AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Espectroscopia de absorção no infravermelho em pele queimada: avaliação de potenciais biomarcadores para o reparo tecidual

Pedro Arthur Augusto de Castro

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zzell**

**São Paulo
2018**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Espectroscopia de absorção no infravermelho em pele queimada: avaliação de potenciais biomarcadores para o reparo tecidual

Pedro Arthur Augusto de Castro

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2018

Auxílio : CAPES/PROCAD 88881.068505/2014-01, CNPq/INCT 465763/2014-6, FAPESP/CEPID (05/51689-2) e (11/51959-0). Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro, Pedro Arthur Augusto de

Espectroscopia de absorção no infravermelho em pele queimada
avaliação de potenciais biomarcadores para o reparo tecidual /
Pedro Arthur Augusto de Castro; orientador Profa.Dra.Denise
Maria Zezell. São Paulo - SP, 2018.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) -
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da
Universidade de São Paulo, 2018.

1. ATR-FTIR.
 2. Reparo Tecidual.
 3. Queimaduras.
 4. Biomarcadores.
-

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, desde a iniciação científica, a doutora Denise Maria Zezell por estar sempre contagiando a convivência acadêmica com muita alegria, seriedade e otimismo. Seu carinho e sua crença na minha capacidade só me fizeram ser uma pessoa melhor. Sua forte energia sempre estará comigo por onde eu for.

Ao amigo mestre Cássio pela sua infinita paciência com as minhas dúvidas e sempre auxiliando no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares(IPEN) e ao Centro de Lasers e Aplicações (CLA) por prover uma excelente infraestrutura nesses quatro ano de aprendizado.

Aos meus estimados companheiros de departamento, sempre com bom humor e união. Sem vocês a rotina acadêmica seria extremamente desencorajadora e infeliz.

Ao meu amigo de longa data Derly pela paciência em me ajudar a lidar com as dificuldades, sua presença e participação foi e sempre será fundamental.

À doutora Claudia Zamataro que em pouco tempo se tornou indispensável como amiga, sempre trazendo felicidade ao ambiente que a cerca e provendo ótimos conselhos.

Ao acolhedor grupo de Biofotônica.

Aos meus pais e irmãos, sem você eu nunca seria o que sou hoje. Vocês estão no meu coração me tornando cada dia mais forte e feliz.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida (processo 1574655).

Aos órgãos de fomento CAPES/PROCAD processo 888881.068505/2014-01, FAPESP/CEPID (05/51689-2) e CNPq/INCT 465763/2014-6.

“ Transforme as pedras que você tropeça
nas pedras de sua escada.”

Sócrates

RESUMO

CASTRO, P.A.A *Espectroscopia de absorção no infravermelho em pele queimada: avaliação de potenciais biomarcadores para o reparo tecidual.*

2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear -Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN- CNEN/SP, São Paulo - SP.

Uma caracterização bioquímica eficiente da cicatrização das feridas por queimadura pode melhorar a rotina clínica para a ajustar os tratamento dos pacientes. Considerando a dificuldade de monitoramento de cicatrização, a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier acoplado com o acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR) é uma técnica analítica a qual tem demonstrado capacidade de prover biomarcadores espectrais no materiais biológicos. Esse estudo avaliou a capacidade de usar ATR-FTIR para classificar a pele queimada com o intuito de monitorar o reparo tecidual em pacientes. Ratos Wistar com pele queimada foram avaliados pela espectroscopia ATR-FTIR nos dias 3, 7, 14 e 21 após a queimadura e comparados com amostras de grupos sadios. Os espectros obtidos foram separados nas regiões entre 900 a 1800 cm^{-1} e entre 2800 a 3000 cm^{-1} para posterior adequação quimiométrica. Avaliou-se as amplitudes das derivadas de segunda ordem dos espectros como parâmetro de discriminação, nos quais demonstraram diferenças significativas para os grupos não queimados com controle e entre grupos de queimadura usando Glicogênio (1030 cm^{-1}), Amida I (1628 cm^{-1}), Amida II (1514 cm^{-1}), Colágeno em 1281 cm^{-1} e Colágeno em 1336 cm^{-1} . Esses resultados indicam que ATR-FTIR é sensível para detectar os estágios de reparo tecidual e pode futuramente ser um instrumento auxiliar para a rotina clínica.

Palavras-chave: 1. ATR-FTIR. 2. Reparo Tecidual. 3. Queimaduras. 4. Biomarcadores.

ABSTRACT

CASTRO, P.A.A *Infrared absorption spectroscopy in burned skin: evaluation of potential biomarkers in the wound healing.* 2018.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear -Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN- CNEN/SP, São Paulo - SP.

Efficient biochemical characterization of burn wound healing stages can improve clinical routine to adjust the patient treatment. Considering the difficulty to monitoring wound healing, the Fourier Transform Infrared spectroscopy coupled with Attenuated Total Reflectance (ATR-FTIR) is an analytical technique that has capability to provide spectral biomarkers in biological materials. This study aims to evaluate the classification feasibility of ATR-FTIR in burned skin to follow the regenerative process in patients. Wistar rat burn tissues were evaluated by ATR-FTIR spectroscopy at 3, 7, 14, 21 days after burn and compared with the healthy group samples. The spectra was separated in the region 900 to 1800 cm^{-1} and the region 2800 to 3000 cm^{-1} for further chemometric adequation. The second derivative of amplitude was applied for discrimination which results demonstrated differences to control with non-wounded groups and between non-wounded using Glycogen (1030 cm^{-1}), Amide I (1628 cm^{-1}), Amide II (1514 cm^{-1}), Collagen in 1281 cm^{-1} and Collagen in 1336 cm^{-1} . These findings indicate that ATR-FTIR is suitable to detect the burn wound healing stages and in the future can be auxiliary instrument for clinical routine.

Key-words: 1. ATR-FTIR. 2. Wound Healing. 3. Burned Skin. 4. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

3.1	Estrutura da Pele	6
3.2	Região das queimaduras. A região mais ao centro dificilmente é recuperada integralmente.	8
3.3	Queimaduras conforme aumento do dano térmico. A - Espessura Superficial, B - Espessura Parcial, C - Espessura Profunda, D - Espessura Total	9
3.4	Dificuldade de diagnóstico. Na imagem à esquerda, ilustração histológica da queimadura, mostra-se a perspectiva em profundidade do dano térmico. Na imagem à direita, exemplificação da dificuldade de diagnóstico, percebe-se tanto a alteração de cor, característica de uma queimadura de espessura superficial, como também uma região mais escura sugerindo uma possível necrose associada a queimadura de espessura profunda e total. A determinação das regiões de cada tipo de queimadura para aplicar o tratamento adequado se configura como um desafio na clínica.	11
3.5	Reparação tecidual. Os intervalos em formas de gaussianas servem para enfatizar a não-linearidade das etapas, isto é, o término de cada etapa é dependente direto do dano térmico. Sendo assim, mais de uma ciclo de cicatrização pode ocorrer ao mesmo tempo.	12
3.6	Sub-processos do reparo tecidual.	13
3.7	Espectro Eletromagnético. No primeiro eixo o símbolo $\nu(Hz)$ representa a frequência e o segundo eixo com o símbolo $\lambda(m)$ significa comprimento de onda. Conforme é ilustrado nas escalas, o comprimento de onda tem uma relação inversa com a frequência. . .	15

3.8	Variação do momento de dipolo. A radiação eletromagnética(RE) incide com a mesma frequência natural da molécula e quando ocorre a interação a amplitude intrínseca de seu movimento altera (ilustrado em vermelho) e volta a um estado fundamental de energia. Ao mensurar essa variação, sua resultante terá que ser diferente de zero para que tenha sinal no infravermelho.	16
3.9	Esquema ilustrativo das modalidades com FTIR. Na figura está ilustrado o feixe incidente(I_0), o feixe resultante (I), o caminho ótico (L), amostra, substrato refletor, elemento de reflexão interna e a onda evanescente	18
3.10	Biomoléculas via ATR-FTIR.	20
4.1	Experimento de indução de queimaduras de pele. No canto à direita observa-se a saída de vapor pela cânula que permanece dentro do recipiente para que quando comece a emissão de vapor indicando a ebulição da água: a cânula deve entrar em contato com dorso do rato.	24
4.2	Ilustração da aquisição dos espectros.	25
4.3	Abordagem escolhida para esse trabalho.	26
5.1	Cortes histológicos representativos de cada grupo. A barra de escala é de 80 μm	28
5.2	Diagramas de caixa. O grupo em vermelho é respectivo ao 3º dia, o azul é representação do 7º dia, o preto é associado ao 14º dia e o rosa refere-se ao 21º dia. Nota-se que o 21º dia é o mais instável dos diagramas de caixa, denotando a dificuldade em validar se a cicatrização está suficientemente completa.	30
5.3	Abordagens realizadas antes da análise espectral. Cada processo pode ser feito em ordem diferente o que faz necessário testar todas as possibilidades para determinar quais métodos se aplicam melhor à natureza da amostra específica.	32

- 5.4 Regiões espectrais características de biomoléculas consideradas no presente estudo. Na figura está as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. No gráfico A está a região espectral de "impressão digital" no qual há bandas associadas a proteínas, RNA, DNA, colágeno, glicogênio e uma banda específica de lipídio. No gráfico B a região espectral é caracterizada por possuir bandas associadas a enzimas e lipídios. . . . 34
- 5.5 Bandas Espectrais associada predominantemente ao glicogênio. Na figura está as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Nota-se que mesmo aplicando a derivada de segunda ordem ainda ocorrem picos de absorção associados a mais de uma biomolécula. 35
- 5.6 Bandas Espectrais associada predominantemente ao colágeno. Na figura é apresentado as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Nota-se que mesmo aplicando a derivada de segunda ordem ainda ocorrem picos de absorção associados a mais de uma biomolécula. 36
- 5.7 Bandas Espectrais associada predominantemente ao lipídio. Na figura está as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. 37

- 5.8 Resultados T-Student par-a-par. Na figura está as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro de infravermelho das amostras de pele C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Ao representar as diferenças entre grupos, utilizou-se as bandas de Glicogênio (1030 cm^{-1}), Glicogênio + Colágeno + Fosfato (1201 cm^{-1}), Amida I (Folha Beta em 1628 cm^{-1}), Amida II (1514 cm^{-1}), Colágeno em 1281 cm^{-1} e Colágeno em 1336 cm^{-1} 38
- 5.9 Resultados ao teste T de Student par-a-par. Na figura está as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Para representar as diferenças entre os grupos de queimadura, utilizou-se Amida II (1514 cm^{-1}) e Amida I (Folha Beta - 1628 cm^{-1}). 40

- 5.10 Resultados ao teste t de Student par-a-par. Na figura está as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Para representar as diferenças entre os grupos de queimadura, utilizou-se Glicogênio (1030 cm^{-1}), Glicogênio + Colágeno + Fosfato (1201 cm^{-1}), Colágeno em 1281 cm^{-1} e Colágeno em 1336 cm^{-1} . . . 42
- A.1 Resultados teste T de Student par-a-par. A figura mostra as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro de infravermelho das amostras de pele C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Ao representar as diferenças entre grupos, utilizou-se as bandas de Lipídio C (1743 cm^{-1}), Lipídio D (2852 cm^{-1}), Lipídio E (2924 cm^{-1}) e Lipídio F (2956 cm^{-1}) 53

A.2 Resultados teste T de Student par-a-par. A figura mostra as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro de infravermelho das amostras 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Ao representar as diferenças entre grupos, utilizou-se as bandas de Lipídio C (1743 cm^{-1}), Lipídio D (2852 cm^{-1}), Lipídio E (2924 cm^{-1}) e Lipídio F (2956 cm^{-1}) 54

LISTA DE TABELAS

3.1	Critérios de diferenciação das queimaduras.	9
3.2	Principais biomoléculas e seus picos de absorção.	21
4.1	Grupos de estudos com números de ratos.	23
5.1	Parâmetros utilizados para validação histométrica.	27
5.2	Perspectivas temporais dos principais eventos do reparo tecidual. . . .	30

SUMÁRIO

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xvi
1 Introdução	1
2 Objetivos	3
3 Estado da Arte	4
3.1 Queimaduras	4
3.1.1 Pele	5
3.2 Classificação e Diagnóstico de queimaduras	7
3.3 Reparo Tecidual	11
3.4 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier	14
3.5 Modos de aquisição espectral com FTIR	16
3.6 Espectroscopia FTIR para reconhecimento de biomoléculas	19
4 Material e Métodos	22
4.1 Delineamento Experimental	22
4.1.1 Preparação de amostra para espectroscopia ATR-FTIR	24
4.2 Preparação dos dados para análise	25
5 Resultados e Discussões	27
5.1 Análise Histológica	27
5.2 Análise Bioquímica por ATR-FTIR	31
6 Conclusões	43

Referências	44
A Apêndice	52

INTRODUÇÃO

As queimaduras estão entre as injúrias mais destrutivas atualmente. Segundo a Organização Mundial da Saúde, todos os anos lesões causadas por queimaduras originam quase 300.000 mortes [1, 2]. O panorama no Brasil é de 2 milhões de mortes e o custo desta tendência no Sistema Único de Saúde (SUS) é superior a 55 milhões para o tratamento do paciente [3]. No caso de cicatrização de queimaduras, a avaliação precisa do dano no tecido da pele é fator crucial na determinação da capacidade regenerativa. Quando a injúria térmica ocorre, o potencial de infecções microbianas aumenta e pode prejudicar o desenvolvimento da cura.

O padrão ouro atual para diagnóstico e monitoramento dos diferentes graus de queimaduras ainda é a biópsia seguida de avaliação do patologista. Esta prática é frequentemente dispendiosa e tecnicamente difícil. Sua eficácia depende da experiência clínica e também de uma boa infraestrutura hospitalar[4]. Em vista desse fato, houve avanços no tratamento e diagnóstico dos pacientes queimados críticos devido ao aumento da colaboração entre profissionais com formação multidisciplinar[5].

As contribuições de diferentes campos da engenharia biomédica motivam o desafio de desenvolver um melhor procedimento para aplicações clínicas[6]. Esta multidisciplinaridade está resultando em novos conhecimentos e consequentemente colaborando para o desenvolvimento de novos tratamentos. Neste contexto, técnicas de biofotônica tem sido estudadas para caracterização de materiais de origem biológica. A espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é umas das fundamentais técnicas para

mapeamento bioquímico de tecidos biológicos[7]. Devido a essa capacidade, a técnica de FTIR pode ser utilizada para reconhecimento de alterações moleculares atípicas ou até servindo como monitoramento do processo de cicatrização, como será objeto deste trabalho.

CAPÍTULO

OBJETIVOS

Avaliar a capacidade da técnica de FTIR, acoplada ao acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR), como metodologia analítica para diferenciação dos estágios de cicatrização após queimaduras de terceiro grau em pele de ratos Wistar.

ESTADO DA ARTE

3.1 Queimaduras

A queimadura é uma das lesões corpóreas mais traumáticas que acometem a pele. O processo de dor, danos estruturais e sua recuperação são intensos e dependentes dos níveis de queimadura. A sua reparação tecidual pode exigir um longo período de internação hospitalar. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a queimadura é definida como uma injúria causada pela exposição ao calor de objetos quentes, gases, chamas, produtos químicos, eletricidade, fricção ou radiação[8].

A temperatura da fonte causadora e seu período de contato são os primeiros parâmetros avaliados para determinar a profundidade e gravidade da lesão nos pacientes de queimadura. A reabilitação e acompanhamento desses pacientes requer o máximo cuidado em razão de seus impactos físicos e psicológicos de curto e longo prazo. Anualmente, as queimaduras resultam em mais de 7,1 milhões de feridos e mais de 250 mil mortes em todo o mundo. Mais de 90% da incidência de queimaduras está associada a países de baixa e média renda[2].

Nos Estados Unidos da América as queimaduras são a terceira maior causa de mortes acidentais. Nesse cenário, 486.000 pacientes precisarão de internação em Centros de Tratamento de Queimados (CTQ) e apenas 40.000 são hospitalizados[1]. Desses 40.000 a estimativa é de que, mesmo sendo atendidos em hospitais especializados, 5.000 pacientes entrem em óbito.

O custo anual do tratamento de pacientes queimados nos EUA é estimado em mais de US\$573 milhões e o custo médio para cada paciente pediátrico é US\$83,535

milhões. Esses últimos valores não incluem os custos ambulatoriais, reabilitação contínua, apoio à saúde comportamental e outros índices de qualidade de vida. A inserção desses parâmetros tornaria os custos ainda maiores[9].

A incidência, a cada ano, de queimaduras no Brasil chega a 2 milhões de pessoas. O Sistema Único de Saúde (SUS) gasta 55 milhões anualmente para o tratamento dos pacientes queimados. Ainda há uma carência de estudos nacionais os quais indiquem o número real de vítimas de queimaduras[3].

3.1.1 Pele

A pele é um órgão complexo responsável por várias funções fisiológicas e imunológicas. Dentre suas funções a primordial se concentra no fato de revestir praticamente toda a superfície do corpo; constituindo assim uma barreira defensiva e reguladora. A pele também auxilia no processo de regulação da temperatura e sua integridade é essencial para o correto funcionamento do sistema tegumentar. Alterações na sua estrutura anatômica podem ser provocadas por danos físicos, químicos e microbiológicos. As queimaduras, por exemplo, causam alterações na estrutura anatômica da pele devido ao seu dano térmico ocasionando às vítimas perda de líquido corpóreo, injúria no sistema vascular cutâneo e um possível retardo da cicatrização das lesões.

O tratamento das vítimas de queimadura requer o conhecimento das mudanças fisiopatológicas ocorridas na área afetada. A composição da pele é dividida em camadas: epiderme, derme e hipoderme, assim como é ilustrado na Figura 3.1.

Figura 3.1: *Estrutura da Pele*

Fontes: Adaptado de [10]

A epiderme é a camada mais superficial e delgada da pele sendo que sua espessura varia de 0,04 a 0,12 mm[11]. A presença de espaços intercelulares, preenchidos por substância intersticial e destinados a trocas intercelulares se contrapõe à ausência de vasos sanguíneos. Seu constituinte celular é composto, principalmente, por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel[12]. Por ser o primeiro tecido a ter contato direto com o meio externo, a epiderme é a principal responsável pela proteção inicial a agentes externos.

A derme, diferentemente da epiderme, é composta de tecido conectivo, sendo sua espessura entre 1 a 4 mm[13]. A epiderme se apoia sobre esse tecido conjuntivo conferindo uma resistência mecânica. A derme pode ser subdividida em derme superficial (derme papilar), logo após a epiderme, e a derme reticular. A derme superficial é composta de tecido conjuntivo frouxo o qual detém colágeno do tipo III, sendo observado maior presença de fibrilas e fibras mais finas. Já na derme reticular, com seu tecido conjuntivo denso, salienta-se o colágeno do tipo I devido a predominância de fibrilas e fibras mais espessas. Ambas as dermes possuem elementos pré-colágeno (fibras elásticas e fibras de reticulina), os quais são responsáveis pela elasticidade da pele. Dentre suas células destacam-se os fibroblastos, fibrócitos, basófilos, histócitos e plasmócitos. Todas as células

pertinentes ao tecido conjuntivo são encontradas em meio à matriz extracelular.

A matriz extracelular também é conhecida como substância intersticial ou substância fundamental amorfa. Sua relevância é justificada por ser um complexo molecular que possibilita a passagem de células, moléculas hidrossolúveis, regulação de íons e principalmente uma defesa contra microorganismos. Seu constituinte é majoritariamente composto por glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas, fibras elásticas e fibras colágenas[14].

A hipoderme é a camada mais profunda sendo composta por tecido adiposo altamente vascularizado. Dentro de suas aplicabilidades conhecidas, salienta-se a termoregulação e equilíbrio mecânico. De forma simplificada, a hipoderme funciona como um grande reservatório de fatores de regulação. Por exemplo, as adipocinas são proteínas de sinalização celular secretadas pelo tecido adiposo. Algumas dessas adipocinas tem características anti-inflamatórias, sendo sua atuação majoritária na região da derme. Também há o hormônio protéico, a adiponectina, que modula inúmeros processos metabólicos dentre os quais atua auxiliando a síntese de ácido hialurônico pelos fibroblastos[15].

3.2 Classificação e Diagnóstico de queimaduras

A lesão térmica, em relação à área, identifica-se de acordo com a intensidade do contato da fonte térmica o que resulta em coagulação dos vasos sanguíneos, desnaturação de proteínas e aumento da permeabilidade capilar. Devido a esses fatores, surgem zonas características. A região mais ao centro é a zona de coagulação e conforme mais afastado do centro, encontram-se as zonas de estase e zona periférica (hiperemia) respectivamente[16]. Essa organização é ilustrada na Figura 3.2.

Figura 3.2: *Região das queimaduras. A região mais ao centro dificilmente é recuperada integralmente.*

Fontes: Adaptado de [10]

A região mais central, zona de coagulação, dificilmente é recuperada devido ao dano celular severo gerando assim uma necrose tecidual. Na zona de estase a congestão sanguínea se intensifica devido a fatores inflamatórios no local, tais como aderência de neutrófilos à parede dos vasos e deposição de fibrina[17, 18]. Se não houver boas condições sistêmicas essa zona pode convergir para necrose de coagulação. A zona de hiperemia é a menos lesada, mas com processo inflamatório e vasodilatação presentes[19].

Outro parâmetro recorrente para classificação de queimaduras é a profundidade. A profundidade da lesão foi inicialmente classificada por Peter Lowe em 1597 e modificada por Fabricius em 1610 sendo pioneiro no uso dos termos de queimadura em primeiro, segundo e terceiro grau[20]. O conceito variação do grau de queimadura de acordo com o aprofundamento da lesão térmica é amplamente aplicado, sendo descrito atualmente com termos de queimadura superficial, espessura parcial, espessura profunda e espessura total[21]. Essas características estão resumida na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Critérios de diferenciação das queimaduras.

Espessura	Sinais Clínicos	Profundidade
Superficial (1º Grau)	Dor e cor avermelhada	Epiderme
Parcial (2º Grau)	Bolhas, dor e cor rosa	Derme papilar
Profunda (2º Grau)	Bolhas, mistura de rosa e branco e menos sensibilidade a dor	Derme reticular
Total (3º Grau)	Marron, preto, branco e sem sensibilidade a dor e sem bolhas	Hipoderme

Fontes: [21, 16, 22]

A decisão de qual tratamento específico irá ser oferecido ao paciente de queimadura é norteadada pela profundidade da queimadura. À medida que se reconhece o tipo de queimadura, os cuidados de curativo, excisão tangencial, enxertia de pele, nutrição, hidratação e medicamentos serão alterados[16]. Os graus de queimadura conforme o dano térmico é ilustrado na Figura 3.3.

Figura 3.3: Queimaduras conforme aumento do dano térmico. A - Espessura Superficial, B - Espessura Parcial, C - Espessura Profunda, D - Espessura Total

Fontes: Adaptado de [23]

As queimaduras superficiais apresentam acúmulo sanguíneo local, dor leve a moderada e ausência de bolhas. Não há perda da integridade da derme, apenas atingindo a epiderme. Normalmente, com suporte clínico adequado, essas injúrias são recuperadas entre dois a três dias. As queimaduras de segundo grau superficial têm potencial de restauração com estimativa de 10 dias, apresentam dor e presença de bolhas[21, 16].

Comparativamente, as queimaduras de primeiro e segundo grau superficial cicatrizam com tratamento mínimo. As lesões dérmicas de espessura superficial não requerem curativos, no máximo são aplicados analgésicos no controle da dor. No caso em que ocorrer a queimadura de segundo grau superficial, a recuperação é em torno de duas semanas, ou até menos em alguns casos, gerando tegumento com capacidade similar a pele sadia com mínima alteração de cor. No entanto, a problemática de diagnóstico se configura a partir das lesões térmicas mais profundas[17].

As lesões de segundo grau profundo e total irão requerer uma avaliação clínica mais cuidadosa para definir as potenciais chances de excisão cirúrgica e enxerto de pele. As lesões mais profundas acometem a derme que, dessa forma, perde a elasticidade, vascularização e suas terminações nervosas. Nessas circunstâncias, nota-se uma ferida esbranquiçada ou até amarronzada sendo que há perda de sensibilidade à dor. Essas não têm capacidade de restauração, necessitando assim, de cirurgia. Dependendo de como for a lesão térmica, o processo de cicatrização tende a durar de três a cinco semanas[18].

A eficiente determinação da profundidade da lesão na queimadura é uma decisão fundamental do direcionamento do tratamento. A biópsia da região afetada se apresenta atualmente como um processo caro, com alto consumo de tempo e deixando uma cicatriz no local da biópsia. Quanto mais rápida e precisa é a avaliação da lesão térmica, maiores são os potenciais de cura. A dificuldade em si reside em distinguir até onde os estágios de queimaduras atingiram a região da pele. O erro nessa etapa do procedimento implica em certas consequências, como o retardo da cicatrização, aumento do risco de infecção, aumento do período da internação hospitalar e prejuízo estético ao paciente[4, 24]. A dificuldade de diagnóstico é exemplificada na Figura 3.4.

Figura 3.4: *Dificuldade de diagnóstico. Na imagem à esquerda, ilustração histológica da queimadura, mostra-se a perspectiva em profundidade do dano térmico. Na imagem à direita, exemplificação da dificuldade de diagnóstico, percebe-se tanto a alteração de cor, característica de uma queimadura de espessura superficial, como também uma região mais escura sugerindo uma possível necrose associada a queimadura de espessura profunda e total. A determinação das regiões de cada tipo de queimadura para aplicar o tratamento adequado se configura como um desafio na clínica.*

Fontes: Adaptado de [25]

A análise tradicional de marcadores de diagnóstico compreende a aparência da ferida e a estimativa da sensibilidade ao toque. Além da baixa precisão dessa abordagem, sua aplicabilidade se restringe a queimaduras bem definidas. Uma inspeção clínica de maior valor de diagnóstico é a retirada mínima de tecido para reconhecimento histológico. Além de depender de um Centro de Queimados com uma infraestrutura adequada, o patologista em questão precisará de muita experiência. Nessa vertente, a inspeção clínica pode incorrer em operações desnecessárias ou até retardar o tempo ideal de enxertia[26].

3.3 Reparo Tecidual

Homeostase é uma importante etapa do processo empregado pelo corpo humano para a manutenção do equilíbrio necessário para o funcionamento das células. Se ocorre alteração desse processo, vários mecanismos biológicos são ativados para haver retorno a um estado de normalidade. A injúria, independentemente de ser

origem de queimadura, é definida como suspensão imprevista das funções teciduais e rompimento da estrutura anatômica[27]. Para garantir a homeostase, logo após a injúria, o processo inflamatório é iniciado. Esse processo é uma reação corpórea designada a proteção de substâncias não comuns, sendo uma resposta vascular e celular[28]. Todos esse eventos bioquímicos detêm o propósito de minimizar e prevenir os danos da perda sanguínea, objetivando a não formação de necrose como também a não entrada de algum agente patogênico. Em suma, é dividida em três ciclos: inflamação, proliferação e maturação do tecido, assim como é exemplificado na Figura 3.5 adaptado de [29].

Figura 3.5: *Reparação tecidual. Os intervalos em formas de gaussianas servem para enfatizar a não-linearidade das etapas, isto é, o término de cada etapa é dependente direto do dano térmico. Sendo assim, mais de uma ciclo de cicatrização pode ocorrer ao mesmo tempo.*

Fontes: Adaptado de [29]

A fase de inflamação é a resposta imediata do corpo à injúria e tende a durar cerca de 5 dias. A reação inicial é a vasoconstrição e na sequência adesão de plaquetas às fibras de colágeno formando um tampão hemostático. Com auxílio da trombina, ocorre ativação e liberação dos fatores de crescimento que junto com as glicoproteínas adesivas irão estruturar uma matriz extracelular provisória. Essas ativações geram, fatores quimiotáticos e mediadores vasoativos,

os quais iniciam o processo de recrutamento das células inflamatórias. Dentre elas, há células que depositam proteínas anti-microbianas, os neutrófilos, células que fagocitam elementos estranhos ao corpo, os macrófagos, os quais desempenham papel importante na degradação de colágeno e elastina. Ambos estão presentes na ferida por cerca de 10 dias, direcionando a evolução do reparo tecidual para a fase de formação do tecido de granulação[30, 27, 31].

Cada uma dessas fases e seus componentes biológicos envolvem uma grande variedade de mediadores químicos e celulares tais como células sanguíneas, células parênquimatosas, matriz extracelular e substâncias solúveis. Na Figura 3.6 é sintetizado as sub-etapas da reparação tecidual.

Figura 3.6: *Sub-processos do reparo tecidual.*

Fontes: Adaptado de [27, 31, 29, 28]

Do quarto dia até o décimo quarto dia, a fase de proliferação mantém-se como uma combinação de angiogênese para recuperação dos vasos sanguíneos e formação de tecido de granulação o qual irá gerar fibroblastos que estimularão a síntese de colágeno, colaborando com a formação da nova matriz tecidual. A transição do tecido de granulação para uma formação de cicatriz é assistida por enzimas características: hialuronidase, collagenases microbianas de bactérias e proteases lisossômicas. Durante a fase de maturação, há um contínuo processo de formação de estabilização do colágeno do tipo I e gradual diminuição das collagenases do esqueleto de colágeno do tipo III respectivo à ferida. O tecido de granulação retrocede e,

com esse cruzamento de diferentes tipos de colágeno, há compreensão dos capilares sanguíneos, diminuindo assim a quantidade de fibroblastos ativos e a formação de novos vasos[32]. Essa última fase possui um tempo de duração longo, podendo manter-se meses ou até anos[31, 30, 33].

3.4 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier

O padrão ouro para exame de tecido ainda é o microscópio de luz o qual é razoavelmente rápido e de análise rotineira. O patologista ao visualmente avaliar o tecido está sujeito a erro por diversos motivos devido principalmente a urgência em definir o diagnóstico. A opção de utilização de técnicas adicionais para que o patologista alcance diagnóstico mais preciso é de considerável interesse tanto científico quanto clínico, principalmente nos casos em que não há consenso morfológico. Essas características no tecido, provavelmente, não demonstraram ainda alterações morfológicas. Entretanto, transformações bioquímicas tendem a se associar ou preceder modificações físicas. Isto é, uma alteração química não necessariamente precede de uma alteração morfológica. Recentemente tem-se avaliado e revisado a capacidade da espectroscopia vibracional em diagnosticar diferentes doenças em vários tipos de tecido humano[34, 35, 36].

A espectroscopia tem sido utilizada para análise bioquímica de materiais de origem biológica[37, 38, 39]. Esses estudos tem sido possível porque as energias da radiação eletromagnética podem ser discretizadas de maneira contínua em função de seu comprimento de onda. Cada intervalo recebe uma denominação conforme sua energia característica altera, assim como é ilustrado na Figura 3.7.

Figura 3.7: *Espectro Eletromagnético. No primeiro eixo o símbolo $\nu(\text{Hz})$ representa a frequência e o segundo eixo com o símbolo $\lambda(\text{m})$ significa comprimento de onda. Conforme é ilustrado nas escalas, o comprimento de onda tem uma relação inversa com a frequência.*

Fontes: autor da dissertação

A espectroscopia é o estudo das absorções ou emissões das moléculas quando a radiação eletromagnética interage com a matéria. A investigação e mapeamento das propriedades de materiais de origem biológica é efetuada pelos diferentes fenômenos associados a cada intervalo do espectro eletromagnético. Nesse sentido, é desejável entender a natureza destas alterações moleculares, que mudam conforme a energia específica da radiação eletromagnética incidente[36]. No caso deste trabalho, utilizou-se a região espectral do Infravermelho.

Para a ocorrência de absorção na região do infravermelho, se a radiação incide sobre uma determinada amostra, alguns de seus componentes precisarão ser equivalentes à frequência natural de vibração das moléculas para que a radiação incidente seja absorvida. Além disso, para que dessa interação consiga-se obter sinal no infravermelho é fundamental que seu momento dipolar sofra uma variação durante a vibração[40]. Esse conceito chave para aquisição do sinal é ilustrado na Figura 3.8.

Figura 3.8: *Variação do momento de dipolo. A radiação eletromagnética (RE) incide com a mesma frequência natural da molécula e quando ocorre a interação a amplitude intrínseca de seu movimento altera (ilustrado em vermelho) e volta a um estado fundamental de energia. Ao mensurar essa variação, sua resultante terá que ser diferente de zero para que tenha sinal no infravermelho.*

Fontes: autor da dissertação

O espectro é o registro de quais componentes foram absorvidas, também informando a intensidade em que a ligação química absorveu a componente da radiação IR incidente. Essa representação pode ser feita tanto pela intensidade da radiação que atravessa a amostra, ou seja, em transmitância e também pela absorbância.

A representação que utilizaremos nesse trabalho é a de absorbância que corresponde ao logaritmo inverso da transmitância. Cada região do espectro possui uma série de informações pertinentes a natureza molecular do material em questão porque as vibrações dos átomos acontecem em valores específicos de frequência[36, 40]. Nessa vertente, alterações na intensidade ou deslocamento nas bandas de absorção detêm significados úteis na compreensão de possíveis alterações químicas.

3.5 Modos de aquisição espectral com FTIR

As escolhas de configurações do equipamento podem ser no modo transmissão, transflexão, reflectância difusa e reflexão total atenuada (ATR). No

caso deste trabalho, optou-se por utilizar o modo ATR devido permitir análises qualitativas ou semi-quantitativas de amostras com mínima preparação o que aumenta significativamente a velocidade de análise.

A principal vantagem da amostragem ATR vem do comprimento muito fino de amostragem e profundidade de caminho de penetração do feixe de infravermelho na amostra[7]. Isto está em contraste para amostragem do FTIR tradicional de transmissão por onde a amostra deve ser diluída com sal transparente ao infravermelho, prensada em uma pastilha ou pressionada para formar uma película fina. Este processo deve ser feito antes da análise para impedir interferência no espectro de infravermelho. Na espectroscopia de transmissão, o feixe de IR passa através da amostra e o comprimento efetivo do percurso é determinado pela espessura da amostra e da sua orientação em relação a direção de plano do feixe de IR, assim como é exemplificado na Figura 3.9.

Figura 3.9: Esquema ilustrativo das modalidades com FTIR. Na figura está ilustrado o feixe incidente (I_0), o feixe resultante (I), o caminho óptico (L), amostra, substrato refletor, elemento de reflexão interna e a onda evanescente

Fontes: autor da dissertação

A consideração útil para a análise ATR é a profundidade da penetração do feixe de IR na amostra. Essa penetração do feixe é definida como a distância necessária para a amplitude do campo elétrico cair para e^{-1} do seu valor na superfície. A radiação no infravermelho é refletida dentro desses materiais devido ao seu alto índice de refração o que possibilita uma pequena fração dessa radiação (onda evanescente) atinja a amostra que está em contato com o cristal[41, 42]. Essa onda evanescente pode ser absorvida pela amostra sendo que a profundidade de penetração na amostra é estimada pelas condições experimentais. A penetração da radiação (d_p) no analito em questão possui uma relação inversa com número de onda

(λ), índice de refração do elemento refletor (n_c), razão entre o índice de refração do analito dividido pelo índice de refração do elemento refletor (n_{sc}) e pelo ângulo de incidência da radiação (θ) :

$$d_p = \frac{1}{2\pi\lambda n_c [\sin^2\theta - n_{sc}^2]^{\frac{1}{2}}} \quad (3.1)$$

A profundidade típica de penetração varia de 0,5 μm até 5 μm , dependendo dos valores experimentais. A intensidade da onda evanescente decai rapidamente a partir da superfície do cristal ATR. Se quisermos comparar a absorbância da amostra de medição no ATR com a de uma medição de transmissão, é necessário calcular o volume da onda evanescente, conhecida como a penetração eficaz do feixe de IR. A profundidade está diretamente relacionada com o elemento refletor, no caso deste trabalho usa-se o diamante o qual possui um índice de refração de 2.41[42, 41, 43].

3.6 Espectroscopia FTIR para reconhecimento de biomoléculas

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica fundamentada nas vibrações dos átomos de uma ou mais moléculas. As vibrações características de biomoléculas são conhecidas em meio a literatura da espectroscopia vibracional[7]. Essas vibrações são apresentadas na forma de espectros, assim como é ilustrado na Figura 3.10.

Figura 3.10: Biomoléculas via ATR-FTIR.

Após o emprego do tratamento matemático conhecido como transformada de Fourier será possível avaliar diferentes biomoléculas, tais como lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas. Esses padrões de vibrações biomoleculares viabiliza desde aplicações de determinação de concentração de lipídeo até diagnóstico de neoplasias[35, 38, 39].

Tecidos biológicos são de uma natureza complexa, porque são formados por diferentes tipos celulares em que suas interações são mediadas por inúmeras cascatas bioquímicas. Tais eventos bioquímicos geram diversas espécies químicas. Esses fenômenos e seus marcadores bioquímicos fomentam a pesquisa interdisciplinar da espectroscopia com a bioquímica. É crucial para interpretação espectroscópica o embasamento dos eventos biológicos em questão uma vez que essas alterações podem contribuir para as variações espectrais[44]. As principais bandas de absorção, utilizadas neste trabalho, foram organizadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Principais biomoléculas e seus picos de absorção.

Picos de absorção (cm^{-1})	Componentes	Significado Bioquímico
3050	Amida B (dobramento N-H)	Proteína
2960 - 2930	CH_3 (estiramento anti-simétrico)	Lipídios e Proteínas
2874 - 2870	CH_3 (estiramento simétrico)	Lipídios e Proteínas
2855 - 2850	CH_2 (estiramento simétrico)	Lipídios e Proteínas
1740	Éster (estiramento C = O)	Lipídios
1655 - 1650	Amida I (estiramento C = O)	Proteínas (estrutura secundária de proteína - α hélice)
1640 - 1630	Amida I (estiramento C = O)	Proteínas (estrutura secundária de proteína - folha β)
1560 - 1500	Amida II (dobramento N - H)	Proteínas
1470 - 1405	CH_2 (dobramento simétrico e anti-simétrico)	Lipídios e Proteínas
1380 - 1250	CH_3 (dobramento simétrico e anti-simétrico)	Lipídios e Proteínas
1280	Amida III de colágeno	Proteínas
1030 - 1020	C - O - H (deformação do glicogênio)	Carboidratos
1080	PO_2^- (estiramento simétrico)	Ácidos nucleicos e lipídios

Fontes :[38, 45, 46, 47, 48, 36].

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Os procedimentos adotados neste projeto estão de acordo com as normas para prática didático-científica da vivisseção de animais (Lei n.º 6638, de 08 de maio de 1979) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA IPEN 165/15). Neste trabalho utilizou-se 45 ratos da raça Wistar, machos e adultos.

Todos os ratos foram alojados e alimentados adequadamente no Biotério do IPEN em gaiola individuais, em condições controladas de temperatura e em regime de luz de 12h/12h. Durante todo o experimento, receberam água e ração sólida *ad libitum* sendo observados diariamente.

A estruturação dos grupos de estudos para o experimento é diretamente associada aos estágios de cicatrização, assim como é organizado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: *Grupos de estudos com números de ratos.*

Grupos pós-queimadura	Referência dos grupos	Dia de eutanásia	Nº de animais	Cortes Histológicos
Controle	C	0	5	25
Inflamação	3d	3	10	30
Transição	7d	7	10	40
Proliferação	14d	14	10	25
Maturação	21d	21	10	25

Fontes: [21, 16, 22, 30, 33].

Na execução do projeto, todos os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação anestésica de cloridrato de quetamina 10% (0,06 mL/100 g) e xilazina 2% (0,05 mL/100 g)[49]. Com o objetivo de minimizar alguma possível dor pós queimadura aplicou-se tramadol 5% (0,004 mL/100 g) por via intramuscular.

O dorso do animal foi submetido à tricotomia e anti-sepsia. Na sequência, em seus dorsos foram provocadas duas queimaduras (5 mm de diâmetro) de terceiro grau usando uma fonte de vapor confeccionada com uma cânula de borracha acoplada para a saída do vapor. A fonte de calor de saída de vapor em alta temperatura é a mais recorrente nos estudos de queimaduras devido principalmente ao seu controle da área da injúria térmica, garantindo assim uma melhor reprodutibilidade sendo que o tempo de contato foi de 12 segundos[50], assim como é ilustrado na Figura 4.1.

Figura 4.1: *Experimento de indução de queimaduras de pele. No canto à direita observa-se a saída de vapor pela cânula que permanece dentro do recipiente para que quando comece a emissão de vapor indicando a ebulição da água: a cânula deve entrar em contato com dorso do rato.*

Fonte: autor da dissertação.

As análises histológicas foram realizadas em colaboração com a professora doutora Telma Maria Tenório Zorn do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

4.1.1 Preparação de amostra para espectroscopia ATR-FTIR

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos com um espectrofotômetro do tipo interferométrico (Nicolet 6700, Thermo Scientific®) acoplado a um acessório de reflexão total atenuada, ATR (Smart Orbit, Thermo Scientific®). Os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm^{-1} e cada espectro consistem em uma média de 150 varreduras. Esses espectros foram intervalados de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (infravermelho médio) usando-se uma fonte emitindo no infravermelho do tipo Globar e um detector DTGS (deuterated triglycine sulphate). As lâminas com amostra de tecido do grupo controle e dos dias de eutanásia das várias fases de cicatrização foram posicionadas sobre o diamante ATR,

como demonstrado na Figura 4.2.

Figura 4.2: Ilustração da aquisição dos espectros.

Fonte: autor da dissertação.

Foram obtidos 243 espectros, sendo 65 espectros para o grupo controle, 57 para o grupo de 3 dias, 50 para o grupo de 7 dias, 33 para o grupo de 14 dias e 38 para o grupo de 21 dias. Após a obtenção dos dados em extensão "txt", foram salvos e exportados em outro formato "mat" para poderem ser processados no software Matlab R2015a (Mathworks®, Natick, MA, USA).

4.2 Preparação dos dados para análise

Uma vez obtidos os espectros, foi preciso minimizar quaisquer contribuições de ruídos aleatórios e artefatos os quais prejudicam a interpretação correta do sinal espectroscópico. Os diversos tipos de ruídos podem ser minimizados, mas não eliminados.

Após aplicar essas abordagens quimiométricas usando o software Matlab, os resultados que forneciam mais biomarcadores espectrais quando avaliou-se a amplitude da derivada de segunda ordem foram os que aplicava na sequência: autoescalonamento, correção de linha de base, suavização por Savitzky-Golay e teste T de Student. Esta sequência é sintetizada na Figura 4.3.

Figura 4.3: Abordagem escolhida para esse trabalho.

Fonte: autor da dissertação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise Histológica

Para a correta comparação do reparo tecidual em ratos avaliou-se por histometria organizada em três critérios advindos da literatura[51]. Esses critérios estão ilustrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: *Parâmetros utilizados para validação histométrica.*

Pontuação	Re-epitelização	Granulação	Células inflamatórias
0	Ausência proliferação epitelial	Maturação ausente e inflamação $\geq 70\%$ do tecido	1 a 5 células inflamatórias por área analisada
1	Organização incompleta da epiderme em $\geq 50\%$ do tecido	Remodelação moderada em $\geq 50\%$ do tecido	5 a 8 células inflamatórias por área analisada
2	Organização moderada da epiderme em $\geq 60\%$ do tecido	Fina camada de granulação e uma matriz bem formada em $\geq 60\%$ do tecido	8 a 11 células inflamatórias por área analisada
3	Remodelação completa da epiderme em $\geq 80\%$ do tecido	Completa organização tecido em $\geq 80\%$ do tecido	11 a 15 células inflamatórias por área analisada

Fonte: Adaptado de [51]

Na Figura 5.1 o grupo controle apresenta uma derme bem estruturada e uma epiderme com estratificação nítida. Tal definição é perdida no grupo de 3 dias após a injúria térmica e a sua falta de delineamento das camadas da pele tem associado à formação de tecido de granulação.

Figura 5.1: Cortes histológicos representativos de cada grupo. A barra de escala é de 80 μm

Fonte : autor da dissertação.

A recuperação da volta ao padrão de delineamento entre as estratificações é mais perceptível do grupo de 7º dias para o de 14º dias, possivelmente associada ao início da fase proliferativa a qual é caracterizada pela intensa deposição de colágeno do tipo I. Na transição do 14º dia para o 21º dia o processo de maturação é iniciado. Conforme é ilustrado na Figura 5.1 a derme torna-se visualmente mais delineada no 21º dia.

Ratos e humanos possuem similaridades na fisiologia e no funcionamento de alguns órgãos, como a pele e suas camadas de epiderme e derme. Entretanto, algumas diferenças precisam ser consideradas. A primeira é que a elasticidade da pele do rato é maior, podendo assim ter uma menor aderência entre as camadas da pele. A segunda diferença é que o ratos possuem uma enzima chamada L-gluconolactona a qual está envolvida no processo de produção da vitamina C, diferentemente dos humanos que não a possuem. A vitamina C é relevante para a cicatrização porque é diretamente envolvida na síntese de colágeno. Além dessas diferenças, os ratos possuem músculo chamado *panículo carnosos*. Esse músculo facilita a cicatrização pela contração da pele após a injúria e auxilia na formação de colágeno. Esses parâmetros são relevantes para determinar o período de reparo tecidual do animal, precisando de validação histológica para associar ao modelo de reparo tecidual humano[52, 53, 54].

A tabela 5.2 foi feita com intuito de resumir os eventos da cicatrização em uma perspectiva temporal. Ao fim de cada ciclo de cicatrização estimados na Tabela 5.2, os tecidos foram adquiridos para o processo de congelamento. A fixação dos cortes histológicos foram feitas com uso de isopentano resfriado em nitrogênio líquido[55]. Também buscou-se obter cortes histológicos que abrangessem tanto a parte sadia como o dano térmico para que fosse possível estimar o reparo tecidual.

Tabela 5.2: *Perspectivas temporais dos principais eventos do reparo tecidual.*

Tempo após a injúria	Eventos	Fases dos reparo tecidual
0 - 3 dias	Formação de coágulos e homeostase	Inflamação
3 - 7 dias	Liberação dos fatores de crescimento	Inflamação e Proliferação
7 - 14 dias	Deposição de colágeno	Proliferação
14 - 21 dias	Finalização da deposição de colágeno e início da estabilização	Proliferação e Maturação
21 - meses	Estabilização das ligações cruzadas de colágeno	Maturação

Fontes: [21, 16, 22, 30, 33].

Na Figura 5.2 é mostrado a análise final do histologista para definir as pontuações citadas na Tabela 5.1.

Figura 5.2: *Diagramas de caixa. O grupo em vermelho é respectivo ao 3º dia, o azul é representação do 7º dia, o preto é associado ao 14º dia e o rosa refere-se ao 21º dia. Nota-se que o 21º dia é o mais instável dos diagramas de caixa, denotando a dificuldade em validar se a cicatrização está suficientemente completa.*

Fonte : autor da dissertação.

A associação dessa análise histométrica com as nuances dos cortes histológicos significa que a metodologia empregada para produzir uma queimadura de 3º grau produziu uma resposta de reparo tecidual homogênea entre os ratos estudados.

Mesmo tendo um comportamento similar, alguns cortes que proveram dúvidas suficientes para não confirmação dos níveis de re-epitelização, granulação e mensuração das células inflamatórias. Esse problema tende a ser resolvido com uma análise de imuno-histoquímica.

5.2 Análise Bioquímica por ATR-FTIR

Em termos de preparação de amostras, os tecidos congelados além terem um bom desempenho de preservação das moléculas de RNA e alguns lípidios são adequados para estudos mais detalhados, como por exemplo imuno-histoquímica e técnicas de proteômica. Apesar dessas vantagens sobre outras técnicas de preparação de amostra os tecidos congelados tem sido usados para análise histológica durante os procedimentos cirúrgicos, enquanto que os tecidos parafinizados são mais recorrentes para análises histológicas pós-cirúrgicas[56, 57].

A definição de qual dos dois métodos usar é fundamental porque dependendo de qual processamento histológico adotado afetará diretamente as análises no ATR-FTIR irão ser afetadas[55, 58]. Quando se opta usar amostras parafinizadas é necessário a remoção da parafina por causa da sobreposição das bandas de absorção do material biológico com os modos vibracionais da parafina. Sem essa remoção, uma análise do comportamento espectral da amostra com mínima interferência externa se torna inviável.

Os solventes orgânicos são usado para remoção de parafina. No entanto, essa remoção química pode afetar bandas de importantes biomoléculas. Por exemplo, ao empregar o processo de remoção da parafina por solventes orgânicos no infravermelho as banda em 1465 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} e 2956 cm^{-1} são afetadas[36, 43, 58]. Todas essas bandas citadas são associadas a lipídios em geral e como estas biomoléculas possuem um papel fundamental no reparo tecidual, optou-se neste trabalho por utilizar a crio-preservação das amostras. No caso da crio-preservação, ocorre deslocamento das bandas de amida I (1650 cm^{-1}), amida II (1550 cm^{-1}) e algumas reduções de intensidade do espectro como um todo[58, 59].

A espectroscopia de infravermelho fornece informações das vibrações moleculares em cada espectro. Há diversos métodos para o propósito de

pré-processamento e pré-tratamento dos dados, neste trabalho comparou-se normalizar pela área da amida I, área da amida II, autoescalados e normalização vetorial[60, 61]. Como não há uma abordagem quimiométrica consolidada para as amostras biológicas, é necessário investigar o desempenho classificatório desse tratamentos matemáticos afim de que forneçam mais biomarcadores espectrais. Isto é, escolher qual ferramenta matemática é mais sensível as múltiplas variações químicas da amostra.

Após testar as possíveis combinações ilustradas na Figura 5.3, optou-se por usar o método de autoescalamento dos dados para na sequência fazer a derivada de segunda ordem com suavização de Savitzky-Golay usando um polinômio de ordem dois e janelas de 11 pontos. Foram testadas janelas de outros números de pontos, entretanto estas as que menos causavam distorções nas principais bandas foram de 11 pontos.

Figura 5.3: Abordagens realizadas antes da análise espectral. Cada processo pode ser feito em ordem diferente o que faz necessário testar todas as possibilidades para determinar quais métodos se aplicam melhor à natureza da amostra específica.

Fontes : [7, 62]

O autoescalamento dos espectros consiste em centrar os dados de cada grupo na média e dividi-los pelos seus respectivos valores de desvio-padrão. Eventualmente quando se divide o espectro pelo desvio padrão podem acontecer

alguns deslocamentos não pertencentes a natureza da amostra. Para minimizar esse possível artefato, após autoescalonar os dados, empregou-se a correção da linha de base. Após essa correção foi feita a derivada de segunda ordem. A necessidade de se aplicar a derivada de segunda ordem é justificada pela sobreposição de bandas devido a proximidade dos números de onda em alguns modos vibracionais.

A derivada de segunda ordem permite uma identificação mais específica de pequenos picos de absorção localizados nas proximidades os quais não estão diferenciáveis no espectro original, oferecendo meios para aumentar a especificidade de picos de absorção conseguindo assim determinar mais modos vibracionais do tecido. No entanto, a aplicação da derivada de segunda ordem causa perda significativa na relação sinal-ruído. Devido a ampliação do ruído, foi necessário utilizar a suavização de Savitzky-golay na sequência[63].

Através do cálculo das derivadas de segunda ordem do espectro seguida da suavização por Savitzky-Golay, foi possível acessar mais componentes bioquímicos nas amostras. Para melhor organizar os principais picos de absorção estudados nesse trabalho, as derivadas de segunda ordem foram divididas em sub-intervalos menores para que a descrição das biomoléculas envolvidas se torne mais clara.

Nessa vertente, a Figura 5.4 ilustra as médias espectrais de cada grupo deste trabalho e seus dois intervalos mais característicos de biomoléculas.

Figura 5.4: Regiões espectrais características de biomoléculas consideradas no presente estudo. Na figura está as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. No gráfico A está a região espectral de "impressão digital" no qual há bandas associadas a proteínas, RNA, DNA, colágeno, glicogênio e uma banda específica de lipídio. No gráfico B a região espectral é caracterizada por possuir bandas associadas a enzimas e lípidios.

Fonte: autor da dissertação.

Na Figura 5.5 estão destacados os picos de absorção associados a glicogênio, fosfato e proteína[64, 36].

Figura 5.5: Bandas Espectrais associada predominantemente ao glicogênio. Na figura está as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Nota-se que mesmo aplicando a derivada de segunda ordem ainda ocorrem picos de absorção associados a mais de uma biomolécula.

Fonte : autor da dissertação.

A banda em 1030 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-O de glicogênio [48, 47, 46]. O glicogênio é uma importante reserva de energia para diversos fins. Para a liberação de energia, inicia-se a quebra das ligações de glicogênio gerando assim glicose[65]. Quando ocorre uma injúria térmica, é necessário aumento no consumo energético para o reparo tecidual[66, 67]. Portanto, alterações na bandas associadas a glicogênio podem servir de parâmetro para monitorar o reparo tecidual.

Na Figura 5.6 estão destacados os picos de absorção associados ao colágeno e amidas[64, 36].

Figura 5.6: Bandas Espectrais associada predominantemente ao colágeno. Na figura é apresentado as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Nota-se que mesmo aplicando a derivada de segunda ordem ainda ocorrem picos de absorção associados a mais de uma biomolécula.

Fonte : autor da dissertação.

É possível observar uma banda associada ao colágeno em 1340 cm^{-1} , banda de amida II em 1514 cm^{-1} , banda de amida I em 1628 cm^{-1} (folha beta) e uma banda de amida I (alfa hélice) em 1655 cm^{-1} [68, 69, 36, 46]. As vibrações relacionadas as amidas envolvem ligações C=O, C-N e N-H. Essas ligações são de ligações peptídicas e estrutura secundária de proteínas. Mais especificamente, a banda de amida II é resultante da combinação fora de fase da flexão de N-H no plano, do estiramento C-N, flexão C-O no plano, estiramentos C-C e estiramentos N-C de ligações peptídicas. Já a banda de amida I é reconhecida pelo estiramento C=O das ligações peptídicas as quais são moduladas pelas estruturas secundárias de alfa hélice e conformação folha beta[64, 61, 60, 70].

Na Figura 5.7 estão destacados os picos de absorção predominantemente aos lípideos[64, 36].

Figura 5.7: Bandas Espectrais associada predominantemente ao lipídio. Na figura está as médias das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização.

Fonte : autor da dissertação.

Na Figura 5.7 observa-se bandas de lipídeos: estiramento de carbonila em 1750 cm^{-1} , sendo 2850 cm^{-1} estiramento simétrico de CH_2 , 2920 cm^{-1} estiramento anti-simétrico de CH_2 e 2956 cm^{-1} estiramento anti-simétrico de CH_3 [37, 47, 48]. A mensuração dessas bandas pode ser possível quando se optou neste trabalho pelo uso do processo de crio-preservação.

Na Figura 5.8 estão os resultados obtidos as amplitudes das derivadas de segunda ordem das principais bandas observadas neste trabalho.

Figura 5.8: Resultados T-Student par-a-par. Na figura está as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro de infravermelho das amostras de pele C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Ao representar as diferenças entre grupos, utilizou-se as bandas de Glicogênio (1030 cm^{-1}), Glicogênio + Colágeno + Fosfato (1201 cm^{-1}), Amida I (Folha Beta em 1628 cm^{-1}), Amida II (1514 cm^{-1}), Colágeno em 1281 cm^{-1} e Colágeno em 1336 cm^{-1} .

Fonte : autor da dissertação.

Na Figura 5.8 pode-se perceber que algumas amplitudes não passaram pelos testes de normalidade. Não obstante, algumas amplitudes passaram pelo teste de normalidade só que detinham um desvio padrão muito alto. Essa característica

implica em um pequeno intervalo de confiança. Esses resultados estão organizados no apêndice.

Após a identificação das bandas mais elegíveis, é observável uma tendência que se associa com o processo de reparação tecidual. Quando comparado o grupo controle com o terceiro dia de cicatrização, o pico de absorção associado a Amida II demonstra sensibilidade em diferenciar uma pele de rato sadia de uma em período inflamatório. O fato de apenas a Amida II ter diferenciado o grupo de terceiro dia com o de controle pode ser avaliado pela cicatrização mais rápida em ratos quando comparado a humanos, sugerindo uma atividade proteica diferenciada entre os grupos[35, 38, 45]. Ao se comparar o grupo controle com sete dias de cicatrização, a diferenciação é observada pelas bandas de Colágeno em 1336 cm^{-1} e Amida I (Folha Beta). Especificamente no sétimo dia é um período de transição do reparo tecidual. Essa transição é bem característica por ainda ocorrer liberação dos fatores de crescimento e o início da deposição de colágeno do tipo I para estruturação da matriz extracelular provisória. Essa discriminação do grupo controle com o de sétimo dia tendo como parâmetro uma banda de colágeno e uma banda associada a variação da estrutura secundária de proteína está em concordância com os resultados de trabalhos similares[45].

Na comparação do grupo controle com o de quatorze dias de cicatrização, os comportamentos das bandas de Amida I (Folha Beta), Colágeno em 1281 cm^{-1} e Glicogênio se distinguem. Destaca-se que o glicogênio só demonstrou ter diferença estatística nessa etapa do reparo tecidual, podendo ser associado a necessidade de utilização de reserva energética para organização da matriz extracelular provisória. Essa especificidade também ocorre com o Colágeno em 1281 cm^{-1} o que, com mais trabalhos na área principalmente com FTIR de imagem, pode vir a se tornar um biomarcador espectral para reconhecimento desse período de alteração de estágio do reparo tecidual. A Amida I (Folha Beta) desde o início da etapa de proliferação tem demonstrado ser um parâmetro espectral útil para discriminar o grupo controle dos outros estágios de cicatrização[68, 66, 48].

Ao entrar no período de maturação, a capacidade de reconhecimento de uma pele sadia e de uma em recuperação pós injúria térmica ainda é presente. As bandas de Amida I (Folha Beta), Colágeno em 1336 cm^{-1} , Glicogênio + Colágeno + Fosfato

e Amida II conseguem ser critérios de diferenciação de uma pele sadia e uma em fase de maturação, mesmo sendo em ratos os quais tendem a possuir um desempenho de reparo tecidual superior ao do ser humano[54, 50, 6].

Apesar de abordar a comparação do controle com os estágios de cicatrização pós injúria térmica, ainda há a necessidade de estimar a viabilidade da técnica ATR-FTIR em discriminar os grupos de cicatrização entres eles. Uma vez que, em geral, quando se há a dificuldade de diagnóstico a problemática em si é definir quais as queimaduras presentes e ainda monitorar se o tratamento utilizado está tendo efeito[5, 25, 33, 30, 32]. Na Figura 5.9 estão os resultados das bandas de amidas entre os grupos de queimaduras.

Figura 5.9: Resultados ao teste *T* de Student par-a-par. Na figura está as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Para representar as diferenças entre os grupos de queimadura, utilizou-se Amida II (1514 cm^{-1}) e Amida I (Folha Beta - 1628 cm^{-1}).

Fonte : autor da dissertação.

Na Figura 5.9 é possível notar que a Amida II não é um parâmetro adequado para se comparar entre as queimaduras. Entretanto, a Amida I (Folha Beta) mostrou sensibilidade suficiente para diferenciar o início do reparo tecidual dos outros estágios de cicatrização. Em uma resposta do corpo a uma desordem biológica, múltiplos processos bioquímicos são ativados. Sendo que qualquer umas dessas reações bioquímicas podem influenciar na amplificação ou redução de uma determinada banda. Mesmo que ainda há sub-etapas do reparo tecidual a serem elucidadas[53, 54].

Na Figura 5.10 é possível observar que todas as possíveis comparações demonstram diferença estatística em algumas das bandas. Ao associar os resultados da Figura 5.9 a qual já proporcionou a discriminação de metade das comparações possíveis, as bandas de Colágeno em 1281 cm^{-1} e Glicogênio conseguem atender ao objetivo de usar a técnica de ATR-FTIR para especificar as etapas de cicatrização comparando com o grupo controle e também comparando as queimaduras entre si.

Figura 5.10: Resultados ao teste *t* de Student par-a-par. Na figura está as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro no infravermelho das amostras de pele. 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Para representar as diferenças entre os grupos de queimadura, utilizou-se Glicogênio (1030 cm^{-1}), Glicogênio + Colágeno + Fosfato (1201 cm^{-1}), Colágeno em 1281 cm^{-1} e Colágeno em 1336 cm^{-1}

Fonte : autor da dissertação.

CONCLUSÕES

Por meio desse trabalho foi possível verificar o potencial de aplicação da técnica ATR-FTIR para reconhecer alterações bioquímicas em pele após injúria térmica. No quesito de alterações bioquímicas, as diferenças encontradas nas bandas de Amida I (1628 cm^{-1}), Amida II (1514 cm^{-1}), Glicogênio (1030 cm^{-1}), Colágeno (1281 cm^{-1}) e Colágeno (1336 cm^{-1}) demonstraram ser biomarcadores espectrais viáveis para um estudo mais avançado e detalhado usando FTIR por imagem. Dessa forma, a espectroscopia ATR-FTIR mostrou ser um equipamento promissor para enriquecer a análise histopatológica e ainda servir de monitoramento do reparo tecidual.

REFERÊNCIAS¹

- [1] BRIGHAM, P. A.; MCLOUGHLIN, E. Burn incidence and medical care use in the united states: Estimates, trends, and data sources. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 17, n. 2, p. 95–107, mar 1996.
- [2] World Health Organization. *WHO Estimates 2014 Summary Tables: Deaths and Global Burden of Disease*. Genf, Schweiz, 2014.
- [3] CA, S.; AA., S. Assistência de enfermagem no atendimento pré-hospitalar ao paciente queimado: uma revisão da literatura. *Rev Bras Queimaduras*, v. 16, n. 1, 2017.
- [4] PAPP, A. et al. The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study. *Burns*, Elsevier BV, v. 30, n. 7, p. 684–690, nov 2004.
- [5] THATCHER, J. E. et al. Imaging techniques for clinical burn assessment with a focus on multispectral imaging. *Advances in Wound Care*, Mary Ann Liebert Inc, v. 5, n. 8, p. 360–378, aug 2016.
- [6] WU, J. et al. *Near-infrared spectrum imaging system and method for diagnosis of depth and area of burn skin necrosis*. Google Patents, dez. 1 2016. US Patent App. 15/114,794. Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/US20160345888>>.
- [7] BAKER, M. J. et al. Using fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, Springer Nature, v. 9, n. 8, p. 1771–1791, jul 2014.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

-
- [8] QUAH, S. R.; COCKERHAM, W. C. *International Encyclopedia of Public Health*. [S.l.]: Academic Press, 2016. ISBN 0128036788.
- [9] HULTMAN, C. S. et al. Systems-based practice in burn care. *Clinics in Plastic Surgery*, Elsevier BV, v. 44, n. 4, p. 935–942, oct 2017.
- [10] INSTITUTE, N. C. *Skin Anatomy*. nov 2008. Disponível em: <<http://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7280>>.
- [11] BUTNARU, C. A.; KANITAKIS, J. Structure of normal human skin. *Eur J Dermatol*, v. 12, n. 6, p. II–IV, 2002.
- [12] BOOT, P. M.; ROWDEN, G.; WALSH, N. The distribution of merkel cells in human fetal and adult skin. *Am J Dermatopathol*, v. 14, n. 5, p. 391–396, Oct 1992.
- [13] SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. *Skin Research and Technology*, Wiley-Blackwell, v. 7, n. 1, p. 18–23, feb 2001.
- [14] BELICO, M. F. D. S. *Análise mecânica e histológica do tegumento facial com seqüela de queimadura após tratamento tópico com tretinoína*. Tese (Doutorado).
- [15] VARKEY, M.; DING, J.; TREDGET, E. Advances in skin substitutes—potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *Journal of Functional Biomaterials*, MDPI AG, v. 6, n. 3, p. 547–563, jul 2015.
- [16] FERREIRA, M. C. *Tratado de Cirurgia Plástica - Queimadura*. [S.l.]: Atheneu, 2013. ISBN 8538804081.
- [17] JOHNSON, G. et al. Erythrocyte filterability in the burned patient. *Burns*, Elsevier BV, v. 6, n. 2, p. 91–95, dec 1979.
- [18] NIELSON, C. B. et al. Burns. *Journal of Burn Care & Research*, Oxford University Press (OUP), v. 38, n. 1, p. e469–e481, 2017.

-
- [19] HETTIARATCHY, S. Pathophysiology and types of burns. *BMJ*, BMJ, v. 328, n. 7453, p. 1427–1429, jun 2004.
- [20] JACKSON, D. M. The diagnosis of the depth of burning. *Br J Surg*, v. 40, n. 164, p. 588–596, May 1953.
- [21] FACS, D. N. H. M. *Total Burn Care: Expert Consult - Online and Print*, 4e. [S.l.]: Saunders, 2012. ISBN 1437727867.
- [22] GAO, Y.; ZOUGHI, R. Millimeter wave reflectometry and imaging for noninvasive diagnosis of skin burn injuries. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 66, n. 1, p. 77–84, jan 2017.
- [23] NAEMT. *PHTLS: Atendimento Pré-hospitalar ao Traumatizado*, Oitava Edição. [S.l.]: Jones & Bartlett Learning, 2016. ISBN 1284099172.
- [24] CUTTING, K.; WHITE, R.; MAHONEY, P. Wound infection, dressings and pain, is there a relationship in the chronic wound? *International Wound Journal*, Wiley-Blackwell, v. 10, n. 1, p. 79–86, may 2012.
- [25] FLANAGAN, M. *Wound Healing and Skin Integrity: Principles and Practice*. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 0470659777.
- [26] NOLE, K. L. B. et al. Wound research funding from alternative sources of federal funds in 2012. *Wound Repair and Regeneration*, Wiley-Blackwell, v. 22, n. 3, p. 295–300, may 2014.
- [27] HART, J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*, Mark Allen Group, v. 11, n. 6, p. 205–209, jun 2002.
- [28] PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, Elsevier BV, v. 187, n. 5, p. S11–S16, may 2004.
- [29] ISAAC, C. *Estudo in vitro da ação de pentoxifilina em fibroblastos oriundos de cicatrizes hipertróficas pós-queimadura e de pele não-cicatricial*. Tese (Doutorado).

-
- [30] GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature*, Springer Nature, v. 453, n. 7193, p. 314–321, may 2008.
- [31] MASI, E. C. D. J. de. *A influência de fatores de crescimento na cicatrização de feridas cutânea em ratas*. Tese (Doutorado).
- [32] BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, FapUNIFESP (SciELO), v. 41, n. 1, mar 2005.
- [33] SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, v. 341, n. 10, p. 738–746, sep 1999.
- [34] OLSZTYNSKA-JANUS, S. et al. Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. part i: ir spectroscopy. Institute of Machine Design and Operation, Wroclaw University of Technology, Wroclaw, p. –, 2012.
- [35] BRUYNE, S. D.; SPEECKAERT, M. M.; DELANGHE, J. R. Applications of mid-infrared spectroscopy in the clinical laboratory setting. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, Informa UK Limited, p. 1–20, dec 2017.
- [36] DIEM, M. *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-Spectroscopy: Theory, Instrumentation and Biomedical Applications*. [S.l.]: Wiley, 2015. ISBN 978-1-118-82498-6.
- [37] CHAN, K. L. A.; KAZARIAN, S. G. Attenuated total reflection fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 45, n. 7, p. 1850–1864, 2016.
- [38] LIMA, C. A. et al. Using fourier transform infrared spectroscopy to evaluate biological effects induced by photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, Wiley-Blackwell, v. 48, n. 5, p. 538–545, feb 2016.
- [39] PEREIRA, T. M. et al. The characterization of normal thyroid tissue by micro-FTIR spectroscopy. *The Analyst*, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 138, n. 23, p. 7094, 2013.

-
- [40] COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Third Edition*. [S.l.]: Academic Press, 1990. ISBN 012182554X.
- [41] TYLKOWSKI, B. et al. Permeation behavior of polysulfone membranes modified by fully organic layer-by-layer assemblies. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, American Chemical Society (ACS), v. 52, n. 46, p. 16406–16413, nov 2013.
- [42] SMITH, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition*. [S.l.]: CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4200-6930-3.
- [43] LIYANAGE, S. et al. Optimization and validation of cryostat temperature conditions for trans-reflectance mode FTIR microspectroscopic imaging of biological tissues. *MethodsX*, Elsevier BV, v. 4, p. 118–127, 2017.
- [44] AKALIN, A. et al. Classification of malignant and benign tumors of the lung by infrared spectral histopathology (SHP). *Laboratory Investigation*, Springer Nature, v. 95, n. 4, p. 406–421, feb 2015.
- [45] NOGUEIRA, V. C. et al. Comparative study of morphometric and fourier transform infrared spectroscopy analyses of the collagen fibers in the repair process of cutaneous lesions. *Advances in Wound Care*, Mary Ann Liebert Inc, v. 5, n. 2, p. 55–64, feb 2016.
- [46] MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, D. I. ur. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, Informa UK Limited, v. 43, n. 2, p. 134–179, feb 2008.
- [47] WIERCIGROCH, E. et al. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier BV, v. 185, p. 317–335, oct 2017.
- [48] TALARI, A. C. S. et al. Advances in fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, Informa UK Limited, v. 52, n. 5, p. 456–506, sep 2016.

-
- [49] FLECKNELL, P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. [S.l.]: Academic Press, 2009. ISBN 9780080918990.
- [50] JUNIOR, J. K. M. et al. Rat an experimental model for burns: A systematic review. *Acta Cirurgica Brasileira*, FapUNIFESP (SciELO), v. 27, n. 6, p. 417–423, jun 2012.
- [51] SEDIGHI, A.; MEHRABANI, D.; SHIRAZI, R. Histopathological evaluation of the healing effects of human amniotic membrane transplantation in third-degree burn wound injuries. *Comparative Clinical Pathology*, v. 25, n. 2, p. 381–385, Mar 2016.
- [52] ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Springer Nature, v. 71, n. 17, p. 3241–3255, apr 2014.
- [53] DOMERGUE, S.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Advances in research in animal models of burn-related hypertrophic scarring. *Journal of Burn Care & Research*, Oxford University Press (OUP), v. 36, n. 5, p. e259–e266, 2015.
- [54] D'ARPA, P.; LEUNG, K. P. Toll-like receptor signaling in burn wound healing and scarring. *Advances in Wound Care*, Mary Ann Liebert Inc, v. 6, n. 10, p. 330–343, oct 2017.
- [55] FAOLÁIN, E. Ó. et al. A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, Elsevier BV, v. 38, n. 1-2, p. 121–127, jul 2005.
- [56] KUMAR, V. et al. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease: With STUDENT CONSULT Online Access, 8e (Robbins Pathology)*. [S.l.]: Saunders, 2009. ISBN 1416031219.
- [57] RIPOLI, F. L. et al. A comparison of fresh frozen vs. formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of canine mammary tumors via branched-DNA assay. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG, v. 17, n. 5, p. 724, may 2016.

- [58] MOSS, D. *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy: A Practical Approach (RSC Analytical Spectroscopy Series)*. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 2011. ISBN 0854041540.
- [59] SRINIVASAN, G. *Vibrational Spectroscopic Imaging for Biomedical Applications (McGraw-Hill Biophotonics)*. [S.l.]: McGraw-Hill Education, 2010. ISBN 0071596992.
- [60] GOORMAGHTIGH, E.; RUYSSCHAERT, J.-M.; RAUSSENS, V. Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 90, n. 8, p. 2946–2957, apr 2006.
- [61] SEVERCAN, F.; HARIS, P. *Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening (Advances in Biomedical Spectroscopy)*. [S.l.]: IOS Press, 2012. ISBN 1614990581.
- [62] FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria: Conceitos, Metodos e Aplicacoes*. [S.l.]: UNICAMP, 2015. ISBN 8526810634.
- [63] RIEPPO, L. et al. Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, Elsevier BV, v. 20, n. 5, p. 451–459, may 2012.
- [64] STUART, B. H. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. [S.l.]: Wiley, 1997. ISBN 0471974145.
- [65] BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry (Chapters 1-34)*. [S.l.]: W. H. Freeman, 2002. ISBN 0716730510.
- [66] MONTENEGRO, S. Proteína e cicatrização de feridas. *Revista Nutricias*, scielopt, p. 27 – 30, 09 2012. ISSN 2182-7230.
- [67] ARNOLD, M.; BARBUL, A. Nutrition and wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 117, n. SUPPLEMENT, p. 42S–58S, jun 2006.

-
- [68] VIDAL, B. de C.; MELLO, M. L. S. Collagen type i amide i band infrared spectroscopy. *Micron*, Elsevier BV, v. 42, n. 3, p. 283–289, apr 2011.
- [69] BELBACHIR, K. et al. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer Nature, v. 395, n. 3, p. 829–837, aug 2009.
- [70] BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Elsevier BV, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, sep 2007.

APÊNDICE

Segue aqui o resultados usando os picos de absorção referentes a lipídios.

O desvio padrão entre as amostras não são suficientemente pequenos para que o intervalo de confiança fornecesse segurança interpretativa.

Figura A.1: Resultados teste *T* de Student par-a-par. A figura mostra as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro de infravermelho das amostras de pele C - Controle, 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Ao representar as diferenças entre grupos, utilizou-se as bandas de Lipídio C (1743 cm^{-1}), Lipídio D (2852 cm^{-1}), Lipídio E (2924 cm^{-1}) e Lipídio F (2956 cm^{-1}).

Fonte : autor da dissertação.

Figura A.2: Resultados teste *T* de Student par-a-par. A figura mostra as médias e desvio padrão das derivadas de segunda ordem do espectro de infravermelho das amostras 3D - 3º dia de cicatrização, 7D - 7º dia de cicatrização, 14D - 14º dia de cicatrização e 21D - 21º dia de cicatrização. Considerando $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando não há representação, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com ****. Ao representar as diferenças entre grupos, utilizou-se as bandas de Lipídio C (1743 cm^{-1}), Lipídio D (2852 cm^{-1}), Lipídio E (2924 cm^{-1}) e Lipídio F (2956 cm^{-1}).

Fonte : autor da dissertação.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto intitulado “**ESTUDO DE PELE QUEIMADA POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (FTIR) E TRATADA POR LASER DE FEMTOSSEGUNDOS**” protocolo nº **165/15** sob a responsabilidade de **DENISE MARIA ZECELL**– que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (**CEUAIPEN**) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP), em reunião de 23/09/2015 .

Vigência do Projeto	Setembro/2015 a Setembro/2017
Espécie/linhagem	Rato/Wistar
Nº de animais	53 animais
Peso/Idade	Peso: 300g e Idade: 8 a 10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério do IPEN – CNEN/SP

São Paulo, 05 de outubro de 2015.

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora da CEUA-IPEN

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**