



MODELO DE IMPEDÂNCIA DE ORDEM FRACIONAL PARA A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA CUTÂNEA

Fernanda de Souza Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Márcio Nogueira de Souza
 Alexandre Visintainer Pino

Rio de Janeiro
Junho de 2011

MODELO DE IMPEDÂNCIA DE ORDEM FRACIONAL PARA A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA CUTÂNEA

Fernanda de Souza Barbosa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

Prof. Marcio Nogueira de Souza, D.Sc.

Prof. Antonio Giannella-Neto, D.Sc.

Prof. Luiz Wagner Pereira Biscainho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JUNHO DE 2011

Barbosa, Fernanda de Souza

Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea/ Fernanda de Souza Barbosa. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XI, 107 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Márcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 89-99.

1. Bioimpedância cutânea. 2. Cálculo fracional. 3. Resposta inflamatória. I. Souza, Márcio Nogueira de, *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

*Aos meus pais,
por não questionarem,
em momento algum, seu amor*

Jamais saberei em vida o quanto fui ajudada.
Aos mais próximos e evidentes amigos,
jamais poderia deixar de agradecer.
Aos demais, que venha o tempo e a bonança,
Pois tudo de bom que nasce na terra,
mesmo sem ser notado,
encontra sentido nos suspiros do sonhador,
nos sorrisos desprevenidos,
nas diferenças inseparáveis,
nas incoerências que de longe não se distinguem
da pobreza, do caos, da guerra,
da ganância, do medo e do rancor,
e nos salva da temível falta de sentido
e nos orienta ao sabor dos ventos desejosos.

Jamais saberei em vida o quanto fui ajudada
E muito menos o quanto ajudei.
Mas como acredito nas coisas boas que nascem na terra,
que assim seja.

Fernanda de S. Barbosa

(01/06/2009)

Agradecimentos

Houve seguramente diversas camadas de envolvimento com este trabalho. Aos meus orientadores, Márcio Nogueira de Souza e Alexandre Visintainer Pino, agradeço a intensa dedicação ao laboratório e aos alunos, o que semeou a confiança de ter com quem contar. Em particular, ao professor Márcio atribuo boa parte do desejo e esperança no projeto. E por sua crença no meu potencial para desenvolvê-lo, sou grata.

Agradeço ao professor Antonio Giannella-Neto, por ter ponderado questões cruciais para a fundamentação do estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico por torná-lo possível com a concessão da bolsa.

Para todos os momentos em que não me escapou titubear, algumas pessoas foram excepcionais no retomar das rédeas. A elas dedico minha alegria: ao amigo Gustavo, companheiro nos desfechos do dia em que solicitei inúmeras vezes por apoio; à Valéria Glioche, quem me ensinou a reconhecer meus reais desejos e a caminhar com prazer; aos meus pais, Aloisio e Nadia, e irmãos, Roberta e Gabriel, que de forma brilhante recolheram as amarguras, deram espaço aos novos ares e ao bom gosto da luta, e assim me influenciaram com o perdão das faltas; às minhas sobrinhas Gabi e Juju, pela singela beleza de ser criança, espalhando a inocência das palavras não comedidas e a arte de rejuvenecer; aos amigos da vela Marcelo, Luiz, Amauri, Renata, Ricardo, Rolf, Guilherme, Eduardo, Maurício, Daniel e aos demais velejadores do Iate Clube Brasileiro, pelas rajadas de acolhimento, carinho e emoção. Aos colegas da residência médica, especialmente ao meu amigo Thiago, e a todos os médicos que persistem na árdua tarefa de respirar a medicina dia após dia. Às queridas amigas Leidy e Angélica, mulheres que estrelaram na minha vida. Ao mais novo vizinho e amigo Eduardo Brum. Aos amigos do Caminho de Santiago, Lilly, Michael, Hiroki, Lea, Christian e Matthew, os quais me ajudaram a observar que poucas coisas na vida merecem ser carregadas conosco e que amizade verdadeira aquece mais do que a brasa, ainda que tudo seja fugaz. Ao meu instrutor Pedro Aires e a toda turma da escalada, por compartilharem a incrível experiência de analisar cada obstáculo, acreditar em si mesmo e chegar ao objetivo.

Aos companheiros do LIB, do PEB, da vida, cada um com seu toque especial, temperando os dias com risadas e compartilhando os desafios, angústias e superações. Agradeço especialmente aos engenheiros Daniel e Fernando, sem eles estaria eu ainda

em frente ao computador. Pela dedicação e camaradagem no estudo do Cálculo Fracional e da Bioimpedância, agradeço à doutoranda Andrea e ao pós-doutor Weber. Dentre os mestrandos, pela doçura e gentileza, agradeço à Giulia e à Nárrima e pelas noites e fins de semana exaustivos de estudo, aos colegas Marcelo, Igor e Junior. A todos os amigos de “Saúde” e de “Exatas” dedico algumas palavras: não é tarefa fácil embrenhar-se no campo de especialidades alheias e é necessária muita coragem para discordar na terra do estrangeiro. Levamos nas costas bagagem pesada, com saberes importantes e outros pouco importantes. No entanto, é convivendo com o inesperado que se desenvolve a capacidade de desafiar. O senso de coletividade anima a caminhada e sem vocês nada disso teria graça.

Ao meu querido Luigui, por toda a alegria que me traz, sua lealdade, dedicação, carinho e amor.

A Deus, por inúmeras vezes me permitir enxergar além do que os olhos permitem.

E ao leitor, aí está o meu propósito. Sou grata por me acompanhar.

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

MODELO DE IMPEDÂNCIA DE ORDEM FRACIONAL PARA A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA CUTÂNEA

Fernanda de Souza Barbosa

Junho/2011

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza
Alexandre Visintainer Pino

Programa: Engenharia Biomédica

Dados experimentais de bioimpedância da pele não são bem ajustados por modelos elétricos clássicos, sendo normalmente necessário o uso de elementos de ordem fracional, os quais são capazes de melhor descrever as dispersões dielétricas da pele. Neste estudo, para avaliar os efeitos da irritação produzida experimentalmente na pele de coelhos e almejando-se aumentar o poder diagnóstico da técnica de bioimpedância, foi utilizado um modelo que inclui um fractor, cuja solução envolve derivadas de ordem fracional. Foram analisados dados anteriormente coletados pelo grupo, onde a pele de coelhos foi sensibilizada com lauril sulfato de sódio em diferentes concentrações durante 5 dias consecutivos. A técnica de espectroscopia de bioimpedância foi baseada na resposta da corrente a um degrau de tensão aplicado à região irritada. No que concerne aos resultados, nenhum dos parâmetros do circuito elétrico (R_i , R_e , α), com relevância na interpretação do fenômeno inflamatório, sofreu alterações de significância estatística compatíveis com a expectativa clínica da inflamação. Em decorrência das limitações do trabalho, não é possível afirmar-se que o modelo fracional aumentou o poder diagnóstico da técnica de bioimpedância cutânea.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

FRACTIONAL ORDER IMPEDANCE MODEL FOR THE CUTANEUS
INFLAMMATORY RESPONSE

Fernanda de Souza Barbosa

June/2011

Advisors: Marcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Department: Biomedical Engineering

Experimental data of bioimpedance of the skin are not well adjusted by classic electric models, and is usually necessary to use fractional-order elements, which are able to better describe the dispersions of dielectric skin. In this study, to evaluate the effects of experimentally produced irritation in the skin of rabbits and aiming to increase the diagnostic power of the bioimpedance technique, it was used a model that includes a fractor, whose solution involves fractional order derivatives. We analyzed data previously collected by the group, where the skin of rabbits were sensitized with sodium lauryl sulfate at different concentrations for 5 consecutive days. The bioimpedance spectroscopy technique was based on the response of current to a voltage step applied to the irritated area. Regarding the results, none of the parameters of the electrical circuit (R_i , R_e , α), with relevance in the interpretation of the inflammatory phenomenon, experienced statistically significant changes consistent with the expectation of clinical inflammation. Due to the limitations of this work, we cannot say that the fractional model increased the diagnostic power of the technique of cutaneous bioimpedance.

SUMÁRIO

Capítulo 1	
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2	
A PELE	6
2.1 Histologia cutânea.....	7
2.2 Lesões por contato com agentes externos	12
2.2.1 Fisiopatologia	12
2.2.2 Eczemas.....	14
2.2.2.1 Dermatite de contato alérgica.....	15
2.2.2.2 Dermatite de contato por irritante primário.....	16
Capítulo 3	
BIOENGENHARIA CUTÂNEA	19
3.1 Técnicas subjetivas	19
3.2 Técnicas de bioengenharia cutânea.....	20
3.1.1 Perda de água transepidermica (<i>Transepidermal water loss - TEWL</i>)	20
3.2.2 Corneometria (CM): Capacitância elétrica e condutância	23
3.2.3 Fluxometria por Doppler a laser (<i>Laser Doppler Flowmetry – LDF</i>).....	24
3.2.4 Método colorimétrico.....	26
3.2.5 Outras técnicas	27
3.2.6 Técnicas de bioengenharia cutânea: revisão de literatura	29
3.2.7 Bioimpedância.....	32
3.3 Impedância elétrica	33
3.3.1 Conceitos.....	33
3.3.2 Modelos.....	42
3.3.3 Bioimpedância cutânea: revisão de literatura.....	43
Capítulo 4	
O CÁLCULO FRACIONAL	49
4.1 Histórico.....	49
4.2 Função Gamma	51
4.3 Função de Mittag-Leffler	53
4.4 Definições de derivadas e integrais fracionais.....	56
4.4.1 Definição de Grünwald-Letnikov.....	56
4.4.2 Definição de Riemann-Liouville.....	56
4.4.3 Definição de Caputo.....	56
4.4.4 Derivada da função de Mittag-Leffler.....	57
4.5 Transformada de Laplace e convolução.....	57
4.6 Função de Green	58
Capítulo 5	
MATERIAIS E MÉTODOS	62
5.1 Modelos elétricos e solução analítica.....	62
5.2 Banco de dados e técnicas de medição	68
5.3 Algoritmo e análise estatística	69
Capítulo 6	
RESULTADOS	71
Capítulo 7	
DISCUSSÃO	80

Capítulo 8	
CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO I.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

SIGLA	SIGNIFICADO
CM	Corneometria
<i>CPE</i>	<i>Constant Phase Element</i>
DCA	Dermatite de contato alérgica
DCIP	Dermatite de contato por irritante primário
<i>ESCD</i>	<i>European Society of Contact Dermatitis</i>
IFN-g	Interferon-gama
IL	Interleucina
IP-10	Proteína induzida por interferon-10
<i>LDF</i>	<i>Laser Doppler Flowmetry</i>
LIB	Laboratório de Instrumentação Biomédica
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago-2
<i>SLS</i>	<i>Sodium Lauryl Sulphate</i>
<i>TEWL</i>	<i>Transepidermal Water Loss</i>
TNF-a	Fator de necrose tumoral alfa

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Por ser um sistema sofisticado, a pele envolve processos físico-químicos bastante elaborados, principalmente quando é submetida à ação de agressores externos. Seu papel se estende além das propriedades de revestimento e proteção do corpo. Ela possui uma relação singular com os demais órgãos e está integrada aos sistemas de maneira que permite o equilíbrio dinâmico de todo o organismo e o equilíbrio deste com o ambiente externo. Fenômenos simples como sudorese e piloereção, por exemplo, estão relacionados com a regulação térmica de forma central. A pele e as mucosas estabelecem limite até mesmo entre o que é permitido ou não interagir com o organismo. Quando detectam agentes agressores, são responsáveis por desencadear inúmeros fenômenos biológicos envolvidos com a ativação do sistema imune, liberação de mediadores químicos, mudanças estruturais do tecido e diversas interações celulares e moleculares. Juntas estas reações contêm danos expressivos. No entanto, se o dano é persistente, ocorre o comprometimento do tecido, especialmente do estrato córneo, a mais externa de todas as camadas. A duração e a intensidade dos mecanismos de defesa podem comprometer as próprias funções da pele e determinar desde pequenas mudanças em sua histologia até estágios patológicos com sinais e sintomas clínicos evidentes.

Reação (ou resposta) inflamatória é o nome dado à resposta geral e inespecífica do tecido vascularizado à agressão externa. No caso do contato da pele com substâncias nocivas que desencadeiam uma reação inflamatória, a condição patológica produzida é

denominada dermatite de contato. As manifestações ocorrem de forma particular e as alterações visualmente perceptíveis podem variar de edema e eritema leves à exsudação, descamação e formação de crostas. Algumas substâncias podem produzir inflamação em qualquer pele, são os irritantes primários. Outras desencadeiam fenômenos imunológicos específicos quanto ao agente, produzindo a dermatite de contato alérgica. A dermatite de contato pelos irritantes primários é causa comum de doença ocupacional. Os trabalhadores mais acometidos são aqueles que mantêm contato frequente com líquidos (DICKEL *et al.*, 2002). Água e detergentes são os principais irritantes (SLODOWNIK *et al.*, 2008) e a maior incidência está entre cabeleireiros e barbeiros (46,9 para cada 10.000 profissionais por ano) (DICKEL *et al.*, 2002). A exposição pode ocorrer ainda pelo uso de cosméticos e produtos de higiene e limpeza. Uma das substâncias com potencial irritativo acrescida a muitos destes produtos é o surfactante lauril sulfato de sódio, conhecido como *SLS* (*Sodium Lauryl Sulphate*). O *SLS* também é empregado habitualmente em estudos que avaliam o grau de irritação da pele de humanos e de animais. Os estudos utilizam formas variadas de medida da resposta tecidual ao irritante. Uma delas é a avaliação clínica (visual), bastante utilizada em testes de contato e ensaios toxicológicos de cosméticos em coelhos, cuja sensibilidade ao irritante é maior do que em humanos. Apresenta, no entanto, desvantagens quanto à subjetividade, necessidade de treinamento ostensivo, e impossibilidade de quantificação contínua (KUZMINA *et al.*, 2003a, GOON *et al.*, 2004). Além disto, em estágios inflamatórios subclínicos ou de evolução recente as mudanças podem ser indetectáveis por este método, pois mesmo os sinais iniciais como edema e eritema são relativamente tardios.

Em alternativa à leitura visual, foram desenvolvidos vários métodos não invasivos de bioengenharia para avaliar a resposta cutânea ao irritante. Estes métodos diferenciam-se pela técnica de quantificação e o fenômeno fisiológico analisado, tal como: função de barreira (perda transepidérmica de água), hidratação (corneometria), fluxo sanguíneo (fluxometria por Doppler a laser), cor (colorimetria), espessura (avaliação ecográfica), conteúdo lipídico superficial (sebumetria) e o pH superficial. Cada técnica resulta em vantagens e desvantagens que devem ser ponderadas de acordo com os objetivos de estudo. As interferências mais comuns advêm de fatores biológicos, psíquicos e ambientais, além das variações intra-individuais. Em geral, a combinação de duas ou mais técnicas e múltiplas aferições pode conferir respostas mais fidedignas.

O estudo da resposta da pele à aplicação tópica de *SLS* também foi um dos temas iniciais de pesquisas na área de bioimpedância cutânea (OLLMAR, EMTESTAM, 1992). Como cada reação tecidual é composta por alterações químicas ou estruturais que levam a mudanças significativas nas propriedades elétricas celulares (NYRÉN *et al.*, 1999), as medidas de impedância elétrica podem ser usadas para quantificar alterações decorrentes da inflamação, como o edema (NICANDER *et al.*, 1995). Para descrever o comportamento da corrente no tecido biológico, são então utilizados modelos elétricos. Em tais modelos, resistores e capacitores normalmente compõem os circuitos que modelam a pele e são dispostos de maneira a fornecer o maior grau de compatibilidade possível com os fenômenos bioelétricos em estudo.

Existe nos sistemas biológicos uma diversidade de padrões, estruturas, formatos e interações que desafia a área de modelagem matemática e da bioengenharia. Os fenômenos envolvidos na dinâmica de um organismo vivo ou deste com os demais, e até mesmo com o ambiente, atingem elevados níveis de complexidade. O maior desafio é uma modelagem realística capaz de captar as principais características do sistema. Em engenharia, é comum o uso de equações diferenciais e certas transformadas para descrever eventos físicos; porém, quando se trata da análise da resposta de um organismo vivo a estímulos elétricos, químicos ou mecânicos, as ferramentas usuais eventualmente encontram algumas limitações. Quando a solução de equações que descrevem o comportamento do sistema encontra derivadas de ordem não inteira, dois caminhos podem ser seguidos, o uso de aproximações ou a solução analítica propriamente dita. O cálculo fracional se destina à solução de equações integro-diferenciais com expoentes arbitrários e, por isto, parece adequar-se melhor à dinâmica dos processos biológicos.

Na elaboração do modelo matemático é necessário identificar o problema específico em análise e o conjunto dos componentes envolvidos no sistema. As expressões matemáticas envolvidas neste modelo terão como base o sinal de entrada e o sinal de saída. Após o equacionamento do sistema, criam-se algoritmos computacionais para a solução das equações matemáticas relacionadas. Tais algoritmos permitem, entre outras possibilidades, a estimação dos valores numéricos dos parâmetros da equação de modo que esta melhor se ajuste a determinados dados experimentais.

Um exemplo é a representação da resposta inflamatória cutânea a partir de medidas bioelétricas do tecido. O comportamento da impedância elétrica da pele pode ser traduzido em um sistema elétrico cujas entrada e saída são sinais que envolvem

medidas de corrente. Aplicando-se um degrau de tensão à pele, será captado um sinal de corrente que terá uma variação de acordo com o grau de inflamação. Esta descrição simples corresponde à base da técnica de espectroscopia por bioimpedância em uso no Laboratório de Instrumentação Biomédica (LIB) do Programa de Engenharia Biomédica da COPPE/UFRJ. O método de resposta de corrente ao degrau de tensão foi desenvolvido por NEVES e SOUZA (2000) e vem sendo aplicado no estudo de sistemas biológicos nos últimos anos (NEVES *et al.*, 1999, NEVES, 2000, NEVES, SOUZA, 2001, MENDONÇA *et al.*, 2001, MENDONÇA, 2002, ALVARENGA, SOUZA, 2003, MENDONÇA, SOUZA, 2003, FERREIRA, SOUZA, 2004, NEVES, 2006, ALVARENGA, SOUZA, 2006, FERREIRA, 2006, 2007). Os estudos do grupo na área de dermatologia foram iniciados em 2006 por Ferreira e foram motivados pelo crescente interesse da bioengenharia na fisiopatologia do tecido cutâneo. Nos últimos trabalhos do grupo (FERREIRA, 2006, 2007), devido ao caráter heterogêneo da pele, lançou-se mão de uma modelagem com um elemento de fase constante, ou *CPE* (*Constant Phase Element*) (GRIMNES, MARTINSEN, 2005, SOSA *et al.*, 2005). Uma vez que o uso de tais elementos de fase constante leva a equações características com expoentes fracionais, a impedância do modelo foi aproximada no domínio de Laplace. Com isto, foi possível realizar estimativas dos parâmetros dos modelos elétricos preconizados para a pele.

O uso do cálculo fracional para a resolução analítica de equações diferenciais não inteiras, ou sua forma equivalente no domínio de Laplace (KILBAS *et al.*, 2006), tem-se difundido recentemente. A impedância elétrica da pele que utiliza o *CPE* parece um campo promissor para a aplicação do cálculo fracional, já que a pele é composta por estruturas que se modificam progressivamente na medida em que atingem planos mais profundos. A resposta inflamatória cutânea é um exemplo de como uma ferramenta matemática que valorize as minúcias do processo pode ser útil na formação de um modelo comportamental. A abordagem do cálculo fracional neste campo é uma proposta inovadora e pode ser útil na interpretação fisiológica do processo, já que permite ressaltar propriedades do sistema que seriam negligenciadas por modelos oriundos de equações aproximadas.

A criação do modelo matemático inicia-se com a análise do sistema em estudo, das possíveis técnicas de medição do fenômeno, das ferramentas matemáticas disponíveis para o equacionamento do modelo, elaboração do algoritmo, obtenção dos valores numéricos dos parâmetros da equação e interpretação dos resultados. Estes

assuntos são abordados em sequência nos próximos capítulos. O estudo da pele e da resposta inflamatória cutânea é iniciado no Capítulo 2. O Capítulo 3 é composto pelas técnicas utilizadas na medição da inflamação cutânea. No Capítulo 4 será abordado o cálculo fracional como ferramenta chave na resolução das equações diferenciais com coeficientes arbitrários. A metodologia utilizada, incluindo a confecção do algoritmo computacional, está disposta no Capítulo 5. Por fim, serão apresentados os resultados, a discussão e a conclusão nos Capítulos 6, 7 e 8.

Objetivo Geral

A proposta deste estudo foi a de investigar a abordagem do cálculo fracional na modelagem de um sistema biológico, ou, mais especificamente, no estudo da reação inflamatória cutânea produzida de forma experimental em coelhos, por meio da estimação de parâmetros relacionados à técnica de bioimpedância. As etapas mais relevantes do trabalho dizem respeito ao equacionamento da resposta da corrente ao degrau de tensão para um modelo de bioimpedância cutânea contendo o *CPE*; a consequente obtenção de uma solução analítica com as ferramentas do cálculo fracional; e a implementação de ferramentas computacionais que permitiram a estimação de parâmetros a partir de tal solução.

Objetivos Específicos

- Aprendizado dos novos conceitos e ferramentas matemáticas aplicadas ao campo do Cálculo Fracional.
- Aplicação das ferramentas de resolução do Cálculo Fracional ao modelo de bioimpedância da pele desenvolvido por FERREIRA (2006) e obtenção de uma equação analítica que pudesse ser implementada computacionalmente.
- Adaptação da solução analítica ao programa de otimização multiparamétrica para obtenção de estimativas dos parâmetros do modelo elétrico de biompedância da pele.
- Re-análise do banco de dados de resposta de corrente ao degrau de tensão coletados por FERREIRA (2006) e comparação dos resultados daquele trabalho com os obtidos pela solução analítica.
- Interpretação fisiológica e discussão dos resultados.

CAPÍTULO 2

A PELE

Há mais de 150 anos, a pele foi descrita por Virchow como um envoltório com função de revestimento e proteção a órgãos mais complexos (VIRCHOW, 1860). Durante os últimos anos, no entanto, estudos têm demonstrado que a pele também é um órgão funcionalmente sofisticado. Suas interações celulares e moleculares são complexas e ocorre renovação e reparo de seus componentes a todo o momento. É um tecido altamente dinâmico, capaz de responder a alterações no ambiente externo e interno e isto permite que muitas das manifestações do organismo se expressem por alterações cutâneas. O controle hemodinâmico, o equilíbrio hidro-eletrolítico, a termorregulação, o metabolismo energético, o sistema sensorial e a defesa contra agressões externas dependem da sua viabilidade.

A pele desempenha funções específicas em cada região do corpo e as estruturas que a compõem variam de acordo com o sítio anatômico. As regiões palmo-plantares, por exemplo, possuem uma maior queratinização e ausência de pêlos, e estão mais adaptadas à abrasão. As extremidades das falanges distais possuem grande número de receptores sensoriais, o que determina uma elaborada função tátil. As regiões ungueais adquirem uma espessa camada de queratina durante a diferenciação celular, caracterizando a rigidez das unhas. Além disto, as mudanças que acometem uma determinada região da pele envolvem mecanismos os quais englobam uma série de componentes celulares e segmentos cutâneos. É necessário, portanto, conhecer os

principais elementos que constituem este tecido e os principais sistemas a ele correlacionados.

2.1 Histologia cutânea

O padrão histológico da pele pode ser definido a partir das três camadas que a compõem: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é um epitélio de revestimento e encontra-se firmemente acoplada ao tecido conjuntivo subjacente do qual recebe suporte, a derme. Abaixo da derme reside um tecido conjuntivo frouxo, a hipoderme, que contém gordura (Figura 1).

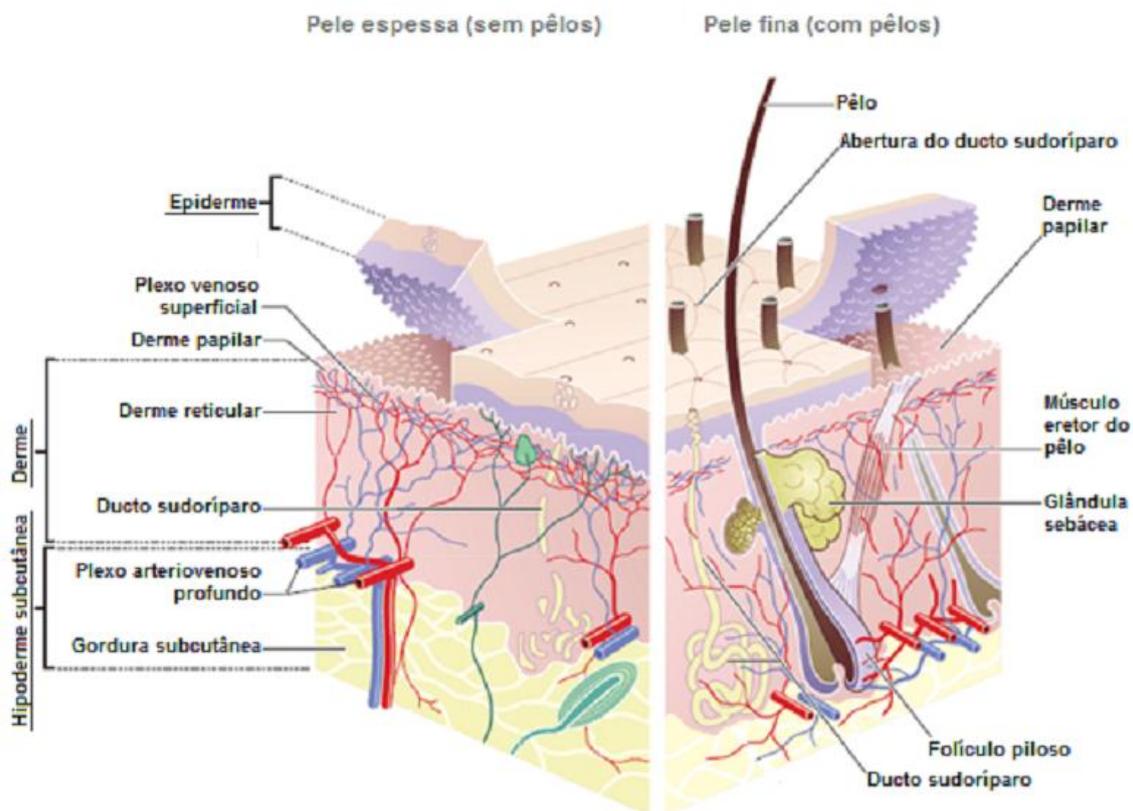


Figura 1 – Principais estruturas e camadas da pele. Adaptado de HUNTER *et al.* (2002).

A epiderme é formada por camadas de células diferenciadas pela morfologia, grau de maturação e profundidade. As mais superficiais são justapostas umas as outras e cobertas por queratina. Daí segue a sua denominação histológica: tecido epitelial pavimentoso (ou escamoso) estratificado queratinizado. As células da camada mais

profunda da epiderme, a camada basal, dividem-se continuamente. Durante um período de 60 dias estas células sofrem mitose e seu conteúdo é modificado na medida em que atravessam as camadas superiores até chegarem a mais superficial, onde morrem (Figura 2 e Figura 3). A camada queratinizada de células mortas varia desde as regiões mais delicadas como as pálpebras, até as mais espessas como as plantas dos pés.

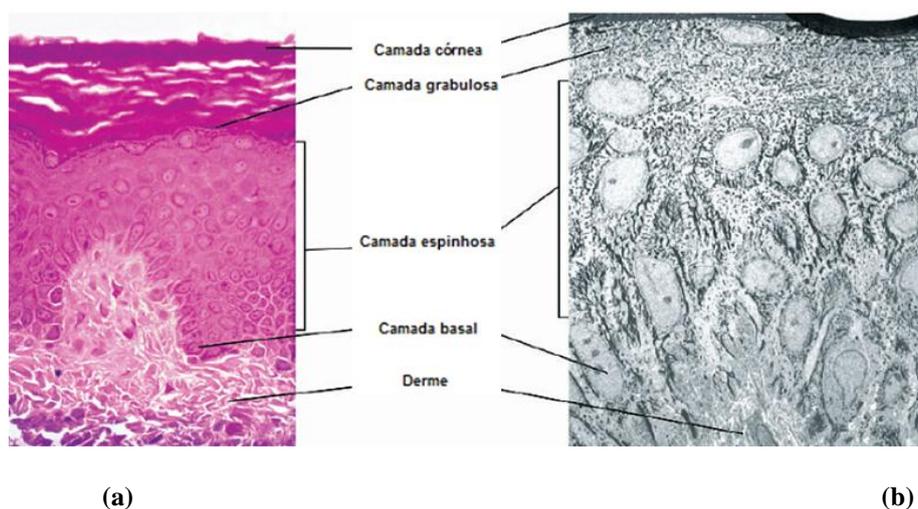


Figura 2 – Camadas da epiderme. (a) imagem por microscopia óptica; (b) imagem por microscopia eletrônica. Extraído de HUNTER *et al.* (2002).

A camada córnea, a mais superficial, é plana e repleta de queratina (*stratum corneum*). É formada por cerca de quinze fileiras de células mortas empilhadas, os corneócitos. Os corneócitos são células anucleadas ricas em proteínas, delimitadas por um envelope protéico e um envelope lipídico, unidas por corneodesmosomos e circundadas por lipídeos intercelulares. O revestimento do corneócito e a matriz hidrofóbica previnem a perda de líquido pela pele e agem como barreira contra a penetração de substâncias externas potencialmente nocivas; porém seu caráter apolar permite que a penetração de compostos orgânicos ocorra facilmente. Em condições normais, esta camada é ligeiramente permeável à água e a substâncias polares, e relativamente impermeável aos íons sódio e potássio e a outras substâncias como glicose e uréia. Sua hidratação é baixa (cerca de 20% de água) em relação aos estratos inferiores (70%) (PLIQUETT, PLIQUETT, 1996) e, com isto, possui a maior oposição ao fluxo de corrente elétrica.

A camada córnea constitui a principal barreira contra substâncias químicas e microrganismos e está envolvida na regulação da perda de água do organismo para a atmosfera, conhecida como perda de água transepidermica.

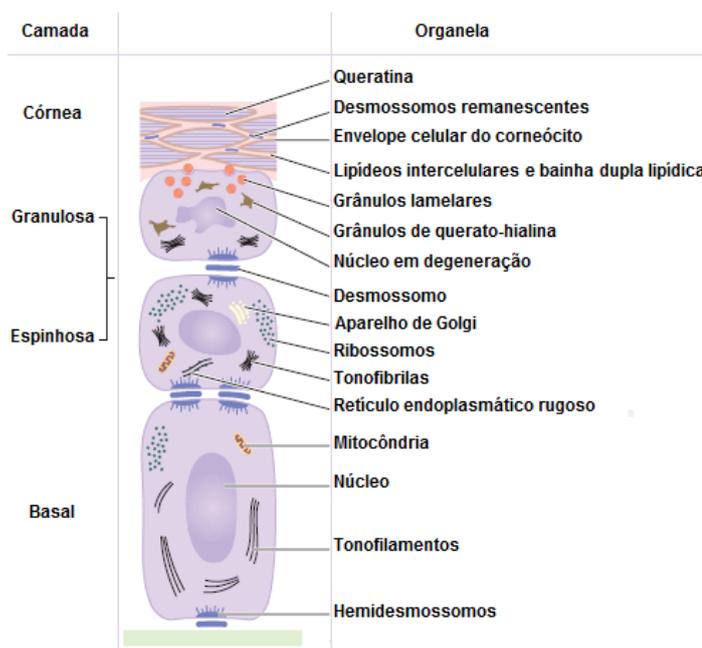


Figura 3 – Mudanças durante a queratinização. Adaptado de HUNTER *et al.* (2002).

A camada granulosa (*stratum granulosum*) localiza-se entre a camada córnea e a espinhosa. Possui morfologia intermediária a ambas e sua denominação advém dos grânulos de querato-hialina e grânulos lamelares que a compõem. O conteúdo dos grânulos lamelares abrange glicoproteínas, glicosilceramidas, ácidos graxos, fosfolípídeos e colesterol. Na transição para a camada córnea, o conteúdo destes grânulos é liberado para o espaço intercelular e sofre modificação pelas hidrolases. Por fim, depositam-se sobre as células e na matriz extracelular em uma bainha dupla formando a barreira lipídica semipermeável da camada córnea com predomínio de ceramidas, colesterol e ácidos graxos.

Logo abaixo da camada granulosa encontra-se a camada espinhosa (*stratum spinosum*), composta pelas células de Malpighi. Estas células são queratinócitos histologicamente diferenciados e unidos por pequenos processos citoplasmáticos, por abundantes desmossomos e por um cimento intercelular de glicoproteínas e lipoproteínas.

A camada granulosa repousa sobre a camada basal (*stratum basale*), cuja composição é de queratinócitos e células tronco epidermais dispostos lado a lado sem espaço entre os mesmos, formando uma fileira única de aspecto colunar. A continuidade entre os queratinócitos ocorre por junções comunicantes conhecidas como *gap junctions*, por onde há passagem de elementos intracelulares. Além da queratina, os

queratinócitos produzem citocinas que participam das reações inflamatórias e imunológicas da pele (ALBANESI *et al.*, 2005).

Há ainda outras células que compõem a epiderme. São elas: os melanócitos da camada basal, que estendem seus prolongamentos dendríticos superiormente até as outras células epidérmicas e contêm pigmentos de melanina com ação protetora contra a radiação ultra-violeta (Figura 4); as células de Langerhans suprabasais, que reconhecem e processam sinais antigênicos e os comunicam às células linfóides, também possuem morfologia dendrítica (Figura 4); e as células de Merkel basais, que são células neuroendócrinas as quais atuam na proliferação de queratinócitos e parecem ter papel na regulação de doenças cutâneas (BOULAIS *et al.*, 2009).

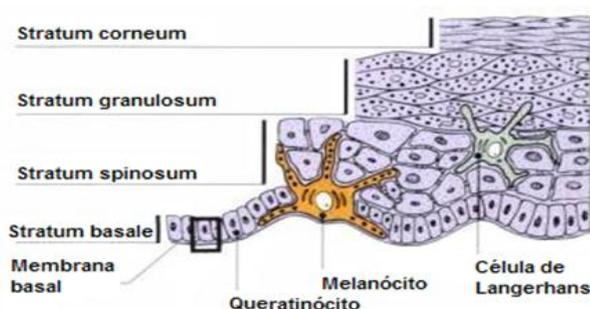


Figura 4 – Camadas e outras estruturas da epiderme. Adaptado de GAWKRODGER (2002).

Os anexos cutâneos incluem os pêlos, cabelos, músculo eretor do pêlo, unhas, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (Figura 4). Os folículos pilosos contêm reservatórios de células tronco epiteliais que participam do processo de reparação tecidual. Exceto pela unha, todos estes apêndices possuem seu leito na derme.

A epiderme não possui vascularização, ela recebe seus nutrientes por contiguidade com a derme. A derme, por sua vez, é definida como “uma rígida matriz de tecido conjuntivo de suporte, contendo estruturas especializadas dispostas imediatamente abaixo e intimamente conectadas à epiderme” (GAWKRODGER, 2002). A adesão da epiderme à derme ocorre pela projeção de cristas epidérmicas, enquanto a derme se projeta superiormente pelas papilas dérmicas. A interface entre estas camadas é conhecida como junção dermoepidérmica ou zona da membrana basal. Os componentes da matriz de tecido conjuntivo são as fibras, os filamentos e a substância amorfa, as quais acomodam vasos, nervos e anexos epidérmicos. Os elementos celulares deste tecido são as células mesenquimais primitivas, os fibroblastos, os macrófagos, as células dendríticas, os mastócitos e os linfócitos, cujas funções estão resumidas na

Tabela 1. A maior parte destes elementos também se apresenta de forma transitória. Os polimorfonucleares, por exemplo, são células de origem vascular e são vistos durante a inflamação. Isto é possível devido à ampla rede vascular e linfática que supre a derme. A inervação desta camada também é rica, determinando sensibilidades táteis, dolorosas e térmicas.

Tabela 1 – Funções de algumas células residentes da derme. Adaptado de HUNTER *et al.* (2002).¹

<u>Célula</u>	<u>Função</u>
Fibroblasto	Síntese de colágeno, reticulina, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos, collagenase
Fagócito mononuclear	Móvel: fagocita e destrói bactérias Secreta citocinas
Linfócito	Vigilância imunológica
Célula de Langerhans e Célula dentrítica dérmica	Em trânsito entre linfonodos locais e epiderme Apresentação de antígenos
Mastócito	Estimulados por antígenos, complementos e outras substâncias a liberar mediadores inflamatórios como histamina, heparina, prostaglandinas, leucotrienos, triptase e fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos

As fibras colágenas perfazem cerca de 70% da derme e são responsáveis pela rigidez e força desta camada. Além disto, a fisiologia e a reparação da pele dependem da síntese e da degradação do colágeno (AZULAY, AZULAY, 1999a). As fibras elásticas conferem elasticidade ao tecido. Elas formam uma rede que se estende desde a junção dermo-epidérmica até a hipoderme. Também estão dispostas ao longo dos folículos pilosos e do endotélio vascular.

A substância fundamental amorfa da pele é constituída basicamente por glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, sulfato de dermatan ou condroitino sulfato B, sulfato de heparana, sulfato de condroitina e sulfato de queranato). Esta substância permite a adesão de diversos componentes do meio extracelular.

Por fim, abaixo da derme encontra-se a camada mais profunda da pele, a hipoderme. Também é conhecida como panículo adiposo, pois se constitui de adipócitos separados por delicados septos de colágeno com estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. Sua participação no metabolismo energético está relacionada à degradação de

¹ Tradução do autor.

ácidos graxos e à prevenção da perda de calor (isolamento térmico). Desempenha ainda proteção contra traumas, pela mobilidade que confere à pele.

2.2 Lesões por contato com agentes externos

2.2.1 Fisiopatologia

A pele constitui uma importante barreira contra agressores físico-químicos (abrasão, corrosão etc.) e biológicos (microorganismos, proteínas estranhas e outros). Os mecanismos de defesa variam desde a secreção sebácea, com ação protetora e antimicrobiana, até as mais específicas e complexas funções imunológicas.

O agente agressor externo representa um estímulo nocivo capaz de ativar vários mecanismos de adaptação celular. Quando as mudanças adaptativas não são possíveis, ou ocorrem em excesso, instalam-se danos celulares que, dependendo do estágio, podem ou não ser revertidos. Caso o estímulo seja severo ou persistente, sucedem danos celulares irreversíveis e morte celular. Estímulos exógenos por danos químicos, em particular, geram morte celular por necrose, que se manifesta pela tumefação ou ruptura das células, desnaturação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e falência das organelas celulares (MAJNO, JORIS, 1995). Os estímulos também podem provocar reações complexas da vasculatura do tecido conjuntivo (derme), fenômeno conhecido como inflamação. A resposta inflamatória é um mecanismo de proteção do organismo, uma resposta imunológica geral e inespecífica de tecidos vascularizados. O objetivo é livrá-lo das causas e consequências dos danos celulares pela destruição, diluição ou confinamento do agente (MITCHELL, COTRAN, 2003a).

Durante a inflamação também ocorre reconstituição do tecido lesado. O reparo é promovido pela regeneração das células do parênquima e pelo preenchimento com tecido conjuntivo fibroso (cicatrização). A inflamação e o reparo, no entanto, podem ser potencialmente nocivos, como ao produzirem reações extremas de hipersensibilidade e cicatrizes desfigurantes.

As reações inflamatórias podem ser agudas ou crônicas. Quando agudas têm duração de no máximo alguns dias. Suas características principais são a presença de exudato (líquido inflamatório extravascular com concentração protéica elevada e grande quantidade de restos celulares) e migração de leucócitos.

Nas dermatoses inflamatórias agudas os fatores produzidos pela inflamação podem coexistir com danos à epiderme, derme e vasculatura. Na inflamação crônica a duração é prolongada, o que permite o surgimento de um novo padrão histológico com neovascularização, fibrose, necrose tecidual e a presença de linfócitos e macrófagos. Nas lesões crônicas de pele a camada epidérmica sofre hipertrofia (aumento do tamanho das células) e hiperplasia (aumento do número de células), enquanto na derme transcorre fibrose.

Sob o contato com agentes irritativos exógenos a pele desenvolve um padrão histológico chamado dermatite espongiosa. A espongiose corresponde ao acúmulo de fluidos no espaço intercelular da camada espinhosa. Ocorre separação dos sítios de adesão intercelular (desmossomos) e das membranas celulares, deslocando os queratinócitos da camada espinhosa e formando vesículas na epiderme (histopatológicas), que lhe conferem o aspecto esponjoso (Figura 5).



Figura 5 – Histologia da espongiose. As setas indicam as vesículas espongiosas na camada espinhosa. Extraído de WILKEL (2007).

Todas estas alterações teciduais somadas a outros mecanismos adaptativos determinam um novo padrão morfológico e estão diretamente relacionados aos sinais e sintomas clínicos da doença, seu curso e prognóstico (MITCHELL, COTRAN, 2003b). As vesículas histopatológicas podem exterioriza-se formando vesículas clínicas. A ruptura destas libera o exudato que, ao secar, formará crostas. O edema intercelular altera a queratinização pela manutenção dos núcleos nas células da camada córnea (paraceratose). Ocorre o espessamento da camada córnea (hiperceratose) resultando na clínica de descamação. Além disto, a vasodilatação produz o eritema e, na fase crônica, pode haver espessamento da camada espinhosa (acantose) e de todas as camadas da epiderme, o que dá origem à liquenificação (espessamento da pele).

2.2.2 Eczemas

Quando o contato da pele com um agente externo desencadeia uma reação inflamatória, produz-se uma condição patológica denominada dermatite de contato. A manifestação clínica majoritária da dermatite de contato é o eczema e, por isto, também é conhecida como eczema de contato. Historicamente, em 1894 Jadassohn (FOUSSERAUX, 1984) observou e replicou uma reação eczematosa devido ao contato da pele com o iodofórmio. Este achado deu início à caracterização de diversos agentes externos como fontes de eczema. WILSON (1865), já havia admitido que elementos irritantes pudessem causar eczema.

Eczema é um termo que abrange doenças cutâneas de diversas etiologias. O termo deriva do grego *ekzein* significa “entrar em ebulição”. Equivale ao termo “erupção”, ou seja, “brotar para fora”. O termo grego, no entanto, é mais fidedigno, pois sugere o estado de ebulição da água, as bolhas que surgem em sua superfície são análogas às vesículas do eczema. O eczema é um estado inflamatório caracterizado por “eritema, prurido, espessamento intersticial e às vezes subcutâneo, exsudação, papulação, vesiculação, incrustação e descamação” (WILSON, 1865). Cada caso de eczema, no entanto, manifesta-se de forma particular e as alterações visualmente perceptíveis podem variar de uma a várias características dentre as mencionadas acima. Eritema e edema costumam apresentar-se inicialmente de forma discreta. Eventualmente evoluem para vesículas e exsudação e, em seguida, ocorre descamação e formação de crostas (Figura 6).



Figura 6 – Eczema de contato. Extraído de WILKEL (2007).

Algumas substâncias podem causar eczema em qualquer pele, são os irritantes primários. Outras dependem de condições específicas do indivíduo e a fisiopatologia se dá por mecanismos alérgicos que sucedem precocemente ou pela exposição prolongada. O contato com estas substâncias classifica os eczemas de origem exógena como: (1) alérgico e (2) por irritante primário. No segundo, além da espongiose do estágio inicial, ocorre hiperplasia em períodos mais avançados. Ambos os tipos não possuem padrão morfológico específico, mas os hábitos do paciente, a localização e a distribuição das lesões ajudam a apontar os agentes etiológicos prováveis, como cosméticos, acessórios de metal e causas ocupacionais. Há outros fatores predisponentes que devem ser observados como idade, sexo, raça, histórico de dermatite atópica e ocupação. A susceptibilidade a irritantes parece decrescer com o avanço da idade e a intensidade das reações parece estar aumentada nas mulheres, as quais possivelmente se expõem mais que os homens (BELSITO, 2005). O conteúdo lipídico do estrato córneo parece reduzir a sensibilidade ao irritante nas descendências africanas, a atopia aumentaria o risco para o eczema e a ocupação é outro fator de extrema relevância, pois influencia no grau de exposição a água, solventes, materiais cáusticos e microtraumas (BELSITO, 2005).

2.2.2.1 Dermatite de contato alérgica

Na dermatite de contato alérgica (DCA), a exposição repetida da pele a substâncias químicas não-protéicas, denominadas haptenos, sensibiliza a epiderme e induz à inflamação cutânea. O mecanismo é chamado hipersensibilidade de contato do tipo IV. Nele ocorre ativação da imunidade adquirida antígeno-específica e o desenvolvimento de mediadores da inflamação, as células T efectoras. Quando a substância química é aplicada topicamente, são formadas ligações covalentes entre os haptenos e as proteínas da pele. Este complexo (o antígeno) liga-se aos carreadores da membrana plasmática das células de Langerhans e de outras células dendríticas cutâneas, as quais migram da epiderme para linfonodos de drenagem paracorticais, onde apresentam o antígeno aos precursores de células T hapteno-específicas. A sensibilização ocorre quando o hapteno permanece em contato com a pele por 18 a 24 horas.

Segundo DUARTE *et al.* (2000), os haptenos “são substâncias de baixo peso molecular, com reatividade química e solubilidade lipídica capaz de promover sua penetração no extrato córneo e reagir com componentes do sistema imune”. Os

haptenos podem ser metais como cromo, níquel, mercúrio; antibióticos como penicilina e neomicina; objetos plásticos como polietileno, acrílicos e polivinil e cosméticos como fenol, formol e eosina.

Um grupo de células T se diferencia em células de memória que sofrem expansão clonal em resposta ao encontro com os antígenos específicos (imunidade adquirida). Após o contato subsequente da pele com o mesmo hapteno, as células T específicas interagem com as células apresentadoras do antígeno, liberam várias citocinas e desencadeiam reação inflamatória. A inflamação persiste por vários dias e diminui progressivamente pela regulação fisiológica negativa.

O prurido é o sintoma característico da DCA e as manifestações clínicas são classificadas em agudas (eritema, vesículas, exudação e crostas), subagudas (eritema, pápulas, escamas e crostas) e crônicas (liquenificação) (AZULAY, AZULAY, 1999b).

2.2.2.2 Dermatite de contato por irritante primário

A dermatite de contato por irritante primário (DCIP) é mais comum do que a dermatite de contato alérgica; porém, seus mecanismos são menos conhecidos. É causada por xenobióticos, substâncias capazes de ativar a imunidade inata da pele devido a seus efeitos tóxicos e pró-inflamatórios. Decorre da aplicação única ou repetida destes agentes a um sítio cutâneo idêntico.

O quadro pode ser produzido por agentes físicos ou infecciosos; porém a maior parte dos irritantes primários são substâncias químicas. O grau de penetração da substância através da pele depende da concentração desta e da espessura da camada córnea. O tempo de exposição e a integridade do tegumento também são fatores decisivos na produção da DCIP. Os irritantes podem ser ácidos ou bases fortes e podem provocar lesões pelo contato imediato. Irritantes fracos exigem contato repetido e/ou prolongado para desencadearem a resposta inflamatória. Os diferentes produtos induzem alterações morfológicas distintas. Pode haver necrose de alguns queratinócitos ou reação espongiótica. A clínica das lesões costuma ser mais variada que a da DCA. O curso pode ser iniciado com descamação e/ou eritema e evoluir para ulceração. Para irritantes fortes a reação costuma surgir em horas após o contato, enquanto para os fracos pode durar semanas. As sensações descritas são prurido, dor em fisgada e queimação.

A resposta a uma substância em particular não prediz a reação a outras. Cada reação depende da susceptibilidade específica do indivíduo ao agente etiológico em questão e de fatores endógenos como idade, sexo, raça e ciclo menstrual (NICANDER, 1998).

A fisiopatologia da DCIP não é tão conhecida como a da DCA. Sabe-se que, diferentemente desta, a resposta endógena à presença do patógeno não é específica. A substância irritante lesa os queratinócitos e estes iniciam a produção de citocinas que ativam as células de Langerhans e de Merkel adjacentes e desencadeiam o processo inflamatório (DUARTE *et al.*, 2000). Há, portanto, três processos envolvidos: destruição da barreira da pele, alterações morfológicas epidérmicas e liberação de mediadores (SMITH *et al.*, 2002). Os mediadores apontados são: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), interleucinas (IL) 1a, 2, 6, 8, 10, proteína induzida por interferon-10 (IP-10) e proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) com predominância de CD4+ sobre as células CD8+ (LEVIN, MAIBACH, 2002).

A DCIP é mais comumente causada pela exposição repetida à água, detergentes e solventes. O detergente aniônico *SLS* é a substância utilizada com mais frequência na indução de DCIP experimental. De acordo com WAHLBERG e MAIBACH (1980), o irritante usado experimentalmente deve possuir as seguintes características: não causar toxicidade sistêmica, sensibilização, carcinogênese ou inconveniência cosmética, não possuir pH extremo e ser quimicamente bem definido.

O *SLS* é um emulsificante utilizado em veículos farmacêuticos, cosméticos, pastas de dente e até mesmo comida. Sua ação sobre a tensão superficial também atinge o estrato córneo e corresponde ao potencial irritativo da pele.

O aspecto clínico das lesões agudas por *SLS* é eritema, infiltração e erosão superficial. Vesículas e pústulas existem quando são aplicadas concentrações maiores do irritante. Fissuras e descamação surgem na fase de recuperação e em aplicações repetidas de *SLS* (LEE, MAIBACH, 2004). As alterações histopatológicas também dependem da concentração do agente. Podem ocorrer: espongiose, vacuolização intracelular, degeneração hidrópica das células basais, hiperqueratose, parakeratose e necrose (LEE, MAIBACH, 2006). Na derme há infiltrado inflamatório em vários níveis. Os linfócitos T predominam e as células CD4+ superam as CD8+ em número.

Além da concentração, NICANDER (1998) também atribuiu variações da resposta cutânea à preparação do *SLS*. As cadeias carbônicas podem ser substituídas por

outras maiores. Estas últimas produzem efeito menos irritativo, ainda que sejam aplicadas concentrações iguais à pele (NICANDER, 1998).

CAPÍTULO 3

BIOENGENHARIA CUTÂNEA

3.1 Técnicas subjetivas

A história clínica, a inspeção visual e palpatória são os métodos mais comumente utilizados no diagnóstico das dermatites de contato e na descrição da lesão tecidual. A caracterização da resposta ao irritante é subjetiva e usa escalas arbitrárias que qualificam as principais alterações macroscópicas do tegumento. O observador deve ser treinado a classificar parâmetros como edema, eritema e presença de vesículas e relacioná-los de forma quantitativa em seus diferentes graus.

As escalas visuais normalmente são compostas por três a cinco descritores da lesão. Várias escalas encontram-se disponíveis e muitos grupos de pesquisa utilizam seus próprios critérios de classificação. Para testes utilizando *SLS* a Sociedade Européia de Dermatite de Contato (*European Society of Contact Dermatitis – ESCD*) criou guias apresentando metodologias de aplicação experimental e escalas para caracterização da resposta ao agente (TUPKER *et al.*, 1997) (Tabela 2). O Grupo Internacional Investigador de Dermatites de Contato desenvolveu um sistema com proposta semelhante, descrito na Tabela 3.

Tabela 2 - Sistema simples da *ESCD* para pontuação de reações agudas ao *SLS*. Leitura de 25 a 96 horas após uma exposição única. Adaptado de TUPKER *et al.* (1997).²

Pontuação	Qualificação	Descrição
0	Negativo	Sem reação
½	Duvidoso	Eritema muito fraco ou descamação diminuta
1	Fraco	Eritema fraco, edema leve, descamação leve e/ou aspereza leve
2	Moderado	Grau moderado de: eritema, edema, descamação, aspereza, erosões, vesículas, bolhas, crostas e fissuras
3	Forte	Grau marcante de: eritema, edema, descamação, aspereza, erosões, vesículas, bolhas, crostas e fissuras
4	Muito forte / cáustico	Como o nível 3, com áreas de necrose

Tabela 3 – Leitura dos testes de contato indicada pelo Grupo Internacional Investigador de Dermatites de Contato. Adaptado de TUPKER *et al.* (1997).²

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 (+++)

Apesar da maior parte das escalas descritas em testes de contato com irritantes possuir de quatro a cinco itens, NICANDER *et al.* (1996) constataram que o uso de três qualificadores – (1) eritema leve, (2) eritema e edema leve, (3) eritema, edema e vesículas – proporcionou resolução suficiente para avaliar as reações da pele ao irritante.

3.2 Técnicas de bioengenharia cutânea

Em estágios subclínicos e em casos de lesões não eritematosas não é possível identificar a irritação da pele por métodos subjetivos de inspeção visual e palpatória (GROVE, GROVE, 1989).

² Tradução do autor.

Como alternativa, existem metodologias que utilizam instrumentos biomédicos de forma não invasiva e permitem a análise de propriedades da pele sã e enferma mesmo quando o discernimento humano não é capaz de detectá-las. As técnicas são variadas e avaliam parâmetros físicos diferentes. Quando utilizadas em combinação, os resultados podem ser ainda mais fidedignos (FERREIRA, 2006).

Para SERUP (2001), o planejamento do estudo, o treinamento do pesquisador e o controle das condições que possam interferir nas medidas são os principais fatores preditores do sucesso das pesquisas envolvendo estas técnicas.

A seguir serão descritas as técnicas de bioengenharia mais utilizadas na medição de fenômenos adversos pelo contato com o *SLS* e outros irritantes primários.

3.2.1 Perda de água transepidérmica (*Transepidermal water loss - TEWL*)

A perda de água transepidérmica é definida como a difusão passiva da água através da epiderme, ou seja, “a perda constitutiva de vapor de água da pele na ausência de atividade glandular sudorípara” (PINSON, 1942 *apud* CHILCOTT *et al.*, 2002). Este parâmetro é muito utilizado em estudos *in vivo* para avaliação da função de barreira da pele induzida à irritação experimentalmente.

Apesar de sua heterogeneidade, o estrato córneo tem sido descrito como uma membrana homogênea para a difusão de água e, portanto, obedece à lei de Fick, para a qual dois componentes participam deste processo: a barreira e a força propulsora (ENDO *et al.*, 2007). Estes dois parâmetros relacionam-se permitindo que o fluxo de água caminhe de regiões de alta concentração para as de baixa concentração, em magnitude proporcional ao gradiente de concentração.

Os lipídeos intercelulares do estrato córneo formam uma barreira contra a difusão de água através da epiderme. Quando a pele é danificada, ocorre prejuízo desta função, resultando em maior perda de água (NETZLAFF *et al.*, 2006). De acordo com DI NARDO *et al.* (1996), em aplicações tópicas de *SLS* este índice sofre um aumento característico, que guarda relação com a concentração em uso. Em experimento realizado com solução de *SLS* a 1%, foi observado que o aumento dos índices de perda de água transepidérmica mantém-se por 7 a 9 dias (GLOOR *et al.*, 2004).

Atualmente existem vários instrumentos disponíveis para sua medição, tais como: Tewameter TM 210 (Figura 7), TM 300 e Tewameter Multi Probe Adapter 5 (Courage and Khazaka, Alemanha), Evaporimeter TM EP 1 (ServoMed AB, Suécia),

ServoMed EP-3 Evaporimeter (ServoMed, Suécia), VapoMeter (Delfin Technologies, Finlândia), H4300 (Nikkiso-YSI, Japão), DermaLab TWEL Probe (Cortex Technology, Dinamarca) (FLUHR, *et al.*, 2006) e Acaderm (Menlo Park, EUA) (BRANCO *et al.*, 2005).

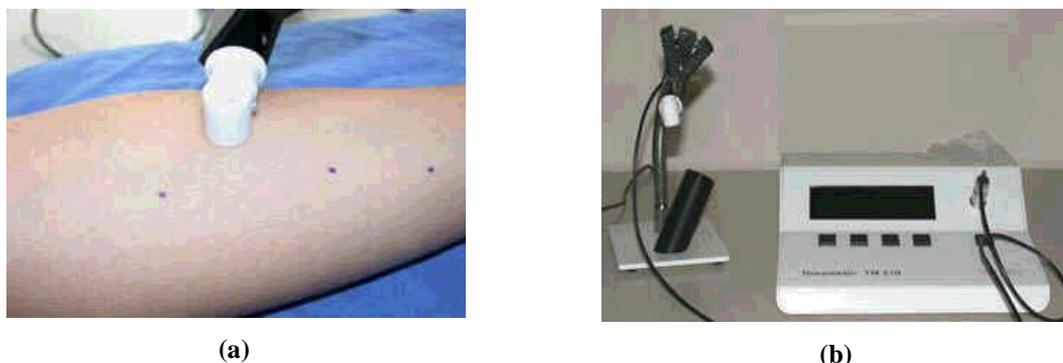


Figura 7 – (a) Medida da perda transepidérmica de água com Tewameter; (b) aspecto geral do equipamento Tewameter TM 210[®]. Extraído de FERREIRA (2006).

Por tratar-se de um fenômeno físico (evaporação) relacionado a um fenômeno fisiológico (transpiração), tanto fatores exógenos como endógenos interferem nesta técnica. A perfusão sanguínea, as flutuações de temperatura corporal, a atividade das glândulas sudoríparas, o metabolismo e outras variações têm influência sobre a perda transepidérmica de água (CHILCOTT *et al.*, 2002). Várias condições devem ser observadas durante a mensuração. Para aumentar a precisão da técnica, deve haver o controle da temperatura e da umidade locais e a estabilidade física e psíquica deve ser assegurada. NICANDER (1998) sugere que o indivíduo descanse por pelo menos quinze minutos antes da medição em ambiente com temperatura entre 20 e 22°C.

Apesar de a técnica ter sido descrita inicialmente como capaz de avaliar a integridade do tecido cutâneo e, como consequência, sua função de barreira, existe um questionamento atual sobre esta afirmação. Em estudos *in vitro*, nos quais as condições externas puderam ser controladas, não foi possível relacionar a perda transepidérmica de água com a permeabilidade da pele (CHILCOTT *et al.*, 2002, NETZLAFF *et al.*, 2006). Estes estudos indicam que o parâmetro não parece ser uma boa ferramenta na medição da função de barreira da pele. De fato, o uso deste índice como base para acessar a permeabilidade cutânea tem sido amplamente questionado, principalmente no caso da pele hidratada (CLONIDINE TRANSDERMAL SYSTEM MEETING, 2003). PROKSCH *et al.* (2008) ressaltam que a perda de água transepidérmica está relacionada

apenas à barreira de dentro para fora. A barreira de fora para dentro, aquela que protege contra os danos por substâncias externas, necessita de estudo pela microscopia ou análises químicas, os quais permitem a avaliação da integridade dos estratos, sua composição lipídica e seu grau de permeabilidade. Além disto, como a perda de água transepidermica também depende da força propulsora, fatores que levem à redução do fluxo sanguíneo, como a aplicação tópica de corticóides (anti-inflamatórios), podem reduzir seus valores sem que isto esteja relacionado à recuperação da função de barreira do tecido.

3.2.2 Corneometria (CM): Capacitância elétrica e condutância

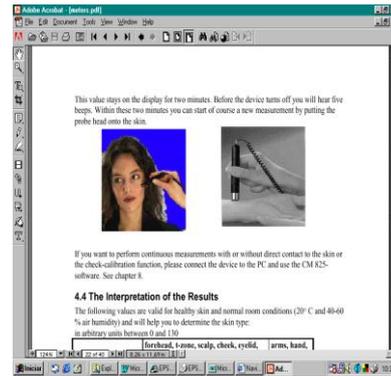
O conteúdo de água no estrato córneo pode estar comprometido em diversas condições, como em estados de desidratação ou quando há perda da capacidade de retenção de água (TAGAMI, 1994). A capacitância elétrica e a condutância podem ser utilizadas na avaliação do conteúdo de água do estrato córneo e na medida de resposta ao irritante, já que solventes orgânicos e surfactantes são capazes de reduzir o estado de hidratação da camada (ENDO *et al.*, 2007).

A medida é realizada em baixas frequências por equipamentos como o Corneometer™ CM820 (Figura 8) e o CM825 (Courage & Khazaka, Alemanha). A sonda possui cerca de 49 mm² de área de contato com a superfície da pele. Ao ser posicionada sobre a mesma, é aplicada uma força constante e o grau de hidratação é definido pela diferença entre os valores das constantes dielétricas da água e do estrato córneo (NICANDER, 1998). O resultado reflete alterações a uma profundidade de 0,1 mm e é expresso em unidades arbitrárias.

Várias condições podem causar influência sobre a medida. Antes da utilização do instrumento recomenda-se que o indivíduo aguarde 20 a 30 minutos em ambiente com temperatura entre 20 e 25°C e umidade relativa entre 40 e 50% (NICANDER, 1998).



(a)



(b)

Figura 8 – (a) Aspecto geral do CorneometerTM CM820; (b) medida de capacitância elétrica de hidratação com o equipamento. Extraído de FERREIRA (2006).

Embora a técnica seja utilizada em muitas pesquisas dermatológicas, sua eficácia é questionada. Como a porção profunda do estrato córneo possui maior capacidade de manter-se hidratada (TAGAMI, 1994), quando o *SLS* é aplicado em baixas concentrações, o estrato córneo sofre desidratação em sua porção superficial, porém as camadas mais profundas não são afetadas. Os valores de capacitância nesta condição são baixos. Isto ocorre devido à proximidade das camadas inferiores do estrato córneo com o vasto conteúdo de água da camada basal. Já em concentrações maiores de *SLS* a barreira mais profunda também é afetada, desencadeando um aumento no transporte de água do estrato basal que excede a evaporação. Neste caso os valores de capacitância apresentados são altos. Há ainda uma faixa de concentrações para as quais não é possível detectar respostas pelo equipamento. Isto ocorre devido ao equilíbrio entre o aumento do transporte de água e a evaporação da superfície. Devido à variabilidade da resposta quanto às concentrações do irritante, a capacitância elétrica de hidratação não parece revelar-se como um bom parâmetro na caracterização da irritação cutânea.

A condutância elétrica também é utilizada para avaliação da hidratação do estrato córneo. Neste caso, o instrumento mais comum é o Skicon-200EX (I.B.S. Inc., Japão).

3.2.3 Fluxometria por Doppler a laser (*Laser Doppler Flowmetry – LDF*)

Na pele exposta ao *SLS* ocorrem alterações hemodinâmicas que se expressam pela perfusão diferenciada dos eritrócitos e aumento do fluxo sanguíneo microvascular

local. A fluxometria por Doppler a laser mede a intensidade da inflamação pela análise do fluxo sanguíneo subpapilar (GLOOR *et al.*, 2004). O movimento das partículas é detectado pela reflexão de luz dos eritrócitos. O conteúdo analisado é composto majoritariamente pelo plexo vascular superficial (arteríolas, capilares e vênulas), porém não abrange os plexos mais profundos da derme.

Há dois tipos de instrumentos utilizados: a sonda e a varredura de imagens. Os modelos encontrados de sonda são constituídos por um laser de baixa potência com uma sonda de fibra ótica, são o BLF 21 (Transonic Systems, EUA), DRT4, Moorlab (Moor Instruments, Inglaterra), Laserflo BPM (Vasamedics, EUA), Oxyflow, Oxylab (Oxford Optronix, Inglaterra), PF4000 e PF5000 (Perimed, Suécia). A detecção é feita em uma única região da pele, cuja dimensão é determinada pelas propriedades ópticas do tecido e pela geometria da sonda (NILSSON *et al.*, 1980). Um feixe de laser com comprimento de onda entre 632 e 785 nm é aplicado sobre a pele formando um foco de luz de cerca de 1 mm². A luz incidente alcança profundidade de 1 a 1,5 mm, sofre espalhamento e uma porção refletida é coletada pelas fibras óticas. A profundidade depende do comprimento de onda, da pigmentação da pele e do tipo de sonda (CHOI, BENNETT, 2003).

No modelo de varredura, cujos principais representantes são o Lisca PIMII (Lisca Development, Linkoping, Suécia) e Moor LDI-2 (Moor Instruments, Axminster, Inglaterra), a função das fibras óticas é substituída por um sistema de espelhos e lentes. O feixe do laser é direcionado à pele pelo sistema de espelhos e move-se discretamente enquanto o espalhamento de luz é captado pelo detector. O sinal formado é proporcional ao produto da velocidade e da concentração do eritrócito. As medidas são armazenadas na memória do computador conforme o feixe segue adiante. O resultado destas medidas é expresso em unidades arbitrárias e revelado na tela como uma imagem de perfusão colorida.

Os valores de perfusão relativa representam o fluxo sanguíneo de capilares e vasos de pequeno calibre. Devido às variações vasculares locais, o número de medidas é determinado pela precisão desejada (LINE *et al.*, 1992). Além disto, a microvascularização cutânea pode ser afetada por fatores fisiológicos como sexo, idade, raça, sítio anatômico da pele, variações circadianas, ciclo menstrual, postura, atividade física, atividade mental e temperatura. As variações intra-individuais perfazem, ainda, um coeficiente de cerca de 50% em respostas irritativas (AGNER, SERUP, 1990 *apud* EUN, 1995).

ARAMAKI *et al.* (2001) compararam os índices de fluxometria por Doppler a laser com a perda transepidérmica de água e evidenciaram o aumento dos primeiros apenas com concentrações mais elevadas de *SLS*. Eles atribuíram este fenômeno à sequência de eventos na pele irritada: danos à barreira epidérmica, pela alteração dos lipídeos e proteínas do estrato córneo, são anteriores à resposta inflamatória. Porém, quando a barreira é danificada de forma severa por concentrações mais elevadas de *SLS*, a resposta inflamatória é intensa, e só então é possível constatar as mudanças pela fluxometria. Em seu estudo, concluíram que a fluxometria por Doppler a laser é um método válido para concentrações de *SLS* iguais ou superiores a 0,5% e tempo de aplicação maior ou igual a seis horas.

3.2.4 Método colorimétrico

O olho humano e o cérebro possuem um limite para a detecção de cores com comprimentos de onda entre 400 e 800 nm, com sensibilidade máxima entre 500 e 600 nm. Em estados inflamatórios a avaliação visual pode ser comprometida pela descamação e pela pigmentação (FULLERTON *et al.*, 1996). Por outro lado, existem instrumentos e princípios colorimétricos que permitem expressar um amplo espectro de cores e uma medida com maior exatidão.

Há dois princípios de medição da cor da pele: espectrofotometria e análise por estímulo triplo. A primeira utiliza instrumentos caros e pouco práticos para o uso rotineiro (FULLERTON *et al.*, 1996). A segunda conta com dois tipos de instrumentos: o espectrofotômetro de banda estreita (DermaSpectrometer, CórteX Technology, Dinamarca) e o colorímetro por estímulo triplo (Chroma Meter CR 200 e CR 300, Japão).

Este último mede a reflexão, e é o mais usado na medição de resposta a irritantes. Uma lâmpada de xênon emite uma luz branca intensa que abrange todo o espectro visível. A luz refletida é quantificada por três foto células sensíveis e seus filtros correspondentes. A medida é realizada a partir das três cores primárias: azul (450 nm), verde (550 nm) e vermelho (610 nm). O valor referente ao vermelho é uma medida de eritema. Com o aumento do eritema, há maior absorção do comprimento de onda da cor verde e, conseqüentemente, menor reflexão da mesma.

O espectrofotômetro de banda estreita funciona como um fotômetro de reflexão com um diodo de emissão de luzes verde e vermelha e um foto diodo azul que detecta a

luz que retorna da pele. O instrumento expressa o eritema como um índice entre hemoglobina e melanina. Ele capta a intensidade das luzes vermelha (I_{verm}) e verde (I_{verde}) refletidas, as quais definem o índice de eritema (E), onde

$$E = 100 \times \log \left(\frac{I_{\text{verm}}}{I_{\text{verde}}} \right) \quad (1)$$

O índice de melanina (M), calculado a partir da luz refletida, é usado para avaliar a densidade óptica da pele:

$$M = 100 \times \log \left(\frac{1}{I_{\text{verde}}} \right) \quad (2)$$

A medida é influenciada por variáveis instrumentais, ambientais e individuais. A óptica da pele depende dos cromóforos, melanina e hemoglobina, da interface com o estrato córneo (ângulo de iluminação, por exemplo), do espalhamento por estruturas mais profundas na derme, do comprimento de onda incidente e de condições fisiológicas (FULLERTON *et al.*, 1996). As variáveis individuais são: idade, sexo, raça, sítio anatômico, doenças cutâneas, variações inter e intra-individuais, variações diurnas, atividades física e mental, alimentação, uso de álcool ou drogas, ciclo menstrual, menopausa e posição ortostática (FULLERTON *et al.*, 1996). As correntes de convecção do ar, a temperatura local, a luz ambiente e a umidade devem ser controladas. Segundo GLOOR *et al.* (2004), as medidas devem ser realizadas nas condições padrão, com tempo de 30 minutos para adaptação.

3.2.5 Outras técnicas

Existem ainda outras técnicas capazes de avaliar as propriedades físicas e químicas da pele. O ultrassom de alta frequência (de 20 a 150 MHz) pode ser utilizado na avaliação estrutural da pele, como medida do espessamento da pele e do edema. O grau de atenuação da ecogenicidade da epiderme varia de acordo com a concentração de *SLS* e a resposta mostra-se dose-dependente. As vantagens da técnica de ultrassom são o estudo da própria estrutura do órgão e a menor interferência de condições ambientais, físicas ou psíquicas (SERUP, 2001). Em contrapartida, é necessário um treinamento técnico especializado, o que pode introduzir um erro potencial.

Apesar de ter sido descrita uma boa correlação entre os dados ecográficos e a perda transepidérmica de água, SEIDENARI e PELLACANI (2005) concluíram que as alterações morfológicas detectadas pelo ultra-som parecem estar mais relacionadas com o fluxo de água transepidermal do que o próprio conteúdo de água no estrato córneo. Já quando o dano à barreira cutânea é pouco pronunciado, o uso do ultra-som parece ser mais adequado que técnicas como perda transepidérmica de água e fluxometria por Doppler a laser (SERUP, 2001). Isto se deve ao fato de que na dermatite de contato o comprometimento da barreira cutânea é o primeiro mecanismo de agressão. Em seguida ocorrem a sensibilização, a inflamação e os distúrbios constitutivos, que incluem a mudança na composição lipídica (PROKSCH *et al.*, 2006).

Em condições fisiológicas os lipídeos do estrato córneo caracterizam-se por quantidades semelhantes de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. Irritantes contendo detergentes ou solventes danificam a barreira cutânea, pois removem os lipídeos do estrato córneo ou alteram sua composição. Uma vez que corneócitos são circundados por lipídeos, os quais formam as regiões de continuidade do estrato córneo, os próximos eventos são marcados pela invasão dos espaços ocupados anteriormente pelos lipídeos. Logo, suceder-se-ão a penetração do irritante nas camadas de células vivas da epiderme, o dano das membranas dos queratinócitos, a mudança molecular dos lipídeos, e, finalmente, a inflamação.

A medida quantitativa do conteúdo superficial de lipídeos pode ser obtida pela sebumetria. O instrumento utilizado é o Sebumeter SM 810 (Courage & Khazaka, Alemanha). Este equipamento é constituído por um fotômetro que mede o nível de transmissão de luz de uma folha de plástico com uma camada de sebo umedecido. A sonda é comprimida contra a pele por trinta segundos em pressão constante de $9,4 \text{ N/cm}^2$. O instrumento mede a variação de luz transmitida através da folha. A variação é proporcional à absorção do conteúdo lipídico. O resultado, expresso em microgramas por centímetro, reflete a quantidade total de lipídeos na superfície da pele (PROKSCH *et al.*, 2006).

Assim como o conteúdo de lipídeos, o pH cutâneo também pode ser utilizado como medida do grau de acometimento da pele. O pH ácido do estrato córneo segue um gradiente ao longo da camada, o que parece ser importante no controle das reações enzimáticas, na renovação celular, na defesa contra microorganismos e na formação da barreira semipermeável da pele (PARRA *et al.*, 2003, SCHMID-WENDTNER, KORTING, 2006). Diversas condições afetam o pH cutâneo: hidratação, suor, sebo,

sítio anatômico, predisposição genética, idade, contato com substâncias químicas, medicações tópicas e oclusão por roupas. As mudanças de pH da pele têm sido descritas na patogênese de diversas doenças, dentre elas a dermatite de contato por irritante primário.

A medida de pH superficial cutâneo é utilizada para avaliar as mudanças de pH durante a exposição a produtos químicos e o estado da pele nos processos patológicos agudos ou crônicos (COURAGE & KHAZAKA, 1998 *apud* EHLERS *et al.*, 2001). O procedimento utilizado na atualidade é a medição potenciométrica do pH. Os impulsos elétricos são medidos por um eletrodo e a diferença de potencial é medida por um potenciômetro (pH900, Courage & Khazaka e pH meter 1140, Mettler Toledo). Segundo PARRA *et al.* (2003), os valores de pH registrados devem ser interpretados com cautela, pois os íons hidrogênio não estão em solução pura em membranas semi-hidrofóbicas como o estrato córneo. O que se mede de fato na superfície da pele é um pH aparente, devido ao material extraído da difusão do estrato córneo na água aplicada à pele (PARRA *et al.*, 2003).

Como a capacidade de tamponamento da pele é elevada, a medida de pH deve ser a mais precisa possível. Além disto, variações quanto à idade, sexo, tipo de pele, sítio anatômico e horário da medição, condições ambientais e higiene local devem ser observados antes do procedimento. Mesmo as pequenas variações de pH podem significar mudanças estruturais a nível molecular (PARRA *et al.*, 2003).

3.2.6 Técnicas de bioengenharia cutânea: revisão de literatura

Para o melhor entendimento sobre os estudos realizados para detecção de irritação cutânea, resultados com o uso das técnicas supracitadas serão descritos neste tópico, de modo a corroborar com a interpretação fisiológica do fenômeno.

Gloor e colaboradores realizaram em 2004 um experimento de sensibilização cutânea com *SLS* a 1%. Os resultados mostram algumas peculiaridades de cada técnica utilizada, mas, sobretudo, o retorno aos valores iniciais por volta do nono dia.

Devido à ação direta do irritante sobre a epiderme, a qual provoca perda de água por evaporação, existe uma desidratação inicial importante (PROKSCH *et al.*, 2008). A perda de água transepidérmica é a primeira a se alterar, o que também é observado pela corneometria, que mede a hidratação da pele. Dados obtidos por GLOOR *et al.* (2004) com estas duas técnicas, quando uma concentração de 1% de *SLS* foi utilizada num

estudo longitudinal, são mostrados na Figura 9 e na Figura 10. Houve um aumento expressivo da retenção e transporte hídricos em torno de 24 horas após exposição, seguido do retorno aos níveis iniciais.

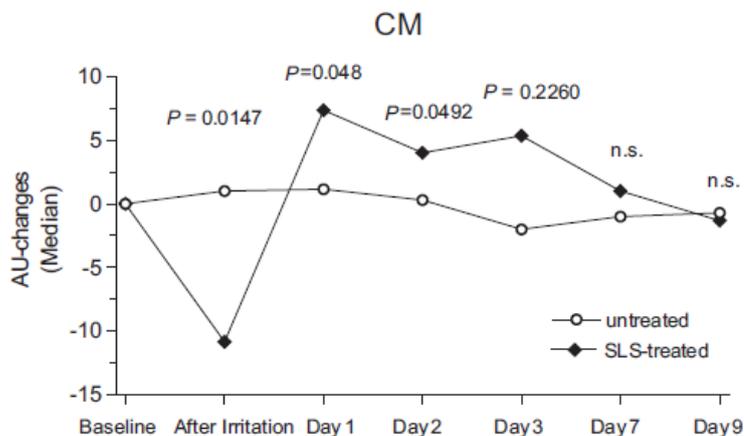


Figura 9 – Valores de corneometria após irritação da pele com SLS 1%. Extraído de GLOOR *et al.* (2004).

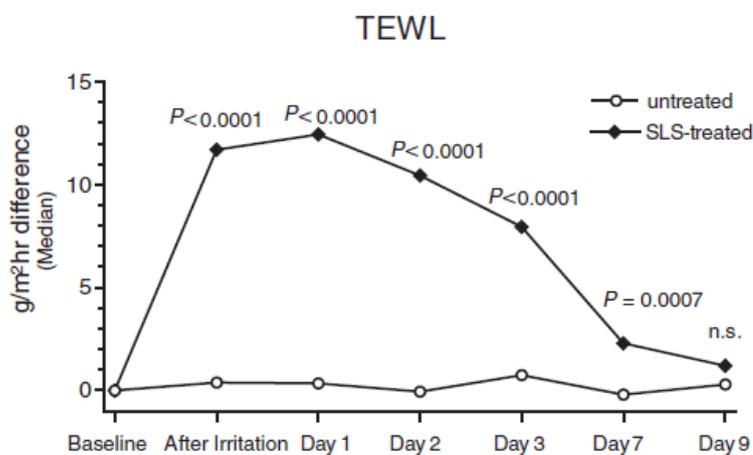


Figura 10 – Valores de perda de água transepidermica após irritação da pele com SLS 1%. Extraído de GLOOR *et al.* (2004).

KUZMINA *et al.* (2003) também obtiveram dados de perda transepidermica de água relacionados com o efeito do SLS. Uma aplicação única do irritante a 2% no dia 1 foi acompanhada por mais 14 dias e notou-se uma elevação máxima da perda de água no terceiro dia (72 horas após a remoção do agente) seguida de uma queda progressiva (Figura 11). Os dados obtidos pelos grupos de GLOOR *et al.* (2004) e KUZMINA *et al.* (2003) são compatíveis com o aumento da hidratação pelo influxo de água descrito anteriormente.

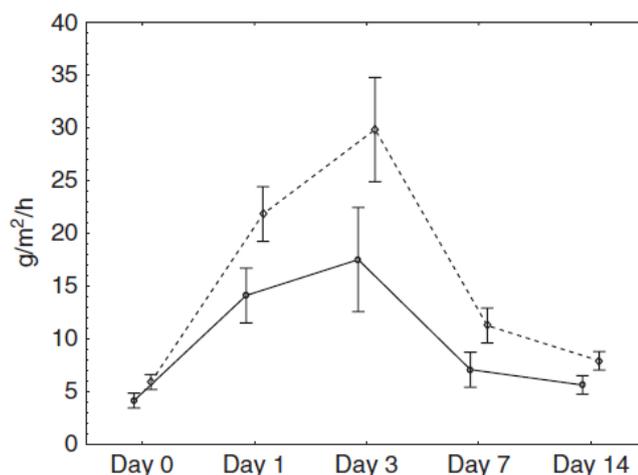


Figura 11 – Valores de perda de água transepidermica após irritação da pele com SLS 1%. As curvas tracejada e contínua representam populações de estudo de duas regiões diferentes da Suécia. Extraído de KUZMINA *et al.* (2003).

O próximo evento após a desidratação cutânea inicial é a vasodilatação dos vasos da derme e o extravasamento de líquido contendo proteínas e células. Duas técnicas se propõem a identificar o aumento do fluxo sanguíneo vascular da derme: a fluxometria por Doppler a laser (de maneira direta), e a colorimetria (de forma indireta). GLOOR *et al.* (2004) também efetuaram medidas por estas técnicas ao longo dos dias subsequentes à exposição única ao SLS a 1% (Figura 12 e Figura 13). Os dados obtidos apontam para um aumento do fluxo sanguíneo, cujo pico é atingido em até 24 horas após a remoção do irritante. Isto é compatível com as evidências de acúmulo de conteúdo intravascular predominante na epiderme inferior (FARTASCH, 1998), já que o aumento verificado pela *LDF* no dia 1 (24 horas após a remoção do irritante, o que corresponde ao dia 2 do presente estudo) não é acompanhado por aumento proporcional na perda de água transepidermica. Ou seja, a perda por evaporação é menor do que o extravasamento de líquido intravascular para a epiderme.

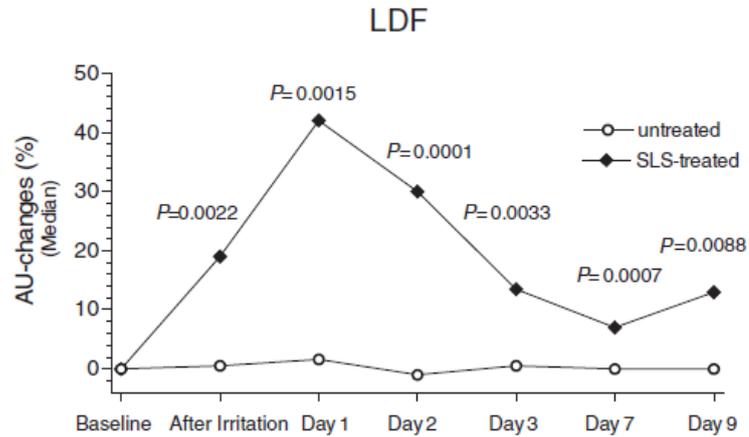


Figura 12 – Análise da irritação da pele após aplicação de SLS 1% por fluxometria por Doppler a laser. Extraído de GLOOR *et al.* (2004).

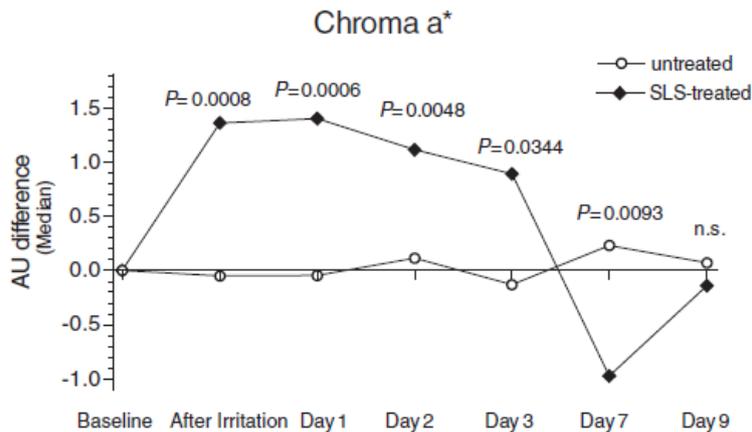


Figura 13 – Valores de colorimetria após irritação da pele com SLS 1%. Extraído de GLOOR *et al.* (2004).

3.2.7 Bioimpedância

A espectroscopia de impedância elétrica aplica-se a medidas de fenômenos eletroquímicos em diversos materiais e na pesquisa de condições clínicas em vários órgãos. As medidas são realizadas dentro da faixa de frequência de interesse, a qual varia, em geral, de 100 Hz a 10 MHz (BROWN, 2003). Dois ou mais eletrodos são utilizados para aplicar um sinal de corrente ou de tensão ao material. O sinal de resposta é processado por técnicas específicas de acordo com o objetivo do estudo.

O termo bioimpedância refere-se ao estudo da impedância elétrica de materiais biológicos. É a propriedade elétrica passiva do tecido de se opor a um fluxo de corrente (GRIMNES, MARTINSEN, 2008). Suas medidas guardam relação com os processos

eletroquímicos fisiológicos e variam quanto ao grupo celular e à organização destes para formar o tecido.

A bioimpedância é estimada pela relação entre a diferença de potencial, medida entre dois eletrodos, e a corrente elétrica que percorre o meio em estudo. A corrente elétrica sempre segue o caminho de menor oposição e, portanto, a impedância do tecido biológico depende de vários fatores: estrutura anatômica, quantidade de água, número de camadas do estrato córneo, distância entre os eletrodos, localização do campo elétrico (BOLFE *et al.*, 2007). Segundo PLIQUETT e PLIQUETT (1996), os valores de impedância dependem até mesmo das condições de circulação sanguínea e da densidade dos ductos sudoríparos. Estes, juntamente com os folículos pilosos, dominam os caminhos da corrente elétrica em baixas frequências.

Quando as células sofrem alterações químicas ou estruturais, ocorrem mudanças significativas em suas propriedades elétricas (GRIMMES e MARTINSEN, 2000). Cada tipo de reação tecidual produz um padrão característico de impedância (NYRÉN *et al.*, 1999). Para determinados valores de frequência é possível que os valores de impedância reflitam alterações no espaço extracelular como o edema e permitam estimá-lo de forma quantitativa (NICANDER *et al.*, 1995). Portanto, as medidas de impedância elétrica podem ser usadas para estimar o grau de mudanças estruturais no tecido biológico. Devido a sua capacidade de revelar tais mudanças, mesmo quando não é possível detectá-las visualmente (NICANDER *et al.*, 1997), as técnicas de bioimpedância possuem grande potencial como ferramenta de suporte diagnóstico (NICANDER, OLLMAR, 1999).

Por tratar-se da metodologia a ser utilizada no presente trabalho, sua abordagem será realizada de forma detalhada a seguir.

3.3 Impedância elétrica

3.3.1 Conceitos

Antes de iniciarmos a discussão sobre a bioimpedância e sua abordagem no âmbito do diagnóstico clínico, serão destacados alguns dos conceitos considerados relevantes para o estudo das propriedades elétricas do tecido cutâneo (GRIMNES, MARTINSEN, 2008).

A impedância elétrica (Z) refere-se à propriedade de um material de opor-se à passagem de corrente elétrica. A impedância segue uma relação algébrica entre a tensão e a corrente, conforme a lei de Ohm:

$$u = Z \cdot i, \quad (3)$$

onde u é a tensão (volts, V), Z é a impedância (ohms, Ω) e i é a corrente (ampères, A). Note que as grandezas presentes na Equação (3) são grandezas genericamente complexas, ou seja, possuem módulo e fase.

Quando a corrente incide sobre sistemas constituídos unicamente por componentes resistivos, a impedância, determinada pela relação entre a tensão e a corrente, que, por sua vez, será igual à resistência:

$$Z = \frac{u}{i} = R \quad (4)$$

A presença de elementos capacitivos, os quais armazenam carga elétrica quando submetidos a uma diferença de potencial, no entanto, atribui novas características ao circuito. Um elemento capacitivo também exerce um tipo de oposição à passagem da corrente. Esta oposição é dita reatância (X_c).

A relação matemática entre a corrente e a tensão no caso dos capacitores é $i = C \cdot \frac{du}{dt}$, e admitindo-se o uso da propriedade de Laplace em que $s = \frac{d}{dt}$, temos que

$I(s) = s \cdot C \cdot U(s)$ e $U(s) = \frac{1}{sC} \cdot I(s)$. Portanto, a reatância capacitiva (X_c) será

representada no domínio de Laplace como $\frac{1}{sC}$. Ademais, para regime senoidal

permanente, assumindo-se a relação $s = j\omega$, onde $j = \sqrt{-1}$ (unidade imaginária), temos

que $X_c = \frac{1}{j\omega C}$.

Em X_c a dependência quanto à frequência (ω) implica que, nos circuitos com capacitores, a impedância se descreve de forma diferenciada para cada valor de frequência. Outra observação importante é que para um circuito constituído tanto por componentes capacitivos como resistivos, afora os regimes permanentes senoidais, a

relação entre tensão e corrente não poderá ser representada como um escalar, mas como um número complexo. A resistência (R) e a reatância capacitiva (X_c) contribuirão para as partes real (Re) e imaginária (Im) de Z distintamente em cada circuito:

$$Z = \text{Re}(Z) + \text{Im}(Z) = R - jX_c \quad (5)$$

Em coordenadas cartesianas, a corrente e a tensão serão representadas como vetores distanciados um ângulo θ , girando a um ângulo de fase a uma velocidade angular ω . Ao ângulo formado entre estas partes dá-se o nome de ângulo de fase e à representação vetorial atribui-se o termo fasores ou rotação vetorial (Figura 14).

Em um sistema puramente capacitivo, a corrente torna-se adiantada com relação à tensão em $\pi/2$ radianos. Logo, reatância capacitiva descreve a parcela da impedância capaz de defasar tensão e corrente em 90° .

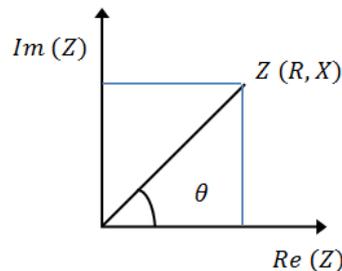


Figura 14 – Representação da impedância no espaço dos números complexos. Z : impedância. $\text{Re}(Z)$: componente horizontal (parte real). $\text{Im}(Z)$: componente vertical (parte imaginária). θ : ângulo de fase.

A condução de eletricidade também se aplica aos materiais biológicos (WEBSTER, 2000). Eles possuem tanto propriedades capacitivas como resistivas e, portanto, exibem um comportamento dependente da frequência. Isto significa que, a nível molecular e celular, os componentes do tecido (membrana celular, líquidos intra e extracelular e outros) contribuem para a impedância de forma variada nas diferentes frequências.

Um tecido biológico pode apresentar-se tanto como um condutor como um dielétrico (isolante seco capaz de armazenar energia elétrica). O primeiro caso aplica-se às soluções eletrolíticas, as quais permitem a condução de corrente pela atividade iônica. Quando se trata de estruturas moleculares, no entanto, o fenômeno sucedido à

passagem de corrente é o da polarização, um comportamento típico do material dielétrico. A polarização pode ser descrita como um distúrbio de distribuição de cargas em uma região devido à presença de energia externa ou interna (GRIMNES, MARTINSEN, 2008, FERREIRA, 2006). Como todo átomo exerce atração sobre os elétrons em uma ligação química, ocorre nas moléculas a formação de cargas parciais positivas e negativas que se mantêm separadas por uma determinada distância. O átomo com maior eletronegatividade (capacidade de atrair elétrons) torna-se mais negativo, enquanto os demais átomos da ligação tornam-se mais positivos. A esta formação de cargas parciais chama-se dipolo permanente. Na medida em que se aplica um degrau de tensão ou campo elétrico, tais cargas orientam-se pelo movimento rotacional da molécula e o material polariza-se.

O tecido biológico não se qualifica unicamente como seco ou úmido, condutor ou não condutor, mas é possível admitir que há nele ambas as propriedades e muitos outros conceitos estão relacionados. Por ora, sabe-se que a pele, apesar de abranger várias propriedades elétricas, encontra o comportamento dielétrico como o principal descritor do estrato córneo.

Após ter sido aplicado um degrau de tensão ou um campo elétrico, o material dielétrico dispõe de um determinado tempo para que as moléculas dipolares se orientem e atinjam um novo equilíbrio (DEBYE, 1929). Ao tempo necessário para a estabilização das cargas dá-se o nome de tempo de relaxação. Este conceito está ligado ao domínio do tempo. No domínio da frequência o fenômeno correlato chama-se dispersão. Como os materiais biológicos possuem uma distribuição assimétrica dos tempos de relaxação e já que o conceito de dispersão pode ser empregado em vários modelos, este último é considerado de maior abrangência e, por isto, mais utilizado (GRIMNES, MARTINSEN, 2008).

SCHWAN (1957) descreveu três dispersões principais em tecidos vivos: α , β e γ , que correspondem à divisão em frequências da relaxação e explicam o comportamento elétrico dos biomateriais (Figura 15). A distinção destes grupos ocorre por efeitos eletrocinéticos, composição das membranas celulares, organelas intracelulares e outros (GRIMNES, MARTINSEN, 2000). A dispersão α está relacionada em maior parte com processos de difusão de íons, densidade iônica e polarização em torno das células; a dispersão β reflete as propriedades dielétricas das membranas, suas interações com os eletrólitos intra e extracelulares e as mudanças estruturais; e a dispersão γ tem relação com a relaxação de pequenas moléculas como a

água, sais e cadeias curtas de aminoácidos (SCHWAN, 1957). As dispersões α e β aparecem entre 10 Hz e dezenas de MHz, enquanto estudos entre 100 Hz e 10 MHz abrangem a dispersão β e detectam alterações morfológicas como o edema (NICANDER, 1998). Como o degrau de tensão ideal possui todas as frequências, uma das formas de descrever o fenômeno de dispersão é pela análise do sinal de resposta ao degrau (GRIMNES, MARTINSEN, 2008).

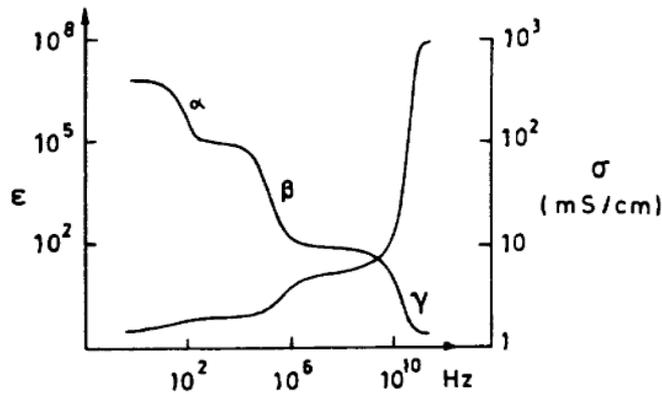


Figura 15 – Espectro de impedância nos tecidos. Comportamento decrescente da constante dielétrica (ϵ) e crescente da condutividade (σ) em função da frequência. Extraído de SCHWAN (1957).

Ao *permitir* a polarização e o armazenamento de energia elétrica, o dielétrico exprime um conceito chamado permissividade (em inglês, *permittivity*). O fenômeno de dispersão expressa a permissividade em função da frequência. A permissividade dielétrica (ϵ^*) depende da frequência, é, portanto, uma grandeza complexa:

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'' = \frac{\epsilon_0}{1 + j\omega\tau} \quad (6)$$

O símbolo ϵ^* , também chamado de constante dielétrica, denota seu caráter complexo; ϵ' é a parte real da permissividade complexa, chamada permissividade relativa; ϵ'' corresponde à parte imaginária, conhecido como fator de perdas; ϵ_0 é o valor da permissividade na frequência zero, j é a unidade imaginária ($j = \sqrt{-1}$); ω é a frequência angular ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$); τ é o tempo médio de relaxação e corresponde a uma frequência angular característica ($\omega_c = 1 / \tau$);

A expressão matemática (6) advém de um modelo para o comportamento de relaxação dielétrica, cuja técnica foi desenvolvida por DEBYE (1929). Ele utilizou um

circuito RC paralelo para modelar a perda dielétrica de dipolos de rotação livre em um meio viscoso (Figura 16). Com isto, incorporou o mecanismo de relaxação ao capacitor ideal.

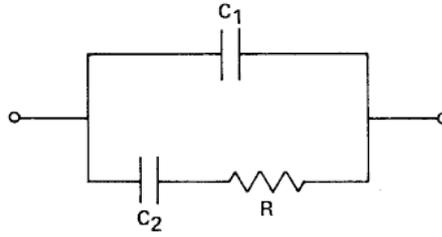


Figura 16 – Circuito equivalente de Debye. Extraído de BARSOUKOV e MACDONALD (2005).

Uma representação comum para as partes real e imaginária da permissividade dielétrica inclui os valores de permissividade de acordo com a frequência estática (zero), ϵ_0 , e frequências muito elevadas ϵ_∞ :

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'' = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_0 - \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau}, \quad (7)$$

a qual pode ser reescrita como:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{(\epsilon_0 - \epsilon_\infty)(1 - j\omega\tau)}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (8)$$

Desta, são extraídas as expressões individuais de ϵ' e ϵ'' :

$$\epsilon' = \epsilon_\infty + \frac{(\epsilon_0 - \epsilon_\infty)}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (9)$$

$$\epsilon'' = \frac{(\epsilon_0 - \epsilon_\infty)\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (10)$$

Desenvolvendo estas expressões chega-se a uma equação correspondente à do círculo:

$$\left[\varepsilon' - \left(\frac{\varepsilon_0 + \varepsilon_\infty}{2} \right)^2 \right] + \varepsilon''^2 = \left(\frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{2} \right)^2 \quad (11)$$

Observa-se que, à luz da equação geral para um círculo de centro (a, b) (Equação (12)), o valor de b na Equação (11) é igual a zero e, portanto, o centro estará localizado sobre o eixo das abscissas.

$$(x - a)^2 + (y - b)^2 = r^2 \quad (12)$$

O gráfico de ε' versus ε'' descreve um semicírculo cuja frequência vai de infinito a zero no sentido anti-horário. Geralmente plotam-se os valores normalizados: $\varepsilon''/(\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty)$ versus $(\varepsilon' - \varepsilon)/(\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty)$, de acordo com as equações (9) e (10) (Figura 17).

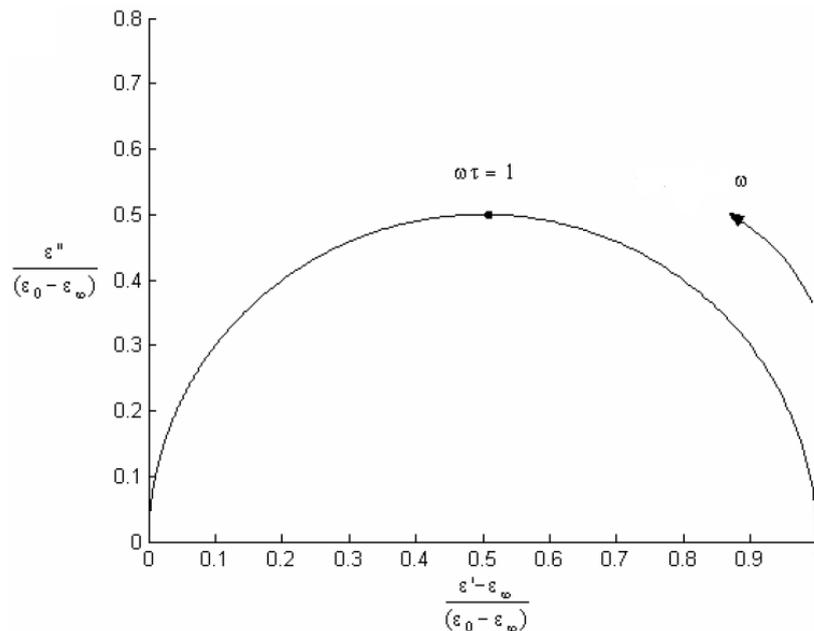


Figura 17 – Gráfico dos valores normalizados de ε' versus ε'' . A seta indica a direção de frequência crescente. Adaptado de MAGIN (2006).

A teoria da perda dielétrica de Debye é capaz de descrever o comportamento da frequência de materiais como a água e alcoois simples; no entanto, aplica-se a um número limitado de dielétricos.

Em 1941, os irmãos Cole apresentaram uma nova equação dielétrica para a permissividade. Eles constataram que os dados experimentais de dielétricos levavam a

círculos com centros deprimidos e desenvolveram uma equação empírica com base naquela elaborada por DEBYE (1929) para aumentar a correspondência entre as medidas dielétricas e a teoria. A equação dielétrica de Cole-Cole é análoga à de DEBYE (1929); eleva-se, contudo, o termo $(j\omega\tau)$ à potência $(1-\alpha)$ (Equação (13)).

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (13)$$

O expoente α , cujo valor varia de 0 a 1, é um parâmetro relacionado ao grau de depressão do semicírculo. Quanto menor o valor de α , maior a depressão do semicírculo no eixo das abscissas e maior o efeito de dispersão dielétrica (Figura 18). COLE (1940) interpretou α como uma medida de interações moleculares. O valor de α igual a 1 significa ausência de interação molecular (capacitor ideal). Em medidas experimentais da pele, o valor de α encontra-se normalmente entre 0,5 e 1,0 (KONTTURI *et al.*, 1993).

No modelo de circuito de Cole-Cole (1941) o resistor no modelo de DEBYE (1929) foi substituído por um fractor, que é um dispositivo capaz de exibir uma relação de ordem não inteira entre a impedância e a frequência (KULKARNI, 2005), cujo significado em eletroquímica se expressa por um elemento de fase constante (*constant phase element, CPE*). O objetivo é representar uma impedância dependente da frequência (Figura 19). A impedância do fractor é definida como:

$$Z(j\omega) = \frac{k}{(j\omega)^\alpha} , \quad (14)$$

onde k é uma constante.

O valor de α varia conforme as propriedades que mais se configuram com os elementos de um circuito. O fractor pode adquirir características moderadas de um capacitor ($\alpha = +1$), resistor ($\alpha = 0$) ou de um indutor ($\alpha = -1$), conforme os valores que assume entre -1 e 1. Distingue-se dos demais elementos pelo fato de seu ângulo de fase permanece constante a despeito de mudanças na frequência, variando apenas o valor de α . De fato, a dependência quanto à frequência pode ser aproximada por uma resposta caracterizada por um ângulo de fase constante (GRIMNES, MARTINSEN, 2008). A proposta de utilização deste elemento teve como objetivo a expressão de

achados experimentais (COLE, COLE, 1941). Não há, no entanto, um significado convencional para o *CPE*, ele é incompatível com os componentes de um circuito e não é possível vislumbrá-lo fisicamente. Ele participa da equação analítica do modelo permitindo que o arco produzido tenha o centro deprimido, como ocorre nos materiais dielétricos. Este gráfico é conhecido como diagrama de Wessel, diagrama de Cole ou gráfico de Nyquist, é diferenciado para cada material biológico (Figura 18).

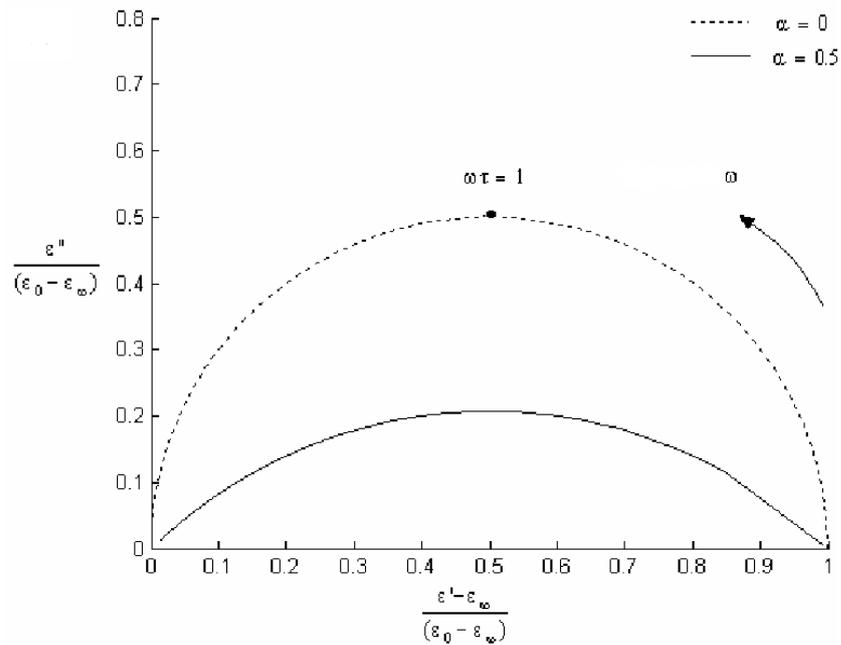


Figura 18 – Gráfico dos valores normalizados de ϵ' versus ϵ'' de Debye (curva tracejada, $\alpha = 0$) e de Cole-Cole (curva contínua, $\alpha = 0,5$). A seta indica a direção de frequência crescente. Adaptado de MAGIN (2006).

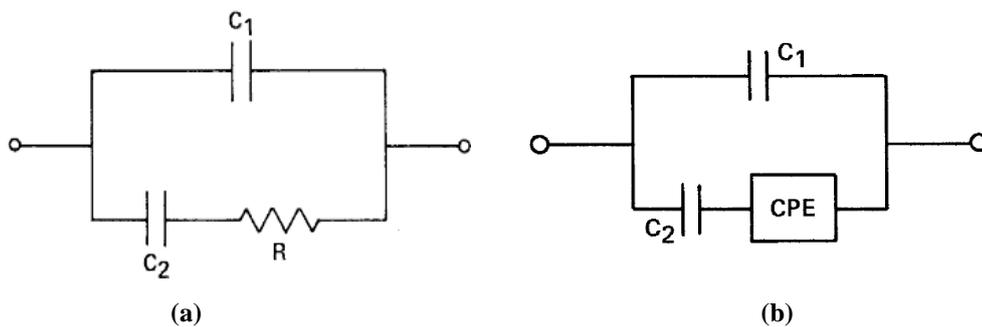


Figura 19 – (a) Circuito de Debye com elementos ideais; (b) Circuito de Cole-Cole com o *CPE* substituindo o resistor. Adaptado de BARSOUKOV e MACDONALD (2005).

Na pele, em particular, cujas camadas e componentes celulares se apresentam de forma complexa e amplamente heterogênea, a contribuição sobre a impedância se dá de

forma muito variada. Os dados experimentais da pesquisa elétrica do tecido cutâneo ajustam-se melhor aos modelos com *CPE* (GRIMNES, MARTINSEN, 2005).

3.3.2 Modelos

Para que sejam atribuídos significados físicos aos parâmetros de impedância, é necessária a descrição de modelos de circuitos equivalentes às medidas bioelétricas. Os modelos consistem na representação do sistema biológico por um circuito elétrico composto por elementos resistivos e capacitivos dispostos em série ou em paralelo. A arquitetura é guiada pelo objetivo do modelo, o qual pode buscar a descrição do comportamento elétrico geral do tecido ou vincular-se às características das estruturas que o compõem.

De acordo com GRIMNES e MARTINSEN (2000), os modelos podem seguir três fundamentos. No primeiro, há distinção completa entre as estruturas microanatômicas. As membranas lipídicas são representadas por capacitores, os eletrólitos por resistores, as membranas semipermeáveis por fontes de tensão. No segundo, apenas os elementos com maior contribuição às propriedades elétricas do tecido são caracterizados. No terceiro, o circuito elétrico equivale a um conjunto único e corresponde ao comportamento elétrico do tecido, sem distinção microanatômica.

A Figura 20 representa o modelo desenvolvido por TREGGAR (1966), o qual descreve estruturalmente as diversas camadas da pele. Os capacitores representam as membranas celulares colapsadas dos corneócitos e o líquido intracelular, cuja resistência é desprezível. Os resistores representam a condutância intercelular, que diminui assim como a hidratação do estrato córneo das regiões mais profundas até as mais superficiais (GRIMNES, MARTINSEN, 2000). A maior parte dos modelos já desenvolvidos para a pele, no entanto, não se compromete com a descrição anatômica detalhada, mas busca, sobretudo, a equivalência com o comportamento elétrico do tecido.

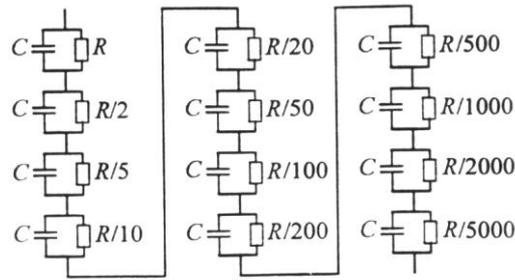


Figura 20 – Modelo desenvolvido por TREGGAR (1966). Extraído de FERREIRA (2006).

Na criação do modelo, uma das maiores expectativas envolvidas é a de que este alcance a dinâmica do sistema em estudo. Particularmente, quando o objetivo se restringe a fenômenos localizados em uma determinada camada, a demanda de correlações explícitas entre todos os componentes do tecido e do circuito, além de utópica, torna-se desnecessária. Um modelo que se dirija a alterações do estrato córneo, por exemplo, pode ser ainda mais efetivo do que aquele que desmembra as estruturas e interações moleculares de camadas mais densas. No entanto, a despeito dos componentes inseridos no circuito elétrico de escolha, é importante que ele dê suporte à explicação sobre os fenômenos biológicos do tecido, de forma que variações químicas e estruturais possam refletir uma mudança correlata nos parâmetros dos componentes elétricos. O desafio em questão reside em estimar mudanças numéricas para os elementos do circuito previamente às alterações morfofisiológicas. Isto garante a interpretabilidade do modelo.

3.3.3 Bioimpedância cutânea: revisão de literatura

Os achados sobre as propriedades elétricas dos tecidos biológicos foram obtidos por vários estudos no âmbito da eletroquímica. No início do século XX, HÖBER (1910, 1912) utilizou correntes alternadas de alta frequência para estimar a condutividade no interior de hemácias e demonstrou a presença de características elétricas na membrana celular. Mais tarde os estudos foram estendidos para várias frequências e foi possível caracterizar o comportamento dielétrico da superfície da célula (FRICKE, 1924, MCCLENDON, 1926a, 1926b). Na década de 1920 vários pesquisadores identificaram a correlação entre a frequência e as variações de resistência e reatância da membrana (COLE, 1932). Além disto, observaram que o ângulo de fase permanece relativamente

constante, mesmo em limites amplos de frequência (COLE, 1932). Esta variação da resistência e da capacitância conservando o ângulo de fase assemelha-se ao fenômeno de polarização nas interfaces entre o metal e o eletrólito (COLE, 1932).

O conceito de impedância elétrica tem sido aplicado ao campo da medicina desde a década de 1920. Várias aplicações clínicas já foram descritas: eletrocardiografia, eletroencefalografia, desfibrilação e eletrochoque, tomografia cardiopulmonar, eletroporação, análise da composição corporal, hidratação do estrato córneo, neoplasias cutâneas e vários tipos de achados patológicos da pele, dentre outros campos de estudo (GRIMNES, MARTINSEN, 2008).

O primeiro estudo de bioimpedância em dermatologia foi realizado por NILSON *et al.* (1992) para avaliar a resposta da mucosa oral à exposição de líquidos dentários e outros materiais. Os resultados mostraram que a técnica de impedância elétrica foi mais sensível do que a análise visual.

Os estudos com a pele humana iniciaram em 1992 com OLLMAR e EMTESTAM. Eles analisaram a irritação cutânea após o contato com *SLS*. Neste experimento também foi possível constatar a maior sensibilidade da técnica de bioimpedância quando comparada à leitura visual. Mais tarde foi possível observar a resposta a diferentes concentrações de *SLS* (NICANDER *et al.*, 1995, NICANDER *et al.*, 1997) e as variações quanto ao sítio anatômico (EMTESTAM, OLLMAR, 1993, NICANDER *et al.*, 1997, ÅBERG, 2002). As medidas de bioimpedância também foram comparadas aos achados histopatológicos (NICANDER *et al.*, 1996) e a outras técnicas de bioengenharia não invasivas (OLLMAR *et al.*, 1994). As reações sazonais da pele (NICANDER, OLLMAR, 2000) e a profundidade em que eram realizadas as medições (NICANDER *et al.*, 1995) mostraram influência sobre a medida. No campo das reações ao *SLS* também foi descrita a capacidade da bedaina em reduzir seus efeitos (NICANDER *et al.*, 2003). No estudo das dermatites de contato, a impedância foi utilizada na distinção entre as reações alérgicas (NYRÉN *et al.*, 2003) e por irritantes primários e na pesquisa do efeito de emolientes nas reações alérgicas (KUZMINA *et al.*, 2005). A pele normal foi comparada com a pele de pacientes atópicos sem manifestação clínica e, mesmo na ausência de lesões ativas, a bioimpedância mostrou-se capaz de identificar alterações no conteúdo lipídico da camada córnea (NICANDER, OLLMAR, 2004). Neoplasias cutâneas também foram observadas pela técnica de impedância elétrica para distinção de carcinomas basocelulares (BEETNER *et al.*, 2003), melanoma maligno e nevo benigno (ÅBERG *et al.*, 2004). Foi descrito um eletrodo microinvasivo

que permite uma melhor separação entre estas duas últimas patologias (ÅBERG *et al.*, 2005). Também foi estudado o efeito de corticosteróides tópicos em 31 frequências de 1 kHz a 10 MHz e a resposta ao uso do anti-inflamatório foi significativa e concentração-dependente (EMTESTAM *et al.*, 2007). A maior parte dos estudos utilizou as mesmas especificações de frequência deste último e índices específicos de impedância elétrica (OLLMAR, NICANDER, 1995, NICANDER *et al.*, 1996, 1997). Os índices *MIX*, *PIX*, *RIX* e *IMIX* são obtidos pela relação entre impedâncias em baixas (20 kHz) e altas frequências (500 kHz):

$$MIX = \frac{\text{abs}(Z_{20 \text{ kHz}})}{\text{abs}(Z_{500 \text{ kHz}})}, \quad (15)$$

onde $\text{abs}(Z_f)$ é a magnitude da impedância na frequência f ;

$$PIX = \arg(Z_{20 \text{ kHz}}) - \arg(Z_{500 \text{ kHz}}) \quad (16)$$

onde $\arg(Z_f)$ é o ângulo de fase em graus na frequência f ;

$$RIX = \frac{\text{Re}(Z_{20 \text{ kHz}})}{\text{abs}(Z_{500 \text{ kHz}})} \quad (17)$$

onde $\text{Re}(Z_f)$ é a parte real da impedância no plano complexo na frequência f ;

$$IMIX = \frac{\text{Im}(Z_{20 \text{ kHz}})}{\text{abs}(Z_{500 \text{ kHz}})} \quad (18)$$

onde $\text{Im}(Z_f)$ é a parte imaginária na frequência f .

Recentemente, BIRGERSSON *et al.* (2011) utilizaram um modelo matemático para a bioimpedância da pele, buscando captar sua morfologia estratificada, ajudar na operação dos eletrodos e auxiliar na escolha dos sinais mais relevantes. Para isto, o grupo estudou a influência de variações de espessura do estrato córneo, viabilidade do tecido e gordura subcutânea nas medidas de bioimpedância. O modelo considerou propriedades eletromagnéticas (conservação de cargas) e foi possível mostrar a influência da concentração iônica da solução tópica e do tempo de exposição à mesma. Este estudo aponta para a tendência de adequação da técnica de bioimpedância cutânea

à fisiopatologia do tecido e para a expansão do seu significado para além da simples extração de parâmetros.

Diferentemente da abordagem da maior parte dos trabalhos da literatura, os quais utilizam o sinal senoidal de frequência variada para o estudo das dispersões, sabe-se que o conceito de relaxação está ligado ao degrau de tensão, o qual possui idealmente todas as componentes de frequências (GRIMNES, MARTINSEN, 2008). O Laboratório de Instrumentação Biomédica (LIB) do Programa de Engenharia Biomédica (PEB) da COPPE/UFRJ tem desenvolvido estudos na área de impedância elétrica da pele (MENDONÇA, SOUZA, 2003, FERREIRA, 2006, 2007) com base na aplicação do degrau de tensão a fim de captar a resposta da corrente – método desenvolvido por NEVES e SOUZA (2000).

O primeiro estudo dedicado à aplicação desta técnica na identificação de alterações da pele causadas por irritação foi realizado por MENDONÇA e SOUZA (2003) com a aplicação de um modelo simples de bioimpedância corporal para o ajuste dos dados experimentais da resposta de corrente ao degrau de tensão (Figura 21). Apesar de apresentar resultados promissores, verificou-se dificuldade no melhor ajuste do modelo aos dados experimentais.

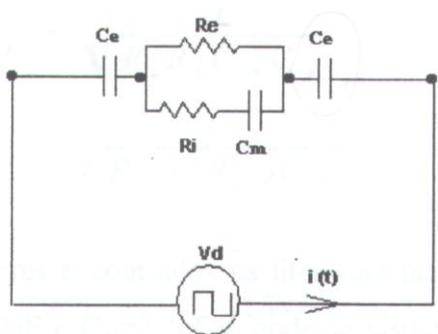


Figura 21 – Modelo simplificado para medições de bioimpedância corporal (NEVES, SOUZA, 2000). **Re**: resistência extracelular; **Ri**: resistência intracelular; **Cm**: capacitância de membrana; **Ce**: capacitância do eletrodo; **Vd**: degrau de tensão; **i(t)**: corrente esperada. Extraído de FERREIRA (2006).

Posteriormente (FERREIRA, SILVA, SOUZA, 2004), dados da resposta de corrente ao degrau de tensão aplicado à pele submetida ao SLS a 5% foram analisados com um modelo usando o CPE (Figura 22), mais compatível com as características de dispersão da pele (GRIMNES, MARTINSEN, 2005, SOSA *et al.*, 2005). Neste modelo o CPE encontra-se em série com uma resistência R, sendo o conjunto chamado

elemento série de Cole ou elemento de fase constante de Fricke (CPE_F) (FERREIRA, 2006) e cuja impedância é definida como:

$$Z_{cpeF} = R + \frac{R}{(j\omega)^\alpha}. \quad (19)$$

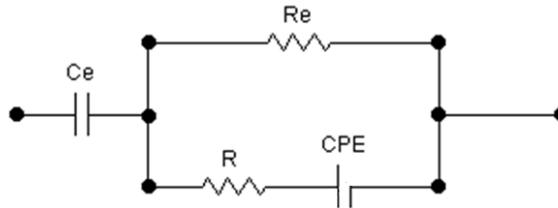


Figura 22 – Modelo elétrico para a pele humana. O capacitor Ce modela a capacitância do eletrodo. O elemento puramente resistivo Re modela a condução elétrica a baixas frequências. A resistência R em série com o CPE forma o elemento série de Cole ou elemento de fase constante de Fricke (CPE_F). Extraído de FERREIRA (2006).

Devido ao expoente fracional α , a solução exata do modelo elétrico da Figura 22 envolve equações diferenciais fracionárias. Pelo desconhecimento da técnica de cálculo fracional à época do trabalho (FERREIRA, SILVA, SOUZA, 2004), os autores obtiveram uma solução da resposta de corrente por meio da aproximação da expressão de Z_{cpeF} em baixas frequências ($s \approx 0$).

Apesar da obtenção de resultados melhores que o modelo clássico (Figura 21), no que concerne à capacidade de prever alterações fisiopatológicas da pele, o modelo da Figura 22 foi novamente modificado para o modelo proposto por GRIMNES e MARTINSEN (2005) (Figura 23). Neste caso, a solução da resposta de corrente foi obtida (FERREIRA, SILVA, SOUZA, 2007) com uma aproximação da expressão de Z_{cpeF} no domínio de Laplace válida para a região da frequência característica, isto é, para $s\tau = 1$, onde τ é o inverso da frequência característica do sistema biológico, cujo valor encontra-se normalmente entre 35 a 80 kHz. Os resultados obtidos a partir deste último modelo são aqueles considerados adiante na discussão do presente trabalho.

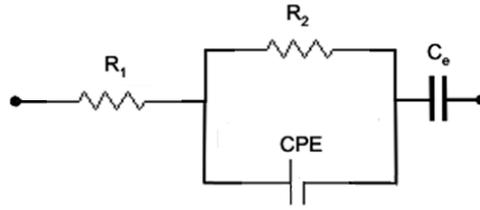


Figura 23 – Circuito equivalente da pele para calcular a resposta ao degrau e derivar os parâmetros elétricos de impedância. *Ce*: capacitância de eletrodo; *R1*: resistência interna; *R2*: resistência externa; *CPE*: elemento de fase constante. Extraído de FERREIRA (2006).

Devido à variabilidade interindividual, FERREIRA (2006) desenvolveu um índice com os parâmetros de bioimpedância (Equação (20)), o que conferiu resultados estatisticamente significativos para o estudo do grau de irritação da pele ao longo de 5 dias após a aplicação de *SLS* em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2%, 5%):

$$IX = \frac{R_1}{R_2} \cdot \alpha , \quad (20)$$

onde R_1 é a resistência interna da pele para o anel 2 (anel mais interno da sonda coaxial utilizada para a coleta dos dados experimentais), R_2 é a resistência externa da pele para o anel 1 (anel mais externo da sonda coaxial utilizada para a coleta dos dados experimentais) e α é o parâmetro do *CPE* para o anel 1, associado ao fenômeno de dispersão do estrato córneo.

Todavia, o uso de um índice com os parâmetros de impedância dificulta a interpretação fisiológica do modelo. Além disto, é possível que o uso de uma solução aproximada tenha limitado a qualidade dos resultados. Tais fatos motivaram o presente estudo na busca de uma solução mais geral que pudesse aumentar o poder diagnóstico da técnica.

Seguindo esta abordagem, e a fim de buscar resultados de bioimpedância mais fidedignos, este trabalho visou à resolução analítica do modelo com *CPE*, sem o uso de aproximações ou índices. Tal resolução depende de uma “nova” área da matemática aplicada conhecida como cálculo fracional (KILBAS *et al.*, 2006), sendo o conhecimento desta ferramenta o objetivo primordial deste estudo.

CAPÍTULO 4

O CÁLCULO FRACIONAL

4.1 Histórico

Enquanto pode ser relativamente simples entender o conceito de expoentes inteiros como em $x^2 = x \cdot x$, a interpretação de operações mais elaboradas, como $x^{2,3}$ ou $e^{j\pi}$, não se atinge de forma tão direta. Ainda assim, é possível desenvolver tais raciocínios, e muito do conhecimento matemático inicialmente complexo encontra seu sedimento pouco a pouco, pela extensão dos significados usuais. Com o cálculo fracional o caminho não foi diferente. No cálculo diferencial integral, havia o questionamento sobre os valores assumidos por n na notação $d^n y / dx^n$ de Leibniz para derivadas de n -ésima ordem, onde $n \in \mathbb{N} = \{0, 1, 2, \dots\}$. Em 1695, L'Hopital perguntou a Leibniz: E se n fosse $1/2$? Em resposta, Leibniz afirmou que isto levaria a um paradoxo e a conseqüências úteis algum dia. Logo, se a idéia pressupõe n como não-inteiro, temos o primeiro registro do que seria chamado “cálculo fracional”, nome dado à teoria das equações diferenciais de ordem fracional. Posteriormente, a pergunta sobre o valor de n foi estendida a todo número, sendo ele fracional, irracional ou complexo. Com isto, o termo cálculo fracional passa a não alcançar os novos domínios da teoria. Uma definição mais apropriada seria “cálculo diferencial integral de ordem arbitrária”.

Desde o início do questionamento por L'Hopital, vários matemáticos contribuíram para o crescimento da teoria (Abel, Liouville, Riemann, Holmgren, Euler,

Lacroix, Lagrange, Laplace, Fourier, de Morgan, Grünwald, Letnikov, Laurant, Krug, Hadamard, Heaviside, Hardy, Littlewood, Weyl, Lévy, Davis, Post, Zygmund, Love, Erdélyi, Kober, Riesz, Feller, Widder, Osler, Sneddon, Mikolas, Al-Bassam). O primeiro evento sobre o tema foi organizado por B. Ross em 1974, na Universidade de New Haven, EUA. Neste mesmo ano OLDHAM e SPANIER (1974) publicaram o primeiro livro sobre o assunto. Mais tarde, outros livros foram escritos e tornaram-se referência no estudo da teoria e aplicação das derivadas e integrais fracionais – SAMKO *et al.* (1993), MILLER e ROSS (1993), KIRYAKOVA (1994), PODLUBNY (1999), MAGIN (2006).

Por quase 300 anos a teoria foi estudada unicamente por matemáticos e seu desenvolvimento restringia-se ao âmbito teórico. Contudo, o grande interesse no assunto motivou outros ramos da ciência e, junto ao entendimento progressivo sobre a teoria, houve uma melhor definição sobre sua utilidade, o que rendeu impacto sobre diferentes áreas. Atualmente aplica-se a dinâmica de fluidos, teoria eletromagnética, redes elétricas, reologia, controle, caos, fractais, e atinge campos da engenharia, economia, biologia e outros.

Na engenharia há muitas situações em que as transformadas e os métodos convencionais não captam a dinâmica do sistema. É neste ponto onde o cálculo diferencial integral de ordem arbitrária – ou, simplesmente, cálculo fracional – disponibiliza ferramentas potenciais para a sua solução. Em sistemas biológicos, por exemplo, tais ferramentas permitem o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevem com acurácia os processos fisiológicos e a resposta a estímulos elétricos, mecânicos ou químicos em todas as escalas de complexidade (MAGIN, 2006). Em engenharia biomédica, um dos campos de atuação reside nos modelos de impedância, modelos viscoelásticos e modelos biomecânicos de ordem fracional. A técnica se adequa à modelagem de dispersões dielétricas Cole-Cole e permite o ajuste de curvas teóricas próximas aos valores experimentais. É útil, portanto, na análise de sistemas elétricos de bioimpedância com modelos utilizando CPE e na solução das equações diferenciais resultantes. Estende-se também a neurociência, processamento de sinais, biomecânica molecular, modelagem de sistema de controle neural e do sistema respiratório, entre outros.

Apesar do longo histórico e constante aprimoramento, o cálculo fracional vem ainda conquistando a maturidade e é considerado um novo campo da matemática. Seu conteúdo transcende os domínios dos cursos de graduação e compõe um ramo de

desafios. A solução das equações diferenciais integrais fracionais requer o conhecimento das definições de derivadas e integrais de ordem arbitrária, o uso de várias funções auxiliares, de tabelas não usuais de funções temporais e suas transformadas de Laplace (MAGIN, 2006) e a implementação de algoritmos elaborados. Estes conceitos serão abordados nos tópicos a seguir e constituirão a base para a aplicação do cálculo fracional neste trabalho.

4.2 Função Gamma

A função gamma constitui um dos conceitos mais básicos do cálculo diferencial integral de ordem arbitrária. Ela está inserida na definição de outra função de grande importância, a Mittag-Leffler, descrita a seguir. Uma peculiaridade destas funções é a existência de mais de uma representação matemática. Isto possui grande utilidade na comprovação de conceitos, porém é preciso atentar para a escolha das mesmas ao longo do raciocínio matemático. A definição em integral da função gamma pode ser escrita como:

$$\Gamma(x) = \int_0^{\infty} e^{-u} u^{x-1} du, \quad (21)$$

ou

$$\Gamma(x + 1) = \int_0^{\infty} e^{-u} u^x du, \quad \text{para todo } x \in \mathbb{R} \quad (22)$$

De forma alternativa, também pode ser definida usando o conceito de limite:

$$\Gamma(x) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{n! n^x}{(x+1)(x+2)\dots(x+n)} \quad (23)$$

O entendimento da função gamma é obtido de forma bem mais simples pela análise de suas propriedades, as quais a revelam como uma generalização da operação fatorial. O caminho para este significado se inicia pela integração por partes da Equação (22):

$$\Gamma(x + 1) = [(-e^{-u} u^x)]_0^{\infty} - \int_0^{\infty} (-e^{-u}) x u^{x-1} du = 0 + x \int_0^{\infty} e^{-u} u^{x-1} du = x \Gamma(x)$$

Como primeira conclusão podemos verificar que:

$$\Gamma(x + 1) = x\Gamma(x) \quad (24)$$

Sabendo que $\Gamma(1) = 1$, se $\Gamma(x) = (x - 1)!$, então $\Gamma(x + 1) = x!$. De fato, $\Gamma(x + 1) = x\Gamma(x) = x(x - 1)! = x!$. Logo, a função gamma pode ser descrita como uma operação fatorial cujo significado se estende a números inteiros e não inteiros, positivos ou negativos. Isto pode ser observado nos exemplos com $x = \frac{3}{2}$ e $x = -\frac{3}{2}$, sendo $\Gamma\left(\frac{1}{2}\right) = \sqrt{\pi}$:

$$\frac{3}{2}! = \Gamma\left(\frac{3}{2} + 1\right) = \frac{3}{2} \cdot \Gamma\left(\frac{3}{2}\right) = \frac{3}{2} \cdot \Gamma\left(\frac{1}{2} + 1\right) = \frac{3}{2} \cdot \frac{1}{2} \cdot \Gamma\left(\frac{1}{2}\right) = \frac{3}{4}\sqrt{\pi}$$

$$-\frac{3}{2}! = \Gamma\left(-\frac{3}{2} + 1\right) = \Gamma\left(-\frac{1}{2}\right)$$

Como $\Gamma(x) = \frac{\Gamma(x+1)}{x}$,

$$\Gamma\left(-\frac{1}{2}\right) = \frac{\Gamma\left(-\frac{1}{2} + 1\right)}{-\frac{1}{2}} = -2 \cdot \Gamma\left(\frac{1}{2}\right) = -2\sqrt{\pi}$$

O gráfico para os valores positivos e negativos da função está ilustrado na Figura 24, a qual mostra segmentos descontínuos, cada um deles com um único ponto mínimo ou máximo e com concavidades alternadas. O acesso a esta função pode ser rapidamente obtido pelo comando *gamma(x)* no Matlab[®].

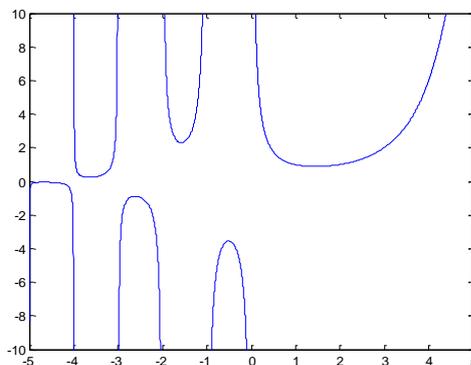


Figura 24 – Gráfico da função gamma obtido pelo MATLAB[®].

4.3 Função de Mittag-Leffler

Quando a transformada de Laplace é utilizada na solução de equações diferenciais integrais de ordem arbitrária, os termos usualmente obtidos não estão relacionados a quaisquer funções temporais encontradas nas tabelas comumente utilizadas nos cursos de engenharia. Um caminho alternativo ao uso das tabelas clássicas consiste na busca dos pares destas funções e suas transformadas em tabelas especiais, as quais envolvem funções auxiliares (Tabela 4). Nestas tabelas a Mittag-Leffler perfaz grande parte da coluna do domínio de Laplace e este é o principal motivo para seu estudo neste trabalho.

Tabela 4 - Pares de transformadas de Laplace envolvendo funções especiais. Adaptado de MAGIN (2006).*

$f(s)$	$F(t)$
$\frac{1}{s^\alpha}$	$\frac{t^{\alpha-1}}{\Gamma(\alpha)}$
$\frac{1}{(s+a)^\alpha}$	$\frac{t^{\alpha-1}}{\Gamma(\alpha)} e^{-at}$
$\frac{1}{s^\alpha + a}$	$t^{\alpha-1} E_{\alpha,\alpha}(-at^\alpha)$
$\frac{s^\alpha}{s(s^\alpha + a)}$	$E_\alpha(-at^\alpha)$
$\frac{a}{s(s^\alpha + a)}$	$1 - E_\alpha(-at^\alpha)$
$\frac{1}{s^\alpha(s-a)}$	$t^\alpha E_{1,1+\alpha}(at)$
$\frac{s^\alpha}{(s-a)}$	$t^{-\alpha} E_{1,1-\alpha}(at), \quad 0 < \alpha < 1$
$\frac{s^{\alpha-\beta}}{s^\alpha - a}$	$t^{\beta-1} E_{\alpha,\beta}(at^\alpha)$

*a é uma constante real, α e β possuem valores arbitrários maiores que zero.

Analogamente à função gamma, a qual abrange a operação fatorial, a função de Mittag-Leffler é assumida como uma generalização da função exponencial. Além disto, como foi mencionado no tópico anterior, a função gamma está contida na definição da Mittag-Leffler:

$$E_{\alpha}(x) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{x^k}{\Gamma(\alpha k + 1)} \quad (\alpha > 0), \quad (25)$$

$$E_{\alpha,\beta}(x) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{x^k}{\Gamma(\alpha k + \beta)} \quad (\alpha > 0, \beta > 0) \quad (26)$$

Observa-se que a função de Mittag-Leffler pode ser definida por um único parâmetro (α), ou por dois parâmetros (α e β). Quando β adquire o valor de 1 (um), o segundo parâmetro pode ser omitido. Nos demais casos ($\alpha > 0$, $\beta > 0$ e $\neq 1$), α e β estão explícitos.

É possível verificar que, quando se trata de equações diferenciais integrais, a função exponencial se apresenta para as ordens inteiras assim como a função de Mittag-Leffler para as ordens não-inteiras. Como exemplo, temos que a função de Mittag-Leffler $t^{\alpha-1}E_{\alpha,\alpha}(-at^{\alpha})$ é a solução da equação $\frac{d^{\alpha}Y(t)}{dt^{\alpha}} + aY(t) = 0$ (MAGIN, 2006), enquanto e^{-at} é a solução para $\frac{dY(t)}{dt} + aY(t) = 0$. De fato, para $\alpha = 1$, $t^{\alpha-1}E_{\alpha,\alpha}(-at^{\alpha}) = e^{-at}$.

Graficamente, o comportamento das curvas das funções de Mittag-Leffler também pode ser analisado de forma comparativa às funções e^x e e^{-x} . A Figura 25 mostra valores específicos de α e β : $E_{1,1}(x) = e^x$, $E_{1/2,1}(x) = e^{x^2} \operatorname{erfc}(-x)$, $E_{1,2}(x) = \frac{e^x - 1}{x}$, $E_{2,1}(x^2) = \cosh(x)$, $E_{2,2}(x^2) = \frac{\sinh(x)}{x}$, onde erfc corresponde à função erro complementar, outra função auxiliar também presente em tabelas especiais de transformadas de Laplace, porém sem aplicação neste trabalho. Em seguida, o gráfico na Figura 26 revela o decaimento de $E_{1/2,1}(-\sqrt{x}) = e^x \operatorname{erfc}(\sqrt{x})$ à semelhança de e^{-x} e $e^{-\sqrt{x}}$.

Vale ressaltar que $E_{\alpha}(x)$ ou $E_{\alpha,\beta}(x)$ são diferenciáveis em qualquer região do plano complexo e a apresentação gráfica pode admitir os formatos mais variados.

O resultado numérico desta função não é obtido de forma simples como ocorre com a função gamma. Para tal, são utilizados algoritmos computacionais baseados nas definições da Mittag-Leffler (Equações (25) e (26)), os quais prevêm uma série de intercorrências durante o cálculo, incluindo o erro admitido pela limitação dos termos do somatório.

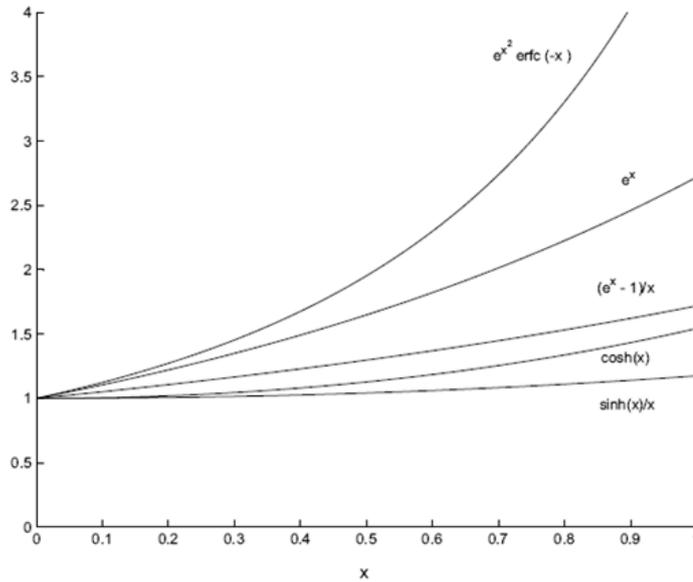


Figura 25 – Comparação entre e^x e algumas funções de Mittag-Leffler. Extraído de MAGIN (2006).

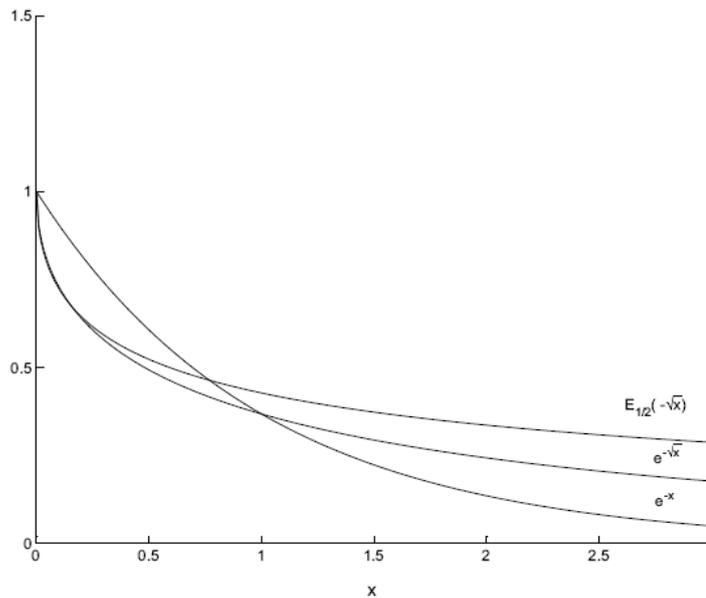


Figura 26 – Comparação entre $E_{1/2}(-x^{1/2})$, e^{-x} e $e^{-x^{1/2}}$. Extraído de MAGIN (2006).

Quando necessário, é possível calcular a derivada da função de Mittag-Leffer diretamente sobre os resultados de tais algoritmos, como será descrito no próximo tópico, ou, em alternativa, pelo uso de sua definição:

$$E_{\alpha,\beta}^{\gamma}(x) = \frac{d^{\gamma}}{dx^{\gamma}} E_{\alpha,\beta} = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\gamma_k \cdot x^k}{k! \Gamma(\alpha k + \beta)} \quad (\alpha > 0, \beta > 0, \gamma > 0), \quad (27)$$

onde γ_n é o símbolo de Pochhammer:

$$\begin{aligned}\gamma_0 &= 1 \\ \gamma_k &= \gamma(\gamma + 1)(\gamma + 2) \dots (\gamma + k - 1)\end{aligned}$$

Existem ainda propriedades da função para argumentos e operações particulares, os quais serão mencionados conforme seu emprego neste trabalho.

4.4 Definições de derivadas e integrais fracionais

Nos tópicos anteriores, uma notação utilizada para a derivada de ordem arbitrária foi $\frac{d^\alpha Y(t)}{dt^\alpha}$. No entanto, existe outro operador ainda mais utilizado, o qual expande os conceitos dos operadores de derivadas e integrais usuais a uma ordem não inteira: ${}_a D_t^\alpha$.

Quando $\alpha > 0$, ${}_a D_t^\alpha$ corresponde ao operador d^α/dt^α . Quando $\alpha = 0$, ${}_a D_t^\alpha = 1$. Por fim, quando $\alpha < 0$, ${}_a D_t^\alpha$ corresponde ao operador $\int_a^t (d\tau)^{-\alpha}$. Há algumas definições para a derivação e a integração de ordem arbitrária, dentre elas a de Grünwald-Letnikov, Riemann-Liouville e Caputo, as quais são apresentadas a seguir.

4.4.1 Definição de Grünwald-Letnikov

$${}_a D_t^\alpha f(t) = \lim_{h \rightarrow 0} \frac{1}{h^\alpha} \sum_{j=0}^{\lfloor \frac{t-a}{h} \rfloor} (-1)^j \binom{\alpha}{j} f(t - jh) \quad (28)$$

4.4.2 Definição de Riemann-Liouville

$$\begin{aligned}{}_a D_t^\alpha f(t) &= \frac{1}{\Gamma(n-\alpha)} \left(\frac{d}{dt}\right)^n \int_a^t \frac{f(\tau)}{(t-\tau)^{\alpha-n+1}} d\tau \\ &(n-1 \leq \alpha < n)\end{aligned} \quad (29)$$

4.4.3 Definição de Caputo

$$\begin{aligned}{}_a D_t^\alpha f(t) &= \frac{1}{\Gamma(\alpha-n)} \int_a^t \frac{f^{(n)}(\tau)}{(t-\tau)^{\alpha-n+1}} d\tau \\ &(n-1 \leq \alpha < n)\end{aligned} \quad (30)$$

4.4.4 Derivada da função de Mittag-Leffler

$${}_a D_t^\gamma (t^{\alpha k + \beta - 1} E_{\alpha, \beta}^{(k)}(\lambda t^\alpha)) = t^{\alpha k + \beta - \gamma - 1} E_{\alpha, \beta - \gamma}^{(k)}(\lambda t^\alpha) \quad (31)$$

4.5 Transformada de Laplace e convolução

Aqui vale a recordação de conceitos básicos sobre a transformada de Laplace, os quais serão utilizados adiante. O método permite a transformação de equações diferenciais lineares com coeficientes constantes em equações algébricas. Uma função $f(t)$ representada no domínio do tempo possui uma correspondente no domínio de Laplace, descrita como $F(s)$. A transformada de Laplace da função $f(t)$ é obtida por integração:

$$L\{f(t)\} = \int_0^\infty e^{-st} f(t) dt = F(s) \quad (32)$$

Ao final, a transformada inversa de Laplace fornece a solução completa no domínio do tempo:

$$L^{-1}\{F(s)\} = \int_{\sigma_1 - j\infty}^{\sigma_1 + j\infty} e^{st} F(s) ds = f(t)$$

Quanto à transformada de Laplace da convolução de duas funções temporais, temos:

$$f(t) * g(t) = \int_0^t f(t - \tau) g(\tau) d\tau = \int_0^t f(\tau) g(t - \tau) d\tau \quad (33)$$

$$L\{f(t) * g(t)\} = F(s)G(s) \quad (34)$$

Portanto, a multiplicação de duas funções no domínio de Laplace corresponde à convolução no tempo.

Além dos pares de transformada descritos na Tabela 4, há alguns outros pares conhecidos, como a transformada $t^k e^{\pm at}$ (Equação (35)) e da função de Mittag-Leffler (Equação (36)) (PODLUBNY, 1999):

$$L\{t^k e^{\pm at}\} = \frac{k!}{(s \mp a)^{k+1}} \quad (35)$$

$$L\{t^{\alpha k + \beta - 1} E_{\alpha, \beta}^{(k)}(\lambda t^\alpha)\} = \frac{k! s^{\alpha - \beta}}{(s^\alpha \mp a)^{k+1}} \quad (36)$$

4.6 Função de Green

Apesar da facilidade encontrada com o uso das tabelas com funções especiais de transformadas de Laplace, há diversas situações em que o modelo proposto exige soluções bem mais elaboradas. Equações diferenciais fracionais com dois ou mais termos são traduzidas no domínio de Laplace por equações igualmente extensas, não descritas em tabelas convencionais e cuja simplificação por frações parciais tampouco se aplica.

Uma das formas de manusear estas equações é por meio da função de Green $G(t, \tau)$, descrita inicialmente por George Green em 1830. Esta função permite resolver equações diferenciais do tipo:

$${}_0L_t y(t) = f(t) \quad (37)$$

onde $f(t)$ pode ser vista como a entrada de um sistema, $y(t)$ como sua saída e ${}_0L_t$ é um operador diferencial linear adjunto (PODLUBNY, 1999).

A solução para a Equação (37) será

$$y(t) = \int_0^t G(t, \tau) f(\tau) d\tau \quad (38)$$

quando

$$G(t, \tau) \equiv G(t - \tau). \quad (39)$$

Deste modo, podemos observar que a chamada função de Green assemelha-se com o conceito de resposta impulsiva, tendo a Equação (38) vista como a integral de convolução entre a entrada $f(t)$ e a resposta impulsiva $G(t, \tau)$.

A função de Green G_1 para uma equação diferencial de ordem fracionária de um único termo e com coeficientes constantes

$$a_0 D_t^\alpha y(t) = f(t) \quad (40)$$

e cuja transformada inversa de Laplace é dada por

$$G_1(s) = \frac{1}{as^\alpha} \quad (41)$$

tem como solução para condições iniciais homogêneas.

$$g_1(t) = \frac{1}{a} \frac{t^{\alpha-1}}{\Gamma(\alpha)} \quad (42)$$

Para os casos particulares de $G_2(s)$, $G_3(s)$ e $G_4(s)$, descreve-se:

$$a_0 D_t^\alpha y(t) + by(t) = f(t)$$

$$G_2(s) = \frac{1}{as^\alpha + b}$$

$$g_2(t) = \frac{1}{a} t^{\alpha-1} E_{\alpha,\alpha} \left(-\frac{b}{a} t^\alpha \right) \quad (43)$$

$$a_0 D_t^\alpha y(t) + b_0 D_t^\beta y(t) + cy(t) = f(t)$$

$$G_3(s) = \frac{1}{as^\beta + bs^\alpha + c}$$

$$g_3(t) = \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \left(\frac{c}{a} \right)^k t^{\beta(k+1)-1} E_{\beta-\alpha, \beta+\alpha k}^{(k)} \left(-\frac{b}{a} t^{\beta-\alpha} \right) \quad (44)$$

$$a_0 D_t^\alpha y(t) + b_0 D_t^\beta y(t) + c_0 D_t^\gamma y(t) + dy(t) = f(t)$$

$$G_4(s) = \frac{1}{as^\gamma + bs^\beta + cs^\alpha + d}$$

$$g_4(t) = \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} \left(\frac{-d}{a} \right)^m \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{c}{d} \right)^k \times t^{\gamma(m+1)-\alpha k-1} E_{\gamma-\beta, \gamma+\beta m-\alpha k}^{(m)} \left(-\frac{b}{a} t^{\gamma-\beta} \right) \quad (45)$$

De forma generalizada, para uma equação diferencial de ordem fracional de n termos e com coeficientes constantes

$$a_n D_t^{\beta_n} y(t) + a_{n-1} D_t^{\beta_{n-1}} y(t) + \dots a_1 D_t^{\beta_1} y(t) + a_0 D_t^{\beta_0} y(t) = f(t), \quad (46)$$

e cuja transformada de Laplace origina uma função de transferência que é dada por:

$$G_n(s) = \frac{1}{a_n s^{\beta_n} + a_{n-1} s^{\beta_{n-1}} + \dots + a_1 s^{\beta_1} + a_0 s^{\beta_0}}. \quad (47)$$

Apresenta como solução a função de Green

$$\begin{aligned} g_n(t) &= \frac{1}{a_n} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^m}{m!} \sum_{\substack{k_0+k_1+\dots+k_{n-2}=m \\ k_0 \geq 0; \dots, k_{n-2} \geq 0}} (m; k_0, k_1, \dots, k_{n-2}) \\ &\times \prod_{i=0}^{n-2} \left(\frac{a_i}{a_n}\right)^{k_i} \times t^{(\beta_n - \beta_{n-1})m + \beta_n + \sum_{j=0}^{n-2} (\beta_{n-1} - \beta_j)k_j - 1} \\ &\times E_{\beta_n - \beta_{n-1}, \beta_n + \sum_{j=0}^{n-2} (\beta_{n-1} - \beta_j)k_j}^{(m)} \left(-\frac{a_{n-1}}{a_n} t^{\beta_n - \beta_{n-1}}\right) \end{aligned} \quad (48)$$

Seguindo a Equação (47), normalmente os casos de interesse possuem $\beta_0 = 0$.

Portanto, para cada equação diferencial integral de ordem arbitrária existe uma função de Green que exprime sua resposta impulsiva. Logo,

$$y_{impulso}(t) = g_n(t). \quad (49)$$

E enquanto a resposta impulsiva do sistema de ordem fracional é a própria função de Green para a mais elevada ordem do sistema, a resposta ao degrau é obtida pela integral desta mesma função de Green:

$$y_{degrau}(t) = {}_0D_t^{-1} g_n(t). \quad (50)$$

A função de Green constitui o resultado de sucessivas operações matemáticas. Estas estão sujeitas a aproximações durante sua implementação computacional, o que pode levar a erros significativos.

CAPÍTULO 5

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Modelos elétricos e solução analítica

O circuito elétrico para a pele proposto inicialmente no presente trabalho foi composto pelas resistências R_b e R_p e pela capacitância C_e , com o objetivo de modelar a impedância do eletrodo, e pelos componentes R_e , R_i e C_m^α , que seguem o modelo utilizado por NEVES e SOUZA (2000) (Figura 22), substituindo o capacitor ideal pelo fractor (Figura 27).

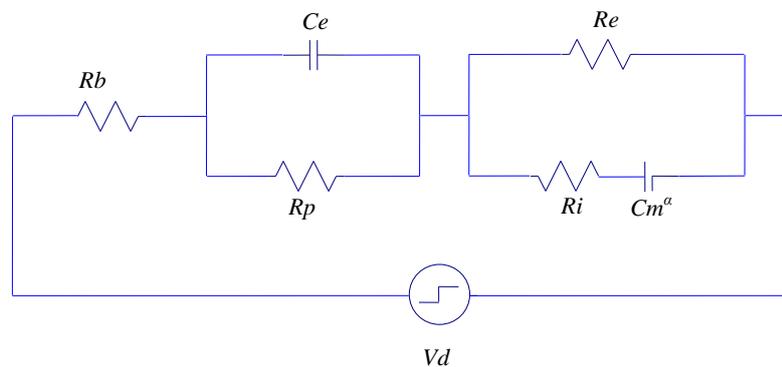


Figura 27 – Modelo inicialmente proposto para a pele.

Para $V_d = V_{d_0} u(t)$, a equação para a corrente obtida para este modelo foi:

$$I(s) = \frac{V d_0}{R_b + R_\infty} \left[\frac{s^{1+\alpha} + \omega_3 s + \omega_1 s^\alpha + \omega_1 \omega_3}{s^{1+\alpha} + \omega_4 s + \omega_5 s^\alpha + \omega_6^2} \right], \quad (51)$$

onde $R_\infty = \frac{R_e R_i}{R_e + R_i}$, $\omega_1 = \frac{1}{R_p \cdot C_e}$, $\omega_2 = \frac{1}{R_i \cdot C_m^\alpha}$, $\omega_3 = \frac{1}{(R_e + R_i) \cdot C_m^\alpha}$, $\omega_4 = \frac{R_b \cdot \omega_3 + R_\infty \cdot \omega_2}{R_b + R_\infty}$,
 $\omega_5 = \frac{R_b \cdot \omega_1 + \frac{1}{C_e} + R_\infty \cdot \omega_1}{R_b + R_\infty}$, $\omega_6^2 = \frac{R_b \cdot \omega_1 \cdot \omega_3 + \frac{\omega_3}{C_e} + R_\infty \cdot \omega_1 \cdot \omega_2}{R_b + R_\infty}$.

Por corresponder a uma equação diferencial de ordem fracional de quatro termos, à fração $\frac{1}{s^{1+\alpha} + \omega_4 s + \omega_5 s^\alpha + \omega_6^2}$ foi aplicada a técnica com base na função de Green. A seguir, desenvolve-se o raciocínio matemático para a equação de quatro termos (PODLUBNY, 1999):

$$a_0 D_t^\gamma y(t) + b_0 D_t^\beta y(t) + c_0 D_t^\alpha y(t) + dy(t) = f(t), \quad (52)$$

$$\begin{aligned} G_4(s) &= \frac{1}{as^\gamma + bs^\beta + cs^\alpha + d} = \\ &= \frac{1}{as^\gamma + bs^\beta} \frac{1}{1 + \frac{cs^\alpha + d}{as^\gamma + bs^\beta}} = \\ &= \frac{a^{-1}s^{-\beta}}{s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b} \frac{1}{1 + \frac{a^{-1}cs^{\alpha-\beta} + a^{-1}ds^{-\beta}}{s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b}} = \\ &= \frac{a^{-1}s^{-\beta}}{s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b} \frac{1}{1 - \left(-1 \cdot \frac{a^{-1}cs^{\alpha-\beta} + a^{-1}ds^{-\beta}}{s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b} \right)} \end{aligned}$$

Sabendo-se que a soma dos termos de uma progressão geométrica de razão $q < 1$ pode ser escrita como $\sum_{m=0}^{\infty} a_0 q^m = \frac{a_0}{1-q}$

$$G_4(s) = \sum_{m=0}^{\infty} (-1)^m \frac{a^{-1}s^{-\beta}}{(s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b)^{m+1}} \left(\frac{c}{a} s^{\alpha-\beta} + \frac{d}{a} s^{-\beta} \right)^m$$

Sabendo-se ainda que $(x + y)^m = \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \cdot x^{m-k} \cdot y^k$,

$$\begin{aligned}
G_4(s) &= \sum_{m=0}^{\infty} (-1)^m \frac{a^{-1}s^{-\beta}}{(s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b)^{m+1}} \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \frac{c^k d^{m-k}}{a^m} s^{\alpha k - \beta m} \\
G_4(s) &= \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{\infty} (-1)^m \frac{s^{-\beta}}{(s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b)^{m+1}} \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{c}{d}\right)^k \left(\frac{d}{a}\right)^m s^{\alpha k - \beta m} \\
G_4(s) &= \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{\infty} (-1)^m \left(\frac{d}{a}\right)^m \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{c}{d}\right)^k \frac{s^{\alpha k - \beta m - \beta}}{(s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b)^{m+1}} \\
G_4(s) &= \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} \left(\frac{-d}{a}\right)^m \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{c}{d}\right)^k \frac{m! s^{\alpha k - \beta m - \beta}}{(s^{\gamma-\beta} + a^{-1}b)^{m+1}}
\end{aligned}$$

Como $L\{t^{Am+B-1}E_{A,B}^{(m)}(\pm C \cdot t^A)\} = \frac{m!s^{A-B}}{(s^A \mp C)^{m+1}}$ (PODLUBNY, 2009), então:

$$g_4(t) = \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} \left(\frac{-d}{a}\right)^m \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{c}{d}\right)^k \times t^{\gamma(m+1) - \alpha k - 1} E_{\gamma-\beta, \gamma+\beta m - \alpha k}^{(m)} \left(-\frac{b}{a} t^{\gamma-\beta}\right)$$

Com as relações $\gamma = 1 + \alpha, \beta = 1, \alpha = \alpha, a = 1, b = \omega_4, c = \omega_5$ e $d = \omega_6^2$:

$$g_4(t) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} (-\omega_6^2)^m \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{\omega_5}{\omega_6^2}\right)^k \times t^{(1+\alpha)(m+1) - \alpha k - 1} E_{\alpha, 1+\alpha+m-\alpha k}^{(m)} \left(-\frac{b}{a} t^{\alpha}\right)$$

Observa-se, em geral, que a escolha dos termos x e y na relação $(x + y)^m = \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \cdot x^{m-k} \cdot y^k$ não altera o resultado, de modo que $\sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \cdot x^{m-k} \cdot y^k = \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \cdot y^{m-k} \cdot x^k$. Contudo, no raciocínio descrito anteriormente, a ordem destes termos interfere na função de Mittag-Leffler produzida na etapa subsequente e permite uma segunda resposta para $g_4(t)$:

$$g_4(t) = \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} \left(\frac{-d}{a}\right)^m \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{c}{d}\right)^k \times t^{\gamma(m+1) - \alpha k - 1} E_{\gamma-\beta, \gamma - \alpha m + \beta m + \alpha k}^{(m)} \left(-\frac{b}{a} t^{\gamma-\beta}\right)$$

$$\begin{aligned}
g_4(t) &= \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} (-\omega_6^2)^m \sum_{k=0}^m \binom{m}{k} \left(\frac{\omega_5}{\omega_6^2}\right)^k \\
&\times t^{(1+\alpha)(m+1) - \alpha k - 1} E_{\alpha, 1+m+\alpha(1-m+k)}^{(m)} \left(-\frac{b}{a} t^{\alpha}\right) \quad (53)
\end{aligned}$$

Durante a implementação do algoritmo computacional, para ambos os resultados foi constatada a produção de séries distintas e divergentes. Como alternativa, a fim de reduzir a complexidade dos cálculos e manter o princípio da interpretabilidade do modelo, foram realizadas duas simplificações (Figura 28).

Para valores de R_p muito menores que a reatância capacitiva de C_e (X_{C_e}) e valores muito elevados de R_p em relação à X_{C_e} , o que corresponde a um capacitor C_e com perdas mínimas, o modelo resultante equivale ao descrito por FERREIRA (2006):

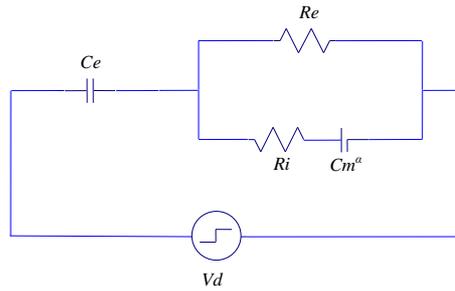


Figura 28 – Modelo para a pele simplificado. Adaptado de FERREIRA (2006).

Neste modelo elétrico R_i representa a resistência no meio intracelular e R_e no meio extracelular, C_e representa a capacitância do eletrodo e o CPE modela o processo de relaxação dielétrica do estrato córneo (POON, CHOY, 1981).

Para V_d correspondente a um degrau de tensão ($V_d = V_{d_0}u(t)$), o mais simples formato de equação para este circuito no domínio de Laplace foi:

$$\frac{V_{d_0}}{s} = \left[\frac{1}{C_e s} + \frac{R_\infty s^\alpha}{s^\alpha + \omega_3} + \frac{R_\infty \omega_2}{s^\alpha + \omega_3} \right] \cdot I(s), \quad (54)$$

onde $R_\infty = \frac{R_e R_i}{R_e + R_i}$, $\omega_2 = \frac{1}{R_i + C_m^\alpha}$, $\omega_3 = \frac{1}{(R_e + R_i) \cdot C_m^\alpha}$.

A Equação (54) pode ser representada na sua forma geral como:

$$V_d(s) = Z(s) \cdot I(s) \quad (55)$$

Aplicando o conceito de transformada inversa de Laplace:

$$V_d(t) = L^{-1}[Z(s)] * i(t) \quad (56)$$

onde * representa a operação de convolução.

Logo, poderíamos definir o conceito de uma impedância variante no tempo $z(t)$ como:

$$z(t) = V_d(t)[*]^{-1}i(t) \quad (57)$$

onde $[*]^{-1}$ corresponde à deconvolução.

Com o uso de tabelas especiais para a transformada inversa de Laplace de funções com expoentes não inteiros, para as quais $\frac{s^\alpha}{s^\alpha+a} = -at^{\alpha-1}E_{\alpha,\alpha}(-at^\alpha)$, $\frac{1}{s^\alpha+a} = t^{\alpha-1}E_{\alpha,\alpha}(-at^\alpha)$ e $E_{\alpha,\beta}(x) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{x^k}{\Gamma(\alpha k + \beta)}$ é a função de Mittag-Leffler quando $\alpha > 0$ e $\beta > 0$, a Equação (54) pode ser reescrita no domínio do tempo como:

$$V_{d_0} \cdot u(t) = \left\{ \frac{1}{C_e} \cdot u(t) - [R_\infty \cdot \omega_2 \cdot t^{\alpha-1}E_{\alpha,\alpha}(-\omega_2 t^\alpha)] + R_\infty \cdot \omega_1 \cdot t^{\alpha-1}E_{\alpha,\alpha}(-\omega_2 t^\alpha) \right\} * i(t) \quad (58)$$

Redefinindo a impedância do *CPE* representado na Figura 28 como:

$$Z_{CPE} = \frac{R_0}{s^\alpha \cdot \tau^\alpha} \quad (59)$$

onde R_0 é o valor impedância do *CPE* em $\tau = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot \omega c}$, para $\omega c =$ frequência característica, e α assume valores não inteiros entre 0 e 1; a Equação (58) passa a ser reescrita como:

$$V_{d_0} \cdot u(t) = \left\{ \frac{1}{C_e} \cdot u(t) - \left[R_\infty \cdot \left(\frac{R_0}{(R_e+R_i) \cdot \tau^\alpha} \right) \cdot t^{\alpha-1} \cdot E_{\alpha,\alpha} \left(-\frac{R_0}{(R_e+R_i) \cdot \tau^\alpha} \cdot t^\alpha \right) \right] + R_\infty \cdot \frac{R_0}{R_i \cdot \tau^\alpha} \cdot t^{\alpha-1} E_{\alpha,\alpha} \left(-\frac{R_0}{(R_e+R_i) \cdot \tau^\alpha} \cdot t^\alpha \right) \right\} * i(t) \quad (60)$$

Por analogia da Equação (57), o comportamento descrito na Equação 60 nos leva a uma impedância no domínio do tempo:

$$z(t) = \frac{1}{C_e} \cdot u(t) - \left[R_\infty \cdot \left(\frac{R_0}{(R_e + R_i) \cdot \tau^\alpha} \right) \cdot t^{\alpha-1} \cdot E_{\alpha,\alpha} \left(-\frac{R_0}{(R_e + R_i) \cdot \tau^\alpha} \cdot t^\alpha \right) \right] + R_\infty \cdot \frac{R_0}{R_i \cdot \tau^\alpha} \cdot t^{\alpha-1} E_{\alpha,\alpha} \left(-\frac{R_0}{(R_e + R_i) \cdot \tau^\alpha} \cdot t^\alpha \right) \quad (61)$$

Então, a deconvolução da corrente experimental do degrau de tensão aplicado leva a obtenção de uma forma temporal de impedância, cuja representação é expressa na Equação (62).

$$V_{d_0}(t)[*]^{-1}i(t) = \frac{1}{C_e} \cdot u(t) - \left[R_\infty \cdot \left(\frac{R_0}{(R_e + R_i) \cdot \tau^\alpha} \right) \cdot t^{\alpha-1} \cdot E_{\alpha,\alpha} \left(-\frac{R_0}{(R_e + R_i) \cdot \tau^\alpha} \cdot t^\alpha \right) \right] + R_\infty \cdot \frac{R_0}{R_i \cdot \tau^\alpha} \cdot t^{\alpha-1} E_{\alpha,\alpha} \left(-\frac{R_0}{(R_e + R_i) \cdot \tau^\alpha} \cdot t^\alpha \right) \quad (62)$$

Como será descrito a seguir, isto permitiu que os sinais de corrente da base de dados pudessem ser utilizados para a obtenção de um sinal experimental de impedância no domínio do tempo que pudesse ser comparado a sua previsão teórica descrita na Equação (61). A Figura 29 ilustra o conceito mencionado.

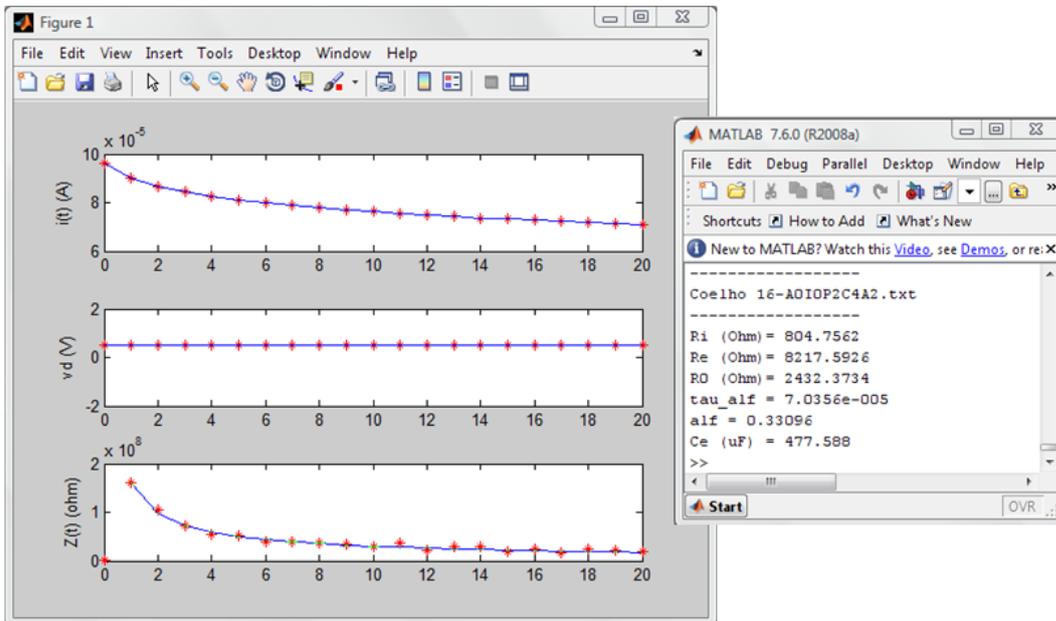


Figura 29 – Programa de ajuste das curvas teóricas de acordo com os dados experimentais de corrente e tensão. À direita os parâmetros do modelo teórico.

5.2 Banco de dados e técnicas de medição

O banco de dados deste trabalho foi formado por sinais de corrente obtidos por FERREIRA (2006) após a aplicação de um degrau de tensão à pele de 15 coelhos do Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Devido à maior sensibilidade cutânea em relação aos humanos, foram utilizados coelhos albinos neozelandeses. A população de coelhos compusera animais hígdios, machos e fêmeas, com peso corpóreo de 2,0 a 3,0 kg, mantidos em um ambiente com temperatura constante ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa entre 30 e 70% durante todo o período do teste, alimentados em regime regular de laboratório e submetidos a períodos de claro e escuro com intervalos de 12 horas.

Cada coelho fora submetido à aplicação tópica de *SLS* (Pharma Special, Wuppertal, Germany) com pureza de 93,33%, diluído em água destilada nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0%, além do controle, composto por água destilada. A primeira medida de impedância elétrica fora efetuada antes da aplicação de *SLS* (dia zero). Em seguida, discos de papel embebidos em cinquenta microlitros de *SLS* foram aplicados em câmaras (*Finn Chambers*[®]) de 12 mm (Epitest Ltd Oy, Hyrylä). As câmaras distinguiram-se pela concentração do *SLS*, sendo uma delas o controle, e foram dispostas sobre o dorso dos coelhos que fora tricotomizado 24 horas antes. A região mantivera-se ocluída por 24 horas com o auxílio de adesivos hipoalergênicos e gaze (Figura 30).



Figura 30 – Oclusão da pele tricotomizada e exposta a substâncias irritantes. Extraído de FERREIRA (2006).

Após este período as câmaras foram removidas e fora realizada a segunda medida (dia 1). As medidas subsequentes corresponderam aos períodos de 24 horas (dia

2), 48 horas (dia 3), 72 horas (dia 4) e 96 horas (dia 5) após a remoção das câmaras. Dados referentes ao dia 3 não constam no presente trabalho, pois não foram encontrados durante a conferência do banco de dados de FERREIRA (2006). Cada medida de corrente em resposta ao degrau de tensão fora efetuada em duas profundidades da pele por meio de uma sonda com dois anéis distanciados do eletrodo central (Figura 31). Como a penetração da corrente no tecido cutâneo corresponde a aproximadamente metade da distância entre os eletrodos, a primeira profundidade seria a metade da distância entre o anel central e o primeiro anel ($\approx 0,75$ mm), refletindo as propriedades do estrato córneo (NICANDER *et al.*, 1997, FERREIRA, 2006). Já a segunda profundidade seria a metade da distância entre o anel central e o último anel ($\approx 2,37$ mm) e reflete as demais camadas.

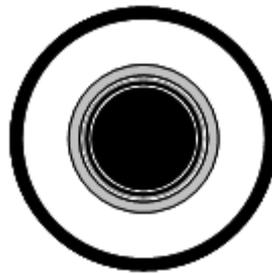


Figura 31 – Ilustração da sonda utilizada por FERREIRA (2006). As regiões em negrito correspondem aos eletrodos em atividade.

Os valores de R_i , R_e e α para o anel 1 descrevem as alterações de condutividade nas porções mais superficiais (estrato córneo). Já os valores destes parâmetros para o anel 2 estão relacionados às porções mais profundas (demais estratos do tecido cutâneo).

5.3 Algoritmo e análise estatística

Os sinais de corrente foram submetidos a um programa computacional de adequação ao modelo. O programa foi desenvolvido em MATLAB[®] e dispõe das seguintes etapas:

(1) tratamento dos sinais de entrada, obtendo-se os sinais $z(t)$ a partir da deconvolução entre os sinais de corrente e de magnitude do degrau de tensão contidos no banco de dados;

(2) definição de limites para o ajuste dos parâmetros do modelo, a fim de estabelecer uma aproximação mínima coerente entre as curvas $z(t)$ teórica e experimental;

(3) otimização dos parâmetros do modelo teórico, a partir da função *fminsearch* do MATLAB, de modo a ajustar a curva teórica de $z(t)$ a sua equivalente experimental, de acordo com o erro médio quadrático entre os pontos experimentais e a curva de ajuste ou por um número máximo de iterações (300).

Para cada sinal experimental de corrente do banco de dados, o programa forneceu os valores dos parâmetros do circuito proposto (Figura 28) que melhor ajustassem a curva teórica (Figura 29). Como acima mencionado, o programa necessitou de uma delimitação para os valores de alguns parâmetros, uma vez que a função de Mittag-Leffler apresenta uma grande sensibilidade em relação aos seus argumentos. Isto faz com que exista mais de uma solução para o ajuste, fazendo com que seja necessário estabelecer limites para que os parâmetros resultantes apresentem coerência com os valores esperados. Tendo como base os achados de outros pesquisadores (FERREIRA, 2006) e a distribuição dos dados deste trabalho, definiu-se para R_e a faixa entre 100 e 16000 Ω , para R_i entre 500 e 2300 Ω e para α entre 0,2 e 0,85.

Inicialmente foi feito um teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) com um conjunto de valores dos parâmetros do modelo fornecido pelo programa de ajuste. Constatou-se que apenas o parâmetro α seguiu a distribuição normal.

Posteriormente a análise dos resultados dos parâmetros elétricos contra os percentuais de irritante foi realizada por meio de análise descritiva, utilizando-se boxplots. Em seguida, os resultados de α foram analisados pelo teste ANOVA com medidas repetidas de 1 fator (dia). O valor p foi corrigido pelo procedimento de Tukey e foi adotado um nível de significância para $p \leq 0,05$. A análise foi realizada com o uso do programa MATLAB[®], com o uso das funções *boxplot*, *anova1* e *multcompare*.

Como os valores de R_i e R_e não seguiram a distribuição normal, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados de FERREIRA (2006) também foram analisados graficamente de acordo com as médias e desvios padrão obtidos.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

Antes de iniciar a apresentação dos resultados, serão descritos alguns conceitos importantes sobre a expectativa teórica dos mesmos.

É esperado que os efeitos sobre a pele após uma única exposição ao *SLS* regridam progressivamente ou sofram desaceleração ao longo dos dias, o que tem sido observado em estudos com técnicas de bioengenharia como *TEWL*, *LDF*, *CM* e colorimetria (GLOOR *et al.*, 2004). Tal comportamento pode ser representado pela Figura 10, reproduzida novamente na Figura 32 a título de facilidade para o entendimento.

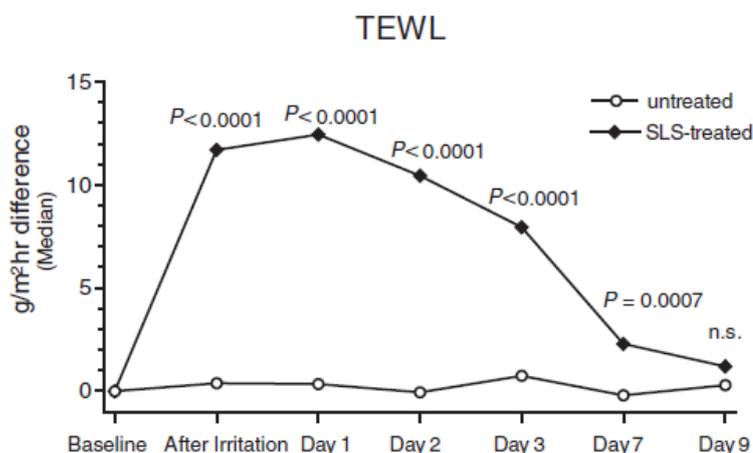


Figura 32 – Valores de perda de água transepidérmica após irritação da pele com *SLS* 1%. Extraído de GLOOR *et al.* (2004).

Em decorrência do acima exposto, seria esperado que as alterações nos parâmetros do modelo elétrico deveriam apresentar comportamento similar ao longo dos dias.

A resistência R_i modela o volume líquido intracelular. As mudanças no meio intracelular são posteriores àquelas no meio intercelular, pois o conteúdo da célula irá se modificar de acordo com a osmolaridade do meio externo, a qual depende do extravasamento de líquido intravascular para o interstício. Além disto, R_i é um parâmetro que somente será captado em altas frequências, quando a corrente vence a barreira das membranas celulares e passa através das células. Devido à peculiaridade destes fenômenos eletroquímicos, não existe um padrão específico esperado para a impedância do meio intracelular. Haveria, possivelmente, uma alteração nos valores de R_i após a irritação e um retorno progressivo destes valores aos níveis iniciais, ainda que não se saiba em quanto tempo estas mudanças seriam atingidas.

A resistência R_e modela o volume líquido extracelular. É um parâmetro que vai captado em baixas e altas frequências, pois representa o caminho de menor oposição à passagem de corrente. Além disto, as mudanças deste meio são decorrentes do extravasamento de líquido intravascular para o interstício. Por isto, quanto mais próxima da derme for a região analisada, mais expressiva seria a mudança, pois o interstício próximo ao leito vascular é o primeiro a ser modificado. Isto significa que o comportamento de R_e no anel 2 pode ser mais evidente do que no anel 1. Esperamos também que exista um retorno progressivo destes valores aos níveis iniciais e uma maior concordância com os resultados de outros estudos, já que é uma medida do acúmulo de líquido intercelular. Considerando que o exudato do meio vascular é rico em proteínas e células do sistema imune, isto pode conferir ao interstício uma maior oposição à passagem de corrente ainda maior. Portanto, seria esperado que o comportamento de R_e fosse crescente após a irritação e, em seguida, decrescesse aos níveis iniciais.

O parâmetro α é um elemento do circuito contendo o *CPE*. Como ele é responsável por modelar as dispersões dielétricas do tecido, seria esperado que quanto maior o acometimento da pele, ou seja, quanto maior a mudança morfológica nas camadas por conta do edema, maior seria a influência sobre seu valor. E por existir uma maior expressão das mudanças nos estratos inferiores, espera-se que o valor de α sofra alterações mais evidentes nas medidas com o anel 2. Na medida em que o edema atinge

as camadas superiores, novamente se alcança a homogeneidade do meio, e α pode atingir novos valores, distintos daqueles observados inicialmente. Portanto, a progressão e a regressão do edema são fundamentais na interpretação de α . Ainda assim, esperamos que exista um retorno progressivo de seus valores aos níveis iniciais já que a alteração inflamatória não foi sustentada com a exposição a doses repetidas de *SLS*.

No trabalho de FERREIRA (2006), por meio de inspeção visual, foi demonstrado que a mesma concentração e o mesmo tempo de exposição ao irritante podem levar a resultados diferentes em cada indivíduo. A intensidade da resposta é individual e um único indivíduo também pode apresentar reações variadas quando submetido à mesma exposição em diferentes períodos, ainda que as condições ambientais e individuais, como temperatura corporal e sudorese, mantenham-se estáveis em ambos os casos. Seria esperado, portanto, uma grande variabilidade dos parâmetros.

A irritação da pele de coelhos com uma dose única de *SLS* em diferentes concentrações foi observada pela evolução dos parâmetros de bioimpedância desde o momento anterior à aplicação das câmaras com o irritante até o 5º dia após a sua remoção. A seguir estão dispostos os resultados das estimativas para R_i , R_e e α associados às medidas realizadas em duas profundidades (anel 1 e anel 2), apresentados em boxplots.

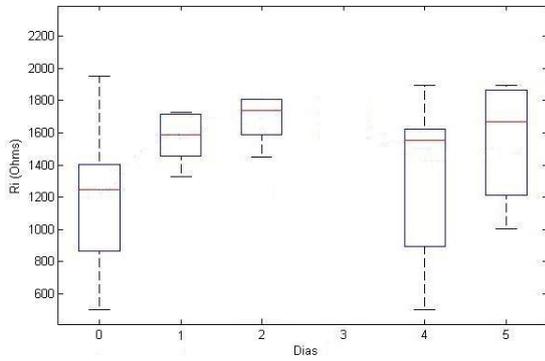
O dia zero corresponde a medidas realizadas antes da aplicação das câmaras. O dia 1 corresponde à medida feita após 24 horas de exposição ao *SLS* nas concentrações de 0% (câmara de referência), 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0%. Os dias 2, 4 e 5 relacionam-se às medidas efetuadas em 24 horas, 72 horas e 96 horas após a remoção das câmaras.

Quanto aos resultados de R_i e R_e , não foi observada diferença estatisticamente significativa para tais valores de resistência entre os dias de observação em quaisquer concentrações ou profundidades (anel 1 e anel 2) pelo teste de Kruskal-Wallis.

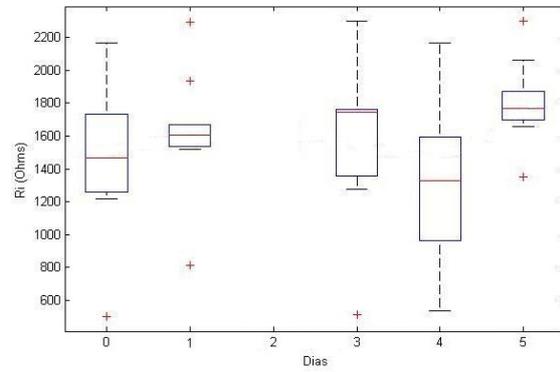
De acordo com a ANOVA, os valores de α entre o dia zero e os dias posteriores à aplicação do *SLS* também não revelaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em quaisquer concentrações para medidas em ambos os anéis.

ANEL 1

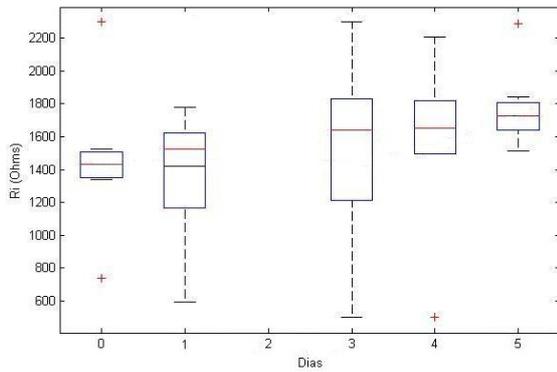
Câmara de referência



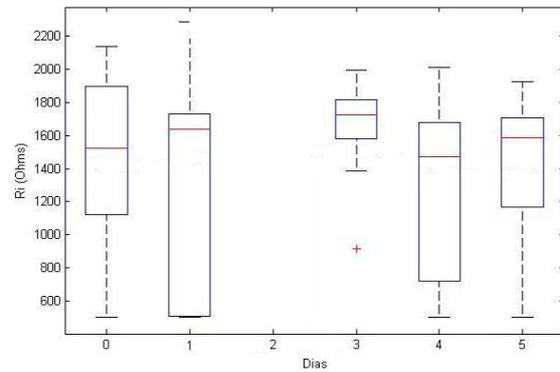
SLS a 0,5%



SLS a 1,0%



SLS a 2,0%



SLS a 5%

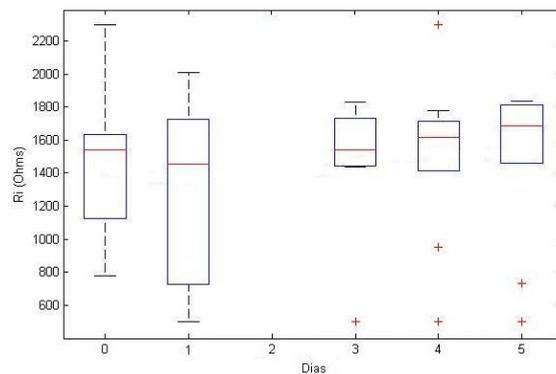
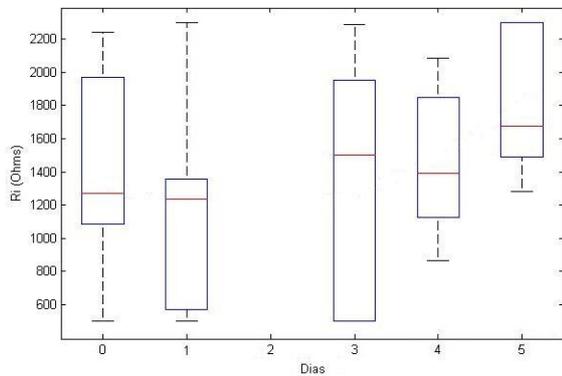


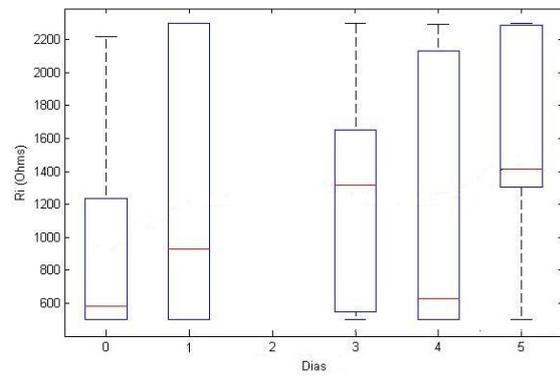
Figura 33 – Boxplot da resistência R_i para as medidas realizadas com o anel 1 do controle (câmara de referência) e nas concentrações de SLS a 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% nos dia zero (antes da aplicação das câmaras), dia 1 (24 horas após a aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes.

ANEL 2

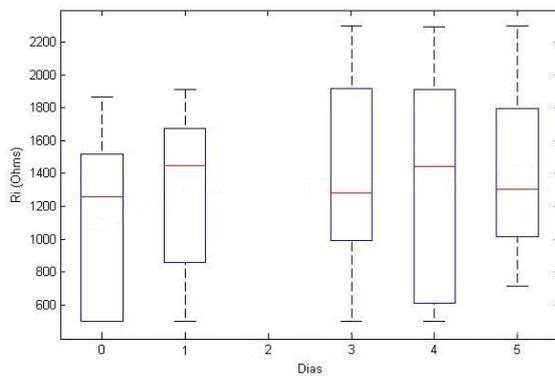
Câmara de referência



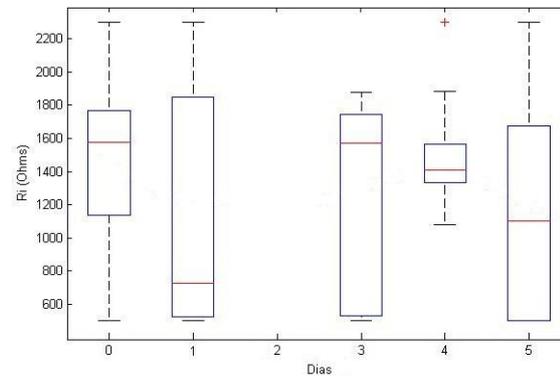
SLS a 0,5%



SLS a 1,0%



SLS a 2,0%



SLS a 5,0%

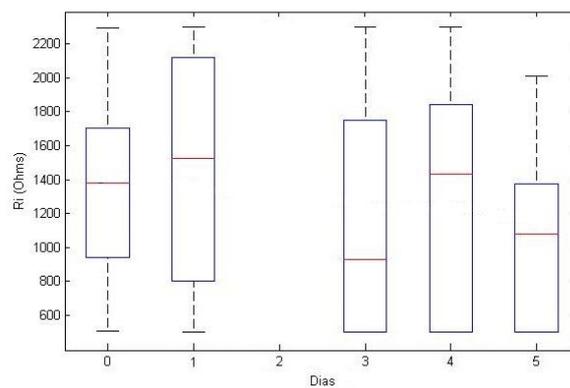
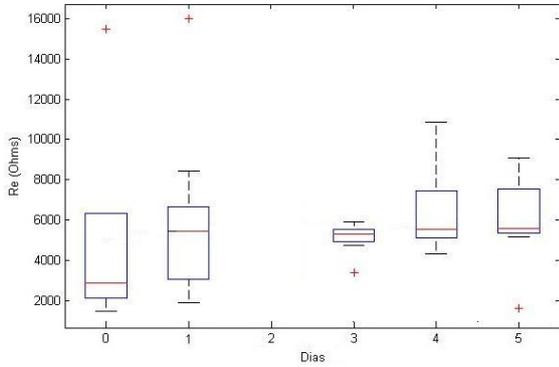


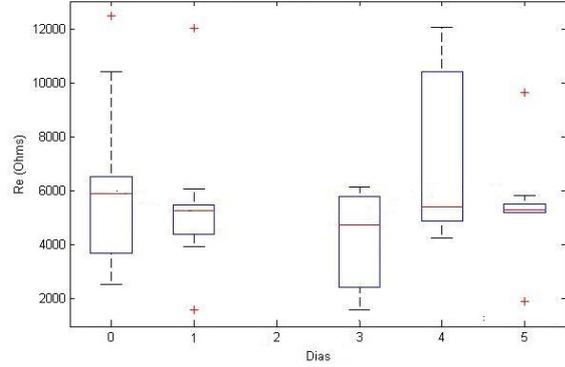
Figura 34 – Boxplot da resistência R_i para as medidas realizadas com o anel 2 do controle (câmara de referência) e nas concentrações de SLS a 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% nos dia zero (antes da aplicação das câmaras), dia 1 (24 horas após a aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes.

ANEL 1

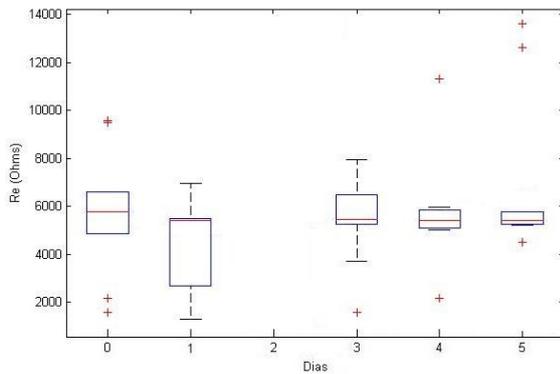
Câmara de referência



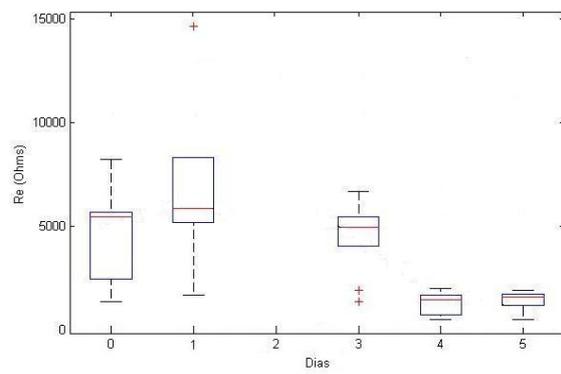
SLS a 0,5%



SLS a 1,0%



SLS a 2,0%



SLS a 5,0%

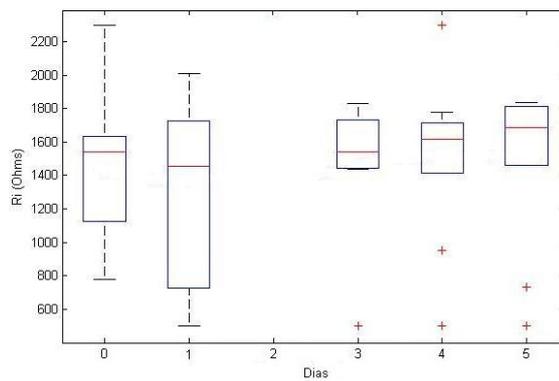
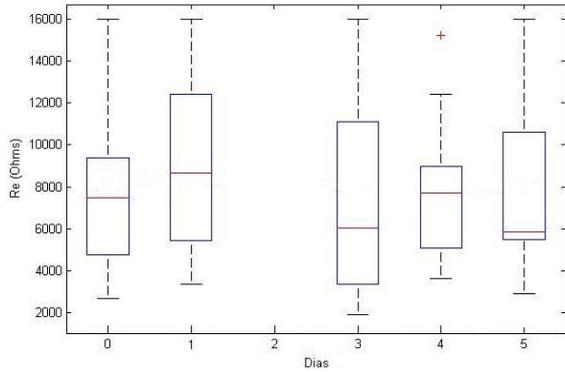


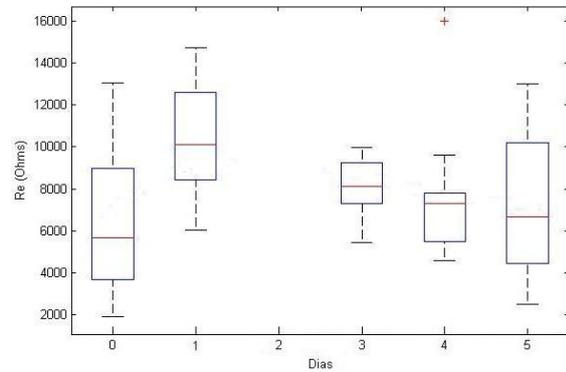
Figura 35 – Boxplot da resistência R_e para as medidas realizadas com o anel 1 do controle (câmara de referência) e nas concentrações de SLS a 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% nos dia zero (antes da aplicação das câmaras), dia 1 (24 horas após a aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes.

ANEL 2

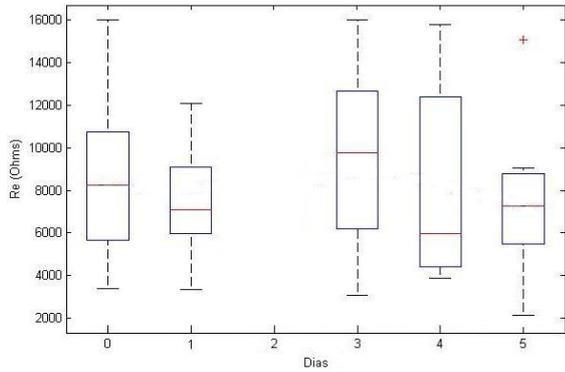
Câmara de referência



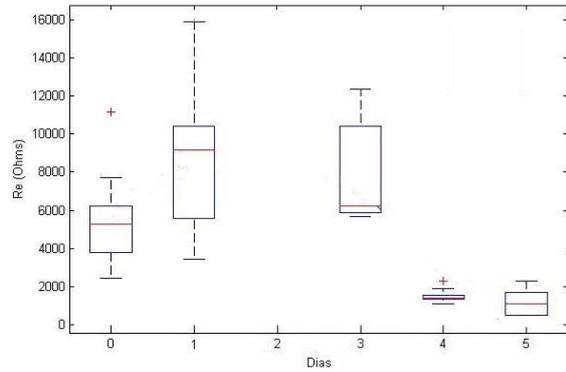
SLS a 0,5%



SLS a 1,0%



SLS a 2,0%



SLS a 5,0%

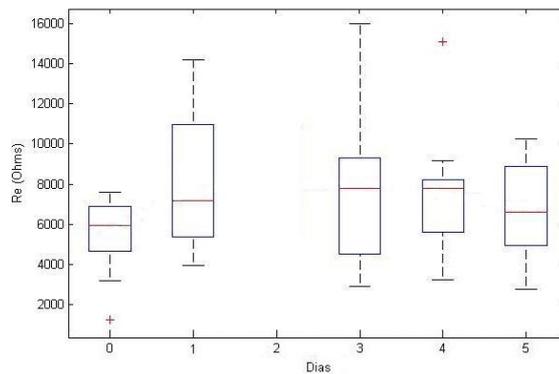
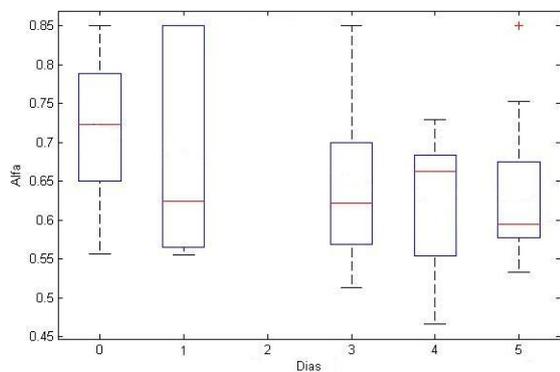


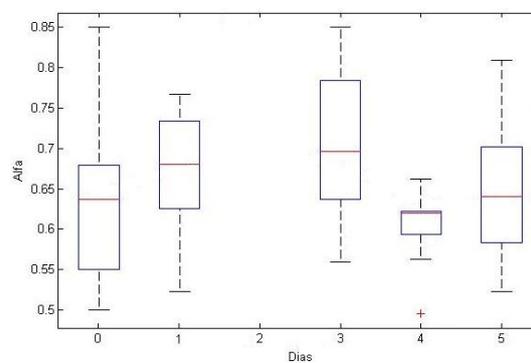
Figura 36 – Boxplot da resistência R_e para as medidas realizadas com o anel 2 do controle (câmara de referência) e nas concentrações de SLS a 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% nos dia zero (antes da aplicação das câmaras), dia 1 (24 horas após a aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes.

ANEL 1

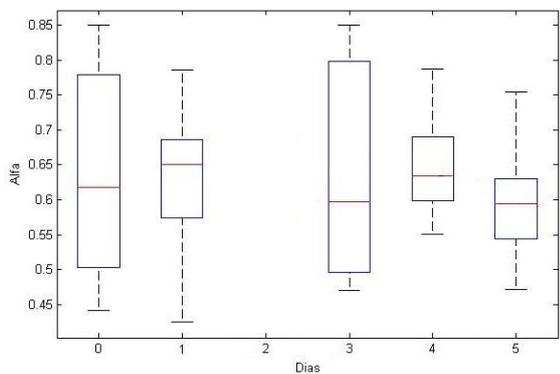
Câmara de referência



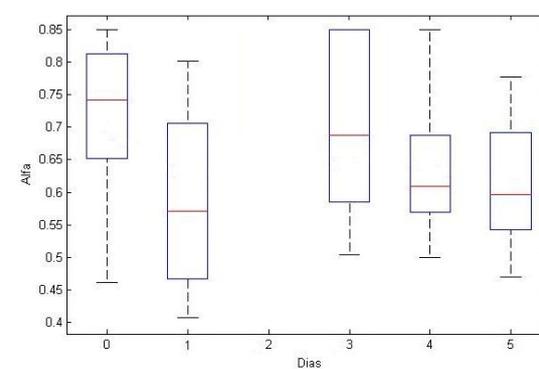
SLS a 0,5%



SLS a 1,0%



SLS a 2,0%



SLS a 5,0%

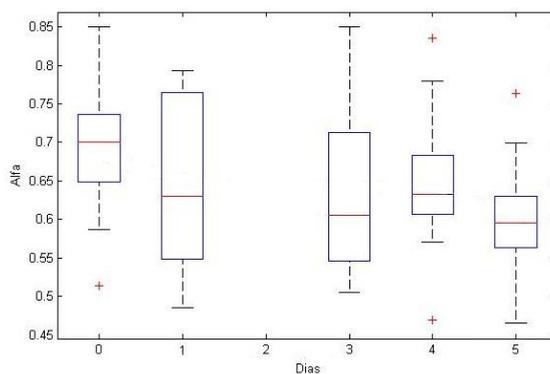
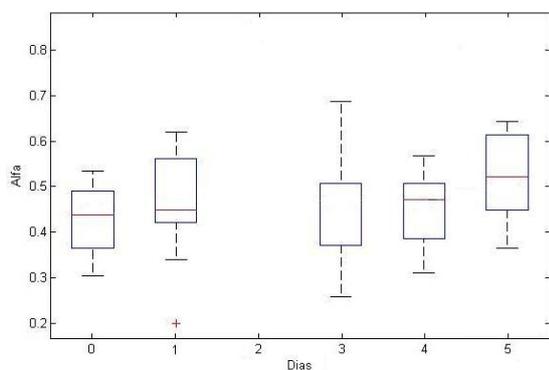


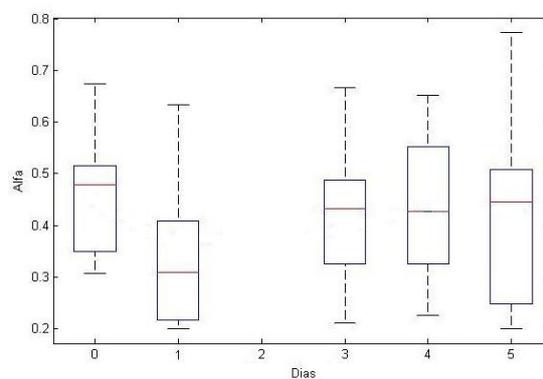
Figura 37 – Boxplot do parâmetro α para as medidas realizadas com o anel 1 do controle (câmara de referência) e nas concentrações de SLS a 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% nos dia zero (antes da aplicação das câmaras), dia 1 (24 horas após a aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes.

ANEL 2

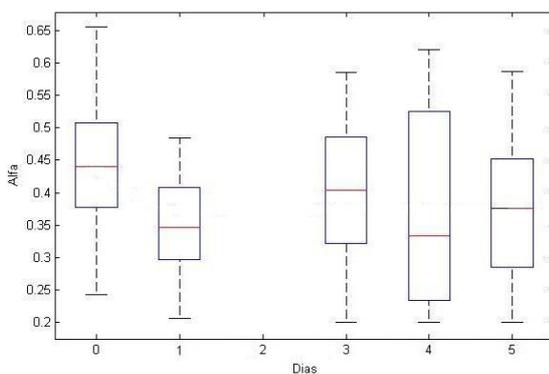
Câmara de referência



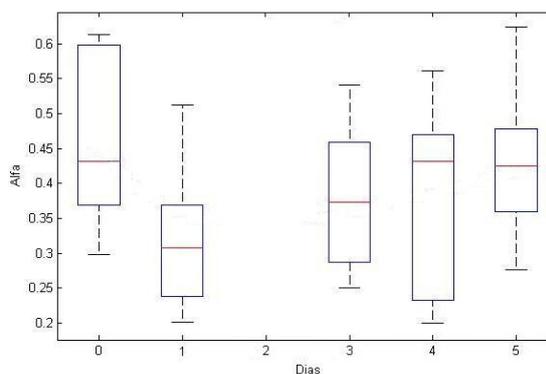
SLS a 0,5%



SLS a 1%



SLS a 2,0%



SLS a 5%

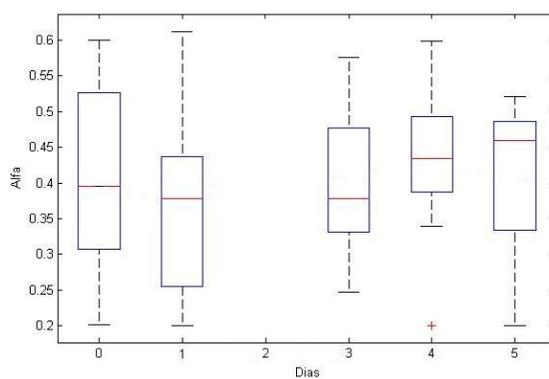


Figura 38 – Boxplot do parâmetro α para as medidas realizadas com o anel 2 do controle (câmara de referência) e nas concentrações de SLS a 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% nos dia zero (antes da aplicação das câmaras), dia 1 (24 horas após a aplicação das câmaras), dia 2 (24 horas após a remoção das câmaras) e nos dias subsequentes.

CAPÍTULO 7

DISCUSSÃO

O estrato córneo é constituído basicamente por corneócitos (anucleados e planos) dispostos lado a lado, formando uma lâmina contínua, e circundados por lipídeos intercelulares. Esta arquitetura, somada a sua característica apolar e ao reduzido conteúdo hídrico, lhe confere a maior contribuição sobre a impedância cutânea. Quaisquer mudanças na composição de lípidos e células repercutirão nas propriedades de condução elétrica do estrato córneo.

Nos estados inflamatórios ocorre uma série de reações locais (vasodilatação, exudação, diapedese de células do sistema imune) que culmina no acúmulo de líquido intersticial nas camadas adjacentes ao vaso sanguíneo. Quando a inflamação é provocada por um irritante tóxico, os eventos são iniciados pela ação direta do agente. Dependendo do tipo, o irritante causa dano epidermal, como a desnaturação de queratinas e remoção dos lipídeos (WIGGER-ALBERTI *et al.*, 2000).

Em seguida ao comprometimento da barreira, ocorre a sensibilização e a inflamação do tecido. As regiões mais profundas da epiderme, as quais mantêm maior proximidade com a vascularização da derme, sofrem danos expressivos. FARTASCH (1997), YANG *et al.* (1995) descreveram um edema intercelular marcante nas camadas nucleadas após 24 horas de exposição ao *SLS*. Logo acima, no estrato córneo inferior, o edema intercelular observado foi focal e produzido já com a concentração de *SLS* a 0,5%. Para esta camada, FARTASCH (1998) também observou um distúrbio do

rearranjo dos corpos lamelares em camadas lipídicas paralelas, diferente do estrato córneo superior, o qual manteve o arranjo lamelar de lipídeos após 24 horas de contato com o *SLS*.

Os eventos que se seguem após 48 horas de exposição são ainda mais complexos, incluindo a proliferação de queratinócitos, proliferação de células epidérmicas e mudanças na diferenciação (WILLIS, 1989).

Apesar de existir uma expectativa quanto à progressão da resposta inflamatória cutânea, este fenômeno é bastante específico para cada indivíduo. Sua intensidade, seu início e fim dependem das características do organismo e das condições de exposição ao meio nocivo, sejam elas por vulnerabilidade do indivíduo exposto, pela potência da agressão ou pela capacidade de resposta ao dano. Em geral, é esperado que a reação ao estímulo nocivo seja exacerbada inicialmente, mas que regrida de forma espontânea. Isto foi observado pela análise dos dados de perda de água transepidérmica, fluxometria e colorimetria, os quais apontam para um aumento da resposta ao irritante logo após a aplicação do mesmo e em seguida a recuperação das condições iniciais (GLOOR *et al.*, 2004).

Diferentemente destas técnicas, a técnica de bioimpedância deste estudo tem como característica a identificação de fenômenos inflamatórios em profundidades distintas da epiderme. Além disto, o parâmetro α do factor descreve a heterogeneidade do tecido e, portanto, trata-se de uma medida do polimorfismo celular e histológico nas fases agudas da inflamação cutânea.

No circuito elétrico proposto, R_e está relacionado à resistência no meio extracelular. A infiltração por líquido inflamatório e as mudanças no conteúdo intercelular estão associadas diretamente ao comportamento de R_e ao longo dos dias. Os valores de R_e para o anel 1 são mais representativos das alterações de condutividade nas porções mais superficiais (estrato córneo). Já os valores de R_e para o anel 2 estão relacionados às porções mais profundas (demais estratos do tecido cutâneo).

Quando há um distúrbio da permeabilidade da barreira por ação de irritantes, ocorre uma alteração no conteúdo lipídico que permite o influxo de água para o estrato córneo (PROKSCH *et al.*, 2008). E já que o conteúdo lipídico do estrato córneo é desfavorável à difusão de água e eletrólitos, o influxo de água facilita o transporte iônico desde os estratos inferiores. Com o maior conteúdo de água e íons, poderia esperar-se uma menor oposição à passagem de corrente pelo estrato córneo, ou seja, uma redução no valor de R_e . No entanto, considerando que o aumento da hidratação das

camadas nucleadas decorre do extravazamento de líquido intravascular (exudato) proveniente do suporte circulatório da derme, é possível que o conteúdo celular e proteico confira menor condutividade ao meio extracelular. Por isto, seria esperado um aumento nos valores de R_e , principalmente no anel 2 (aquele que melhor representa os aspectos das camadas mais internas). Apesar de terem sido observadas curvas de ascensão até o nível máximo em torno de 24 horas após a exposição e declínio subsequente na concentração de 2,0% em ambos os anéis (Figura 35 e Figura 36), não foi possível confirmar este raciocínio pelo atual estudo, já que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de R_e ao longo dos dias.

A hidratação do estrato córneo, o aumento da perda de água transepidérmica e a vasodilatação provocam uma diferenciação nas camadas, cuja morfologia irá se subdividir naquela já apresentada e na nova disposição celular sob hidratação e exudação. As alterações morfológicas detectadas por estudos histopatológicos mostram novos arranjos celulares no tecido cutâneo exposto ao *SLS*. NICANDER *et al.* (1995, 1996) verificaram mudanças como infiltração linfocítica, presença de vesículas espongióticas e desconexões entre os queratinócitos basais da pele exposta ao *SLS* a 2%. Tais achados tendem a interferir no valor de α , pois representam uma mudança na heterogeneidade do tecido. Em medidas de impedância cutânea obtidas por GRIMNES e MARTINSEN (2005), o valor de α decresceu junto ao tempo de penetração de solução eletrolítica sob os eletrodos aplicados à pele do braço. Tal comportamento poderia estar associado ao aumento da heterogeneidade das camadas e isto seria traduzido em uma redução de α . Em fases mais tardias da inflamação, no entanto, o valor de α poderá aumentar progressivamente na medida em que toda a extensão do tecido adquira seu novo aspecto ou até que se retome a conformação original.

Como nas reações agudas há um predomínio de edema e reação inflamatória desde as camadas mais profundas, seria possível que estas camadas revelassem variações de α em maior magnitude do que o estrato córneo. Com isto, as mudanças de α ao longo dos dias de irritação cutânea para o anel 2 podem ser mais evidentes do que aquelas descritas para o anel 1. Logo, seria esperada uma queda nos valores de α após a exposição ao irritante e um retorno ao nível inicial mais evidentes com o aumento da concentração do irritante, principalmente nas medidas com o anel 2. Este raciocínio não foi confirmado pelos achados do atual estudo. Apesar de ter havido uma elevação da α no anel 2 até o nível máximo em torno de 24 horas após a exposição para as concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0%, estes resultados não apresentaram significância

estatística (Figura 37 e Figura 38). Tampouco foi possível verificar uma reação inflamatória diretamente proporcional à concentração do agente.

Como foi mencionado no Capítulo 6, não existiu um padrão específico esperado para a impedância do meio intracelular (R_i). De fato, o comportamento de R_i ao longo dos dias e a ausência de significância estatística não contribuíram para a interpretação dos resultados deste parâmetro (Figura 33 e Figura 34).

Nenhum dos parâmetros apresentou o padrão esperado quando a pele foi submetida à concentração máxima utilizada (5,0%). A técnica de bioimpedância poderia perder seu potencial diagnóstico com o aumento da sensibilização, já que a resposta inflamatória atinge grande complexidade e não haveria mais uma definição clara da contribuição de cada fator para a impedância total do tecido biológico, uma vez que os seguintes fatores teriam papel importante em tal caso: acúmulo de líquido, mudança na constituição protéica e celular e alteração no arranjo das camadas da epiderme.

Quanto à contribuição do cálculo fracional à técnica de bioimpedância, não foi observado um benefício estatisticamente significativo na detecção da mudança na heterogeneidade do tecido, descrita por α , e da alteração de condutividade nos meios extracelular e intracelular, descritos por R_e e R_i , respectivamente. Tanto no estudo de FERREIRA (2006), o qual utilizou uma aproximação na equação que descrevia a impedância do circuito, como no presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para o comportamento destes parâmetros ao longo dos dias em quaisquer concentrações. De forma comparativa, as curvas dos gráficos de FERREIRA (2006) para os componentes modeladores das resistências intracelular (R_1) e extracelular (R_2) mostraram conformações diferentes nas concentrações de *SLS* a 0,5% e 1,0% em relação aos gráficos do presente estudo (Figura 39, Figura 40 e Figura 41).

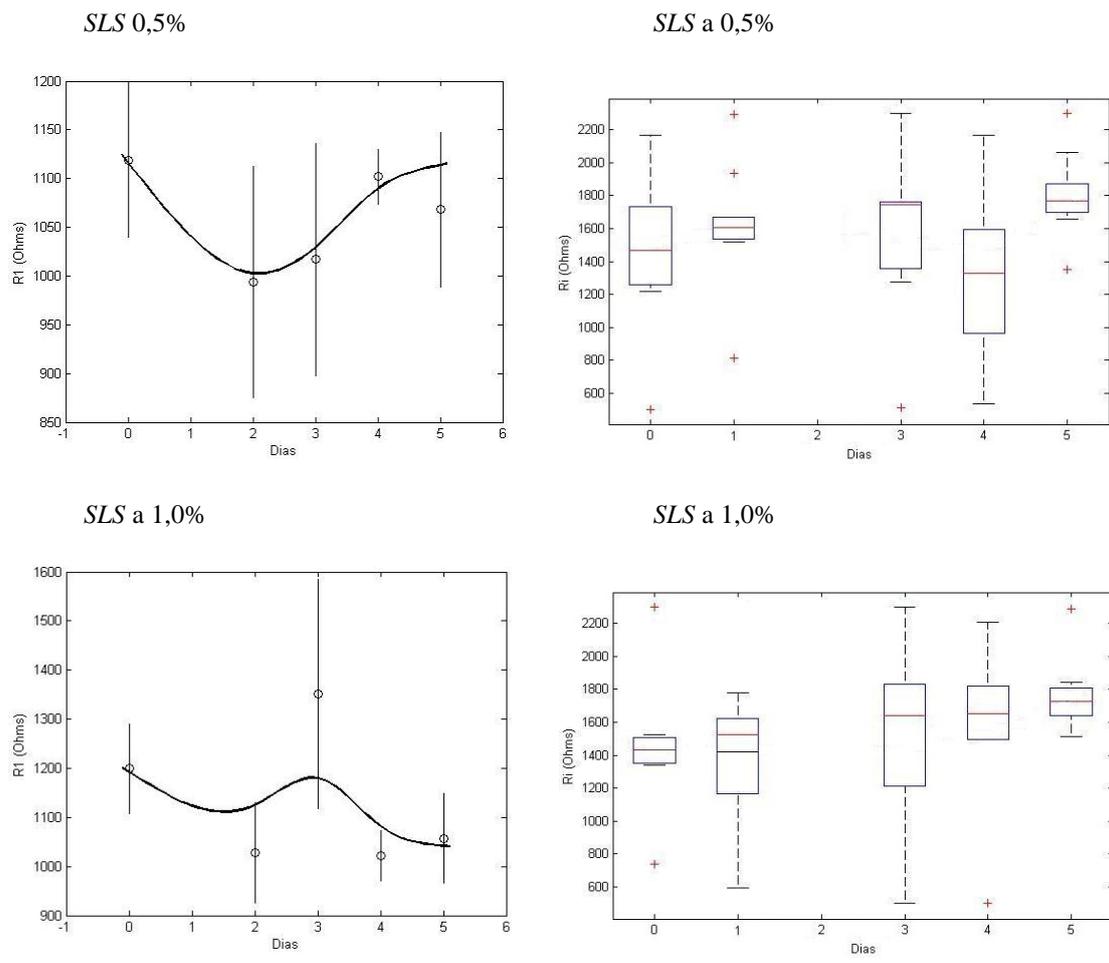


Figura 39 – Boxplot comparativo entre os elementos modeladores da resistência intracelular, R_1 (FERREIRA, 2006) (à esquerda) e R_i (à direita), para medidas com o anel 1, nas concentrações de SLS a 0,5% e 1,0%, ao longo de 5 dias após a aplicação.

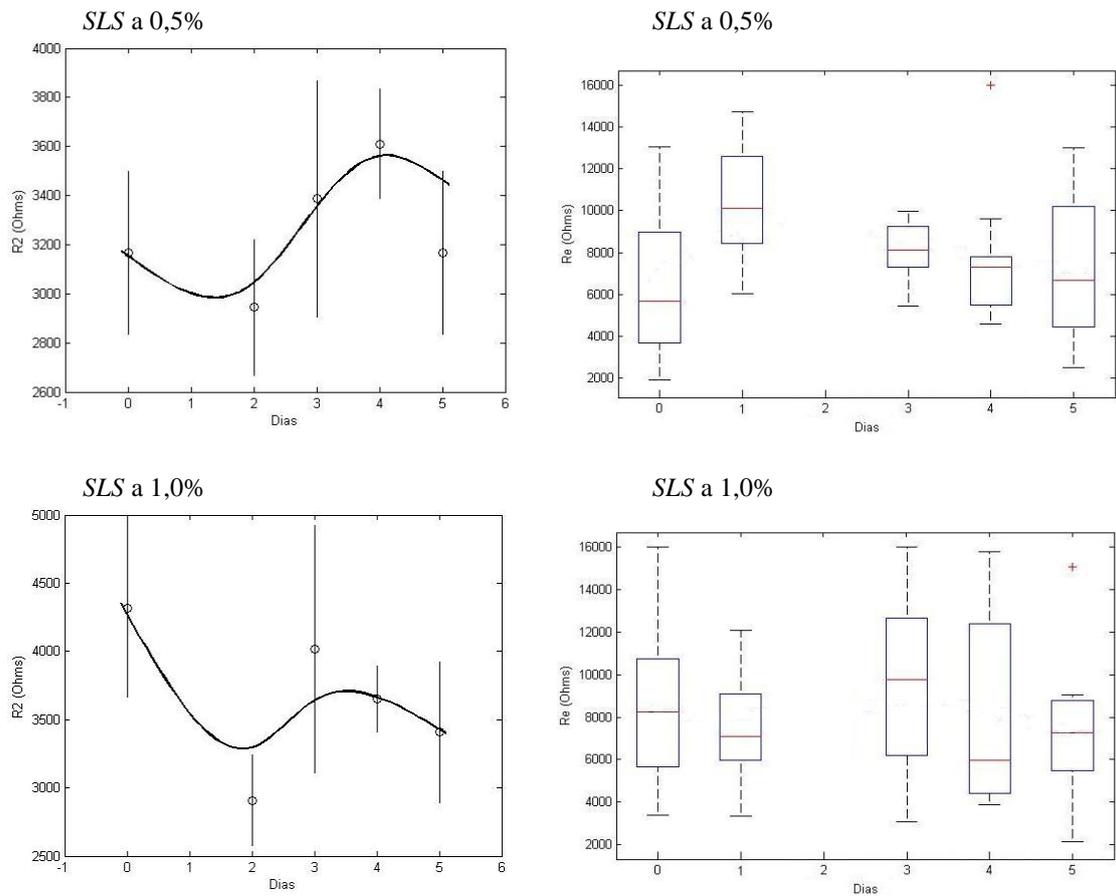


Figura 40 – Boxplot comparativo entre os elementos modeladores da resistência extracelular, R_2 (FERREIRA, 2006) (à esquerda) e R_e (à direita), para medidas com o anel 2, nas concentrações de SLS a 0,5% e 1,0%, ao longo de 5 dias após a aplicação.

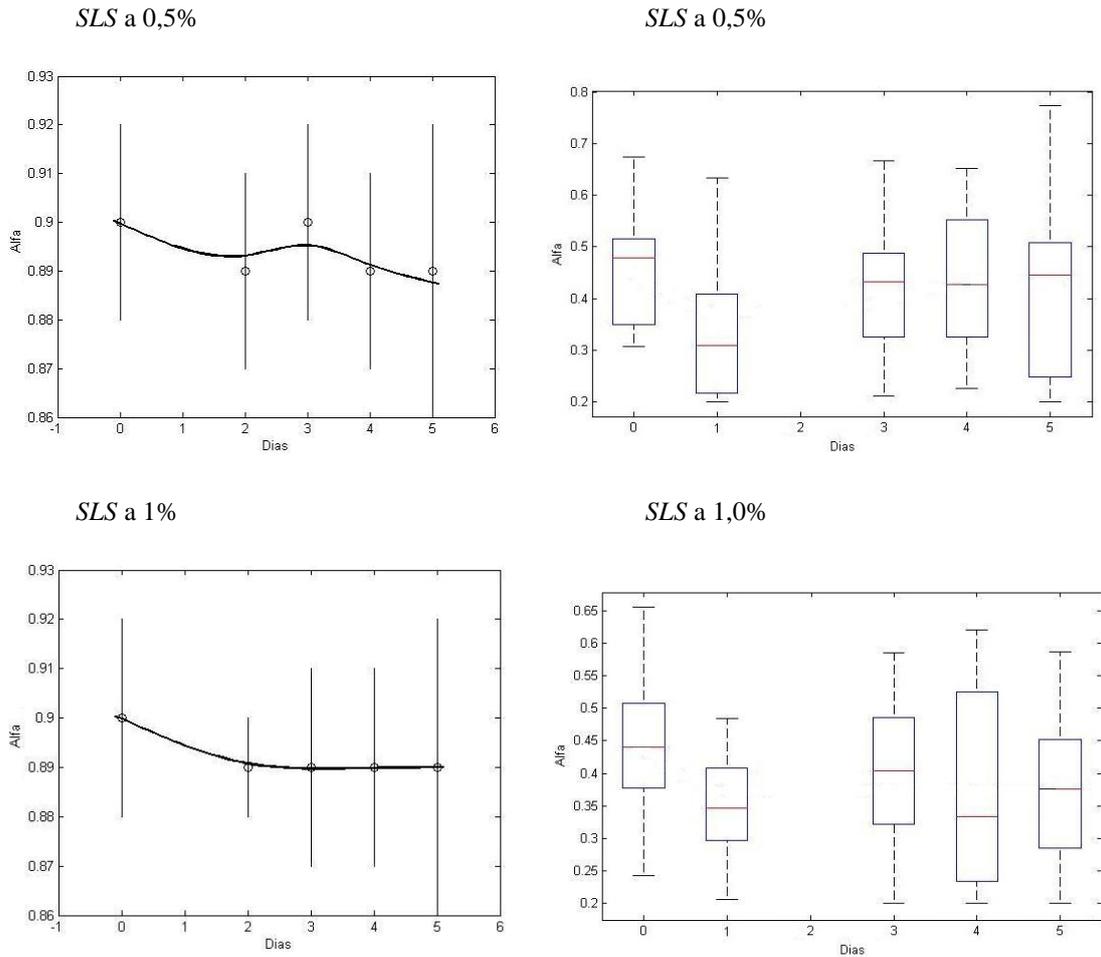


Figura 41 – Boxplot comparativo entre os valores de α obtidos por FERREIRA (2006) (à esquerda) e pelo presente trabalho (à direita) nas concentrações de SLS a 0,5% e 1,0%, ao longo de 5 dias após a aplicação.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi aplicado o cálculo fracional em um problema real de modelagem do sistema biológico. Dados de resposta de corrente ao degrau de tensão associados à pele de coelhos quando submetida ao irritante *SLS* propiciaram a avaliação da reação inflamatória por meio da evolução dos parâmetros de bioimpedância. Tendo como expectativa teórica o pico de inflamação em cerca de 24 horas após uma dose única de *SLS* e a redução gradual de seus níveis nos dias subsequentes, era esperado que os parâmetros do modelo elétrico seguissem um comportamento semelhante, com elevação a um nível máximo e redução progressiva de seus valores. Apesar de isto ter sido observado em algumas concentrações e para alguns componentes do circuito, não é possível afirmar-se que o modelo fracional aumentou o poder diagnóstico da técnica de bioimpedância cutânea.

A reação inflamatória envolve muitos fatores que podem influenciar a bioimpedância de forma variada e em diferentes momentos da evolução. Para verificar a contribuição desta ferramenta matemática à solução analítica de equações de bioimpedância, seria necessário o uso de sistemas de menor complexidade.

Além disto, é importante verificar a adequação do modelo, pois a simplificação do circuito elétrico para a pele pode não ter sido adequada à interpretação das mudanças bioelétricas devido à complexidade do sistema. Testar modelos com situações mais simples pode oferecer mais informações neste âmbito.

São necessários maiores estudos para o uso do cálculo fracional na área de bioimpedância, já que os resultados observados não forneceram uma melhor expectativa para a interpretação fisiológica do fenômeno inflamatório cutâneo.

Algumas propostas para os próximos estudos seriam:

- (1) A reprodução *in vitro* da resposta inflamatória cutânea, permitindo um maior controle das variáveis ambientais e individuais;
- (2) A normalização dos dados, a fim de reduzir o problema da grande variabilidade interindividual e intraindividual e aumentar a sensibilidade da técnica;
- (3) O aperfeiçoamento do programa computacional de forma a obter um ajuste dos parâmetros mais preciso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, N. H., 1823, *Solution de quelques problèmes à l'aide d'intégrales définies*, v.1, Oeuvres Complètes, Norway.
- ÅBERG, P., 2002, "Electronic biopsies – applications and data analysis". D.Sc. Thesis, Medical Laboratory Science and Technology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
- ÅBERG, P., NICANDER, I., HANSSON, J., *et al.*, 2004, "Skin Cancer Identification Using Multifrequency Electrical Impedance — A Potential Screening Tool", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 51, pp. 2097-2102.
- ÅBERG, P., GELADI, P., NICANDER, I., *et al.*, 2005, "Non-invasive and microinvasive electrical impedance spectra of skin cancer – a comparison between two techniques", *Skin Research and Technology*, v. 11, pp. 281-286.
- AGNER, T., SERUP, J., 1990, "Individual and instrumental variations in irritant patch test reactions: Clinical evaluation and quantitation by bioengineering methods", *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 15, pp. 29-33.
- ALBANESI, C., SCARPONI, C., GIUSTIZIERI, M. L., GIROLOMONI, G., 2005, "Keratinocytes in Inflammatory Skin Diseases", *Current Drug Target. Inflammation & Allergy*, v. 4, n. 3, pp. 329-334.
- 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.
- ALVARENGA, R. L., SOUZA, M. N., "Bioimpedância Muscular para Determinação Não Invasiva de Limiar de Lactato", *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, São Pedro, São Paulo, 2006.

- 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.
- ARAMAKI, J., EFFENDY, I., HAPPLE, R., *et al.*, 2001, “Which bioengineering assay is appropriate for irritant patch testing with sodium lauryl sulfate?”, *Contact Dermatitis*, v. 45, pp. 286-290.
- BEETNER D. G., KAPOOR, S., MANJUNATH, S., *et al.*, 2003, “Differentiation among basal cell carcinoma, benign lesions, and normal skin using electric impedance”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 50, pp. 1020-1025.
- BIRGERSSON, U., BIRGERSSON, E., ÅBERG, P., NICANDER, I., OLLMAR, S., 2011, “Non-invasive bioimpedance of intact skin: mathematical modeling and experiments”, *Physiological Measurement*, v. 32, pp. 1-18.
- BELSITO, D. V., 2005, “Occupational contact dermatitis: etiology, prevalence, and resultant impairment/disability”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 53, pp. 303-313.
- BOLFE, V. J., RIBAS, S. I., MONTEBELO, M. I. L., *et al.*, 2007, “Comportamento da impedância elétrica dos tecidos biológicos durante estimulação elétrica transcutânea”, *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v. 11, n. 2, p. 153-159.
- BOULAIS, N., PEREIRA, U., LEBONVALLET, N., GOBIN, E., DORANGE, G. ROUGIER, N., CHESNE, C. MISERY, L., 2009, "Merkel Cells as Putative Regulatory Cells in Skin Disorders: An In Vitro Study", *PLoS One*, v. 4, n. 8, e6528.
- BRANCO, N., LEE, I., ZHAI H., *et al.*, 2005, “Long-term repetitive sodium lauryl sulfate-induced irritation of the skin: an in vivo study”, *Contact Dermatitis*, v. 53, pp. 278-284.
- BROWN, B. H., 2003, “Electrical impedance tomography (EIE): a review”, *Journal of Medical Engineering Technology*, v. 27, n. 3, pp. 97-108.
- CHILCOTT, R. P., DALTON, C. H., EMMANUEL, A. J., *et al.*, 2002, “Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function *in vitro*”, *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 118, pp. 871-875.

- CHOI, C. M, BENNETT, R. G., 2003, "Laser Dopplers to determine cutaneous blood flow", *Dermatologic Surgery.*, v. 29, pp. 272-280.
- CLONIDINE TRANSDERMAL SYSTEM MEETING, 2003. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, april 29, 12:30 pm, Rockville, Maryland. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/cder/ogd/0429clon.pdf>>. Acesso em 24 nov. 2008.
- COLE, K. S., 1932, "Electric phase angle of cell membranes", *The Journal of General Physiology*, v.15, pp. 641-649.
- COLE, K. S., 1940, "Permeability and impermeability of cell membranes for ions", *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 8, pp. 110-112.
- COLE, K. S., COLE, R. H., 1941, "Dispersion and adsorption in dielectrics", *J. Chem. Rev.*, v. 9, pp. 341-352.
- COURAGE & KHAZAKA, 1998, *pH 900. Manufacturer's manual*.
- DEBYE, P., 1929, *Polar Molecules*, 1 ed., Chemical Catalog Co, New York.
- DICKEL, H., KUSS, O., SCHMIDT, A., KRETZ, J., DIEPGEN, T. L., 2002, "Importance of irritant contact dermatitis in occupational skin disease", *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 3, n. 4, pp. 283-289.
- DI NARDO, SUGINO, K., WERTZ, P., *et al.*, 1996, "Sodium lauryl sulfate (SLS) induced irritant contact dermatitis: a correlation study between ceramides and in vivo parameters of irritation", *Contact Dermatitis*, v. 35, pp. 86-91.
- DUARTE, I., LAZZARINI, R., BUENSE, R. *et al.*, 2000, "Dermatite de contato", *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 75, pp. 529-548.
- EHLERS, C., IVENS, U. I., MØLLER, M. L., *et al.*, 2001, "Comparison of two pH meters used for skin surface pH measurement: the pH meter 'pH900' from Courage & Khazaka versus the pH meter '1140' from Mettler Toledo", *Skin Research Technology.*, v. 7, pp. 84-89.
- ENDO, K., SUZUKI, N., YOSHIDA, O., *et al.*, 2007, "The barrier component and the driving force component of transepidermal water loss and their application to skin irritant tests", *Skin Research and Technology*, v. 13, pp. 425-435.
- 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.

- EMTESTAM, L., KUZMINA, N., TALME, T., 2007, "Evaluation of the effects of topical clobetasol propionate by visual score, electrical impedance and laser Doppler flowmetry", *Skin Research Technology*, v. 13, pp. 73-78.
- EUN, H. C., 1995, "Evaluation of skin blood flow by laser Doppler flowmetry", *Clinics in Dermatology*, v. 13, pp. 337-347.
- FARTASCH, M., 1997, "Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation", *Microsc. Res. Tech.*, v. 37, pp. 193-199.
- FARTASCH, M., SCHRETZ, E., DIEPGEN, T., 1998, "Characterisation of detergent-induced barrier alteration", *J. Invest. Dermatol.*, v. 3 (suppl.), pp. 121-127.
- FERREIRA, D. O., SILVA, C. S., SOUZA, M. N., "Aplicação da Impedância Elétrica na Determinação de Alterações da Pele Provocadas por Produtos Químicos", *IFMBE Proceedings do III Congresso Latinoamericano de Engenharia Biomédica*, João Pessoa, v. 5, n. 1, pp. 641-644, 2004.
- 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., 2006, *Estudo da Impedância Elétrica na Determinação de Alterações da Pele provocadas por Irritantes Químicos*, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FERREIRA, D. M., SILVA, C. S., SOUZA, M. N., 2007, "Electrical impedance model for evaluation of skin irritation in rabbits and humans", *Skin Research and Technology*, v. 13, pp. 259-267.
- FLUHR, J. W., FEINGOLD, K. R., ELIAS, P. M., 2006, "Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models", *Experimental Dermatology*, v. 15, pp. 483-492.
- FOUSSERAUX, J., 1984, "History of epicutaneous tests: the blotting-paper and other methods", *Contact Dermatitis*, v. 11, pp. 219-223.
- FULLERTON, A. Q., FISHER, T., LAHTI, A. Q., *et al.*, 1996, "Guidelines for the measurement of skin color and erythema", *Contact Dermatitis*, v. 35, pp. 1-10.
- FULLERTON, A., STÜCKER, M., WILHELM, K. P., *et al.*, 2002, "Guidelines for visualization of cutaneous blood flow by laser Doppler perfusion imaging: A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis based upon the HIRELADO European community project", *Contact Dermatitis*, v. 46, pp. 129-140.

- GAWKRODGER, D. J., 2002, *Dermatology: An Illustrated Colour Text*, 3 ed., Edinburgh, Churchill Livingstone.
- 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*, 1 ed., 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.
- GRIMNES, S., MARTINSEN, Ø. G., 2008, *Bioimpedance & Bioelectricity*, 2 ed., London, Academic Press.
- GROVE, G. L., GROVE, M. J., "Objective Methods for Assessing Skin Surface Topography Noninvasively", 1989. In: Leveque, J. (ed), *Cutaneous Investigation in Health and Disease: Noninvasive Methods and Instrumentation*, chapter 1, New York, Marcel Dekker.
- HÖBER, R., 1910. Eine Methode die elektrische Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Arch. Ges. Physiol.*, v. 133, pp. 237-259.
- HÖBER, R., 1912, Ein zweites Verfahren die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen *Arch. Ges. Physiol.*, v. 148, pp. 189-221.
- HUNTER, J. A. A., SAVIN, J. A., DAHL, M. V., 2002, *Clinical Dermatology*, 3 ed., Oxford, Blackwell Publishing.
- KILBAS, A. A., SRIVASTAVA, H. M., TRUJILLO, J.J., 2006, *Theory and Applications of Fractional Differential Equations*, v. 204, 1 ed., NorthHolland Mathematics Studies, Elsevier, Amsterdam.
- KIRYAKOVA, V., 1994, *Generalized Fractional Calculus and Applications*, Pitman Research Notes in Mathematics, n. 301, Longman, Harlow.
- 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.

- KULKARNI, N. A., 2005, *Effects of manufacturing conditions, stresses, temperature and humidity on the performance of an innovative fractional order control device*, M.Sc. Thesis, Montana State University, Bozeman, Montana, EUA.
- KUZMINA, N., DUVAL, C., JOHANSSON, S., *et al.*, 2003, "Assessment of irritant skin reactions using electrical impedance – a comparison between 2 laboratories", *Contact Dermatitis*, 2003, v. 49, pp. 26-31.
- KUZMINA, N., NYRÉN, M., LODÉN, M., 2005, "Effects of pretreatment with a urea-containing emollient on nickel allergic skin reactions", *Acta Derm Venereol.*, v. 85, pp. 9-12.
- LEE, C. H., MAIBACH, H. I., 2004, "Sodium Lauryl Sulfate in Dermatotoxicology". In: Zhai, C. H., Maibach, H. I. (eds), *Dermatotoxicology*, 6 ed., chapter 26, Boca Raton, CRC Press.
- LEE, C. H., MAIBACH, H. I., 2006, "Sodium Lauryl Sulfate". In: Chew, A., Maibach, H. I. (eds), *Irritant Dermatitis*, chapter 30, Berlin, Springer Publishing Company.
- LEVIN, C. Y., MAIBACH, H. I., 2002, Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? *International Immunopharmacology*, v. 2, pp. 183-189.
- LINE, P. D., MOWINCKEL, P., LIEN, B., *et al.*, 1992, "Repeated measurement variation and precision of laser Doppler flowmetry measurements", *Microvascular Research*, v. 43, pp. 285-293.
- MAGIN, R. L., 2006, *Fractional Calculus in Bioengineering*, 1 ed., Begell House, Connecticut.
- MAJNO, G., JORIS, I., 1995, "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death", *American Journal of Pathology*, v. 146, pp. 3-15.
- MCCLENDON, J. F., 1926a, Colloidal Properties of the Surface of the Living Cell. I. Conductivity of Blood to Direct Electric Currents, *J. Biol. Chem.*, v. 68, pp. 653-663.
- MCCLENDON, J. F., 1926b, Colloidal Properties of the Surface of the Living Cell. II. Electric Conductivity and Capacity of Blood to Alternating Currents of Long Duration and Varying in Frequency from 260 to 2,000,000 cycles per second, *J. Biol. Chem.* 69, pp. 733-754.
- MENDONÇA, D. O. , ZAEYEN, E. J. B., SOUZA, M. N., "Assessment of Fluid Balance in Neonates Using Biimpedance", *CD ROM Proceedings of the 23rd International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Istanbul, Turkey, pp. 1-4, 2001.

- MENDONÇA, D. O., 2002, "Monitorização do Balanço Hídrico em Neonatos Através de Bioimpedância", M.Sc., 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.
- MILLER, K. S., ROSS, B., 1993, *An Introduction to the Fractional Calculus and Fractional Differential Equations*, ed., Wiley & Sons, New York.
- MITCHELL, R. N., COTRAN, R. S., 2003a, "Acute and Chronic Inflammation". In: Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L. (eds), *Robbins Basic Pathology*, 7 ed., chapter 2, Philadelphia, W. B. Saunders.
- MITCHELL, R. N., COTRAN, R. S., 2003b, "Cell Injury, Cell Death and Adaptations". In: Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L. (eds), *Robbins Basic Pathology*, 7 ed., chapter 1, Philadelphia, W. B. Saunders.
- NETZLAFF, F., KOSTKA, K., LEHR, C., *et al.*, 2006, "TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 63, p. 44-50.
- 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.
- 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.

- NEVES, C. E. B., 2006, "Estimativa da Composição Corporal por Espectroscopiade Impedância Bio-Elétrica Bipolar em Indivíduos com Sobrepeso e Obesidade", Tese D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, BR.
- NEUMAN, R. N., 1992, "Biopotential electrodes". In: Webster, J. G. (ed), *Medical Instrumentation*, Houghton Mifflin, Boston.
- 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., NYRÉN, M., EMTESTAM, L., *et al.*, 1997, "Baseline electrical impedance measurements at various skin sites related to age and sex", *Skin Research and Technology*, v. 3, pp.252-258.
- NICANDER, I., 1998, *Electrical impedance related to experimentaly induced changes of human skin and oral mucosa*. DSc. Thesis, Kongl Carolinska Medico Chirurgiska Institutet, Stockholm.
- 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.
- NICANDER, I., OLLMAR, S., 2004, "Clinically normal atopic skin vs. non-atopic skin as seen through electrical impedance", *Skin Research and Technology*, v. 10, pp. 178-183.
- NILSSON, G. E., TENLAND, T., ÖBERG, P. A., 1980, "Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow", *IEEE Transactions on Biomedical Engeneering*, v. 27, pp. 597-604.
- 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.

- NYRÉN, M., HAGSTRÖMER, L., EMTESTAM, L. 1999, “On assessment of skin reactivity using electrical impedance”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 873, pp. 214-220.
- NYRÉN, M., KUZMINA, N., EMTESTAM, L., 2003, “Electrical impedance as a potential tool to distinguish between allergic and irritant contact dermatitis”, *J Am Acad Dermatol.*, v. 48, pp. 394-400.
- OLDHAM, K. B., SPANIER, J., 1974, *The Fractional Calculus: Theory and Applications of Differentiation and Integration to Arbitrary Order*, Academic Press, New York, London.
- 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., NYRÉN, 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, NICANDER, 1995, “Information in multi-frequency measurement on intact skin”, *Innov Tech Biol Med*, v. 16, pp. 745-751.
- PARRA, J. L., PAYE, M., THE EEMCO GROUP, 2003, “EEMCO Guidance for the in vivo Assessment of Skin Surface pH”, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.*, v. 16, pp. 188-202.
- PICCOLI, A., PASTORI, G., GUIZZO, M., *et al.*, 2005, “Equivalence of information from single versus multiple frequency bioimpedance vector analysis in hemodialysis”, *Kidney Int.*, v. 67, pp. 301-313.
- PINSON, E. A., 1942. “Evaporation from human skin with sweat glands inactivated”, *The American Journal of Physiology*, v. 187, pp. 492-503.
- PLIQUETT, F., PLIQUETT, U., 1996, “Passive electrical properties of human stratum corneum in vitro depending on time after separation”, *Biophysical Chemistry*, v. 58, pp. 205-210.
- PODLUBNY, I., 1999, *Fractional Differential Equations*, Academic Press, San Diego.
- PODLUBNY, I., 2005, “MLF.m” algorithm at file-exchange section of Mathworks. Disponível em: <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/8738-mittag-leffler-function>. Acesso em: 04 março 2011.

- PROKSCH, E., FÖLSTER-HOLST, R., JENSEN, J., 2006, "Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema", *Journal of Dermatological Science*, v. 43, pp. 159-169.
- PROKSCH, E., BRANDNER, J. M., JENSEN, J. M., 2008, "The skin: an indispensable barrier", *Exp. Dermatol.*, v. 17, pp. 1063-1072.
- POON, C., CHOY, T., "Frequency dispersion of human skin dielectrics", *Biophys. J.*, v. 34, pp. 135-147.
- SAMKO, S. G., KILBAS, A. A., MARICHEV, O. I., 1993. *Fractional Integrals and Derivatives: Theory and Applications*, Gordon and Breach Science, Amsterdam.
- SCHMID-WENDTNER, M. H., KORTING, H. C., 2006, "The pH of the skin and its impact on the barrier function", *Skin Pharmacol Physiol.*, v. 19, pp. 296-302.
- 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.
- SEIDENARI, S., PELLACANI, G., 2005, "Ultrasound and Water in the Stratum Corneum". In: Fluhr, J., Elsner, P., Berardesca, E., Maibach, H. I. (eds), *Bioengineering of the Skin: Water and Stratum Corneum*, 2 ed., chapter 6, Boca Raton, CRC Press.
- SEIDENARI, S., PELLACANI, G., 2006, "Quantitative Sonography for the Evaluation of Irritant Reactions". In: Chew, A., Maibach, H. I. (eds), *Irritant Dermatitis*, chapter 24, Berlin, Springer Publishing Company.
- SERUP, J., 2001, "Non-invasive Techniques for Quantification of Contact Dermatitis". In: Rycroft, R. J. G., Menne, T., Frosch, P. J., Lepoittevin, J. (eds), *Textbook of Contact Dermatitis*, 3 ed., chapter 28, Berlin, Springer-Verlag.
- SLODOWNIK, D., LEE, A., NIXON, R., 2008, "Irritant contact dermatitis: A review", *Australasian Journal of Dermatology*, v. 49, p. 1-11.
- SMITH, H. R., BASKETTER, D. A., MCFADDEN, J. P., 2002, "Irritant dermatitis, irritancy and its role in allergic contact dermatitis", *Clinical and experimental dermatology*, v. 27, pp. 138-146.
- SOSA M., BERNAL-ALVARADO, J., JIMÉNEZ-MORENO M., *et al.*, 2005, "Magnetic field influence on electrical properties of human blood measured by impedance spectroscopy", *Bioelectromagnetics*, v. 26, pp. 564-570.

- TAGAMI, H., 1994, "Quantitative measurements of water concentration of the stratum corneum in vivo by high-frequency current", *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, v. 185, pp. 29-33.
- TREGGAR, R. T., 1966, *Physical functions of skin*, Academic Press, New York.
- TUPKER, R. A., WILLIS, C., BERARDESCA, E., *et al.*, 1997, "Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis", *Contact Dermatitis*, v. 37, pp. 53-69.
- VIRCHOW, R. L. K., 1860, *Cellular Pathology: As Based Upon Physiological and Pathological Histology*, 2 ed., London, John Churchill.
- WAHLBERG, J. E., MAIBACH, H. I., 1980, "Nonanoic acid irritation – a positive control at routine patch testing?", *Contact Dermatitis*, v. 6, pp. 128-130.
- WEBSTER, J. G., Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering [S.l.]: Google Book Search, 2000. Disponível em:
<<http://books.google.com>>. Acesso em: 28 nov. 2008.
- WIGGER-ALBERTI, W., KREBS, 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, pp. 551-556.
- WILKEL, C. S., 2007, "Psoriasiform and Spongiotic Dermatoses". In: Grant-Kels, J. M. (ed), *Color Atlas of Dermatopathology*, chapter 4, Boca Raton, CRC Press.
- WILLIS, C. M., STEPHENS, C. J., WILKINSON, J. D., 1989, "Epidermal changes induced by irritants in man: a light and electron microscopic study", *J. Invest. Dermatol.*, v. 93, pp. 695-699.
- WILSON, E., 1865, *The Student's Book of Cutaneous Medicine and Diseases of the Skin*, 1 ed., New York, William Wood.
- YANG, L., MAO-QIANG, M., TALJEBINI, M., ELIAS, P. M., FEINGOLD, K. R., 1995, "Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment", *Br. J. Dermatol.*, v. 133, 679-685.

ANEXO I

Algoritmo computacional

```
%-----  
function lambda = calcula82c(Arquivo)  
  
% Le arquivo de dados experimentais  
dados = load(Arquivo);  
clear t tg tgz zz zzg  
global t tg tgz zz zzg;  
  
i = dados(2:end);  
vd = 0.5;  
fs = 500000;  
t = (0:63)/fs;  
v = ones(size(t))*vd;  
tg = (0:20);  
  
[zz,resto] = deconv([v;v],[i]);  
zz = [zz(1); fs*zz(2:length(i))];  
zzg=zz(2:length(tg));  
tgz=tg(2:end);  
  
%Dados de Coelho  
ri0 = 1.6e3;  
re0 = 5.5e3;  
ro0 = 1.8e3;  
tau_alf0 = 7.3e-5;  
alf0 = 0.5;  
ce0 = 5e-4;  
  
lam = [ri0 re0 ro0 tau_alf0 alf0 ce0];
```

```

opcoes = optimset('Display','off','TolFun',1e-
4,'TolX',1e1,'MaxIter',300,'MaxFunEvals',7000);

% Chama rotina para otimizar os parametros da equação teórica
lambda = fminsearch('fit_zz11',lam,opcoes);

%-----
function err = fit_zz11(lambda)

% Sobre a função mlf3
%     MLF (alpha,beta,Z,P) é a função de Mittag-Leffler  $E_{\{\alpha,\beta\}}(Z)$ 
%     avaliada com a acurácia de  $10^{(-P)}$  para cada elemento de Z.
% (C) 2001-2005 Igor Podlubny, Martin Kacena

global t tg tgz zz zzg erro Plothandle
tgg = tg(2:end)*1e-6;
ri=lambda(1);
re=lambda(2);
r0=lambda(3);
tau=lambda(4);
alf=lambda(5);
tau_alf=tau^alf;
ce=lambda(6);

omega = r0/((re+ri)*tau_alf);
rinf = (ri*re)/(ri+re);
mittag = mlf3(alf,alf,((-omega)*tgg.^alf));
zzt = 1/ce-(rinf*omega*tgg.^(alf-1).*mittag')+((r0*rinf*tgg.^(alf-
1).*mittag')/(ri*tau_alf));

set(Plothandle,'ydata',zzt)
drawnow

erro = 0;

```

```

errom= max(zzg)*10000;

if ce<0 erro = erro + errom*abs(ce); end;
if (ri<500 | ri>2300) erro = erro + errom*abs(ri); end;
if (re<100 | re>16000) erro = erro + errom*abs(re); end;
if (alf<0.2 | alf>0.85) erro = erro + errom*abs(alf); end;

err = norm(((zzt - zzg')./zzg'),2) + erro;

%-----
% function [e]=mlf3(alf,bet,Z,P);
% MLF -- Mittag-Leffler function.
%      MLF (alpha,beta,Z,P) is the Mittag-Leffler function  $E_{\{\alpha,\beta\}}(Z)$ 
%      evaluated with accuracy  $10^{(-P)}$  for each element of Z.
% (C) 2001-2005 Igor Podlubny, Martin Kacena

function [e]=mlf3(alf,bet,c,fi);

if nargin<4 , fi=6;          end
%if nargin<3 | alf<=0 | fi<=0
% else

[r,s]=size(c); [r1,s1]=size(alf); [r2,s2]=size(bet);
mx=max([r,s]); mx1=max([r1,s1]); mx2=max([r2,s2]);
if (r>1 & s>1) | (r1>1 & s1>1) | (r2>1 & s2>1) | (mx1>1 & mx2>1)
    sprintf('wrong number of input parameters')
else
    if mx1>mx2 , mxx=mx1; e=zeros(mx,mx1);

```

```

else, mxx=mx2; e=zeros(mx,mx2);end;

for i1= 1:mx
    for i2=1:mxx

        if r>s , z=c(i1,1); else,z=c(1,i1); end

        if mx1>mx2 , if r1>s1 , alfa=alf(i2,1); else, alfa=alf(1,i2);end, beta=bet;

        else if r2>s2 ,beta=bet(i2,1); else, beta=bet(1,i2); end, alfa=alf; end

        if beta<0 , rc=(-2*log(10^(-
fi)*pi/(6*(abs(beta)+2)*(2*abs(beta))^(abs(beta))))))^alfa;

            else , rc=(-2*log(10^(-fi)*pi/6))^alfa; end

        r0=max([1,2*abs(z),rc]);

        if (alfa==1 & beta==1)

            e(i1,i2)=exp(z);

        else

            if (alfa<1 & abs(z)<=1) | (1<=alfa<2 & abs(z)<=floor(20/(2.1-alfa)^(5.5-
2*alfa))) | (alfa>=2 & abs(z)<=50)

                oldsum=0;

                k=0;

                while (alfa*k+beta)<=0

                    k=k+1;

                end

                newsum=z^k/gamma(alfa*k+beta);

                while newsum~=oldsum

                    oldsum=newsum;

                    k=k+1;

                    term=z^k/gamma(alfa*k+beta);

                    newsum=newsum+term;

                    k=k+1;

```

```

term=z^k/gamma(alfa*k+beta);

newsum=newsum+term;

end

e(i1,i2)=newsum;

else

if (alfa<=1 & abs(z)<=fix(5*alfa+10))

if ((abs(angle(z))>pi*alfa & (abs(abs(angle(z))-(pi*alfa))>10^(-fi)))

if beta<=1

e(i1,i2)=rombint('K',0,r0,fi,alfa,beta,z);

else

eps=1;

e(i1,i2)=rombint('K',eps,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...

rombint('P',-pi*alfa,pi*alfa,fi,alfa,beta,z,eps);

end

elseif (abs(angle(z))<pi*alfa & abs(abs(angle(z))-(pi*alfa))>10^(-fi))

if beta<=1

e(i1,i2)=rombint('K',0,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...

(z^((1-beta)/alfa))*(exp(z^(1/alfa))/alfa);

else

eps=abs(z)/2;

e(i1,i2)=rombint('K',eps,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...

rombint('P',-pi*alfa,pi*alfa,fi,alfa,beta,z,eps)+ ...

(z^((1-beta)/alfa))*(exp(z^(1/alfa))/alfa);

end

else

eps=abs(z)+0.5;

e(i1,i2)=rombint('K',eps,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...

```

```

        rombint('P',-pi*alfa,pi*alfa,fi,alfa,beta,z,eps);
    end
else
    if alfa<=1
        if (abs(angle(z))<(pi*alfa/2+min(pi,pi*alfa))/2)
            % alfa
            newsum=(z^((1-beta)/alfa))*exp(z^(1/alfa))/alfa;
            for k=1:floor(fi/log10(abs(z)))
                newsum=newsum-((z^(-k))/gamma(beta-alfa*k));
                % k
            end
            e(i1,i2)=newsum;
        else
            newsum=0;
            for k=1:floor(fi/log10(abs(z)))
                newsum=newsum-((z^(-k))/gamma(beta-alfa*k));
            end
            e(i1,i2)=newsum;
        end
    end
else
    if alfa>=2
        m=floor(alfa/2);
        sum=0;
        for h=0:m
            zn=(z^(1/(m+1)))*exp((2*pi*i*h)/(m+1));
            sum=sum+mlf3(alfa/(m+1),beta,zn,fi);
        end
    end
end

```



```

        sum=sum+feval(funfcn,(a+h*(j-0.5)),varargin{:});
    end
    rom(2,1)=(rom(1,1)+h*sum)/2;
    for k=1:i-1
        rom(2,k+1)=((4^k)*rom(2,k)-rom(1,k))/((4^k)-1);
    end

    for j=0:i-1
        rom(1,j+1)=rom(2,j+1);
    end
    ipower=ipower*2;
    h=h/2;
end
res=rom(1,order);
end

```

```

function res=K(r,alfa,beta,z)
res=r.^((1-beta)/alfa).*exp(-r.^(1/alfa)).*(r*sin(pi*(1-beta))-...
z*sin(pi*(1-beta+alfa)))/(pi*alfa*(r.^2-2*r*z*cos(pi*alfa)+z.^2));

```

```

function res=P(r,alfa,beta,z,eps)
w=(eps^(1/alfa))*sin(r/alfa)+r*(1+(1-beta)/alfa);
res=((eps^(1+(1-beta)/alfa))/(2*pi*alfa))*((exp((eps^(1/alfa))*cos(r/alfa)).*...
(cos(w)+i*sin(w)))/(eps*exp(i*r)-z);

```