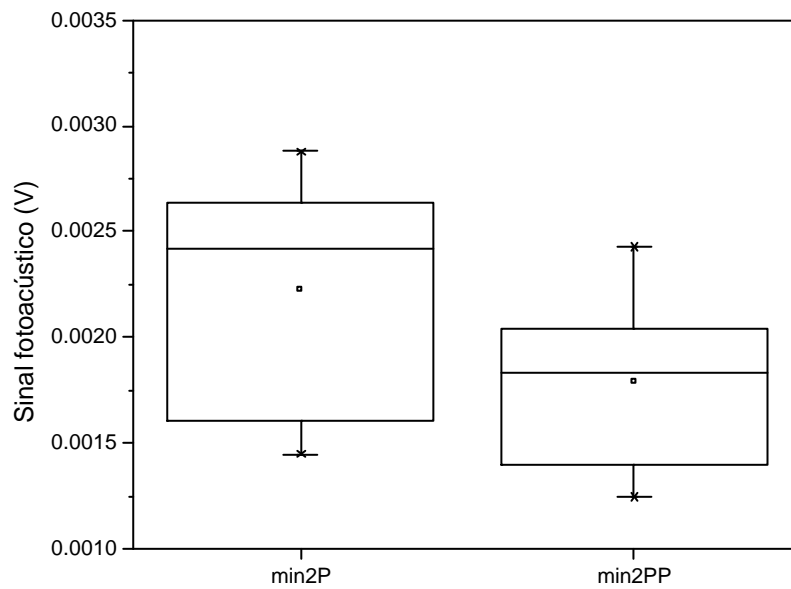


Figura 10: Box-plot para os dados referentes a sonoforese de 2 min do voluntário 1. Na legenda: min2P refere-se aos dados da pele limpa e min2PP refere-se aos dados da pele mais piroxicam.

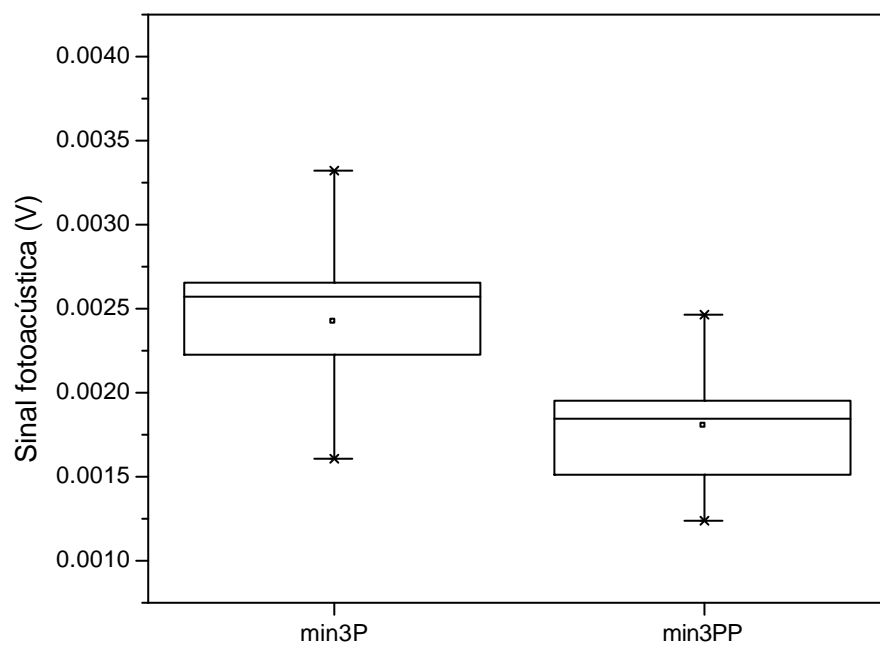


Figura 11: Box-plot para os dados referentes a sonoforese de 3 min do voluntário 1. Na legenda: min3P refere-se aos dados da pele limpa e min3PP refere-se aos dados da pele mais piroxicam.

Os gráficos para os outros voluntários são semelhantes, e por isso não serão apresentados. Pode-se observar nas tabelas II – V e nas figs. 9 a 11, que o sinal da pele limpa (P) é significativamente maior que o sinal da pele + piroxicam (PP). Para afirmar isto, foi realizado um teste de t pareado bicaudal entre os dados da pele limpa e os dados da pele + piroxicam, para cada tempo de aplicação. Em todos os casos $p < 0,05$, significando que realmente o sinal da pele limpa sempre foi maior que o sinal da pele + piroxicam (afirmação feita com uma significância de 5%). A interpretação para isto se encontra na eq. 1.6, ou seja, $X \approx \log\left(\frac{SinalPA_P}{SinalPA_{PP}}\right)$. Como a concentração X é um número real positivo, então o argumento dentro do logaritmo tem que ser maior que 1, ou seja:

$$\frac{SinalPA_P}{SinalPA_{PP}} > 1 \Rightarrow SinalPA_P > SinalPA_{PP}$$

Assim, nossos dados confirmam que a mudança do sinal fotoacústico esta relacionada com a penetração do medicamento na pele.

A seguir, foi calculado o valor aproximado de X (usando a eq. 1.6) em função do tempo de aplicação da sonoforese, para cada voluntário. A Fig. 13 mostra a distribuição de valores de X obtida para o voluntário 1. A distribuição de valores para os outros voluntários é semelhante à observada na fig. 13 e não serão mostradas. Pode-se observar que todas elas são semelhantes na sua distribuição, o que fará com que elas não tenham valores médios significativamente diferentes. Para mostrar isto, na Tabela VI são mostrados os valores médios e os desvios padrão das distribuições de valores de X em função do tempo para cada voluntário.

Foi realizado para cada grupo de valores de X , nos três diferentes tempos usados, um teste de Anova. Para os quatro voluntários, o valor de p sempre foi maior que 0,05, o que implica que os valores médios de X para cada tempo de aplicação do medicamento são estatisticamente semelhantes, ou seja, o maior tempo de aplicação do US não fez com que penetrasse mais medicamento na pele humana.

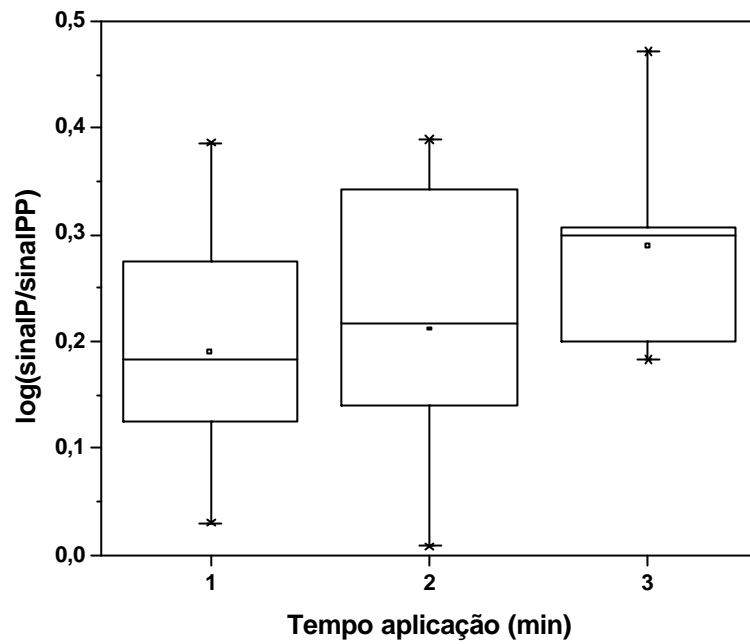


Figura 12: Box plot do $\ln(\text{sinalP}/\text{sinalPP}) \approx X$ em função do tempo de aplicação da sonoforese, para os dados do voluntário 1.

Tabela VI: Valores médios aproximados de X , calculados usando a eq. 6.8, para cada voluntário e para cada tempo de aplicação da sonoforese.

Voluntário	1 min		2 min		3 min	
	X_m	SD	X_m	SD	X_m	SD
1	0,082	0,045	0,092	0,052	0,125	0,044
2	0,076	0,049	0,064	0,036	0,041	0,029
3	0,067	0,053	0,062	0,023	0,083	0,046
4	0,086	0,048	0,035	0,026	0,077	0,058

Outra observação é que o sinal fotoacústico obtido para a pele limpa, como pode ser observado nas tabelas II, III, IV e V para os diferentes voluntários, é praticamente igual. Neste estudo podemos afirmar então que o sinal fotoacústico da pele limpa em princípio não muda com o tipo de pele, pois entre os quatro voluntários havia um de pele negra. Souza *et al.* (2005) realizou estudos onde foi observado que o sinal

fotoacústico obtido em voluntários com diferentes tipos de pele é diferente e pode ser usado para distinguir o tipo de pele de um indivíduo. Estes resultados e os de o trabalho desta tese mostram que a pele *in vivo* é um sistema realmente complexo e que seu estudo deve ser feito em ambientes com temperatura e umidade controladas, além de outros fatores que possam afetar as propriedades da pele.

Os resultados obtidos até aqui mostram que a técnica fotoacústica mostrou-se viável para a realização de medidas não-invasivas que caracterizam a aplicação tópica de um medicamento, possibilitando uma mensuração da penetração do medicamento de maneira rápida.

As medidas realizadas apresentaram uma relação sinal-ruído favorável, o que é relevante quando se considera a dificuldade em minimizar os ruídos para medidas fotoacústicas *in vivo*, relacionada à dificuldade de estabilização do braço do voluntário na célula. Conforme descrito anteriormente, a configuração adotada para a montagem fotoacústica permitiu uma boa estabilização.

Gutiérrez-Juárez *et al.* (2002) apontam uma série de fatores que podem interferir nos resultados de experimentos *in vivo*, como o grau de hidratação da pele, movimentos involuntários e a transpiração. Em seu trabalho, estes autores afirmam que tais fatores devem ser considerados e que mais estudos devem ser realizados para identificar a real influência dos mesmos no sinal fotoacústico e/ou no nível de ruído. Bernengo *et al.* (1998) mencionam como dificuldades na realização das medidas *in vivo* o fato de que o sinal fotoacústico é mais fraco nesses casos; além disso, afirmam que o posicionamento e o grau de relaxamento do voluntário são essenciais para se obter resultados satisfatórios.

Medidas anteriormente realizadas pelo Grupo de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos da UNIVAP comprovaram a influência do grau de hidratação da pele na amplitude do sinal PA através de um estudo de monitoração da cinética de desidratação da pele, analisando o espectro fotoacústico em função do tempo, onde identificaram mudanças no espectro fotoacústico de acordo com o grau de umidade da pele (ROMPE *et al.*, 2003).

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que a fotoacústica pode ser adotada como técnica de análise dos efeitos da sonoforese. Através de sua utilização, foi possível avaliar a penetração do piroxicam gel em função do tempo de aplicação da sonoforese nos voluntários deste estudo, sob as condições e parâmetros utilizados e citados anteriormente. Os resultados obtidos mostram que a concentração relativa de piroxicam, na pele, não muda com o tempo de aplicação. Poderia se pensar então que a quantidade de creme que penetra é a mesma. Porém não pode se esquecer que o sinal fotoacústico obtido depende do comprimento de difusão térmica (eq. 1.2), o qual é função da difusividade da pele e da frequência da radiação utilizada. Como em todos os tempos de aplicação analisados foi utilizada a mesma frequência de pulsos na análise fotoacústica, em princípio o comprimento de difusão térmica deve ter sido o mesmo. Assim, o fato de que o valor estimado de X seja semelhante nos três tempos estudados pode significar que até a profundidade analisada a quantidade de medicamento que penetra é a mesma, porém não podemos afirmar que não está penetrando mais medicamento para camadas mais profundas, implicando numa dinâmica de penetração sem barreiras que façam o medicamento se acumular nas diferentes camadas da pele. Mesmo assim, se pensarmos que o medicamento está sendo empurrado mecanicamente, esperaríamos um gradiente de concentração do medicamento, onde a menor concentração estaria mais perto da superfície da pele, e a qual seria maior para maiores tempos de aplicação. Os nossos resultados não mostram isto, e por isso também podem ser interpretados como que a quantidade de creme que penetra é a mesma independentemente do tempo de aplicação da sonoforese. Isto implicaria numa saturação da quantidade de creme que pode penetrar na pele. Se isto último for o caso, então os resultados atestam para uma reavaliação da utilização da técnica terapêutica da sonoforese em relação ao tempo utilizado para que ocorra a penetração do medicamento.

Para que a cinética de penetração de um medicamento seja mais bem avaliada, devemos enfatizar a necessidade de trabalhar com uma quantidade maior de voluntários, e com um maior número de medições.

O presente trabalho abre perspectivas para a realização de mais estudos analisando o problema da penetração de cremes através da pele humana. Uma possibilidade é a análise da concentração aproximada X em função da frequência de

pulsos. Isso permitiria traçar o gradiente de concentrações na pele, se é que ele existe. Também podem ser analisadas a penetração e concentração relativa, na pele humana, de outras substâncias e suas misturas. Estudos nesta área encontram-se atualmente sendo realizados no Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos do IP&D/UNIVAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, F. H; ROMPE, P.C. B; MANSANARES, A.M; SILVA, E.C; BARJA, P.R; AVALOS, D.A. Análise Fotoacústica do Efeito do Protetor Solar na Pele Humana. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVAP. 2003, São José dos Campos, SP. **Anais de Trabalhos Completos**. São José dos Campos: UNIVAP, 2003. CD-ROM.

ANJOS, F.H. **Análise fotoacústica da concentração relativa de Piroxicam administrado por sonoforese na pele humana *in vivo***. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. 2004.

BALDERAS-LOPEZ, J. A. *et al.* Photoacoustic measurements of transparent liquid samples: thermal effusivity. **Measurements in Science and Technology**, v.6, p. 1163-1168, 1995.

BARJA, P.R. **Estudo da Indução Fotossintética Através da Técnica Fotoacústica: Efeitos de Saturação e Fotoinibição**. 1996. 71 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física Gleb Wataglin, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

BENSON, H.A.E; MC ELNAY, J.C. Transmission of ultrasound energy through topical pharmaceutical. **Physiotherapy**, v.74, n.11, p.587-589, 1988.

BERNENGO, J.C; GASQUEZ, C; FALSON-RIEG, F. Photoacoustics as a tool for cutaneous permeation studies. **High Temperatures-High Pressures** v.30, p. 619-624, 1998.

BISSCHOP, G; BISSCHOP, E; COMMANDRÉ, F. **Vibrações Mecânicas In: Eletrofisioterapia**. São Paulo: Santos, 2001. p.93 - 102.

BUCALON, A.J. **Terapia por Ultra-som – notas atualizadas**. Manual do Fabricante. Bioset – Indústria e Tecnologia em Bio-Equipamentos. Rio Claro, SP. 1990. 12 p.

DE SOUZA, J; ACOSTA-AVALOS, D; BARJA, P.R. Classificação *in vivo* de tipos de pele por fotoacústica. **Anais do IX Encontro Latino-americano de Iniciação Científica da UNIVAP**, 2005. pp. 269 – 272

DYSON, M. Mechanisms involved in the Ultrasound Therapy. **Physiotherapy** ,v.73 n.3, p.116-120, 1987.

FUIRINI, N.JR. ; LONGO, J.G. **ULTRA – SOM KLD Biosistemas**. Equipamentos Eletrônicos LTDA, Manual KLD, 1996.

GUIRRO, E; GUIRRO, R. **Ultra-som. In: Fisioterapia Dermato-Funcional. Fundamentos, Recursos, Patologias**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2002.

GUIRRO, E; GUIRRO, R. **Noções de Citologia e Histologia. In: Fisioterapia Dermato-Funcional. Fundamentos, Recursos, Patologias**. 3ed. São Paulo: Manole, 2002. p.3 -32.

GUTIÉRREZ-JUÁREZ, G.; VARGAS-LUNA, M; CÓRDOVA, T; VARELA, J.B; BERNAL-ALVARADO, J.J; SOSA, M. In vivo measurement of the human skin absorption of topically applied substances by photoacoustic technique. **Physiological Measurement**, v. 23, p. 1-12, 2002.

HAAR TER G Basic physics of therapeutic ultrasound. **Physio Therapy** , v.4, p.1978.

H. VARGAS, E. V. ;CORRÊA DA SILVA, L.C.M.; 13th ICPPP International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena. **Journal de Physique IV** , v.125,p. 3 – 893, 2005.

HOOGLAND, R. **Terapia Ultrasonica**. Manual do Fabricante. Enraf Nonius Delft. Holanda, 1986. 29 p.

JOSHI, A; RAJE, J. Sonicated transdermal drug transport. **Journal of Controlled Release** v. 83, p. 13-22. 2002.

KAHN, J. **Ultra-som. In: - Princípios e prática de eletroterapia**. 4 ed. São Paulo: Santos, 2001. p.49 - 58.

KANIKKANNAN N; KANDIMALLA K; LAMBA S.S; SINGH M. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. **Current Medicinal Chemistry** v.7, n.6, p.593-608, 2000.

LOW, J; REED, A. **Ultra-som. In: - Eletroterapia explicada: princípios e prática**. 3ed. São Paulo: Manole, 2001.

MACHET, L; BOUCAUD, A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. **International Journal of Pharmaceutics** v.243, p.1-15, 2002.

MEIDAN, V.M; WALMSLEY, A.D; DOCKER, M.F; IRWIN, W.J. Ultrasound-enhanced diffusion into coupling gel during phonophoresis of 5-fluorouracil. **International Journal of Pharmaceutics** v.185, p.205-213, 1999.

MITRAGOTRI, S. Effect of therapeutic ultrasound on partition and diffusion coefficients in human stratum corneum. **Journal of Controlled Release** v.71, p.23-29, 2001.

MORGANTI, P; RUOCCO, E; WOLF, R; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology** v.19, p.489-501, 2001.

PUC CETTI, G; LAHJOMRI, F; LEBLANC, RM. Pulsed photoacoustic spectroscopy applied to the diffusion of sunscreen chromophores in human skin: the weakly absorbent regime. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v.39, p.110-120, 1997.

ROMPE, P.C. B; ANJOS, F.H; SILVA, E.C; AVALOS, D.A; BARJA, P.R. Caracterização da pele humana por espectroscopia fotoacústica. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVAP. 2003, São José dos Campos, SP. **Anais de Trabalhos Completos**. São José dos Campos: UNIVAP, 2003. CD-ROM.

ROMPE, P.C.B. **Estudo fotoacústico das propriedades de penetração de medicamento de uso tópico aplicado na pele humana *in vivo***. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). 2004.

ROSENCWAIG A.; GERSHO A. Theory of the photoacoustic effect with solids. **Journal of Applied Physics** v.47, n.1, p.64-69, 1976.

ROSENCWAIG, A. **Studies in Biology. In: Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.219 -231.

SEHN, E; SILVA K.C; RETUCI, V.S; MEDINA A.N; BENTO, A.C; BAESSO, ML. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment. **Review of Scientific Instruments** v.74, n.1, p.758-760, 2003.

SIMONIN, J.P. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. **Journal of Controlled Release** v.33, p.125-141, 1995.

VINHA, C. A; HAAS, U. Qualitative and semiquantitative analysis of dried fruits and seasoning products of paprika using photoacoustic spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.45, n.4, p.1273, 1997.

XIAO, P; COWEN, J.A; IMHOF, R.E. Protocols and data analysis in quantitative optothermal in vivo transdermal diffusion measurements. **Review of Scientific Instruments** v.74, n.1, p.767-769, 2003.

WU, J. Defects Generated in Human Stratum Corneum Specimens by Ultrasound. **Ultrasound Méd. & Biol.**, v. 24, n. 5, p. 705-710, 1998.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente projeto tem como título “Análise Fotoacústica da Penetração do Piroxicam gel na Pele Humana *in vivo* por Sonoforese com Diferente Tempo de Aplicação” e está sendo elaborado pela aluna Fabíola Leite França Dias da Silveira sob orientação do Prof. Dr. Daniel Acosta Avalos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, na Universidade do Vale do Paraíba.

Propósitos e Hipóteses:

O projeto proposto tem por objetivo verificar as possíveis diferenças na penetração do fármaco aplicado por US no modo contínuo em amostras de pele *in vivo*.

Material e Métodos

Serão selecionados para participarem do estudo um mínimo de três e um máximo de cinco voluntários, de ambos os sexos, sem uma faixa etária definida, membros do próprio Grupo de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos da Universidade do Vale do Paraíba (Univap).

Os critérios de INCLUSÃO para a participação no estudo serão:

- Não apresentar ferida, ulceração ou qualquer tipo de alteração dermatológica, principalmente nos braços;
- Não apresentar alergia a qualquer um dos componentes da fórmula do medicamento utilizado;
- Não possuir implantes metálicos na região do braço.

As medidas serão realizadas no Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos, sempre sob a presença da pesquisadora responsável, que fará as aplicações e compromete-se a esclarecer eventuais dúvidas a respeito da metodologia, embasamento teórico e riscos oferecidos pela pesquisa. O fármaco escolhido para este estudo é o piroxicam gel, conhecido no ambiente clínico por suas propriedades antiinflamatórias.

Inicialmente, serão realizadas as medidas do sinal fotoacústico com o antebraço limpo, ou seja, sem aplicação do fármaco. Para tanto, o voluntário deverá lavar os antebraços com sabão em água corrente e depois limpá-lo com um papel embebido em

álcool. Após ter lavado os antebraços, o voluntário será devidamente posicionado com o braço direito sobre a célula fotoacústica para que a medida do sinal seja realizada.

Após este procedimento, será realizada a aplicação da sonoforese, com a mesma dosagem de piroxicam gel (0,5 miligramas), US de 3 MHz, modo contínuo, intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, durante 1, 2 e 3 minutos. Após cada aplicação, será feita nova medida do sinal fotoacústico.

Análise Crítica de Riscos e Benefícios

O projeto de pesquisa proposto não oferece risco a voluntários por se tratar de um estudo experimental que utiliza um fármaco amplamente utilizado no meio clínico, sem efeitos colaterais eminentes, conforme afirmado pelo fabricante. Além disso, a dosagem, a área de pele a ser utilizada e o procedimento de lavagem das mãos poucos minutos após a aplicação minimiza ainda mais o risco de superdosagem ou algo semelhante. Deste modo, a probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata e tardia do estudo é bastante reduzida.

Fica assegurado, através deste termo, a liberdade do sujeito se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, bem como a garantia de sigilo das informações obtidas no estudo.

Este termo deve ser assinado em duas vias, sendo uma retida pelo voluntário da pesquisa e uma arquivada pelo pesquisador responsável.

São José dos Campos, de de 2004.

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador