

IMPEDÂNCIA ELÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES DA PELE
PROVOCADAS POR SUBSTÂNCIAS IRRITANTES

Daniele Mendonça Ferreira

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Aprovada por:

Prof. Marcio Nogueira de Souza, D.Sc.

Prof. Antonio Giannella-Neto, D.Sc.

Profª. Elisabete Pereira Santos, D.Sc.

Profª. Célia Santos da Silva, D.Sc.

Dra. Maria Elisabeth Lopes Moreira, M.D.

Prof. Pedro Lopes de Melo, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

AGOSTO DE 2006

FERREIRA, DANIELE MENDONÇA

Impedância Elétrica na Determinação de
Alterações da Pele Provocadas por Substâncias
Iritantes [Rio de Janeiro] 2006

XIV, 130 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D.Sc., Engenharia Biomédica, 2006)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Impedância Elétrica

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que sempre acreditaram em mim contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional:
meus pais e meu marido.

AGRADECIMENTOS

Aos voluntários da COPPE e da clínica que contribuíram para a realização deste trabalho.

À doutora Maria Alice Gabay e sua secretária Elizabeth que me acolheram no consultório durante a coleta de dados e me ajudaram em todas as dificuldades que surgiram.

Ao seu Souza que dedicou finais de semana para ajudar na coleta de dados em coelhos.

Aos meus pais que também se dispuseram a ajudar na medição de coelhos nos finais de semana.

À minha orientadora Profa. D.Sc. Célia Santos da Silva que teve que prolongar sua aposentadoria para contribuir com seus anos de experiência neste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. D.Sc. Marcio Nogueira de Souza, que apesar das inúmeras tarefas para desenvolver no laboratório e na coordenação do PEB, se dedicou para que este trabalho alcançasse a meta traçada.

Ao Prof. D.Sc. Antonio Giannella e à profa. Elisabete Pereira dos Santos, que com suas críticas ajudaram a enriquecer o trabalho.

Um especial agradecimento ao meu marido que compartilhou todas as angústias e vitórias deste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente cooperaram para o bom andamento da pesquisa.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

IMPEDÂNCIA ELÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES DA PELE PROVOCADAS POR SUBSTÂNCIAS IRRITANTES

Daniele Mendonça Ferreira

Agosto/2006

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza

Célia Santos da Silva

Programa: Engenharia Biomédica

A resposta de irritação da pele em testes de contato é frequentemente avaliada por métodos subjetivos que utilizam escalas baseadas na observação visual. Porém, a utilização de um método objetivo e não-invasivo para avaliação da irritação pode contribuir para diminuição do risco imposto a homens e animais submetidos ao teste. O objetivo deste estudo foi investigar a potencialidade do método de espectroscopia por bioimpedância baseado na resposta da corrente à excitação por degrau de tensão para detectar reações da pele após aplicação de uma substância irritante em baixas e altas concentrações. Os resultados obtidos com o método desenvolvido foram correlacionados com a escala visual em 12 humanos ($r=0,650$) e 30 coelhos ($r=0,651$). Observou-se que os valores do índice de impedância proposto após a indução da irritação apresentaram redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando comparados com os valores obtidos antes da aplicação do irritante, inclusive nos locais da pele onde não foram observadas reações visuais indicando que o método utilizado é mais sensível do que o método subjetivo por ter identificado a presença de irritação na ausência de sinal visual. Baseado nos achados do estudo é possível concluir que o método de impedância é capaz de detectar a irritação da pele sugerindo que pode ser utilizado para medir alterações induzidas por substâncias irritantes em baixas concentrações.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ELECTRICAL IMPEDANCE IN THE ASSESSMENT OF SKIN ALTERATIONS
INDUCED BY IRRITANT SUBSTANCES

Daniele Mendonça Ferreira

August/2006

Advisors: Marcio Nogueira de Souza

Célia Santos da Silva

Department: Biomedical Engineering

Skin irritant reaction in contact test is frequently assessed by subjective methods through visual scales. Although, the use of objective and non-invasive methods can contribute to reduce the risk imposed to animals and humans. The aim of this study was to investigate the potential of impedance spectroscopy based on current response to voltage step in detection of skin reaction after irritant substance application in low and high concentrations. Results obtained with the method were compared with visual score in 12 humans ($r=0.650$) and 30 rabbits ($r=0.651$). It was observed that the impedance index values obtained after induction of irritation showed a statically significant reduction ($p<0.05$) when compared with values obtained before irritant application, even on sites where it was not possible to identify visual reactions indicating that the used method was more sensible than subjective method since it detected the presence of irritation in the absence of visual signs. Based on these findings, it is possible to conclude that the impedance method is able to detect skin irritation and could be used to measure alterations induced by irritant substances in low concentrations.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AC: Corrente elétrica alternada
- ANOVA: Análise de variância
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BIA: *Bioelectrical Impedance Analysis*
- C_e : Capacitância de eletrodo
- C_m : Capacitância de membrana
- CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- CPE: *Constant Phase Element*
- CTFA: *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association*
- DCA: Dermatite de contato alérgica
- DCFT: Dermatite de contato fototóxico
- DCI: Dermatite de contato por irritante
- DCIP: Dermatite de contato por irritação primária
- ECM: *Electrical Capacitance Moist*
- ECVAM: *European Committee for Validation of Alternative Methods*
- F_c : Frequência característica
- FDA: *Food and Drugs Administrations*
- FRAME: *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments*
- G: Condutância
- IL: Interleucina
- IMIX: Índice da parte imaginária da impedância
- IP-10: *Interferon-inducible protein 10*
- IRAG: *Interagency Regulatory Alternatives Group*
- ISBS: Sociedade Internacional de Bioengenharia da Pele
- IX: Índice de impedância ou irritação
- LDF: *Laser Doppler Fluoximetry*
- MIX: Índice de magnitude da impedância
- MS: Ministério da Saúde
- MTT: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide]
- PIX: Índice de fase da impedância
- R_∞ : Resistência na frequência infinita
- R_0 : Resistência na frequência zero

- R_1 : Resistência interna da pele do anel 2
- R_2 : Resistência externa da pele do anel 1
- R_e : Resistência extracelular
- R_i : Resistência intracelular
- RIX: Índice da parte real da impedância
- R_X : Resistência total equivalente
- SCIM: Monitor de Impedância para Caracterização de Superfície
- SLS: *Sodium Lauril Sulphate*
- TER: Teste da Resistência Elétrica Transcutânea de Pele de Rato
- TNF: Fator de necrose tumoral
- TWEL: *Transepidermal Water Loss*
- UV: Ultravioleta
- X_{C_X} : Reatância equivalente

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Ilustração da estrutura da pele humana: epiderme, derme e hipoderme	6
2. Processo de renovação cutânea	6
3. Camadas da epiderme.....	7
4. Ilustração de camadas da derme.....	8
5. Ilustração da hipoderme.....	10
6. Atuação do irritante na pele hidratada (esquerda) e pele desidratada (direita).....	16
7. Exemplos de dermatites de contato por irritante primário: (a) henna, (b) desodorante, (c) esmalte de unhas.....	17
8. Cortes histológicos da pele normal.....	24
9. Corte histológico da pele com irritação: a) presença de vesícula; b) rompimento da vesícula.....	24
10. Corte histológico da pele com irritação: presença de espongiose.....	25
11. Corte histológico da pele com irritação: presença de infiltrado inflamatório.....	25
12. Ilustração do teste de contato cutâneo (<i>Patch Test</i>).....	26
13. Medida de TEWL com Tewameter (a) e aspecto geral do equipamento Tweameter TM 210 [®] (b).....	39
14. Ilustração de medida do transporte de vapor de água cutânea.....	40
15. Aspecto geral do Corneometer TM CM820 (a) e medida de <i>ECM</i> com o equipamento (b).....	41
16. Resposta da pele à irritação por <i>SLS</i> detectada por fluxometria à laser-Doppler.....	42
17. Relação gráfica dos termos de impedância.....	43
18. Representação da impedância no plano complexo.....	44
19. Corrente elétrica de baixa frequência (LF) penetrando no espaço extracelular e de alta frequência (HF) nos espaços intra e extracelulares...	44
20. Características gerais do espectro de impedância nos tecidos.....	47
21. Gráfico de Cole-Cole - reatância vs. Resistência.....	48
22. Gráfico de Nyquist para pele intacta (a) e para pele friccionada (b).....	49
23. Modelo das propriedades elétricas utilizadas nas medições de bioimpedância corporal.....	50
24. Ilustração de modelos elétricos da pele descritos na literatura.....	52
25. Circuito equivalente da pele condutância-dependente proposto por Cole, 1940 (a) e circuito equivalente da pele condutância-independente proposto por Grimnes e Martinsen, 2005 (b).....	55
26. Medida da impedância elétrica da pele.....	58
27. Modelo simplificado para medições de bioimpedância corporal.....	64
28. Ilustração do <i>probe</i> (primeira versão) utilizado para medir a bioimpedância da pele. Os anéis internos e externos são os eletrodos ativos e o anel intermediário é usado como eletrodo de guarda (a); aplicação do <i>probe</i> sobre a pele no antebraço anterior (b).....	66
29. Modelo elétrico da pele humana (primeira versão).....	67
30. Comparação do módulo e da fase de Z_{cpeF} (linha contínua) e sua aproximação (linha em cruz).....	69
31. Painel frontal do programa de aquisição e ajuste dos dados de bioimpedância utilizando a primeira versão do modelo elétrico da pele....	71

Figuras	Página
32. Circuito equivalente da pele para calcular a resposta da corrente à excitação por degrau de tensão e para derivar os parâmetros elétricos de impedância: C_e : capacitância de eletrodo; R_1 : resistência interna; R_2 : resistência externa; CPE : elemento de fase constante.....	72
33. Distribuição das funções $(\tau s)^\alpha$, $1 + \alpha(\tau s - 1)$ (termo de 1ª ordem da aproximação), $1 + \alpha(\tau s - 1) + 0,5(\alpha - 1) \cdot \alpha(\tau s - 1)^2$ (termos de 1ª e 2ª ordens da aproximação) com diferentes valores de α	74
34. Painel frontal do programa de aquisição e ajuste dos dados de bioimpedância utilizando o modelo elétrico da pele (definitivo).....	75
35. Ilustração do <i>probe</i> para medição da bioimpedância da pele. Os eletrodos ativos estão em preto.....	76
36. Linhas de corrente em um tecido biológico com a variação da distância entre os eletrodos. A profundidade de penetração da corrente é aproximadamente a metade da distância entre os eletrodos.....	77
37. Modelo experimental para determinar a profundidade total de penetração da corrente.....	78
38. Área dorsal do coelho tricotomizada.....	81
39. Oclusão das substâncias irritantes com adesivos hipoalergênicos e gaze...	81
40. Aplicação do <i>probe</i> na área dorsal do coelho para leitura de bioimpedância.....	82
41. Localização das câmaras no antebraço esquerdo. As câmaras são numeradas no sentido medial-lateral, proximal-distal.....	84
42. Box plot do índice de impedância elétrica em relação à escala visual em coelhos. O símbolo quadrado indica a média, o símbolo redondo inferior indica o valor mínimo e o símbolo redondo superior indica o valor máximo. Os marcadores (*) mostram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste de duas amostras Kolmogorov-Smirnov entre a referência e cada pontuação da escala visual.....	88
43. Box plot do índice de impedância em relação à escala visual em humanos. O símbolo quadrado indica a média, o símbolo redondo inferior indica o valor mínimo e o símbolo redondo superior indica o valor máximo. Os marcadores (*) mostram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste de duas amostras Kolmogorov-Smirnov entre a referência e cada pontuação da escala visual.....	89
44. Ilustração da resposta visual cutânea em um coelho (a) e em um indivíduo (b) 24 horas após a remoção do irritante.....	90
45. Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência (Ref) e de cada concentração de <i>SLS</i> nas profundidades 1 e 2 do dia 0 comparado com o dia 2 em coelhos. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0.05$) através do teste <i>t-Student</i> pareado entre o dia 0 e o dia 2.....	91
46. Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência (Ref) e de cada concentração de <i>SLS</i> nas profundidades 1 e 2 do dia 0 comparado com o dia 2 em humanos. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0.05$) através do teste <i>t-Student</i> pareado entre o dia 0 e o dia 2.....	92

Figuras	Página
47. Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (Ref) e de cada concentração de <i>SLS</i> do dia 0 comparado com o dia 2 em coelhos (a) e humanos (b). O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p<0,05$) através do teste <i>t-Student</i> pareado entre o dia 0 e o dia 2.....	93
48. Distribuição da escala visual em coelhos para cada concentração de <i>SLS</i> em dose única nos dias de observação após a remoção das câmaras.....	94
49. Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência e cada concentração de <i>SLS</i> em dose única: 0,5%, 1,0%, 2,0%, 5,0% no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subseqüentes.....	95
50. Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência e cada concentração de <i>SLS</i> em dose única: 0,5%, 1,0%, 2,0%, 5,0% no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subseqüentes. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre a referência (local não exposto ao <i>SLS</i>) e cada concentração de <i>SLS</i> através da análise de variância (ANOVA).....	96
51. Distribuição da escala visual em coelhos para cada concentração de <i>SLS</i> em doses repetidas nos dias de observação.....	97
52. Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência e cada concentração de <i>SLS</i> em aplicações repetidas: 0,5%, 1,0% no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subseqüentes. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre a referência (local não exposto ao irritante) e cada concentração de <i>SLS</i> através da análise de variância (ANOVA).....	98
53. Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência e cada concentração de <i>SLS</i> em doses repetidas: 0,5%, 1,0%, no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subseqüentes. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre a referência (local não exposto ao irritante) e cada concentração de <i>SLS</i> através da análise de variância (ANOVA).....	99
54. Distribuição da escala visual em humanos para cada concentração de <i>SLS</i> em dose única com e sem aplicação de hidratante (trealose a 5%).....	100
55. Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (Ref) e de cada concentração de <i>SLS</i> com e sem hidratante do dia 0 e do dia 2 em humanos.....	101
56. Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (Ref) e de cada concentração de <i>SLS</i> com hidratante (a) e sem hidratante (b) do dia 0 comparado com o dia 2 em humanos. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p<0,05$) através do teste <i>t-Student</i> pareado entre o dia 0 e o dia 2.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Leitura dos Testes de Contato indicada pelo Grupo Internacional Investigador de Dermatites de Contato.....	27
2. Média e desvio padrão dos parâmetros de bioimpedância estimados pelo modelo clássico de bioimpedância corporal.....	66
3. Média e desvio padrão dos parâmetros de bioimpedância estimados pelo modelo da pele incluindo o CPE (primeira versão).....	71
4. Valores estimados de R_l (Ω) medidos pelos anéis 1 e 2 de diversas camadas de gelatina e da camada basal baseando-se no modelo clássico da pele.....	79
5. Classificação de irritante primário cutâneo.....	82
6. Avaliação visual de irritação cutânea em humanos.....	85
7. Distribuição da escala visual para a referência (ref) e cada concentração de <i>SLS</i> no dia 2 em humanos e coelhos.....	90
8. Média \pm desvio padrão de α da referência (ref.) e de cada concentração de <i>SLS</i> nas profundidades 1 e 2 do dia 0 e do dia 2 em coelhos e humanos.....	93
9. Média \pm desvio padrão de α da referência (ref.) e de cada concentração de <i>SLS</i> aplicado em dose única nas profundidades 1 e 2 do dia 0 e dos dias 2 até 5 em coelhos.....	96
10. Média \pm desvio padrão de α da referência (ref.) e de cada concentração de <i>SLS</i> aplicado em doses repetidas nas profundidades 1 e 2 do dia 0 e dos dias 2 até 4 em coelhos.....	99

ÍNDICE

	Página
FOLHA DE ROSTO	i
FICHA CATALOGRÁFICA	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
ÍNDICE	xii
Capítulo	Página
1 INTRODUÇÃO	01
2 DERMATOLOGIA E COSMETOLOGIA	05
2.1 Estrutura e funções da pele humana	05
2.1.1 Epiderme	06
2.1.1.1 Camadas da epiderme	07
2.1.2 Derme.....	08
2.1.2.1 Regulação da temperatura	09
2.1.3 Hipoderme	09
2.1.4 Emulsão Epicutânea	10
2.1.5 Influência fisiológica da pele	11
2.1.6 Efeitos ambientais	12
2.2 Dermatites ou Eczemas	13
2.2.1 Eczema de Contato (Dermatite de Contato)	14
2.2.1.1 Dermatite de Contato Alérgica (DCA)	14
2.2.1.2 Dermatite de Contato Fototóxico (DCFT)	15
2.2.1.3 Dermatite de Contato Fotoalérgico	15
2.2.1.4 Dermatite de Contato por Irritação Primária (DCIP)	15
2.2.2 Patogênese das Doenças da Pele	22
2.2.3 Testes de Contato (<i>Patch Test</i>)	25
2.3 Cosmetologia	28
2.3.1 Análise da segurança de um produto cosmético	30
2.3.2 Ensaio de toxicidade	32
2.3.2.1 Princípios TER	33
2.3.2.2 Princípios do EPISKIN	34
2.3.2.3 Testes toxicológicos <i>in vivo</i>	34
3 BIOENGENHARIA CUTÂNEA	38
3.1 Perda de água transepidérmica (<i>Transepidermal water loss</i>) – TEWL	38

3.2 Capacitância elétrica de hidratação (<i>Electrical Capacitance Moist - ECM</i>)	40
3.3 Fluxometria à laser-Doppler (<i>Laser-Doppler Flowmetry - LDF</i>)	42
3.4 Impedância elétrica (IMP)	42
3.4.1 Conceitos gerais.....	42
3.4.2 Propriedades elétricas dos tecidos	44
3.4.2.1 Polarização.....	45
3.4.2.2 Relaxação e dispersão dielétrica de tecidos biológicos.....	46
3.4.2.3 Equação de Cole.....	48
3.4.3 Modelagem em bioimpedância	50
3.4.4 Instrumento de impedância elétrica cutânea	57
3.4.5 Revisão da literatura em bioimpedância cutânea	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1 Técnica de análise de bioimpedância baseada na resposta em degrau.....	63
4.1.1 Resposta ao degrau e modelo clássico de bioimpedância.....	65
4.1.2 Resposta ao degrau e modelo de bioimpedância com CPE	67
4.2 Probe.....	76
4.3 Delineamento do estudo.....	79
4.4 Amostra	79
4.5 Substância e procedimento do teste	80
4.5.1 Procedimento de irritação primária da pele com dose simples em coelhos	80
4.5.1.1 Animais.....	80
4.5.1.2 Preparo dos animais.....	80
4.5.1.3 Aplicação do produto.....	81
4.5.1.4 Leitura das reações cutâneas.....	81
4.5.2 Procedimento de irritação primária da pele com doses repetidas em coelhos	83
4.5.3 Procedimento de irritação primária da pele em humanos.....	83
4.6 Análise dos dados.....	85
4.7 Análise estatística	85
5 RESULTADOS	87
5.1 Índice de irritação cutânea (IX).....	87
5.2 Escala visual e parâmetros de impedância da pele de coelhos e humanos antes e após a irritação.....	89
5.2.1 Método visual.....	90
5.2.2 Impedância elétrica.....	91
5.3 Evolução da irritação na pele de coelhos após a aplicação de SLS em dose única.....	94
5.4 Evolução da irritação na pele de coelhos após a aplicação de SLS em doses repetidas.....	97
5.5 Comparação entre o padrão de irritação da pele de humanos com e sem aplicação de hidratante (trealose a 5%).....	100
6 DISCUSSÃO.....	103
7 CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXOS	124

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A pele é reconhecida como o maior órgão do corpo e sua principal função mecânica é delimitar o organismo, protegendo-o contra agentes do meio externo (AZULAY & AZULAY, 1999a).

Sua larga superfície está constantemente exposta a fatores físicos e químicos. Agentes infecciosos e alergênicos podem desencadear uma reação cutânea muito comum na área dermatológica conhecida como Dermatite de Contato por Irritante (DCI), caracterizada por uma reação não imunológica na pele decorrente do contato com uma substância irritante (solventes e detergentes).

A história médica e o exame clínico constituem ferramentas importantes no diagnóstico dermatológico. O método mais utilizado na avaliação clínica dos testes de contato é baseado na leitura visual do grau de irritação (*visual scoring*). Porém, tal método apresenta algumas desvantagens, tais como: variação interindividual entre os observadores, necessitando de maior tempo de treinamento; subjetividade; sistema de pontuação simplificado e a impossibilidade de quantificação contínua da irritação (KUZMINA *et al.*, 2003; GOON *et al.*, 2004). É sabido que sinais macroscópicos como edema e eritema são relativamente tardios. Devido à subjetividade da avaliação, o resultado do teste se torna algumas vezes não confiável, dependendo de fatores como cor da pele do paciente e a habilidade do examinador.

Durante as últimas décadas, técnicas de bioengenharia têm sido utilizadas no campo experimental da dermatite de contato, proporcionando dados objetivos e quantitativos, assim como detectando alterações da pele no estágio subclínico. Todos

os métodos de bioengenharia cutânea são baseados em um princípio físico particular para avaliar um fenômeno biológico resultante de eventos complexos (KUZMINA *et al.*, 2003).

Embora os métodos não-invasivos em dermatologia sejam empregados desde o início do século XIX, o interesse em desenvolver "novas" técnicas começou durante a década de 70 do século XX, quando o termo "bioengenharia da pele" foi introduzido para a aplicação da engenharia em dermatologia e cosmetologia. Em 1976 foi fundada a Sociedade Internacional de Bioengenharia da Pele (ISBS – *International Skin Bioengineering Society*) para auxiliar no desenvolvimento de novos instrumentos, proporcionar um programa de trocas de informações e padronizar os métodos (ELSNER *et al.*, 1998).

O desenvolvimento da bioengenharia tem importância fundamental na área de cosmetologia. Antes que novos produtos sejam introduzidos no mercado, o teste destes cosméticos, assim como de seus ingredientes, é essencial para identificar o potencial para reações cutâneas adversas (irritação ou alergia) (ROBINSON & PERKINS, 2002). Tradicionalmente, testes de irritação cutânea têm sido conduzidos em alguns animais que apresentam uma pele mais sensível que de seres humanos. A utilização da bioengenharia cutânea durante estes testes não só apresenta vantagens no avanço científico, como também nas questões éticas, por possibilitar a monitoração de alterações funcionais e estruturais da pele no estágio subclínico, reduzindo desta forma, o risco potencial imposto aos animais.

De acordo com ELSNER *et al.* (1998), as técnicas de bioengenharia não-invasivas são indispensáveis no desenvolvimento de drogas e cosméticos, assim como na clínica dermatológica. Tais técnicas permitem aos pesquisadores estudar a estrutura e a função do tecido epitelial de revestimento humano de forma quantitativa e qualitativa.

As técnicas de bioengenharia têm crescido e vários instrumentos comerciais são utilizados nos laboratórios dermatológicos. Enquanto muitos aparelhos ainda estão sendo utilizados em experimentos, a tecnologia avança rapidamente, sendo confirmada pelo aumento do uso de imagens de ultra-som e microscopia da superfície da pele na prática clínica.

Vários métodos propostos para avaliação não-invasiva da pele já estão disponíveis no mercado. Dentre os mais estabelecidos encontram-se a “Perda de água transepidérmica”, a “Capacitância Elétrica de Hidratação” e a “Fluxometria à laser-Doppler” (ELSNER *et al.*, 1998). Alguns destes, porém, apresentam desvantagens como, por exemplo, interferência de fatores ambientais e efeitos psicológicos e fisiológicos do indivíduo.

Um método que vem sendo recentemente utilizado é baseado nas alterações dos parâmetros de impedância elétrica da pele decorrente do processo de irritação. Medidas precisas de impedância fornecem informações significativas sobre a propriedade elétrica do material biológico sob investigação, auxiliando no diagnóstico clínico.

A impedância elétrica reflete alterações no espaço extracelular e proporciona uma estimativa do grau de edema causado pela resposta inflamatória (OLLMAR & EMTESTAM, 1992). Baseado nesta afirmativa, Ollmar e colaboradores desenvolveram um Monitor de Impedância para Caracterização de Superfície da Pele (SCIM). O instrumento grava o espectro de impedância, magnitude e fase, em 31 frequências distribuídas logaritmicamente na faixa de 1 kHz a 1 MHz. O índice de impedância ou irritação (IX) desenvolvido por Ollmar e colaboradores deriva da razão dos valores de impedância obtidos em duas frequências fixas, onde a baixa frequência (20 kHz) está relacionada com o espaço extracelular e a alta frequência (500 kHz) representa o volume total do tecido.

Uma vez que este índice de irritação (IX) reflete apenas um aspecto da impedância, quatro novos índices de impedância foram introduzidos (índice de magnitude, índice de fase, índice da parte real e índice da parte imaginária). O índice da parte real reflete alterações principalmente na condutividade, enquanto que o índice da parte imaginária reflete alterações na reatância. O índice de magnitude descreve a impedância no espaço complexo, que aumenta se as partes real e imaginária mudam na mesma direção e proporção. O índice de fase aumenta se as partes real e imaginária mudam em direção e/ou proporção diferentes.

Apesar do avanço no diagnóstico dermatológico através da técnica de impedância bioelétrica, ainda existem campos sem resposta como a possibilidade de quantificação do estado da pele em reação a uma substância irritante. É possível prever o potencial de irritação de um produto cosmético ou medicamentoso através

de parâmetros de impedância bioelétrica? Como desenvolver uma técnica quantitativa adequada inclusive para casos subclínicos? Existem questões clínicas que podem ser mais bem respondidas com a quantificação das reações dermatológicas?

Para contribuir para as respostas destas perguntas este trabalho avaliou uma técnica de espectroscopia de impedância elétrica para detectar a resposta da pele induzida por várias concentrações do irritante (Lauril Sulfato de Sódio - *SLS*). A técnica de impedância é baseada na resposta da corrente a uma excitação por degrau de tensão (NEVES & SOUZA, 2000).

Alguns objetivos específicos abordados na busca das respostas às perguntas colocadas foram:

- Construir um sistema de aquisição de dados para determinação dos parâmetros de bioimpedância da pele;
- Realizar um experimento piloto que respondesse à questão da exequibilidade de quantificação de alterações dermatológicas através da impedância bioelétrica;
- Investigar modelos elétricos adequados à caracterização da pele;
- Associar as alterações dos parâmetros de impedância com as alterações fisiológicas da pele decorrente da irritação provocada por aplicação única e cumulativa do irritante;

O método proposto foi avaliado através da comparação dos resultados da impedância da pele com os do método visual. Posteriormente foi pesquisada uma contribuição clínica relevante, como a habilidade da bioimpedância em identificar a proteção da pele contra irritação decorrente da aplicação de um hidratante.

CAPÍTULO 2

DERMATOLOGIA E COSMETOLOGIA

2.1 Estrutura e funções da pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano com uma superfície de aproximadamente 1,8 m² e corresponde a 15% do peso corporal. Consiste em uma membrana de dupla camada que delimita o organismo protegendo-o através das inúmeras funções de relação com o meio externo. É um órgão que apresenta certo grau de impermeabilidade, cuja maior função é a conservação da homeostasia (termorregulação, controle hemodinâmico e excreção de metabólitos). A presença de elementos do sistema nervoso situados na derme faz com que seja considerada como um órgão de informações sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). Dentre outras funções apresentadas pela pele podem-se destacar: defesa contra elemento físico, químico (queratinização e manto lipídico) e imunológico (anticorpo gênese); controle do fluxo sanguíneo e capacidade renovadora e reparadora.

Pode ser dividida em duas partes, a camada mais externa sendo representada pela epiderme e a mais interna pela derme que cobre o tecido celular subcutâneo (Figura 1).

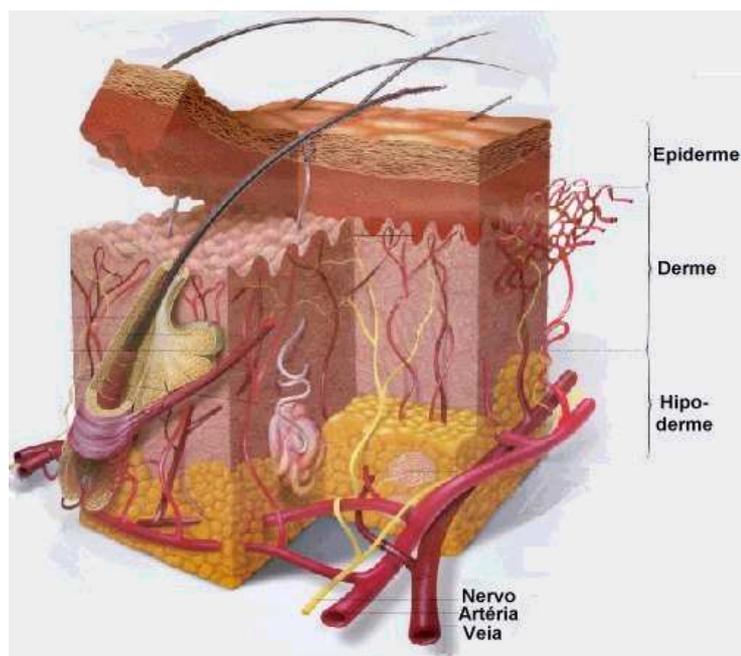


Figura 1 – Ilustração da estrutura da pele humana: epiderme, derme e hipoderme (extraído de www.saudetotal.com)

2.1.1 Epiderme

É a camada mais externa da pele e constituída por células epiteliais (queratinócitos). Estas células são produzidas na camada mais inferior da epiderme (camada basal ou germinativa) e em sua evolução em direção à superfície sofrem um processo de queratinização ou corneificação, que dá origem à camada córnea. Esta camada é composta basicamente de queratina, uma proteína responsável pela impermeabilização da pele. A renovação celular constante da epiderme faz com que as células da camada córnea sejam gradativamente eliminadas e substituídas por outras (Figura 2). Este processo ocorre em quatro semanas em uma pele saudável.

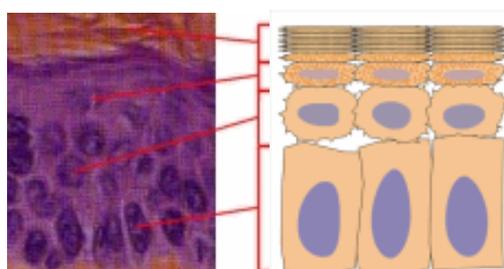


Figura 2 - Processo de renovação cutânea (extraído de www.saudetotal.com).

2.1.1.1 Camadas da epiderme

A epiderme é composta por quatro camadas que podem ser observadas na Figura 3. A camada basal, também chamada de camada germinativa, é formada por células altas, que se dividem por mitose e são as responsáveis por renovar as células da epiderme. Atua como filtro semipermeável para trocas necessárias entre as células da derme e epiderme.

As células da camada espinhosa são mais cuboidais (células de Malpighi) e apresentam projeções citoplasmáticas que ancoram as células umas às outras, dando resistência ao atrito.

As células da camada granulosa são poligonais, mais achatadas, e têm grânulos grosseiros em seu citoplasma (querato-hialina) que são precursores da queratina do estrato córneo.

A camada mais superficial é formada por células em forma de placa, os queratinócitos, que correspondem à camada córnea, formada por células mortas e achatadas que se dispõem como placas empilhadas. A espessura desta camada varia com a região do corpo sendo mais espessa nas regiões palmoplantares. Apresenta função protetora contra agressões físicas, químicas e biológicas do meio ambiente.



Figura 3 – Camadas da epiderme (extraído de www.saudetotal.com).

Além dos queratinócitos também são encontrados na epiderme: os melanócitos, que produzem a melanina (pigmento que dá cor à pele) e as células de defesa imunológica (células de Langerhans).

2.1.2 Derme

Esta camada é localizada entre a epiderme e a hipoderme e é responsável pela resistência e elasticidade da pele. É constituída por tecido conjuntivo (fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas. O limite da derme com a epiderme é formado por papilas dérmicas (camada papilar), que correspondem a reentrâncias na epiderme. A camada papilar está ligada com uma camada mais profunda e mais espessa denominada camada reticular (Figura 4).

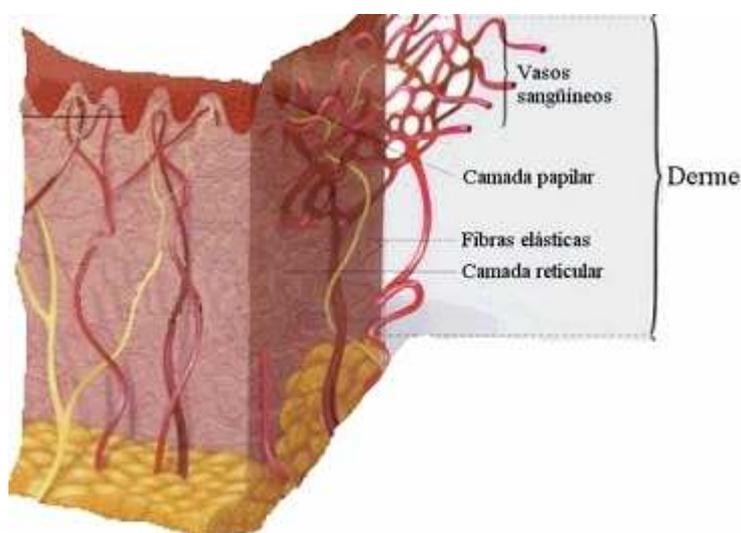


Figura 4 - Ilustração de camadas da derme (extraído de www.saudetotal.com).

Na derme estão presentes os anexos cutâneos derivados da epiderme: unhas, pêlos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A abertura dos folículos polissebáceos (pêlo e glândula sebácea) e das glândulas sudoríparas na pele formam os orifícios conhecidos como poros.

- As unhas são formadas por células corneificadas (queratina) localizadas na falange distal dos dedos. Formam lâminas de consistência endurecida que confere proteção à extremidade dos dedos das mãos e pés. A unha cresce através da raiz, ou matriz, a partir da diferenciação de células epiteliais de forma similar à epiderme, fazendo com que a unha deslize gradualmente sobre o leito ungueal.

- Os pêlos estão presentes por quase toda a superfície cutânea, exceto nas regiões plantares e palmares. Podem ser minúsculos e finos (lanugos) ou grossos e fortes (terminais). São constituídos de queratina e se desenvolvem a partir de uma invaginação da epiderme, o folículo piloso.
- As glândulas sudoríparas produzem o suor e têm grande importância na regulação da temperatura corporal. Existem dois tipos: as écrinas, que são mais numerosas, existindo por todo o corpo e produzem suor, um fluido constituído de água, sódio, potássio, cloretos, uréia, amônia e ácido úrico; e as apócrinas, existentes principalmente nas axilas, regiões genitais e ao redor dos mamilos. São responsáveis pelo odor característico do suor quando a sua secreção sofre decomposição por bactérias.
- As glândulas sebáceas desembocam na porção terminal dos folículos pilosos e produzem a oleosidade ou o sebo da pele. Mais numerosas e maiores na face, couro cabeludo e porção superior do tronco, não existem nas regiões palmares e plantares. A oleosidade da pele tem ações bactericidas e antifúngicas.

Além dos anexos cutâneos, são encontrados vários receptores nervosos que caracterizam a pele como um órgão sensorial capaz de identificar percepções como dor, temperatura, pressão e tato.

2.1.2.1 Regulação da temperatura

O organismo humano está adaptado para funcionar de forma otimizada à temperatura de 36,5° C. O aumento da temperatura corporal ocasiona a necessidade de dissipação do calor que é feita através da produção do suor pelas glândulas sudoríparas. A evaporação das gotas de suor é um fenômeno físico onde ocorre uma mudança de um estado líquido para gasoso. Esta mudança requer energia que é obtida da superfície da pele ocasionando seu resfriamento.

2.1.3 Hipoderme

Também chamada de tecido celular subcutâneo, por ser a porção mais profunda da pele, a hipoderme é composta por feixes de tecido conjuntivo que envolvem células gordurosas (adipócitos) e formam lobos de gordura (Figura 5). É formada por um

tecido conjuntivo frouxo que une a derme aos outros órgãos do corpo, permitindo que a pele tenha certo grau de deslizamento, variável com a região do corpo. Sua estrutura fornece proteção contra traumas físicos (AZULAY & AZULAY, 1999a).

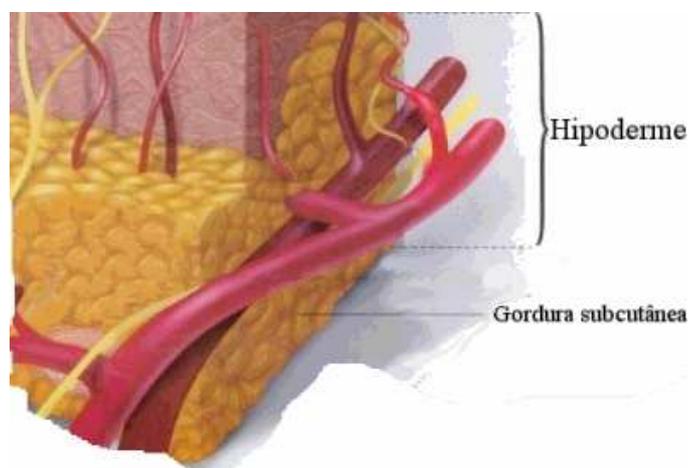


Figura 5 – Ilustração da hipoderme (extraído de www.saudetotal.com).

2.1.4 Emulsão Epicutânea

A emulsão epicutânea da pele consiste de sebo excretado pelas glândulas sebáceas e componentes do suor. Esta emulsão fornece proteção à pele contra o ressecamento e penetração de microorganismos devido à existência de uma barreira ácida natural. Qualquer alteração da emulsão epicutânea pode causar problemas à pele tais como irritação e doenças cutâneas. O equilíbrio desta emulsão pode ser perturbado apenas com a limpeza da pele. Porém, em peles saudáveis esta alteração é restaurada, uma vez que as glândulas sebáceas iniciam sua função instantaneamente (BARNHILL, 2004).

A composição da emulsão epicutânea varia e é dependente de diversos parâmetros, sendo a camada córnea (estrato córneo) o fator mais importante para o equilíbrio da emulsão, já que as camadas internas da pele estão sempre hidratadas. Quanto maior o conteúdo de água do estrato córneo, maior o equilíbrio da emulsão epicutânea.

O pH da pele constitui um outro fator que influencia no equilíbrio da emulsão. O valor do pH é determinado pelas substâncias solúveis em água presentes na camada córnea, pela secreção da transpiração, pelo sebo e pela excreção de ácido carbônico. A média de valores para mulheres é de 5,5 e para homens de aproximadamente 5,0 (COURAGE & RICHTER, 1999). Estes valores variam de acordo com a área da pele

e fatores externos diversos. Porém, o pH normal da pele se encontra sempre na faixa ácida provocando um efeito bactericida e fungicida.

A utilização permanente de alguns cosméticos e produtos farmacêuticos ou químicos pode irritar a pele ou causar envelhecimento precoce. Normalmente, soluções de sabão apresentam valores de pH acima de 7. Após a lavagem destas soluções, a pele saudável obtém o valor normal de pH em aproximadamente cinco horas (COURAGE & RICHTER, 1999). A pele sensível ajusta o valor de pH por um período mais prolongado causando uma influência negativa na função de proteção contra microorganismos. A utilização de sabões não-alcálicos (neutros ou levemente ácidos) elimina a influência negativa do sabão na pele sensível.

Na área dermatológica há grande interesse no equilíbrio da emulsão epicutânea. As técnicas de bioengenharia são utilizadas para detectar as alterações da função da barreira cutânea que podem ser observadas no início do processo através de medidas de hidratação, sebo e pH. Tais técnicas também podem ser utilizadas para testar a eficácia de produtos cosméticos e farmacêuticos.

2.1.5 Influência fisiológica da pele

O mecanismo de regulação de temperatura corporal influencia a hidratação da pele. Se a temperatura corporal for maior do que a temperatura do ambiente, o organismo equilibra esta diferença através da evaporação da água. Sob condições climáticas normais (20° C, 40-60% de umidade relativa), a regulação da temperatura é feita principalmente pela evaporação. As principais formas de excreção da água corporal são através da urina, respiração e pele (evaporação) e estes processos são importantes para o equilíbrio da água que é indispensável para o revestimento da barreira da epiderme.

A região do corpo medida também influencia o valor de hidratação devido à espessura da pele e à atividade das glândulas sudoríparas. Os valores de hidratação são altos na frente e na palma das mãos, enquanto que no braço, a poucos centímetros as mãos, a pele é seca (COURAGE & RICHTER, 1999).

As glândulas sebáceas podem ser encontradas em toda superfície da pele. Porém, a quantidade de sebo varia em diferentes partes do corpo. A maioria das glândulas sebáceas pode ser encontrada na zona-t da face (frente, nariz e queixo), couro cabeludo, parte superior do dorso e peito.

O valor do pH aumenta com a idade e varia consideravelmente em diferentes regiões do corpo. No peito, por exemplo, o valor de pH é maior do que na frente e a sola dos pés apresenta os maiores valores de pH (COURAGE & RICHTER, 1999).

A hidratação, o conteúdo de sebo e o valor do pH variam com a idade. A hidratação da pele da criança é baixa e atinge seu valor máximo em um adulto de 20 a 40 anos. A partir desta idade, a hidratação se torna baixa novamente devido à diminuição da capacidade de estocar água do estrato córneo (COURAGE e RICHTER, 1999).

A pele de um adolescente é mais oleosa do que de uma criança devido a maior secreção de sebo que é controlada por hormônios.

O excesso de transpiração influencia no equilíbrio da emulsão epicutânea. Por este motivo, ao fazer medições de hidratação, conteúdo de sebo ou pH, é recomendado que o indivíduo fique em repouso por 10-20 minutos para que a circulação sanguínea alcance os níveis normais, e que se verifique a presença de estresse emocional, que aumenta a transpiração.

2.1.6 Efeitos ambientais

O nível de hidratação da pele aumenta com o aumento da umidade relativa do ar e da temperatura ambiental. As condições ideais de medida são temperatura a aproximadamente 20° C e umidade relativa a aproximadamente 50%. Sendo assim, as estações do ano e o clima influenciam na medida de hidratação. Devido à baixa umidade relativa do ar no inverno, o conteúdo de água da emulsão epicutânea também diminui e a pele pode sofrer desidratação se a limpeza for excessiva. Durante o verão, a transpiração é maior, porém, devido ao aumento da umidade relativa do ar, a perda de água pela evaporação é menor e o estrato córneo é mais hidratado.

O estilo de vida do indivíduo, a alimentação, o consumo regular de nicotina e álcool e o uso de produtos farmacêuticos e cosméticos influenciam na emulsão epicutânea da pele. O uso de cosméticos baseados em emulsão água/óleo proporciona mais hidratação à pele do que aqueles baseados em emulsão óleo/água. Em virtude da composição dos cosméticos, é recomendado um tempo de 30 minutos após a aplicação do produto para medir a hidratação da pele a fim de evitar a influência do hidratante.

2.2 Dermatites ou Eczemas

Correspondem a um grupo de dermatoses pruriginosas de etiologia variada, localizadas ou dispersas, cuja lesão elementar é a vesícula. São resultantes de agentes exógenos (contactantes) ou endógenos (endocantes), que podem ser de natureza física até psíquica, e que agem por mecanismos diversos (AZULAY & AZULAY, 1999b).

A palavra eczema deriva do grego, podendo ser entendido como “estado de ebulição” da pele. O termo é amplamente empregado na prática clínica dermatológica para definir o estado patológico da pele em que predominam condições inflamatórias caracterizadas pelos sinais eritema, edema, vesiculação (elevação circunscrita com líquido no interior), secreção, infiltração e crostas (SAMPAIO *et al.*, 1987). Com o tempo, a doença evolui para uma forma mais crônica onde predominam as escamas e liquenificação (aumento da espessura da epiderme), associados sempre ao sintoma prurido, em intensidades variáveis. Este é causado pela liberação de certas substâncias que excitam as terminações nervosas cutâneas, sendo os estímulos levados ao córtex cerebral.

O eczema é definido como um tipo de resposta inflamatória da pele onde há predomínio de infiltrado linfo-histiocitário em torno dos vasos da derme superior, em associação com graus variados de espongiose (edema intercelular) e acantose (aumento da espessura da camada espinhosa).

Com frequência os termos “eczema” e “dermatite” são usados como sinônimos, sendo o termo “dermatite” capaz de incluir todos os tipos de inflamação cutânea, interpretando-se assim, que todos os eczemas são dermatites, mas nem toda dermatite é eczema.

A classificação das formas clínicas de eczema é difícil porque, além da nomenclatura ser controversa, em muitos casos estão implicadas múltiplas causas e/ou duas ou mais formas podem estar presentes, simultânea ou seqüencialmente.

Considerando critérios clínicos e causas, os eczemas podem ser agrupados nos seguintes tipos principais:

1. Eczema ou Dermatite eczematosa de contato.
2. Eczema ou Dermatite eczematosa atópica.

3. Eczema ou Dermatite numular.
4. Eczema circunscrito ou Líquen simples.
5. Eczema ou Dermatite eczematosa de estase.
6. Eczema Disidrósico ou Disidrose.

Os eczemas são patologias cutâneas muito frequentes, sendo mais comum o eczema de contato; seguido pelo atópico, sendo os demais tipos mais raros.

2.2.1 Eczema de Contato (Dermatite de Contato)

Por constituir a forma mais comum das dermatites e por ser a manifestação clínica observada durante o estudo, o detalhamento da dermatite eczematosa se concentrará apenas no eczema de contato.

Existem quatro tipos de dermatite de contato com etiofisiopatogenias distintas: dermatite de contato alérgica (DCA), dermatite de contato fototóxico (DCFT), dermatite de contato fotoalérgico (DCFA) e dermatite de contato por irritação primária (DCIP).

2.2.1.1 Dermatite de contato alérgica (DCA)

A DCA corresponde a uma reação imunológica, onde há hipersensibilidade retardada ou mediada por células (hipersensibilidade tipo IV). A substância contactante é capaz de penetrar na pele e estimular o sistema imunológico do indivíduo a produzir linfócitos T que liberam várias citocinas, provocando uma reação inflamatória.

O tempo deste processo será de poucos dias para alérgenos fortes (sete a quatorze dias), podendo levar anos para outros antígenos. Em geral, a hipersensibilidade adquirida persiste por toda vida.

Neste tipo de dermatite, os agentes etiológicos são substâncias químicas pouco complexas tais como os metais cromo (couros), níquel (utilidades domésticas) e mercúrio (remédios); antibióticos (penicilina e neomicina); cosméticos (eosina, fenol, formol e outros) e objetos plásticos (polietileno, acrílicos, polivinil).

Clinicamente, a DCA pode apresentar-se de três formas, sendo que em todas há ocorrência de muito prurido: aguda (eritema, vesículas, exsudação e crostas); subaguda (eritema, pápulas, escamas e crostas); crônica (liquenificação).

2.2.1.2 Dermatite de contato fototóxico (DCFT)

É desencadeado por substâncias que se transformam em elementos fototóxicos pela ação da radiação UVA, levando a uma reação eczematosa. Não existe mecanismo imunológico na formação do eczema.

2.2.1.3 Dermatite de contato fotoalérgico (DCFA)

O mecanismo etiopatogênico é o mesmo da dermatite alérgica de contato, com participação da luz solar no desencadeamento do processo. A formação da reação imunológica do tipo IV necessita da presença concomitante da radiação apropriada e do fotoaergeno. Após a absorção da energia da luz, a substância é convertida em molécula em estado ativado. Neste processo, a molécula se une ao carregador proteico para formar um antígeno completo. Uma vez que o antígeno é formado, o mecanismo que se segue é o mesmo da DCA.

2.2.1.4 Dermatite de contato por irritação primária (DCIP)

A DCIP é mais comum do que a DCA e de acordo com MATHIAS e MAIBACH (1978) pode ser definida como “uma reação inflamatória local não-imunológica caracterizada por eritema, edema ou descamação, devido a uma única ou repetidas aplicações de substâncias químicas ao mesmo local cutâneo”. Geralmente é provocada por substâncias alcalinas ou ácidas fracas que produzem irritação cutânea. Estas substâncias, ao entrarem em contato com a pele causam reação inflamatória na derme e as características clínicas surgem horas após o contato com agentes irritantes fortes ou depois de semanas de contato com agentes irritantes fracos. Ocorre sensação de dor e queimação e o prurido é discreto ou ausente.

A *dermatite de contato por irritante primário absoluto* é desencadeada pela ação cáustica de substâncias quando em contato com a pele. Ocorre pela capacidade

da substância em provocar dano tecidual. Não existe susceptibilidade individual e os sintomas surgem abruptamente, havendo melhora rápida após a suspensão do contato. Geralmente é conseqüente do contato acidental.

A *dermatite de contato por irritante primário relativo* é a forma mais freqüente de dermatite de contato por irritação. Pode surgir após dias, semanas, meses ou anos de exposição ao agente causador. O seu aparecimento depende das características da substância irritante, do tempo de exposição e da periodicidade do contato com o agente irritante. A freqüente exposição à água, sabões e detergentes favorecem a irritação.

Uma observação importante é que não há envolvimento do sistema imunológico, e portanto qualquer indivíduo em contato com as substâncias específicas desenvolvem a DCPI, que fica restrita ao local de contato (SAMPAIO *et al.*, 1987).

Existem variações na suscetibilidade dos indivíduos e de regiões do mesmo indivíduo que dependem principalmente da espessura da camada córnea. A sensibilidade da pele está relacionada com o grau de queratinização e densidade das glândulas sudoríparas e folículos de cabelo (NICANDER, 1998). Com a diminuição da umidade relativa do ar, a pele pode ficar desidratada permitindo a penetração de irritantes através do extrato córneo (Figura 6).

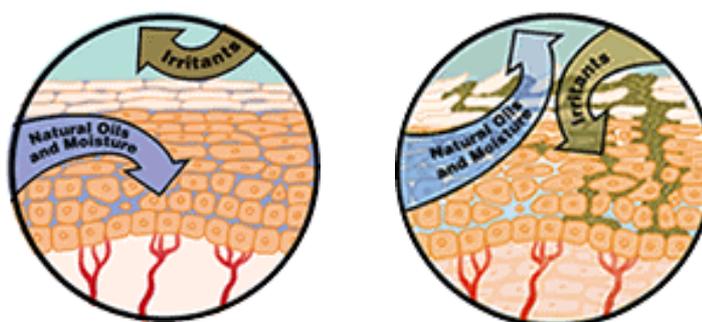


Figura 6 – Atuação do irritante na pele hidratada (esquerda) e pele desidratada (direita) (extraído de www.skinmdnatural.com).

A resposta histopatológica na DCPI é caracterizada, em alguns casos, por alterações que ficam limitadas à camada mais superficial da epiderme, enquanto que em outros casos há envolvimento de todo epitélio. A resposta é dependente do

irritante em contato. FARTASCH (1997) mostrou que irritantes diferentes induzem alterações distintas aos componentes do extrato córneo.

Na Figura 7 são apresentadas algumas manifestações de dermatite de contato por irritantes primários. Os irritantes utilizados foram: figura (a) henna; (b) desodorante e (c) esmalte de unhas.

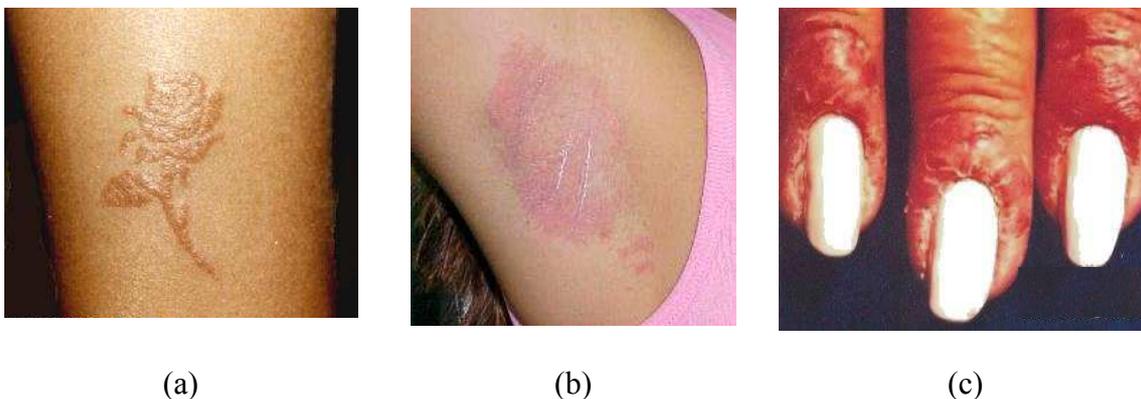


Figura 7 – Exemplos de dermatites de contato por irritante primário: (a) henna, (b) desodorante, (c) esmalte de unhas (extraído de www.dermatologia.net).

a) Irritantes

De acordo com KLIGMAN e WOODING (1967), uma irritação primária prejudica a pele por ação citotóxica direta sem sensibilização prévia.

Dentre os irritantes mais comuns podem-se destacar: tintas de cabelo, cosméticos em geral (tais como pós, cremes nutritivos e de limpeza), perfumes e colônias (desodorantes), depilatórios, sabões e esmalte de unhas, óleos de bronzear e protetores anti-solares, tecidos como náilon e poliéster, couro de sapatos, pulseiras, relógios e brincos.

Muitos irritantes primários têm sido usados para provocar DCPI experimentalmente, como lauril sulfato de sódio (*SLS*) e ácido nonanóico. WAHLBERG e MAIBACH (1980) sugeriram que o irritante selecionado deveria ser quimicamente bem definido, não apresentar valores extremos de pH e não causar toxicidade sistêmica, sensibilização, inconveniência cosmética ou efeitos carcinogênicos naqueles expostos ao irritante.

b) Processo de inflamação

A inflamação é a reação do organismo à invasão por um agente infeccioso ou apenas reação a uma lesão física. Esta reação atrai leucócitos e moléculas plasmáticas para o local de infecção ou dano tecidual.

Durante a reação inflamatória são identificados dois eventos diferenciados e que se relacionam (ABBAS *et al.*, 2000):

Eventos Vasculares

Os eventos vasculares ocorrem na microcirculação. O rubor e o aumento de temperatura local que caracterizam as regiões de inflamação se devem a maior quantidade de sangue fluindo através dos vasos locais. O aumento do fluxo sanguíneo, por sua vez, se deve a uma vasoconstrição arterial, seguida por dilatação ativa e intensa das arteríolas, capilares e veias do local. O edema associado é resultado da exsudação dos vasos a partir das vênulas.

O aumento da permeabilidade capilar é causado pela retração das células endoteliais abrindo as junções intercelulares e possivelmente também pelo aumento no transporte vesicular através do endotélio (WILLIAMS & KUPPER, 1996). Isto permite que moléculas de maior peso molecular atravessem o endotélio, facilitando a chegada de anticorpo, complemento e moléculas de outros sistemas enzimáticos do plasma (sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas) no local da inflamação. Este aumento de líquido no local da inflamação leva a um aumento da drenagem linfática, permitindo que o agressor seja retirado e levado até linfonodos, onde entra em contato com células do sistema imune adaptativo. A causa imediata de tais modificações é a ação local dos chamados mediadores químicos da reação inflamatória aguda. Estes mediadores são sistemas de enzimas plasmáticas, citocinas e produtos de mastócitos, plaquetas e leucócitos.

Mediadores

– **Aminas vasoativas:** A histamina e a serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A liberação de

histamina pelos mastócitos e basófilos é desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo e pelo sistema complemento.

– **Sistema de Coagulação:** A função final do sistema de coagulação é a produção de fibrina, elemento essencial para a formação do trombo sangüíneo. Este sistema pode ser desencadeado por injúria tecidual ou por fatores liberados pelos tecidos, e tem como função durante a resposta inflamatória delimitar a área inflamada impedindo a rápida disseminação do agressor.

– **Sistema Fibrinolítico:** Sua função dentro da coagulação sangüínea é de desfazer os trombos e deste modo manter um fluxo sangüíneo contínuo. Dentro da resposta inflamatória está envolvida na ativação do sistema complemento e participar do aumento da permeabilidade vascular.

– **Sistema Cininas:** Este sistema de enzimas tem como função a ativação das plaquetas e produção de bradicinina e calicreína. A bradicinina é um potente agente vasoativo, produz vasodilatação, contração da musculatura lisa e produz dor. A calicreína é um agente quimiotático para neutrófilo.

– **Citocinas:** as citocinas são um tipo especial de mediadores que podem ser produzidos pelas células do tecido afetado, e atraem linfócitos e fagócitos.

– **Produtos do metabolismo do ácido araquidônico:** O ácido araquidônico é encontrado em fosfolípidos de membranas celulares em mastócitos, basófilos, macrófagos e células endoteliais. Os produtos gerados do metabolismo do ácido araquidônico são o leucotrieno e a prostaglandina. As prostaglandinas agem na vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas, potencializa a dor, vasoconstrição e modula a função de macrófagos. Os leucotrienos promovem quimiotaxia, aumento da permeabilidade vascular, agregação e pavimentação de leucócitos nas células endoteliais e vasoconstrição.

Eventos Celulares

Em condições normais, os leucócitos circulam através de todos os tecidos do organismo. Cada grupo celular possui um padrão característico de migração. Quando ocorre inflamação em um determinado local ocorre uma reação de atração de leucócitos de diferentes populações para o tecido inflamado (BEVILACQUA, 1993). O aumento da permeabilidade vascular associado à dilatação do leito capilar e venoso,

além de outros fatores como o aumento da adesividade das plaquetas e a hemoconcentração, colaboram para um progressivo retardo da circulação na área inflamada. Uma das conseqüências é a mudança no padrão de circulação. Em condições normais, os elementos figurados do sangue circulam no centro da corrente e o fluido circula em contato com o endotélio. Na inflamação esta condição se modifica, as células passam a circular por toda a coluna sanguínea, facilitando o contato dos leucócitos com as células endoteliais. O processo de aproximação dos leucócitos à parede do vaso próximo ao local de inflamação é denominado marginação dos leucócitos, enquanto que sua adesão denomina-se pavimentação e sua passagem para o tecido chama-se diapedese (ABBAS, 2000). A migração para a área inflamada ocorre direcionada através de agentes quimiotáticos que são produtos de origem variada cuja ação resulta em marginação, pavimentação e diapedese de leucócitos para o tecido inflamado. São agentes quimiotáticos os fragmentos do sistema complemento ativado; fatores derivados do sistema fibrinolítico, sistema cininas; produtos de leucócitos e plaquetas; produtos de determinadas bactérias.

Na primeira fase de reação inflamatória, os neutrófilos são os mais numerosos leucócitos a entrarem no local afetado, encarregando-se da fagocitose, por exemplo, de bactérias. Os neutrófilos morrem durante o processo de destruição do invasor, constituindo a substância amarelada e espessa chamada pus. Outro efeito combinado de produtos de neutrófilos e endotoxinas bacterianas (pirogênios) é a elevação da temperatura corporal, gerando o surgimento da febre. Outros leucócitos fagócitos, principalmente monócitos, entram secundariamente no local de inflamação. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos, fagocitam bactérias e restos teciduais. Com o tempo as características da população celular no local da inflamação muda. Os macrófagos permanecem mais tempo no local que os neutrófilos e têm papel importante na resposta imune, pois vão apresentar antígenos aos linfócitos. Os eosinófilos, os basófilos e linfócitos passam a atuar principalmente em estágios mais avançados da inflamação desencadeando a resposta imune. A migração de grande quantidade de linfócitos para o local vai permitir que o pequeno número de linfócitos específicos para cada antígeno, tenha a chance de se encontrar com o antígeno (NEUTRA, 1996).

As células fagocíticas fazem parte da resposta imune inata compreendendo a primeira linha de defesa do organismo e estão relacionadas com o processo de inflamação. Os fagócitos estão divididos em duas categorias: os

monócitos/macrófagos e os granulócitos. Além destas células a resposta imune é assessorada por inúmeras células com características bastante distintas. As células acessórias incluem: células apresentadoras de antígenos; plaquetas; mastócitos; células endoteliais.

c) Inflamação da pele

O controle das reações imunes e inflamatórias na pele é feito pela liberação de citocinas e eicosanóides na comunicação célula-célula. Este processo de controle ainda não é totalmente entendido, principalmente devido à natureza complexa dos vários mecanismos de *feedback* que existem entre mais de 30 fatores químicos. O fenômeno complexo de irritação da pele envolve células epidérmicas residentes, fibroblastos dérmicos e células endoteliais, assim como leucócitos invasores interagindo uns com outros sob controle de uma rede de citocinas e mediadores lipídicos (BOSS & KAPSENBERG, 1993). Embora a função primária dos queratinócitos seja manter a integridade estrutural e a função de barreira da epiderme, nas últimas três décadas tem sido esclarecido que estas células desempenham uma importante função na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória e imunológica da pele através da liberação de citocinas (McKENZIE & SAUDER, 1990). Enquanto os queratinócitos presentes produzem algumas citocinas, uma variedade de estímulos ambientais, tais como tumores, raios ultravioletas e agentes químicos, podem induzir os queratinócitos epidérmicos a liberarem citocinas inflamatórias (interleucina 1 – [IL-1], fator de necrose tumoral – [TNF]), citocinas quimiotáticas (IL-8, IP-10) e citocinas promotoras de crescimento (IL-6, IL-7, IL-15). Dentre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, apenas a IL-1a e o TNF-a ativam um número suficiente de mecanismos que independentemente desencadeiam a inflamação cutânea (KUPPER, 1990). Como a IL-1a é produzida pelos queratinócitos e fica retida na célula, a epiderme constitui de um vasto reservatório de IL-1a (KUPPER & GROVES, 1995). Qualquer dano provocado na pele desencadeia a liberação de IL-1a pelos queratinócitos, que é essencialmente o evento primário na defesa da pele. As IL-1a estimulam posteriormente outras IL-1a e a produção e liberação de outras citocinas como IL-8 e IL-6. Estas citocinas, por sua vez, são ativadoras de células pró-inflamatórias. Além de serem diretamente quimiotáticas aos leucócitos, as IL-1a induzem a expressão de moléculas de adesão intercelulares na superfície de células

endoteliais e fibroblastos (KUPPER & GROVES, 1995). Assim, a resposta inflamatória pode ser rapidamente gerada via cascata e rede de citocinas.

Neste cenário, os queratinócitos agem como transdutores de sinais pró-inflamatórios respondendo a um estímulo externo não-específico com a produção de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos, preparando a pele para uma atividade imunológica específica. O padrão histopatológico de quase toda doença inflamatória da pele pode ser atribuído a citocinas apropriadas ou combinadas. O padrão de citocinas expressas no local desempenha uma importante função na modulação da natureza da inflamação tecidual. Por esta razão, é importante lembrar que diversos mecanismos e tipos de células estão envolvidos na indução da resposta inflamatória da pele.

2.2.2 Patogênese das Doenças da Pele

A dermatite de contato segue um padrão de reação cutânea conhecido como *padrão de reação espongiótico*. Esta reação é caracterizada por edema intercelular na epiderme (espongiose) com alongamento das pontes intercelulares. Pode variar de focos microscópicos até vesículas reconhecidas macroscopicamente.

O conceito de espongiose é anatomopatológico, enquanto que a denominação eczema refere-se a um padrão clínico de lesão. Apesar de todos os eczemas mostrarem espongiose à microscopia em algum estágio de sua evolução, o padrão clínico da espongiose é muito variável, podendo apresentar-se como eczema, eritema e lesões vesico-bolhosas.

Células inflamatórias estão presentes na derme e entre as células da epiderme (exocitose) e seu tipo e padrão de distribuição permite fazer um diagnóstico específico dentro do grupo de doenças espongióticas.

A maioria das doenças cutâneas com este padrão (dermatite atópica, dermatite de contato, dermatite seborréica) desenvolve progressiva hiperplasia psoriasiforme da epiderme com sua cronificação. Esta alteração usualmente é acompanhada de diminuição da espongiose.

Histologicamente, as dermatites são classificadas em: aguda, subaguda e crônica.

Na dermatite aguda, o estrato córneo se encontra normal, a epiderme pode estar normal ou espessada com a presença de edema entre os queratinócitos

progredindo para formação de vesículas intraepidérmicas, que podem se romper com formação de crostas. Há presença de exocitose de linfócitos e infiltrado linfocitário ao redor dos vasos superficiais (derme). Os eosinófilos podem estar presentes tanto no infiltrado, como nas áreas de espongiose (mais freqüente nas DCA). Na DCIP pode ocorrer ulceração extensa, necrose e acantólise (perda de coesão entre as células espinhosas com formação de espaços, vesículas ou bolhas intra-epidérmicas) dependendo do agente irritante. A dermatite é considerada aguda quando a substância causadora tem concentração alta e a resposta é imediata à exposição.

A dermatite subaguda é caracterizada por apresentar epiderme acantótica (aumento da espessura da camada espinhosa), com paraqueratose (retenção de núcleos picnóticos na camada córnea), e pouca ou moderada espongiose. O infiltrado inflamatório é menos proeminente.

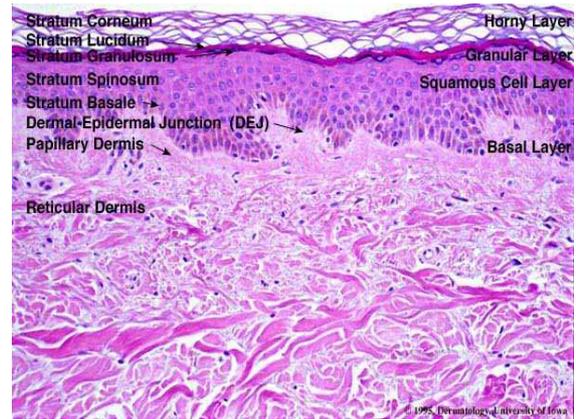
Na dermatite crônica, são observados hiperqueratose (aumento da espessura da camada córnea), paraqueratose, hipergranulose (aumento do número de células da camada granulosa), liquenificação (aumento da espessura da epiderme) com acantose moderada. A espongiose está presente em focos mínimos e o infiltrado inflamatório é esparso. Há presença de fibrose nas papilas dérmicas. A dermatite é considerada crônica quando a pele é exposta repetidamente a substâncias irritativas de baixa concentração, provocando um dano cumulativo. É o caso do eczema de mãos de indivíduos que lidam diariamente com sabões e detergentes (BARNHILL, 2004).

A seguir serão apresentadas algumas ilustrações de cortes histológicos cutâneos para observação da pele normal e das principais alterações histológicas que ocorrem durante o processo de irritação. Neste caso, a irritação está presente nas mãos e está relacionada ao uso de detergentes.

A Figura 8 (a e b) ilustra cortes histológicos da pele normal com todas as camadas sem alterações histológicas.



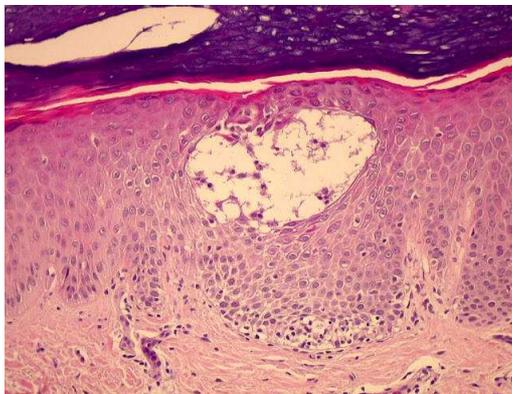
(a)



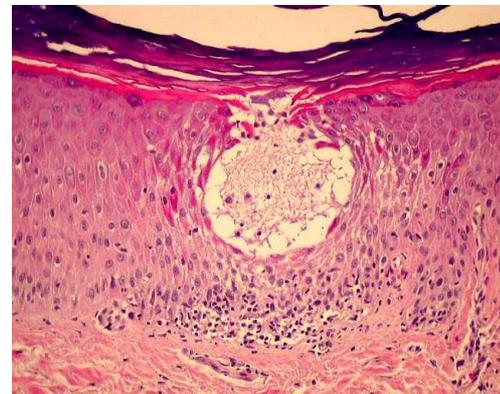
(b)

Figura 8 – Cortes histológicos da pele normal (extraído de www.fcm.unicamp.br) ampliada em 100x.

Na Figura 9a observa-se a epiderme acantótica, com espongiose e formação de vesículas e bolhas. Estas contêm material amorfo ou filamentososo, queratinócitos em degeneração, detritos celulares, alguns neutrófilos e hemácias. Na figura 9b observa-se o rompimento da bolha na superfície, com extravasamento do seu conteúdo para o estrato córneo. Este achado é comum na fase aguda do eczema e explica o significado do termo (efervescência ou ebulição).



(a)



(b)

Figura 9 – Corte histológico da pele com irritação: a) presença de vesícula; b) rompimento da vesícula (extraído de www.fcm.unicamp.br).

Na Figura 10 pode ser observada a presença de espongiose (edema intercelular), notada como fendas claras entre as células da epiderme.

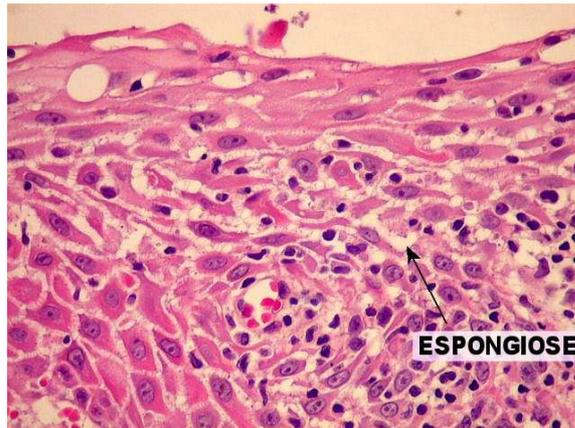


Figura 10 – Corte histológico da pele com irritação: presença de espongiose (extraído de www.fcm.unicamp.br).

A Figura 11 ilustra as camadas basal e suprabasal da epiderme onde pode ser observado um infiltrado inflamatório crônico inespecífico. Este infiltrado é denominado exocitose, independente se agudo ou crônico.

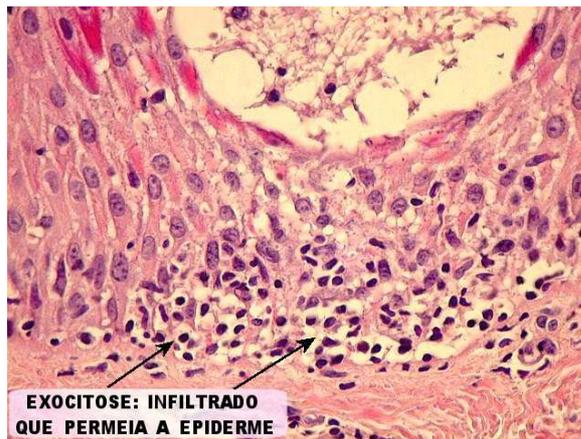


Figura 11 – Corte histológico da pele com irritação: presença de infiltrado inflamatório (extraído de www.fcm.unicamp.br).

2.2.3 Testes de Contato (*Patch Test*)

O teste de contato ou teste epicutâneo é o método mais eficiente para confirmar o diagnóstico etiológico da dermatite alérgica de contato. A presença de teste positivo a certa substância, relacionada com a história clínica do paciente, possibilita identificar os materiais que, em contato com a pele do paciente, podem desencadear um quadro eczematoso (AGNER & SERUP, 1990).

Este teste também pode auxiliar na distinção entre dermatite de contato alérgica e dermatite de contato por irritação primária. A ausência de testes positivos

em pacientes com quadro de dermatite de contato pode confirmar a hipótese de quadro eczematoso ocasionado pela ação de um irritante na pele.

O teste baseia-se no princípio da participação dos linfócitos T sensibilizados e macrófagos (reação tipo IV de hipersensibilidade tardia). Os linfócitos T são capazes de se tornarem sensíveis (imunologicamente competentes) e passarem essa hipersensibilidade a outros linfócitos. Os linfócitos sensíveis distribuem-se pelo sistema linfático, ou sanguíneo, a todo organismo, tornando o tegumento cutâneo capaz de responder ao antígeno (ROBINSON & PERKINS, 2002).

O tempo mínimo necessário para a produção de um estado de sensibilização cutânea é de 5 dias. Durante o período de incubação, antes do aparecimento do quadro inflamatório cutâneo, há tumefação dos linfonodos e aumento do número de linfócitos. Quando sensibilizados, em presença do antígeno, os linfócitos determinam vasodilatação e reação epidérmica.

Os testes em geral são aplicados no dorso dos pacientes, por se tratar de área que, pela sua extensão, possibilita a colocação de número adequado de substâncias (Figura 12).

Existem vários materiais que facilitam a aplicação dos testes. Esses materiais são compostos por fitas adesivas hipoalergênicas com câmaras de papel, alumínio ou plástico, sobre as quais são colocadas as substâncias da bateria de testes. Como exemplo, cita-se o *Finn Chambers*, disponível no mercado. Na falta destes aplicadores, as substâncias podem ser aplicadas sobre quadrados de papel de filtro de 1 cm de lado aderidos em fita adesiva tipo *micropore* e distantes entre si de 2 cm.

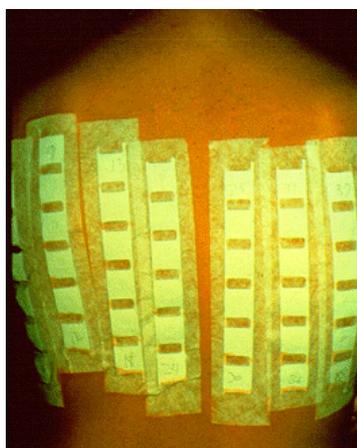


Figura 12 – Ilustração do teste de contato cutâneo (*Patch Test*) (extraído de www.cdc.gov).

Após 48 horas o material é removido, deixando-se a área cutânea exposta por 15 a 30 minutos e em seguida é realizada a primeira leitura do teste. A segunda leitura é feita 24 horas após a retirada do material. Os resultados são anotados de acordo com a tabela preconizada pelo Grupo Internacional Investigador de Dermatites de Contato, a seguir referida:

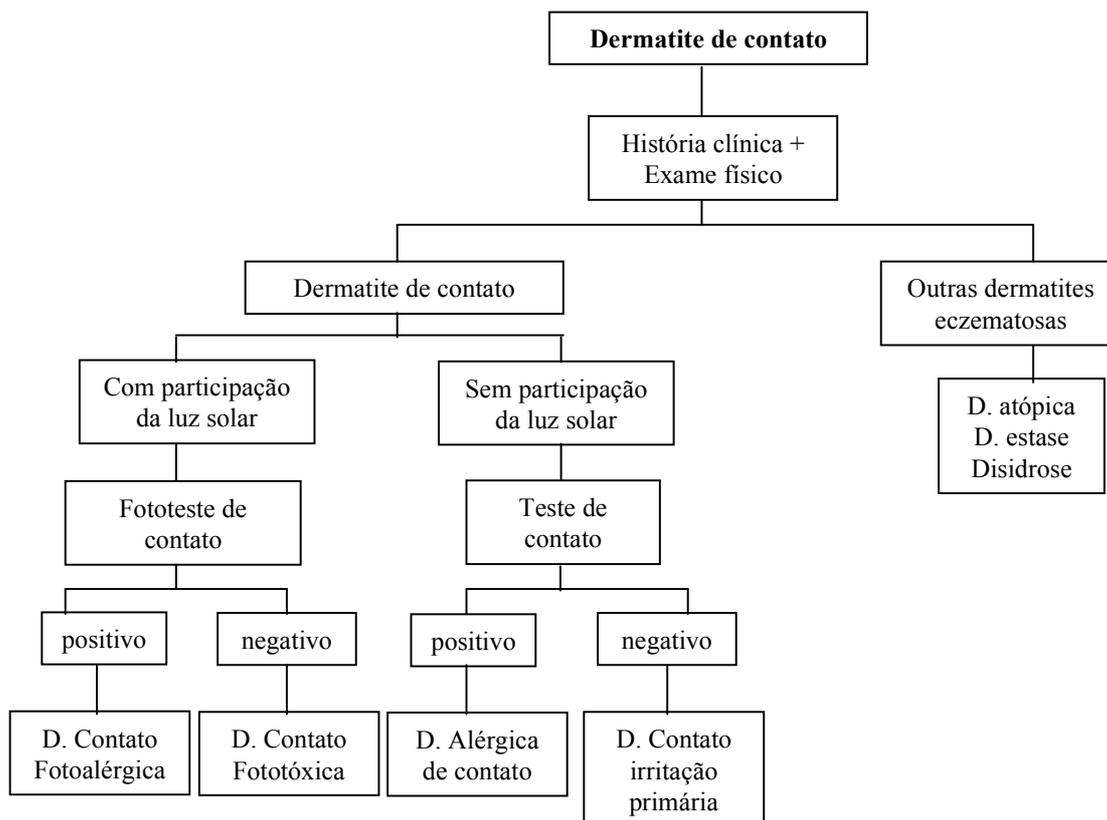
Tabela 1: Leitura dos Testes de Contato indicada pelo Grupo Internacional Investigador de Dermatites de Contato.

Reação	Resultado
Ausente	Negativo (-)
Leve eritema	Duvidoso (?)
Discreto eritema com algumas pápulas (lesão elevada com até 1 cm de diâmetro)	Positivo (+)
Eritema + Pápulas + Vesículas (elevação com menos de 1 cm de diâmetro e com líquido no interior)	Positivo (++)
Eritema intenso + Pápulas + Vesículas confluentes	Positivo (+++)

Quando o paciente apresenta todos os testes de contato negativos, as seguintes eventualidades podem ocorrer:

- Trata-se de caso de dermatite de contato por irritação primária;
- Houve falha na aplicação do teste epicutâneo;
- Houve exposição solar prévia no local da aplicação dos testes;
- O tempo de leitura do teste foi insuficiente;
- A substância alergizante não foi testada;
- A substância testada é fotossensibilizante;
- Ocorreu uso de corticóide tópico no local da aplicação do teste.

O teste epicutâneo é recomendado em casos de dermatite de contato. Porém, para o paciente ser submetido aos testes, deve, no momento da aplicação, apresentar sua dermatose em fase inativa. O diagnóstico da dermatite é baseado no algoritmo descrito a seguir:



2.3 Cosmetologia

Antes de iniciar a discussão sobre cosmetologia e sua relação com a segurança de saúde do consumidor convém definir conceitos sobre produto cosmético e ingrediente cosmético.

De acordo com a definição conferida pela legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000), Cosméticos, Produtos de Higiene e Perfumes “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”.

A definição de ingrediente cosmético engloba “qualquer substância química ou preparação de origem sintética ou natural, com exceção dos compostos odoríficos e aromáticos que entrem na composição dos produtos cosméticos”.

Atualmente, quando um fabricante deseja incluir um novo ingrediente ou produto cosmético no mercado, a lei exige que sejam efetuados determinados ensaios toxicológicos a fim de avaliar a segurança para a saúde humana dos ingredientes e combinações de ingredientes presentes na composição dos produtos cosméticos. Esses produtos não devem ser nocivos nem em curto prazo (causando, por exemplo reações alérgicas), nem em longo prazo (provocando anomalias congênitas).

As doenças por hipersensibilidade constituem um dos problemas de saúde mais comuns e mais dispendiosos em países industrializados. Em 1994, a FDA (*Food and Drugs Administrations, USA*) recebeu aproximadamente 200 relatos de reações adversas a cosméticos, 65 dos quais correspondiam a produtos para tratamento da pele e maquiagem. A maioria dos relatos era relativa a irritações cutâneas e alérgicas.

Os ensaios toxicológicos de cosméticos são realizados principalmente em animais, dentre eles o rato, o coelho e o porquinho da Índia. Inicialmente, usam-se baterias de ensaios, submetendo os animais à exposição por diferentes vias. Procedese, então, à observação dos efeitos e seu somatório, para cada um dos quais se determina geralmente uma curva dose/efeito e um resultado médio. Posteriormente, são determinados os mecanismos que permitam transformar a relação da substância em teste no animal em uma relação no homem.

Devido à evolução técnico-científica, na década de 80 iniciou-se o desenvolvimento de modelos experimentais alternativos para a área cosmética, em substituição ao uso de animais de laboratório. Metodologias foram desenvolvidas, inicialmente, para responder corretamente as necessidades de pesquisa em farmacologia, onde se sabe que o comportamento animal pode ser diferente do humano. Os métodos alternativos também foram contemplados para a avaliação de efeitos toxicológicos. Isto resulta fundamentalmente da percepção pública de que, laboratórios de toxicologia administram rotineiramente materiais como batons, xampus ou outras substâncias na pele e olhos de animais causando dor e estresse. O grande nível de sofrimento a que os animais são sujeitos, tem sido ao longo dos anos alvo de ataque por parte da opinião pública, obrigando inúmeras empresas a investir na pesquisa de métodos alternativos.

Vários esforços têm sido efetuados para a diminuição do uso e do sofrimento de animais. Em 1984, o Governo Britânico concedeu fundos para o desenvolvimento de métodos alternativos ao FRAME - *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments*. Em 1994, foi inaugurado o ECVAM - *European Committee for*

Validation of Alternative Methods - instituição da Comissão Européia encarregada de promover e validar técnicas e metodologias destinadas à substituição dos ensaios em animais. Algumas instituições, como CTFA - *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association*, IRAG - *Interagency Regulatory Alternatives Group*, FDA - *Food and Drug Administration* e *Alternatives to Animal Testing*, John Hopkins University, Baltimore - USA, são referências para acelerar a padronização e a harmonização de metodologias *in vitro*.

2.3.1 Análise da segurança de um produto cosmético

A análise da segurança de um produto depende da sua utilização, uma vez que esta é determinante na quantidade de substância que poderá ser ingerida, inalada ou absorvida pelo consumidor. Assim, antes de qualquer avaliação ou análise de risco de um produto, o grau e a via de exposição (pele, mucosas, ingestão, inalação) do consumidor deverão ser considerados.

Em virtude desta variabilidade, não é possível indicar níveis específicos de utilização e exposição de cosméticos, sendo necessária fazer uma abordagem individual na avaliação da segurança após a obtenção dos resultados de toxicidade.

Devido à grande complexidade que envolve parâmetros relacionados às avaliações de risco, algumas considerações, definidas pela ANVISA (2003), se tornam necessárias para um maior entendimento do assunto.

1 - Dano e risco: o dano é o prejuízo à saúde em função da propriedade inerente de uma substância; o risco é a probabilidade de ocorrência do dano;

2 - Os ingredientes para uso em produtos cosméticos devem ser avaliados em termos de risco e não de dano, conseqüentemente a avaliação do risco deve relacionar o dano com o nível de exposição;

3 - A avaliação de segurança deve atender o conhecimento dos parâmetros toxicológicos de interesse dos ingredientes com base em dados correntes, observadas as condições de uso do produto cosmético e o perfil do consumidor alvo;

Os tipos de reações que podem ser observadas em conseqüência do uso de um produto cosmético são:

- Irritação: intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto menores, mas também a reações mais ou menos agudas, variando sua intensidade, desde ardor, coceira e pinicação podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido. Todas estas reações se restringem à área em contato direto com o produto;
- Sensibilização: corresponde a uma alergia, que é uma reação de efeito imediato (de contato ou, urticária) ou tardio (hipersensibilidade). Ela envolve mecanismos imunológicos e pode aparecer em outra área, diferente da área de aplicação. Portanto, é importante insistir que no campo da imunologia deve-se, não apenas, verificar se um produto pode desencadear uma resposta alérgica em pessoas pré-sensibilizadas, mas também, verificar se o próprio produto não é capaz de induzir uma reação alérgica ao consumidor;
- Efeito sistêmico: resultante da passagem de quaisquer ingredientes do produto para a circulação geral, diretamente por via oral, inalatória, transcutânea ou transmucosa, metabolizados ou não.

De maneira geral, deve-se considerar que:

- Na grande maioria dos casos, o risco sistêmico é avaliado a partir dos dados relativos às matérias primas. Não se conhece efeitos toxicológicos sistêmicos em produtos acabados que não sejam causados pelos próprios ingredientes. Portanto, é importante prever este tipo de risco para os produtos que eventualmente possam ser ingeridos ou inalados, ou aqueles destinados a uma população em particular (crianças, gestantes, etc.);
- Ao contrário, as reações de irritação, decorrentes da penetração cutânea ou de mucosa dos ingredientes, estão relacionadas às concentrações de uso no produto final e sua formulação cosmética;
- Entre estas duas situações extremas, o risco de alergia pode decorrer tanto em função dos ingredientes quanto do produto final. Na realidade, a reação é basicamente atribuída a algum ingrediente cuja reatividade pode ser desencadeada ou potencializada pela fórmula do produto acabado.

Assim, com base nas informações obtidas, pode-se chegar a alguma das seguintes conclusões:

- a) Os dados são suficientemente claros para assegurar o uso do produto cosmético avaliado por parte dos consumidores, respeitadas as condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso;
- b) Os dados disponíveis permitem a comercialização do produto em condições restritas de uso, claramente expressas na rotulagem;
- c) Os dados não são suficientes para atestar a segurança do produto e necessita-se empreender novas pesquisas ou testes adicionais para avaliar a ausência de risco para os consumidores alvo;
- d) Os dados são suficientes para desaconselhar a comercialização do produto.

2.3.2 Ensaio de toxicidade

As substâncias analisadas nos ensaios de toxicidade devem ter especificações semelhantes às usadas nos produtos comercializados, uma vez que pequenas alterações na sua natureza podem alterar a sua toxicidade.

A determinação do potencial tóxico é o primeiro passo na análise de risco de um ingrediente e consiste de uma série de estudos de toxicidade. Assim, quando requerido, o fabricante de um produto cosmético deve disponibilizar a informação relativa aos seguintes ensaios: 1. Toxicidade aguda; 2. Absorção cutânea; 3. Irritação cutânea; 4. Sensibilização cutânea; 5. Mutagenicidade; 6. Fotomutagenicidade e fototoxicidade; 7. Toxicidade sub-crônica; 8. Irritação de membranas mucosas; e 9. Dados humanos (se disponíveis).

Na falta de disponibilização de métodos substitutivos *in vitro* adequados e válidos, e por razões éticas evidentes, a maioria destes testes feitos com ingredientes só pode ser razoavelmente avaliada, hoje, em animais. No entanto, é da responsabilidade do pesquisador, bem como, dos avaliadores dos dados, a redução máxima do número de animais de laboratório utilizados e também, a máxima redução de seu sofrimento.

De acordo com o Artigo 7 da diretiva 86/609/EEC relativa à proteção de animais, um ensaio *in vivo* não deve ser executado na eventual existência de outro método científico *in vitro* válido, satisfatório, razoável e disponível na prática para obtenção do resultado desejado. Este princípio tem estimulado a criação de estratégias alternativas. Porém, estas novas metodologias ainda não foram suficientemente

validadas para utilização em alguns ensaios, como por exemplo, na avaliação de substâncias irritantes (EDWARDS & MARKS, 1995).

A dificuldade no emprego de tais métodos alternativos, hoje, reside na avaliação da reatividade de sistemas mais complexos o que é, na prática, o caso da avaliação de risco toxicológico. É necessário o acesso a uma bateria de testes que sejam complementares, de maneira que o conjunto destes ofereça um resultado com os mesmos níveis científicos e de informação, em relação aos obtidos, anteriormente, com os modelos em animais. Tais modelos alternativos devem ser, portanto, validados, de acordo com os procedimentos internacionais na área de aplicação para que sejam reconhecidos pelo meio científico e pelos órgãos regulamentadores.

Em relação à irritação cutânea, ainda não existem métodos alternativos válidos capazes de substituir o teste *in vivo* 404 da OECD (detalhado posteriormente). No entanto, em ensaios de corrosão da pele a ECVAM concluiu positivamente a validação de dois métodos *in vitro*: o Teste da Resistência Elétrica Transcutânea de Pele de Rato (TER) e o Teste EPISKIN. A corrosão da pele é definida como a produção de uma lesão irreversível seguida da aplicação de um material teste. O teste de corrosividade consiste em aplicar o produto sobre uma unidade de epiderme reconstruída. A viabilidade celular é avaliada pela medida da atividade mitocondrial, através do corante MTT que forma um precipitado azul (formazan) sobre as células viáveis, quantificado por espectrofotometria (ELSNER *et al.*, 1998).

2.3.2.1 Princípios do TER

O material a testar é aplicado por um período mínimo de 24 horas em discos de epiderme de ratos jovens (20-23 dias) mortos “sem sofrimento”. Para cada substância são utilizados três discos de pele. Os materiais a testar são então removidos por lavagem com jato de água tépida (até 30°C). A TER é mensurada usando uma corrente alternada de baixa voltagem. Antes de mensurar a TER a tensão superficial da pele é reduzida pela adição de etanol a 70%, seguida de hidratação com 3 mL de solução de sulfato de magnésio. Os eletrodos são colocados de cada lado do disco de pele para medição da resistência elétrica. Os materiais corrosivos são identificados pela sua habilidade de danificar a integridade do estrato córneo e da barreira funcional da pele, que é mensurada por um valor de TER abaixo ou igual a 5 k Ω . Se o valor obtido for superior a 5 k Ω , os materiais não são corrosivos.

2.3.2.2 *Princípios do EPISKIN*

O material a testar é aplicado topicamente por mais de 4 horas num modelo de pele humana tridimensional, contendo uma epiderme reconstituída e um estrato córneo funcional. Os materiais corrosivos são identificados pela habilidade de provocarem um decréscimo na viabilidade das células abaixo de níveis definidos em períodos de tempo específicos. A viabilidade das células é mensurada pela quantidade de redução de MTT (valor de densidade óptica). O disco de pele é colocado em 0,3 mg/mL de solução MTT (corante) a 20-28°C durante 3 horas. O precipitado azul formado é extraído e a concentração é mensurada pela determinação da densidade óptica a comprimento de onda entre 545 e 595 nm. O controle negativo do valor de DO (densidade óptica) representa 100% de viabilidade celular. Os valores obtidos para cada amostra podem ser usados para calcular uma porcentagem de viabilidade em relação ao controle negativo. Um valor percentual limite de viabilidade celular, distinguindo materiais de teste corrosivos de não corrosivos, deve ser claramente definido em um modelo antes do método ter validade, e o estudo subsequente de validação tem que demonstrar que este valor limite é apropriado.

2.3.3 **Testes toxicológicos *in vivo***

Produtos cosméticos necessitam de ensaios clínicos em humanos, para que as empresas possam oferecer aos consumidores, o máximo de segurança com o menor risco, garantindo as melhores condições de uso do produto. A partir das informações pré-clínicas coletadas, deve haver a comprovação de segurança de uso por humanos. Estas informações são importantes para determinação do modo e local de uso, advertências de rotulagem e orientações para o serviço de atendimento ao consumidor.

Os ensaios de compatibilidade têm por objetivo comprovar a inocuidade dos produtos em pele humana. São realizados de modo geral com apósitos oclusivos ou semi-oclusivos (*patch tests*) ou em modelos abertos (*open tests*). Representam o primeiro contato do produto acabado com um ser humano, e por isso devem seguir premissas de ordem ética (levantamento prévio de dados pré-clínicos segundo Resolução 196/96 do MS) e de boas práticas clínicas.

A avaliação do produto cosmético em humanos não ocorre no sentido de investigar o potencial de risco, mas sim, de confirmar a segurança do produto acabado.

No Brasil, o Conselho Nacional de Saúde regulamentou as pesquisas envolvendo seres humanos através da Resolução 196/96 e, constituiu a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), responsável, entre outros, pelo registro dos Comitês de Ética em Pesquisa Institucionais.

Como anteriormente referido, é ilegal distribuir cosméticos que contenham substâncias perigosas susceptíveis de provocar danos nos consumidores em condições normais. A diretiva 67/548/CEE referente à classificação de substâncias perigosas inclui nesta categoria as seguintes substâncias:

- Tóxicas: definidas como substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos graves, agudos ou crônicos, e mesmo a morte.
- Corrosivas: definidas como substâncias e preparações que, em contato com tecidos vivos, podem exercer uma ação destrutiva sobre estes últimos.
- Nocivas: substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos de gravidade limitada.
- Irritantes: substâncias e preparações não corrosivas que, por contato imediato, prolongado ou repetido com a pele ou as mucosas, podem provocar uma reação inflamatória.

A execução de testes *in vivo* na área dos cosméticos é prática corrente desde os anos 30. As firmas de cosméticos fazem-no para sua própria proteção, para estabelecer a segurança do produto e dos seus ingredientes e assegurar a ausência de efeitos tóxicos, irritantes, corrosivos ou nocivos para o consumidor (EDWARDS & MARKS, 1995).

No caso dos EUA, o *FDA*, ao contrário do que acontece para os produtos que atuam como fármacos, não requer aprovação governamental prévia para a comercialização de cosméticos. No entanto, na ocorrência de um problema de segurança com esse produto, após a sua introdução no mercado, o *FDA* pode exigir da firma a informação relativa a dados de segurança do produto. Uma vez que não existe atualmente informação suficiente de alternativas válidas à testagem animal para

garantir a segurança do consumidor, o *FDA* só poderá aceitar dados de testes de segurança executados em animais.

A cosmetologia talvez seja a área em que mais animais são utilizados nos ensaios toxicológicos. Nestes ensaios, procura-se demonstrar a possível toxicidade, inocuidade e as conseqüências do uso/manipulação das substâncias introduzidas na elaboração de produtos cosméticos, mediante a exposição de determinadas espécies animais inferiores a possíveis xenobióticos e a observação das conseqüências dessa exposição.

Para avaliação do risco e da segurança de um ingrediente ou produto em cosmetologia são referidos alguns testes toxicológicos em animais. Dentre estes testes, são realizados os testes de irritação cutânea, que podem ser feitos de duas formas dependendo do tipo de exposição do produto.

- Teste de irritação cutânea primária (teste 404 da OECD): são utilizados seis coelhos, sendo o material testado (0,6 mL de substância líquida ou semi-líquida) aplicado em locais da pele intacta ou irritada durante 4 a 24 horas, usando uma técnica de banda oclusiva. As áreas do teste são examinadas para detecção de eritema ou edema nas 24 e 72 horas após a aplicação e classificadas em uma escala de 0 a 9. Uma média combinada de 5 de todas as observações é considerada indicativa da presença de uma substância irritante.
- Teste de irritação cutânea sub-aguda: o procedimento é semelhante ao anterior, mas a pele intacta é untada diariamente durante 90 dias sem cobertura de bandagem. Como conseqüências da exposição contínua pode observar-se um efeito mumificante ou coagulativo da pele, necrose ou formação severa de escamas com posterior descamação.

Apesar do desenvolvimento de grande variedade de métodos alternativos experimentais, estes têm se provado, em grande parte, longe de serem seguros substituintes da experimentação animal. Uma das razões para esta situação é a complexidade de mecanismos envolvidos e a conseqüente falta de modelos *in vitro* capazes de refletir rigorosamente os mecanismos de dano celular.

De acordo com as principais instituições regulamentadoras da comercialização dos produtos cosméticos, os testes *in vivo*, particularmente os de irritação ocular e cutânea, constituem ainda os métodos mais viáveis para garantir a segurança de um

cosmético. Os testes alternativos poderão, em contrapartida ser úteis como instrumentos de pré-avaliação para indicação da toxicidade relativa da substância, não podendo demonstrar isoladamente a segurança da substância. Os efeitos de uma substância em uma reação bioquímica, ou em uma célula ou tecido específicos em cultura, podem diferir do seu efeito no organismo como um todo. Outro fator que é preponderante na dificuldade de aceitação de métodos alternativos é o insucesso dos estudos prévios de validação, imprescindíveis para a sua introdução na rotina laboratorial.

Os defensores ativistas dos animais defendem como principais desvantagens da experimentação animal o desconforto e mortalidade animal e o excessivo tempo e dinheiro despendido nestes ensaios.

No entanto, apesar da opinião pública ser favorável a novas iniciativas e aos cosméticos “Cruelty-Free”, é de conhecimento também geral e indiscutível que os testes sem animais são considerados por essa mesma opinião como dotados de um baixo fator de confiança comparativamente aos procedimentos animais.

Considerando a importância da segurança do produto através dos testes toxicológicos em animais e da mesma forma a preocupação ética envolvida, seria de grande contribuição para a comunidade científica a introdução de testes que utilizem baixas concentrações do produto para identificar a irritação cutânea poupando desta forma, algumas manifestações cutâneas desnecessárias aos animais.

CAPÍTULO 3

BIOENGENHARIA CUTÂNEA

Os métodos de bioengenharia não-invasiva têm sido muito utilizados na área dermatológica, principalmente para detectar reações da pele a produtos cosméticos e farmacêuticos, tais como aumento ou diminuição da hidratação e irritação.

Existem vários métodos de bioengenharia e cada qual é capaz de detectar diferentes parâmetros físicos da pele. Portanto, a utilização dos métodos depende da situação a ser estudada. Quando se pretende medir a resposta da pele à irritação, cada método avalia aspectos diferentes da resposta e em determinados casos a combinação de alguns métodos pode auxiliar na obtenção de resultados mais fidedignos da resposta fisiológica da pele.

Dentre os vários métodos existentes, aqueles mais utilizados na prática clínica e mais citados na literatura serão, resumidamente, descritos a seguir.

3.1 Perda de água transepidérmica (*Transepidermal Water Loss - TEWL*)

A perda de água transepidérmica é a difusão passiva da água através do estrato córneo. Esta perda de água constitui um parâmetro importante para a avaliação da função da pele como barreira da água. Portanto, quanto melhor a barreira protetora, maior o conteúdo de água na pele (COURAGE & RICHTER, 1999).

A utilização de produtos cosméticos e farmacêuticos altera o processo de excreção da pele através da reação dos seus componentes ativos com o vapor de água

e o dióxido de carbono podendo causar um aumento do conteúdo de água no estrato córneo. A aplicação de um irritante provoca alteração na barreira, aumentando a permeabilidade da membrana celular e a excreção de água.

A medida de TEWL (Figura 13a) permite identificar as alterações na função de proteção da pele que ocorrem no início do processo de irritação por fatores físicos (oclusão) e químicos (detergentes), o que torna um instrumento importante para ser utilizado em testes de produtos cosméticos e farmacêuticos. A medida é feita através dos aparelhos TEWAMETER TM 210[®] (Figura 13b) ou EVAPOMITER[™] EP 1.



(a)



(b)

Figura 13 – Medida de TEWL com Tewameter (a) e aspecto geral do equipamento Twearmeter TM 210[®] (b) (extraído de www.courage-khazaka.de).

O transporte de vapor da água é medido através de uma câmara aberta, posicionada perpendicularmente à superfície da pele (Figura 14), e a leitura é feita após 30-60 segundos do posicionamento.

Além dos aspectos pessoais, como idade, localização anatômica, temperatura da pele e suor, os aspectos ambientais também são importantes para a confiabilidade da medida, como temperatura ambiental e umidade relativa do ar. A medida deve ser feita após 15 minutos de climatização sob uma temperatura entre 20-22⁰C (NICANDER, 1998).

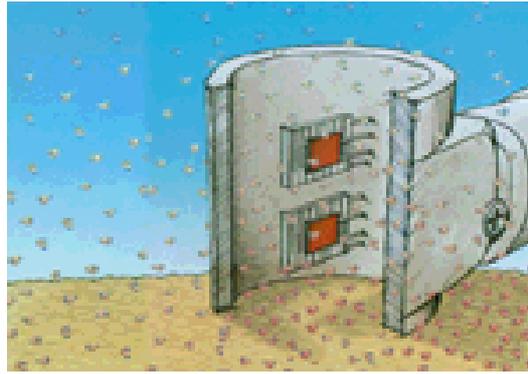


Figura 14 – Ilustração de medida do transporte de vapor de água cutânea (extraído de www.courage-khazaka.de).

3.2 Capacitância elétrica de hidratação (*Electrical Capacitance Moist - ECM*)

O valor de capacitância da pele está associado ao grau de hidratação da camada superficial (estrato córneo). Tal capacitância é medida em baixas frequências através de um instrumento denominado Corneometer™ CM820 (Figura 15a). O *probe* cobre uma área de 49 mm^2 e é aplicado à pele com uma força constante de 3,5 N (Figura 15b). O resultado é expresso em unidades arbitrárias e é diretamente proporcional ao nível de hidratação (LOMUTO *et al.*, 1995).

A hidratação do estrato córneo é medida indiretamente pela capacitância elétrica existente entre os eletrodos do *probe* e o meio dielétrico formado pela pele e os eletrodos. Sabendo-se dos valores de constante dielétrica da água (81) e do estrato córneo seco (abaixo de 5) o grau de hidratação é definido fisicamente (NICANDER, 1998).

A medida é influenciada por variáveis pessoais e ambientais que devem ser consideradas antes da utilização do instrumento. A temperatura ambiental deve estar entre 20 e 25°C, a umidade relativa entre 40 e 50% e a medida deve ser feita após 20-30 minutos de climatização.



(a)



(b)

Figura 15 – Aspecto geral do Corneometer™ CM820 (a) e medida de *ECM* com o equipamento (b) (extraído de www.courage-khazaka.de).

Alguns autores afirmam que a capacitância elétrica de hidratação não pode ser utilizada para medir o nível de irritação da pele. VAN NESTE *et al.* (1987) observaram que o Corneometer não refletia a intensidade da irritação cutânea, apesar de ser fortemente associada com as alterações que ocorrem na superfície da pele. OLLMAR *et al.* (1994) também concluíram que a medida de *ECM* deve ser utilizada apenas para detectar o nível de hidratação do estrato córneo. De acordo com a teoria proposta neste último estudo, a pele pode apresentar duas barreiras, uma no estrato córneo e a outra mais abaixo, no estrato basal. Em baixas concentrações de *SLS* (Lauril Sulfato de Sódio), apenas uma irritação superficial é induzida. O estrato córneo sofre desidratação e a segunda barreira não é afetada suficientemente para desencadear um aumento no transporte de água. Portanto, um valor baixo de *ECM* é encontrado. Em concentrações mais altas, ambas as barreiras são afetadas e o líquido aumenta no estrato córneo com a evaporação na superfície. Em certo grau de irritação ocorre um equilíbrio e nenhuma resposta pode ser detectada com o Corneometer. Em altas concentrações do irritante, a taxa de transporte da água do estrato basal excede a taxa de evaporação ocasionando altos valores de *ECM*. Por este motivo, os autores descrevem que a irritação da pele não pode ser medida por esta técnica.

3.3 Fluxometria à laser-Doppler (*Laser-Doppler Flowmetry – LDF*)

Este método é baseado no princípio de Doppler para detecção das partículas em movimento. Tem como fundamento a medição da perfusão dos eritrócitos (fluxo sanguíneo microvascular) nos tecidos através da iluminação com laser de baixa potência com um *probe* de fibra ótica (SERUP, 1995).

O processo de irritação da pele provoca alterações na microcirculação, que pode ser detectada pelo método. A Figura 16 mostra uma área de tecido cutâneo (branca) exposta a um irritante (Lauril Sulfato de Sódio - *SLS*). Pode-se observar na área exposta uma alteração da microcirculação através do comprimento de onda dos eritrócitos.

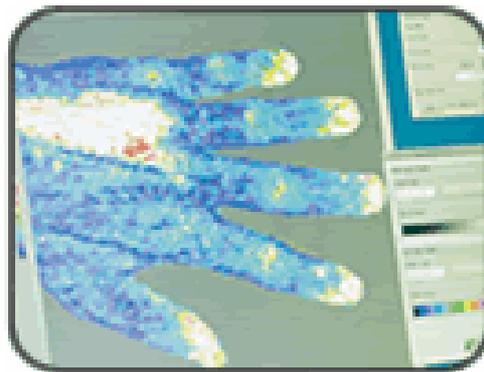


Figura 16 – Resposta da pele à irritação por *SLS* detectada por fluxometria à laser-Doppler (extraído de www.moor.co.uk).

3.4 Impedância elétrica (IMP)

Por ser a base do presente trabalho, este método será descrito com maiores detalhes, visando facilitar a leitura das demais partes do trabalho.

3.4.1 Conceitos gerais

A impedância elétrica do corpo é medida através da leitura da diferença de potencial (tensão) produzida entre dois eletrodos quando o sistema biológico é excitado por uma corrente elétrica alternada (AC) e consiste na oposição à passagem

desta corrente. Esta corrente flui através de íons presentes nos fluidos corporais e é inversamente proporcional à mobilidade destes e diretamente proporcional à área por onde atravessa. A conjunção destes efeitos é denominada genericamente de impedância, sendo sua parte real conhecida como resistência e sua parte imaginária denominada de reatância (GRIMNES & MARTINSEN, 2000).

A membrana celular é análoga a um capacitor elétrico, que por definição consiste de duas ou mais placas condutoras separadas por um isolante ou material não condutivo. A analogia advém do fato da membrana ser formada por uma camada de lipídios não condutora, denominada camada dielétrica, e estar situada entre duas camadas condutoras de proteínas e de eletrólitos (os líquidos intra-celular e extra-celular).

As correntes e tensões alternadas podem ser separadas ao longo do eixo do tempo. Como os materiais biológicos têm propriedades capacitivas, a tensão é atrasada da corrente. Este atraso no tempo é denominado ângulo de fase (θ) (Figura 17).

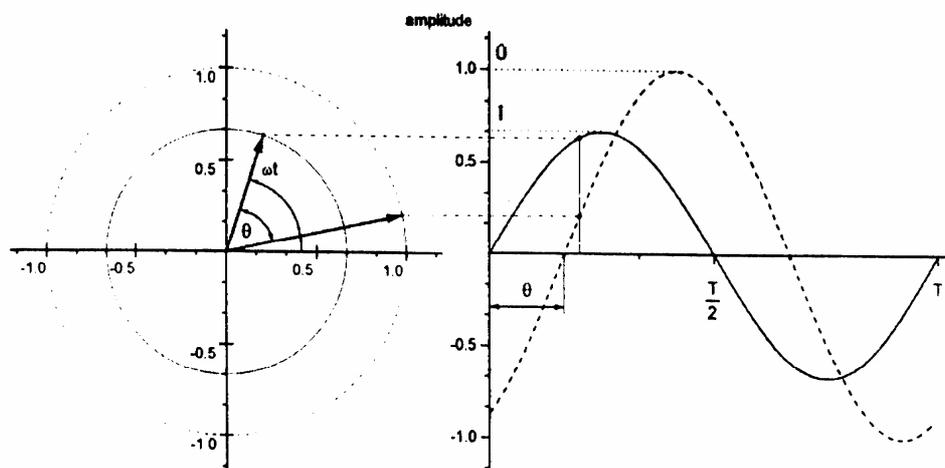


Figura 17 – Relação gráfica dos termos de impedância (NICANDER, 1998).

Se a corrente é aplicada a um resistor puro, a impedância será igual à resistência, que é relacionada com o pico da magnitude da tensão e da corrente. Porém, os materiais biológicos apresentam propriedades resistivas e capacitivas, e com isso, a impedância é descrita por um par de números para cada frequência

(resistência e reatância). Estes, por sua vez, estão representados no plano complexo (ÅGNER, 2002); sendo a resistência a parte real (eixo x) e a reatância a parte imaginária (eixo y). O módulo da impedância é a magnitude da resultante entre os dois componentes e o ângulo de fase é aquele formado entre o vetor de impedância e o eixo real (Figura 18).

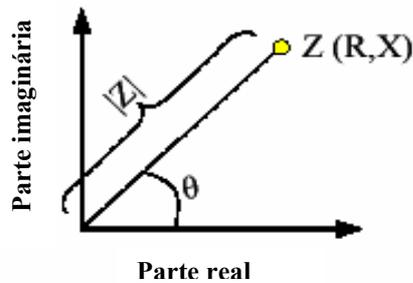


Figura 18 – Representação da impedância no plano complexo (ÅGNER, 2002)

Em um resistor puro, a impedância será frequência-independente e estará localizada no eixo real. Em um tecido biológico, com propriedades resistivas e capacitivas, a impedância será frequência-dependente e estará representada por um gráfico característico no espaço de números complexos.

3.4.2 Propriedades elétricas dos tecidos

As alterações estruturais e químicas dos tecidos são acompanhadas pelas mudanças na impedância elétrica (FOSTER & SCHWAN, 1989; SCHWAN, 1989).

Em 1912, HÖBER *apud* NICANDER (1998) estudou células sanguíneas e demonstrou que a membrana limita a passagem da corrente em baixas frequências, enquanto que em altas frequências a corrente penetra nas células (Figura 19).

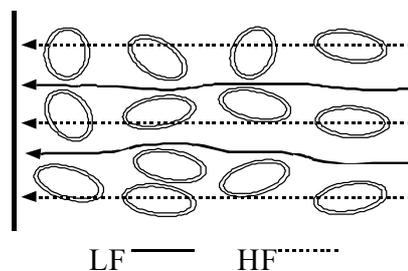


Figura 19 – Corrente elétrica de baixa frequência (LF) penetrando no espaço extracelular e de alta frequência (HF) nos espaços intra e extracelulares.

Através da teoria das células em suspensão pode-se afirmar que em casos de edema, onde há uma expansão do líquido extracelular, a impedância em baixas frequências diminui devido à menor resistência extracelular.

Baseado neste fato, Ollmar e colaboradores desenvolveram, como anteriormente mencionado, um índice de impedância (IX) para quantificar a resposta da pele à irritação. O índice foi definido como o quociente entre os módulos da impedância em duas frequências (uma considerada baixa, 20 kHz e outra considerada alta, 500 MHz) (OLLMAR *et al.*, 1994)

O grau de irritação cutânea é definido pelo índice de impedância (IX): quanto menor o IX maior o nível de irritação. Esta relação pode ser interpretada pela teoria exposta acima. A expansão do líquido extracelular (edema) em decorrência da irritação diminui a impedância em baixas frequências (numerador) e conseqüentemente o IX é menor.

3.4.2.1 Polarização

A polarização é um conceito importante para o estudo das propriedades elétricas do tecido, uma vez que está presente em muitos fenômenos característicos, como a relaxação e a dispersão, e pode ser definida como o distúrbio da distribuição de cargas em uma região em conseqüência da presença de energia externa ou interna. A polarização exógena ocorre após a aplicação de energia externa, como, por exemplo, radiação eletromagnética ou campo elétrico externo. A polarização endógena é obtida através do consumo de energia interna como ocorre com a membrana celular que é polarizada devido à transferência de íons da bomba sódio-potássio deixando o interior da célula carregado negativamente e o exterior positivamente.

A membrana celular apresenta uma característica dielétrica que está associada a alguns fenômenos elétricos, como por exemplo, a polarização dielétrica, que ocorrem no tecido.

Um dielétrico pode ser definido como um material que tenha a capacidade de armazenar energia elétrica, devido ao deslocamento (polarização) de cargas positivas e negativas, sob efeito de um campo elétrico aplicado.

A aplicação do campo elétrico externo sobre o material produz uma força que, exercida sobre cada partícula carregada, direciona as cargas positivas no sentido do

campo e as partículas negativas no sentido inverso, de forma que as partes positivas e negativas de cada molécula sejam deslocadas de suas posições de equilíbrio em sentidos opostos. Baseado neste conceito, a superfície externa da membrana celular apresenta carga negativa, enquanto que o interior é positivamente carregado, estabelecendo um potencial de membrana.

O organismo vivo é um complexo heterogêneo de tecidos biológicos com propriedades condutivas e dielétricas bastante dissimilares. Enquanto que o tecido muscular é mais condutor com algumas propriedades capacitivas, o extrato córneo é mais dielétrico com algumas propriedades condutivas.

Todo material dielétrico tem uma rigidez dielétrica, que é o valor máximo do campo elétrico a que ele pode ser submetido sem comprometer suas características dielétricas (isolantes), tornando-se bruscamente um condutor. Um material pode ter características condutoras ou isolantes dependendo da frequência da corrente aplicada. Em frequências suficientemente altas um material condutor pode se tornar um dielétrico (GRIMNES & MARTINSEN, 2000).

3.4.2.2 Relaxação e dispersão dielétrica de tecidos biológicos

A polarização é considerada como um estado estático do material não dependente do tempo, mas apenas da aplicação de um campo externo. Entretanto, a polarização e a mudança de posição das cargas em um material não ocorrem instantaneamente. Assim, a relaxação dielétrica pode ser definida como o tempo necessário para as cargas se estabilizarem após a aplicação de um campo elétrico. O tempo de relaxação é dependente do mecanismo de polarização. Se a frequência medida for baixa, esse tempo é suficiente e a polarização é máxima. Com o aumento da frequência a polarização e a permissividade vão diminuindo.

O conceito de dispersão é o mesmo de relaxação, porém no domínio da frequência. Em uma dispersão simples é encontrado um nível de permissividade em baixas frequências (tempo para completar o relaxamento) e um segundo nível em altas frequências (tempo insuficiente para o processo de relaxamento), que será a zona de transição caracterizada por uma janela de frequências, com uma frequência central característica. Cada faixa de frequência representa um nível de dispersão. SCHAWAN (1957) descreveu três principais níveis de dispersão nos tecidos vivos conhecidos por dispersão α , β e γ , cada qual relacionado a efeitos característicos que

ocorrem na célula (Figura 20). A dispersão α é afetada principalmente pela polarização de nuvens iônicas ao redor da célula, a dispersão β reflete alterações estruturais como edema e polarização da membrana celular e a dispersão γ está relacionada com a relaxação de moléculas pequenas (GRIMNES & MARTINSEN, 2000).

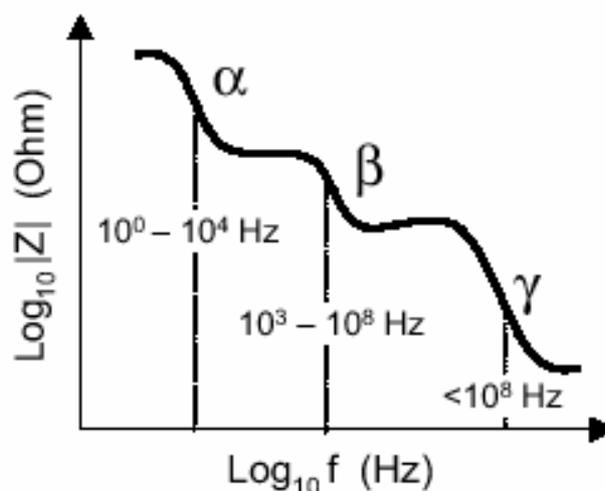


Figura 20 – Características gerais do espectro de impedância nos tecidos (ÅGNER, 2002)

O estrato córneo exibe uma ampla dispersão α que provavelmente é devido à sua natureza heterogênea com diferentes graus de hidratação entre as células queratinizadas. A derme e a epiderme apresentam propriedades elétricas parecidas com as de outros tecidos biológicos e, portanto, exibem dispersões α e β separadas. A interface entre o estrato córneo e a camada mais interna da pele dá origem ao tipo de dispersão Maxwell-Wagner na série β . O efeito Maxwell-Wagner é o processo que ocorre na interface entre diferentes dielétricos na região de MHz. Embora a impedância do estrato córneo seja bem maior em baixas frequências do que a impedância da pele com células vivas, as diferenças nos mecanismos de dispersão fazem com que as propriedades elétricas convirjam com o aumento da frequência. Esta é a principal razão pelo qual o aumento da frequência leva a medições nas camadas mais internas da pele.

3.4.2.3 Equação de Cole

Algumas propriedades da estrutura celular foram descritas por COLE (1940) e representadas no plano complexo por gráficos circulares. A equação da impedância de Cole modela a maioria dos materiais biológicos, inclusive a pele, e pode ser escrita como:

$$Z = R_{\infty} + \frac{(R_0 - R_{\infty})}{1 + (j\omega\tau)^{\alpha}} \quad (1)$$

onde Z é a impedância [Ω]; R_0 a resistência na frequência zero [Ω]; R_{∞} a resistência na frequência infinita [Ω]; ω a frequência angular [$\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$]; τ a constante de tempo característica do sistema, correspondendo a uma frequência característica angular, e α o ângulo de depressão para o centro do gráfico [rad].

No gráfico de Cole o comportamento da curva para a maioria dos tecidos biológicos é uma curva semicircular (Figura 21).

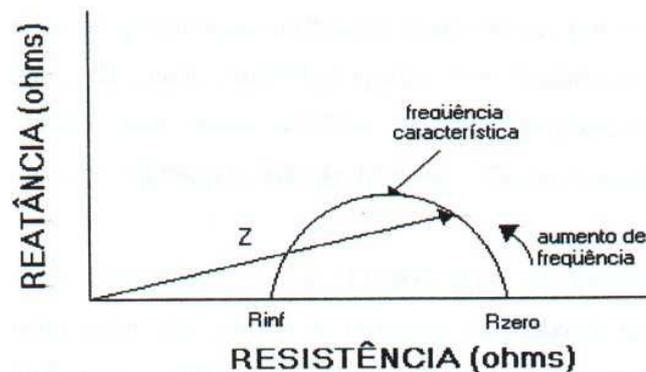


Figura 21 – Gráfico de Cole-Cole - reatância vs. resistência, CORNISH *et al.* (1998).

Em baixas frequências a reatância da membrana celular é alta e a corrente elétrica flui apenas no espaço extracelular. Assim, a medida da impedância é considerada resistiva pura, sem componente reativo, e a resistência na frequência zero (R_0) pode ser considerada como a resistência extracelular (R_e). Quando a frequência é aumentada a corrente começa a fluir no espaço extracelular e intracelular, causando diminuição da resistência total equivalente (R_X) e aumento da reatância equivalente (X_{Cx}), fazendo com que o ângulo de fase também aumente. Uma observação importante nesta análise é a definição da frequência característica (F_C), que é aquela onde o valor da reatância equivalente é máximo. Quando a frequência excede este valor, a reatância equivalente diminui a medida que a corrente penetra na célula. Em

sinais de frequências muito altas, a impedância equivale apenas à resistência R_∞ (R_e em paralelo com R_i), que por sua vez está associada à água corporal total.

O comportamento da curva é alterado quando se pretende medir apenas a impedância da pele. Em peles intactas, a camada mais superficial (o estrato córneo) domina a impedância. Pode-se observar através da Figura 22 que o gráfico para a pele intacta é quase uma reta (Figura 22a). Quando o estrato córneo é removido através da fricção sobre a pele, o gráfico começa a se aproximar de um semicírculo (Figura 22b).

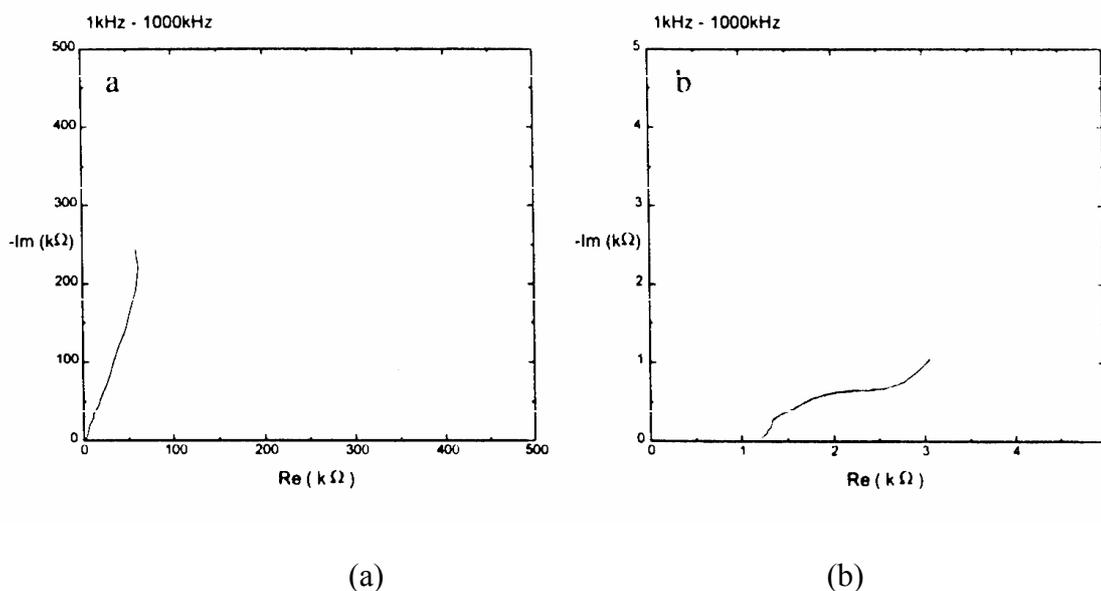


Figura 22 – Gráfico de Nyquist (ou gráfico de Cole-Cole) para pele intacta (a) e para pele friccionada (b) (NICANDER, 1998).

MARTINSEN (2001) observou que a resposta de frequência do estrato córneo não obedece à equação de Cole. Com isso, o autor afirma que a interpretação das medidas de estrato córneo com aparelhos multifrequenciais é impossível de ser feita *in vivo* com o sistema de eletrodos normalmente utilizado. Este autor afirmou que medidas elétricas de hidratação do estrato córneo devem ser conduzidas em uma única baixa frequência.

3.4.3 Modelagem em bioimpedância

Antes de discutir sobre modelagem é importante definir o conceito de modelo. A palavra modelo tem essencialmente duas interpretações diferentes; protótipo/figura e equivalente/substituto. Os modelos elétricos pretendem representar propriedades

específicas da realidade que eles refletem. Sua função preditiva é de grande interesse, uma vez que são usados para investigar a funcionalidade ou estrutura do original. Porém, algumas vezes os modelos são usados em contextos para os quais não foram destinados ou são usados apenas porque fornecem resultados numéricos adequados na curva de ajuste aos dados medidos, e assim, o modelo não é preditivo dos parâmetros fisiológicos e patológicos, podendo induzir interpretações errôneas. Em virtude disso, uma avaliação crítica seguida pelo processo de validação deve ser realizada a fim de utilizar o modelo que represente realmente as propriedades que se deseja estudar.

O processo de validação envolve vários procedimentos para avaliar como o modelo está relacionado com os dados observados, com o conhecimento prévio da realidade e com a aplicação desejada (LJUNG, 1987). Um comportamento deficiente do modelo nestes aspectos resulta na sua rejeição, enquanto que um bom desempenho irá desencadear certa confiança. Porém, é importante ressaltar que um modelo não pode nunca ser aceito como final e como verdadeira descrição do sistema. Por outro lado, pode ser considerado como uma boa descrição de alguns aspectos que são de interesse particular no estudo.

O sistema biológico pode ser representado por elementos resistivos e capacitivos em circuitos série/paralelos. Um dos modelos clássicos e bastante utilizado é representado por uma resistência intracelular (R_i) em série com a capacitância de membrana (C_m), ambos em paralelo com a resistência extracelular (R_e) (Figura 23).

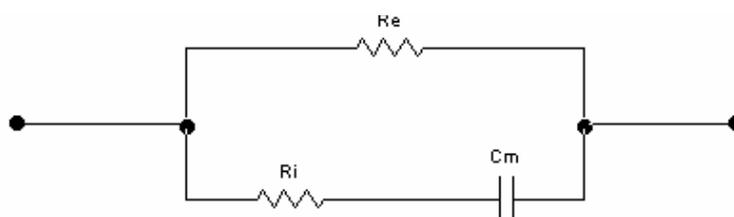


Figura 23 – Modelo das propriedades elétricas utilizadas nas medições de bioimpedância corporal.

A pele, por sua vez, é considerada um órgão heterogêneo complexo por apresentar várias camadas de espessuras e estruturas diferentes. Esta característica física confere uma perda de energia pela passagem de uma corrente elétrica conhecida pelo fenômeno de dispersão. Em virtude desta perda dielétrica, as camadas da pele

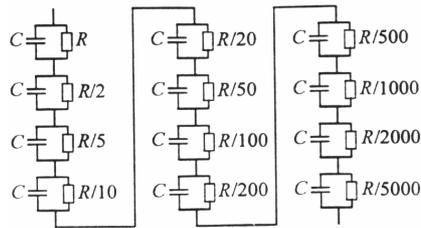
não podem ser tratadas por uma simples capacitância na medida de impedância. Por este motivo, o modelo utilizado para medidas de bioimpedância corporal não é ideal para modelagem do comportamento elétrico da pele.

GRIMNES e MARTINSEN (2000) sugeriram três soluções diferentes para este problema que poderiam resultar nos seguintes modelos:

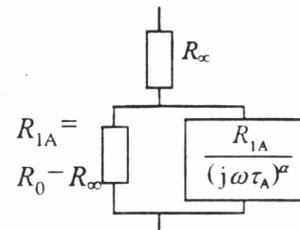
- *Modelo 1*: uma solução seria fazer uma distinção completa entre as diferentes estruturas da pele e assim, desenvolver um modelo elétrico tão complexo como a pele. As membranas lipídicas seriam então tipicamente representadas por capacitores, os eletrólitos por resistores e as membranas semipermeáveis por fonte de tensão. Este modelo teria como objetivo refletir as propriedades elétricas das várias estruturas microanatômicas.
- *Modelo 2*: uma solução diferente seria focar nas estruturas da pele que mais contribuem para as propriedades elétricas e decidir se cada uma destas estruturas seria representada por um resistor ou um capacitor, e posteriormente encontrar o circuito elétrico equivalente mais simples que envolva todas estas estruturas. Este modelo seria uma versão simplificada do modelo 1.
- *Modelo 3*: uma terceira solução seria considerar a pele como uma caixa preta, realizar várias medidas e encontrar o circuito elétrico que combine com os níveis de admitância e a resposta da frequência medidos. A anatomia da pele não é considerada neste modelo.

Vários autores afirmam que a pele apresenta propriedades elétricas diferentes dos outros tecidos e sugeriram modelos específicos que representam contribuições de algumas estruturas como polarização do eletrodo, estrato córneo, ductos sudoríparos e camadas internas da pele (GRIMNES & MARTINSEN, 2000).

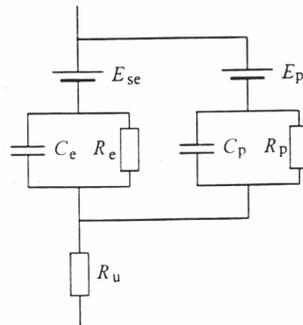
Algumas tentativas têm sido feitas para melhor modelagem da impedância da pele, destacando-se os modelos de TREGGAR (1966), SALTER (1979), NEUMAN (1992), KONTTURI *et al.* (1993) e COLE (1940) (Figura 24).



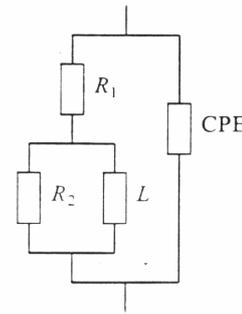
(a) Modelo da pele descrito por TREGGEAR



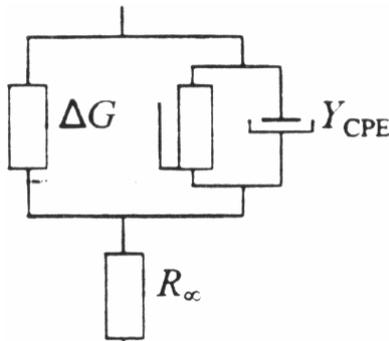
(b) Modelo da pele descrito por SALTER



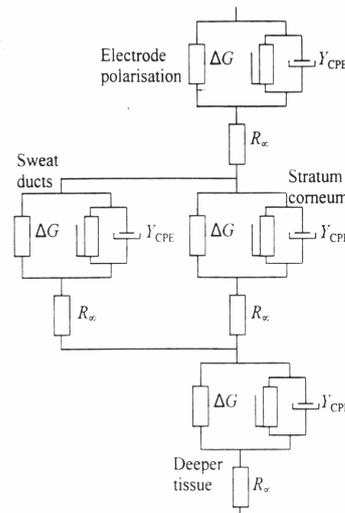
(c) Modelo da pele descrito por NEUMAN



(d) Modelo da pele descrito por KONTTURI



(e) Modelo básico da pele descrito por COLE com uma única dispersão



(f) Sistema múltiplo de COLE para modelar a pele com várias dispersões

Figura 24 – Ilustração de modelos elétricos da pele descritos na literatura (GRIMNES & MARTINSEN, 2000).

KONTTURI *et al.* (1993) e COLE (1940) incluíram no circuito equivalente da pele, em substituição do capacitor, um Elemento de Fase Constante (*Constante Phase Element* - CPE) que modela a heterogeneidade do meio. A idéia de introduzir o CPE no modelo surgiu após várias observações em eletroquímica e com as células e tecidos em suspensão. Estas observações resultaram em um semi-círculo deprimido no gráfico de Nyquist (gráfico do módulo da impedância em função da frequência no

plano complexo) que foi melhor modelado com o CPE. A definição e aplicação do CPE na modelagem da pele são discutidas no capítulo 4.

O modelo básico de COLE (Figura 24e) representa uma dispersão elétrica única com uma distribuição do tempo de relaxação e pode, portanto, ser um modelo interessante para tecidos macroscopicamente homogêneos dentro de uma faixa de frequência limitada. Um sistema experimental prático, entretanto, irá envolver em muitos casos um objeto que pode ser dividido em dois ou mais componentes, e cada um destes pode ser modelado individualmente pela equação de COLE. Além disso, quando a medida é baseada em uma ampla faixa de frequência, diferentes mecanismos de dispersão irão dominar em diferentes partes da faixa de frequência, e cada um destes mecanismos também pode ser atribuído a uma equação de COLE. Considerando este fato, foi sugerido o sistema múltiplo de COLE (Figura 24f) para medir a impedância da pele. Os dados medidos podem representar contribuições da polarização de eletrodo, estrato córneo, ductos sudoríparos e tecido interno da pele, além das diversas dispersões de alguns destes componentes. Apenas um modelo básico de COLE representa a polarização de eletrodo, embora duas dispersões tenham sido descritas em alguns estudos (ONARAL & SCHAWN, 1982 *apud* GRIMNES & MARTINSEN, 2000). O estrato córneo é dominado por uma ampla dispersão (YAMAMOTO & YAMAMOTO, 1976) e os ductos sudoríparos exibem uma dispersão devido à relaxação dos íons opostos (MARTINSEN, 1998). As camadas mais internas da pele provavelmente apresentam algumas dispersões, como citado anteriormente.

Este modelo complexo pode ser simplificado baseando-se nos conhecimentos sobre as diferentes partes do circuito. O modelo de COLE que representa os ductos sudoríparos pode, por exemplo, ser reduzido a um simples resistor uma vez que a admitância de polarização provavelmente é negligenciada (MARTINSEN, 1998). As dispersões β e γ dos tecidos internos da pele também podem ser omitidas se as medições forem realizadas em baixas frequências e da mesma forma a polarização do eletrodo pode ser negligenciada em determinados conjunto de dados. Entretanto, é de suma importância reconhecer todos os sistemas de COLE relevantes que influenciam na interpretação dos dados medidos antes de fazer as simplificações necessárias.

Segundo GRIMNES e MARTINSEN (2000), existem dois tipos de modelos; os descritivos e os explanatórios. Os modelos descritivos caracterizam a pele

eletricamente por meio dos componentes elétricos e algoritmos. Estes representam principalmente o fenômeno, ou seja, os valores medidos e a teoria não estão relacionados com a microanatomia da pele. As entidades do modelo não são necessariamente como uma estrutura biológica isolada, e mesmo que o modelo inclua componentes elétricos conhecidos, eles não correspondem necessariamente ao processo eletrofisiológico da pele. Estes modelos simulam o comportamento elétrico da pele e são bons instrumentos para calcular a resposta de frequência da pele.

Os modelos explanatórios são baseados nos conceitos básicos da teoria elétrica – potencial, condutância, polarização, indução, etc. O conhecimento sobre os mecanismos físicos envolvidos neste fenômeno é usado para proporcionar o entendimento do fenômeno similar nos materiais biológicos. Os modelos são explanatórios porque os componentes representam estruturas anatômicas isoladas ou processos físicos, ou seja, a propriedade elétrica dominante pode ser explicada por meio das propriedades dos componentes. Um pré-requisito para este modelo é supor que seus componentes existem como estruturas da pele.

Os modelos de TREGGAR e NEUMAN (Figuras 24a e 24c, respectivamente) são essencialmente explanatórios. Eles proporcionam um conhecimento dos mecanismos elétricos dominantes do estrato córneo e são apropriados para prever o efeito de, por exemplo, aumento da umidade do ar, da atividade secretora dos ductos sudoríparos, do processo de remoção do estrato córneo. O ponto negativo, entretanto, é que estes modelos não simulam a resposta elétrica de frequência da pele como os modelos de SALTER e KONTURI (Figuras 24b e 24d, respectivamente), que são classificados como modelos descritivos.

Considerando a complexidade da pele, a escolha do melhor modelo deve ser baseada em algumas reflexões. De acordo com GRIMNES e MARTINSEN (2000), o modelo mais correto deve considerar todos os conhecimentos recentes sobre o processo de relaxação, dispersão de frequência, difusão, etc. Além disso, deve ser simples e usar símbolos de forma a tornar fácil o entendimento do perfil das propriedades elétricas das diferentes subestruturas da pele. Tal modelo satisfaz todos os requisitos para um modelo elétrico da pele – mas infelizmente não existe. O modelo existente mais correto é, portanto, aquele que melhor se adapta ao objetivo da sua aplicação.

Os modelos explanatórios são os únicos que diferenciam as subestruturas da pele e têm um valor clínico no auxílio da escolha da técnica de medição. Os modelos descritivos, entretanto, são considerados como estágio intermediário essencial no desenvolvimento de modelos explanatórios melhores. Os novos modelos explanatórios devem compreender componentes passivos discretos, porém com alterações no uso dos símbolos comparados aos modelos descritivos, assim que a relação entre a estrutura anatômica e os mecanismos eletrofisiológicos forem determinadas. Estes novos modelos devem ser capazes de explicar a relação entre as doenças da pele e a resposta de frequência da pele mostrando como as alterações na subestrutura da pele influenciam um ou mais componentes do modelo.

Em 2005, GRIMNES e MARTINSEN propuseram uma alternativa no modelo básico de COLE (1940) para representar a pele. O modelo de COLE é baseado em um CPE, uma condutância como parâmetro dependente e uma constante de tempo característica como parâmetro independente. Entretanto, geralmente as constantes de tempo dos tecidos ou células em suspensão são condutância-dependente, o que torna o modelo de COLE incompatível com a teoria geral de relaxação. Em virtude disto, os autores analisaram um modelo alternativo com uma condutância independente e com um tempo de relaxação como parâmetro dependente tornando-o mais adequado à teoria geral de relaxação e aos dados medidos.

A Figura 25 mostra os modelos propostos por COLE (a) e por GRIMNES e MARTINSEN (b).

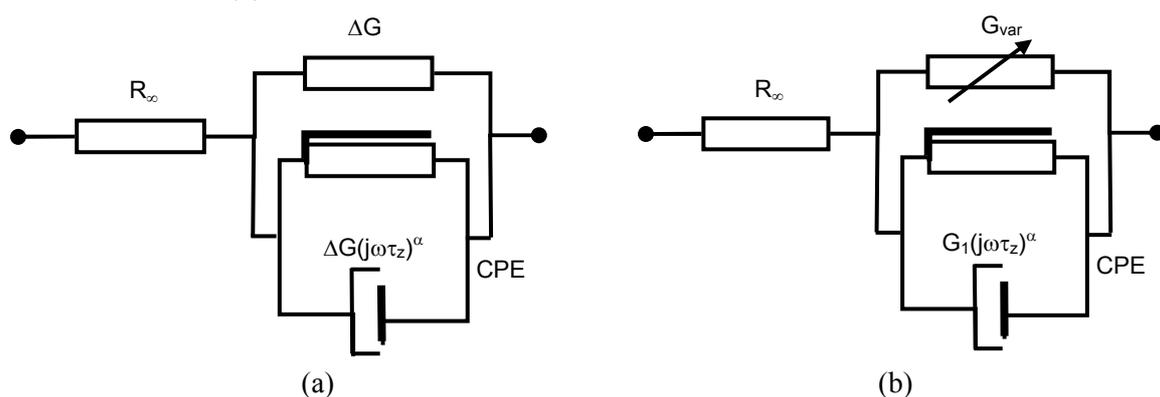


Figura 25 – Circuito equivalente da pele condutância-dependente proposto por COLE, 1940 (a) e circuito equivalente da pele condutância-independente proposto por GRIMNES e MARTINSEN, 2005 (b).

Pode-se observar na Figura 25a que o CPE está em paralelo com a condutância ΔG . Entretanto, a admitância do CPE, $\Delta G(j\omega\tau_z)^\alpha$, é proporcional à condutância do circuito (ΔG). Assim, a condutância paralela não é um parâmetro independente. Na Figura 25b foi introduzida uma condutância independente G_{var} em paralelo com o CPE com admitância $G_l(j\omega\tau_z)^\alpha$. De acordo com os autores, o CPE modela o estrato córneo e a condutância independente (G_{var}) modela os ductos sudoríparos.

As equações da impedância dos circuitos descritos acima são, respectivamente:

$$Z = R_\infty + \frac{1}{\Delta G + \Delta G(j\omega\tau_z)^\alpha} \quad (2)$$

$$Z = R_\infty + \frac{1}{G_{var} + G_l(j\omega\tau_z)^\alpha} \quad (3)$$

Os resultados do estudo mostraram que a constante de tempo τ_z corresponde ao ápice do semi-círculo no gráfico de Nyquist apenas quando $G_l = G_{var}$, que é o caso do modelo de COLE. Entretanto, quando $G_l \neq G_{var}$, a constante de tempo (τ_{Zm}) não corresponde ao ápice do arco e é determinada pela equação 4:

$$\tau_{Zm} = \frac{1}{\omega_{Zm}} = \tau_z \left(\frac{G_l}{G_{var}} \right)^{1/\alpha} \quad (4)$$

Baseado nesta observação, a constante de tempo τ_z não é a verdadeira constante de tempo característica e a nova constante de tempo τ_{Zm} mostra que uma alteração em G_{var} passa a influenciar na constante de tempo de acordo com a teoria de relaxação. Quanto maior o valor de G_{var} , menor o valor de τ_{Zm} . A verdadeira constante de tempo τ_{Zm} não aparece na equação 3, mas é calculada pela equação 4. A frequência característica ω_{Zm} corresponde à frequência quando a admitância do CPE, $Y_{CPE} = G_l(j\omega\tau_z)^\alpha$, se iguala a G_{var} .

A determinação dos parâmetros R_∞ , G_{var} e α é feita através da geometria da curva, porém os parâmetros G_I e τ_Z não podem ser determinados separadamente dos dados medidos, apenas o produto $G_I \tau_Z$. Neste caso, um valor fixo é dado para τ_Z (1 s) para determinar G_I através da equação 4.

Apesar da crítica ao modelo do COLE ter sido feita apenas recentemente por GRIMNES e MARTINSEN (2005), YAMAMOTO e YAMAMOTO (1978) já tinham utilizado um modelo similar através de um resistor paralelo independente (R_2) conectado com o CPE como a Figura 25b, porém não tinham discutido o modelo de COLE baseado em uma constante de tempo como parâmetro independente.

3.4.4 Instrumento de impedância elétrica cutânea

Desde o início dos estudos sobre a impedância cutânea (1920), várias técnicas e equipamentos foram implementados. Um instrumento desenvolvido por Martinsen e Grimnes (MARTINSEN *et al.*, 1993), operando na frequência de 88 Hz, tem se mostrado ideal para pesquisas de hidratação do estrato córneo (SensodermTM 970).

Nos últimos quinze anos, vem sendo utilizado um aparelho multifrequencial, com penetração cutânea controlada, desenvolvido por Stig Ollmar (NICANDER *et al.*, 1995). No início do desenvolvimento do aparelho, foi utilizado um *probe* com geometria fixa que determinava o grau de penetração cutânea. A análise do sinal deste aparelho era feita apenas com um índice de impedância (o índice *IX* anteriormente citado). Os resultados do estudo com esta técnica simples mostraram que a impedância era tão sensível quanto às medidas de *TEWL* e mais sensível que a escala visual, detectando reações subclínicas da pele à irritação (OLLMAR *et al.*, 1994).

A última versão do instrumento de impedância utiliza um *probe* conectado a um aparelho automatizado sob controle do computador, e é capaz de efetuar medidas em uma faixa de 31 frequências logaritmicamente distribuídas entre 1 kHz a 1 MHz (Figura 26). Este sistema de medidas facilita a seleção eletrônica em cinco graus de penetração diferentes. Com este *probe*, a faixa de profundidade que pode ser alcançada é aproximadamente de 0,1 a 2,0 mm, que cobre a profundidade de interesse da pele. O simples índice de impedância (*IX*) também foi desenvolvido e foram

estipulados quatro índices, representando os quatro principais aspectos da impedância elétrica no plano complexo (magnitude, fase, parte real e parte imaginária).

(a) índice de magnitude, $MIX = abs(Z_{20\text{ kHz}}) / abs(Z_{500\text{ KHz}})$

(b) índice de fase, $PIX = arg(Z_{20\text{ kHz}}) - arg(Z_{500\text{ KHz}})$

(c) índice da parte real, $RIX = Re(Z_{20\text{ kHz}}) / abs(Z_{500\text{ KHz}})$

(d) índice da parte imaginária, $IMIX = Im(Z_{20\text{ kHz}}) / abs(Z_{500\text{ KHz}})$

onde, $abs(Z_i)$ é o módulo da impedância elétrica complexa na frequência i , $arg(Z_i)$ é o ângulo de fase em graus, $Re(Z_i)$ é a parte real e $Im(Z_i)$ é a parte imaginária da impedância elétrica complexa.



Figura 26 – Medida da impedância elétrica da pele (NICANDER, 1998).

3.4.5 Revisão da literatura em bioimpedância cutânea

A técnica de bioimpedância da pele foi desenvolvida inicialmente por um grupo de pesquisadores do Instituto da Karolinska (Estocolmo, Suécia) para aplicação na área dermatológica com o objetivo de avaliar a resposta do tecido cutâneo e da mucosa oral à irritação. O primeiro estudo foi feito por NILSON *et al.* (1992) com aplicação da bioimpedância na mucosa oral através de um equipamento improvisado: um eletrodo pequeno colocado na área de investigação da mucosa bucal e um eletrodo maior do lado externo concentrando a corrente de teste na membrana da mucosa oral. Esta técnica foi aplicada antes e depois da exposição da mucosa a vários materiais e líquidos dentários. Um índice de irritação simples (índice de impedância) foi formulado, utilizando os resultados em 20 kHz e 1 MHz, como o quociente entre as magnitudes da impedância elétrica nestas duas frequências. Assim que o sinal de

irritação surgia, o índice de impedância diminuía. Os resultados mostraram que a tecnologia da impedância elétrica foi mais sensível do que a observação visual das reações da mucosa.

No primeiro estudo com a pele humana, foi utilizado um instrumento improvisado, composto de um circuito especialmente projetado para tal finalidade e uma sonda, ou *probe*, onde se localizam os eletrodos. Este *probe* foi construído com uma geometria fixa que determina uma profundidade fixa de penetração. Para análise de resultados foi mantido o mesmo índice de irritação do estudo anterior. O instrumento manual foi utilizado para investigar a habilidade da técnica de impedância elétrica em detectar a irritação da pele após o contato com o irritante SLS (OLLMAR & EMTESTAM, 1992), a variação entre as diferentes regiões do corpo (EMTESTAM & OLLMAR, 1993) e comparações com outras técnicas de bioengenharia (perda de água transepidermica – *TEWL*, fluxometria por Doppler à laser – *LDF* e hidratação do extrato córneo – *ECM*) (OLLMAR *et al.*, 1994).

Após constatar que os primeiros resultados experimentais foram mais sensíveis que as leituras visuais, foi desenvolvido um espectrômetro de bioimpedância multifrequencial automatizado. Tal instrumento armazena o espectro de magnitude e fase da impedância em 31 frequências logaritmicamente distribuídas entre 1 kHz e 1 MHz do volume delimitado pelo *probe*. Geralmente, o principal fator que controla a profundidade de penetração é a distância entre os eletrodos: a profundidade de penetração do campo elétrico é a metade da distância entre os eletrodos.

O *probe* é equipado com 4 eletrodos para variar o tamanho efetivo do sistema de eletrodos (OLLMAR *et al.*, 1995). Porém, para a medida são necessários apenas três eletrodos: dois para a distribuição da corrente e um para a detecção.

Em 1995, NICANDER *et al.*, examinaram as diferentes profundidades de penetração na pele em voluntários com dermatites de irritação por SLS com o instrumento de bioimpedância. O irritante foi dissolvido em água destilada nas concentrações 0,1%, 0,5% e 2,0%, que são suficientes para produzir reações irritantes. Os resultados obtidos com as medidas de impedância elétrica em cinco profundidades da pele foram correlacionados com aqueles obtidos pelo exame histológico, escala visual e perda de água transepidermica (*TEWL*).

Em todos os métodos utilizados, a resposta foi proporcional à concentração do irritante. Alterações estatisticamente significativas da impedância elétrica foram obtidas para todas as profundidades e concentrações, exceto para 0,1% de SLS na profundidade mais superficial. As mudanças histológicas, constituídas principalmente por edema, foram focadas na epiderme. As alterações na espessura da epiderme devido ao edema foram usadas como um parâmetro quantitativo para a correlação com a avaliação da irritação através da técnica da impedância elétrica. O estudo concluiu que para a detecção das reações irritantes, a *TEWL* e a impedância elétrica foram mais sensíveis do que a escala visual e aconselhou que a seleção da melhor profundidade da pele para penetração aumenta a sensibilidade das medidas de impedância.

NICANDER *et al.* (1996) correlacionaram a resposta padrão de impedância com os achados histológicos durante a reação irritante da pele induzida por surfactantes. Foram testados em 28 voluntários três produtos químicos diferentes: lauril sulfato de sódio (*SLS*), cloreto de benzalcônio e ácido nonanóico. As concentrações selecionadas foram aquelas em que cada irritante produz resposta semelhante sob escala visual. A magnitude e a fase da impedância foram medidas e comparadas com a *TEWL*. Os resultados mostraram que os três irritantes produziram efeitos diferentes, proporcionando padrões distintos de impedância. As respostas histológicas aos três irritantes também foram diferentes, sugerindo que a impedância pode ser usada para classificar as reações de irritação por contato, que são difíceis de serem alcançadas por outras técnicas não-invasivas.

Em 1997, NICANDER e OLLMAR quantificaram e classificaram as reações fracas da pele ao *SLS* em baixas concentrações (0,004%, 0,02%, 0,1% e 0,5%) através da profundidade controlada pela impedância elétrica. Foi constatado que entre o primeiro e o terceiro dia de contato com o irritante, ocorreram diferenças estatisticamente significativas dos parâmetros de impedância na concentração de 0,02% e o nível de significância aumentou da profundidade mais externa (1) para a mais interna (5). Com isso, pôde-se concluir que o método de impedância elétrica apresenta sensibilidade para detectar respostas macroscopicamente (visual) negativas induzidas pelo irritante *SLS*.

No mesmo ano, NICANDER *et al.* (1997), utilizaram a técnica de impedância elétrica para comparar as propriedades das diferentes áreas anatómicas da pele

utilizando a mesma metodologia dos outros estudos. Foi demonstrado que os valores normais de impedância da pele variam de acordo com o local. A idade mostrou exercer maior influência nestes parâmetros. O aumento da idade contribuiu para o aumento dos índices de magnitude da impedância e diminuição da fase.

Em 1998, NICANDER *et al.*, estudaram a habilidade da técnica de impedância elétrica em detectar alterações no conteúdo de lipídio do extrato córneo e compararam com outros métodos não-invasivos (*TEWL* e *ECM*). Os resultados mostraram que, após a extração de lipídios, as maiores alterações obtidas foram com os parâmetros de impedância quando comparadas com os outros métodos analisados. Com isso, pôde-se concluir que a impedância elétrica é dependente do conteúdo de lipídios do extrato córneo.

Em 2000, NICANDER e OLLMAR empregaram a técnica de impedância para estudar as variações sazonais nos mesmos locais da pele que foram utilizados no estudo prévio (NICANDER *et al.*, 1997). Os valores normais de impedância variaram de um local para o outro e aumentaram significativamente, na maioria dos locais, do inverno para o verão, enquanto que de Outubro até Março as alterações foram insignificantes. Estes resultados sugerem que as variações sazonais para diferentes locais de pele devem ser levadas em consideração quando a técnica de impedância elétrica for aplicada.

ÅBERG *et al.* (2002) investigaram as propriedades da pele em diferentes locais do antebraço anterior humano através dos parâmetros de bioimpedância e verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a parte medial e lateral e entre os antebraços direito e esquerdo, enquanto que os locais proximal e distal apresentaram valores de impedância constantes. Este estudo foi desenvolvido para mostrar a importância do cuidado no protocolo de experimentos dermatológicos, uma vez que diferentes locais do antebraço são frequentemente utilizados. Para evitar a variabilidade das propriedades da pele, os autores sugerem realizar randomizações e medidas repetidas.

Em 2003, NICANDER *et al.* estudaram a capacidade de um hidratante (betaína) reduzir os efeitos irritantes do SLS (1%) através dos métodos visual e de bioengenharia. Os antebraços de 21 indivíduos ficaram ocluídos por 24 horas com SLS, com betaína e com SLS + betaína e as medidas foram feitas 24 horas após a

remoção das substâncias. Foi verificado que a adição do hidratante ao SLS reduziu o efeito do irritante sendo indicado o uso contínuo da substância ao manipular detergentes para evitar dermatites de contato.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Técnica de análise de bioimpedância baseada na resposta em degrau

A técnica de impedância da pele desenvolvida por S. Ollmar (*Karolinska Institute*) é baseada na aplicação de uma corrente elétrica alternada (varredura de senóides) e pela leitura da diferença de potencial produzida entre os eletrodos.

Um método alternativo de extração de parâmetros modeladores da bioimpedância corporal total foi proposto por NEVES e SOUZA (2000) e vem sendo aplicado em estudos de análise dos fluidos corporais em neonatos (MENDONÇA *et al.*, 2001; MENDONÇA, 2002; FERREIRA & SOUZA, 2004); em estudos de composição corporal (NEVES *et al.*, 1999; NEVES, 2000; NEVES & SOUZA, 2001, NEVES, 2006), na avaliação de doenças articulares (ALVARENGA & SOUZA, 2003) e na estimativa não-invasiva de limiares anaeróbios (ALVARENGA & SOUZA, 2006). Tal método é baseado na resposta da corrente a uma excitação por degrau de tensão (resposta ao degrau). A principal vantagem deste método em relação ao método de varredura de senóides está na necessidade de um menor levantamento de sinais para a caracterização do sistema, já que a excitação utilizada (degrau de 0,5 V) explora teoricamente todos os componentes de frequência (sendo na prática obtidos componentes entre 1kHz e 500kHz).

Em NEVES e SOUZA (2000), a modelagem da bioimpedância corporal total foi definida por um modelo simplificado de interface eletrodo/tecido e o modelo clássico de bioimpedância corporal (Figura 27).

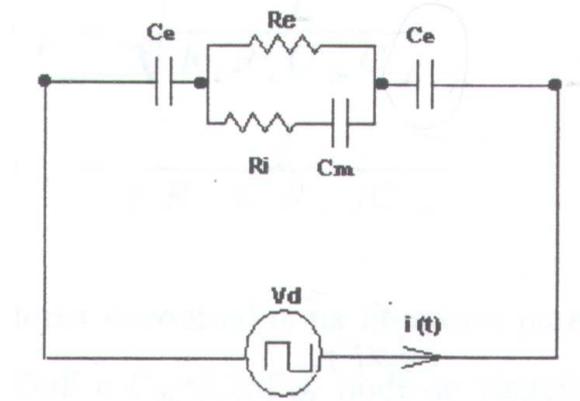


Figura 27 – Modelo simplificado para medições de bioimpedância corporal (NEVES & SOUZA, 2000).

De acordo com este sistema, o comportamento da corrente é expresso pela equação 5.

$$i(t) = i_p [(k_1 e^{p_1 t}) + (k_2 e^{p_2 t})] \quad (5)$$

onde,

$$i_p = \frac{V_d (R_i + R_e)}{(R_i R_e)} \quad (6)$$

$$k_1 = \frac{p_1 + \omega_z}{p_1 - p_2} \quad (7)$$

$$k_2 = \frac{p_2 + \omega_z}{p_2 - p_1} \quad (8)$$

$$p_1 = \left(\frac{-\omega_p + \omega_p \sqrt{1 - 4Q^2}}{2Q} \right) \quad (9)$$

$$p_2 = \left(\frac{-\omega_p - \omega_p \sqrt{1 - 4Q^2}}{2Q} \right) \quad (10)$$

Sendo o fator de qualidade (Q), e as frequências do pólo (ω_p) e do zero (ω_z) expressas como:

$$Q = \frac{1}{\omega_p [R_e C_e + (R_i + R_e) C_m]} \quad (11)$$

$$\omega_p = \sqrt{\frac{1}{R_i R_e C_m C_e}} \quad (12)$$

$$\omega_z = \frac{1}{(R_i + R_e)C_m} \quad (13)$$

Através da corrente esperada $i(t)$ da equação 5 e da sua análoga obtida experimentalmente, podem-se extrair os parâmetros elétricos modeladores da bioimpedância corporal, tais como a resistência extracelular (R_e), a resistência intracelular (R_i), a capacitância de membrana (C_m) e a capacitância do eletrodo (C_e). Um procedimento de minimização de erro é utilizado para a obtenção dos melhores parâmetros para ajustar a expectativa teórica aos dados experimentais. No trabalho original (NEVES e SOUZA, 2000), o algoritmo utilizado foi baseado em gradiente descendente e possuía como valores iniciais $R_i = 1600 \Omega$, $R_e = 1000 \Omega$, $C_m = 2,0 \text{ nF}$ e $C_e = 7,0 \text{ nF}$.

A utilização do referido método ao presente trabalho implicou em uma prévia validação de modelo elétrico para a pele, sendo desenvolvidos alguns circuitos baseados na análise de dispersão das camadas da pele (modelos descritivos), descartando suas características físicas (modelos explanatórios). A determinação do modelo adequado foi baseada no ajuste dos dados medidos e nas propriedades elétricas da pele capazes de prever alterações cutâneas fisiológicas e patológicas.

4.1.1 Resposta ao Degrau e modelo clássico de bioimpedância

Em um estudo inicial (MENDONÇA & SOUZA, 2003) o método e o modelo de bioimpedância corporal total anteriormente mencionados foram utilizados para determinação dos parâmetros de impedância da pele antes e após a indução da irritação cutânea. Os valores iniciais do algoritmo de otimização foram alterados para valores mais próximos dos apresentados pela pele de acordo com a literatura (KONTTURI *et al.*, 1993), isto é, $R_i = 10 \text{ k}\Omega$, $R_e = 50 \text{ k}\Omega$, $C_m = 2,0 \text{ nF}$ e $C_e = 500 \text{ pF}$. Este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade do método da resposta de corrente ao degrau de tensão na detecção das alterações da pele induzidas por altas concentrações do irritante lauril sulfato de sódio (5%). Foram incluídos no estudo 20 voluntários que não apresentavam doenças de pele. A substância irritante foi colocada em uma câmara (*Finn Chambers*) de 12 mm que foi aplicada na parte anterior do antebraço e que ficou em oclusão durante 1 hora. A leitura da bioimpedância foi realizada antes da aplicação do irritante e imediatamente após a sua remoção.

O primeiro protótipo do sistema de espectroscopia de bioimpedância foi equipado com um *probe* coaxial (Figura 28a), que foi aplicado sobre a pele (Figura 28b) para injeção do degrau de tensão e detecção da corrente elétrica. O sinal foi enviado para um *software* desenvolvido em LabVIEW® 6i (National Instruments, Austin – Texas, USA) onde foram feitos os ajustes entre o sinal medido e a expectativa teórica baseada no modelo descrito anteriormente.



Figura 28 – Ilustração do *probe* (primeira versão) utilizado para medir a bioimpedância da pele. Os anéis internos e externos são os eletrodos ativos e o anel intermediário é usado como eletrodo de guarda (a); aplicação do *probe* sobre a pele no antebraço anterior (b).

Pela leitura visual não foi detectada nenhuma alteração, enquanto que pela bioimpedância, foi possível observar diferenças estatisticamente significativa entre as duas medidas (antes e após a aplicação do irritante) através do teste *t-student* pareado, em todos os parâmetros analisados, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos parâmetros de bioimpedância estimados pelo modelo clássico de bioimpedância corporal.

	Antes da aplicação do irritante	Após a remoção do irritante	Valores de p
R_i (k Ω)*	14,4 \pm 4,9	28,7 \pm 15,1	0,001
R_e (k Ω)*	28,5 \pm 10,1	8,4 \pm 6,1	0,001
R_{inf} (k Ω)*	8,7 \pm 1,07	5,8 \pm 2,8	0,01
C_e (nF)*	227,9 \pm 122,4	730,7 \pm 456,2	0,047
Índice*	3,28 \pm 1,24	1,35 \pm 0,39	0,03

O símbolo (*) mostra a existência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as medidas anteriores e posteriores à aplicação do irritante através do teste *t-student* pareado. O índice é a razão entre a impedância em baixa e alta frequência.

Apesar da adequação pouco satisfatória do modelo às características de dispersão observadas na pele, os resultados puderam demonstrar que o método era sensível o bastante para detectar a presença do irritante.

4.1.2 Resposta ao Degrau e modelo de bioimpedância com CPE (*Constant Phase Element*)

Como anteriormente mencionado, o modelo baseado somente nos elementos passivos resistivos (R_e e R_i) e capacitivos (C_m) não é suficiente para representar as características conhecidas das várias camadas constituintes da pele.

Deste modo, o modelo inicialmente investigado foi substituído por outro mais representativo das características elétricas da pele associadas ao fenômeno da dispersão (figura 29).

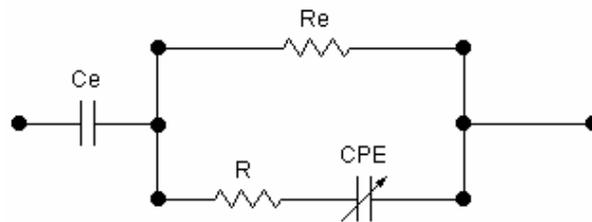


Figura 29 – Modelo elétrico da pele humana (primeira versão).

Tal modelo é constituído por um capacitor C_e modelando a capacitância de eletrodo e um Elemento de Fase Constante (*Constant Phase Element - CPE*) de Fricke (R em série com CPE), também conhecido como elemento série de Cole, em paralelo com um elemento puramente resistivo (R_e) que modela a condução elétrica em baixas frequências, e que normalmente está associado ao espaço extracelular.

A utilização de um modelo elétrico da pele que inclui o CPE resulta em um semicírculo deprimido no gráfico de impedância de Nyquist, sendo que medidas experimentais de impedância da pele mostram melhor concordância com tal modelo (KONTTURI *et al.*, 1993), do que com aqueles que só utilizam elementos passivos clássicos (resistores e capacitores).

A impedância do elemento série de Cole ou CPE_F (Fricke) é definida na equação 14:

$$Z_{cpeF} = R + \frac{R}{(j\omega)^\alpha}, \quad (14)$$

onde ω é a frequência angular ($\omega = 2\pi f$, sendo f a frequência em Hz) e o expoente α é um parâmetro do CPE que pode variar entre 0 e 1, mas que em medidas experimentais da pele tal valor normalmente encontra-se entre 0,5 e 1,0 (KONTTURI *et al.*, 1993). Quando $\alpha = 1$, o CPE se comporta como um capacitor ideal (e o modelo total não

apresenta o fenômeno de dispersão) e quando assume valores entre 0,5 e 1,0, o *CPE* é descrito como um pseudo capacitor.

O valor de α está relacionado com o grau de depressão do semicírculo observado no gráfico de impedância de Nyquist. Quanto menor o valor, maior a depressão do semicírculo no eixo x e maior o efeito de dispersão dielétrica.

Apesar de existirem relatos na literatura de utilização de *CPEs* na interpretação de dados de impedância da pele, o equacionamento da expressão da resposta em corrente para excitação por degrau constitui-se em uma contribuição original deste trabalho. Vale lembrar que a solução exata envolve cálculos de equações diferenciais fracionárias, campo de estudo dos números fractais (KILBAS *et al.*, 2006).

Uma vez que o cálculo da resposta de corrente ao degrau de tensão é realizado por meio da Transformada de Laplace (método tradicionalmente utilizado no cálculo da resposta impulsiva ou da resposta do degrau), o primeiro passo para obter-se uma solução matemática e computacionalmente viável foi realizar-se uma aproximação da impedância do *CPE_F* de Fricke ao invés de uma aproximação baseada somente no *CPE*. Assim, a impedância do elemento série de Cole ou *CPE_F* (Fricke), definida na equação 14, foi primeiramente equacionada no domínio de Laplace (equação 15):

$$Z_{cpeF} = R + \frac{R}{(s)^\alpha}. \quad (15)$$

Considerando-se que a solução do sistema envolve equações diferenciais devido a exponencial α , foi feita uma aproximação em baixas frequências ($s \approx 1$) e a equação 15 foi substituída pela equação 16:

$$Z_{cpeF} = R \cdot \left(1 + \frac{1}{1 + \alpha s} \right), \quad (16)$$

que por sua vez pode ser re-escrita como a equação 17, dando origem a uma expressão aproximada para a impedância do *CPE_F* (Fricke).

$$Z_{cpeF} = R \cdot \frac{(s + 2/\alpha)}{(s + 1/\alpha)} \quad (17)$$

A Figura 30 mostra a comparação do módulo e da fase da expressão exata da impedância CPE_F (Fricke) (equação 14) e de sua aproximação (equação 16). Pode-se observar que o modelo aproximado apresenta valores semelhantes ao modelo real em grande parte da faixa de frequência.

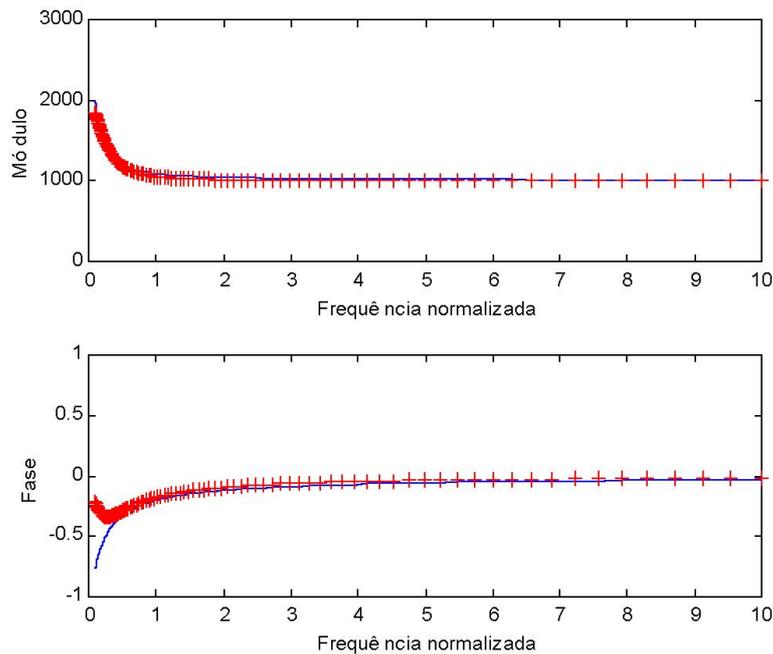


Figura 30 – Comparação do módulo e da fase de Z_{cpeF} (linha contínua) e sua aproximação (linha em cruz).

De acordo com a aplicação do método de espectroscopia proposto e com o novo modelo da pele, o comportamento da corrente pode ser expresso pela equação 18, onde novamente observa-se que a resposta da corrente é composta por duas exponenciais acrescidas de um termo impulsivo.

$$i(t) = k_0 + k_1 \cdot e^{(\omega_1 \cdot t)} + k_2 \cdot e^{(\omega_2 \cdot t)}, \quad (18)$$

onde ω_1 e ω_2 são raízes da equação característica da resposta ao degrau (equação 19):

$$s^2 + s \cdot \left[\frac{C_e R_e R + R_e \alpha + R \alpha}{C_e R_e R \alpha} \right] + \frac{2R + R_e}{C_e R_e R \alpha}. \quad (19)$$

Considerando a função de transferência da resposta de corrente ao degrau de tensão $H(s)$ (equação 20),

$$H(s) = \frac{\left[s^2 (C_e R_e \alpha + C_e R \alpha) + s (2C_e R + C_e R_e) \right]}{\left[s^2 C_e R_e R \alpha + s (C_e R_e R + R_e \alpha + R \alpha) + 2R + R_e \right]}, \quad (20)$$

a resposta de corrente no domínio de Laplace seria (equação 21):

$$I(s) = \frac{vd}{s} \cdot H(s) = vd \cdot \frac{\left[s^2 (C_e R_e \alpha + C_e R \alpha) + s (2C_e R + C_e R_e) \right]}{s (s + \omega_1) (s + \omega_2)} \quad (21)$$

Através do cálculo de resíduos (DESOER e KUH, 1969) os coeficientes k_i podem ser obtidos como:

$$\frac{\left[s (C_e R_e \alpha + C_e R \alpha) + (2C_e R + C_e R_e) \right]}{(s + \omega_1) (s + \omega_2)} = \frac{k_1}{s + \omega_1} + \frac{k_2}{s + \omega_2} \quad (22)$$

$$k_1 = \left. \frac{s^2 \cdot (C_e R_e \alpha + C_e R \alpha) + s \cdot (2C_e R + C_e R_e)}{s \cdot (s + \omega_2)} \right|_{s = -\omega_1} \quad (23)$$

$$k_2 = \left. \frac{s^2 \cdot (C_e R_e \alpha + C_e R \alpha) + s \cdot (2C_e R + C_e R_e)}{s \cdot (s + \omega_1)} \right|_{s = -\omega_2} \quad (24)$$

Como investigação da potencialidade da primeira versão do modelo da pele, os dados coletados para o estudo anteriormente descrito (MENDONÇA & SOUZA, 2003) foram novamente ajustados ao novo modelo da pele, possibilitando assim a estimação da variação do parâmetro α com a irritação (FERREIRA *et al.*, 2004). O ajuste dos dados à expectativa teórica pode ser observado na Figura 31 e os parâmetros estimados antes da aplicação do irritante e após a remoção deste estão apresentados na tabela 3.

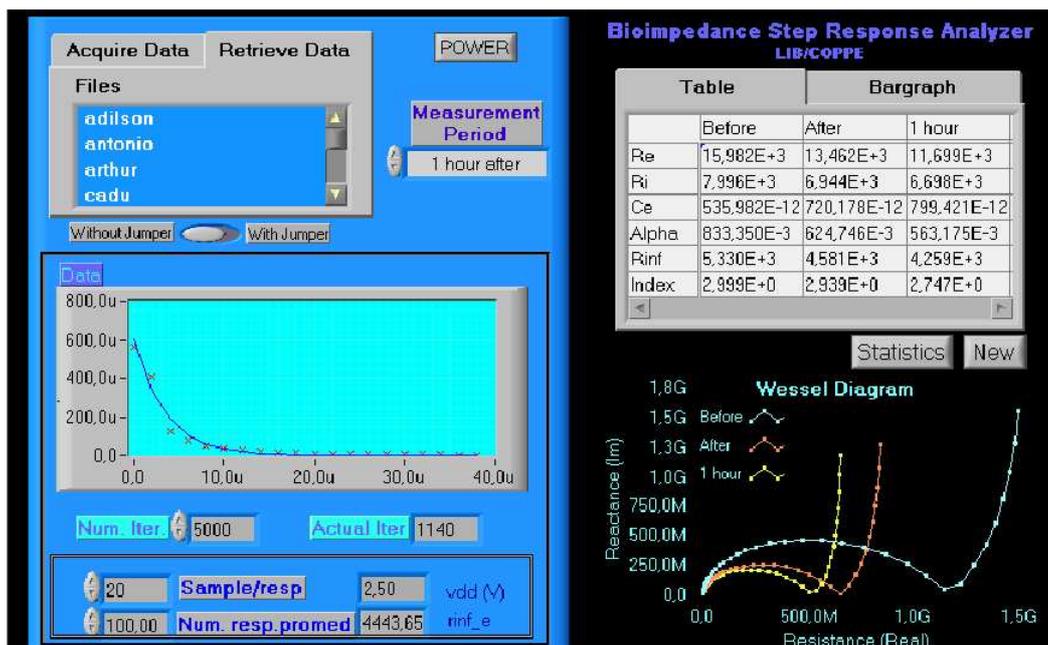


Figura 31 – Paineil frontal do programa de aquisição e ajuste dos dados de bioimpedância utilizando a primeira versão do modelo elétrico da pele.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos parâmetros de bioimpedância estimados pelo modelo da pele incluindo o CPE (primeira versão).

	Antes da aplicação do irritante	Após a remoção do irritante	Valores de p
R (k Ω)*	11,0 \pm 2,7	9,3 \pm 2,0	0,01
R_e (k Ω)*	16,4 \pm 3,7	14,4 \pm 3,3	0,03
R_{inf} (k Ω)*	6,6 \pm 1,5	5,5 \pm 1,5	0,01
C_e (nF)*	330,5 \pm 169,1	657,2 \pm 447,5	0,04
α *	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	0,01
Índice	2,5 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2	0,15

O símbolo (*) mostra a existência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as medidas anteriores e posteriores à aplicação do irritante através do teste *t-student* pareado. O índice é a razão entre a impedância em baixa e alta frequência.

Apesar da melhor adequação às características de dispersão observadas na pele e dos resultados mostrarem que o método é sensível o bastante para detectar a presença do irritante, as propriedades elétricas dos componentes deste modelo não são capazes de prever alterações cutâneas fisiológicas e patológicas.

Por este motivo, foi investigado o modelo da pele proposto por GRIMNES e MARTINSEN (2005) (Figura 25b) após adaptação conveniente para o presente estudo (Figura 32).

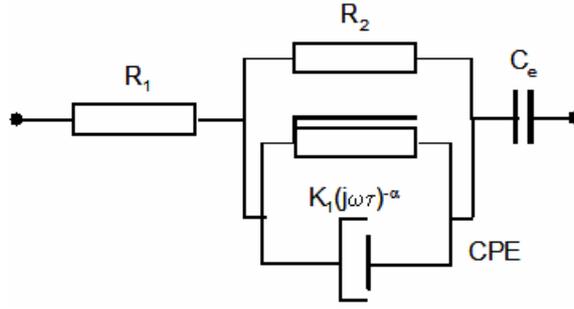


Figura 32: Circuito equivalente da pele para calcular a resposta da corrente à excitação por degrau de tensão e para derivar os parâmetros elétricos de impedância: C_e : capacitância de eletrodo; R_1 : resistência interna; R_2 : resistência externa; CPE : elemento de fase constante.

Neste modelo, R_1 representa a resistência interna do tecido, R_2 modela a resistência externa do tecido, C_e representa a interface eletrodo/tecido e o CPE (elemento de fase constante) modela o processo de relaxação dielétrica do estrato córneo (POON e CHOY, 1981). O CPE pode ser considerado como um elemento composto por infinitos componentes agrupados que modela as camadas de estrato córneo. Tal modelo é mais bem ajustado aos tecidos e células em suspensão (GRIMNES e MARTINSEN, 2005).

A impedância do CPE pode ser definida como na equação 25:

$$Z_{cpeF} = \frac{K}{(j\omega)^\alpha}, \quad (25)$$

onde ω é a frequência angular (rd/s) e K é um parâmetro com dimensão complexa, ou seja, $[\Omega \cdot (\text{rd/s})^\alpha]$.

Em virtude da dificuldade na interpretação do parâmetro K , uma vez que sua dimensão não é $[\Omega]$, este foi re-definido como a razão K_1/K_2 , onde a dimensão de K_1 é $[\Omega]$ e a dimensão de K_2 é $[(\text{rd/s})^{-\alpha}] = [\tau^\alpha]$. Assim, a equação da impedância do CPE pode ser reescrita pela equação 26:

$$Z_{cpeF} = \frac{K_1}{(j\omega\tau)^\alpha} \quad (26)$$

A introdução do parâmetro τ faz com que o denominador da equação 26, isto é o produto $\omega\tau$, seja agora adimensional. Portanto, o parâmetro K_1 pode ser

interpretado como a resistência do *CPE* na frequência característica $\omega_c=1/\tau$, sendo τ considerado a constante de tempo do sistema. O parâmetro α é a constante de fase do componente frequência-dependente e, como já mencionado, está relacionada com o grau de depressão do semi-círculo no gráfico de impedância de Nyquist.

Como anteriormente mencionado, o sistema de espectroscopia por bioimpedância utilizado para obter os parâmetros da pele é baseado no modelo elétrico do sistema biológico em questão para permitir a obtenção da expressão teórica da resposta da corrente à excitação por degrau de tensão. Tal estimativa teórica é baseada na Transformada de Laplace, onde neste caso, a impedância do *CPE* (equação 26) pode ser descrita como:

$$Z_{cpeF} = \frac{K_1}{(j\omega\tau)^\alpha} \quad \text{que para } s = j\omega \quad Z_{cpeF} = \frac{K_1}{(\tau s)^\alpha} \quad (27)$$

Como também mencionado, a solução exata de tal sistema envolve a utilização de técnicas de equações diferenciais fracionárias, uma vez que os valores de α variam entre 0,5 e 1,0. Tal utilização normalmente leva a equações de difícil solução analítica. Por este motivo, foram feitas aproximações baseando-se na hipótese de que a região próxima à frequência característica é a que fornece mais informações do sistema. Baseado nesta consideração, o produto τs da equação 27 foi considerado próximo da unidade e o termo $(\tau s)^\alpha$ foi aproximado por uma expansão em série de Taylor truncada no termo de primeira ordem (equação 28):

$$\tau s^\alpha = 1 + \alpha(\tau s - 1) \quad (28)$$

A Figura 33 mostra o aspecto da função real $(\tau s)^\alpha$ em função do produto τs , da aproximação com o termo de 1ª ordem e da aproximação com os termos de 1ª e 2ª ordens com diferentes valores de α . Pode-se observar que próximo à frequência característica ($\tau s \approx 1$) a aproximação de 1ª ordem se distancia pouco da função verdadeira $(\tau s)^\alpha$ e em altas frequências fica mais próxima do que a aproximação com os termos de 1ª e 2ª ordens para os diversos valores de α , justificando a utilização da aproximação com apenas o primeiro termo para solucionar a impedância do *CPE*.

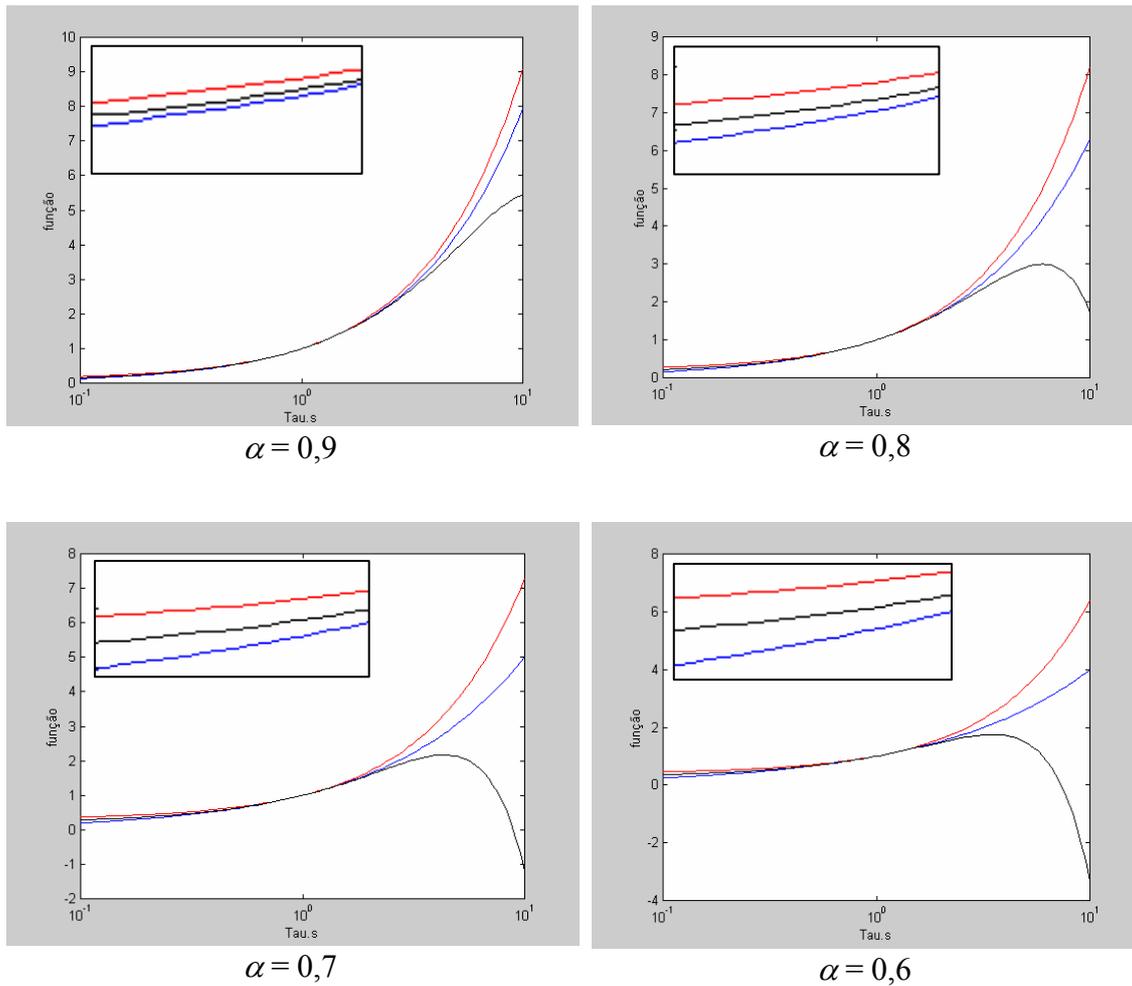


Figura 33: Distribuição das funções $(\tau)^{\alpha}$ (■), $1 + \alpha(\tau - 1)$ (termo de 1ª ordem da aproximação) (■) e $1 + \alpha(\tau - 1) + 0,5(\alpha - 1) \cdot \alpha(\tau - 1)^2$ (termos de 1ª e 2ª ordens da aproximação) (■) com diferentes valores de α .

Baseado na aplicação do método proposto para solucionar o problema de obter-se a transformada de Laplace do CPE, é possível demonstrar que a função de transferência $H(s)$ da resposta da corrente à excitação por degrau de tensão é expressa em:

$$H(s) = \frac{\left[s^2 C_e R_2 R_1 \tau \alpha + s (C_e R_2 R_1 (1 - \alpha) + C_e K_1 R_1 + C_e K_1 R_2 + \tau \alpha R_2) + R_2 (1 - \alpha) \right]}{\left[s^2 C_e R_2 \tau \alpha + s (C_e R_2 (1 - \alpha) + C_e K_1) \right]} \quad (29)$$

A transformada inversa de Laplace do produto entre a função de transferência $H(s)$ e a entrada do degrau de tensão dá origem à estimação teórica da resposta da corrente no domínio do tempo como descrito na equação 30:

$$i(t) = \left[k_0 + \left(k_1 e^{\omega_1 t} \right) + \left(k_2 e^{\omega_2 t} \right) \right], \quad (30)$$

onde ω_1 e ω_2 são raízes da equação característica da resposta da corrente à excitação por degrau de tensão (equação 31) e os coeficientes k_i ($i = 0, 1$ ou 2) podem ser obtidos após a aplicação de cálculos residuais (DESOER e KUH, 1969), como demonstrado no modelo anterior.

$$s^2 + s \cdot \left[\frac{C_e R_2 R_1 (1 - \alpha) + C_e K_1 R_1 + C_e R_2 K_1 + \tau \alpha R_2}{\tau \alpha R_2 R_1 C_e} \right] + \frac{R_2 (1 - \alpha) + K_1}{\tau \alpha R_2 R_1 C_e} \quad (31)$$

Com a nova equação da corrente obtida através da solução do modelo específico da pele e com a resposta obtida experimentalmente, podem-se estimar os parâmetros de impedância após o procedimento de minimização de erro baseado no gradiente descendente. O ajuste da expectativa teórica aos dados experimentais à pode ser observado na Figura 34.

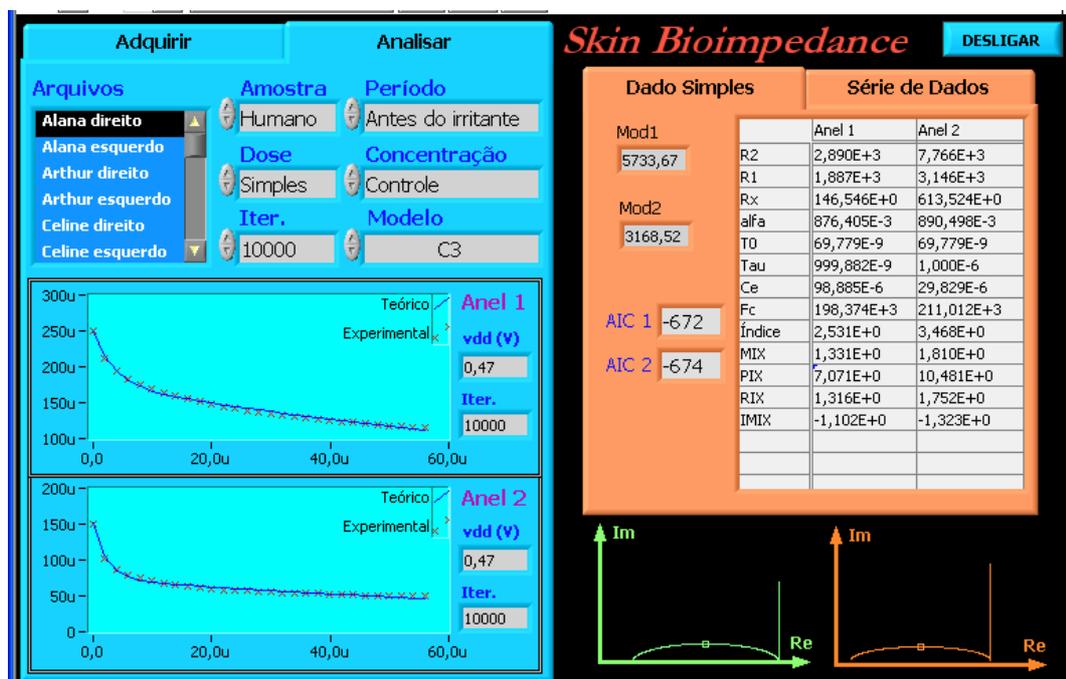


Figura 34: Painel frontal do programa de aquisição e ajuste dos dados de bioimpedância utilizando o modelo elétrico da pele (definitivo).

4.2 Probe

O *probe* utilizado no estudo anterior (MENDONÇA e SOUZA, 2003) foi construído em caráter experimental e, portanto, foi desenvolvida uma nova

configuração baseada na literatura (NICANDER, 1998), que pode ser observada na Figura 35.

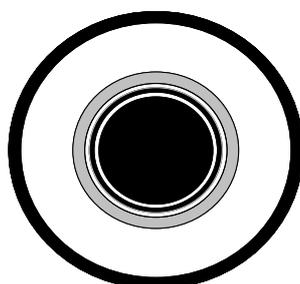


Figura 35 – Ilustração do *probe* para medição da bioimpedância da pele. Os eletrodos ativos estão em preto.

Baseado nesta configuração, a impedância da pele foi medida entre dois eletrodos, embora quatro eletrodos estejam incluídos. O eletrodo circular central é cercado por três eletrodos concêntricos de ouro que foram depositados em uma base de alumina. O eletrodo central constituiu-se em um disco de 2,4 mm, cercado a 0,2 mm de distância por um anel de 0,2 mm. O próximo eletrodo, que está a 0,2 mm de distância do primeiro anel tem dimensão de 0,5 mm e o último eletrodo de 0,5 mm está distanciado do anterior em 2,2 mm.

A penetração da corrente no tecido cutâneo está correlacionada com a frequência, com a distância entre os eletrodos, com o tamanho dos eletrodos e com a propriedade física do tecido (ÅBERG, 2002). Porém, a profundidade de penetração da corrente pode ser aproximada para a metade da distância entre os eletrodos (Figura 36). Frequências altas têm penetração mais profunda do que frequências baixas em uma estrutura de dupla camada onde a camada superficial é menos condutiva do que as camadas internas.

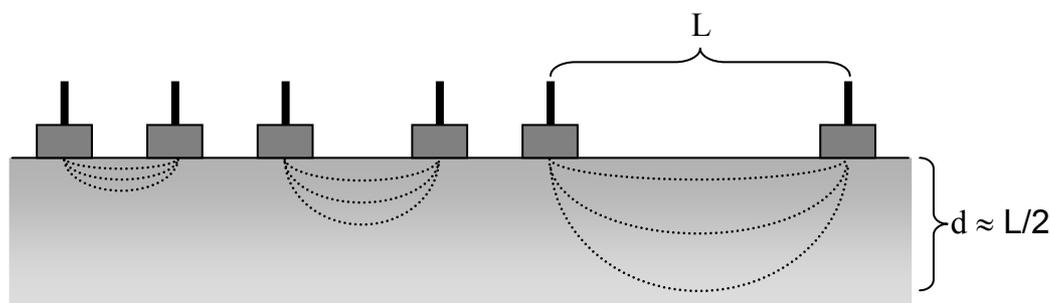


Figura 36 – Linhas de corrente em um tecido biológico com a variação da distância entre os eletrodos. A profundidade de penetração da corrente é aproximadamente a metade da distância entre os eletrodos (ÅBERG, 2002)

Embora o *probe* utilizado neste estudo tenha o mesmo desenho daquele apresentado na literatura no qual a corrente penetra em 5 profundidades, foram utilizados apenas dois anéis distanciados do eletrodo central possibilitando a medição de duas profundidades. A primeira profundidade seria a metade da distância entre o anel central e o primeiro anel ($\approx 0,75$ mm) e a segunda profundidade seria a metade da distância entre o anel central e o último anel ($\approx 2,37$ mm). De acordo com NICANDER *et al.* (1997), a primeira profundidade reflete principalmente as propriedades do epitélio superior (estrato córneo) e a segunda profundidade reflete as propriedades sobrepostas de todas as camadas da pele.

Apesar de existir uma relação entre a distância dos eletrodos e a profundidade de penetração da corrente, a estimativa da primeira profundidade (anel 1) é incerta, uma vez que não há como se determinar fisicamente o local de penetração exato da corrente. Entretanto, foi desenvolvido um modelo experimental (Figura 37) para fornecer informações sobre a penetração total da corrente na pele (anel 2). O modelo foi composto por finas camadas de um composto de gelatina+agar-agar sobrepostas em uma base de gelatina+agar-agar+cloreto de sódio. Uma aquisição do sinal de bioimpedância foi inicialmente realizada somente usando-se a base e posteriormente a cada sobreposição de uma camada de gelatina+agar-agar. Como a camada basal apresenta maior condutividade pelo conteúdo de cloreto de sódio, a profundidade de penetração da corrente foi definida como a espessura de camadas através da qual a resistência no anel 2 (camadas mais internas) passou a ser maior do que a resistência no anel 1 (camadas superiores) indicando que a corrente não estava mais passando pela camada de alta condutividade (gelatina+agar-agar+cloreto de sódio).

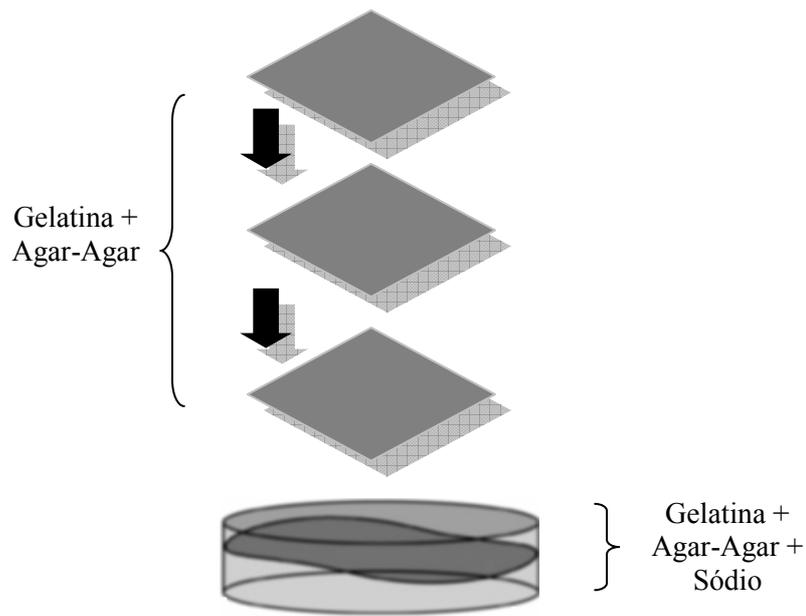


Figura 37: Modelo experimental para determinar a profundidade total de penetração da corrente.

Após a repetição do experimento por 3 vezes, de modo a se ter uma avaliação média, a alteração da condutividade foi detectada entre as camadas 7 e 8 (Tabela 4), que corresponde a uma espessura de aproximadamente 2 mm, ou seja, a mesma espessura identificada em outro modelo experimental realizado por NICANDER *et al.* (1995). De acordo com OLLMAR *et al.* (1995), para estudos de irritação cutânea que utilizam impedância elétrica, as dimensões de profundidade de interesse compreendem entre 10 μm e 1 a 2 mm, dependendo da região anatômica e da variação individual.

Tabela 4: Valores estimados de R_l (Ω) medidos pelos anéis 1 e 2 de diversas camadas de gelatina e da camada basal baseando-se no modelo clássico da pele.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Base anel 1	600,243	546,021	506,181
Base anel 2	537,816	503,009	501,382
Camada 3 anel 1	1246,000	1173,000	2510,000
Camada 3 anel 2	881,743	1015,000	1432,000
Camada 4 anel 1	1398,000	1311,000	2127,000
Camada 4 anel 2	1110,000	1158,000	1585,000
Camada 5 anel 1	1951,000	1366,000	2504,000
Camada 5 anel 2	1779,000	1143,000	1923,000
Camada 6 anel 1	2282,000	620,132	698,476
Camada 6 anel 2	1826,000	699,563	671,015
Camada 7 anel 1	3606,000	2138,000	1946,000
Camada 7 anel 2	2601,000	1432,000	2690,000
Camada 8 anel 1	692,774	619,342	597,782
Camada 8 anel 2	796,234	704,906	610,963
Camada 9 anel 1	2232,000	910,760	553,481
Camada 9 anel 2	2912,000	972,871	623,183
Camada 10 anel 1	634,358	1045,000	1188,000
Camada 10 anel 2	724,424	1269,000	1281,000

4.3 Delineamento do estudo

O estudo é caracterizado por uma pesquisa experimental longitudinal e prospectiva.

4.4 Amostra

Os testes foram realizados em humanos voluntários escolhidos aleatoriamente em uma clínica dermatológica e em coelhos do Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Foram incluídos no estudo homens e mulheres na faixa etária de 18 a 30 anos e fototipo de I a III na classificação de Fitzpatrick (FITZPATRICK *et al.*, 1999).

Foram excluídos do estudo crianças, gestantes e nutrízes e indivíduos que apresentassem doenças de pele ou história de alguma manifestação atópica (urticária crônica, dermatite atópica). Só foram utilizados no estudo os animais com a pele íntegra sendo descartado o animal portador de qualquer doença de pele.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ) (anexo 1) e

pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ) (anexo 2).

4.5 Substância e procedimento do teste

A substância de teste utilizada para irritação cutânea foi o SLS (Pharma Special, Wuppertal, Germany) diluído em água destilada nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% para doses simples e 0,5% e 1,0% para doses repetidas, sendo esta última realizada apenas em coelhos. A pureza do SLS é de 93,33%.

Cinquenta microlitros de uma solução dissolvida de SLS foram aplicadas em um disco de papel sobre uma câmara (*Finn Chambers*[®]) de 12 mm (Epitest Ltd Oy, Hyrylä) que ficou em contato com a pele. Essas câmaras têm a vantagem de, quando removidas, deixar marcas bem individualizadas no ponto do teste cutâneo; permitem ainda contato uniforme com a pele e não ocasionam perda ou dispersão do material testado.

4.5.1 Procedimento de irritação primária da pele com dose simples em coelhos

Esta avaliação é realizada através da observação e quantificação de reações cutâneas que podem surgir após a aplicação de um produto químico sobre a pele de animais. Os animais são observados por um período determinado de tempo após a aplicação única do produto, permitindo-se assim uma verificação do aparecimento de reações imediatas e tardias.

4.5.1.1 Animais

Foram utilizados 15 coelhos albinos neozelandeses, machos e fêmeas, hípidos e de peso corpóreo de 2,0 a 3,0 kg. Os coelhos albinos foram escolhidos por apresentarem pele mais sensível que a pele humana às substâncias irritantes.

Os animais foram mantidos em gaiolas durante todo o período do teste, em sala de temperatura constante ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e de umidade relativa entre 30 e 70%. Os períodos de claro e escuro tiveram ciclos de 12 horas e o regime alimentar é o clássico de laboratório, com água potável *ad libitum*.

4.5.1.2 Preparo dos animais

Cada animal foi tricotomizado cuidadosamente na área dorsal 24 horas antes do início do teste (Figura 38).



Figura 38 - Área dorsal do coelho tricotomizada.

4.5.1.3 Aplicação do produto

Antes da aplicação do produto, o animal era segurado delicadamente até que se acalmasse. Posteriormente, foi aplicada uma solução salina fisiológica durante 1 minuto para reduzir a impedância do estrato córneo e possibilitar a leitura pelo instrumento de bioimpedância. A seguir, o produto foi aplicado em diferentes concentrações de forma ordenada para facilitar a colocação da substância no local correto. Uma câmara com água destilada também foi colocada em contato com a pele como referência (controle). A substância irritante aplicada e o controle foram ocluídos por adesivos hipoalergênicos e gaze durante 24 horas (Figura 39)



Figura 39 - Oclusão das substâncias irritantes com adesivos hipoalergênicos e gaze.

4.5.1.4 Leitura das reações cutâneas

A leitura por bioimpedância (Figura 40) foi realizada após a aplicação da solução salina fisiológica e antes da aplicação do produto (dia 0) para comparação dos

parâmetros no período anterior e posterior à irritação. A câmara ocluída foi retirada 24 horas após a aplicação do produto. A leitura do teste pela bioimpedância e pelo método visual foi feita durante os dias 2, 3, 4 e 5 após a aplicação do produto e a observação visual foi registrada através de uma câmara digital (Kodak EasyShare) e descrita em um formulário específico (anexo 3). A primeira avaliação foi realizada 24 horas após a retirada do irritante porque o efeito da oclusão permanece durante algumas horas após a remoção da câmara (LÖFFLER & HAPPLE, 2003).



Figura 40 - Aplicação do *probe* na área dorsal do coelho para leitura de bioimpedância.

A graduação da formação de edema, medida através do paquímetro, e da intensidade das reações cutâneas foi baseada no método de Draize (DRAIZE *et al.*, 1944) (anexo 4).

Após realizar a leitura, foi feito o cálculo do índice de irritação cutânea primária ou índice de Draize. Para se obter os pontos para esta avaliação, somam-se os pontos da formação de edema e da formação de eritema (anexo 4) e calcula-se a média aritmética das avaliações durante o período de observação.

De acordo com o índice de irritação cutânea primária obtido, o produto pode ser classificado em diferentes potenciais de irritação que podem ser observados na tabela 5:

Tabela 5 – Classificação de irritante primário cutâneo.

Valor do Índice	Classificação
0 – 0,9	Não irritante
1,0 – 1,9	Ligeiramente irritante
2,0 – 4,9	Moderadamente irritante
5,0 – 8,0	Severo irritante

Como o objetivo do estudo não era classificar o produto em potencial de irritação, mas observar o grau de irritação, a classificação do método visual foi feita através da soma dos pontos de formação de edema e eritema em cada dia de avaliação.

4.5.2 Procedimento de irritação primária da pele com doses repetidas em coelhos

Esta avaliação é realizada através da observação e quantificação de reações cutâneas que podem surgir após a aplicação de um produto químico sobre a pele de animais. A substância é aplicada em doses repetidas, a intervalos de 24 horas entre uma aplicação e outra, sobre a pele dos animais de experiência.

Todas as etapas do processo são as mesmas da irritação primária da pele com dose única, com exceção do número de aplicações.

Foram utilizados 15 coelhos albinos neozelandeses diferentes daqueles utilizados no protocolo anterior.

Antes de cada aplicação do produto foi feita a leitura de bioimpedância. Posteriormente, o produto em baixas concentrações (0,5% e 1,0%) ficou ocluído por 24 horas e, ao final deste tempo, este foi retirado. Após 24 horas todo o procedimento de aplicação foi repetido e assim, sucessivamente, durante 4 dias totalizando quatro aplicações.

A observação dos sintomas edema e eritema nos animais, juntamente com a medição da bioimpedância, e o registro pela câmara digital foram feitos durante os dias 2, 3 e 4 após a primeira aplicação do produto. As lesões foram classificadas baseando-se na tabela de Draize (anexo 4) de acordo com o índice de irritação cutânea primária descrito anteriormente.

4.5.3 Procedimento de irritação primária da pele em humanos

Embora a informação obtida pelo teste animal seja importante, a extrapolação dos resultados para seres humanos, tanto de dose única quanto de doses repetidas do produto, não tem um valor determinado e o teste de contato (*patch test*) em humanos é indicado.

Por esta razão, foram feitos testes de irritação aguda em humanos que foram relacionados com os resultados obtidos em animais nas mesmas concentrações do produto.

No teste de contato, voluntários humanos são expostos a uma substância de teste sob uma câmara oclusiva no dorso ou na parte anterior do braço. Após 24 horas, a câmara é removida e a pele é classificada pelos sinais apresentados como edema e eritema.

As quatro câmaras contendo o irritante em concentrações diferentes (0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0%) foram aplicadas de forma ordenada nos antebraços anteriores esquerdo e direito em 12 humanos mantendo uma distância de 4 cm (Figura 41). Uma câmara vazia (sem irritante e água destilada) também foi colocada em contato com a pele como referência (controle). No antebraço esquerdo, antes da aplicação do irritante, foi aplicado um produto hidratante (trealose a 5%) para verificar a proteção contra a irritação.

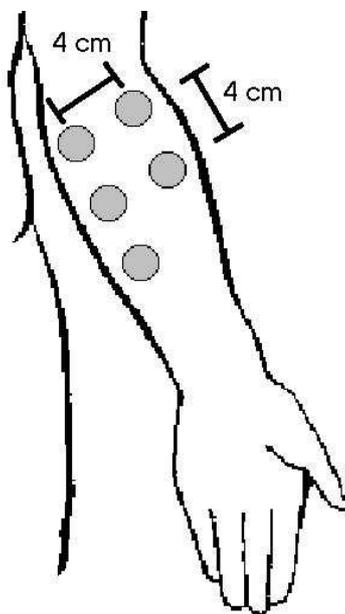


Figura 41 – Localização das câmaras no antebraço esquerdo. As câmaras são numeradas no sentido medial-lateral, proximal-distal.

Antes de cada medida, os indivíduos ficaram em repouso por 15 minutos em local arejado para evitar excesso de suor. A superfície da pele foi umedecida com uma solução salina fisiológica durante 1 minuto para reduzir a alta impedância do estrato córneo e eliminar o suor.

As câmaras ficaram em contato com a pele durante 24 horas e as leituras visuais e por bioimpedância foram realizadas antes da colocação das câmaras (dia 0) e 24 horas após a remoção destas (dia 2).

A avaliação visual foi baseada na escala sugerida por AGNER e SERUP (1990) (tabela 6) e a reação foi registrada por uma câmara digital (Kodak EasyShare) e em formulário específico (anexo 5).

Tabela 6 – Avaliação visual de irritação cutânea em humanos

Reação	Resultado
Ausente	0
Leve escamação ou eritema muito fraco	0,5
Eritema fraco e leve infiltração	1
Eritema visível, infiltração, possíveis vesículas e crostas	2
Eritema pronunciado, infiltração, possíveis vesículas, bolhas, pústulas e/ou crostas pronunciadas	3

4.6 Análise dos dados

Uma vez que os parâmetros de impedância da pele (R_1 , R_2 , K_1 e α) apresentam grande variabilidade inter-individual, os valores medidos foram convertidos em índice para normalização dos dados e melhor interpretação do comportamento geral da pele. Foram testadas diversas combinações de parâmetros para identificar o índice que apresentasse a maior correlação com o método visual (ver resultados).

4.7 Análise estatística

Os parâmetros de impedância obtidos em humanos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade da distribuição de dados Kolmogorov-Smirnov (K-S). Uma vez que neste protocolo foram realizadas apenas duas medidas (antes e após a aplicação do irritante), foi utilizado o teste *t-Student* pareado após a constatação da distribuição normal dos dados. O nível de significância adotado foi de 5%.

A comparação entre os valores de índice de impedância da referência (valores obtidos antes da aplicação do irritante) e de cada pontuação da escala visual (valores obtidos após a remoção do irritante) foi feita através do teste de duas amostras Kolmogorov-Smirnov que é aplicado quando as amostras apresentam distribuições diferentes (simétrica e assimétrica).

Os resultados obtidos durante dias consecutivos nos protocolos de coelhos foram analisados através do teste ANOVA com medidas repetidas de 1 fator (dia). O

valor p foi corrigido pelo procedimento de Tukey e foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$.

Testes de correlação de Spearman ordenado foram realizados entre as medidas da escala visual e o índice de impedância verificando assim a adequação deste método na determinação de irritação cutânea.

Todas as análises foram feitas através do pacote estatístico SPSS versão 10.0.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Índice de irritação cutânea (IX)

Como anteriormente mencionado, foram investigadas várias combinações de parâmetros de impedância da pele para se obter um índice capaz de identificar e descrever as alterações decorrentes do processo de irritação, uma vez que os parâmetros isolados apresentam grande variabilidade inter-individual impossibilitando a identificação de um padrão de resposta.

Inicialmente, foram feitas combinações de índices no anel 1 e no anel 2 separados, ou seja, os parâmetros do modelo do anel 1 foram usados para obtenção de um índice que descrevesse as alterações da camada superior e os parâmetros do anel 2 seriam usados para descrever as alterações das camadas mais internas da pele. Porém, todas as combinações apresentaram baixa correlação com a escala visual pelo teste de correlação de *Spearman*. Como foi observado que as maiores alterações nos parâmetros ocorreram no anel 2, foi investigado um índice que pudesse refletir as alterações internas em relação aos parâmetros da superfície (estrato córneo). Assim, o índice (equação 32) que apresentou maior correlação ($r > 0,6$) com a escala visual foi:

$$IX = \frac{R_1}{R_2} \cdot \alpha, \quad (32)$$

onde R_1 é a resistência interna da pele do anel 2, R_2 é a resistência externa da pele do anel 1 e α é o parâmetro do *CPE* do anel 1 que está associado ao fenômeno de dispersão do estrato córneo.

As Figuras 42 e 43 mostram a relação entre o índice de impedância e a escala visual em coelhos e humanos, respectivamente. A referência (ref) na escala visual inclui as observações no dia anterior à aplicação do irritante, enquanto que os outros valores da escala correspondem àqueles observados após a aplicação do irritante em todas as concentrações. Foram observadas correlações estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre as duas variáveis para coelhos ($r = 0,651$) e humanos ($r = 0,650$) através do teste de correlação de *Spearman*.

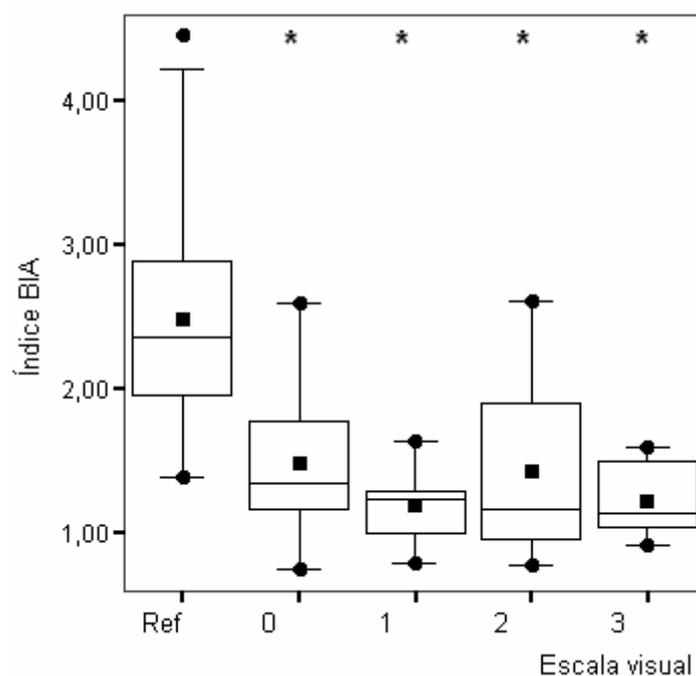


Figura 42: Box plot do índice de impedância elétrica em relação à escala visual em coelhos. O símbolo quadrado indica a média, o símbolo redondo inferior indica o valor mínimo e o símbolo redondo superior indica o valor máximo. Os marcadores (*) mostram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste de duas amostras Kolmogorov-Smirnov entre a referência e cada pontuação da escala visual.

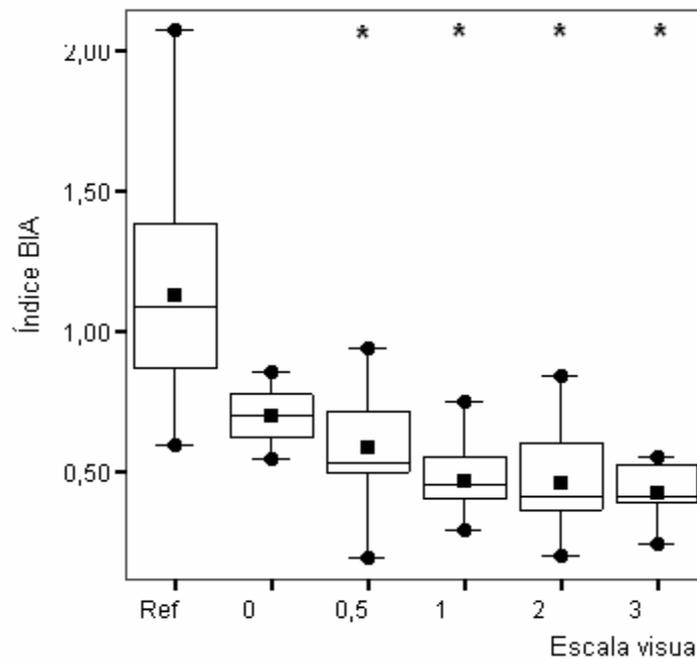


Figura 43: Box plot do índice de impedância em relação à escala visual em humanos. O símbolo quadrado indica a média, o símbolo redondo inferior indica o valor mínimo e o símbolo redondo superior indica o valor máximo. Os marcadores (*) mostram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste de duas amostras Kolmogorov-Smirnov entre a referência e cada pontuação da escala visual.

5.2 Escala visual e parâmetros de impedância da pele de coelhos e humanos antes e após a irritação

Nesta seção são apresentados a resposta visual (Figura 44 e Tabela 7) e os parâmetros de impedância da pele de coelhos e humanos antes da aplicação da câmara de referência e do *SLS* (dia 0) nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% e 24 horas após a remoção destes (dia 2). Os parâmetros de impedância incluem a resistência interna (R_1) e externa (R_2) da pele de coelhos e humanos (Figuras 45 e 46, respectivamente) e α (Tabela 8) estimados na profundidade superficial (anel 1) e interna (anel 2). Através destes parâmetros, foi derivado o índice de impedância (equação 32) que é apresentado na Figura 47.

Os resultados das seções 5.1 e 5.2 foram aceitos para publicação na revista *Skin Research and Technology* (FERREIRA *et al.*, 2006a).

5.2.1 Método visual

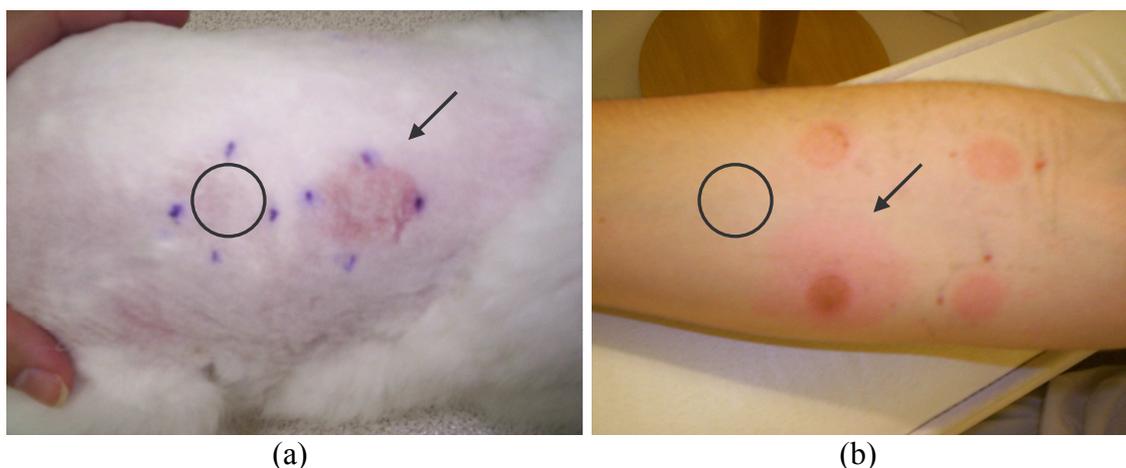


Figura 44: Ilustração da resposta visual cutânea em um coelho (a) e em um indivíduo (b) 24 horas após a remoção do irritante.

Na Figura 44 observa-se que não houve reação no local onde foi colocada a câmara de referência (círculo em preto) e a reação mais intensa ocorreu no local de aplicação de 5% de *SLS* (indicação da seta).

Tabela 7: Distribuição da escala visual para a referência (ref) e cada concentração de *SLS* no dia 2 em humanos e coelhos.

SLS	Escala Visual									
	Coelhos					Humanos				
	0	1	2	3	0	0,5	1	2	3	
Ref	15				12					
0,5%	15				3	4	4	1		
1,0%	15				1	4	3	4		
2,0%	10	4	1			1	4	5	2	
5,0%	5	1	3	6			1	5	6	

O número de respostas positivas foi maior em humanos do que em coelhos, uma vez que estes só mostraram alguma reação visual nas concentrações mais elevadas (2,0% e 5,0%). Foi observado um incremento na escala visual com o aumento da concentração de *SLS* e nenhum dos locais onde foi colocada a câmara de referência apresentou reação.

5.2.2 Impedância elétrica

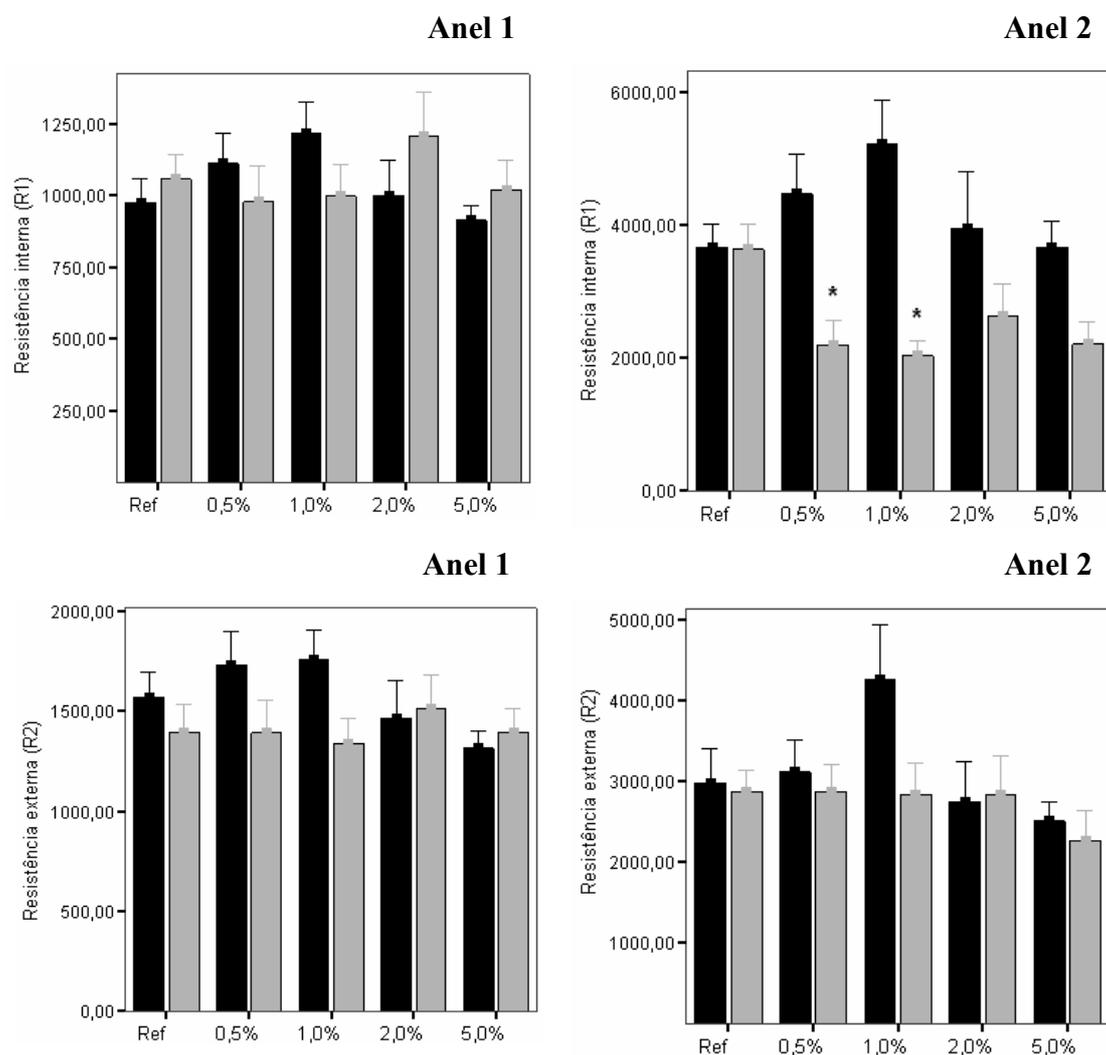


Figura 45: Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência (Ref) e de cada concentração de SLS nas profundidades 1 e 2 do dia 0 (■) comparado com o dia 2 (□) em coelhos. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste *t-Student* pareado entre o dia 0 e o dia 2.

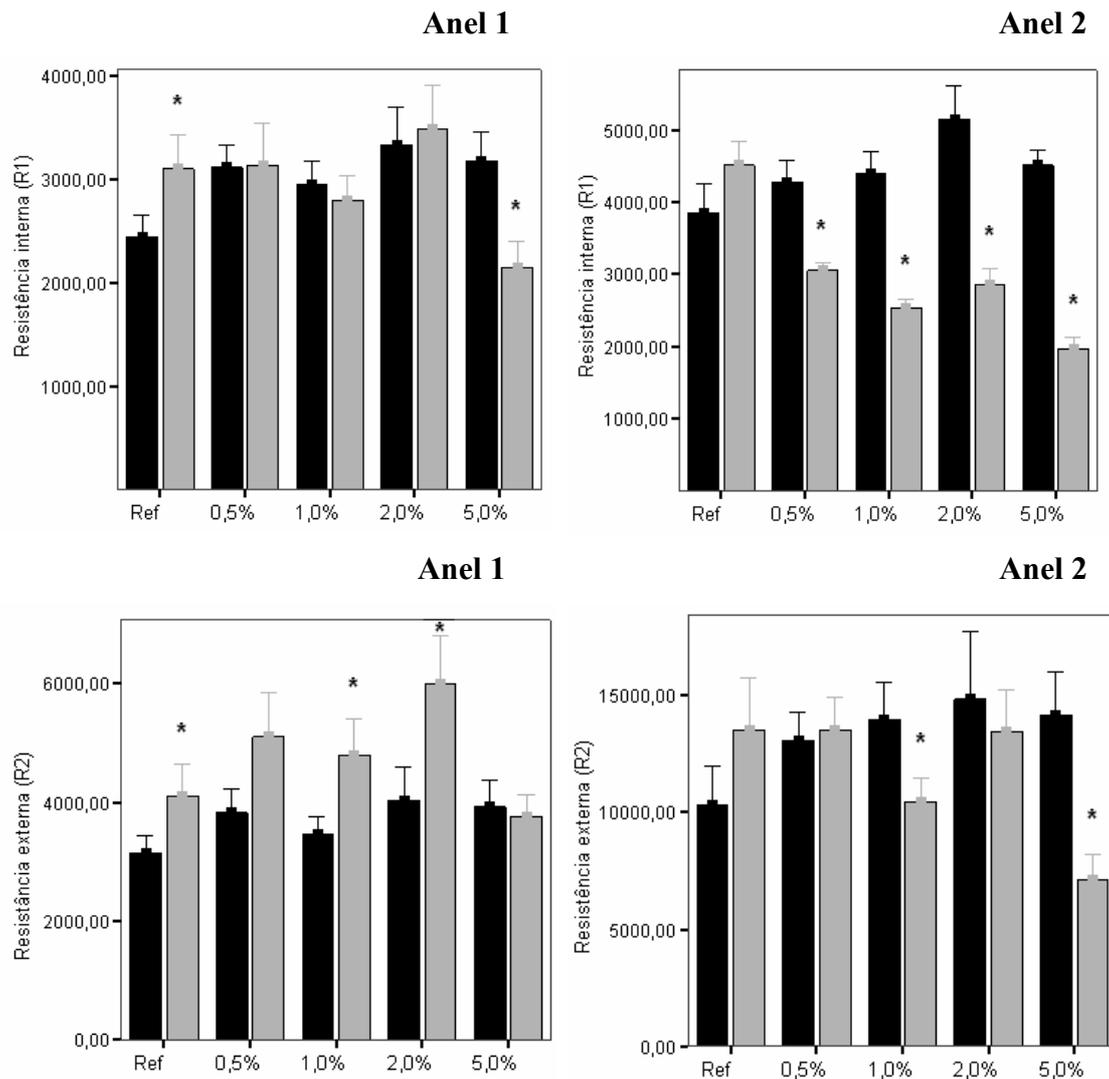


Figura 46: Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência (Ref) e de cada concentração de SLS nas profundidades 1 e 2 do dia 0 (■) comparado com o dia 2 (□) em humanos. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste *t-Student* pareado entre o dia 0 e o dia 2.

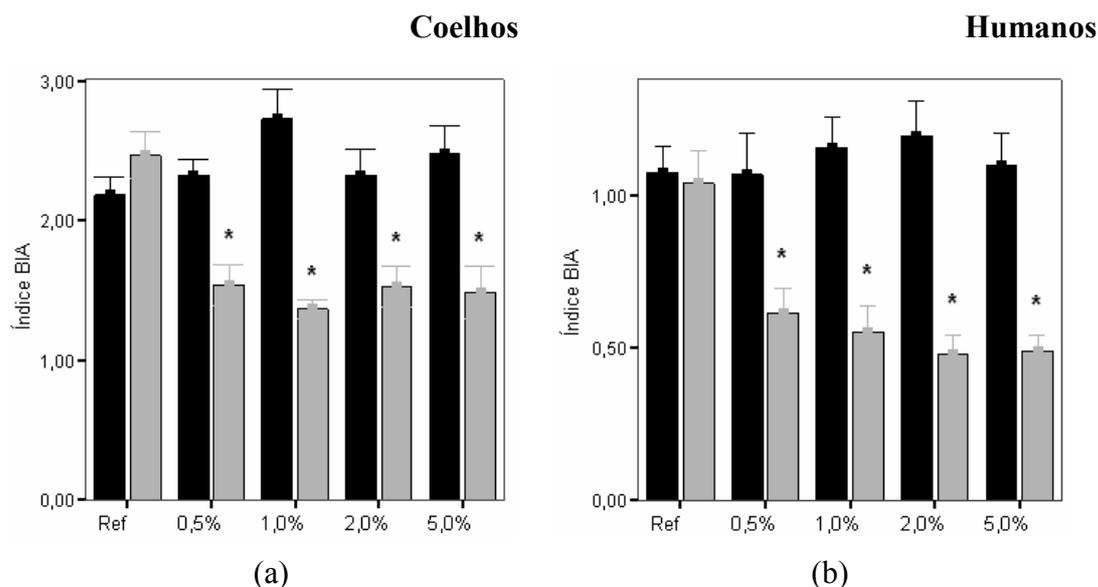


Figura 47: Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (Ref) e de cada concentração de *SLS* do dia 0 (■) comparado com o dia 2 (□) em coelhos (a) e humanos (b). O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste *t-Student* pareado entre o dia 0 e o dia 2.

Tabela 8: Média \pm desvio padrão de α da referência (ref.) e de cada concentração de *SLS* nas profundidades 1 e 2 do dia 0 e do dia 2 em coelhos e humanos.

		Ref.	0,5%	1,0%	2,0%	5,0%	
Coelhos	Anel 1	Dia 0	0,94 \pm 0,01	0,93 \pm 0,02	0,92 \pm 0,04	0,94 \pm 0,02	0,93 \pm 0,02
		Dia 2	0,93 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02	0,91 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02
	Anel 2	Dia 0	0,89 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02
		Dia 2	0,88 \pm 0,03	0,89 \pm 0,02	0,89 \pm 0,01	0,89 \pm 0,01	0,90 \pm 0,02
Humanos	Anel 1	Dia 0	0,86 \pm 0,01*	0,87 \pm 0,02*	0,86 \pm 0,02*	0,86 \pm 0,02*	0,86 \pm 0,01*
		Dia 2	0,86 \pm 0,01*	0,88 \pm 0,01*	0,87 \pm 0,01*	0,88 \pm 0,01*	0,87 \pm 0,01*
	Anel 2	Dia 0	0,90 \pm 0,03	0,91 \pm 0,02	0,90 \pm 0,01	0,91 \pm 0,03	0,91 \pm 0,03
		Dia 2	0,89 \pm 0,02	0,90 \pm 0,01	0,90 \pm 0,01	0,90 \pm 0,01	0,90 \pm 0,01

O símbolo (*) mostra uma diferença estatisticamente significativa dos valores de α de humanos quando comparados com os valores de coelhos nos dias correspondentes.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nos valores de α antes e após a exposição ao *SLS*, tanto em humanos quanto em coelhos. Porém, pelo teste de variância entre grupos (ANOVA), foi verificada diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores de α de humanos e de coelhos na profundidade 1 (estrato córneo) em todas as concentrações de *SLS*, inclusive na referência.

5.3 Evolução da irritação na pele de coelhos após a aplicação de SLS em dose única.

As reações da pele de coelhos foram observadas pelo método visual (Figura 48) e pelos parâmetros de bioimpedância (Figuras 49 e 50, Tabela 9) no momento anterior à aplicação da câmara de referência e do irritante nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% (dia 0) e durante quatro dias consecutivos a partir de 24 horas após a remoção das câmaras (dias 2, 3, 4 e 5). Neste protocolo, o SLS foi aplicado em dose única para observar o comportamento da reação da pele. Os resultados desta seção foram aceitos para apresentação no 28th *International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, que se realizará em agosto/setembro de 2006 em New York, USA (FERREIRA *et al.*, 2006b).

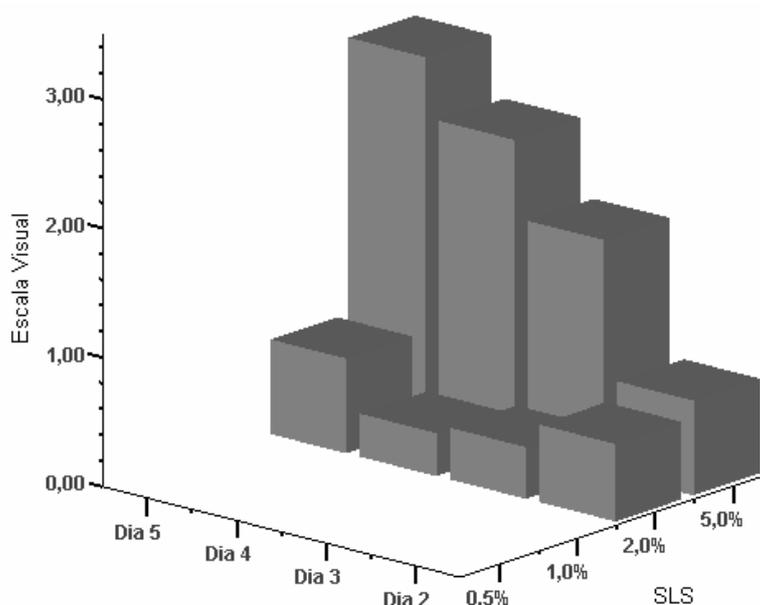


Figura 48: Distribuição da escala visual em coelhos para cada concentração de SLS em dose única nos dias de observação após a remoção das câmaras.

Não foi observada nenhuma reação nas concentrações mais baixas de SLS (0,5% e 1,0%) durante todos os dias de observação. Na concentração de 2,0% houve uma diminuição na escala visual do dia 2 ao dia 4, porém, no quinto dia foi verificado um aumento da resposta. O número de respostas positivas ao SLS foi maior na concentração de 5,0% quando comparado a 2,0%, sendo também observado aumento de resposta com os dias de observação.

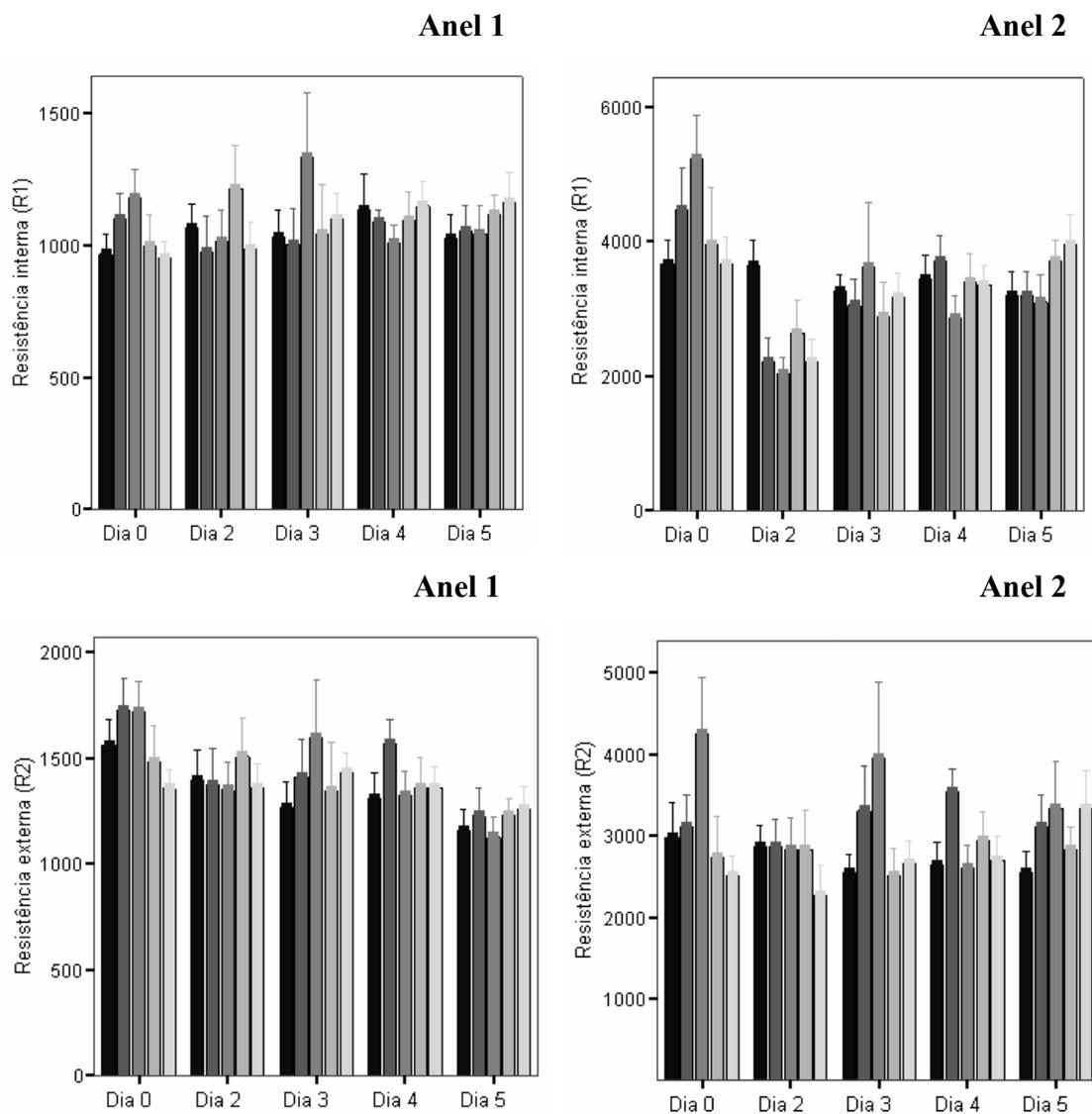


Figura 49: Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência (■) e cada concentração de *SLS* em dose única: 0,5% (■); 1,0% (■); 2,0% (■); 5,0% (■) no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subseqüentes.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre todas as concentrações e a referência (local não exposto ao *SLS*) durante os dias de observação nos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) dos anéis 1 e 2.

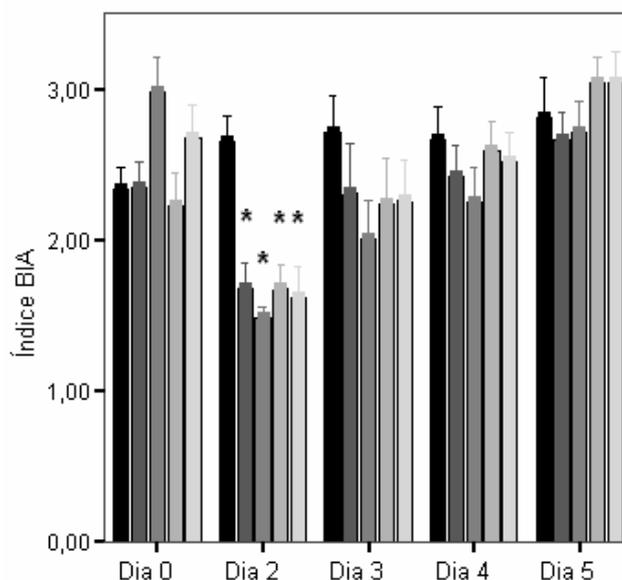


Figura 50: Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (■) e cada concentração de *SLS* em dose única: 0,5% (■); 1,0% (■); 2,0% (□); 5,0% (□) no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a referência (local não exposto ao *SLS*) e cada concentração de *SLS* através da análise de variância (ANOVA).

Tabela 9: Média \pm desvio padrão de α da referência (ref.) e de cada concentração de *SLS* aplicado em dose única nas profundidades 1 e 2 do dia 0 e dos dias 2 até 5 em coelhos.

	Ref.	0,5%	1,0%	2,0%	5,0%	
Anel 1	Dia 0	0,94 \pm 0,01	0,93 \pm 0,02	0,92 \pm 0,04	0,94 \pm 0,02	0,93 \pm 0,02
	Dia 2	0,93 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02	0,91 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02
	Dia 3	0,92 \pm 0,05	0,92 \pm 0,03	0,92 \pm 0,03	0,93 \pm 0,02	0,93 \pm 0,02
	Dia 4	0,92 \pm 0,01	0,91 \pm 0,01	0,91 \pm 0,03	0,92 \pm 0,03	0,92 \pm 0,02
	Dia 5	0,92 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02	0,91 \pm 0,03	0,92 \pm 0,02	0,91 \pm 0,02
Anel 2	Dia 0	0,89 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02
	Dia 2	0,88 \pm 0,03	0,89 \pm 0,02	0,89 \pm 0,01	0,89 \pm 0,01	0,90 \pm 0,02
	Dia 3	0,90 \pm 0,03	0,90 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02	0,89 \pm 0,01
	Dia 4	0,91 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02	0,90 \pm 0,01
	Dia 5	0,91 \pm 0,02	0,89 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	0,89 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02

De acordo com a análise de variância (ANOVA), não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nos valores de α entre o dia 0 e os dias posteriores à aplicação do *SLS* em todas as concentrações tanto no anel 1 quanto no anel 2.

5.4 Evolução da irritação na pele de coelhos após a aplicação de *SLS* em doses repetidas.

Neste protocolo, a aplicação do *SLS* (0,5% e 1,0%) foi feita diariamente durante quatro dias consecutivos para observar a evolução da resposta da pele quando o agente irritante permanece em contato. A avaliação visual (Figura 51) e por bioimpedância (Figuras 52 e 53, Tabela 10) foram realizadas no dia anterior à aplicação das câmaras (dia 0) e nos dias 2, 3 e 4 após a primeira aplicação de *SLS*. Estes resultados foram aceitos para apresentação no XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, que se realizará em outubro de 2006 na Cidade de São Pedro, São Paulo (FERREIRA *et al.*, 2006c).

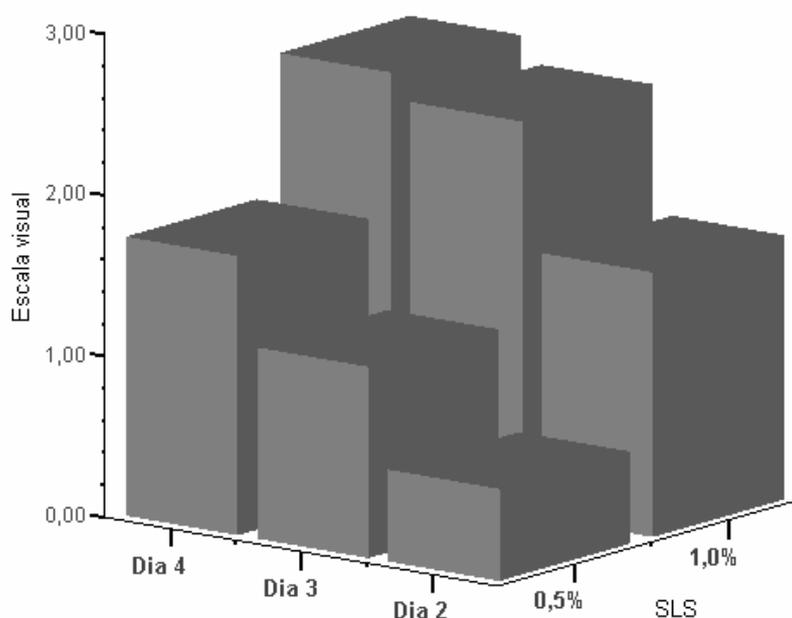


Figura 51: Distribuição da escala visual em coelhos para cada concentração de *SLS* em doses repetidas nos dias de observação.

Nesta figura pode-se observar um aumento do número de respostas positivas com o aumento da concentração de *SLS* e com os dias de observação.

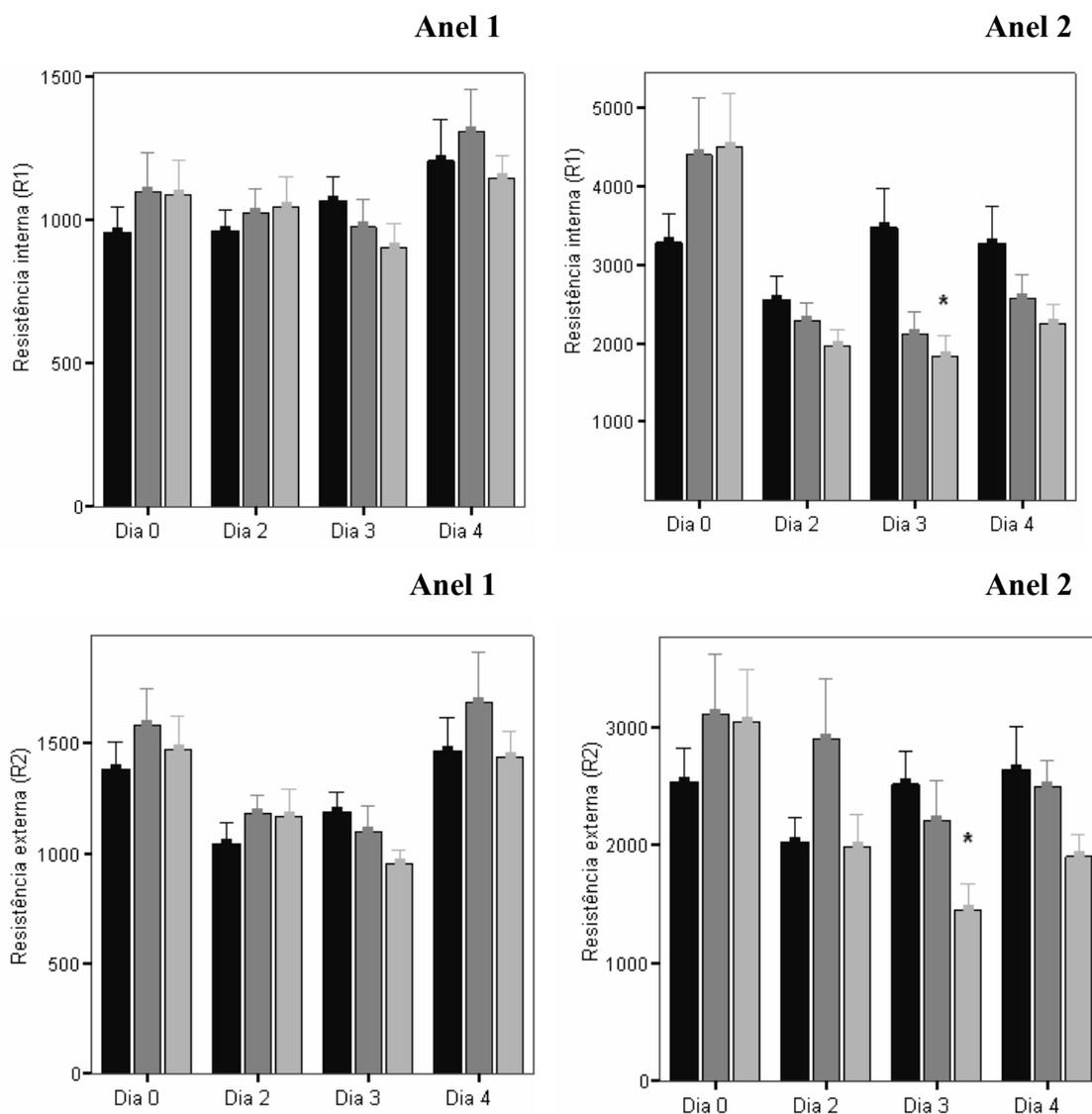


Figura 52: Média e erro médio padrão dos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) da referência (■) e cada concentração de *SLS* em aplicações repetidas: 0,5% (■); 1,0% (□) no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a referência (local não exposto ao irritante) e cada concentração de *SLS* através da análise de variância (ANOVA).

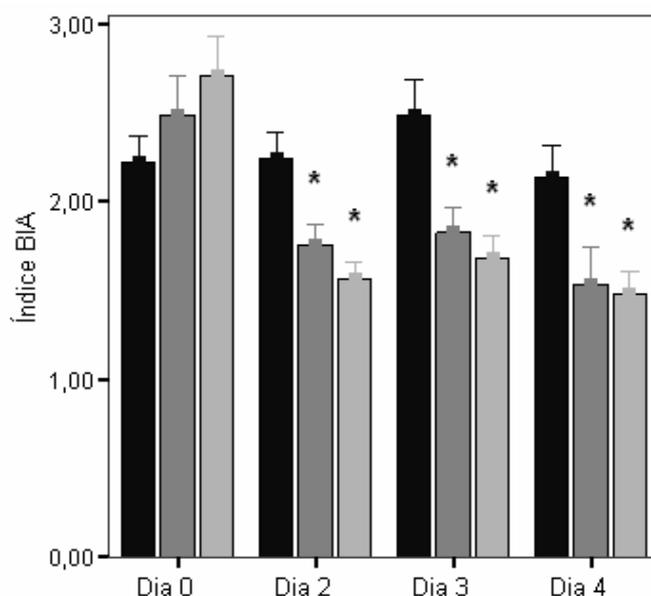


Figura 53: Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (■) e cada concentração de *SLS* em doses repetidas: 0,5% (■); 1,0% (■) no dia 0 (antes da aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a referência (local não exposto ao irritante) e cada concentração de *SLS* através da análise de variância (ANOVA).

Tabela 10: Média \pm desvio padrão de α da referência (ref.) e de cada concentração de *SLS* aplicado em doses repetidas nas profundidades 1 e 2 do dia 0 e dos dias 2 até 4 em coelhos.

		Ref.	0,5%	1,0%
Anel 1	Dia 0	0,94 \pm 0,02	0,94 \pm 0,03	0,93 \pm 0,03
	Dia 2	0,91 \pm 0,01*	0,91 \pm 0,01*	0,91 \pm 0,01*
	Dia 3	0,90 \pm 0,02*	0,91 \pm 0,02*	0,91 \pm 0,01*
	Dia 4	0,90 \pm 0,02*	0,91 \pm 0,02*	0,90 \pm 0,02*
Anel 2	Dia 0	0,91 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	0,90 \pm 0,02
	Dia 2	0,88 \pm 0,03	0,88 \pm 0,01	0,88 \pm 0,01*
	Dia 3	0,88 \pm 0,03	0,87 \pm 0,02	0,88 \pm 0,01*
	Dia 4	0,89 \pm 0,02	0,88 \pm 0,02	0,87 \pm 0,02*

O símbolo (*) mostra uma diferença estatisticamente significativa dos valores de α de cada dia após a aplicação de *SLS* quando comparados com o dia 0.

Baseando-se na análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos valores de α entre o dia 0 e os dias posteriores à aplicação repetida do *SLS* nas duas concentrações, inclusive na referência no anel 1. No anel 2, a diferença estatística ($p < 0,05$) só foi verificada na maior concentração (1,0%).

5.5 Comparação entre o padrão de irritação da pele de humanos com e sem aplicação de hidratante (trealose a 5%)

Em humanos, foram aplicadas soluções de *SLS* em dose única nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% nos antebraços anterior direito e esquerdo. Porém, no lado esquerdo, antes da colocação das câmaras com irritante, foi aplicada uma solução de trealose a 5% (hidratante) para verificar a proteção contra irritação. A leitura visual e por bioimpedância foi realizada no momento anterior à aplicação das substâncias (dia 0) e 24 horas após a remoção das câmaras (dia 2). A avaliação visual dos antebraços direito (sem hidratante) e esquerdo (com hidratante) pode ser observada na Figura 54 e os índices de impedância em todas as concentrações são apresentados nas Figuras 55 e 56.

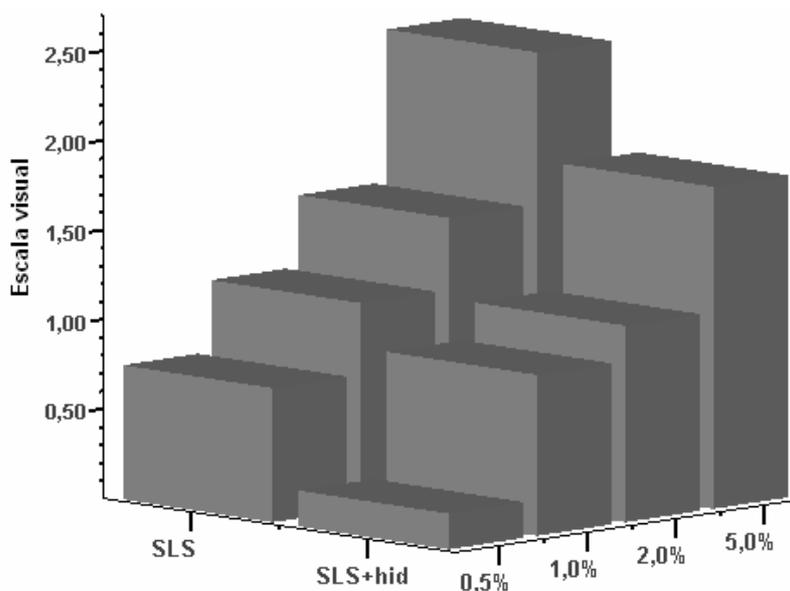


Figura 54: Distribuição da escala visual em humanos para cada concentração de *SLS* em dose única com e sem aplicação de hidratante (trealose a 5%)

Na figura 54, pode-se observar um incremento na escala visual com o aumento da concentração de *SLS* e que a resposta positiva à irritação foi maior nos locais expostos apenas ao *SLS* do que naqueles com aplicação anterior de hidratante.

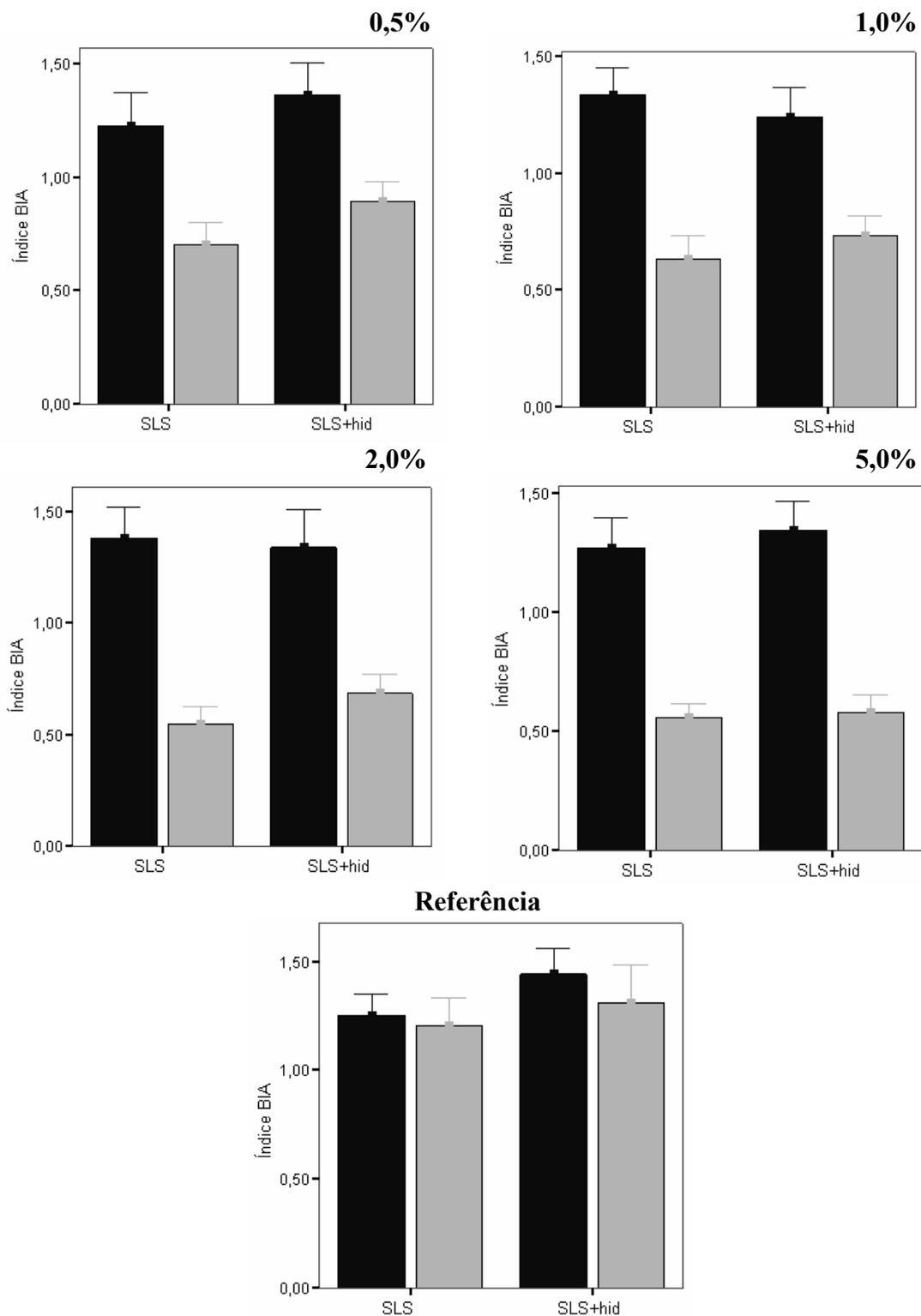


Figura 55: Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (Ref) e de cada concentração de *SLS* com e sem hidratante do dia 0 (■) e do dia 2 (□) em humanos.

Através da análise da variância entre grupos (ANOVA) não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o índice de impedância nos locais em contato com *SLS* puro e com hidratante em todas as concentrações, inclusive para referência.

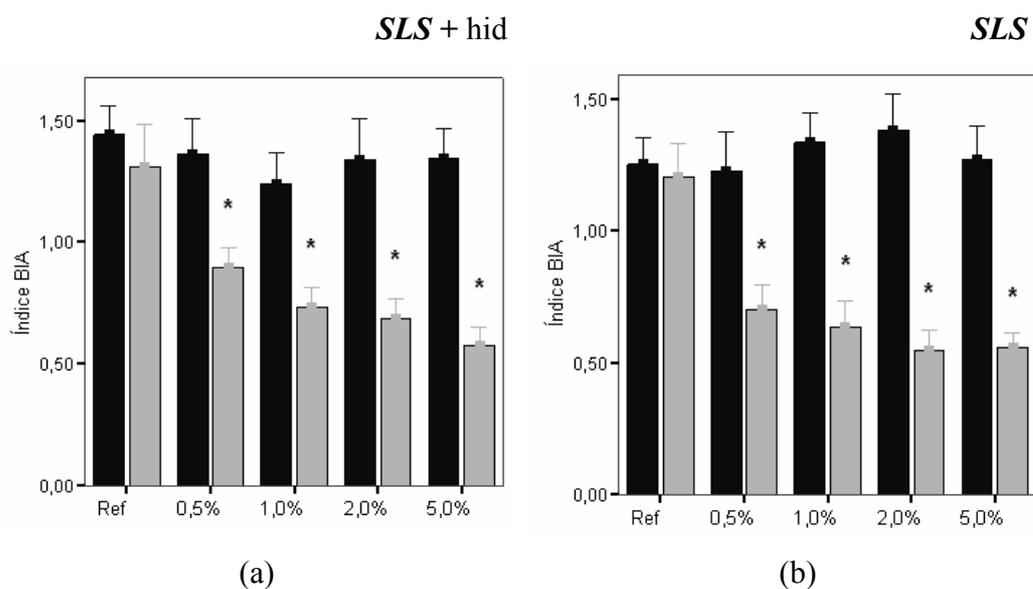


Figura 56: Média e erro médio padrão do índice de impedância (BIA) da referência (Ref) e de cada concentração de *SLS* com hidratante (a) e sem hidratante (b) do dia 0 (■) comparado com o dia 2 (□) em humanos. O símbolo (*) mostra uma alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do teste *t-Student* pareado entre o dia 0 e o dia 2.

Na Figura 56 pode-se observar que o comportamento do índice de impedância mostrou-se semelhante para os locais expostos apenas ao *SLS* e aqueles expostos ao irritante e ao hidratante.

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO

Os métodos de bioengenharia da pele vêm sendo amplamente utilizados em pesquisas por apresentarem medidas quantitativas capazes de identificar a irritação no estágio subclínico, diminuindo desta forma, os riscos impostos aos animais e humanos. Porém, nem todo método avalia os mesmos aspectos da irritação. O instrumento que mede a perda de água transepidérmica (*Evapometer* ou *Tewameter*) é um dos mais utilizados em pesquisas (OLLMAR *et al.*, 1994) e avalia a função de barreira da pele. O contato de um irritante com a pele altera a síntese de lipídios pelos queratinócitos ocasionando uma redução na capacidade de proteção da pele contra agentes do meio externo. Esta alteração na barreira permite uma maior perda de água através da epiderme que é detectada pelo aparelho e associada com a irritação cutânea. A fluxometria por *laser Doppler* já avalia outro aspecto da irritação que está relacionado com o fluxo sanguíneo em direção à área exposta ao irritante, uma vez que os elementos envolvidos na resposta inflamatória chegam ao local através deste fluxo que se encontra aumentado. A colorimetria mede o rubor da pele, que constitui em um sinal característico da resposta inflamatória e a capacitância elétrica de hidratação mostra o grau de hidratação da pele avaliando indiretamente a irritação, que envolve uma perda de água pela epiderme. Portanto, os diversos métodos, como descrito por OLLMAR *et al.* (1994), avaliam diferentes parâmetros físicos que podem ou não ser relevantes dependendo do objetivo do estudo.

A impedância elétrica da pele tem sido aplicada para avaliar a irritação cutânea sobre outro aspecto, diferente daqueles detectados pelos métodos descritos acima, ou seja, a formação de edema. É descrito na literatura (RIEGER,1994; WILHELM *et al.*,1994) que o edema é decorrente da alteração da pressão oncótica

devido a desnaturação da queratina (proteína), que por sua vez é provocada pelo contato do irritante com a epiderme. Através da alteração da impedância elétrica da pele, é possível estimar o grau de edema presente, que está relacionado com o processo de irritação.

Apesar de ter sido demonstrada a validade deste método para identificar a irritação no estágio subclínico (OLLMAR *et al.*, 1994), os autores não utilizaram modelos elétricos da pele, conferindo assim, limitações na interpretação dos efeitos decorrentes da irritação. GRIMNES e MARTINSEN (2005) destacam a importância da utilização de circuitos equivalentes para análise dos dados de bioimpedância. O modelo elétrico da pele utilizado neste estudo foi capaz de conferir interpretações coerentes em relação às alterações fisiológicas do tecido e a curva teórica da corrente foi bem ajustada aos dados medidos. Como reportado por LJUNG (1987), essas características são importantes para considerar o modelo como um bom representante das propriedades específicas da realidade.

O método de espectroscopia de impedância desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Biomédica (COPPE/UFRJ) é baseado na resposta da corrente a uma excitação por degrau de tensão constituindo-se em uma alternativa de se realizar a espectroscopia de impedância com menor número de excitações em relação à técnica baseada na varredura senoidal. Tal método implica no uso de um modelo da pele, fornecendo parâmetros elétricos que foram utilizados no cálculo de um índice para identificar a irritação, uma vez que as medidas isoladas de bioimpedância apresentam grande variabilidade inter-individual e por esta razão, não indicam um padrão de resposta capaz de detectar a irritação.

Após a combinação de vários parâmetros de impedância foi derivado um índice que melhor refletiu a irritação da pele através da correlação com a escala visual. Apesar deste método não ser considerado padrão-ouro para validação do estudo, este foi aplicado pela dificuldade em se utilizar cortes histológicos da pele, considerado um método mais adequado para avaliar novos métodos em desenvolvimento.

O índice foi desenvolvido baseando-se nas suposições de que na profundidade superficial (anel 1) a principal contribuição para o modelo seria da resistência externa (R_2), enquanto que nas camadas mais profundas (anel 2) a resistência interna (R_1) seria o principal contribuinte para o modelo. De acordo com achados histológicos (NICANDER *et al.*, 1995), as principais alterações decorrentes da irritação são

encontradas na parte basal da epiderme. Estas alterações estão relacionadas com edema, infiltração linfocitária e degeneração de queratinócitos. Portanto, no processo de irritação, é esperada uma maior mudança na profundidade interna do que na superfície. A presença de edema na epiderme reduz R_1 na profundidade interna, porém a alteração em R_2 na profundidade superficial é pequena. Baseado nesta suposição, a irritação foi avaliada como a razão entre R_1 na profundidade interna e R_2 na profundidade superficial e uma diminuição do índice corresponde ao aumento da irritação. O parâmetro α foi incluído no cômputo do índice para descrever o processo de dispersão que ocorre na camada córnea.

O índice foi correlacionado com a escala visual independentemente da concentração de *SLS* (variável 1) a qual o local foi exposto e do dia de observação (variável 2), uma vez que o método padrão de avaliação da irritação é baseado somente na resposta clínica observada na pele (edema e eritema). Apesar de alguns estudos analisarem essas duas variáveis em função dos parâmetros de bioengenharia (OLLMAR e EMTESTAM, 1992; OLLMAR *et al.*, 1994, NICANDER *et al.*, 1995), e de ter sido confirmada uma associação positiva entre concentração e tempo de exposição da substância com o grau de irritação cutânea, na prática clínica esses dados podem assumir pouco significado, já que muitas vezes não é conhecida a concentração do produto ou o tempo de sua aplicação. Além disso, a inflamação é decorrente de um processo inespecífico, ou seja, os sinais clínicos produzidos (calor, rubor, edema e dor) independem da causa e por esta razão a utilização do método não fica limitada à aplicação do *SLS*. Este só foi utilizado no estudo para induzir a resposta inflamatória, porém é possível identificar a irritação provocada por outras causas como queimaduras, infecções microbianas, agentes físicos, outros agentes químicos, etc. Nesses casos, a informação relevante está no grau de irritação cutânea para aplicação de tratamento imediato.

Foi verificada uma correlação estatisticamente significativa entre o índice de impedância e o método visual, tanto em coelhos como em humanos, indicando que o índice é capaz de identificar diferentes graus de irritação. Também foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores de índice da referência (valores medidos antes da aplicação das câmaras) e os índices correspondentes a cada pontuação na escala visual após a exposição do irritante, com exceção da pontuação 0 (zero) em humanos. Este achado sugere que o índice de impedância é capaz de

detectar a irritação em nível subclínico pelo fato de diferenciar a resposta pré e pós-exposição, mesmo esta não sendo observada macroscopicamente.

Em um estudo desenvolvido por OLLMAR *et al.* (1994), comparando a impedância elétrica com outras técnicas de bioengenharia e a escala visual foi verificado que o método de impedância foi tão sensível quanto os métodos quantitativos e apresentou maior sensibilidade para medir níveis leves de irritação do que a escala visual.

Quando se comparou a resposta visual da pele de humanos e coelhos antes da exposição em dose única ao *SLS* e 24 horas após sua remoção foi observado um maior número de respostas positivas em baixas concentrações do irritante (0,5% e 1,0%) em humanos do que em coelhos, apesar dos animais tipicamente apresentarem a pele mais sensível do que humanos. Este resultado pode ter sido encontrado devido ao rápido crescimento dos pêlos dos animais, que dificulta a leitura correta do teste. A diferença da resposta visual encontrada neste estudo constata a afirmação de NIXON *et al.* (1975) de que os resultados do teste de contato em coelhos não podem ser diretamente extrapolados para humanos. Mesmo com esta diferença foi detectado em ambas as amostras uma reação mais evidente com o aumento da concentração de *SLS*.

Em relação aos parâmetros de impedância da pele estimados pelo modelo, não foi verificado um padrão de resposta capaz de identificar a irritação tanto em humanos quanto em coelhos. Por esta razão, um índice de impedância foi idealizado e analisado. De acordo com os valores obtidos do índice proposto foi possível detectar diferenças estatisticamente significativa entre pré e pós-exposição de *SLS* em todas as concentrações, exceto na referência (locais não expostos ao irritante) em humanos e coelhos. Apesar do método visual não detectar nenhuma reação ao irritante nas concentrações mais baixas (0,5% e 1,0%) em coelhos, o método de impedância identificou a presença de edema nestas concentrações indicando a capacidade de avaliar a resposta subclínica.

Estes resultados corroboram os achados de alguns trabalhos da literatura que utilizam a impedância elétrica para avaliar a irritação cutânea (OLLMAR *et al.*, 1994, OLLMAR *et al.*, 1995, NICANDER *et al.*, 1995). Como relatado nestes artigos, o principal sinal relacionado com a irritação foi o edema, confirmado histologicamente na pele de coelhos (orelha) e humanos (antebraço anterior). As alterações observadas com o método em baixas frequências foram associadas com as mudanças no espaço extracelular que estão relacionadas com a presença de edema.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores de α antes e após a exposição ao *SLS* em dose única, podendo-se sugerir que a aplicação simples do irritante não altera a espessura da camada córnea. Este fenômeno, denominado de hiperqueratose, é mais evidente na irritação crônica (SAMPAIO *et al.*, 1987). Quando os valores das duas amostras foram comparados, foi verificado que os humanos apresentaram menores valores de α no estrato córneo do que os coelhos para todas as concentrações de *SLS* e para referência. Como o α está relacionado com o processo de dispersão que ocorre no estrato córneo devido às variações morfológicas das lâminas da camada, pode-se deduzir que quanto maior a variação na camada, menor o valor de α . Assim, sugere-se que o estrato córneo de humanos apresenta maior variação do que de coelhos.

Além da avaliação da resposta da pele pré e pós-exposição, também foi feito um acompanhamento da reação cutânea em coelhos durante 5 dias após a aplicação em dose única de *SLS* para observar o processo de regeneração da pele. A resposta visual só foi evidente nas concentrações de 2,0% e 5,0% e a reação foi maior na concentração mais alta de *SLS*. Nos locais ocluídos com 5,0% de *SLS*, a resposta aumentou com os dias de observação (valor máximo alcançado no quinto dia). Alguns estudos vêm sendo realizados com humanos para verificar a regeneração da pele após irritação com *SLS* em diversas concentrações. De acordo com ALE *et al.* (1997), o eritema esteve presente até 15 dias após a aplicação em dose única de *SLS* a 1,0% e alcançou seu valor máximo no quinto dia. GLOOR *et al.* (2004) observaram que o rubor da pele aumentou até o terceiro dia após a irritação com *SLS* a 1,0% alcançando os valores basais no dia 9. WILHELM *et al.* (1994) verificaram a presença de eritema até 18 dias após a aplicação de *SLS* a 0,5%, porém o valor máximo foi encontrado imediatamente após a remoção das câmaras seguido de uma redução gradual lenta.

Em relação aos parâmetros de impedância (R_1 e R_2) não foi encontrado qualquer padrão de comportamento que identificasse a irritação durante os dias de observação; porém foram verificadas diferenças estatisticamente significativa entre os valores de índice de impedância da referência (locais não expostos ao *SLS*) e os valores de índice de todas as concentrações de *SLS* no segundo dia após a remoção das câmaras. Nos dias subseqüentes, os valores do índice em todas as concentrações se aproximaram do valor da referência indicando que o sinal agudo da irritação (edema) esteve presente até o segundo dia. Embora a fase de cicatrização da irritação

cutânea tenha sido reportada na literatura através de métodos de bioengenharia (WILHELM *et al.*, 1994, LÖFFLER & HAPPLE, 2003, GLOOR *et al.*, 2004, KOOPMAN *et al.*, 2004), pouco se conhece sobre o término da fase aguda, ou seja, o decréscimo do edema, uma vez que tais métodos avaliam parâmetros biofísicos diferentes daqueles obtidos pela impedância. OLLMAR *et al.* (1994) avaliaram a irritação da pele pela impedância elétrica e por outros métodos de bioengenharia em humanos nos dias 1, 2, 7 e 14 após a remoção de *SLS* em quatro concentrações (0,1%, 0,5%, 2,0% e 5,0%). Quando foram comparados os locais expostos ao irritante com a referência, foram encontradas diferenças estatisticamente significativa até o dia 2, exceto na menor concentração (0,1%), confirmando os resultados apresentados neste estudo. No sétimo dia, a diferença foi significativa apenas na concentração mais alta (5,0%).

É importante ressaltar que para melhor entendimento do processo de recuperação da pele após a irritação, outros métodos de bioengenharia que avaliam parâmetros biofísicos diferentes da pele devem ser utilizados. Entretanto, a interpretação dos resultados obtidos por tais métodos depende do conhecimento do mecanismo de irritação. Vários estudos já tentaram detalhar o efeito do *SLS* na epiderme (RIEGER, 1994; WILHELM *et al.*, 1994; FARTASCH, 1995; GLOOR *et al.*, 2004). FARTASCH (1995) reportou que quando o *SLS* é aplicado sobre a pele, este penetra nas camadas mais internas da epiderme provocando lesão dos queratinócitos, apesar dos lipídios presentes no estrato córneo permanecerem intactos. Esta lesão celular está relacionada com a diminuição da síntese de lipídios resultando na alteração da composição da barreira (estrato córneo) que persiste por 1 a 2 horas após o efeito do *SLS* (GLOOR *et al.*, 2004). O dano na barreira do estrato córneo é responsável pelo aumento da perda de água transepidérmica e hiperhidratação do estrato córneo (RIEGER, 1994; GLOOR *et al.*, 2004). Além disso, o contato do *SLS* com a epiderme ocasiona a desnaturação da queratina que está relacionada com a formação de edema. Estes sinais são descritos como sendo a reação da pele durante a fase aguda da irritação. Após a evaporação do excesso de água através da barreira da pele, o conteúdo de água do estrato córneo diminui, dando origem ao ressecamento cutâneo (WILHELM *et al.*, 1994; ALE *et al.*, 1997).

Os processos de irritação e recuperação da pele vêm sendo explorados por diversos autores através de métodos de bioengenharia (WILHELM *et al.*, 1994; LÖFFLER & HAPPLE, 2003; GLOOR *et al.*, 2004; KOOPMAN *et al.*, 2004). Como

descrito por GLOOR *et al.* (2004), os parâmetros de bioengenharia (perda de água transepidermica, capacitância elétrica de hidratação, fluxometria a laser Doppler e colorimetria) retornaram à condição original apenas 7 dias após a irritação com *SLS* a 1,0% aplicado no antebraço de humanos em dose única durante 24 horas. LÖFFLER e HAPPLE (2003) detectaram irritação pela perda de água transepidermica e laser Doppler até 10 dias após a irritação de *SLS* em cinco concentrações diferentes (0,125%; 0,25%; 0,5%; 1,0% e 2,0%). Resultados similares foram encontrados por WILHELM *et al.* (1994). PATIL *et al.* (1994) afirmam que o *SLS* provoca uma irritação consistente por efeito citotóxico direto nos queratinócitos afetando as estruturas protéicas e lipídicas. Tal substância é capaz de induzir um dano prolongado à função de barreira da pele, excedendo 10 dias após uma única aplicação oclusiva. EFFENDY *et al.* (1996) e ALE *et al.* (1997) verificaram que o valor máximo da perda de água transepidermica se encontrava no segundo dia após a remoção do *SLS*, juntamente com o aumento da hidratação do estrato córneo. Uma vez que o edema também foi observado no mesmo período de maior perda de água através da pele, pode-se sugerir que esta perda seja proveniente do edema presente na epiderme.

Após o acompanhamento do comportamento dos parâmetros de impedância durante os 5 dias sucessivos à irritação, não foi identificada alteração estatisticamente significativa nos valores de α reforçando a sugestão feita anteriormente de que a aplicação simples do irritante não altera a espessura da camada córnea.

Além de verificar as alterações visuais e dos parâmetros de impedância após a irritação com dose única de *SLS* durante um período, também foram registradas as alterações destes durante o processo de irritação cutânea com exposição diária ao irritante (cumulativa).

Foi observado que a resposta visual aumentou com o aumento da concentração de *SLS* e com os dias de observação. Resultados semelhantes foram reportados por WIGGER-ALBERTI *et al.* (2000) e FLUHR *et al.* (2005) após a aplicação repetida de *SLS* a 0,5% durante 4 e 5 dias consecutivos, respectivamente, no antebraço de humanos.

Mesmo com o efeito cumulativo do irritante, os parâmetros isolados de impedância (R_1 e R_2) não apresentaram alterações significativas com os dias de observação. Porém, o índice de impedância nas concentrações de 0,5% e 1,0% foi menor do que na referência (locais não expostos ao *SLS*) durante todos os dias de

observação, indicando que a exposição constante ao irritante impede a regeneração da pele.

Embora não existam dados na literatura sobre o comportamento dos parâmetros de impedância após a aplicação cumulativa de um irritante, informações a respeito do fenômeno que ocorre na pele durante o processo de irritação podem auxiliar na interpretação dos resultados obtidos neste estudo. Já é bem estabelecido que a dermatite de contato cumulativa é uma consequência de vários pequenos danos à pele se o tempo entre as exposições for curto o suficiente para restauração completa da função de barreira da pele. Os efeitos da oclusão sobre a pele são complexos e podem produzir alterações importantes incluindo aumento da espessura da epiderme, dilatação do espaço intercelular, alterações nas células de Langerhans e mononucleares na epiderme, entre outras (FLUHR *et al.*, 2005). KOOPMAN *et al.* (2004) afirmam que em um teste de contato repetitivo de duração suficiente, surgem mecanismos adicionais que são ausentes no teste simples, como alteração da espessura da epiderme resultando em mudanças na permeabilidade ao *SLS*. O *SLS* também aumenta a renovação do estrato córneo quando aplicado cumulativamente. A alta atividade mitótica é responsável pela arrumação desordenada das células do estrato córneo seguida de intensa escamação que pode afetar a função de barreira (EFFENDY *et al.*, 1996). WIGGER-ALBERTI *et al.* (2000) relatam que a aplicação do *SLS* induz a um aumento da proliferação das células epidérmicas e edema intercelular nas partes nucleadas da epiderme após 48 horas de exposição.

Apesar do número de aplicações de *SLS* e do tempo de oclusão não terem sido suficientes para provocar uma reação cutânea crônica com aumento na espessura da epiderme foi possível identificar, através dos valores de α , indícios de alteração na organização das lâminas da camada córnea decorrente da alta renovação celular. Tal parâmetro de impedância apresentou redução estatisticamente significativa quando foram comparados valores anteriores e posteriores à irritação, inclusive na referência, indicando que a oclusão prolongada pode produzir um efeito de irritação cumulativa. O parâmetro α está relacionado ao processo de dispersão que ocorre nas camadas superficiais da pele pela passagem da corrente elétrica. Quando as camadas se encontram organizadas, este parâmetro se aproxima da unidade. Por outro lado, a desorganização ou o aumento da espessura das camadas reduz o valor de α , apontando para uma maior diversificação das camadas. Uma vez que tais valores não

mostraram alteração significativa quando foi aplicada uma única dose de *SLS*, pode-se sugerir que a aplicação cumulativa do irritante apresenta alguma influência sobre a estrutura da camada córnea que está relacionada com o ressecamento e aumento da espessura da epiderme quando a área é exposta por um longo período.

O método de impedância aplicado nos diversos protocolos desenvolvidos neste estudo foi capaz de mensurar a presença de edema que constitui em um sinal da irritação. Entretanto, é desejável saber se o mesmo método é capaz de identificar a proteção contra a irritação fornecida por um produto hidratante cuja finalidade é aumentar a função de barreira da pele. Pela leitura visual, os locais expostos apenas ao *SLS* (antebraço direito) apresentaram maior reação do que os locais expostos ao hidratante + *SLS* (antebraço esquerdo). Apesar do hidratante fornecer alguma proteção à pele, ele não foi capaz de impedir as reações positivas ao irritante.

Quando o índice de impedância foi comparado entre os locais com e sem hidratante, não foi observada diferença estatisticamente significativa para a referência (locais não expostos ao *SLS*) e para todas as concentrações do irritante. Este resultado indica que, apesar do hidratante conferir uma maior proteção visual, o grau de edema produzido pela inflamação cutânea é semelhante àquele encontrado com a exposição apenas ao *SLS*, ou seja, a trealose não foi capaz de diminuir o efeito do *SLS* na pele. A comparação entre os valores do índice do dia 0 (antes da exposição ao *SLS*) e do dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) nos locais expostos ao *SLS* + hidratante mostrou diferenças estatisticamente significativas semelhantes ao padrão observado nos locais expostos apenas ao *SLS*, confirmando a observação descrita acima.

A trealose é um dissacarídeo que tem sido considerada útil na proteção de proteínas contra a desnaturação que ocorre durante o processo de desidratação química (D'ALFONSO *et al.*, 2003). Apesar do mecanismo da trealose ainda não estar totalmente esclarecido, existem algumas hipóteses discutidas na literatura. BORDAT *et al.* (2004) descrevem dois efeitos protetores: (1) estabilização das membranas celulares sob condição de baixa hidratação e (2) estabilização das macromoléculas no estado rugoso da pele sob condições que normalmente conduziriam à sua desnaturação.

Em um estudo desenvolvido por NICANDER *et al.* (2003), onde foi avaliada, através da impedância, a habilidade de um hidratante (betaína) para reduzir o efeito irritante do *SLS* a 1,0% na pele de humanos, foi observada diferença entre os locais expostos apenas ao *SLS* e os locais expostos à betaína + *SLS* indicando que a

aplicação prévia da betaína ao irritante foi capaz de reduzir seus efeitos (edema) na pele. Esses resultados são opostos aos encontrados neste estudo, porém esta diferença pode ser atribuída aos produtos hidratantes utilizados nos dois estudos, que contêm composição diferente. Além disso, o modo de atuação também é diferente devido às características intrínsecas das peles das amostras investigadas, onde Nicander e colaboradores (2003) estudaram uma população de um país europeu de clima frio e o presente trabalho obteve dados de uma população de um país tropical.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentada a utilização de uma técnica de espectroscopia de impedância elétrica baseada na resposta da corrente ao degrau de tensão para detectar a reação da pele induzida por várias concentrações de irritante (Lauril Sulfato de Sódio - *SLS*). Particularmente, o método de impedância é útil para estudos de alterações na pele onde a avaliação visual é pouco discriminatória.

Apesar do método já ser aplicado em estudos de irritação da pele, a utilização de um modelo elétrico específico contribuiu para estimação de parâmetros de impedância pouco disponíveis na literatura e que podem auxiliar na interpretação dos efeitos decorrentes da irritação.

Através dos resultados encontrados neste estudo pode-se concluir que:

- O modelo elétrico da pele parece apropriado para fornecer parâmetros de bioimpedância que, uma vez associados (índice), são capazes de detectar alterações na pele relacionadas com o processo de irritação aguda (edema) em coelhos e humanos.
- Além do método de impedância apresentar correlação significativa com o método visual, também mostrou-se mais sensível em identificar a presença de irritação cutânea por ter detectado reações da pele abaixo do limiar clínico, indicando que pode ser utilizado como uma ferramenta objetiva e não-invasiva para medir alterações induzidas por substâncias irritantes em baixas concentrações. Tal aplicação reduziria o risco imposto a humanos e animais em testes de contato comumente realizado na indústria de cosméticos.
- Foi possível identificar os efeitos da exposição simples e repetitiva ao *SLS* durante um período curto (5 dias). Porém, sugere-se que a avaliação da recuperação da

pele após a irritação seja feita por uma combinação de outros métodos de bioengenharia.

- Em relação à contribuição clínica do método, não foi possível identificar o efeito protetor do hidratante à função de barreira da pele através do índice de impedância, apesar da avaliação visual mostrar uma resposta reduzida nos locais expostos ao hidratante juntamente com o irritante.

De um modo geral, este trabalho mostrou que o método de impedância é capaz de identificar a resposta da pele à irritação induzida por SLS. Porém, como a inflamação é uma resposta inespecífica, ou seja, independente do fator que a ocasiona, sugere-se como trabalhos futuros a aplicação do método para identificar reações da pele induzidas por outros fatores que são observados frequentemente na prática clínica, como infecções microbianas, agentes físicos, outras substâncias químicas, etc. Além disso, seria relevante estudar o efeito cumulativo na pele provocado por alguns fatores que podem levar a alterações estruturais importantes, como a oclusão prolongada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S., 2000, *Imunologia Celular & Molecular*, 3ª edição, Rio de Janeiro: Revinter.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. “Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos”. Brasília, 2003.
- AGNER, T.; SERUP, J., 1990, “Sodium lauryl sulphate for irritant patch test – a dose-response study using bioengineering methods for determination of skin irritation”, *J. Invest. Dermatol.*, v. 95, pp. 543-547.
- ALE, S. I.; LAUGIER, J-P. K.; MAIBACH, H. I., 1997, “Differential irritant skin responses to tandem application of topical retinoic acid and sodium lauryl sulphate: II. Effect of time between first and second exposure”, *British Journal of Dermatology*, v. 137, pp. 226-233.
- ALVARENGA, R. L.; SOUZA, M. N., "Assessment of knee Osteoarthritis by Bioimpedance Impedance", *Proceedings of the 25th International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Cancun, Mexico, pp. 3118-3121, 2003 (ISSN 0-7803-7789-3)
- ALVARENGA, R. L.; SOUZA, M. N., "Bioimpedância Muscular para Determinação Não Invasiva de Limiar de Lactato", aceito em julho de 2006 para apresentação no *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, que se realizará em Outubro de 2006 na cidade de São Pedro, São Paulo.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R., 1999a, “A pele – embriologia, estrutura e fisiologia”, In: *Dermatologia* (Revisada e atualizada), 2ª edição, Editora Guanabara Koogan, Capítulo 1, pp. 1-10.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R., 1999b, “Eczemas e dermatites afins”, In: *Dermatologia* (Revisada e atualizada), 2ª edição, Editora Guanabara Koogan, Capítulo 7, pp.77-94.
- BARNHILL, R., 2004, *Textbook of Dermatology*, 2nd edition, New York: McGraw-Hill.
- BEVILACQUA, M. P., 1993, “Endothelial-leukocyte adhesion molecules”, *Annual Review of Immunology*, v. 11, pp. 767-804.

- BORDAT, P.; LERBRET, A.; DEMARET, J.-P., *et al.*, 2004, "Comparative study of trehalose, sucrose and maltose in water solutions by molecular modeling", *Europhys. Lett.*, v. 65, p. 41-47.
- BOSS, J. D.; KAPSENBERG, M. L., 1993, "The skin immune system: progress in cutaneous biology", *Immunology Today*, v. 14, pp. 75-78.
- COLE, K. S., 1940, "Permeability and impermeability of cell membranes for ions", *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 8, pp. 110-112.
- CORNISH, B. H.; THOMAS, B. J.; WARD, L. C., 1998, "Effect of temperature and sweating on bioimpedance measurements", *Applied Radiation and Isotopes*, v. 49 (5/6), pp. 475-476.
- COURAGE, W.; RICHTER, S., 1999, Information and Operating Instructions for the SEBUMETER[®] SM 810 / CORNEOMETER[®] CM 825 / SKIN-pH-METER[®] PH 900 and the Software for Windows[®] NT, pp. 5-11.
- D'ALFONSO, L.; COLLINI, M.; BALDINI, G., 2003, "Trehalose influence on beta-lactoglobulin stability and hydration by time resolved fluorescence", *Eur. J. Biochem.*, v. 270, p. 2497-2504.
- DESOER, C. A.; KUH, E. S., 1969, "Laplace Transforms", In: *Basic Circuit Theory*, 1^a edição, International Student Edition, Chapter 13, pp. 527-581.
- DRAIZE, H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O., 1944, "Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes.", *J Pharm Exp Therap*, v. 82, pp. 377-390.
- EDWARDS, C.; MARKS, R., 1995, "Evaluation of Biomechanical Properties of Human Skin", v. 13, pp. 375-380.
- EFFENDY, I.; WELTFRIEND, S.; PATIL, S. *et al.*, 1996, "Differential irritant skin responses to topical retinoic acid and sodium lauryl sulphate: alone and in crossover design", *British Journal of Dermatology*, v. 134, pp. 424-430.
- ELSNER, P.; BAREL, A. O.; BERARDESCA, E., *et al.*, 1998, "Skin bioengineering: techniques and applications in dermatology and cosmetology", *Current Problems in Dermatology*, v. 26., pp. 77-81
- EMTESTAM, L.; OLLMAR, S., 1993, "Electrical impedance index in human skin: Measurements after occlusion, in 5 anatomical regions and in mild irritant dermatitis", *Contact Dermatitis*, v. 28, pp. 104-108.
- FARTASCH, M., 1995, "Human barrier formation and reaction to irritation", *Curr Probl Dermatol*, v. 23, pp. 95-100.

- FARTASCH, M., 1997, “Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation”, *Microsc. Res. Tech.*, v. 37, pp. 273-276.
- FERREIRA, D. M.; SILVA, Célia S.; SOUZA, M. N.– “Aplicação da Impedância Elétrica na Determinação de Alterações da Pele Provocadas por Produtos Químicos”, *III Congresso Latino Americano de Engenharia Biomédica, IFMBE Proc.* 5(1), pp. 641-644, João Pessoa – PA, set/2004 (ISSN 1727-1983).
- FERREIRA, D. M.; SOUZA, M. N., 2004, “Bioelectrical Impedance Spectroscopy in the Assessment of Body Liquid Volumes in Term Neonates”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, pp. 1595-1606.
- FERREIRA, D. M.; SILVA, C. S.; SOUZA, M. N., 2006a, “Electrical impedance model for evaluation of skin irritation in rabbits and humans” – aceito em julho de 2006 para publicação na revista *Skin Research and Technology*.
- FERREIRA, D. M.; SILVA, C. S.; SOUZA, M. N., 2006b, “Assessment of acute skin irritation in rabbits using electrical impedance model” – aceito em junho de 2006 para apresentação na 28th *International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* que se realizará em Agosto de 2006 em New York, USA.
- FERREIRA, D. M.; SILVA, C. S.; SOUZA, M. N., 2006c, “Modelo de impedância elétrica para avaliar a resposta de irritação cumulativa da pele em coelhos”, aceito em julho de 2006 para apresentação no *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, que se realizará em Outubro de 2006 na cidade de São Pedro, São Paulo.
- FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K., *et al.*, 1999, *Dermatology in General Medicine*, vol. 1, 5th ed., New York: McGraw-Hill, Inc.
- FLUHR, J.W.; AKENGİN, A.; BORNKESSEL, A., *et al.*, 2005, “Additive impairment of the barrier function by mechanical irritation, occlusion and sodium lauryl sulphate *in vivo*”, *British Journal of Dermatology*, v. 153, p. 125-131.
- FOSTER, K. R.; SCHWAN, H. P., 1989, “Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review”, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, v.17, pp. 25-104.
- GLOOR, M.; SENGER, B.; LANGENAUER, M., *et al.*, 2004, “On the course of the irritant reaction after irritation with sodium lauryl sulphate”, *Skin Research and Technology*, v. 10, pp. 144-148.
- GOON, A. T.; LEOW, Y.; CHAN, Y., *et al.*, 2004, “Correlation between laser Doppler perfusion imaging and visual scoring of patch test sites in subjects with

- experimentally induced allergic and irritant contact reactions”, *Skin Research and Technology*, v. 10, pp. 64-66.
- GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G., 2000, *Bioimpedance & Bioelectricity*, London: Academic Press.
- GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G., 2005, “Cole electrical impedance model – a critique and an alternative”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 52, pp.132-135.
- HÖBER, R., 1912, “Ein zweites Verfahren die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen”, *Arch f. D. Ges. Physiol.*, v. 148, pp. 189 *Apud* NICANDER, I., 1998, *Electrical impedance related to experimentaly induced changes of human skin and oral mucosa*. DSc. Thesis, Kongl Carolinska Medico Chirurgiska Institutet, Stockholm.
- KILBAS, A.A.; SRIVASTAVA, H.M.; TRUJILLO, J.J., 2006, *Theory and Applications of Fractional Differential Equations, 204*, First Edition (North-Holland Mathematics Studies) (Hardcover).
- KLIGMAN, A. M.; WOODING, W. M., 1967, “A method for the measurement and evaluation of irritants on human skin”, *J. Invest. Dermatol.*, v. 49, pp. 78-94.
- KONTTURI, K.; MURTOMÄKI, L.; HIRVONEN, J., *et al.*, 1993, “Electrochemical characterization of human skin by impedance spectroscopy: the effect of penetration enhancers”, *Pharmaceutical Research*, v. 10, pp. 381-385.
- KOOPMAN, D. G.; KEZIC, S.; VERBERK, M. M., 2004, “Skin reaction and recovery: a repeated sodium lauryl sulphate patch test vs. a 24-h patch and tape stripping”, *British Journal of Dermatology*, v. 150, pp. 493-499.
- KUPPER, T. S., 1990, “Immune and inflammatory processes in cutaneous tissue: mechanisms and speculations”, *Journal of Clinical Investigation*, v. 86, pp. 1783-1789.
- KUPPER, T. S.; GROVES, R. W., 1995, “The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation”, *Journal of Investigative Dermatology*, v. 105, pp. 62-66.
- KUZMINA, N.; DUVAL, C.; JOHNSON, S., *et al.*, 2003, “Assessment of irritant skin reactions using electrical impedance – a comparison between 2 laboratories”, *Contact Dermatitis*, v. 49, pp. 26-31.
- LJUNG, L., 1987, “Introdução aos modelos”, In: *System Identification: Theory for the user*, 1st edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, Chapter 1, pp.1 – 10.

- LOMUTO, M.; PELLICANO, R.; GIULIANI, M., 1995, "Equipment Available for bioengineering of the Skin", *Clinics in Dermatology*, v. 13, pp. 409-415.
- LÖFFLER, H.; HAPPLE, R., 2003, "Profile of irritant patch testing with detergents: sodium lauryl sulphate, sodium laureth sulphate and alkyl polyglucoside.", *Contact Dermatitis*, v. 48, pp. 26-32.
- MARTINSEN, Ø. G.; GRIMNES, S.; KARLSEN, J., 1998, "Low frequency dielectric dispersion of microporous membranes in electrolyte solution", *J. Colloid.Interface Sci.*, v. 199, pp. 107-110.
- MARTINSEN, Ø., G.; GRIMNES, S.; KARLSEN, J., 1993, "An instrument for the evaluation of skin hydration by electrical admittance measurements", *Innov. Technol. Biol. Med.*, v. 14, pp. 588-596.
- MARTINSEN, Ø., G.; GRIMNES, S., 2001, "Facts and Myths about electrical measurements of stratum corneum hydration state", *Dermatology*, v. 202, pp. 87-89.
- MATHIAS, T. C. G.; MAIBACH H. I., 1978, "Dermatotoxicology monographs – I. Cutaneous irritation: factors influencing the response to irritants", *Clin. Toxicol.*, v. 13, pp. 333-346.
- McKENZIE, R. C.; SAUDER, D. N., 1990, "The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity", *Journal of Investigative Dermatology*, v. 95, pp. 105-107.
- MENDONÇA, D. O.; ZAEYEN, E. J. B.; SOUZA, M. N., "Assessment of Fluid Balance in Neonates Using Biopedance", *CD ROM Proceedings of the 23rd International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Istanbul, Turkey, pp. 1-4, 2001 (ISSN 0-7803-7211-5)
- MENDONÇA, D. O., 2002, "Monitorização do Balanço Hídrico em Neonatos Através de BioImpedância", M.Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, BR.
- MENDONÇA, D. O.; SOUZA, M. N., "Application of Step Response Impedance Spectroscopy for Detection of Skin Irritation", *Proceedings of the 25th International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Cancun, Mexico, pp. 3215-3217, 2003 (ISSN 0-7803-7789-3)

- NEUMAN, R. N., 1992, Biopotential electrodes. In: Webster J. G. (ed.) *Medical instrumentation*. Houghton Mifflin, Boston *Apud* GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G., 2000, *Bioimpedance & Bioelectricity*, London: Academic Press.
- NEUTRA, M. R.; PRINGAULT, E.; KRALHENBUHL, J.-P., 1996, "Antigen sampling across epithelial barriers and inclusion of mucosal immune responses", *Annual Review of Immunology*, v. 14, pp. 275-300.
- NEVES, E. C. B.; LEITE, B. B.; SOUZA, M. N. - "Body Impedance Spectroscopy Based on a Step Response", *Proceedings of the 21st International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, p. 825, Atlanta, USA, 1999 (ISSN 0-7803-5674-8)
- NEVES, C. E. B., 2000, "Medição da Composição Corporal por Bioimpedância Bipolar em Resposta a um Degrau de Tensão", Dissertação M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, BR.
- NEVES, C. E. B.; SOUZA, M. N., 2000, "A method for bio-electrical impedance analysis based on a step-voltage response", *Physiological Measurements*, v. 21, pp. 395-408.
- NEVES, C. E. B.; SOUZA, M. N., "A Comparison between Impedance Measured by a Commercial Analyzer and Its Value Adjusted by Theoretical Model in Body Composition Evaluation", *CD ROM Proceedings of the 23rd International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Istanbul, Turkey, pp. 1-4, 2001 (ISSN 0-7803-7211-5)
- NEVES, C. E. B., 2006, "Estimativa da Composição Corporal por Espectroscopia de Impedância Bio-Elétrica Bipolar em Indivíduos com Sobrepeso e Obesidade", Tese D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, BR.
- NICANDER, I.; OLLMAR, S.; LUNDH ROZELL, B., *et al.*, 1995, "Electrical impedance measured to five skin depths in mild irritant dermatitis induced by sodium lauryl sulphate", *Br. J. Dermatol.*, v. 132, pp. 718-724.
- NICANDER, I.; OLLMAR, S.; EEK, A., *et al.*, 1996, "Correlation of impedance response patterns to histological findings in irritant skin reactions induced by various surfactants", *Br. J. Dermatol.*, v. 134, pp. 221-228.
- NICANDER, I.; OLLMAR, S., 1997, "Mild and below threshold skin responses to sodium lauryl sulphate assessed by depth controlled electrical impedance", *Skin Res. Technol.*, v. 3, pp. 259-263.

- NICANDER, I.; NYREN, M.; EMTESTAM, L., *et al.*, 1997 A E B, “Baseline electrical impedance measurements at various skin sites related to age and sex”, *Skin Res. & Tech.*, v. 3, pp.252-258.
- NICANDER, I., 1998, *Electrical impedance related to experimentally induced changes of human skin and oral mucosa*. DSc. Thesis, Kongl Carolinska Medico Chirurgiska Institutet, Stockholm.
- NICANDER, I.; NORLÉN, L.; BROCKSTEDT, U., *et al.*, 1998, “Electrical impedance and other physical parameters as related to lipid content of human stratum corneum”, *Skin Res. Technol.*, in press.
- NICANDER, I.; OLLMAR, S., 2000, “Electrical impedance measurements at different skin sites related to seasonal variations”, *Skin Research and Technology*, v. 6, pp. 81-86.
- NICANDER, I.; RANTANEN, I.; LUNDH ROZELL, B., *et al.*, 2003, “The ability of betaine to reduce the irritating effects of detergents assessed visually, histologically and by bioengineering methods”, *Skin Research and Technology*, v. 9, pp. 50-58.
- NILSON, G. E.; FALLAN, J. O.; LARSSON, K. S., *et al.*, 1992, “Electrical impedance – a new parameter for oral mucosal irritation tests”, *J.Mat. Sci. Mater Med.*, v. 3, pp. 278-282.
- NIXON, G.A.; TYSON, C.A.; WERTZ, W.C., 1975, “Interspecies comparisons of skin irritancy”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 31, pp. 481–490.
- OLLMAR, S.; EMTESTAM, L., 1992, “Electrical impedance applied to non-invasive detection of irritation in skin”, *Contact Dermatitis*, v. 27, pp. 37-42.
- OLLMAR, S.; NYREN, M.; NICANDER, I., *et al.*, 1994, “Electrical impedance compared with other non-invasive bioengineering techniques and visual scoring for detection of irritation in human skin”, *Brit. Jour. Dermatology*, v. 130, pp. 29-36.
- OLLMAR, S.; EEK, A.; SUNDSTROM, F., *et al.*, 1995, “Electrical impedance for estimation of irritation in oral mucosa and skin”, *Medical Progress through Technology*, v. 21, pp. 29-37.
- ONARAL, B.; SCHAWN, H. P., 1982, “Linear and non-linear properties of platinum electrode polarization. Part I: Frequency dependence at very low frequencies.”, *Med. Biol. Eng. Comput.*, v. 20, pp. 299-306 Apud GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G., 2000, *Bioimpedance & Bioelectricity*, London: Academic Press.

- PATIL, S. M.; SINGH, P.; MAIBACH, H. I., 1994, "Cumulative irritancy in man to sodium lauryl sulphate: the overlap phenomenon", *Int. J. Pharm.*, v. 110, pp. 147-154.
- POON, C. S.; CHOY T. T. C., 1981, "Frequency dispersions of human skin dielectrics", *Biophysical Journal*, v. 34, pp. 135-147.
- ÅBERG, P., 2002, "Electronic biopsies – applications and data analysis. DSc Thesis, Medical Laboratory Science and Technology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
- ÅBERG, P.; GELADI, P.; NICANDER, I.; OLLMAR, S., 2002, "Variation of skin properties within human forearms demonstrated by non-invasive detection and multi-way analysis", *Skin Research and Technology*, v. 8, pp. 1-8.
- RIEGER, M., 1994, "Human Epidermis Responses to Sodium Lauryl Sulphate Exposure", *Cosmetics & Toiletries*, v. 109, pp. 65-74.
- ROBINSON, M. K.; PERKINS, M. A., 2002, "A Strategy for Skin Irritation Testing", *American Journal of Contact Dermatitis*, v. 13, n. 1 (March), pp. 21-29.
- SALTER, D. C., 1979, Quantifying skin disease and healing in vivo using electrical impedance measurements. In: Rolfe P (ed) *Non-invasive physiological measurements*, v. 1. Academic Press, New York. *Apud* GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G., 2000, *Bioimpedance & Bioelectricity*, London: Academic Press.
- SAMPAIO, S. A. P.; CASTRO, R. M.; RIVITTI, E. A., 1987, "Erupções eczematosas", In: *Dermatologia Básica*, 3^a edição, Editora Artes Médicas, Capítulo 5, pp. 83-108.
- SCHWAN, H. P., 1957, "Electrical properties of tissue and cell suspensions" In: *Advances in Biological & Medical Physics*. New York:Academic Press, v. 5, pp. 147-224.
- SCHWAN, H. P., 1989, "Dielectric properties of cells and tissues", In: Chiabrera, A., Nicolini, C., Schwan, H. P.(eds): *Interactions between electromagnetic fields and cells*. Plenum Publishing Corporation, pp. 75-97.
- SERUP, J., 1995, "Bioengineering and the Skin: Standardization", *Clinics in Dermatology*, v. 13, pp. 293-297.

- TREGEAR, R.T., 1966, *Physical functions of skin*. Academic Press: New York. *Apud* GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G., 2000, *Bioimpedance & Bioelectricity*, London: Academic Press.
- VAN NESTE D. J.; DE LA CUADRA J.; ANTOINE J. L., 1987, "Non-invasive evaluation of functional changes induced by short term application of sodium lauryl sulphate on human skin.", *J. Invest. Dermatol.*, v. 89, pp. 320-321 (Abstr.).
- WAHLBERG, J. E.; MAIBACH, H. I., 1980, "Nonanoic acid irritation – a positive control at routine patch testing?", *Contact Dermatitis*, v. 6, pp. 128-130.
- WIGGER-ALBERTI, K. W. A.; ELSNER, P., 2000, "Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application", *British Journal of Dermatology*, v. 143, p. 551-556.
- WILHELM, K. P.; FREITAG, G.; WOLFF, Hh., 1994, "Surfactant-induced skin irritation and skin repair: evaluation of the acute human irritation model by noninvasive techniques", *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 30, pp. 944-949.
- WILLIAMS, I. R.; KUPPER, S., 1996, "Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system.", *Life Sciences*, v. 58, pp. 1485-1507.
- YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, Y., 1976, "Electrical properties of the epidermal stratum corneum". *Med. Biol. Eng.*, v. 14, pp. 592-594.
- YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, Y., 1978, "Dispersion and correlation of the parameters for skin impedance". *Med. Biol. Eng.*, v. 16, pp. 592-594.

ANEXOS

ANEXO 1

Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Animais



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa

Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2005.

PARECER

Parecer sobre o uso de animais (coelhos) no projeto "**Estudo da impedância elétrica na determinação de alterações da pele provocadas por produtos químicos**" de responsabilidade de Daniele Mendonça Ferreira e Célia Santos da Silva dos laboratórios: de Instrumentação Biomédica (PEB/COPPE); e de Análises Toxicológicas (Fac. Farmácia/ICB) da UFRJ.

O referido projeto está em acordo com os "Princípios Básicos para a Pesquisa Envolvendo o Uso de Animais" adotado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP – IBCCF/UFRJ). Os "Princípios Básicos para a Pesquisa Envolvendo o Uso de Animais" foram aprovados pelo Conselho Departamental do IBCCF-UFRJ em 09/09/1992 e estão de acordo com os padrões internacionais ("International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals", CIOMS, Switzerland; "Statement Regarding the Care and Use of Animals" aprovado pela "American Physiological Society" e pela "Society for Neuroscience"; e pelo "NIH Guidelines for Animal Use in Research, USA").

Atenciosamente,

Mario Fiorani Jr.
Presidente, CAUAP.
IBCCF/UFRJ

ANEXO 2

Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

- Coordenador:**
 Luiz Carlos Duarte de Miranda
Médico - Prof. Adjunto
- Secretário:**
 Mário Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista
- Membros Titulares:**
 Alice Helena Dutra Vianna
Médico - Prof. Adjunto
 Antonio de Magalhães Maranhão
Enfermeiro - Mestre
 Benicê Mariz Tepe
Médico - Doutorando
 Benicê Rodu Miranda Viana
Oncólogo - Prof. Substituto
 Eduardo Jorge Bastos Otton
Médico - Prof. Assistente
 Ellen Regina Ambrósio
Assistente Social - Mestre
 Luiz Euzébio Pereira da Costa
Médico - Especialista
 Maria de Fátima Gustavo Lopes
Representante das Unidades
 Paulo Feijó Barros
Médico - Prof. Adjunto
 Rodrigo Teixeira Santos
Aluno de Graduação - FM
 Zuzana Rodrigues da Silva
Professora
- Membros Suplentes:**
 Alberto Krayson Arêx
Médico - Doutorando
 Alexandre Carvalho
Aluno de Graduação - FM
 Daniel Santiago Moreira
Farmacêutico - Especialista
 Helena Waczynsky
Representante das Unidades
 Lúcia de Cassia de Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre
 Maria Adelaide Moreira da Silva
Nutricionista - Mestre
 Mário Fernando Petzhold
Engenheiro - Doutor
 Orlando Naves Cosentino
Sociólogo - Doutor
 Roberto Bianco dos Santos
Médico - Bacharel de Direito
 Roberto Coury Pedron
Médico - Doutor
 Vânia Dias de Oliveira
Assistente Social

CEP - MEMO - n° 963/05

Rio de Janeiro, 24 de outubro de 2005.

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Daniele Mendonça Ferreira.

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 164/05 - CEP

Título: "Utilização da impedância elétrica na determinação de alterações da pele provocadas por produtos químicos".

Pesquisador (a) responsável: Dra. Daniele Mendonça Ferreira.

Data de apreciação do parecer: 26/09/2005

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 28/01/06, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

ANEXO 3

Formulário de coleta de dados em animais

Coelho: _____

Irritação primária:

() Dose simples

() Doses repetidas

0,5%	1,0%
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2,0%	5,0%
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Controle	
<input type="radio"/>	

Concentração:

1. 0,5%
2. 1,0%
3. 2,0%
4. 5,0%
5. Controle

Avaliação visual:

___/___/___

Data

A. Formação de eritema e escaras

Concentração

LESÃO	VALOR	1	2	3	4	5
Sem eritema	0					
Eritema leve (apenas perceptível)	1					
Eritema bem definido	2					
Eritema moderado a grave	3					
Eritema grave (vermelho violeta) com escaras	4					

B. Formação de edema

Concentração

LESÃO	VALOR	1	2	3	4	5
Sem edema	0					
Edema leve (apenas perceptível)	1					
Edema bem definido (bordas menores que 1mm)	2					
Edema moderado a grave (bordas e 1 mm)	3					
Edema grave (bordas com mais de 1 mm e não restrito às regiões de aplicação)	4					

C. Somatório

	1	2	3	4	5
A + B					

D. Índice de Draize:

Pontos	Irritação	1	2	3	4	5
0 a 2	Suave					
2 a 5	Moderada					
5 a 8	Severa					

ANEXO 4

Avaliação da irritação primária em animais (Técnica de Draize)

A. Formação de eritema e escara	Pontos
Eritema muito discreto (quase imperceptível).....	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo (vermelho beterraba) até formação de escaras (injúrias em profundidade)	4

B. Formação de edema	Pontos
Edema muito discreto (quase imperceptível)	1
Edema discreto (bordos bem definidos pela elevação das margens)	2
Edema moderado (elevação da área de aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (elevação da área acima de 1 mm estendendo-se além da área de exposição)	4

C. O total máximo de pontos de A ou B é igual a 4 pontos; para se obter os pontos para avaliação de irritação primária somam-se A + B.

D. Índice Draize, dérmico

0 a 2 pontos	Suave irritação
2 a 5 pontos	Moderada irritação
5 a 8 pontos	Severa irritação

ANEXO 5

Formulário de coleta de dados em humanos

Data: ___/___/_____

Nome: _____

Avaliação visual:

BRAÇO DIREITO	VALOR	0,5%	1,0%	2,0%	3,0%	5,0%
Nenhuma reação	0					
Eritema muito fraco	0,5					
Eritema fraco	1					
Eritema evidente, infiltração	2					
Eritema pronunciado, infiltração, crosta	3					

BRAÇO ESQUERDO	VALOR	0,5%	1,0%	2,0%	3,0%	5,0%
Nenhuma reação	0					
Eritema muito fraco	0,5					
Eritema fraco	1					
Eritema evidente, infiltração	2					
Eritema pronunciado, infiltração, crosta	3					

ANEXO 6

Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do projeto de pesquisa: Aplicação da Impedância Elétrica na Determinação de Alterações da Pele Provocadas por Produtos Químicos.

As informações contidas neste termo foram elaboradas para sua participação voluntária neste estudo que tem como objetivo medir a impedância da pele do antebraço antes e após a aplicação de uma substância levemente irritante. A substância ficará em contato com a pele durante 24 horas para provocar um ressecamento. Antes da colocação da substância e imediatamente após a sua retirada será feita uma leitura visual e da impedância da pele. Você poderá sentir uma leve coceira no local de aplicação. Caso este sintoma seja muito intenso, solicitamos que comunique à pesquisadora responsável.

A medida da impedância consiste na colocação de um aparelho sobre a pele por onde circulará uma corrente elétrica imperceptível para a captação de um sinal. Cada medida levará aproximadamente 15 segundos, e todo procedimento, aproximadamente 3 minutos.

Os resultados deste estudo serão úteis para detectar a irritação da pele antes do aparecimento dos sinais clínicos visíveis evitando o avanço da reação inflamatória.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável (Daniele Mendonça Ferreira) que pode ser encontrado no e-mail danielle@peb.ufrj.br ou nos telefones 2714-0984 ou 9847-1936. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – sala 01D-46 – 1º andar, telefone 2562-2480 – Email: ccp@hucff.ufrj.br.

Se desejar desistir do estudo em qualquer momento, você tem toda liberdade para fazê-lo, garantindo que a recusa de participação não acarretará em prejuízo ao tratamento recebido nesta clínica.

As informações a serem obtidas durante o estudo serão analisadas em conjunto com as informações obtidas de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Tais informações serão utilizadas pelos pesquisadores envolvidos no projeto para fins estatísticos e científicos. Se desejar, você poderá ser informado sobre os resultados parciais da pesquisa. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, você terá direito a tratamento médico na clínica, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com a Dra. Daniele Mendonça Ferreira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confiabilidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso ao tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta clínica.