

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIANA TEIXEIRA GOMES

**DISCUSSÃO SOBRE PROPRIEDADES ÓPTICAS E HISTOLOGIA
DE PELE DE RATO SADIA E QUEIMADA**

São Paulo - SP

2019

MARIANA TEIXEIRA GOMES

**DISCUSSÃO SOBRE PROPRIEDADES ÓPTICAS E HISTOLOGIA
DE PELE DE RATO SADIA E QUEIMADA**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho,
para obtenção do título de Doutora em Biofotônica
Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Fátima Teixeira
da Silva

**São Paulo - SP
2019**

Gomes, Mariana Teixeira.

Discussão sobre propriedades ópticas e histologia de pele de rato sadia e queimada. / Mariana Teixeira Gomes. 2019.

55 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof^a.Dr^a. Daniela de Fátima Teixeira da Silva.

1. Coeficiente de absorção. 2. Coeficiente de espalhamento. 3. Coeficiente de atenuação. 4. Espectroscopia difusa. 5. Kubelka-Munk. 6. Queimadura.

I. Silva, Daniela de Fátima Teixeira da.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 17 de dezembro de 2019

TERMO DE APROVACAO

Aluno (a): Mariana Teixeira Gomes

Titulo da Tese: "Correlação entre propriedades ópticas e histologia de pele de rato sadia e queimada™"

Presidente: PROF[^]. DR[^]. DANIELA DE FATIMA TEIXEIRA DA SILVA



Membro: PROF^o. DR^o. CHRISTIANE PAV.



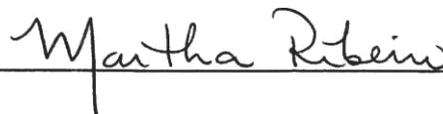
Membro: PROF. DR. ALESSANDRO MELODEANA



Membro- PROF. DR. THIAGO MICHEL DE BRITO FARIAS



Membro: PROF[^]. DR[^]. MARTHA SIMOES RIBE



*“Para todos que já tiveram um momento de fraqueza.
Não vai doer para sempre, então não deixe isso
afetar o que há de melhor em você.”*

J. A. Redmerski

Agradecimentos

À Universidade Nove de Julho (UNINOVE) por possibilitar e amparar da melhor forma possível a obtenção do título de Doutora.

À CAPES, pelo apoio financeiro oferecido desde o início do curso e por auxiliar na realização de um sonho ao me conceder bolsa no Programa Institucional de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE).

À Professora Doutora Daniela de Fátima Teixeira da Silva por toda atenção, suporte e paciência, e pela excelente orientação desde a Iniciação Científica em 2012. A cada conversa, reunião e problema resolvido percebo que não haveria pessoa melhor para estar comigo nessa jornada acadêmica.

À Professora Doutora Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues e ao Doutor Bruno Tavares Sedassari pelo auxílio na leitura e compreensão do conteúdo histológico aqui apresentado.

A todos os professores do programa de pós-graduação, sem os quais a minha formação e a de dezenas de outros alunos não seria possível. Possuo um carinho especial por todos os docentes que se fizeram presente, sem exceções.

Aos amigos e colegas de laboratório, por serem responsáveis por parte da alegria em frequentar a universidade e por todos os momentos e experimentos bons que passamos juntos.

À *University of Rochester*, aos doutores Hani Awad e Timothy Baran, e a toda equipe do *Medical Center* por me receberem de braços abertos durante meu período no exterior.

À minha família e amigos, que fornecem suporte e estímulo constante para que a obtenção do título de Doutora seja alcançada.

Resumo

Contextualização: A interação entre luz e tecido biológico se dá através da reflexão, refração, absorção, espalhamento e transmissão. A determinação de tais propriedades é importante para que dispositivos ópticos sejam adequadamente projetados, sinais de diagnóstico sejam bem interpretados e para que protocolos de terapias fotônicas sejam seguros, uma vez que as propriedades ópticas de um tecido afetam o comportamento da luz que nele incide. A espectroscopia óptica difusa tem avançado como ferramenta promissora para determinação da reflectância e transmitância e, uma vez que esses dados são coletados, a função Kubelka-Munk para aquisição indireta dos demais parâmetros pode ser utilizada para determinar coeficientes de absorção, espalhamento reduzido, atenuação reduzida e profundidade de penetração. Sendo a pele a maior barreira física durante as terapias fotônicas e considerando o fato de que o tecido lesionado se comporta de forma diferente quando comparado ao sadio, é importante que as propriedades ópticas da pele sejam conhecidas em ambos os estados fisiológicos. **Objetivo:** Analisar as diferenças ópticas e histológicas entre pele de rato sadia e pele de rato após indução de queimadura. **Material e métodos:** Ratos Wistar sofreram indução de queimadura por escaldamento sob anestesia geral, e foram eutanasiados após 3, 7 e 14 dias. Através de análise espectroscópica, as biópsias de pele queimada e sadia tiveram seus valores de transmitância e reflectância coletados entre os comprimentos de onda 350 e 1400 nm. Os dados foram tratados pela função Kubelka-Munk para a obtenção dos coeficientes de absorção, espalhamento reduzido e atenuação reduzida. Análise histológica das biópsias foi realizada para que a comparação entre as propriedades ópticas e histológicas fosse avaliada. **Resultados:** 3 dias após indução de queimadura os coeficientes de absorção, espalhamento reduzido e atenuação reduzida foram maiores em pele sadia; histologicamente foi observado infiltrado inflamatório intenso com perda de epitélio e parte da derme. 7 dias após indução de queimadura todos os coeficientes estudados foram maiores em pele lesionada; histologicamente as biópsias apresentaram remodelação dérmica e reepitelização abaixo da área da lesão. 14 dias após indução de queimadura, os coeficientes de absorção e atenuação reduzida se mantiveram maiores em pele queimada, enquanto o coeficiente de espalhamento reduzido foi maior em pele sadia; histologicamente é observada completa reparação epidérmica e ausência de anexos cutâneos. **Conclusão:** A partir dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que a condição em que a pele se encontra influencia no comportamento da luz que incide sobre esse tecido, assim como a fase do reparo em que ele se encontra. Há indícios de que os parâmetros de irradiação devem ser alterados de acordo com a condição específica em que a pele se encontra.

Palavras-chave: coeficiente de absorção, coeficiente de espalhamento, coeficiente de atenuação, espectroscopia difusa, Kubelka-Munk, queimadura.

Abstract

Background: The interaction between light and biological tissue occurs through reflection, refraction, absorption, scattering, and transmission. Determining such properties is important for optical devices to be properly designed, diagnostic signals to be well interpreted, and for photonic therapy protocols to be safe once the optical properties of tissue affect the light's behavior. Diffuse optical spectroscopy has advanced as a promising tool for non-invasive determination of reflectance and transmittance. Once this data is collected, the Kubelka-Munk function for the indirect acquisition of the other parameters can be used to determine absorption coefficient, reduced scattering coefficient, reduced attenuation coefficient, and penetration depth. Since the skin is the major physical barrier during photonic therapies and that injured tissue behaves differently compared to healthy tissue, it is important that the optical properties of the skin be known in both physiological states. **Objective:** The aim of this study was to analyze the optical and histological differences between healthy rat skin and rat skin after burn induction. **Methods:** Wistar rats underwent scalding burn induction under general anesthesia and were euthanized after 3, 7 and 14 days. Through spectroscopic analysis, skin biopsies had their transmittance and reflectance values collected between 350 and 1400 nm wavelengths. Data was then processed by the Kubelka-Munk function to obtain the absorption coefficient, reduced scattering coefficient, and reduced attenuation coefficient. Histological analysis of the biopsies was performed so that the comparison between the optical and histological properties could be evaluated. **Results:** 3 days after burn induction the absorption coefficient, reduced scattering coefficient, and reduced attenuation coefficient was higher in healthy skin; histologically, an intense inflammatory infiltrate with loss of epithelium and part of the dermis was observed. 7 days after burn induction all the coefficients studied was higher in burned skin; histologically, the biopsies showed dermal remodeling and reepithelization below the lesion area. 14 days after burn induction, the absorption and reduced attenuation coefficients remained higher in burned skin, while the reduced scattering coefficient was higher in healthy skin; histologically, it's seen complete epidermal repair and absence of skin appendages. **Conclusion:** From the results obtained in the present study it can be concluded that the condition in which the skin is found influences the behavior of the light that falls on this tissue, as well as the repair phase in which it is found. There are indications that irradiation parameters should be altered according to the specific condition of the skin.

Keywords: absorption coefficient, scattering coefficient, attenuation coefficient, diffuse spectroscopy, Kubelka-Munk, burn.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo da reflexão difusa e refração	12
Figura 2: Espalhamento tipo Rayleigh. Espalhamento tipo Mie	14
Figura 3: Corte histológico de pele humana	18
Figura 4: Profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda	19
Figura 5: Lesão circular com <i>punch</i> cirúrgico em rato após 8 dias. Queimadura por escaldo em rato após 7 dias	20
Figura 6: Indução da queimadura por escaldo com água aquecida a 60 °C	25
Figura 7: Molde para realização da queimadura por escaldo	25
Figura 8: Diagrama esquemático do espectrofotômetro utilizado	27
Figura 9: Corte histológico de pele de rato três dias após indução da queimadura, sete dias após indução da queimadura e quatorze dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina	30
Figura 10: Coeficiente de absorção de pele de rato sadia e de três dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	31
Figura 11: Coeficiente de espalhamento reduzido de pele de rato sadia e de três dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	32
Figura 12: Coeficiente de atenuação reduzida de pele de rato sadia e de três dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	33
Figura 13: Corte histológico de pele de rato três dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina	35
Figura 14: Coeficiente de absorção de pele de rato sadia e de sete dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	36
Figura 15: Coeficiente de espalhamento reduzido de pele de rato sadia e de sete dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	37
Figura 16: Coeficiente de atenuação reduzida de pele de rato sadia e de sete dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	38
Figura 17: Corte histológico de pele de rato sete dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina	40
Figura 18: Corte histológico de pele de rato sete dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina	41
Figura 19: Coeficiente de absorção de pele de rato sadia e de quatorze dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda .	42
Figura 20: Coeficiente de espalhamento reduzido de pele de rato sadia e de quatorze dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	43
Figura 21: Coeficiente de atenuação reduzida de pele de rato sadia e de quatorze dias após indução da queimadura, com relação ao comprimento de onda	44
Figura 22: Corte histológico de pele de rato quatorze dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina	46

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores para a anisotropia e seu significado	14
Tabela 2: Valores de significância estatística da análise de <i>score</i> do infiltrado inflamatório entre as condições de pele de rato estudadas	29
Tabela 3: Análise histológica do <i>score</i> do infiltrado inflamatório e do tecido de granulação de pele de rato sadia e após três, sete e quatorze dias de indução da queimadura	30
Tabela 4: Valores de transmitância difusa, reflectância difusa, coeficiente de absorção, coeficiente de espalhamento reduzido e coeficiente de atenuação reduzida, em função do comprimento de onda em pele de rato sadia e após três dias de indução da queimadura	34
Tabela 5: Valores de transmitância difusa, reflectância difusa, coeficiente de absorção, coeficiente de espalhamento reduzido e coeficiente de atenuação reduzida, em função do comprimento de onda em pele de rato sadia e após sete dias de indução da queimadura	39
Tabela 6: Valores de transmitância difusa, reflectância difusa, coeficiente de absorção, coeficiente de espalhamento reduzido e coeficiente de atenuação reduzida, em função do comprimento de onda em pele de rato sadia e após quatorze dias de indução da queimadura	45

Lista de Abreviaturas e Siglas

- A: coeficiente de absorção K-M
C: concentração de agentes absorvedores
D: espessura do tecido
DNA: ácido desoxirribonucleico
g: coeficiente de anisotropia
GQ: grupo queimadura
GS: grupo sadio
I': intensidade da radiação refletida/transmitida
I₀: intensidade da radiação incidente
I(z): intensidade da radiação a uma distância z
K-M: Kubelka-Munk
R: reflectância
R_d: reflectância difusa
S: coeficiente de espalhamento K-M
T: transmitância
T_d: transmitância difusa
z: espessura do meio
Δ: profundidade de penetração
 μ_a : coeficiente de absorção
 μ_s : coeficiente de espalhamento
 μ'_s : coeficiente de espalhamento reduzido
 μ_T : coeficiente de atenuação
 μ'_T : coeficiente de atenuação reduzida
 φ : ângulo de espalhamento

Sumário

1. Contextualização	10
1.1 Propriedades ópticas de tecidos	11
1.1.1 Reflexão e refração	11
1.1.2 Absorção	12
1.1.3 Espalhamento	13
1.1.4 Transmissão	14
1.2 Modelos teóricos para medição de propriedades ópticas	15
1.2.1 Kubelka-Munk	16
1.3 Pele	17
1.3.1 Processo de cicatrização	19
1.3.2 Queimadura	20
1.3.3 Pele humana vs. pele de roedores	21
1.4 Justificativa	22
2. Objetivo Geral	23
2.1 Objetivos específicos	23
3. Material e Métodos	24
3.1 Indução da queimadura	24
3.2 Preparação das biópsias	25
3.3 Análise espectroscópica	26
3.4 Análise histológica	27
3.5 Análise estatística	28
4. Resultados	29
4.1 Três dias após indução da queimadura	30
4.2 Sete dias após indução da queimadura	35
4.3 Quatorze dias após indução da queimadura	41
5. Discussão	47
6. Conclusão	51
7. Referências Bibliográficas	52

1. Contextualização

As propriedades ópticas de um tecido afetam o comportamento da luz tanto nas aplicações diagnósticas quanto nas terapêuticas. Nas aplicações diagnósticas, a luz deve penetrar o tecido, interagir com suas estruturas e então emergir de volta para o meio de origem para que seja detectada (Carneiro *et al.*, 2019).

Já nas aplicações terapêuticas, a luz deve penetrar no tecido e ser absorvida em algum momento para gerar o efeito desejado. Especificamente na terapia por fotobiomodulação, a energia absorvida deve ser convertida majoritariamente em fotoquímica, isto é, a geração de calor deve ser mínima (Hamblin, 2017).

Então, determinar as propriedades ópticas de um tecido é a etapa preliminar para que dispositivos ópticos sejam adequadamente projetados, sinais de diagnósticos sejam bem interpretados e protocolos terapêuticos sejam mais seguros (Jacques, 2013; Carneiro *et al.*, 2019). A próxima etapa é estimar a distribuição da luz e a deposição de energia no tecido usando as propriedades ópticas em um modelo de propagação da luz.

Diferentes modelos de propagação da luz têm sido desenvolvidos com base na Lei de Beer-Lambert modificada ou em simulações computacionais usando método de Monte Carlo (Tuchina *et al.*, 2015; Bashkatov *et al.*, 2016). No entanto, tais métodos requerem muitos parâmetros ópticos a serem inseridos e, conseqüentemente, longo tempo de processamento de dados. O modelo de Kubelka-Munk, por outro lado, é um método analítico mais simples para que se compreenda a propagação da luz no tecido a partir de medidas da reflectância e transmitância (Li *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a espectroscopia óptica difusa tem avançado como uma ferramenta promissora para determinação não invasiva da reflectância e transmitância de tecidos biológicos (Babadi *et al.*, 2019; Ong *et al.*, 2019). A forte difusão da luz presente nesses tecidos faz deles um meio turbido, ou seja, são meios não homogêneos e caracterizam-se pela impossibilidade da luz em propagar-se em linha reta e com velocidade constante. Sendo assim, quando há interação entre fótons e tecido biológico, há ocorrência dos fenômenos de

reflexão, refração, absorção, espalhamento e transmissão, simultaneamente (da Silva *et al.*, 2017; Hamdy *et al.*, 2017).

A seguir, tais fenômenos ópticos serão abordados com maior detalhamento, assim como o modelo de Kubelka-Munk, com ênfase no tecido biológico.

1.1 Propriedades ópticas de tecidos

As propriedades ópticas estão diretamente ligadas às condições e alterações fisiológicas dos tecidos. É destacada a importância dos coeficientes de absorção e espalhamento para análises diagnósticas, uma vez que são indicadores importantes da condição do tecido (Hamdy *et al.*, 2017).

As propriedades ópticas de reflexão, refração, espalhamento, transmissão e absorção vão determinar como a luz interage com tecidos biológicos. Para tanto, algumas propriedades devem ser diretamente medidas, sendo as mais comuns a reflectância e a transmitância difusas, para que as demais sejam obtidas indiretamente por meio de modelos de propagação de luz (coeficientes de absorção, de transmissão e de espalhamento, por exemplo).

1.1.1 Reflexão e refração

A reflexão (Fig. 1A) é a porção do feixe de luz que retorna ao meio de origem, não penetrando no tecido irradiado. Uma vez que tecidos biológicos possuem superfície rugosa, quando estes são irradiados o processo de reflexão se dá de maneira difusa. Isso ocorre quando a rugosidade da superfície é igual ou maior que o comprimento de onda da luz incidente (da Silva *et al.*, 2017).

A refração (Fig. 1B), por sua vez, ocorre com a mudança na velocidade em que a luz se propaga. Essa mudança é consequência da alteração na superfície onde a luz incide devido a densidades diferentes e massas específicas, ou seja, da mudança de meio - como do ar para o tecido biológico, por exemplo (da Silva *et al.*, 2017).

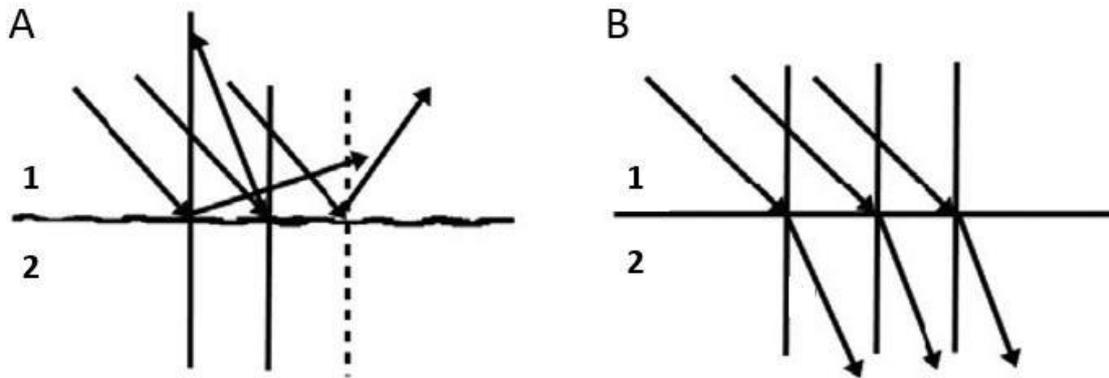


Figura 1: Esquema ilustrativo da reflexão difusa (A) e refração (B) (adaptado de da Silva *et al.*, 2012).

Reflectância (R) representa a razão entre as intensidades das radiações refletida (I') e incidente (I_0):

$$R = \frac{I'}{I_0} \quad (1)$$

1.1.2 Absorção

Absorção é a capacidade de um meio absorver radiação eletromagnética incidente. Ela depende da constituição eletrônica e estado vibratório de seus átomos e de suas moléculas, do comprimento de onda da radiação incidente, da espessura da camada absorvedora e de parâmetros internos, tais como a concentração de agentes absorvedores e a temperatura. A absorção só ocorrerá se a frequência da luz incidente corresponder à frequência natural de vibração das partículas absorvedoras do meio (da Silva *et al.*, 2017).

De acordo com a Lei de Lambert a intensidade da radiação diminui exponencialmente, ao atravessar um meio em relação à sua espessura z , então:

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_a z} \quad (2)$$

Sendo $I(z)$ a intensidade da radiação a uma distância z do ponto de incidência, (I_0) a intensidade da luz incidente em $z=0$, (z) o caminho óptico e (μ_a) o coeficiente de absorção óptica do meio, dado em cm^{-1} .

A Lei de Beer relaciona a diminuição na intensidade da radiação ao atravessar um meio em relação à concentração de absorvedores numa determinada espessura, então:

$$I(z) = I_0 e^{-k.C.z} \quad (3)$$

Sendo (k) um fator que depende de outros parâmetros que influenciam a absorção e (C) a concentração de agentes absorvedores.

A absorção ocorre quando a energia do fóton incidente é a mesma do elétron em seu estado excitado, de forma que o fóton é absorvido e o elétron passa para o estado de energia correspondente. Normalmente essa transformação produz uma energia térmica transitória que não ocasiona danos ao tecido onde é gerada (da Silva *et al.*, 2017).

No tecido biológico, a absorção óptica está geralmente relacionada às concentrações de hemoglobina, melanina, saturação de oxigênio e água (Hamdy *et al.*, 2017).

1.1.3 Espalhamento

O espalhamento (Fig. 2) é o fenômeno decorrente da reflexão a partir de partículas dentro do tecido alvo, ou seja, não retornam ao meio de origem (da Silva *et al.*, 2017).

Existe o espalhamento elástico, quando os fótons incidente e espalhado têm a mesma energia, e o espalhamento inelástico, quando há perda de energia no espalhamento ao alcançar um meio mais denso. No espalhamento elástico tipo Rayleigh, os centros espalhadores são muito menores que o comprimento de onda e os fótons podem ser espalhados para frente e/ou para trás (Fig. 2A), enquanto no espalhamento elástico tipo Mie, os centros espalhadores são maiores que o comprimento de onda e os fótons são majoritariamente espalhados para frente (Fig. 2B) (da Silva *et al.*, 2017).



Figura 2: Espalhamento tipo Rayleigh (A). Espalhamento tipo Mie (B).

O coeficiente de espalhamento μ_s , dado em cm^{-1} , está relacionado aos componentes responsáveis pelo espalhamento dos fótons.

A teoria Rayleigh ou a teoria Mie não descrevem completamente o fenômeno do espalhamento quando os fótons interagem com o tecido biológico, sendo necessário o desenvolvimento de outros modelos.

Um dos modelos mais aceitos é aquele que considera o coeficiente de anisotropia, g , do meio espalhador. Ele representa o valor médio do cosseno do ângulo de espalhamento (φ) (Richards-Kortum; Sevick-Muraca, 1996).

Na Tabela 1 são indicados os valores-limite da anisotropia e seu significado quanto ao tipo de espalhamento.

Tabela 1: Valores para a anisotropia e seu significado.

Anisotropia ($g = \cos \varphi$)	Tipo de Espalhamento
-1	Retroespalhamento
0	Espalhamento isotrópico
1	Mesma direção e mesmo sentido da onda incidente

No tecido biológico, o espalhamento óptico está relacionado, por exemplo, à concentração lipídica, tamanho do núcleo celular, alterações do índice de refração da membrana celular (Hamdy *et al.*, 2017) e a presença de colágeno (Bashkatov *et al.*, 2016).

1.1.4 Transmissão

A transmissão se dá quando parte da radiação incidente não sofre nenhum dos fenômenos citados anteriormente - reflexão, refração, absorção ou espalhamento. Porém, a parcela de luz que é transmitida sofre atenuação (da Silva *et al.*, 2017).

O coeficiente de atenuação (μ_T), dado em cm^{-1} , é a soma dos coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento (μ_s):

$$\mu_T = \mu_a + \mu_s \quad (4)$$

Em meios túrbidos, utiliza-se o coeficiente de espalhamento reduzido (μ'_s), dado em cm^{-1} , que depende do coeficiente de espalhamento (μ_s) e da anisotropia (g) do meio espalhador:

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (5)$$

A transmitância (T) é a razão entre a intensidade de radiação transmitida (I) pelo meio em relação à intensidade incidente (I_0):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (6)$$

1.2 Modelos teóricos para medição de propriedades ópticas

Conhecer as propriedades ópticas de um tecido biológico é de extrema importância para melhor adequabilidade dos parâmetros de irradiação utilizados em fototerapias (Carneiro *et al.*, 2019). Para tanto, existem algumas técnicas que podem ser aplicadas. A grande maioria dessas técnicas utiliza luz para explorar o tecido alvo, conhecidas como técnicas fotométricas, onde a luz é medida por si só tanto quando é propagada pelo tecido, quanto quando ocorre a reflexão difusa e transmissão (da Silva *et al.*, 2017).

As técnicas fotométricas podem ser classificadas em *ex vivo* ou *in vivo*. Quando classificadas como *ex vivo*, podem ser obtidos parâmetros ópticos diretamente ou indiretamente. Quando *in vivo*, as medições dependerão da geometria do alvo e do equipamento, da quantidade a ser medida e da situação em que essas medições são feitas (Kim; Wilson, 2011).

As medidas diretas são aquelas em que um coeficiente microscópico é medido de forma a não precisar de um modelo de propagação de luz. As medidas indiretas, por sua vez, são aquelas que contam com a determinação

dos parâmetros através de um modelo de propagação de luz, onde os dados coletados são ajustados às propriedades ópticas (Kim; Wilson, 2011).

1.2.1 Kubelka-Munk

Kubelka-Munk (K-M) é a função mais utilizada para determinação dos coeficientes de absorção, espalhamento reduzido, atenuação reduzida e profundidade de penetração, usando as medidas de reflectância (R_d) e transmitância (T_d) difusas (Golovynskiy *et al.*, 2018). Estas duas últimas, no entanto, devem ser obtidas diretamente por meio da espectroscopia óptica difusa, desde que a espessura (D) do tecido alvo seja conhecida.

O modelo K-M descreve dois fluxos opostos e distinguíveis de fótons que se propagam em uma única direção: um fluxo corresponde à propagação do feixe incidente e o outro ao retroespalhamento resultante (Sabino *et al.*, 2016). Dessa forma, duas equações bastam para solucionar o modelo de propagação da luz através do tecido biológico, uma para cada fluxo.

No modelo, os fluxos são sujeitos ao espalhamento elástico e à absorção de um fóton por vez, sendo a probabilidade de ocorrência desses eventos diretamente proporcional ao coeficiente de espalhamento K-M, representado por S , e ao coeficiente de absorção K-M, representado por A (Sabino *et al.*, 2016).

$$A = (x - 1)S \quad (7)$$

$$S = \frac{1}{yD} \ln \left[\frac{1 - R_d(x-y)}{T_d} \right] \quad (8)$$

D é a espessura da amostra, em cm, e:

$$x = \frac{1 + R_d^2 - T_d^2}{2R_d} \quad (9)$$

$$y = \sqrt{x^2 - 1} \quad (10)$$

As seguintes equações foram usadas para converter os coeficientes K-M nos coeficientes de absorção (μ_a), espalhamento reduzido (μ'_s), atenuação reduzida (μ'_T) e profundidade de penetração (Δ) (Thennadil, 2008; Sabino *et al.*, 2016):

$$S = \frac{3}{4} \mu'_s \quad (11)$$

$$A = 2\mu_a \quad (12)$$

$$\mu'_T = \mu_a + \mu'_s \quad (13)$$

$$\Delta = [3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)]^{-0,5} \quad (14)$$

1.3 Pele

A pele é o órgão responsável pelo revestimento do corpo e corresponde a 16% da massa corporal, sendo considerada um dos maiores órgãos do corpo humano. Tem funções importantes para a manutenção da homeostase do indivíduo como, por exemplo, protegendo-o contra desidratação e atritos com o ambiente externo, proporcionando constantemente informações sobre esse ambiente, colaborando com a termorregulação do corpo e excreção de substâncias, protegendo o corpo contra a radiação ultravioleta e, não menos importante, auxiliando o sistema imunológico contra a invasão de microrganismos (Junqueira; Carneiro, 2013).

A pele é composta, histologicamente, por uma região epitelial chamada epiderme e uma região conjuntiva chamada derme (Fig. 3). Abaixo da derme, ainda, é possível observar a hipoderme - ou tecido celular subcutâneo - que é responsável por conectar a pele com os órgãos subjacentes (Junqueira; Carneiro, 2013).

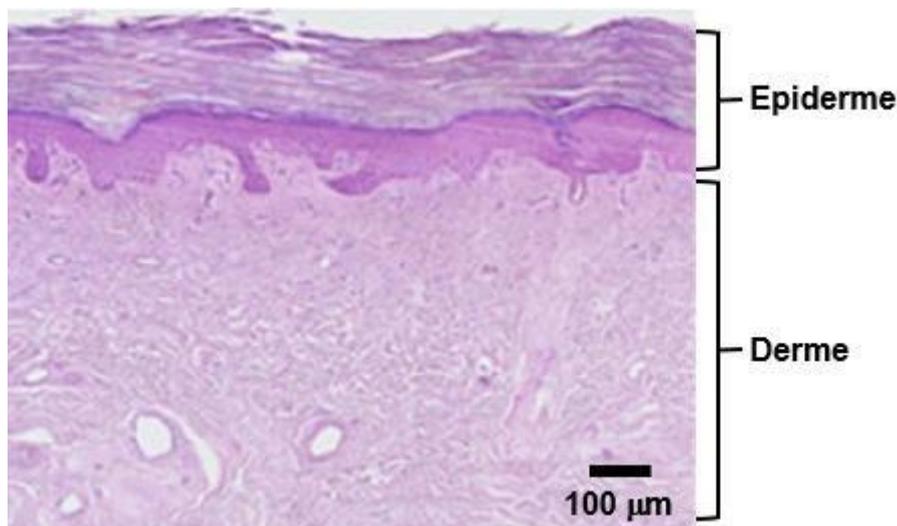


Figura 3: Corte histológico de pele humana (adaptado de Vela-Romera *et al.*, 2019).

Na região da epiderme são encontrados ácidos graxos, que são substâncias orgânicas presentes em grande quantidade em células como queratinócitos e sebócitos, responsáveis por manter os níveis de lipídio adequados e auxiliar em quadros inflamatórios (Dumas; Ntambi, 2018). Na camada basal da epiderme, a melanina - que é um pigmento - tem como função proteger o DNA contra a radiação solar (ultravioleta) (Vela-Romera *et al.*, 2019).

Se aprofundando mais nas camadas da pele, onde existe vascularização, podemos observar a presença de hemoglobinas. Essas proteínas são responsáveis por levar moléculas de oxigênio do pulmão para os demais tecidos do corpo (Gabriela, 2013). Ainda na região dérmica, encontra-se a proteína elastina, que tem como função dar elasticidade à pele (Tsai *et al.*, 2001).

Considerando o fato de que a luz emitida nos comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm - abrangendo a região vermelha e infravermelha do espectro eletromagnético - apresenta maior profundidade de penetração na pele (Fig. 4) (Ash *et al.*, 2017), é possível afirmar que mais informações podem ser obtidas do tecido quando tais comprimentos de onda são utilizados para análise das propriedades ópticas (da Silva *et al.*, 2012; Hamdy *et al.*, 2017).

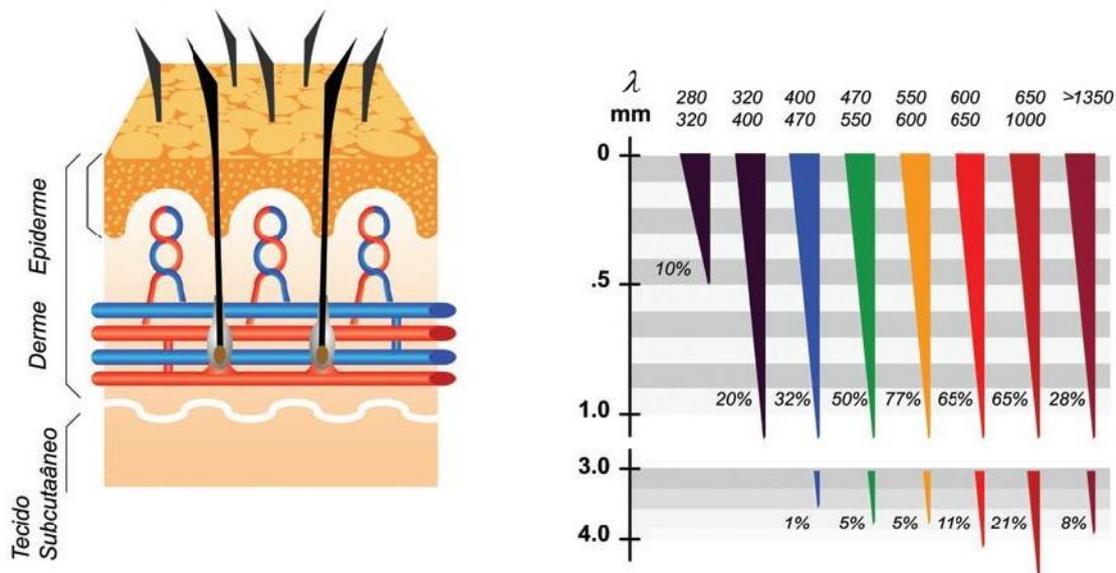


Figura 4: Profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda (da Silva *et al.*, 2012).

1.3.1 Processo de cicatrização

Quando um fragmento de pele é removido, dá-se início ao processo cicatricial na região afetada (Junqueira; Carneiro, 2013). Basicamente, esse processo é dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelamento (Gomes *et al.*, 2017).

A fase infamatória tem como principal objetivo a limpeza da lesão perante células e moléculas estranhas à constituição normal da pele. Primeiramente ocorre a ativação das plaquetas, ocasionando a coagulação de fibrinas. Também há liberação de fatores quimiotáticos e recrutamento de neutrófilos, células T e ativação de macrófagos (Rittié, 2016). Ao analisar histologicamente esta fase do reparo, é possível observar a presença do infiltrado inflamatório na derme (Junqueira; Carneiro, 2013).

A fase de proliferação é responsável por substituir as diferentes células danificadas pela lesão, estejam elas na epiderme - processo chamado de reepitelização -, derme ou hipoderme. Também ocorre a restauração de estruturas como vasos sanguíneos, terminações nervosas e glândulas sudoríparas (Rittié, 2016). Quando observada ao microscópio, esta fase conta com a presença de tecido de granulação, que é formado pelas alças dos capilares sanguíneos em formação (Junqueira; Carneiro, 2013).

A última fase do processo de cicatrização é o remodelamento, onde as fases anteriores se encerram por completo e é esperada a normalização da

espessura da epiderme, das células presentes, da composição da matriz extracelular e da presença dos vasos sanguíneos (Rittié, 2016). Na análise histológica desta fase é possível observar o tecido conjuntivo com as fibras colágenas mais organizadas e também a presença das papilas dérmicas, que indicam a cicatrização completa da pele (Gomes *et al.*, 2017).

Via de regra, o tempo de cicatrização é determinado pela extensão e profundidade da lesão, assim como o agente causador da mesma. Lesões lineares como incisões cirúrgicas concluem o processo com maior rapidez que lesões circulares (Fig. 5A), por exemplo, devido à distância entre as bordas de cada lesão. A perda de sangue também deve ser considerada, sendo que quanto maior o volume perdido, maior o tempo necessário para a cicatrização do tecido (Rittié, 2016).

1.3.2 Queimadura

Com relação à cicatrização da queimadura, foi observado que esse tipo de ferida é capaz de causar morte celular também na região abaixo da lesão que está visível, ocorrendo o impedimento da microcirculação e a futura necrose do tecido caso o tratamento adequado não seja aplicado, e este processo de necrose pode retardar a cicatrização (Stone *et al.*, 2018).

Outro fator que interfere negativamente na cicatrização de queimaduras é a remoção das bolhas formadas, havendo formação de crosta devido à exposição do tecido subjacente ao ar (Fig. 5B). Como resultado, o processo se torna mais lento e dolorido (Rittié, 2016).

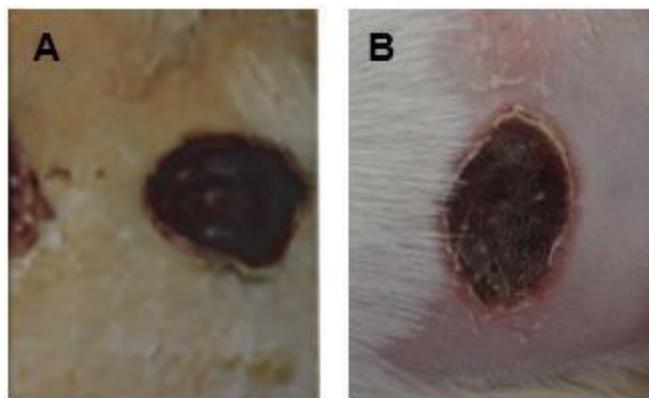


Figura 5: Lesão circular com *punch* cirúrgico em rato após 8 dias (A) (adaptado de Santana *et al.*, 2015). Queimadura por escaldamento em rato após 7 dias (B) (acervo do autor).

A queimadura consiste na lesão decorrente de agentes externos que causam calor excessivo capaz de danificar os tecidos do corpo (SBQ, 2012). A profundidade dessa lesão é utilizada para classificar a queimadura em primeiro grau - quando atinge apenas as camadas superficiais da pele -, segundo grau - lesão parcialmente profunda -, e terceiro grau - lesão profunda, podendo atingir tecido muscular e ósseo (SBQ, 2012; Stone *et al.*, 2018). Dependendo de sua extensão e profundidade, a queimadura também pode afetar o sistema imunológico da vítima, impactando diretamente o quadro clínico geral do paciente (SBQ, 2012).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ, 2012), os acidentes por escaldos são os mais recorrentes no Brasil, principalmente pelo fato de ocorrerem em ambiente doméstico, envolvendo majoritariamente crianças, mulheres e idosos. Tendo isso em vista, a utilização de um modelo experimental que mimetize esses acidentes é importante.

1.3.3 Pele humana *versus* pele de roedores

A epiderme - camada mais externa da pele - de ratos, camundongos e coelhos possui estruturação semelhante à epiderme humana, porém é mais fina. Além disso, a pele humana apresenta menos pelo corporal, mais glândulas sudoríparas e alta vascularização (Rittié, 2016).

Todos os mamíferos apresentam a mesma organização morfológica básica do folículo piloso, diferenciando apenas na quantidade em que aparecem e em alguns detalhes estruturais - como o número de glândulas sebáceas anexas a ele, por exemplo. As glândulas sudoríparas são responsáveis pela produção de suor e, nos humanos, elas aparecem por toda a extensão da pele enquanto na maioria dos demais mamíferos elas são presentes somente nas patas traseiras e dianteiras (Rittié, 2016).

A vascularização humana conta com uma rede mais complexa de capilares, o que aumenta o alcance do sangue até as camadas mais superficiais da pele, aumentando também o fluxo sanguíneo neste tecido (Rittié, 2016).

Embora haja o desejo da obtenção das propriedades ópticas diretamente em tecido humano, tal fato é limitado, principalmente, pela impossibilidade de determinação da espessura dos tecidos nos métodos *in*

vivo. Por outro lado, os métodos *ex vivo* são invasivos porque requerem uma biópsia do tecido alvo. Dessa forma, o estudo da óptica dos tecidos ainda depende dos métodos *ex vivo* para que os resultados sejam mais precisos, pois o caminho óptico dos fótons (dependente da espessura dos meios) é necessário nos diferentes modelos de propagação de luz até então conhecidos.

1.4 Justificativa

A determinação das propriedades ópticas e o conhecimento da propagação da luz através dos tecidos biológicos sadios já é importante por si só, pois conforme mencionado anteriormente, essa etapa é fundamental para que dispositivos ópticos sejam adequadamente projetados, sinais de diagnósticos sejam bem interpretados e protocolos terapêuticos sejam seguros, com a correta previsão de como a luz se distribui e quanto de energia ela deposita nos tecidos. A pele é a maior barreira física durante a interação da luz com os organismos, se fazendo necessária a compreensão do comportamento da luz nesse tecido. No entanto, nem sempre os tecidos biológicos encontram-se saudáveis, sendo necessária, também, a determinação das propriedades ópticas e da propagação da luz em condições aquém da homeostase.

2. Objetivo Geral

Analisar as diferenças ópticas e histológicas entre pele de rato sadia e pele de rato após indução de queimadura.

2.1 Objetivos específicos

- Medir a transmitância difusa e a reflectância difusa das diferentes condições fisiológicas de pele;
- Determinar indiretamente os coeficientes de absorção, espalhamento reduzido e atenuação reduzida das diferentes condições fisiológicas de pele;
- Comparar as características ópticas às histológicas em uma mesma condição fisiológica de pele;
- Comparar as características ópticas e histológicas entre condições fisiológicas diferentes de pele.

3. Material e Métodos

A metodologia utilizada neste estudo foi elaborada atendendo às resoluções 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e submetida à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN/CNEN-SP, tendo sido aprovada sob o protocolo 95/11.

Durante o período experimental foram seguidos os princípios básicos da sensibilidade, bom senso e boa ciência elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao *International Council of Laboratory Animal Science* (ICLAS) com base nas normas internacionais, que visam o aprimoramento de condutas na experimentação animal.

Foram utilizados 7 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com massa corpórea entre 200 e 250 g, com idade entre 8 e 10 semanas, mantidos no biotério do IPEN/CNEN-SP. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, num máximo de 3 animais por caixa, em temperatura ambiente (22°C) e luminosidade controlada com ciclo de 12 horas alternado com luz e sem luz. Após alocação nos grupos de estudo, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com comida e água *ad libitum*.

Dois grupos foram estudados: grupo sadio (GS) e grupo queimadura (GQ). As amostras de pele sadia foram retiradas de regiões ílesas do dorso dos mesmos animais que foram submetidos à indução da queimadura.

3.1 Indução da queimadura

Os animais receberam injeção intraperitoneal de uma mistura de ketamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP) na dose de 80 mg/kg e de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, SP) na dose de 10 mg/kg. Foram utilizadas seringas da marca BD, com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina, comprimento de 12,7 mm, calibre de 0,33 mm e bisel trifacetado.

Após anestesiados, o dorso dos animais foi cuidadosamente tricotomizado para a realização da lesão térmica por escaldamento, onde quatro regiões circulares do dorso, com raio de 0,5 cm e área de 0,8 cm², ficaram em contato com água quente a 60 °C por 45 s (Fig. 6). Estas áreas foram delimitadas inserindo o animal em um molde, confeccionado em tubo de PVC com as mesmas quatro áreas de 0,8 cm² cada, conforme metodologia

adaptada de Cribbs *et al.* (1998) (Fig. 7). Dessa maneira, cada animal teve quatro queimaduras no dorso.



Figura 6: Indução da queimadura por escaldamento com água aquecida a 60 °C (acervo do autor).



Figura 7: Molde para realização da queimadura por escaldamento (acervo do autor).

Para prevenir a hipotermia, os animais foram manipulados sempre sobre um isopor coberto com papel descartável na bancada e mantidos em gaiolas com aquecimento até o término do efeito da anestesia.

Os animais foram eutanasiados via excesso de anestésico para a realização das biópsias nos dias 3, 7 e 14 após indução da queimadura. Foram retiradas amostras de pele queimada e sadia.

3.2 Preparação das biópsias

Biópsias de pele da região dorsal sadia e queimada contendo todas as camadas do tecido (epiderme, derme e tecido subcutâneo) foram

cuidadosamente destacadas da fáscia e removidas com tesoura cirúrgica. Para que tivessem um suporte mecânico, cada amostra de pele foi posicionada entre duas lâminas de microscópio sob mínima pressão. As lâminas estavam levemente umedecidas com soro fisiológico para minimizar os efeitos dos diferentes índices de refração entre a lâmina de vidro, o ar e o tecido.

A espessura total das amostras, incluindo as lâminas, foi medida usando um paquímetro, mas foi considerada apenas a espessura do tecido, subtraindo-se as espessuras das duas lâminas. Cada espessura foi medida três vezes, realizando-se a média e o desvio padrão de cada amostra.

3.3 Análise espectroscópica

Em até duas horas após a excisão da pele, as medições espectroscópicas foram conduzidas em um espectrofotômetro comercial (Cary 5000, Agilent, Australia) acoplado a uma única esfera integradora (Internal DRA-2500, Agilent, Australia). Os espectros da transmitância e reflectância foram medidos de 350 nm a 1400 nm. Para não comprometer a reprodutibilidade experimental, evitou-se dobrar as amostras e o tempo entre a eutanásia e as medições foi minimizado para evitar deterioração devido à possível desidratação e/ou oxidação dos constituintes do tecido. O tempo de aquisição das medidas foi, aproximadamente, de 3 minutos. Nenhuma mudança visual foi percebida nos tecidos após as medições.

Os espectros da transmitância foram obtidos colocando as amostras na frente do feixe amostra (porta a, Fig. 8) e os espectros de reflectância foram obtidos deslocando as amostras para a porta b (Fig. 8). Para a medição dos espectros de transmitância total, as amostras foram colocadas na porta a e a porta b foi fechada para medir a transmitância colimada retroespalhada. O feixe amostra foi posicionado sempre no centro das amostras. Durante as medições, as dimensões retangulares do feixe amostra foram 1 cm de altura e 0,5 cm de largura, com intensidade óptica incidente menor que 1 mW/cm^2 , dessa forma, a possibilidade de efeito térmico foi descartada.

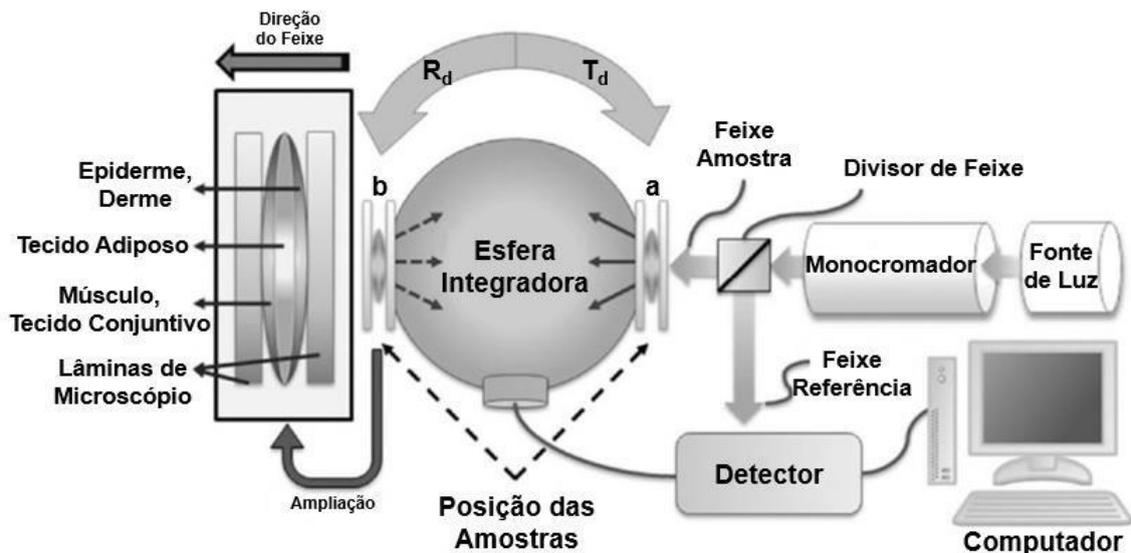


Figura 8: Diagrama esquemático do espectrofotômetro utilizado (adaptado de Sabino *et al.*, 2016).

Uma vez que as amostras foram inseridas entre duas lâminas de microscópio (Fig. 8), as reflexões originadas nas interfaces ar/ vidro/ água/ vidro/ ar foram subtraídas nas portas a e b durante a calibração da linha base. Para essa calibração foram usadas duas lâminas de microscópio com uma fina camada de soro fisiológico entre elas.

Os dados serão apresentados em tabelas contendo os valores de transmitância e reflectância difusas que foram coletados diretamente pelo espectrofotômetro, assim como os coeficientes de absorção, espalhamento reduzido e atenuação reduzida obtidos através da função Kubelka-Munk, nos comprimentos de onda mais utilizados para diagnósticos e terapias que contam com a utilização de luz (Mosca *et al.*, 2019; Musstaf *et al.*, 2019).

3.4 Análise histológica

Lâminas histológicas obtidas em experimentos independentes, mas que tiveram as lesões obtidas da mesma maneira anteriormente descrita, foram utilizadas.

As amostras de pele foram cuidadosamente removidas, fixadas com paraformaldeído 10% e processadas rotineiramente para inclusão em parafina, microtomia com cortes de 5 μm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina de acordo com o protocolo:

- 1) Hematoxilina de Harris, por 5 min;
- 2) Lavagem com água, por 5min;
- 3) Diferenciador (1 ml de ácido acético e 100 ml de álcool absoluto), por 5min;
- 4) Água destilada, por 10 min;
- 5) Eosina Y, por 5min;
- 6) Lavagem em água destilada.

O estudo histológico foi realizado por meio de análise descritiva comparativa dos grupos experimentais em um microscópio óptico (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha) avaliando-se a evolução da cicatrização da pele após as lesões. As seguintes características foram avaliadas: a) resposta inflamatória, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório; b) tecido de granulação, caracterizado pela presença de fibroblastos e neovascularização. Um *score* foi feito para os parâmetros avaliados: ausente; presença discreta; presença moderada; presença intensa (Pereira *et al.*, 2012).

3.5 Análise estatística

Para comparar a frequência de ocorrência dos valores de *score* atribuídos na análise histológica entre as condições de pele de rato estudadas, o teste Qui-quadrado foi realizado com nível de significância $\alpha = 0,05$, usando-se o software Origin Pro 2017 (OriginLab, EUA).

4. Resultados

Nos menores comprimentos de onda analisados (de 350 a 500 nm, abrangendo da região ultravioleta a verde do espectro eletromagnético) são observados os maiores coeficientes de absorção, espalhamento reduzido e atenuação reduzida.

Independentemente se a amostra de pele é sadia ou lesionada, do terceiro, sétimo ou décimo quarto dia, alguns picos de absorção foram observados nos comprimentos de onda por volta de 400, 540, 950, 1200 e 1400 nm.

Também foi observado que, quanto maiores os valores de transmitância e reflectância difusas, menores os coeficientes de absorção e atenuação reduzida (grandezas inversamente proporcionais) e maior o coeficiente de espalhamento reduzido (grandezas diretamente proporcionais).

A análise histológica apresentou diferença significativa com relação ao *score* do infiltrado inflamatório entre as seguintes condições de pele: sadia e após três dias de indução da queimadura; sadia e após sete dias de indução da queimadura; sadia e após quatorze dias de indução da queimadura; três e sete dias após indução da queimadura; três e quatorze dias após indução da queimadura. A única comparação que não apresentou significância estatística com relação ao *score* do infiltrado inflamatório foi entre sete e quatorze dias após indução da queimadura (Tab. 2).

Tabela 2: Valores de significância estatística da análise de *score* do infiltrado inflamatório entre as condições de pele de rato estudadas (sadia, três, sete e quatorze dias após indução da queimadura). Células sombreadas indicam significância estatística ($p \leq 0,05$).

Condição da Pele	Significância Estatística			
	Sadia	Dia 3	Dia 7	Dia 14
Sadia		0,0001	0,0024	0,0003
3 dias			0,0040	0,0005
7 dias				0,073
14 dias				

Com relação ao *score* atribuído para o tecido de granulação, que foi classificado como ausente ou presente, houve diferença significativa entre a pele de rato sadia e todos os dias após indução da queimadura que foram

analisados. Entre os dias três, sete e quatorze após indução da queimadura não houve diferença significativa quanto ao tecido de granulação.

Uma comparação geral do score de infiltrado inflamatório e de tecido de granulação atribuídos às diferentes condições de pele pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3: Análise histológica de score do infiltrado inflamatório e do tecido de granulação de pele de rato sadia e após três, sete e quatorze dias de indução da queimadura.

Condição da Pele	Score Inflamatório	Frequência do Score (%)	Tecido de Granulação
Sadia (n= 7)	Ausente	100	Ausente
3 dias (n= 2)	Intenso	100	Presente
7 dias (n= 3)	Discreto/Moderado	50/50	Presente
14 dias (n= 2)	Discreto	100	Presente

Abaixo, a Figura 9 apresenta uma visão panorâmica dos cortes histológicos em todos os dias pós indução da queimadura que foram analisados.

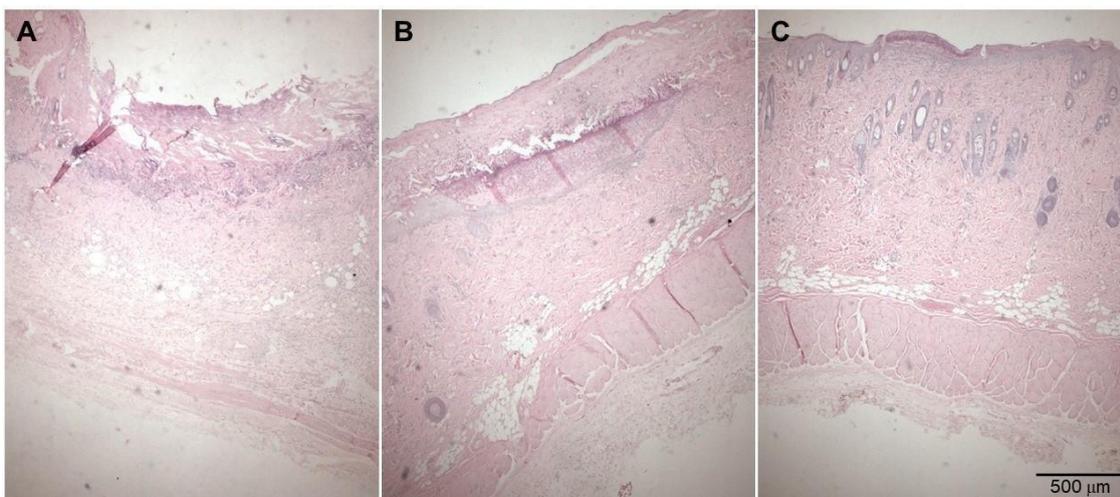


Figura 9: Corte histológico de pele de rato três dias após indução da queimadura (A), sete dias após indução da queimadura (B) e quatorze dias após indução da queimadura (C). Coloração com hematoxilina e eosina.

4.1 Três dias após indução da queimadura

Os espectros já calculados dos coeficientes de absorção (Fig. 10), espalhamento reduzido (Fig. 11) e atenuação reduzida (Fig. 12) da pele sadia e queimada são mostrados a seguir.

Após três dias de indução da queimadura, a pele lesionada absorve mais luz nos comprimentos de onda entre 350 e 550 nm; nos demais

comprimentos avaliados (entre 750 e 1400 nm) a pele sadia apresenta maior absorção, quando comparada a pele queimada. Os coeficientes de espalhamento e atenuação reduzidos são maiores em pele sadia em qualquer dos comprimentos de onda avaliados.

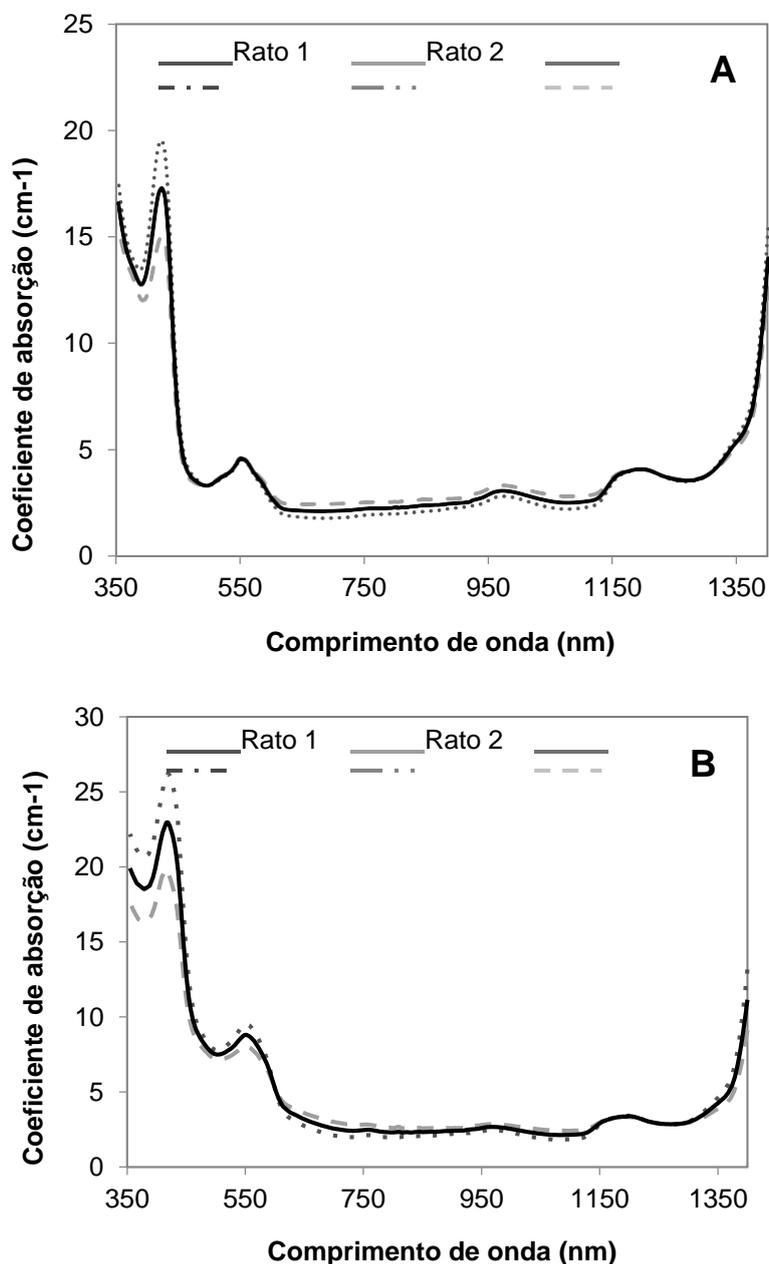


Figura 10: Coeficiente de absorção de pele de rato sadia (A) e de três dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

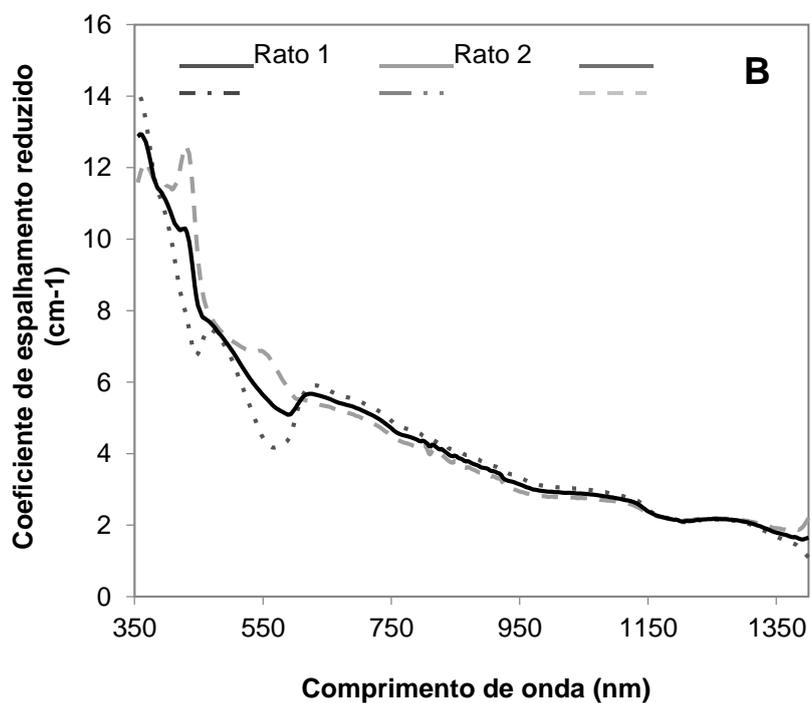
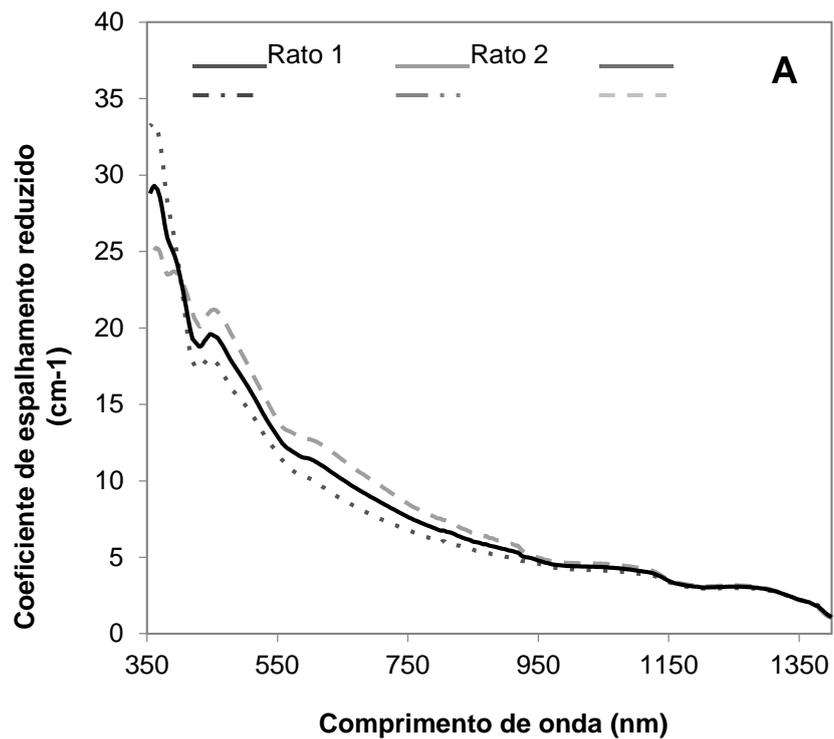


Figura 11: Coeficiente de espalhamento reduzido de pele de rato sadia (A) e de três dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

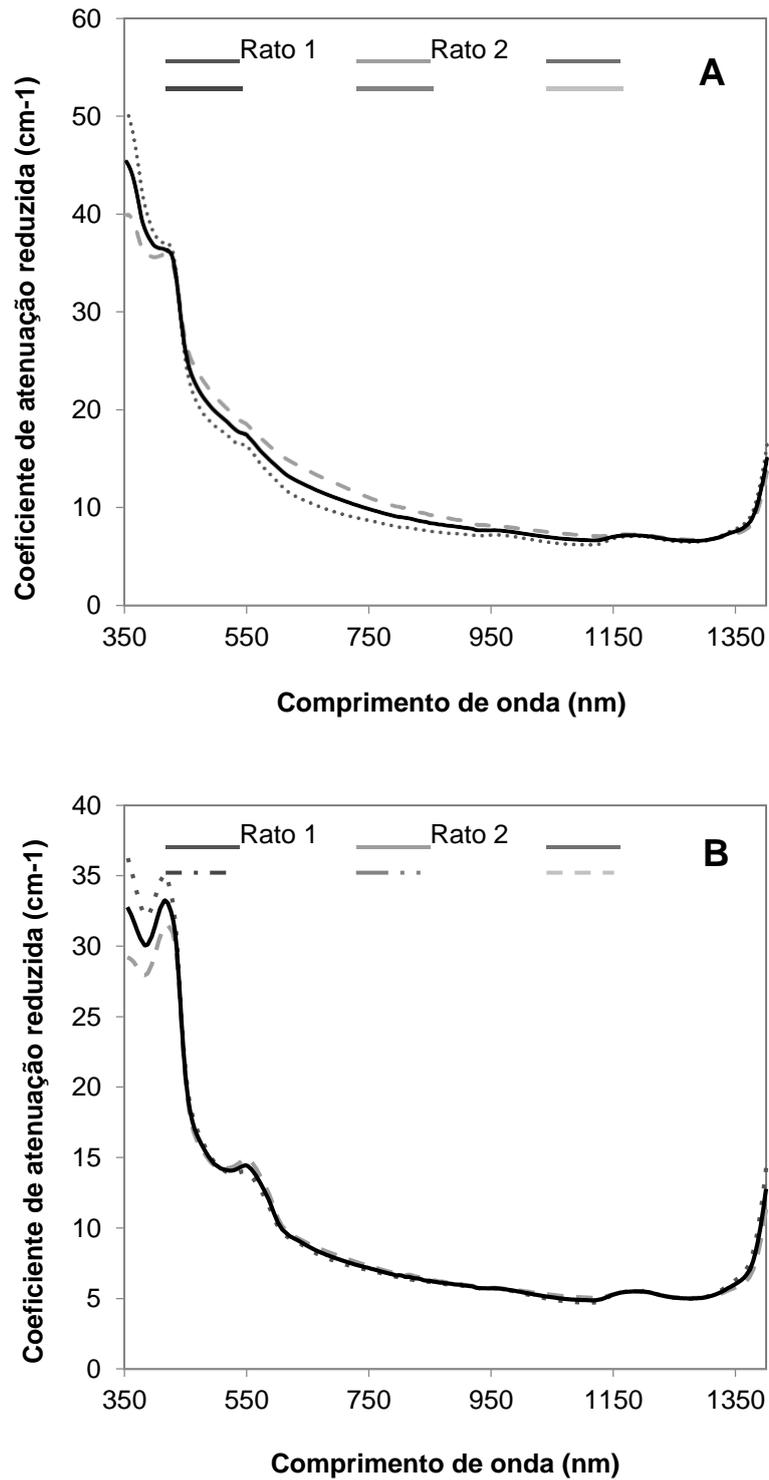


Figura 12: Coeficiente de atenuação reduzida de pele de rato sadia (A) e de três dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

Os valores dos coeficientes, bem como das transmitâncias e reflectâncias difusas para os principais comprimentos de onda usados nas terapias fotônicas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de transmitância difusa (Td), reflectância difusa (Rd), coeficiente de absorção (μ_a), coeficiente de espalhamento reduzido (μ_s') e coeficiente de atenuação reduzida (μ_t'), em função do comprimento de onda (λ) em pele de rato sadia e após três dias de indução da queimadura.

λ nm	Pele Sadia					Pele Queimada				
	Td %	Rd %	μ_a cm-1	μ_s' cm-1	μ_t' cm-1	Td %	Rd %	μ_a cm-1	μ_s' cm-1	μ_t' cm-1
405	1,1	23,6	14,1	22,5	36,6	0,6	10,3	21,4	10,8	32,2
445	3,5	27,6	9,3	19,5	28,8	2,3	11,3	15,2	8,5	23,7
460	10,6	38,6	4,6	19,3	23,8	6,8	14,3	10,0	7,8	17,8
488	15,7	40,9	3,4	17,1	20,5	11,3	16,0	7,8	7,2	14,9
532	16,3	35,5	3,9	14,3	18,1	11,7	13,9	8,0	6,1	14,1
633	37,7	21,2	2,8	4,9	7,7	45,3	16,0	2,5	3,2	5,7
660	31,4	35,7	2,2	9,8	11,9	34,4	22,3	3,0	5,5	8,5
690	32,9	34,1	2,1	9,0	11,2	37,7	23,0	2,6	5,3	8,0
730	34,4	31,8	2,2	8,1	10,3	40,5	22,7	2,4	5,0	7,4
780	36,0	29,0	2,3	7,1	9,4	42,6	21,1	2,3	4,5	6,8
808	36,7	27,7	2,3	6,7	9,0	43,5	20,3	2,3	4,2	6,5
890	38,0	24,1	2,5	5,6	8,1	45,0	17,9	2,4	3,6	6,0
940	37,7	21,2	2,8	4,9	7,7	45,3	16,0	2,5	3,2	5,7
980	36,5	19,0	3,1	4,5	7,6	45,0	14,7	2,6	3,0	5,6
1064	41,4	19,9	2,6	4,3	6,9	50,3	15,4	2,2	2,9	5,0
1320	33,1	10,7	4,3	2,7	7,0	42,5	9,5	3,3	2,0	5,3
1340	29,2	8,8	5,0	2,4	7,4	38,2	8,2	3,9	1,9	5,8

Com relação à análise histológica, após três dias de queimadura é observado infiltrado inflamatório polimorfonuclear intenso e presença de tecido de granulação. Além disso, é notável a perda da epiderme e o processo de necrose. Na área da lesão o colágeno apresenta degeneração eosinofílica (Fig. 13).

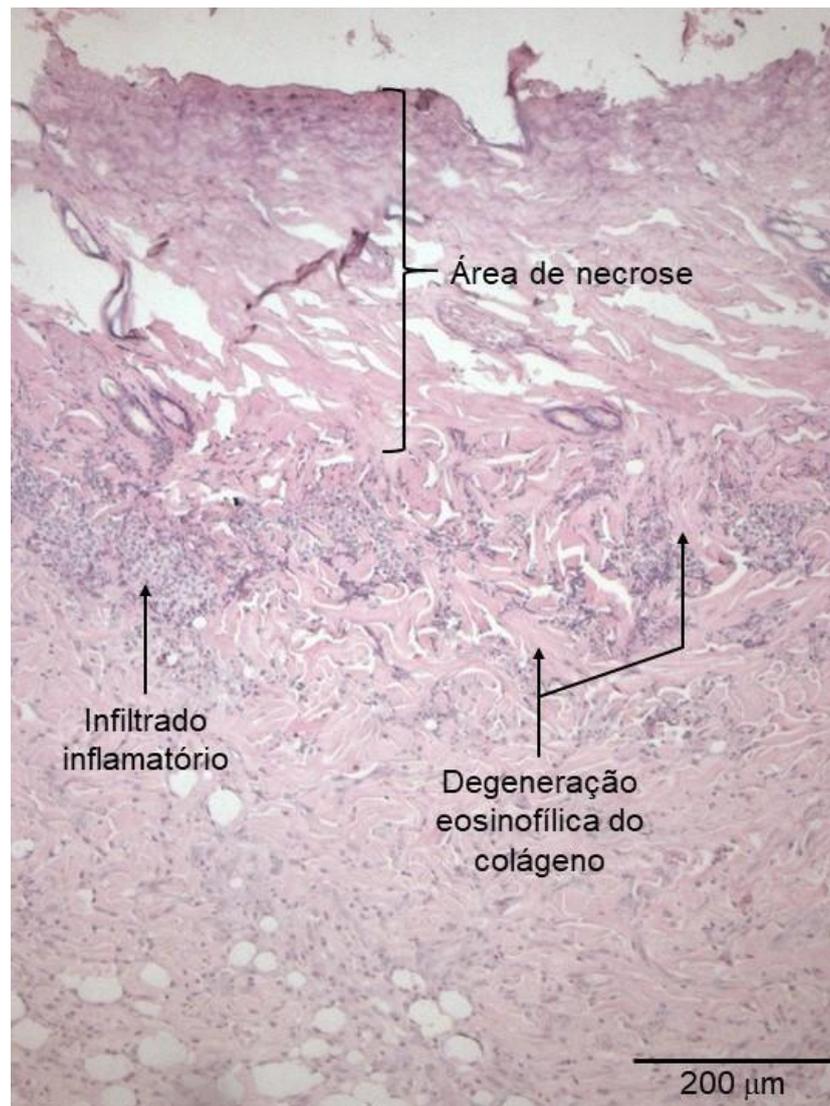


Figura 13: Corte histológico de pele de rato três dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina.

4.2 Sete dias após indução da queimadura

Os espectros já calculados dos coeficientes de absorção (Fig. 14), espalhamento reduzido (Fig. 15) e atenuação reduzida (Fig. 16) da pele sadia e queimada são mostrados a seguir.

Após sete dias de indução da queimadura, todos os coeficientes foram maiores em pele queimada, em todos os comprimentos de onda analisados, quando comparados aos valores obtidos para pele sadia.

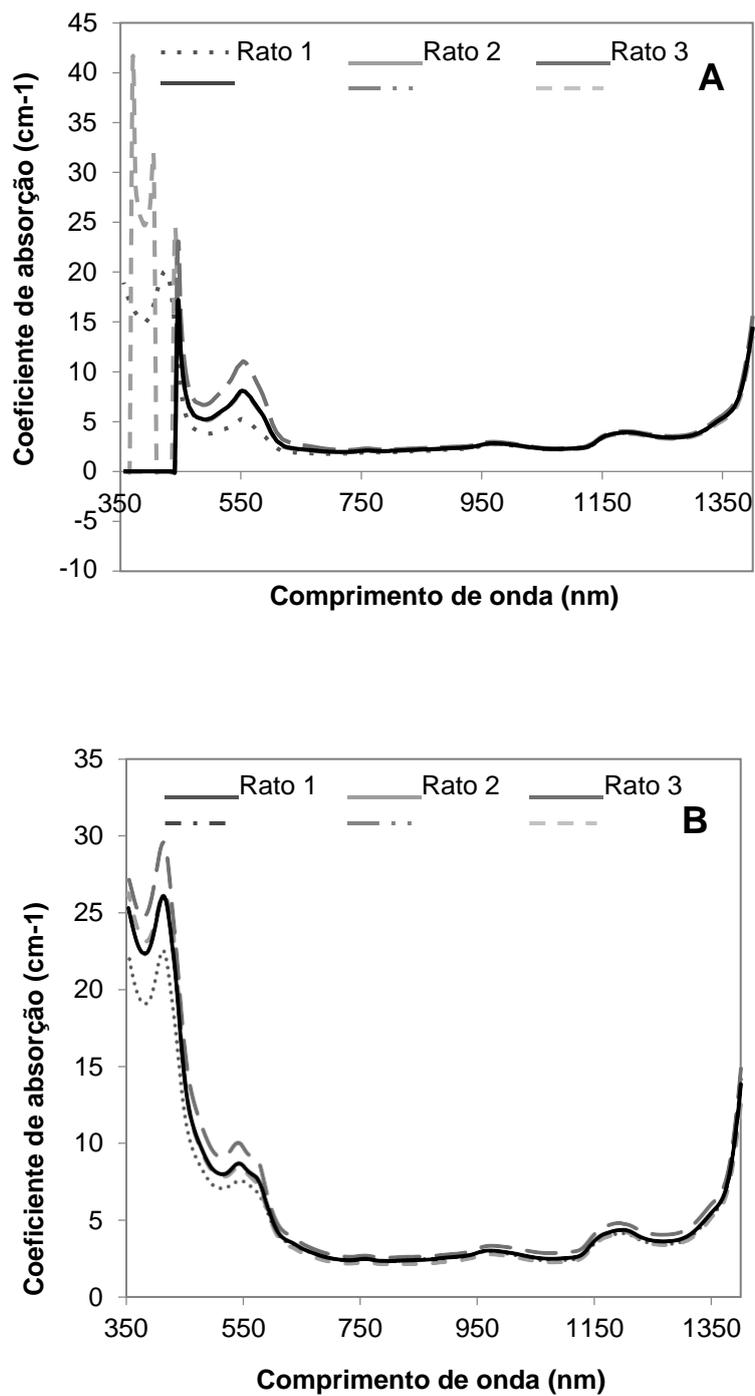


Figura 14: Coeficiente de absorção de pele de rato sadia (A) e de sete dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

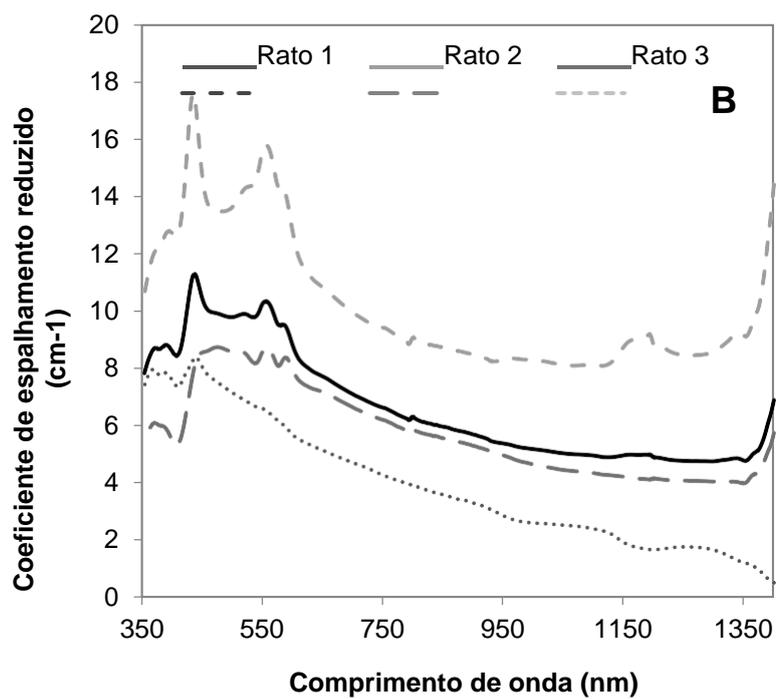
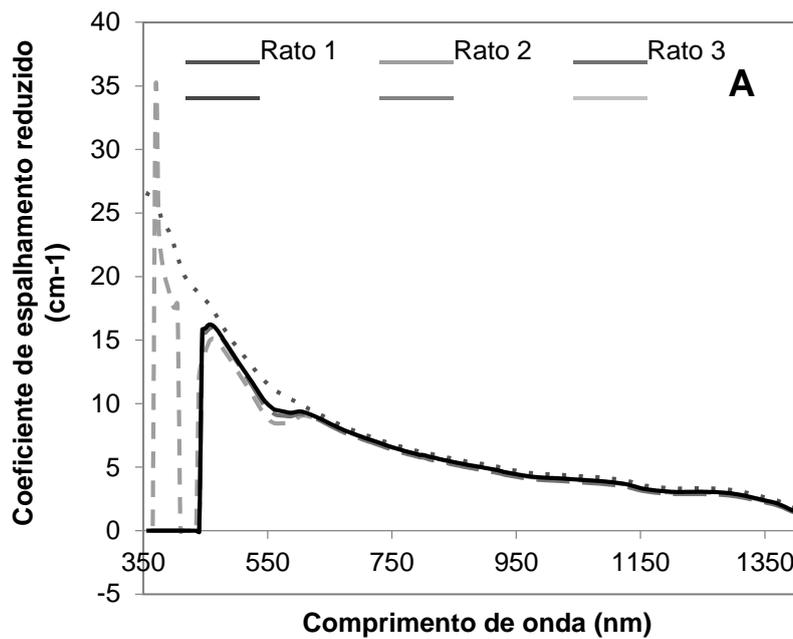


Figura 15: Coeficiente de espalhamento reduzido de pele de rato sadia (A) e de sete dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

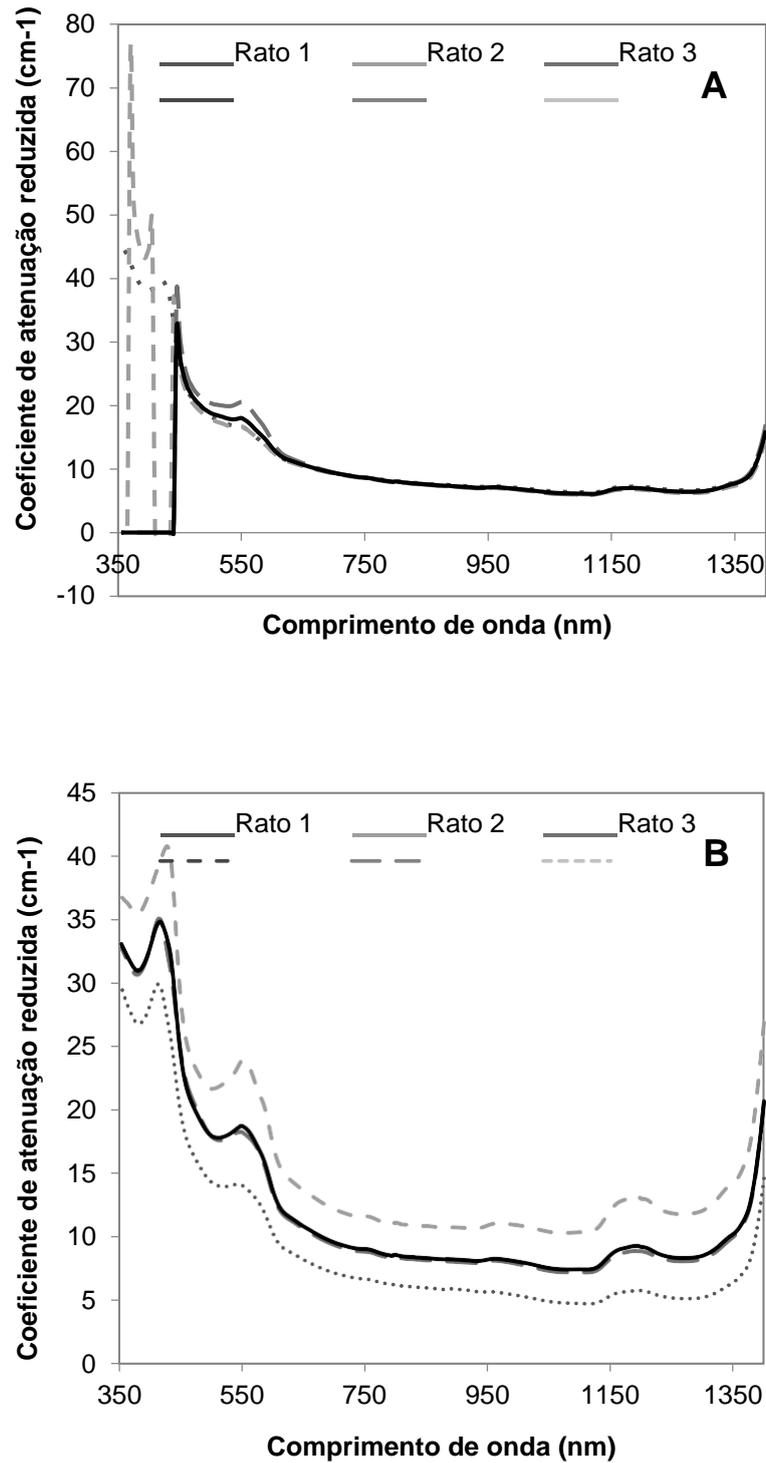


Figura 16: Coeficiente de atenuação reduzida de pele de rato sadia (A) e de sete dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

Os valores dos coeficientes, bem como das transmitâncias e reflectâncias difusas para os principais comprimentos de onda usados nas terapias fotônicas são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de transmitância difusa (Td), reflectância difusa (Rd), coeficiente de absorção (μ_a), coeficiente de espalhamento reduzido (μ_s') e coeficiente de atenuação reduzida (μ_t'), em função do comprimento de onda (λ) em pele de rato sadia e após sete dias de indução da queimadura.

λ nm	Pele Sadia					Pele Queimada				
	Td %	Rd %	μ_a cm-1	μ_s' cm-1	μ_t' cm-1	Td %	Rd %	μ_a cm-1	μ_s' cm-1	μ_t' cm-1
405	0,2	14,0				0,4	7,3	24,9	8,5	33,4
445	1,3	17,1	16,8	15,7	32,5	1,7	12,5	16,5	10,9	27,4
460	7,2	28,8	7,2	16,2	23,4	4,2	15,1	11,9	10,1	22,0
488	12,4	31,7	5,2	14,2	19,4	7,8	18,2	8,8	9,8	18,6
532	11,5	24,9	6,6	11,3	17,9	8,8	18,8	8,3	9,8	18,1
633	40,7	20,7	2,5	4,5	7,1	37,0	22,1	2,8	5,4	8,2
660	34,2	32,4	2,2	8,2	10,4	30,1	27,1	3,0	7,6	10,6
690	36,8	31,7	2,0	7,6	9,6	33,5	27,7	2,6	7,2	9,8
730	38,7	30,0	2,0	6,9	8,9	36,1	27,4	2,4	6,8	9,2
780	40,1	27,5	2,0	6,2	8,2	37,4	26,2	2,4	6,3	8,7
808	40,6	26,3	2,1	5,8	7,9	38,1	25,9	2,3	6,2	8,5
890	41,1	23,1	2,3	5,0	7,3	37,8	23,9	2,5	5,8	8,3
940	40,7	20,7	2,5	4,5	7,1	37,0	22,1	2,8	5,4	8,2
980	39,5	19,0	2,8	4,2	7,0	35,7	20,7	3,0	5,2	8,3
1064	45,0	19,6	2,2	4,0	6,2	40,4	21,5	2,5	5,0	7,5
1320	33,9	11,1	4,1	2,7	6,9	29,0	16,0	4,3	4,8	9,1
1340	29,3	9,3	5,0	2,5	7,5	24,8	14,5	5,1	4,9	9,9

Após sete dias de queimadura observa-se infiltrado inflamatório mononuclear variando entre discreto e moderado, com a presença de tecido de granulação (Fig. 17). Há também a remodelação dérmica e reepitelização na região abaixo da lesão, sendo possível observar ainda os neutrófilos degenerados na região da crosta (Fig. 18).

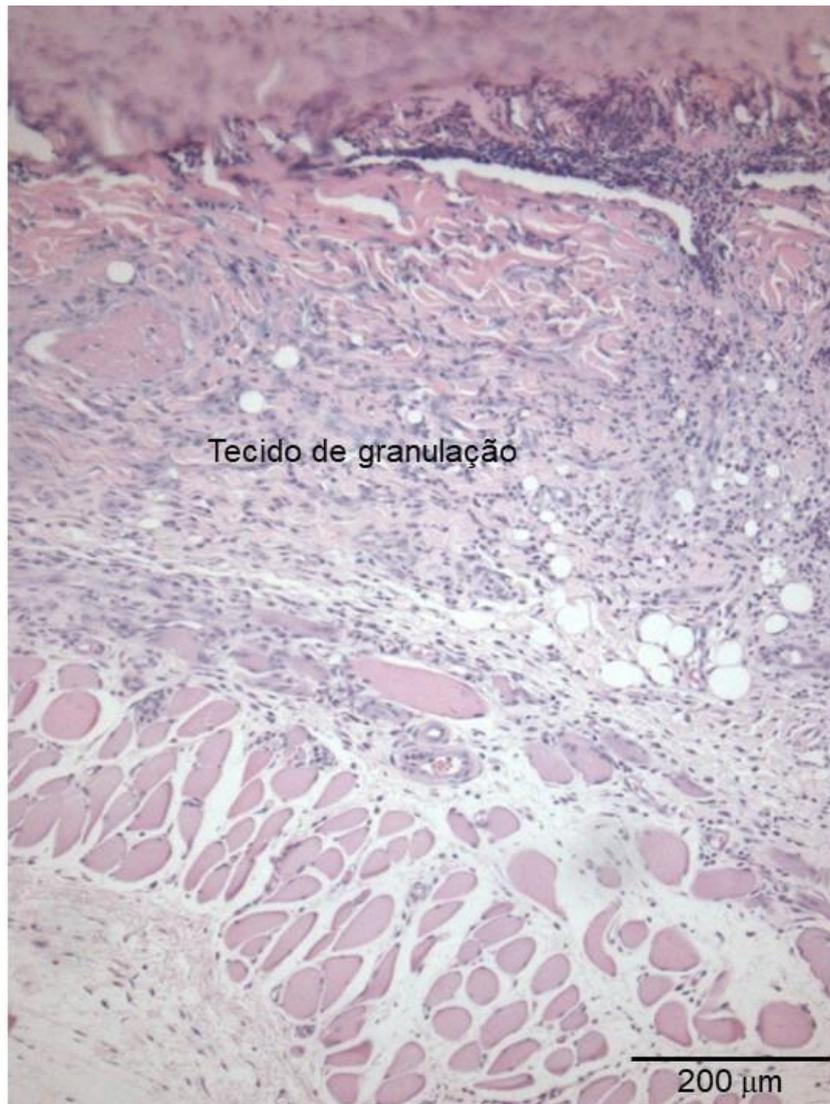


Figura 17: Corte histológico de pele de rato sete dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina.

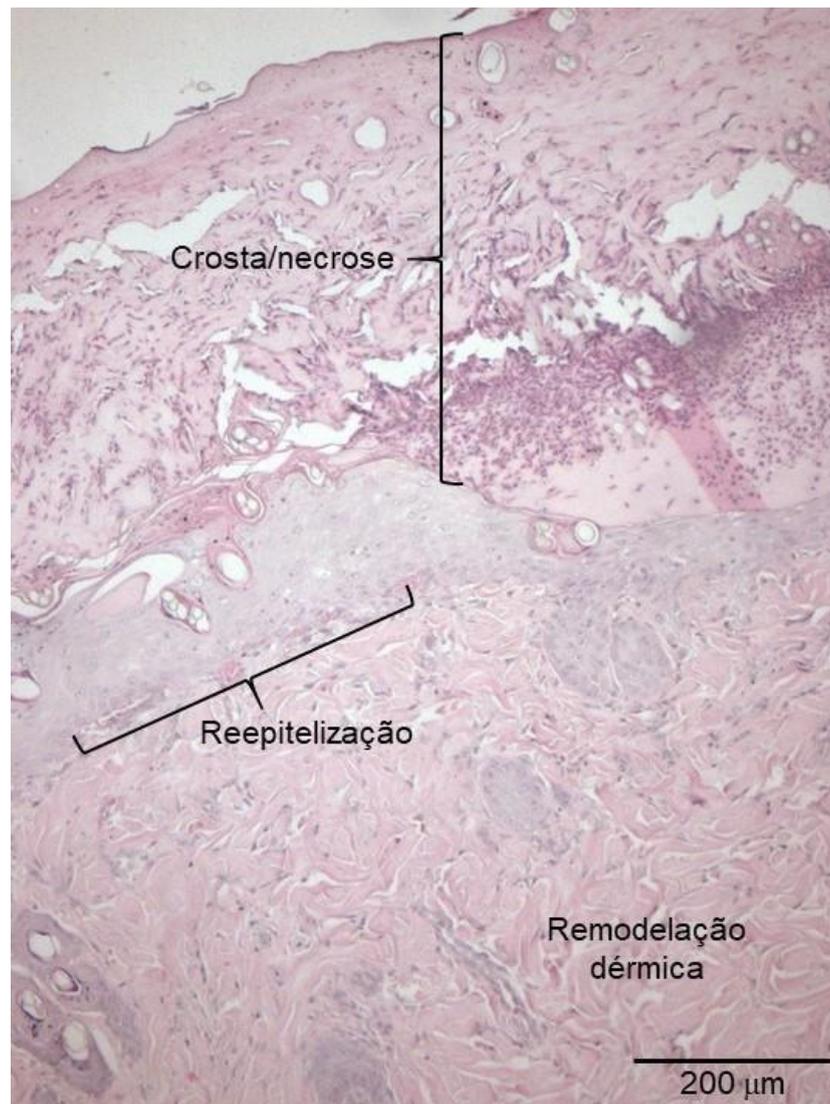


Figura 18: Corte histológico de pele de rato sete dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina.

4.3 Quatorze dias após indução da queimadura

Os espectros já calculados dos coeficientes de absorção (Fig. 19), espalhamento reduzido (Fig. 20) e atenuação reduzida (Fig. 21) da pele sadia e queimada são mostrados a seguir.

Após quatorze dias de indução da queimadura, a absorção é maior em pele queimada, assim como a atenuação reduzida, em todos os comprimentos de onda. O coeficiente de espalhamento reduzido, por sua vez, foi maior em pele sadia.

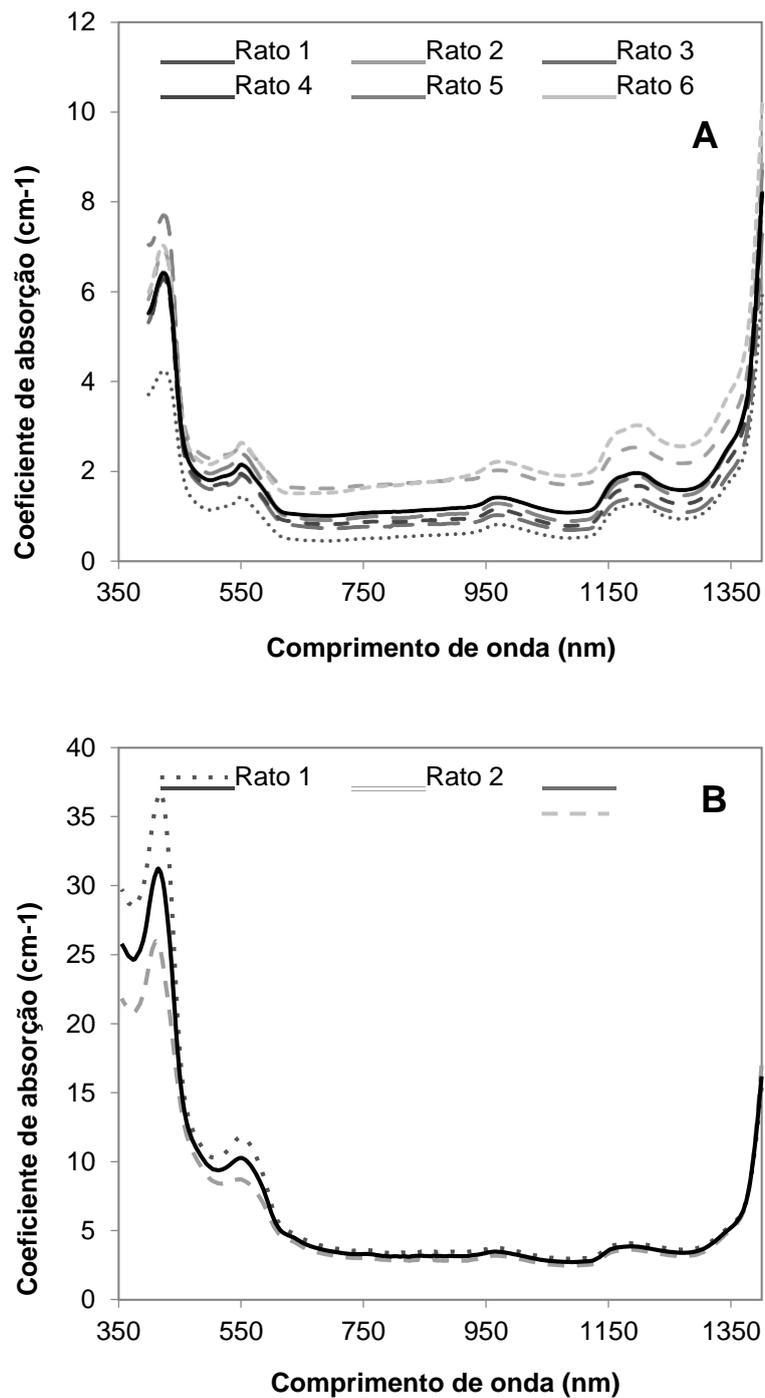


Figura 19: Coeficiente de absorção de pele de rato sadia (A) e de quatorze dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

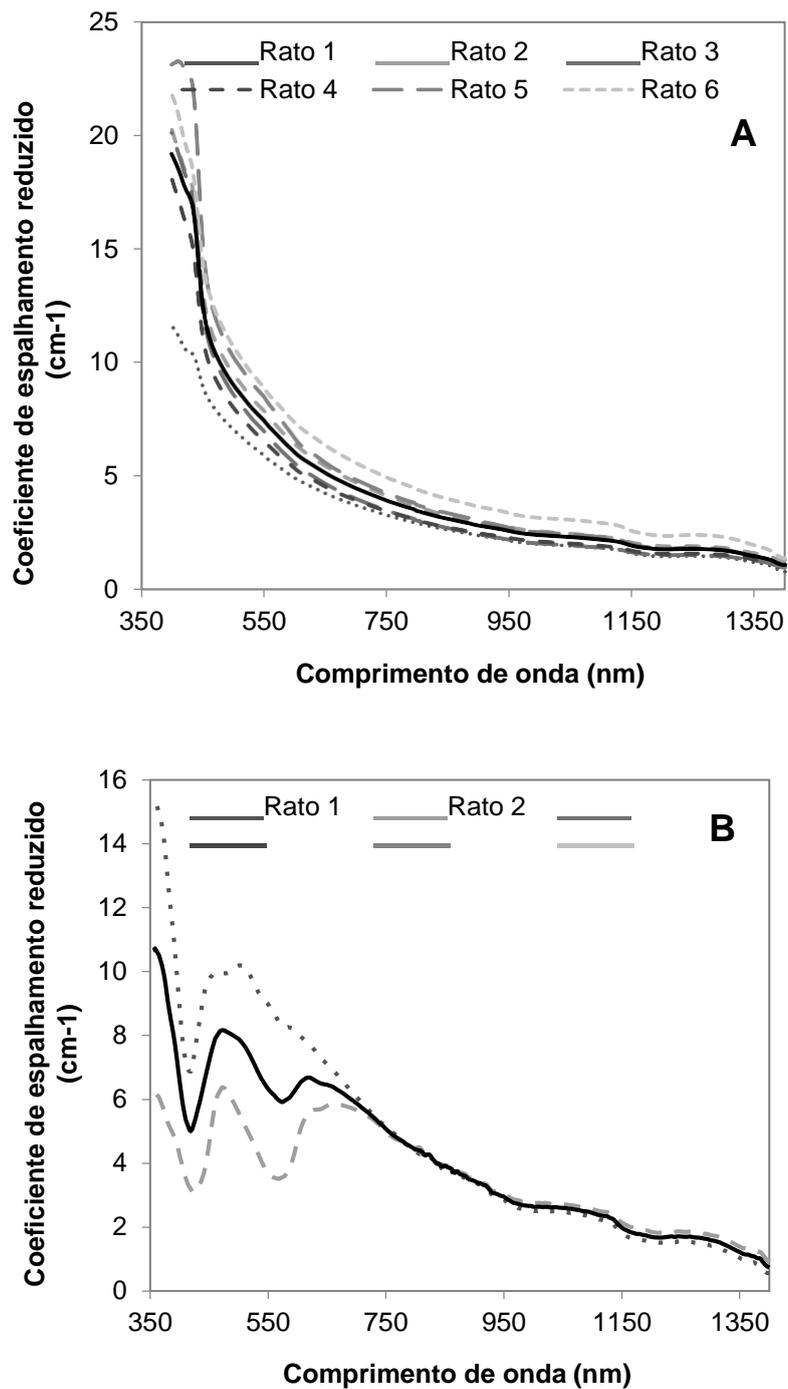


Figura 20: Coeficiente de espalhamento reduzido de pele de rato sadia (A) e de quatorze dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

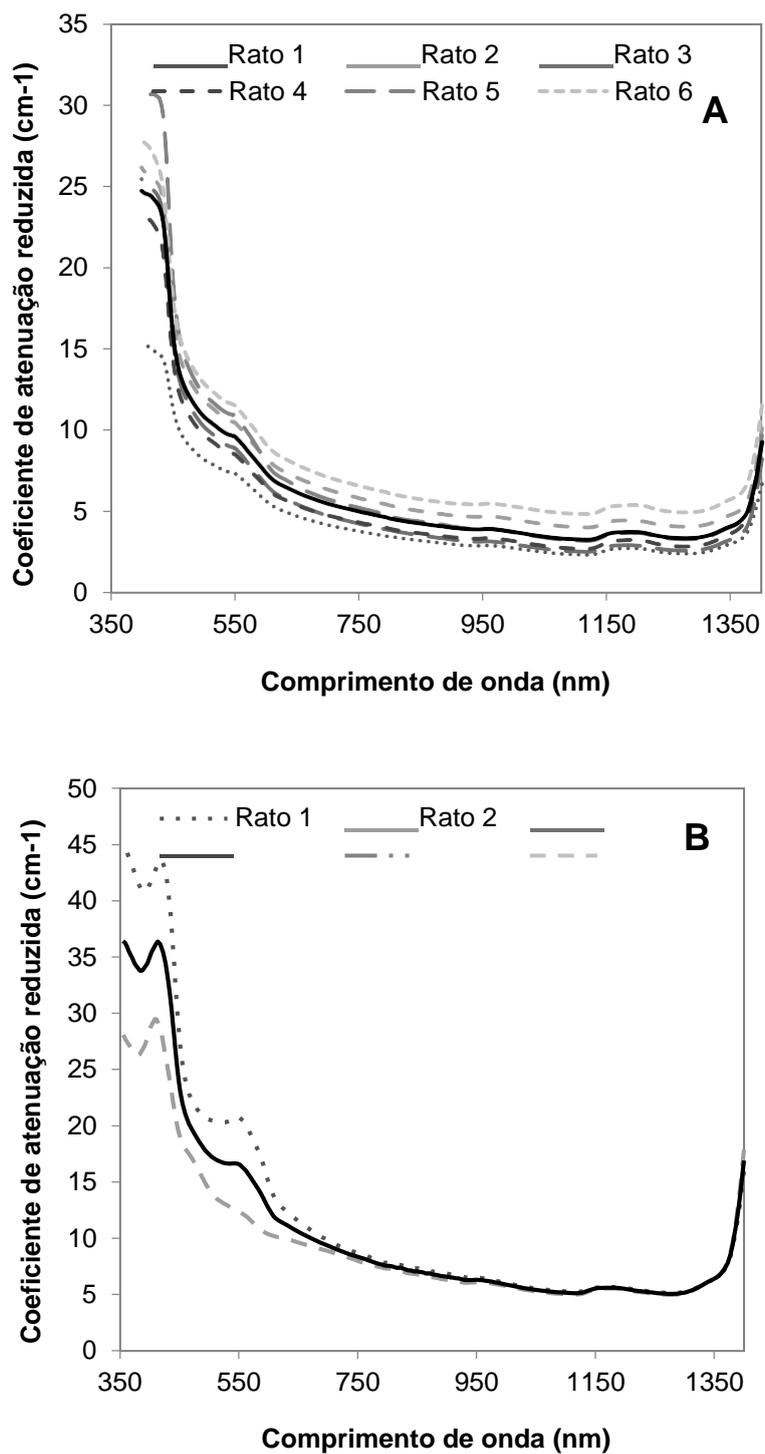


Figura 21: Coeficiente de atenuação reduzida de pele de rato sadia (A) e de quatorze dias após indução da queimadura (B), com relação ao comprimento de onda. A linha cheia representa a média entre as curvas.

Os valores dos coeficientes, bem como das transmitâncias e reflectâncias difusas para os principais comprimentos de onda usados nas terapias fotônicas são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de transmitância difusa (Td), reflectância difusa (Rd), coeficiente de absorção (μ_a), coeficiente de espalhamento reduzido (μ_s') e coeficiente de atenuação reduzida (μ_t'), em função do comprimento de onda (λ) em pele de rato sadia e após quatorze dias de indução da queimadura.

λ nm	Pele Sadia					Pele Queimada				
	Td %	Rd %	μ_a cm-1	μ_s cm-1	μ_t cm-1	Td %	Rd %	μ_a cm-1	μ_s cm-1	μ_t cm-1
405	9,2	34,6	5,7	18,9	24,6	0,2	4,4	29,9	5,9	35,7
445	15,6	33,7	4,3	14,1	18,4	1,6	7,4	18,9	6,8	25,7
460	27,1	36,9	2,5	11,3	13,7	3,8	11,5	13,1	7,9	21,0
488	34,2	36,4	1,9	9,5	11,3	7,0	14,2	10,0	8,0	18,0
532	36,8	32,8	1,9	8,0	9,9	8,5	12,9	9,7	7,0	16,7
633	52,3	29,1	1,1	5,4	6,5	39,5	13,6	3,3	3,0	6,3
660	54,2	27,8	1,0	5,0	6,0	26,7	21,9	3,9	6,4	10,3
690	55,9	26,3	1,0	4,6	5,6	29,6	22,0	3,6	6,0	9,6
730	57,3	24,2	1,1	4,1	5,2	32,6	21,2	3,3	5,4	8,7
780	58,9	22,0	1,1	3,7	4,8	35,4	19,4	3,2	4,7	7,8
808	60,0	20,7	1,1	3,4	4,5	36,6	18,6	3,1	4,4	7,5
890	61,5	18,0	1,2	2,9	4,1	38,8	15,6	3,2	3,5	6,7
940	61,7	16,5	1,3	2,6	3,9	39,5	13,6	3,3	3,0	6,3
980	60,8	15,2	1,4	2,4	3,9	39,4	12,2	3,4	2,7	6,1
1064	65,6	15,1	1,1	2,3	3,4	45,5	12,9	2,8	2,6	5,3
1320	58,4	9,8	2,0	1,6	3,6	38,4	6,6	4,1	1,5	5,6
1340	53,9	8,5	2,4	1,5	4,0	33,4	5,3	4,8	1,3	6,2

A histologia do décimo quarto dia após indução da queimadura apresenta infiltrado inflamatório discreto, com presença de tecido de granulação vestigial. Observa-se também a completa reparação epidérmica com discretas alterações de maturação epitelial, remodelação dérmica e ausência de anexos cutâneos (Fig. 22). Em algumas áreas da lesão onde a queimadura apresenta menor gravidade, é possível observar anexos cutâneos em formação.



Figura 22: Corte histológico de pele de rato quatorze dias após indução da queimadura. Coloração com hematoxilina e eosina.

5. Discussão

Todos os coeficientes estudados neste trabalho (absorção, espalhamento reduzido e atenuação reduzida) foram maiores nos menores comprimentos de onda, ou seja, na região ultravioleta do espectro eletromagnético. Tal fenômeno pode ter ocorrido em função da alta atividade tecidual quando irradiado em tais comprimentos de onda, de forma que os componentes celulares se mostram agentes absorvedores, espalhadores e atenuantes com maior intensidade. A radiação ultravioleta corresponde aos comprimentos de onda entre 1 e 400 nm, e é conhecida por estar presente na radiação solar. Sua interação com a pele é prejudicial a longo prazo, ocasionando o fotoenvelhecimento (Amano, 2016). Em nível celular, a deterioração dérmica causada pela radiação ultravioleta inclui a geração de espécies reativas de oxigênio que levam ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, dano ao DNA. Também há degradação da matriz extracelular e inibição da síntese de colágeno. Com relação à camada mais superficial da pele, a radiação ultravioleta é absorvida na epiderme e induzem danos ao DNA dos queratinócitos. Os queratinócitos, por sua vez, ativam suas vias apoptóticas (Abadie *et al.*, 2019).

Com relação aos coeficientes de absorção, independentemente da condição estudada, foram observados alguns picos em comum. A melanina é a proteína responsável pela proteção contra a radiação ultravioleta, tendo sua absorção mais significativa em torno dos 300-400 nm (Kollias; Baqer, 1987; Gabriela, 2013). A hemoglobina, por sua vez, apresenta picos de absorção em 280, 420, 540 e 580 nm (Gabriela, 2013). Em todas as fases de reparo estudadas neste trabalho os picos de absorção da hemoglobina foram maiores na pele lesionada. Durante a fase inicial de reparo há vasodilatação para possibilitar a chegada das células inflamatórias ao local da lesão, aumentando também a quantidade dessas proteínas absorvedoras; ao final do reparo, a formação de novos vasos pode ser responsável por esse aumento (Moura *et al.*, 2019). Nos comprimentos de onda 950, 1040 e 1165 nm encontram-se os picos de absorção do ácido graxo (Tsai *et al.*, 2001). A elastina, umas das mais abundantes proteínas presentes na derme, possui pico de absorção em torno de 1200 nm (Tsai *et al.*, 2001). Além de todos esses componentes celulares,

moléculas de água também agem como agentes absorvedores, principalmente nos comprimentos de onda de 960, 1190 e 1350 nm (Tsai *et al.*, 2001). Esses picos de absorção citados condizem com o que foi observado no presente estudo.

No terceiro dia após indução da queimadura a análise histológica mostrou a presença de infiltrado inflamatório intenso, assim como a perda da epiderme e parte da derme. Em 2016, Dolgachev e colaboradores observaram este mesmo padrão após induzirem queimadura por escaldos em ratos de linhagem Sprague-Dawley, inserindo-os em um molde e posicionando o dorso dos animais em contato com água aquecida a 60 °C por 25 segundos. A perda de epiderme e derme também foi observada por Du e colaboradores (2018), que optaram por ratos Sprague-Dawley e a utilização de um molde, deixando a região dorsal exposta a água aquecida a 92 °C por 18 segundos. Esse mesmo trabalho corrobora com a necrose e degeneração do colágeno observadas no presente estudo. Lee *et al.* (2015) também observou infiltrado inflamatório intenso e necrose após dois dias de indução da queimadura.

Sete dias após indução da queimadura, foi observada a presença de crosta e reepitelização na região abaixo da lesão, assim como no trabalho de Loder e colaboradores (2015), que realizaram queimaduras por escaldos em ratos Sprague-Dawley deixando seu dorso em contato com água aquecida à 60 °C por 17 segundos. No presente estudo também foi observado infiltrado inflamatório discreto e moderado, assim como remodelação dérmica, indo de encontro aos dados de Shah e colaboradores (2019), que observaram intenso infiltrado inflamatório e ausência de colágeno e remodelação dérmica após sete dias de indução da queimadura. Entretanto, o modelo utilizado não foi de queimadura por escaldos, de forma que ratos Sprague-Dawley tiveram a região lateral do dorso queimada através de um bloco metálico aquecido à 90 °C que ficou em contato com a pele por 20 segundos, sem que nenhuma pressão fosse aplicada.

Após quatorze dias de indução da queimadura, as características histológicas que foram observadas podem ser corroboradas por Lee e colaboradores (2015), que realizaram queimadura por escaldos em ratos Sprague-Dawley deixando a área do dorso em contato com água aquecida à 100 °C por 10 segundos. Tanto neste trabalho quanto no presente estudo,

houve a presença de infiltrado inflamatório discreto, completa reparação dérmica, ausência de anexos cutâneos e remodelação dérmica.

Ao associar os resultados das propriedades ópticas com a análise histológica, é possível levantar algumas informações sobre o tecido a ser diagnosticado ou tratado com luz. Como por exemplo, agentes espalhadores estão na região epitelial da pele, que está ausente na pele recém lesionada. No décimo quarto dia de reparo tecidual, o epitélio se mostrou novamente como agente espalhador, uma vez que foi maior em pele sadia. Nesta fase do reparo, o epitélio já pode ser observado, o que leva à ideia de que a sua maturação completa interfira nesse processo de espalhamento, pois no décimo quarto dia o epitélio - embora presente - ainda se mostra mais estreito quando comparado ao de pele sadia, sem papilas dérmicas e queratina. Provavelmente essa característica espalhadora do epitélio não seja evidenciada no sétimo dia de reparo por interferência da crosta.

Por estar presente no sétimo dia, a crosta pode ter agido como agente absorvedor, espalhador e atenuante, uma vez que todos os coeficientes foram maiores em pele lesionada nesta fase do reparo tecidual.

Outro dado evidenciado pela análise das propriedades ópticas é decaimento do coeficiente de espalhamento no decorrer do processo cicatrização, coincidindo com a diminuição de células inflamatórias presentes no tecido, indicando que estas células podem atuar como agentes espalhadores de luz.

Os coeficientes de pele sadia, de um modo geral, se mantiveram semelhantes no decorrer dos diferentes dias de biópsia - 3, 7 e 14, indicando que não há alterações morfológicas que justifiquem alterações ópticas.

Ambas análises de propriedade óptica e histológica têm como finalidade associar a fase do reparo tecidual com a quantidade de luz que é absorvida, espalhada e atenuada para que, por exemplo, a dosimetria seja alterada com o decorrer do processo cicatricial, culminando num melhor desempenho das terapias fotônicas. Nas fases de reparo com maior absorção em determinado comprimento de onda, a recuperação pode ser retardada caso a energia entregue ao tecido se mantenha a mesma (Huang *et al.*, 2011). Dessa forma sugere-se, por exemplo, que se altere a energia aplicada na lesão no decorrer do processo de reparo, uma vez que no presente estudo foi

observado discreto aumento na capacidade absorvedora do tecido com o passar do tempo. Tal fenômeno de retardo na recuperação do tecido pode ser explicado pelo efeito bifásico, que consiste em entregar a energia mínima necessária para ocorrência do efeito, a fim de evitar a “sobrecarga” energética no alvo biológico que pode levar ao retardo do efeito positivo ou até mesmo à bioinibição (Huang *et al.*, 2011).

Existe uma escassez de artigos na literatura sobre propriedades ópticas de pele lesionada, ainda mais quando se estreita a busca para lesões causadas por escaldamento, de forma que não foi encontrado nenhum artigo publicado aplicando a espectroscopia óptica difusa para a obtenção das propriedades ópticas da pele queimada. Assim sendo, esta discussão baseou-se nos trabalhos encontrados que mais se aproximam do que foi realizado no presente estudo com relação às técnicas aplicadas e resultados obtidos.

O presente estudo apresenta dados iniciais importantes para a compreensão do comportamento da luz na pele, que se apresenta como a maior barreira física nos diagnósticos e terapias fotônicas. Além disso, o entendimento de como a luz é absorvida, atenuada e espalhada no decorrer do processo de reparo após indução de queimadura é extremamente relevante e pode ainda ser complementado futuramente com a utilização de pele queimada humana. Porém, pelo fato da função Kubelka-Munk depender da espessura do tecido, não há maneira não invasiva de aplicá-la, mas uma solução para isso poderia ser uma parceria com cirurgiões plásticos que realizam procedimentos de remoção da pele necessários aos pacientes que sofrem queimaduras graves. A especificidade das análises imuno-histoquímicas também pode ser de grande valia para o entendimento do comportamento da luz no tecido biológico. Mantendo-se o modelo de indução de queimadura por escaldamento em ratos, ainda é possível avaliar se o aumento de energia entregue no decorrer do processo de reparo influencia de fato no fechamento da lesão e qualidade do tecido.

6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que a condição em que a pele se encontra influencia no comportamento da luz que incide sobre esse tecido, assim como a fase do reparo em que ele se encontra. Após três dias de indução da queimadura, os coeficientes de absorção espalhamento reduzido e atenuação reduzida foram maiores em pele de rato sadia, histologicamente apresentando infiltrado inflamatório intenso e perda do epitélio e parte da derme, com grande área de necrose nessa região. Após sete dias de indução da queimadura, os coeficientes analisados foram maiores em pele de rato queimada quando comparada à pele sadia; na análise histológica foi observado infiltrado inflamatório moderado e remodelação dérmica, assim como a reepitelização abaixo da área da lesão. No décimo quarto dia, a pele queimada apresentou os maiores coeficientes de absorção e atenuação reduzida, enquanto a pele sadia apresentou o maior coeficiente de espalhamento; a histologia mostrou infiltrado inflamatório discreto, completa reparação epidérmica com algumas alterações de maturação e ausência de anexos cutâneos na região mais severa da lesão.

Análises mais detalhadas do tecido podem ser realizadas para melhor entendimento da interação da luz com células e moléculas específicas que estão presentes na pele tanto sadia quanto lesionada. Entretanto, os resultados aqui apresentados fornecem elucidação prévia dessa interação.

7. Referências Bibliográficas

Abadie, S.; Bedos, P.; Rouquette, J. A human skin model to evaluate the protective effect of compounds against UVA damage. **International Journal of Cosmetic Science**. 41(6):594-603, 2019.

Amano, S. Characterization and mechanisms of photoageing-related changes in skin. Damages of basement membrane and dermal structures. **Exp Dermatol**. 3:14-19, 2016.

Ash, C.; Dubee, M.; Donne, K.; Bashford, T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. **Lasers Med Sci**. 32:1909-1918, 2017.

Babadi, M.; Mohajerani, E.; Ataie-Fashtami, L.; Zand, N.; Shirkavand, A. Quantitative Analysis of Skin Erythema Due to Laser Hair Removal: A Diffusion Optical Spectroscopy Analysis. **J Lasers Med Sci**. 10(2):97-103, 2019.

Bashkatov, A.N.; Genina, E.A.; Kozintseva, M.D.; Kochubei, V.I.; Gorodkov, S.Y. Tuchin, V.V. Optical Properties of Peritoneal Biological Tissues in the Spectral Range of 350-2500 nm. **Optics and Spectroscopy**. 120(1):1-8, 2016.

Carneiro, I.; Carvalho, S.; Henrique R.; Oliveira, L.; Tuchin, V.V. Measuring optical properties of human liver between 400 and 1000 nm. **Quantum Electronics**. 49(1):13-19, 2019.

Cribbs, R.K.; Luquette, M.H.; Besner, G.E. A standardized model of partial thickness scald burns in mice. **J Surg Res**. 80:69-74, 1998.

da Silva, D.F.T.; Almeida-Lopes, L.; Ribeiro, M.S. *In: Garcez, A.S.; Ribeiro, M.S.; Núñez, S.C. (orgs.) Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia*. São Paulo: Elsevier Editora, 2012. p. 14-26.

da Silva, D.F.T.; Fábio, L.; Guedes, G.H. *In: Fernandes, K.P.S.; Mesquita-Ferrari, R.A.; França, C.M. (orgs.) Biofotônica: conceitos e aplicações*. São Paulo: UNINOVE, 2ª ed., 2017. p. 52-66.

Dolgachev, V.A.; Ciotti, S.M.; Eisma, R.; Gracon, S.; Wilkinson, E.; Baker Jr, J.R.; Hemmila, M.R. Nanoemulsion Therapy for Burn Wounds is Effective as a Topical Antimicrobial Against Gram Negative and Gram Positive Bacteria. **J Burn Care Res**. 37(2):e104-e114, 2016.

Du, P.R.; Lu, H.T.; Lin, X.X.; Wang, L.F.; Wang, Y.X.; Gu, X.M.; Bai, X.Z.; Tao, K.; Zhou, J.J. Calpain inhibition ameliorates scald burn-induced acute lung injury in rats. **Burns and Trauma**. 6(18):1-9, 2018.

Dumas, S.N.; Ntambi, J.M. A Discussion on the Relationship between Skin Lipid Metabolism and Whole-Body Glucose and Lipid Metabolism: Systematic Review. **J Cell Signal**. 3(3):1-13, 2018.

Gabriela, M. Mathematical Methods in Biomedical Optics. **ISRN Biomedical Engineering**. 2013:1-8, 2013.

Golovynskiy, S.; Golovynska, I.; Stepanova, L.I.; Datsenko, O.I.; Liu, L.; Qu, J.; Ohulchanskyy, T.Y. Optical Windows for head tissues in near-infrared and short-wave infrared regions: Approaching transcranial light applications. **J Biophotonics**. 11:e201800141, 2018.

Gomes, M.T.; Campos, G.R.S.; Piccolo, N.; França, C.M.; Guedes, G.H.; Lopes, F.; Belotto, R.A.; Pavani, C.; de Lima, R.N.; da Silva, D.F.T. Experimental burns: Comparison between silver sulfadiazine and photobiomodulation. **Rev Assoc Med Bras**. 63(1):29-34, 2017.

Hamdy, O.; El-Azab, J.; Al-Saeed, T.A.; Hassan, M.F.; Solouma, N.H. A Method for Medical Diagnosis Based on Optical Fluence Rate Distribution at Tissue Surface. **Materials**. 10(1104):1-13, 2017.

Hamblin, M.R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**. 4(3):337-361, 2017.

Huang, Y.Y.; Sharma, S.K.; Carroll, J.; Hamblin, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose-Response**. 9:602-618, 2011.

Jacques, S.L. Optical properties of biological tissues: a review. **Phys Med Biol**. 58:37-61, 2013.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12^a ed., 2013. p. 353-365.

Kim, A.; Wilson, B.C. *In*: Welch, A.J.; van Gemert, M.J.C. (eds.) **Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue**. Toronto: Springer, 2011. p. 267-319.

Kollias, N.; Baqer, A.H. Absorption mechanisms of human melanin in the visible, 400-720 nm. **J Invest Dermatol**. 89(4):384-388, 1987.

Lee, K.; Lee, B.; Lee, M.H.; Kim, B.; Chinannai, K.S.; Ham, I.; Choi, H.Y. Effect of Ampelopsis Radix on wound healing in scalded rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 15(213):1-9, 2015.

Li, C.; Brost, V.; Benezeth, Y.; Marzani, F.; Yang, F. Design and evaluation of a parallel and optimized light-tissue interaction-based method for fast skin lesion assessment. **J Real-Time Image Proc**. 15:407-420, 2018.

Loder, S.; Peterson, J.R.; Agarwal, S.; Eboda, O.; Brownley, C.; DeLaRosa, S.; Rangagathan, K.; Cederna, P.; Wang, S.C.; Levi, B. Wound Healing

Immediately Post-Thermal Injury Is Improved by Fat and Adipose Derived Stem Cell Isografts. **J Burn Care Res.** 36(1):70-76, 2015.

Mosca, R.C.; Ong, A.A.; Albasha, O.; Bass, K.; Arany, P. Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach. **Adv Skin Wound Care.** 32(4):157-167, 2019.

Moura, F.B.R.; Justino, A.B.; Ferreira, B.A.; Espindola, F.S.; Araújo, F.A.; Tomiosso, T.C. Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* in Skin Repair. **Planta Med.** 85(7):570-577, 2019.

Musstaf, R.A.; Jenkins, D.F.L.; Jha, A.N. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. **Int J Radiat Biol.** 92(2):120-143, 2019.

Ong, Y.H.; Zhu, Y.; Zhu, T.C. Validation of tissue optical properties measurement using diffuse reflectance spectroscopy (DRS). **Proc SPIE Int Soc Opt Eng.** 10860, 2019.

Pereira, D.S.T.; Lima-Ribeiro, M.H.; de Pontes-Filho, N.T.; Carneiro-Leao, A.M.; Correia, M.T. Development of animal model for studying deep second-degree thermal burns. **J Biomed Biotechnol.** 2012:1-7, 2012.

Richards-Kortum, R.; Sevick-Muraca, E. Quantitative Optical Spectroscopy For Tissue Diagnosis. **Annual Review of Physical Chemistry.** 47:555-606, 1996.

Rittié, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **J Cell Commun Signal.** 10:103-120, 2016.

Sabino, C.P.; Deana, A.M.; Yoshimura, T.M.; da Silva, D.F.T.; França, C.M.; Hamblin, M.R.; Ribeiro, M.S. The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. **J Photochem Photobiol B.** 160:72-78, 2016.

SBQ - Sociedade Brasileira de Queimaduras. Cartilha para Tratamento de Emergência das Queimaduras. Disponível em (<http://sbqueimaduras.org.br/material/1300>). Visualizado em 26/11/2019.

Shah, A.; Ali, B.M.; Arafa, E.A.; Hussain, I.; Li, L.; Murtaza, G. The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin. **Int J Pharm.** 564:22-38, 2019.

Stone, R.; Natesan, S.; Kowalczewski, C.J.; Mangum, L.H.; Clay, N.E.; Clohessy, R.M.; Carlsson, A.H.; Tassin, D.H.; Chan, R.K.; Rizzo, J.A.; Christy, R.J. Advancements in Regenerative Strategies Through the Continuum of Burn Care. **Front Pharmacol.** 9:672, 2018.

Thennadil, S.N. Relationship between the Kubelka-Munk scattering and radiative transfer coefficients. **J Opt Soc Am A**. 25:1480-1485, 2008.

Tsai, C.; Chen, J.; Wang, W. Near-infrared Absorption Property of Biological Soft Tissue Constituents. **J Med Biol Eng**. 21(1):7-14, 2001.

Tuchina, D.K.; Shi, R.; Bashkatov, A.N.; Genina, E.A.; Zhu, D.; Luo, Q.; Tuchin, V.V. *Ex vivo* optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin. **J Biophotonics**. 8(4):332-346, 2015.

Vela-Romera, A.; Carriel, V.; Martín-Piedra, M.A.; Aneiros-Fernández, J.; Campos, F.; Chato-Astrain, J.; Prados-Olleta, N.; Campos, A.; Alaminos, M.; Garzón, I. Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis. **Histochem Cell Biol**. 151(1):57-73, 2019.