



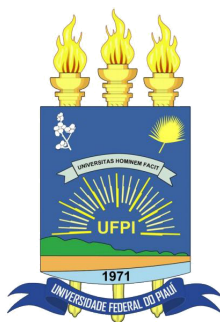
Universidade Federal do Piauí
Centro de Ciências da Natureza
Departamento de Física
Programa de Pós-Graduação em Física

**ANÁLISE DE ENVELHECIMENTO CUTÂNEO
INTRÍNSECO E EXTRÍNSECO POR ESPECTROSCOPIA
RAMAN CONFOCAL EX VIVO: COLÁGENO DÉRMICO**

Alexandre Silva Santos

Teresina - PI

2018



ANÁLISE DE ENVELHECIMENTO CUTÂNEO INTRÍNSECO E EXTRÍNSECO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN CONFOCAL EX VIVO: COLÁGENO DÉRMICO

Alexandre Silva Santos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão

Co-orientador: Prof. Dr. Airton Abrahao Martin

Teresina - PI

2018

Ao meu avô Raimundo Alexandre(In Memoriam)

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus pelos dons e habilidades confiados a mim por ele.

Aos meus pais Maria Antonia Santos Barros e Antonio Carlos Barros da Silva, pelo apoio incondicional e ser minha fonte de incentivo. Aos meus irmãos Carlos Eugênio, Maria Clara e Ana Karlly, minha avó Maria das Dores, meu avô Raimundo Alexandre (*In Memoriam*) e minha avó Raimunda (*In Memoriam*).

A minha querida noiva Juliana Nascimento por todo o apoio e sempre estar ao meu lado nesta caminhada em todos os momentos me apoiando e incentivando.

A todos os meus familiares que embora estejam longe na maior parte do tempo, estão sempre torcendo por mim.

A minha sogra Ana Maria e meu sogro João Filho por sempre me apoiarem e serem presentes na minha vida. A minha amiga Vanuze por estar sempre me dando bons conselhos e aos seus pais Maria da Natividade e José Eugênio que me tratam como um filho.

Ao meu amigo Lázaro Medeiros (UniBrasil) por discussões contributivas e sugestões, obrigado por todo apoio. E ao Gustavo (UniBrasil) por todo o suporte e ajuda no laboratório da DermoProbes.

Aos meus amigos de graduação José Airton, Marcos Paulo e Daniel Oliveira.

Aos meus amigos da Pós-Graduação Gisllayson Dias e José Fereira por todas as discussões sobre a área. Aos amigos de sala Francisco, Fernando e Gil. Aos meus amigos de turma David, Guilherme e Mário. Aos demais colegas da Física como: Lucas Marinho, Iago, Carlos Henrique, Fabrício, Maycon, Orlando, Nefy, Ramiro, Brenda, Kennedy e Jadson.

Agradecer ao Prof. Antonio Machado pela colaboração com as amostras de pele e discussões sobre o conteúdo.

A Bióloga Luana Lopes por todo auxílio e preparação das amostras.

A Universidade Federal do Piauí, que me proporcionou a oportunidade de cursar o Mestrado em Física em um programa de Pós-Graduação de excelência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão, pela orientação e oportunidade de realização desta dissertação, pela amizade, por todo o seu apoio e confiança, pela dedicação e prazer de dividir os seus conhecimentos em todas as etapas deste trabalho e por me acompanhar na minha trajetória acadêmica desde a iniciação científica.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Airton Abrahao Martin pela Co-orientação neste trabalho, pelas discussões e sugestões dadas, pela divisão de conhecimentos que ele me proporcionou durante a produção desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto por todo acompanhamento e orientação através de discussões das disciplinas no laboratório dando todo o apoio acadêmico necessário.

A todos professores da PPGF em especial ao Prof. Dr. Cleânio Luz Lima e Prof. Dr. Gardênia Pinheiro pelas colaborações, discussões e todo apoio no laboratório do FisMat.

Agradecer a empresa DermoProbes Ltda pela oportunidade de realizar os experimentos e fornecer todo o suporte e estrutura.

Obrigado ao suporte financeiro da agência brasileira de fomento a pesquisa CAPES que através dela consegui me manter na universidade.

Resumo

Nesta pesquisa, utilizou-se a técnica de Espectroscopia Raman Confocal (ERC) *ex vivo* para investigar as alterações bioquímicas na pele humana resultante da exposição excessiva à radiação solar. A ERC é uma técnica não invasiva e de alta sensibilidade que permite detectar modificações conformacionais nas estruturas das proteínas resultante da exposição à radiação ultravioleta (UV), infravermelha (IV) e visível que podem causar alterações no DNA, colágeno e fibras elásticas. Foi utilizado um sistema Raman dispersivo com laser de excitação em 785nm. As medidas foram realizadas em amostras *ex vivo*, de tecidos da pele dos voluntários do sexo masculino entre 50 e 60 anos com fototipo II e III retirados através de uma biopsia de duas regiões distintas, uma da face interna do braço e a outra do dorso da mão. Esses voluntários foram divididos em dois grupos, um com exposição solar excessiva e outro com exposição solar reduzida. O objetivo deste trabalho é diferenciar os grupos através de uma análise estatística usando PCA (*principal component analysis*) e loading plot que em conjunto permitem identificar os constituintes bioquímicos que são alterados devido a exposição solar e ao envelhecimento natural. As medidas dos espectros Raman foram feitas nas regiões da derme mais externa até a mais interna (derme papilar e reticular) e através do HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) os espectros foram classificados em três clusters: estrato córneo, camada basal e derme em que a análise de dados do trabalho foi realizada na derme. Os resultados obtidos através de uma análise de loading plot neste trabalho evidenciam que os voluntários do grupo II que tem exposição solar reduzida apresentam uma maior quantidade de prolina, hidroxiprolina correspondente à banda observada em 855 cm^{-1} , colágeno do tipo I e amida III quando comparado com os voluntários com exposição solar excessiva. Portanto, é possível concluir que a espectroscopia Raman é uma técnica promissora para este tipo de comparação auxiliando no entendimento da ação da radiação solar em diferentes tipos de exposição.

Palavra chave: Espectroscopia Raman, pele, alterações bioquímicas.

Abstract

In this research, the Confocal Raman Spectroscopy (ERC) technique was used to investigate biochemical changes in human skin resulting from excessive exposure to solar radiation. ERC is a non-invasive, high sensitivity technique which allows the detection of conformational changes in the structures of the proteins resulting from exposure to ultraviolet (UV), infrared (IV) and visible radiation that may cause changes in DNA, collagen and elastic fibers. A dispersive Raman system with excitation laser at 785nm. Measurements were performed on *ex vivo* samples of skin tissues of male volunteers aged 50-60 years with phototype II and III taken through a biopsy of two distinct regions, one of the inner side of the arm and the other of the back of the hand. These volunteers were divided into two groups, one with excessive sun exposure and one with reduced sun exposure. The objective of this work is to differentiate the groups through a statistical analysis using PCA (main component analysis) and loading plot that together allow to identify the biochemical constituents that are altered due to sun exposure and natural aging. Measurements of the Raman spectra were made in the outermost to the innermost dermis (papillary and reticular dermis) and through the HCA (Hierarchical Cluster Analysis) the spectra were classified into three clusters: stratum corneum, basal and dermis in which data analysis of the work was performed on the dermis. The results obtained through a loading plot analysis in this study show that group II volunteers who have reduced sun exposure have a higher amount of proline, hydroxyproline corresponding to the band observed at 855 cm^{-1} , type I collagen and amide III when compared to volunteers with excessive sun exposure. Thus, it can be concluded that Raman spectroscopy is a promising technique for this type of comparison aiding in understanding the action of different types of exposure. **Palavra chave:**Raman spectroscopy, skin, biochemical changes.

Lista de Símbolos

\vec{P} - Momento de dipolo induzido

ω_1 -Frequência de Rayleing

ω_M - Frequência da molécula

\vec{E} - Campo elétrico

ν -Estiramento

$Q_{k,l}$ -Coordenadas normais de vibração

ρ -Balanço

δ -Flexão ou deformação angular

m -Massa

\vec{F} -Força

v -Velocidade

e -Carga elementar

c -Velocidade da luz

Lista de Abreviações

PCA-Principal Components Analysis
HCA-Hierarchical Clusters Analysis
EPH-Equivalente à pele humana
TCLE-Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento
CAPP-Comissão de Avaliação de Projetos e Pesquisa
CEP-Comitê de Ética e Pesquisa
CNS-Conselho Nacional de Saúde
UFPI-Universidade Federal do Piauí
HU-Hospital Universitário
SERS-Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
HPV-Papilomavírus humano
ESE-Exposição Solar Excessiva
ESR-Exposição Solar Reduzida
NMF-Natural Moisturizer Factor
ERC-Espectroscopia Raman Confocal
SC-Stratum Corneum
SG-Stratum Granulosum
SS-Stratum Spinosum
SB-Stratum Basale
MMP-Matrix Metalloproteína
DNA- Deoxyribonucleic Acid
TSH-Thyroid-Stimulating Hormone
SHG-Second Harmonic Generation

Lista de Figuras

1.1	Representação da barreira epidérmica de dentro para fora e fora para dentro.	16
1.2	Camadas da pele, em que abaixo é enfatizado a região da epiderme.	17
1.3	Estrutura da derme e suas divisões.	19
2.1	Estrutura da derme e suas divisões.	23
2.2	Representação do espalhamento elástico e inelástico da luz.	24
3.1	Máxima homogeneidade de indivíduos dentro de grupos e máxima heterogeneidade entre os grupos.	32
4.1	Região em que foi selecionado os voluntários para a pesquisa.	36
4.2	Criostato utilizado para corte dos tecidos biológicos.	37
4.3	Tecido de pele humana colorada com H&E de voluntário com exposição solar excessiva (ESE), em que é destacado a região do estrato córneo.	37
4.4	Equipamento Raman confocal utilizado.	38
4.5	Representação do caminho óptico do laser do equipamento.	39
5.1	Espectro Raman característico da pele humana da face interna do braço com seus respectivos constituintes bioquímicos que são Raman ativo.	40
5.2	Dendograma do voluntário 1 com ESE da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	42
5.3	Dendograma do voluntário 2 com ESE da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	42
5.4	Dendograma do voluntário 1 com ESR da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	43
5.5	Dendograma do voluntário 2 com ESR da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	43
5.6	<i>Matriz plot</i> de todas as amostras da face interna do braço normalizadas vetorialmente tanto do grupo de ESE e ESR.	44
5.7	Média dos espectros de amostras da face interna do braço dos voluntários com ESE e ESR todos normalizados vetorialmente entre 400-1800 cm^{-1} .	45

5.8	Média dos espectros de amostras da face interna do braço com com maiores mudanças espectrais do grupo I e grupo II.	46
5.9	(a) <i>Scatterplot</i> de amostras da face interna do braço de voluntários com ESE e ESR. (b) <i>Loading plot</i> de amostras da face interna do braço dos voluntários com ESE e ESR, normalizado vetorialmente entre 400-1800 cm^{-1}	46
5.10	Dendograma do voluntário 1 com ESE do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	47
5.11	Dendograma do voluntário 2 com ESE do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	47
5.12	Dendograma do voluntário 1 com ESR do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	48
5.13	Dendograma do voluntário 2 com ESR do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.	48
5.14	<i>Matriz plot</i> de todas as amostras do dorso da mão normalizadas vetorialmente tanto do grupo de ESE e ESR	49
5.15	Média dos espectros normalizados vetorialmente das amostras do dorso da mão de voluntários com ESE e ESR.	50
5.16	Média dos espectros do dorso da mão com maiores mudanças espectrais do grupo I e grupo II.	51
5.17	(a) <i>Scatterplot</i> de amostras do dorso da mão de voluntários com ESE e ESR. (b) <i>Loading plot</i> de amostras do dorso da mão dos voluntários com ESE e PES, normalizado vetorialmente entre 400-1800 cm^{-1}	51
5.18	<i>Matriz plot</i> de todas as amostras da face interna do braço e do dorso da mão normalizadas vetorialmente tanto do grupo de ESE e ESR.	52
5.19	Espectro Raman médio do grupo I e grupo II.	53
5.20	Média dos espectros com maiores mudanças espectrais do grupo I e grupo II.	54
5.21	(a) <i>Scatterplot</i> de amostras do dorso da mão e da face interna do braço de voluntários com ESE e ESR. (b) <i>Loading plot</i> de amostras do dorso da mão dos voluntários com ESE e ESR, normalizado vetorialmente entre 400-1800 cm^{-1}	55
5.22	Média e desvio padrão da amostra com ESR da face interna do braço grupo 1.	56
5.23	Média e desvio padrão da amostra com ESR do dorso da mão grupo 1.	56
5.24	Média e desvio padrão da amostra com ESE da face interna do braço grupo 1.	57
5.25	Média e desvio padrão da amostra com ESE do dorso da mão grupo 2.	57

Lista de Tabelas

1.1	Classificação dos fototipos da pele humana segundo Royden e Fitzpatrick.	20
5.1	Principais picos dos constituintes bioquímicos que são Raman ativo. Com intervalo de confiança de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$.	41
5.2	Autovalores do PCA de comparação entre os tecidos da face interna do braço dos voluntários com ESE <i>versus</i> ESR.	44
5.3	Autovalores do PCA de comparação entre os tecidos dorso da mão dos voluntários com ESE <i>versus</i> ESR.	49
5.4	Autovalores do PCA de comparação entre os tecidos dorso da mão e face interna do braço dos voluntários com ESE <i>versus</i> ESR.	53

Sumário

Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	12
Sumário	13
1 Introdução	15
1.1 Epiderme	15
1.1.1 Estrato Córneo	16
1.1.2 Estrato Lúcido	17
1.1.3 Estrato Granuloso	17
1.1.4 Estrato Espinhoso	18
1.1.5 Camada Basal ou Estrato Germinativo	18
1.2 Derme	18
1.2.1 Derme Papilar	18
1.2.2 Derme Reticular	19
1.3 Hipoderme	20
1.4 Fototipos da pele	20
1.5 Efeitos da radiação na pele humana	20
1.5.1 Efeitos da radiação UV	20
1.5.2 Efeitos da radiação IR	21
1.5.3 Efeitos da radiação visível	21
2 Espectroscopia Raman e suas aplicações	22
2.1 Tratamento clássico para o efeito Raman	22
2.1.1 Limitações da Teoria Clássica	25
2.2 Espectroscopia Raman aplicada em sistemas biológicos	25
2.3 Espectroscopia Raman aplicado em pele humana	26
3 Análise Multivariada	28
3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)	28
3.1.1 Teoria geométrica	29

3.2	Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)	31
3.2.1	Similaridade	32
4	Metodologia e Procedimento Experimental	35
4.1	Comitê de Ética	35
4.2	População de Estudo	35
4.3	Preparo dos Voluntários	35
4.4	Análise das amostras	36
5	Resultados e Discussões	40
5.1	Comparação do grupo com ESE e ESR da região cronoenvelhecida	41
5.2	Comparação do grupo com ESE e ESR da região fotoenvelhecida	47
5.3	Comparação do grupo com ESE e ESR da região cronoenvelhecida e fotoenvelhecida	52
6	Conclusão e Perspectivas	58
	Referências Bibliográficas	63

Capítulo 1

Introdução

Diferentemente dos outros sistemas epiteliais, a pele tem a função de proteger as estruturas internas dos efeitos externos nos quais ela está exposta, haja vista que é um órgão intermediário entre o ambiente e o organismo[1]. Em virtude das suas propriedades físicas, biológicas e químicas, ela atua na manutenção do organismo, principalmente, com a secreção sebácea na camada córnea que impossibilita a perda de água e é relevante na manutenção eutrófica e no controle da temperatura (termorregulação). Além da pele ser uma barreira de proteção contra agentes externos como a radiação solar, ela também mantém a integridade das estruturas internas ao impedir a desidratação[1, 2].

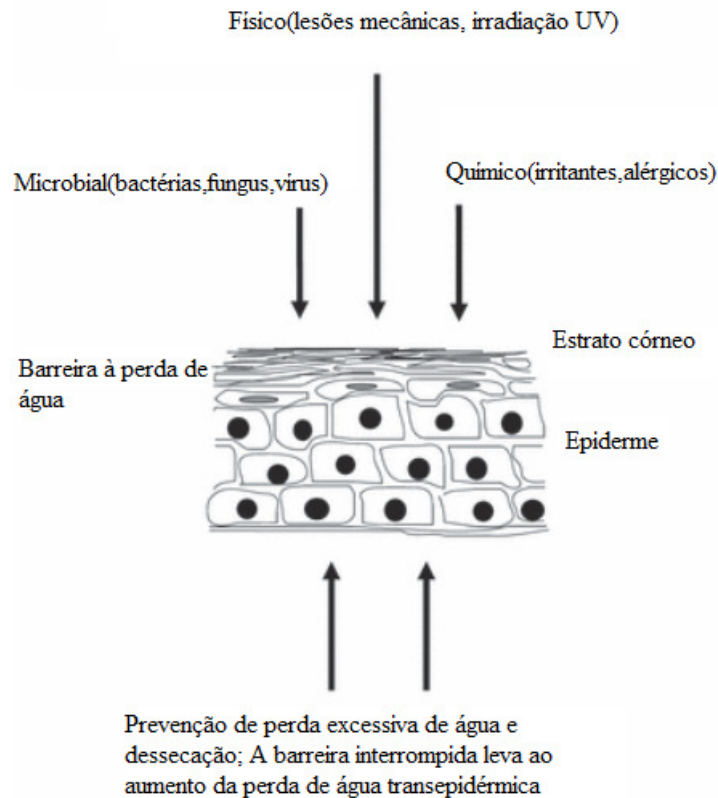
1.1 Epiderme

Um dos tecidos epiteliais mais extensos é a epiderme com $40\mu\text{m}$, que possui a importante função de proteger a parte interna contra agentes externos (microorganismos), penetração de agentes químicos (tóxicos e drogas), radiação ultravioleta e diminuição do conteúdo hídrico como mostrado na figura 1.1[1]. Ela é constituída por cinco camadas distintas: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal ou germinativo. Essas camadas citadas anteriormente são formadas por queratinócitos, responsáveis pela produção de queratina, enquanto que as melaninas são constituídas pelos melanócitos, responsáveis pela pigmentação da pele[3].

A constituição bioquímica da epiderme possui 40% de proteína responsável pela hidratação, predominando a queratina, que é formada por 40% de água, 15% a 20% de ácidos graxos livres, lipídeos polares, lipídeos neutros, esteróides livres e colesterol. Na figura 1.2 encontra-se a descrição das camadas da epiderme. E nas subseções seguintes a discussão da sua composição bioquímica[2].

1.1. EPIDERME

Figura 1.1: Representação da barreira epidérmica de dentro para fora e fora para dentro.



Fonte: Adaptado da referência[4].

1.1.1 Estrato Córneo

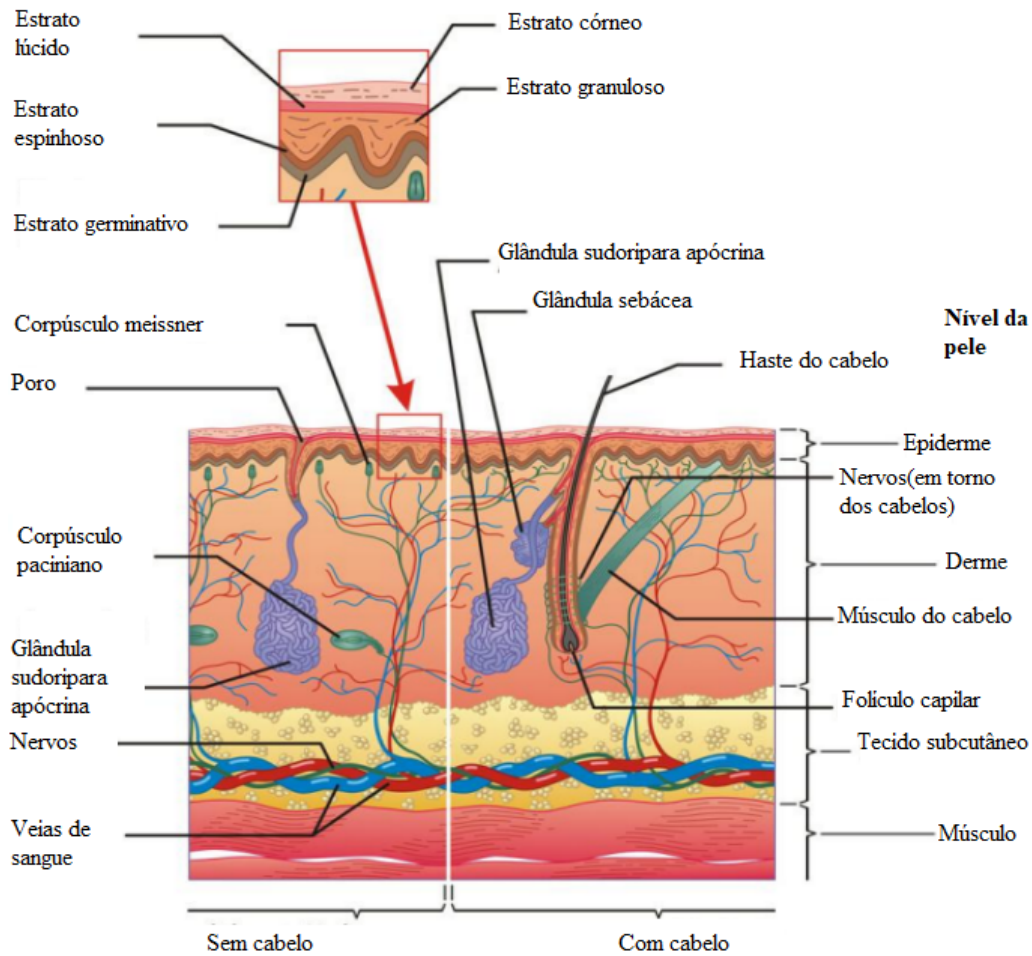
Essa é a parte mais externa da epiderme, possuindo entre $10\mu\text{m}$ e $20\mu\text{m}$ de espessura, formada principalmente por corneócitos hidrofílicos[4]. Sua constituição bioquímica é 80% de queratina, 5% a 10% de água, 5% a 10% de lipídeos, na maioria ceramidas, e pelo fator de hidratação natural (FHN)[6] que é composto por queratina, alguns sais (para manter a hidratação da epiderme), quinze aminoácidos (a alanina, histidina, glicina, ornitina, citrulina, serina, fenilalanina e arginina), ácido urocânico, ácido pirrolidona-carboxílico, lactato e uréia.

Com o passar do tempo, há uma diminuição do FHN e da queratina, que é uma das principais proteínas do estrato córneo, constituída por 21 aminoácidos ligados por pontes de hidrogênio e por lipídeos que no estrato córneo tem a função de formar uma barreira de proteção para epiderme[7, 8]. Esses dois fatores, em conjunto, tornam a pele desidratada e aparentemente opaca, evidenciando o envelhecimento cronológico cutâneo[1].

Os efeitos da radiação solar no estrato córneo podem levar a graves danos a pele, como alterações das propriedades mecânicas, cortes, fissuração, cicatrização e infecção[9].

1.1. EPIDERME

Figura 1.2: Camadas da pele, em que abaixo é enfatizado a região da epiderme.



Fonte: Adaptado da referência[5].

Esta exposição à radiação UV causa também efeitos de coesão celular, envelhecimento de células e lesões no *Deoxyribonucleic Acid* DNA que podem manifestar-se na forma de câncer[10].

1.1.2 Estrato Lúcido

É uma camada após o estrato córneo, que se localiza em regiões como o solado dos pés, e auxilia na proteção mecânica originada pelo atrito[1], geralmente esta região possui células que são anucleadas e achatadas que detém de células mortas ou em fase de degeneração.

1.1.3 Estrato Granuloso

As células desse estrato existem em grande quantidade nas células de grânulos de queratina achatadas e medem, aproximadamente, entre 100nm a 500nm, sendo conhecidas

como corpos lamelares[1]. E por excitose¹ o estrato granuloso libera lipídios na região intercelular do estrato córneo, criando uma barreira a prova d'água[2].

1.1.4 Estrato Espinhoso

Os queratinócitos têm forma espinhosa, onde ao ocorrer o processo de queratinização os filamentos pequenos de queratina (desmossomos) permeiam para o citoplasma das células. Essa camada da epiderme tem a interface esponjosa devido aos poros que permitem a passagem de nutrientes existentes entre as células espinhosas[1].

1.1.5 Camada Basal ou Estrato Germinativo

Essa camada é formada por células proliferativas e matrizes. Quando as células eucarióticas dividem seus cromossomos entre duas células metade ajuda na renovação da epiderme. A camada basal possui células alongadas, (os queratinócitos) e estruturas encarregadas de fixar a membrana que é constituída por fibras de queratina (os hemidesmossomos) à camada basal. Além disso, nessa camada existem outras células com funções diferentes como as Langerhans, Merkel e melanócitos[11].

1.2 Derme

A derme é formada por uma camada conjuntiva responsável pela elasticidade, sustentação e estrutura da pele, encontrando-se mais fina nas mulheres e cada região do corpo apresenta espessuras diferentes entre 0,5mm a 3,0mm chegando até uma espessura de quarenta vezes da epiderme. Na derme existem: glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, nervos, pelos, vasos e células como leucócitos, fibroblastos, mastócitos, linfócitos, macrófagos, plasmócitos e miofibroblastos. A termorregulação, a defesa imunológica e o suporte da rede vascular são as funções da derme[11].

Ela é constituída principalmente por proteína de colágeno do tipo I, dispostas em uma rede ortogonal na derme reticular formada por fibras espessas sendo de 80% a 90% do colágeno da derme e o colágeno do tipo III que é composto por fibrilas de diâmetro pequeno de 8% a 12% do colágeno da derme, e em menor quantidade as proteínas encarregadas pela elasticidade cutânea, as elastinas.

1.2.1 Derme Papilar

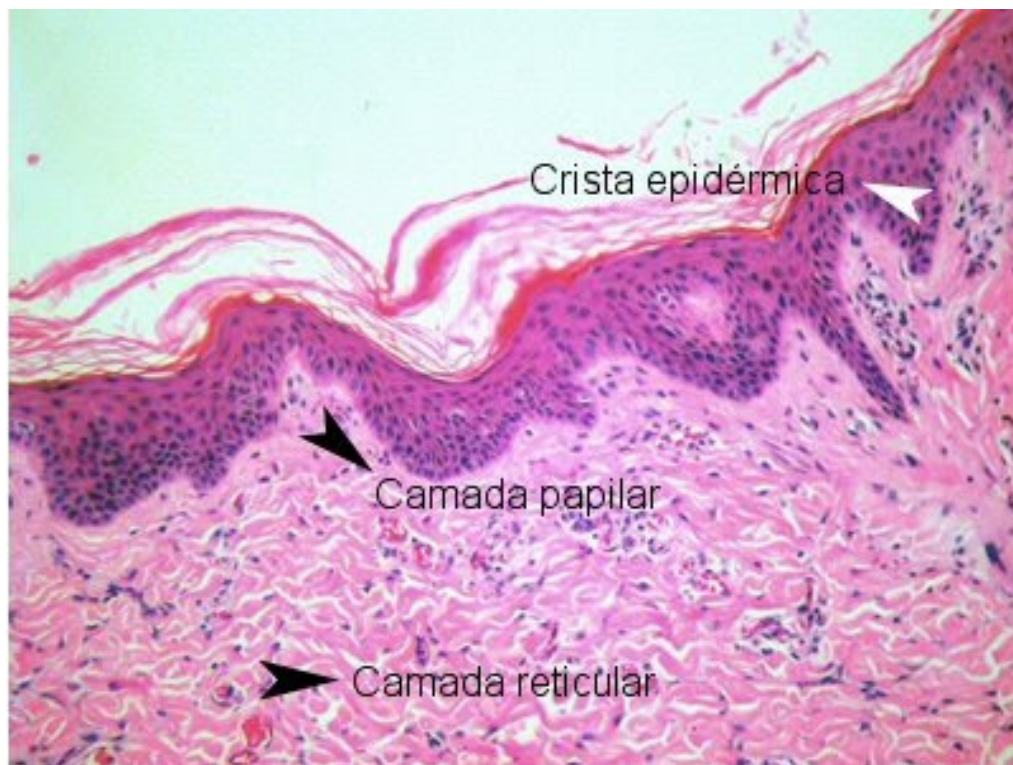
É a camada que fica entre a derme reticular e a epiderme, nesta região como é mostrado na figura 1.3 encontra-se um fina fibra elástica, dispostas perpendicularmente a superfície

¹Processo ativo em que um material intracelular é transportado através de vesículas para o meio extracelular.

onde elas são denominadas de oxitalanas, tendo como papel a fixação da membrana basal, além disso a derme papilar é composta por duas glicoproteínas e elastina imatura [7]. Nessa região há maior sensibilidade da pele devido aos vasos sanguíneos, linfáticos, fibroblastos e nervos com maior quantidade de colágeno do tipo II, III, IV, V e VII[1].

Nos estudos realizados por BERNSTEIN *et al*[12] é mostrado que o colágeno é danificado pela exposição solar ocorre nesta região acompanhada da degradação de outros componentes da matriz celular e fibras elásticas.

Figura 1.3: Estrutura da derme e suas divisões.



Fonte: Adaptado da referência[7].

1.2.2 Derme Reticular

Nesse tecido existe principalmente o colágeno do tipo I que ajuda na força, estruturação e resistência da pele com as fibras dispostas paralelas a superfície, e essas fibras elásticas proporcionam a flexibilidade cutânea que evita danos a pele. E toda a resistência, estrutura, elasticidade e força da pele é dado pelo colágeno[7].

A radiação solar nesta região pode levar ao envelhecimento cutâneo, podendo haver danos no DNA e desencadeamento de células cancerosas na pele. A radiação solar também pode ocasionar alterações benignas na pele, dermatites, sardas, neoplasia e queimaduras[13].

1.3 Hipoderme

É uma camada que fica abaixo da derme e é composta principalmente por lobos gordurosos tendo $150\mu\text{m}$ de diâmetro, algumas fibras de colágeno que conectam-se a ossos e músculos e em menor quantidade por células adiposas que servem como reserva de energia, isolante mecânico e térmico funcionando como modeladora corpórea[1].

1.4 Fototipos da pele

A melanina é responsável pelas diferentes tonalidades da pele do rosto, retina, presença de sardas, exposição a radiação solar e coloração dos pelos e cabelos, portanto, a pele humana é classificada conforme a produção de melanina. Abaixo na tabela 1.1 temos os fototipos da pele humana[2].

Tabela 1.1: Classificação dos fototipos da pele humana segundo Royden e Fitzpatrick.

Classificação	Cor da pele	Características após exposição solar
I	Branca	Sempre queima
II	Branca	Bronzeia com dificuldade
III	Branca	Bronzeia moderadamente
IV	Castanho claro	Bronzeia com dificuldade
V	Castanho escuro	Bronzeia muito facilmente
VI	Negra	Nunca queima, só bronzeia

Fonte: Adaptado da referência[1].

1.5 Efeitos da radiação na pele humana

1.5.1 Efeitos da radiação UV

A exposição à radiação UV é classificada como crônica e é originada pela exposição excessiva à radiação solar, que ocasiona o fotoenvelhecimento, perda de elasticidade, atrofia, pigmentação excessiva de cores, ressecamento da pele e rugas, sendo os raios UVA os principais responsáveis por essas alterações pois penetram até as camadas mais profundas da pele. O câncer de pele também é proveniente de uma exposição crônica que pode ser do tipo não-maligno, não-melanoma e neoplasia maligna[14].

A exposição à radiação UV pode ser também do tipo aguda em que as reações são queimaduras, bronzeamento e produção de vitamina D provocadas pelos raios UVB[14].

1.5.2 Efeitos da radiação IR

Estudos anteriores relatados por SOYUN CHO et al., mostraram que a exposição à radiação IR e ao calor induz um angiogênese cutânea e inflamatória celular que interrompe a matriz extracelular dérmica induzindo uma metaloproteinases, alterando as proteínas estruturais na derme que por sua vez aumentam o envelhecimento da pele humana.

Pesquisas recentes mostram que a radiação IR pode danificar o conteúdo no colágeno ocasionado por um aumento da matriz metalloproteína(MMP)[15].

A radiação IR pode causar dois tipos de efeitos, o térmico que pode ser benéfico dependendo da exposição, e o dano oxidativo que fica na região do IR-A entre 760-1500nm, que atinge a pele mais profundamente com 35% na epiderme, 48% na derme e 17% no tecido subcutâneo[16].

1.5.3 Efeitos da radiação visível

Segundo MANPREET RANDHAWA et al.,[17] em estudos *ex vivo* investigando a formação de melanina na pele, mostra que uma única exposição à luz visível induz pouca pigmentação e exposições múltiplas fornecem aumento na pigmentação, fazendo com que ocorra uma produção irregular de melanina na pele humana que é um dos fatores principais do fotoenvelhecimento. E a luz visível pode induzir dano ao DNA pela geração de oxigênio reativo que é uma série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres[18].

Capítulo 2

Espectroscopia Raman e suas aplicações

2.1 Tratamento clássico para o efeito Raman

Uma luz monocromática de frequência ω_1 incide sobre um material, como por exemplo uma molécula. Então, a influência do campo elétrico da luz incidente irá ocasionar uma modificação nos centros de distribuição das cargas positivas e negativas que não irão mais coincidir, fazendo com que as moléculas passem a ter um momento de dipolo induzido, em que este momento de dipolo induzido é dado por \vec{P} [19].

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (2.1)$$

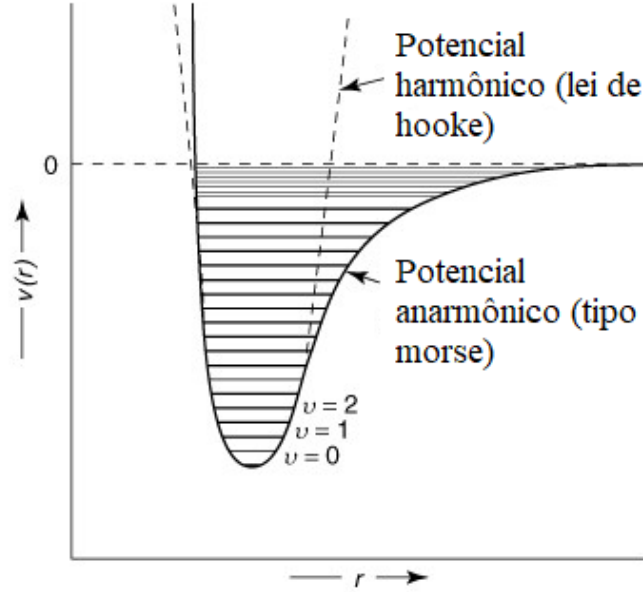
Ao considerar o sistema de dispersão como uma molécula que é livre para vibrar, mais não girar, ou seja, para simplificar o tratamento, a aproximação harmônica é adotada e despreza-se termos anarmônicos como é mostrado na figura 2.1 [20].

Portanto, as vibrações moleculares em torno de seu ponto de equilíbrio fazem com que ocorra uma variação da polarizabilidade e que este tensor possa ser expandido em uma série de Taylor em relação as coordenadas normais de vibração.

$$\alpha_k = (\alpha_{ij})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots \quad (2.2)$$

Para que ocorra o efeito Raman é necessário que as componentes α_{ij} (ou pelo menos uma delas) varie com os movimentos de vibração da molécula. Onde o valor de $(\alpha_{ij})_0$ é o termo da posição de equilíbrio, e que Q_k e Q_l são as coordenadas normais de vibração associado com as frequências de vibração molecular ω_k e ω_l [22]. O Q_k tem a representação de um movimento harmônico simples, o qual é dependente do tempo e expresso como $Q_k = Q_{k0} \cos(2\pi\omega_k t)$ e a polarizabilidade fica:

Figura 2.1: Estrutura da derme e suas divisões.



Fonte: Adaptado da referência[21].

$$\alpha = \alpha_0 + \sum \alpha_n \cos(2\pi\omega_m t) \quad (2.3)$$

em que α é a polarizabilidade estática e ω_m é a frequência dos modos normais de vibração da molécula, onde substituindo a equação 2.3 na 2.1, e usando o campo incidente como $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\omega_1 t)$:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\omega_1 t) + \vec{E}_0 \sum \alpha_n \cos(2\pi\omega_m t) \cos(2\pi\omega_1 t) \quad (2.4)$$

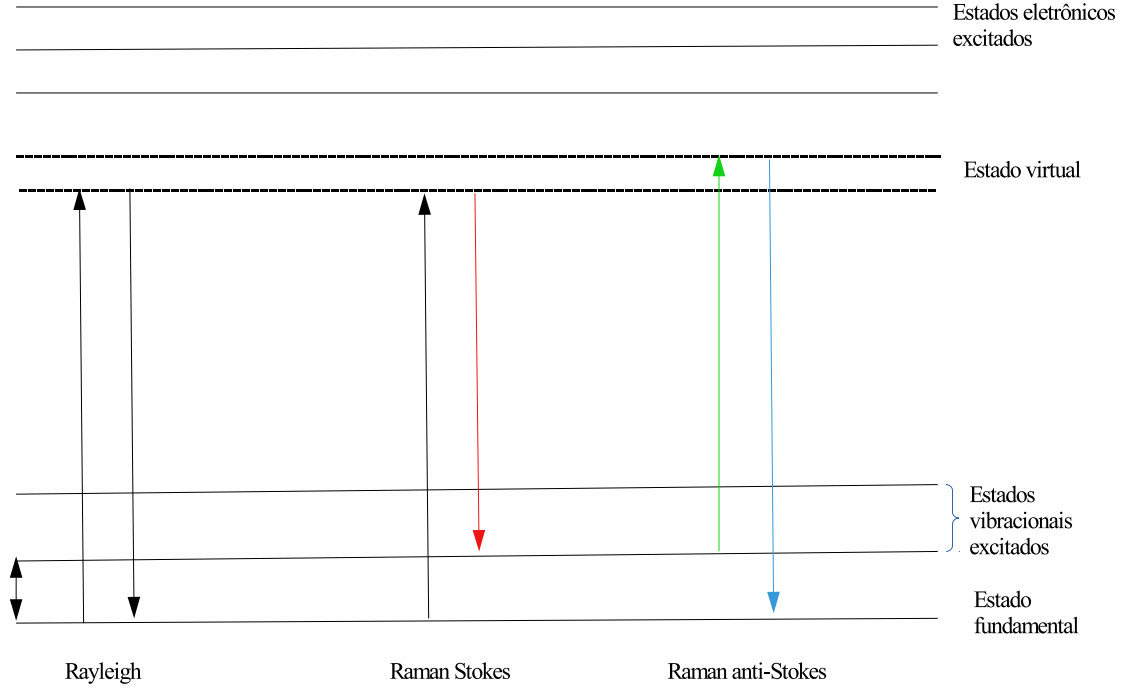
usando uma identidade trigonométrica¹ a equação 2.4 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\omega_1 t) + \frac{1}{2} \vec{E}_0 \sum \alpha_n [\cos 2\pi(\omega_m + \omega_1)t + \cos 2\pi(\omega_m - \omega_1)t] \quad (2.5)$$

pode-se observar que na equação 2.5 o momento de dipolo induzido tem três componentes distintas de frequências, o primeiro termo que é o espalhamento Rayleigh, o segundo espalhamento Raman Stokes ($\omega_m - \omega_1$) e o terceiro o anti-Stokes ($\omega_m + \omega_1$), em que a relação destes espalhamentos podem ser observados na figura 2.2 em um diagrama de energia, onde isto ocorrerá se $\alpha_n \neq 0$, daí teremos uma reemissão de luz com as frequências ($\omega_m - \omega_1$) e ($\omega_m + \omega_1$). Ao observar o momento de dipolo da equação 2.1 pode-se representá-la em termos de suas componentes e reescrevê-la na forma matricial[23].

¹ $\cos(a) \cdot \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a + b) + \cos(a - b)]$

Figura 2.2: Representação do espalhamento elástico e inelástico da luz.



Fonte: Acervo do autor.

$$\begin{aligned}
 P_x &= \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \\
 P_y &= \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \\
 P_z &= \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z
 \end{aligned} \tag{2.6}$$

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \tag{2.7}$$

Na equação 2.7 os nove termos de α_{ij} , são componentes do tensor polarizabilidade α , se $\alpha_{ij} = \alpha_{ji}$ o tensor polarizabilidade por ser expresso por uma matriz real e simétrica, tendo seis componentes independentes. E a condição para que a matriz seja simétrica é que o espalhamento Raman não seja ressonante[20]. Como existe a simetria as seis componentes são:

$$\alpha_{xy} = \alpha_{yx} \quad \alpha_{xz} = \alpha_{zx} \quad \alpha_{yz} = \alpha_{zy} \tag{2.8}$$

A partir dos campos elétricos unitários pode-se escrever uma elipsóide com o vetor \vec{P} , da seguinte forma:

$$P_x = \alpha_x E_x \quad ; \quad P_y = \alpha_y E_y \quad ; \quad P_z = \alpha_z E_z \tag{2.9}$$

E a condição para que o efeito Raman seja ativo é que $\frac{\partial\alpha}{\partial Q} \neq 0$ [24].

2.1.1 Limitações da Teoria Clássica

Se a espectroscopia Raman for usada apenas para obter frequências de moléculas e também como uma análise qualitativa, a teoria clássica pode ser considerada adequada [25]. Mas, como toda teoria tem suas peculiaridades a teoria clássica também tem suas limitações, haja vista que não pode-se aplicar as rotações moleculares utilizando uma descrição clássica, pois não é especificado discretamente as frequências rotacionais para as moléculas,

$$\alpha_k^{Ram} = \frac{1}{2}\alpha'_k Q_k \quad (2.10)$$

onde existe na expressão anterior o tensor do espalhamento Raman que é parcialmente correto.

Com isso o uso da mecânica quântica é importante pois pode-se fazer descrições mais completas sobre as vibrações moleculares, onde a amplitude clássica Q_k é substituída por um quantum de amplitude mecânica. Além disso, a teoria clássica não pode fornecer informações sobre como um α'_k está relacionado às propriedades de dispersão da molécula[25].

2.2 Espectroscopia Raman aplicada em sistemas biológicos

Nos últimos anos com os avanços da tecnologia, a espectroscopia Raman passou a ter aplicações em diversas áreas do conhecimento, como na física, química, biologia, ciências dos materiais, farmacologia, paleontologia, ciência forense, arqueologia, e biomédica[26].

Em particular na área biomédica muitos trabalhos vem sendo realizados, pois tem despertando à atenção de pesquisadores da área da saúde por ser uma técnica não invasiva, não destrutiva e que por fornecer informações em nível molecular, permite uma descrição sobre a composição bioquímica do material estudado[27].

A Espectroscopia Raman se trata de uma técnica que possui vários campos de atuações, como já citado neste trabalho, portanto é válido salientar pesquisas já realizadas que utilizaram a referida técnica[28].

Como uma alternativa para a detecção de alguns tipos de câncer a espectroscopia Raman vem sendo utilizada como biopsia óptica no tecido humano em amostras *ex vivo* ou *in vivo*. Através de mudanças observadas nas bandas dos espectros Raman pode-se determinar a natureza do tumor se é benigno ou maligno, alguns exemplos do uso da técnica são: um estudo feito na mucosa estomacal maligno e normal, a análise do *Thyroid-Stimulating Hormone* (TSH) no sangue, o estudo das camadas mais externas (estrato

córneo) e internas da pele (derme), além de analisar a permeação de produtos cosméticos, poluentes, drogas transdérmicas, melhorar as drogas típicas na pele, supersaturação e verificar os diagnósticos de pele saudável e doente[26].

Ademais, a espectroscopia Raman é utilizada também para entender as propriedades físicas das unhas, que mudam de acordo com o conteúdo de hidratação, e pela interação água - proteína nas bandas $\nu(\text{OH})/\nu(\text{CH}_2)$ [29]. Além de ser utilizada em tecido renal tumoral e normal que apresentam alto grau de células renais e carcinomas, e com a diminuição da cisteína ocorre a formação de cálculo renal podendo a diminuição ser detectada pelas mudanças entre os espectros dos dois tecidos[30]. Além das informações sobre tecidos vivos, pode-se fazer análise em osso através da técnica de *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* SERS² para a identificação de biomarcadores como o anthrax[26].

A evolução possibilitou ótimos resultados dos equipamentos Raman na parte de bioanálise, que oferecem informações de quase todas as biomoléculas, possibilitando informar lesões precursoras ou tumores malignos como o *human papiloma virus* (HPV), um tipo de infecção que pode levar ao desenvolvimento de neoplasia cervical uterina, e pesquisas já feitas mostraram que o espectro Raman apresenta mudanças nos picos de proteínas e DNA, que é consistente com o gene do HPV[31].

Estudos que também utilizaram a mesma técnica analisaram as interações hidrofóbicas em proteínas de soro de leite com a lisozima que foram verificadas pela mudança da frequência de vibração disulfeto e redução dos níveis R-helix e α -sheet atribuídas pelas vibrações do CH_2 e CH [32].

2.3 Espectroscopia Raman aplicado em pele humana

Estudos recentes, realizado por VAMSHI et al., sobre a penetração de alguns tipos de filtros solares na pele humana investigados por espectroscopia Raman confocal, confirmaram que a penetração desses produtos testados na pele humana *in vivo* foi restrita a camada do estrato córneo, provando que a espectroscopia Raman confocal é uma técnica analítica semiquantitativa simples, rápida, não destrutiva e não invasiva para estudos *in vivo* envolvendo o efeito de agentes externos na pele humana[33].

Recentemente, PEREIRA et al., relatou a aplicação da espectroscopia Raman confocal *in vivo* como um sensor importante para a detecção de produtos avançados de glicação em processos a nível molecular, mostrando que os produtos finais de glicação avançada têm incidência na progressão de doenças relacionadas a idade, principalmente a diabetes e Alzheimer. Neste estudo, foi possível identificar marcadores de bandas Raman da pentosidina e glucosepano na pele humana na região da derme[34].

²O espalhamento Raman Intensificado por Superfície é conhecido pela sigla em inglês SERS(*Surface-Enhanced Raman Scattering*) é um fenômeno em que é observado os espectros de moléculas adsorvidas em superfícies metálicas rugosas chamadas de substratos SERS-ativos, em que geralmente se utiliza como base de preparação substratos metálicos com alta refletividade óptica como: ouro, cobre e prata.

CLAUDIO et al., em uma pesquisa realizada em jovens saudáveis, idosos saudáveis e com diabetes mostrou através da espectroscopia Raman confocal *in vivo* na pele na região da derme que a área da banda da prolina, hidroxiprolina e a intensidade da banda de amida I variam de acordo com a idade e estado de saúde[35].

MONICA et al., fizeram uma análise *in vivo* dos efeitos da radiação infravermelha da derme da pele de voluntárias com fototipo I e II usando espectroscopia Raman Confocal e observaram que os voluntários de pele do fototipo I na média não tiveram alterações significativas do colágeno enquanto os voluntários com fototipo II tiveram uma redução. Assim mostraram que esta técnica é uma potencial ferramenta para a análise *in vivo* das diferentes condições metabólicas em relação a diferentes partes da pele[36].

Pesquisas recentes realizadas por LIN et al., sobre diagnóstico *in vivo* e em tempo real de carcinomas usando espectroscopia Raman, apontam que os espectros Raman na região de impressão digital/alta frequência apresentam diferenças espectrais entre o tecido nasofaríngeos normais (na endoscopia) e cancerosos, que são atribuídos a alterações da proteína, lipídeos, ácidos nucleicos e conteúdo de água ligada, mostrando que a técnica de espectroscopia Raman de fibra óptica é promissora para melhorar o diagnóstico de câncer *in vivo* e resultado em tempo real[37].

Estudos mostram que a microscopia Raman confocal está sendo utilizada na caracterização para o transporte de drogas na pele. Como exemplo, têm-se a penetração do anestésico na pele, onde a microscopia Raman confocal fornece informações sobre a penetração da droga na pele e até qual região ela atinge[38].

Recentemente, GUALERZI et al., realizou um estudo com vesículas extracelulares (VEs) das células do estroma mesenquimatosas (MCS) que estão sendo usados como agentes terapêuticos para a regeneração de tecidos, em que é atribuído um Raman da VEs a partir de células não diferenciadas e de diferentes origens de tecido que fornece informações sobre as características bioquímicas da VEs[39].

Estudos recentes realizados por INÊS et al., mostram as diferenças espectrais na região CH dos espectros Raman com lesões melanócitos benignas em melanoma clinicamente suspeita, utilizando espectroscopia Raman devido à baixa precisão do diagnóstico clínico do melanoma. E os resultados demonstram um estiramento do CH que discrimina melanoma de lesões melanócitos benignos que são mal diagnosticados clinicamente[40].

Pesquisas realizadas por GIUSEPPE et al., mostram o uso da espectroscopia Raman para examinar tecidos moles para investigar a idade humana através das alterações bioquímicas, em que esta abordagem espectroscópica fornece informações sobre a composição das proteínas e cristalização das estruturas lipídicas, que leva a identificação da idade de lactantes para adultos[41].

Estudos também reportam que a entrega de fármacos no estrato córneo pode ser analisada através de microscopia Raman que fornece informações sobre a integridade química da droga e também da pele[42].

Capítulo 3

Análise Multivariada

A análise multivariada é um conjunto de métodos que podem ser utilizados quando existem diversas medidas feitas em uma ou mais amostras orgânicas, inorgânicas, animais ou humanas (*in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*)[43]. Cada medida realizada é uma variável e as suas unidades, de acordo com o problema no qual o pesquisador está trabalhando, são as observações que podem ser do tipo: experimentais, de amostragem e de pesquisa. Os métodos que foram utilizados nesse trabalho são: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA).

3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A teoria mostra que quando há um conjunto de \mathbf{P} variáveis correlacionadas, deve-se substituir esse por novas variáveis \mathbf{P}' não correlacionadas e que são expressas como uma combinação linear das variáveis principais, desde que as \mathbf{P} variáveis iniciais não sejam independentes, objetivando a redução da dimensionalidade[44], sem perdas de informações significativas. Além disso, essa transformação em novas variáveis tende a eliminar as originais que possuem poucas informações, e nas novas variáveis, procura-se a variância máxima da combinação linear[43].

O PCA é um dos métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados, os quais são usados para examinar similaridade ou diferenças entre amostras. É um método matemático usado para maximizar as informações que podem ser extraídas de um conjunto de dados, reduzindo o número de variáveis da matriz original de dados envolvidos no modelamento[45].

Já de forma geométrica obtêm-se um novo conjunto de eixos ortogonais, no qual as coordenadas das observações relacionadas a cada um dos mesmos geram valores para as novas variáveis[46]. A primeira componente principal explica a variância máxima nos dados, a segunda explica a variância máxima que não foi contabilizada pela primeira componente e assim sucessivamente, gerando uma quantidade \mathbf{P}' de novas variáveis (PCs) não correlacionadas[47].

3.1.1 Teoria geométrica

A análise de componentes principais trata-se de \mathbf{n} observações com vetores $\vec{y}_1, \vec{y}_2, \dots, \vec{y}_p$ que forma um conjunto de pontos em uma dimensão P do espaço, onde sua visualização é mais fácil de ser observada geometricamente se o conjunto de pontos for elipsoidal. Caso haja y_1, y_2, \dots, y_p , as variáveis no \vec{y} serão correlacionadas, e formarão um conjunto de pontos da elipsóide que não estarão orientados paralelamente a nenhum dos eixos representados por y_1, y_2, \dots, y_p [43].

Com isso procura-se obter os eixos naturais do conjunto de pontos da elipsóide com a origem em \vec{y} e os vetores médios $\vec{y}_1, \vec{y}_2, \dots, \vec{y}_p$, ademais é válido ressaltar que girando os eixos e mudando sua origem para \vec{y} são encontradas as novas variáveis não correlacionadas[48]. Logo, a rotação nos eixos pode ser multiplicada por uma matriz ortogonal \vec{A} e um vetor \vec{y} , onde obtêm-se:

$$\vec{d}_i = \vec{A} \cdot \vec{y}_i \quad (3.1)$$

no qual esse vetor ortogonal \vec{A} é do tipo $\vec{A}^T \cdot \vec{A} = I$, então não há alteração na distância da origem, se:

$$\vec{d}_i' \cdot \vec{d}_i = [\vec{A}^T \vec{y}_i'] [\vec{A} \vec{y}_i] \rightarrow \vec{d}_i' \cdot \vec{d}_i = \vec{y}_i' \vec{A}^T \vec{A} \vec{y}_i \rightarrow \vec{d}_i' \cdot \vec{d}_i = \vec{y}_i' \vec{y}_i \quad (3.2)$$

Ao encontrar a matriz ortogonal obtêm-se os eixos da elipsóide que se alinham com as extensões do conjunto de pontos das novas variáveis que são as componentes principais d_1, d_2, \dots, d_n com $\vec{d} = \vec{A} \cdot \vec{y}$ não correlacionado. Se tivermos as constantes a_1, a_2, \dots, a_n haverá a combinação linear abaixo:

$$d = a_1 y_1 + a_2 y_2 + \dots + a_p y_p = \vec{a}' \cdot \vec{y} \quad (3.3)$$

Aplicando o vetor \vec{a} em y_i , fica:

$$d_i = a_1 y_{i1} + a_2 y_{i2} + \dots + a_p y_{ip} = \vec{a}' \cdot \vec{y}_i \quad i = 1, 2, 3, \dots, n. \quad (3.4)$$

E a média dos valores de \vec{d} podem ser obtidos pela média de $d_1 = \vec{a}' \vec{y}_1, d_2 = \vec{a}' \vec{y}_2, \dots, d_n = \vec{a}' \vec{y}_n$, ou a combinação linear de \vec{y} dos vetores médios $\vec{y}_1, \vec{y}_2, \dots, \vec{y}_n$. Que é representada por:

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i = \vec{a}' \cdot \bar{y} \quad (3.5)$$

Similarmente a $d_i = \vec{a}' \vec{y}_i$ pode-se encontrar a variância para d_1, d_2, \dots, d_n ou direta-

3.1. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

mente de \vec{a} e \vec{S} , onde \vec{S} a matriz de covariância de $\vec{y}_1, \vec{y}_2, \dots, \vec{y}_n$:

$$s_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{(n-1)} = \vec{a}' \vec{S} \vec{a} \quad (3.6)$$

Na equação 3.6 se a variância for não negativa, então $s_d^2 \geq 0$, logo $\vec{a}' \vec{S} \vec{a} \geq 0$. Definindo uma nova combinação linear do tipo $J = \vec{b}' \vec{y}_1 = b_1 y_1 + b_2 y_2 + \dots + b_p y_p$, em que $\vec{b}' = (b_1, b_2, \dots, b_p)$ é um vetor com constantes diferentes de \vec{a}' , com isso a covariância entre d e J fica:

$$s_{dJ} = \frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})(J_i - \bar{J})}{(n-1)} = \vec{a}' \vec{S} \vec{b} \quad (3.7)$$

Se considerarmos os vetores \vec{a} e \vec{b} como \vec{a}_1 e \vec{a}_2 de forma a ter um vetor \vec{A} relacionado aos dois anteriores e também com a equação 3.1, obtêm-se:

$$\vec{A} = \begin{pmatrix} \vec{a}_1' \\ \vec{a}_2' \end{pmatrix} \rightarrow \vec{d} = \begin{pmatrix} \vec{a}_1' \\ \vec{a}_2' \end{pmatrix} \vec{y} = \vec{A} \cdot \vec{y} \quad (3.8)$$

A média de \vec{d} é obtida da mesma forma que na equação 3.8, que fica:

$$\bar{\vec{d}} = \vec{A} \cdot \bar{\vec{y}} \quad (3.9)$$

Agora usando as equações 3.6 e 3.7 pode-se construir a matriz de covariância para \vec{d} .

$$\vec{S}_d = \begin{pmatrix} s_{d_1}^2 & s_{d_1, d_2} \\ s_{d_2, d_1} & s_{d_2}^2 \end{pmatrix} \rightarrow \vec{S}_d = \begin{pmatrix} \vec{a}_1' \\ \vec{a}_2' \end{pmatrix} \vec{S}(\vec{a}_1, \vec{a}_2) = \vec{A} \vec{S} \vec{A}' \quad (3.10)$$

Usando a expressão (3.10) a matriz de covariância para \vec{d} resulta em:

$$\vec{S}_d = \begin{pmatrix} \vec{a}_1' \vec{S} \vec{a}_1 & \vec{a}_1' \vec{S} \vec{a}_2 & \dots & \vec{a}_1' \vec{S} \vec{a}_k \\ \vec{a}_2' \vec{S} \vec{a}_1 & \vec{a}_2' \vec{S} \vec{a}_2 & \dots & \vec{a}_2' \vec{S} \vec{a}_k \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \vec{a}_k' \vec{S} \vec{a}_1 & \vec{a}_k' \vec{S} \vec{a}_2 & \dots & \vec{a}_k' \vec{S} \vec{a}_k \end{pmatrix} \rightarrow \vec{S}_d = \begin{pmatrix} \vec{a}_1' \\ \vec{a}_2' \\ \vdots \\ \vec{a}_k' \end{pmatrix} \vec{S}(\vec{a}_1, \vec{a}_2, \dots, \vec{a}_k) = \vec{A} \vec{S} \vec{A}' \quad (3.11)$$

Pode-se também obter a equação anterior da seguinte forma:

$$tr(\vec{A} \vec{S} \vec{A}') = \sum_{i=1}^k \vec{a}_i' \vec{S} \vec{a}_i \quad (3.12)$$

Portanto, a matriz de covariância d com $\vec{S}_d = \vec{A} \vec{S} \vec{A}$ é expressa por:

$$\vec{S}_d = \vec{A} \vec{S} \vec{A}' = \begin{pmatrix} s_{d_1}^2 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & s_{d_2}^2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & s_{d_p}^2 \end{pmatrix} \quad (3.13)$$

Com \vec{S} a matriz de covariância de $\vec{y}_1, \vec{y}_2, \dots, \vec{y}_n$, e $\vec{H} = \vec{C}' \vec{S} \vec{C}$ sendo $\vec{H} = (\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n)$ os elementos da diagonal principal e λ_i os autovalores de \vec{A} e \vec{S} com as colunas da matriz ortogonal \vec{S} com autovetores normalizados. Logo, a matriz ortogonal \vec{A} que normaliza \vec{S} é a transposta da matriz \vec{C} :

$$\vec{A} = \vec{C}' = \begin{pmatrix} \vec{a}'_1 \\ \vec{a}'_2 \\ \vdots \\ \vec{a}'_p \end{pmatrix} \quad (3.14)$$

em que \vec{a}_i é o autovetor normalizado ($\vec{a}'_i \vec{a}_i = 1$) de \vec{S} . E suas componentes principais são transformadas em variáveis do tipo: $d_1 = \vec{a}'_1 \vec{y}, d_2 = \vec{a}'_2 \vec{y}, \dots, \vec{a}'_p \vec{y}$ que pode ser expressa como $\vec{d} = \vec{A} \cdot \vec{y}$.

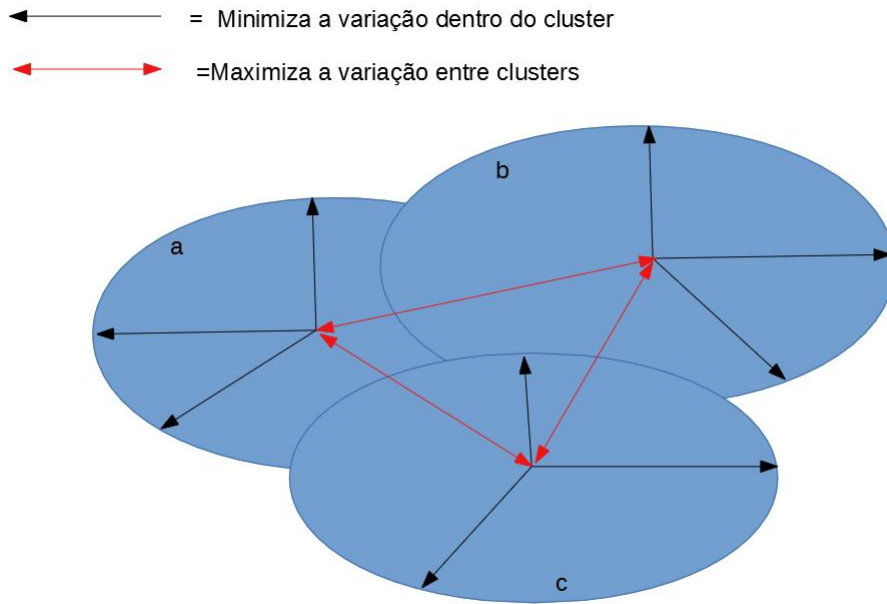
3.2 Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)

Essa análise é uma técnica usada para combinar observações em grupos, diferindo-se da análise de classificação que é dada pela separação de grupos e caracterizada por funções discriminantes. Quando o objetivo é separar elementos em grupos, a análise utilizada é a de *cluster*, de forma que em um mesmo grupo os elementos sejam homogêneos e em outro heterogêneos[43].

O HCA é uma análise não supervisionada, que é baseado na medida da distância entre os objetos por uma determinada métrica, e tem como objetivo agrupar os dados de forma a permitir identificar semelhanças entre os objetos[49].

A análise procura maximizar a homogeneidade dos indivíduos dentro dos grupos e ainda a heterogeneidade entre eles como pode-se observar na figura 3.1, buscando uma grande variação dos mesmos e, como resultado, há uma separação aceitável dentro deles que geram distâncias mínimas (alto grau de similaridade). É válido ressaltar ainda que, para agrupar *clusters* muitas das técnicas iniciam com a semelhança entre todos os pares de observações, e que de modo geral a similaridade é baseada na medida da distância[43].

Figura 3.1: Máxima homogeneidade de indivíduos dentro de grupos e máxima heterogeneidade entre os grupos.



Fonte: Acervo do autor.

3.2.1 Similaridade

Muitas técnicas utilizam a proximidade ou similaridade como índice para cada par de observações, tentando identificar os vetores que têm semelhança e representá-los como *clusters*, sendo que as distâncias entre esses *clusters* aumenta à medida que as unidades ficam mais separadas. A distância mais comum utilizada é a euclidiana, que é medida entre dois vetores $\vec{y} = (y_1, y_2, \dots, y_p)'$ e $\vec{x} = (x_1, x_2, \dots, x_p)'$, definido como:

$$d(\vec{x}, \vec{y}) = \sqrt{(\vec{x} - \vec{y})'(\vec{x} - \vec{y})} = \sqrt{\sum_{j=1}^p (x_j - y_j)^2} \quad (3.15)$$

Também podemos utilizar a distância estatística para poder ajustar as covariâncias e variâncias entre as p variáveis, que é representada da seguinte forma:

$$d(\vec{x}, \vec{y}) = \sqrt{(\vec{x} - \vec{y})' \vec{S}^{-1} (\vec{x} - \vec{y})} \quad (3.16)$$

Após obter os *clusters*, \vec{S} pode ser considerado como a matriz de covariância dentro do cluster agrupado. Mas como \vec{S} as vezes apresenta distorção na covariância e variância devido a algumas amostras que tem cluster naturais, utiliza-se por isso geralmente a

distância euclidiana. Há também outras medidas de distâncias utilizadas que é a métrica de Minkowski.

$$d(\vec{x}, \vec{y}) = \left[\sum_{j=1}^p |x_j - y_j|^r \right]^{\frac{1}{r}} \quad (3.17)$$

onde tem-se que para o $r = 2$ a métrica de Minkowski se reduz a distância euclidiana. Essa métrica é a menos afetada pela presença de *outliers* do que a distância euclidiana.

Agora explanaremos alguns métodos para se construir *clusters*, que são as técnicas aglomerativas mais abordadas em análise multivariada, em que há duas formas o hierárquico que é responsável por identificar agrupamentos e o provável número g de grupos e, ainda, o não hierárquico quando esse g é pré-especificado.

A primeira técnica aglomerativa é a *Single Linkage* que mede a distância entre dois *clusters* A e B definida pela distância mínima entre dois pontos A e B , delineada como:

$$D(A, B) = \min\{d(\vec{y}_i, \vec{y}_j)\} \quad \therefore (\vec{y}_i \rightarrow A ; \vec{y}_j \rightarrow B) \quad (3.18)$$

A distância euclidiana entre os vetores \vec{y}_i e \vec{y}_j é $d(\vec{y}_i, \vec{y}_j)$ que determina o vizinho mais próximo. No método de *Single Linkage* a distância 3.18 é encontrada para cada par de *clusters*, e aqueles com a menor distância são agrupados, reduzindo o número de *clusters* a um.

Outra técnica hierárquica é a *Complete Linkage* definida como a distância máxima entre dois *clusters* distintos em um ponto A e B , determinada a seguir:

$$D(A, B) = \max\{d(\vec{y}_i, \vec{y}_j)\} \quad (3.19)$$

Existe, ainda, o método de *Average Linkage*, no qual a distância entre dois *clusters* A e B é dada pela média das distâncias $n_A n_B$ entre seus respectivos pontos A em n_A e B em n_B , expressa da seguinte forma:

$$D(A, B) = \frac{1}{n_A n_B} \sum_{i=1}^{n_A} \sum_{j=1}^{n_B} d(\vec{y}_i, \vec{y}_j) \quad (3.20)$$

onde essa soma é sobre y_i em A e y_j em B .

O *Centróide* é um método baseado na distância entre dois *clusters* A e B definido pela distância euclidiana dos vetores médios, como é mostrado abaixo:

$$D(A, B) = d(\vec{\bar{y}}_A, \vec{\bar{y}}_B) \quad (3.21)$$

Através da equação 3.21 constata-se que $\vec{\bar{y}}_A$ e $\vec{\bar{y}}_B$ são as médias dos vetores de observação A e B , respectivamente e define-se os vetores médios para $\vec{\bar{y}}_A$ e $\vec{\bar{y}}_B$ como $\vec{\bar{y}}_A = \sum_{i=1}^{n_A} \frac{\vec{y}_i}{n_A}$. Após obter dois agrupamentos A e B , o centróide do novo cluster é dado pela média pon-

derada:

$$\vec{y}_{AB} = \frac{n_A \vec{y}_A + n_B \vec{y}_B}{n_A + n_B} \quad (3.22)$$

Dispõe-se, ainda, do método Median em que tem-se dois *clusters* A e B que são relacionados utilizando o método de centróide, e quando A contiver um maior número de itens que o de B podemos concluir que o novo centróide 3.22 está mais próximo de \vec{y}_A do que de \vec{y}_B , dessa forma, para evitar que ocorra a ponderação dos vetores médios, relacionado ao tamanho do agrupamento, pode-se utilizar o ponto médio na linha que une A e B que é a mediana, apresentada a seguir:

$$\vec{m}_{AB} = \frac{1}{2}(\vec{y}_A + \vec{y}_B) \quad (3.23)$$

Essa 3.23 não é uma mediana no sentido estatístico, mas sim relacionada à mediana de um triângulo que é a linha de um vértice para o ponto médio do lado oposto.

E, por fim, um outro método é o de *Ward*, também conhecido como soma dos quadrados, que utiliza a distância entre os *clusters* e dentro dos *clusters*, em que a soma das distâncias dentro do cluster relacionado aos seus vetores médios é dada por:

$$SSE_A = \sum_{i=1}^{n=A} (\vec{y}_i - \vec{y}_A)' (\vec{y}_i - \vec{y}_A) \quad (3.24)$$

$$SSE_B = \sum_{i=1}^{n=B} (\vec{y}_i - \vec{y}_B)' (\vec{y}_i - \vec{y}_B) \quad (3.25)$$

$$SSE_{AB} = \sum_{i=1}^{n=AB} (\vec{y}_i - \vec{y}_{AB})' (\vec{y}_i - \vec{y}_{AB}) \quad (3.26)$$

Há, ainda, este termo \vec{y}_{AB} que é dado pela equação 3.22, e o método de Ward que une dois *clusters* A e B minimiza o aumento da *SSE* definido como:

$$I_{AB} = SSE_{AB} - (SSE_A + SSE_B) \quad (3.27)$$

Capítulo 4

Metodologia e Procedimento Experimental

4.1 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Avaliação de Projetos e Pesquisa (CAPP) do Hospital Universitário (HU-UFPI) e em seguida submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) de nº 64503316.6.0000.5214 da instituição para a aprovação conforme a resolução 466/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), órgão responsável pelas pesquisas e normas regulamentadoras envolvendo seres humanos.

4.2 População de Estudo

Os pacientes foram submetidos a uma triagem no ambulatório do HU-UFPI, e aqueles que atenderam a todos os critérios de inclusão tornaram-se voluntários da pesquisa.

A relação dos critérios de inclusão são: sexo masculino, ausência de dermatoses (auto informado), faixa etária entre 50 a 60 anos, fototipo II e III, sem histórico de doenças de pele prévia (auto informado), autonomia para comparecer ao local de coleta, assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e preencher um questionário sobre seu modo de vida e exposição solar.

Os critérios de exclusão são: tabagista, diabético, doença do sistema circulatório (auto informado), histórico de irritação ou sensibilidade a produtos cosméticos e luz solar (auto informado) e paciente sob qualquer tipo de tratamento contra o envelhecimento.

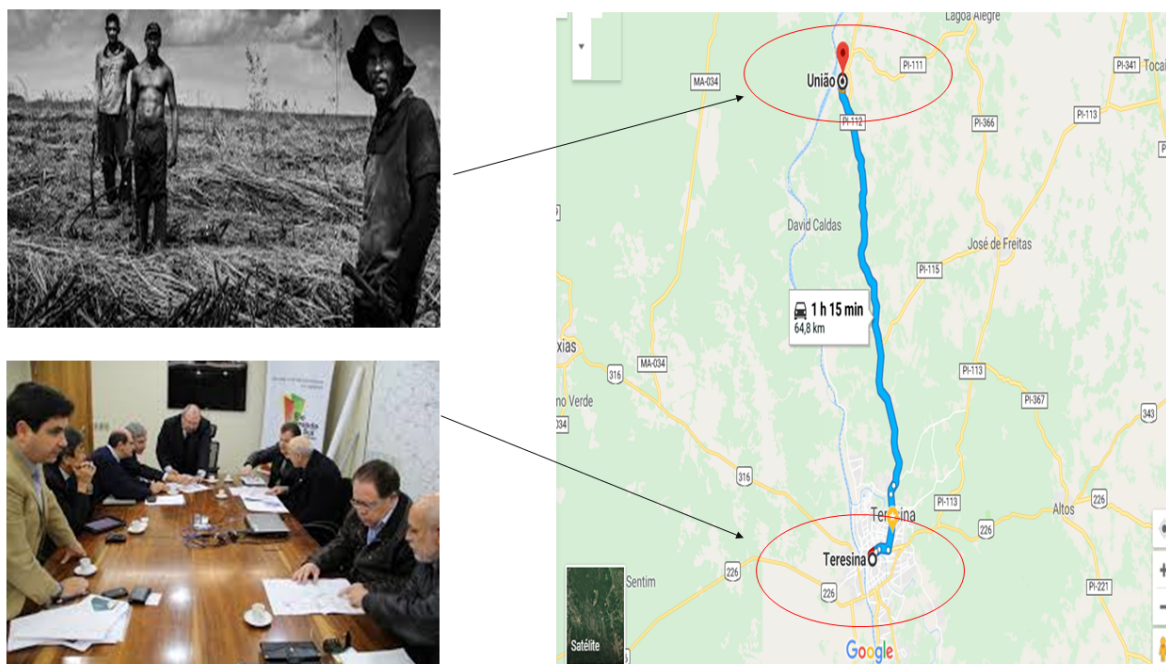
4.3 Preparo dos Voluntários

Para a análise espectral foram utilizados 4 voluntários, em que 2 são do grupo I com exposição solar excessiva e 2 do grupo II com exposição solar reduzida, como mostra na

4.4. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

figura 4.1 a cidade de origem dos voluntários de cada grupo.

Figura 4.1: Região em que foi selecionado os voluntários para a pesquisa.



Fonte: Acervo do autor.

Todos os voluntários foram esclarecidos sobre a pesquisa e cuidados que deviam ter com a pele no decorrer do estudo quando assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Antes do início das análises os pacientes ficaram por 15 minutos em uma sala com a temperatura controlada em ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e uma umidade relativa do ar entre 40% e 50%. Em seguida foi realizado uma assepsia com algodão embebido com álcool etílico 97%, e retirados dois fragmentos de pele de cada voluntário de aproximadamente 2mm uma do dorso da mão e outra da face interna do braço utilizando um *punch*.

O critério usado para a escolha dessas regiões foi que se tenha exposição solar excessiva e exposição solar reduzida, respectivamente. As amostras foram mantidas refrigeradas em torno de -80°C para a manutenção e conservação das propriedades do material a ser estudado. A coleta dos fragmentos foi feita por uma cirurgiã dermatologista Prof.^a Dr. Ana Lúcia França da Costa com registro junto ao seu conselho regulamentador.

4.4 Análise das amostras

Após obter os tecidos biológicos foram feitos dois cortes na mesma pele usando um criostato como mostra na figura 4.2, ambos foram realizados na vertical de forma que contivessem todas as camadas da pele.

4.4. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

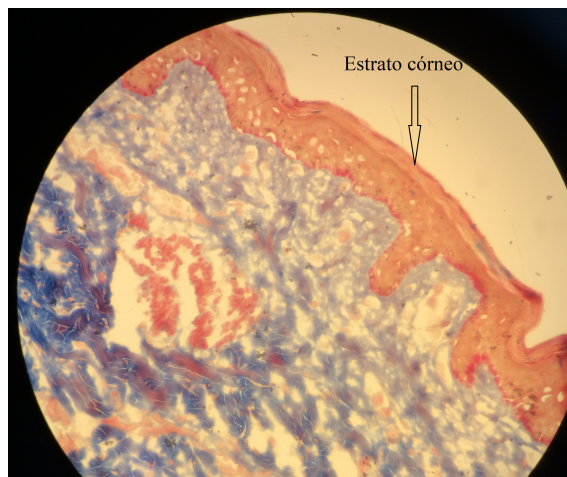
Figura 4.2: Criostato utilizado para corte dos tecidos biológicos.



Fonte: Acervo do autor.

O primeiro corte com $16\mu\text{m}$ foi colocado em uma lâmina de CaF_2 (Fluoreto de Cálcio)¹ para as medidas de Espectroscopia Raman Confocal, e o segundo corte com $5\mu\text{m}$ foi colocado em uma lâmina patológica para fazer a coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E)² como é mostrado na figura 4.3, para poder identificar as camadas do tecido em um

Figura 4.3: Tecido de pele humana colorada com H&E de voluntário com exposição solar excessiva (ESE), em que é destacado a região do estrato córneo.



Fonte: Acervo do autor.

¹Sua utilização no experimento é devido a um pico característico somente em 321 cm^{-1} que não faz parte da região em que medimos que é de $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ e depois foi usado para fazer a medida Raman, coletando apenas picos característicos do tecido.

²Coloração de Hematoxilina-Eosina H&E é a principal técnica de coloração de tecidos em histologia.

4.4. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

microscópio e comparar com a amostra da lâmina de CaF_2 para auxiliar na identificação das suas respectivas camadas na realização do experimento.

As medidas nos tecidos biológicos foram feitas no Laboratório de Pesquisa da DermoProbes Ltda-Me em São José dos Campos-São Paulo, utilizando um sistema Raman confocal da *Rivers Diagnostics (Model 3510 Skin Composition Analyzer)*.

As figuras 4.4 e 4.5 apresentam o sistema Raman dispersivo confocal com laser de excitação de $\lambda=785$ nm e uma objetiva de 40x invertida, localizada sob uma janela de quartzo, onde o sinal Raman foi coletado por uma câmara CCD e registrado por um computador acoplado ao sistema. A potência de chegada nas amostras foram de 22mW, com 12 acumulações de 5 segundos em cada ponto feito, resolução espectral de 4 cm^{-1} e de um ponto a outro utilizando um passo manual com 15 a 17 espectros em média por cada amostra.

Figura 4.4: Equipamento Raman confocal utilizado.

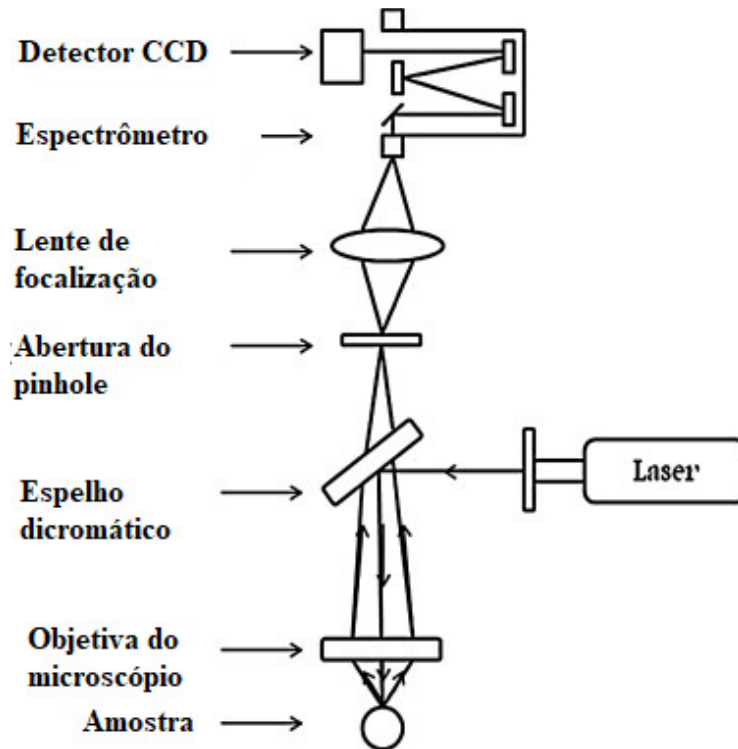


Fonte: Acervo do autor.

As análises de dados realizadas nas amostras foram a linha de base dos espectros utilizando uma função polinomial de 7º grau através do *software LabSpec (Horiba Jobin Yvon)* e normalização vetorial de cada espectro entre $400-1800 \text{ cm}^{-1}$. Foi feita uma análise de agrupamento hierárquico para poder identificar os espectros de cada camada

Por meio desta técnica, podemos diferenciar partes basófilas (pela hematoxilina) e acidófilas, ou eosinófilas (pela eosina). A hematoxilina tem atração por substâncias ácidas (basófilas) dos tecidos, como os núcleos e o retículo endoplasmático rugoso e ácidos nucleicos. Já a eosina, sendo ácida, cora predominantemente o citoplasma, as fibras de colágeno e outras estruturas compostas por substâncias com caráter básico (acidófilas).

Figura 4.5: Representação do caminho óptico do laser do equipamento.



Fonte: Adaptado da referência [26].

da pele através de uma análise de similaridade, em que foram divididos os espectros em três grupos e representados através de um dendograma.

Com todos os espectros divididos em grupos e normalizados vetorialmente foi calculado a variância, e através destes valores foi feito a PCA (usando *software* Minitab 17) usando seis componentes, que através delas foram calculados a matrizes plot e scatterplot com as duas principais componentes, destas duas componentes utilizou-se a que melhor diferenciou os dois grupos para poder plotar o gráfico de *loading plot*, usando *software* OriginPro 8.

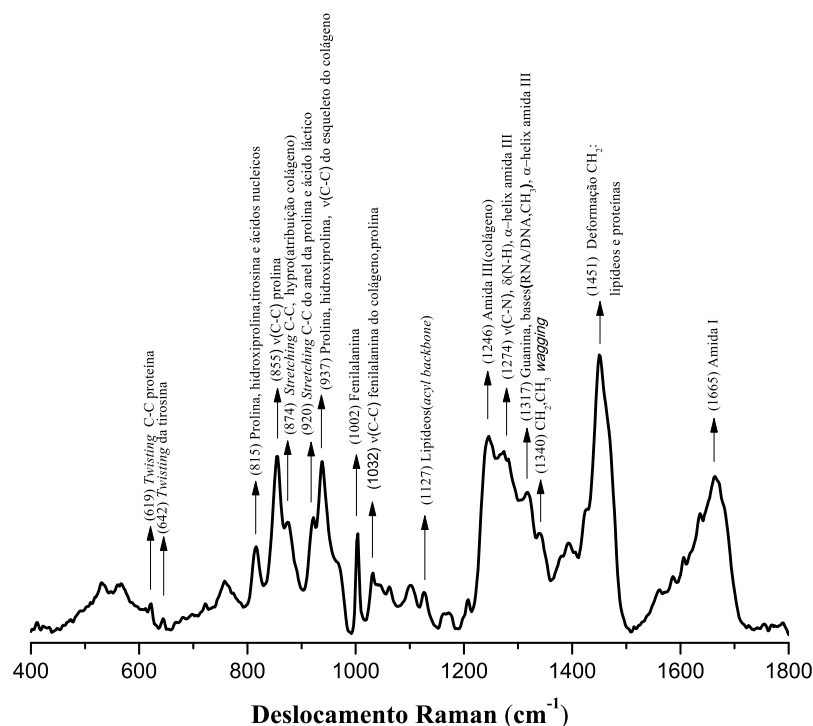
Capítulo 5

Resultados e Discussões

Neste capítulo serão mostrados os resultados obtidos e suas respectivas discussões. Inicialmente são apresentadas as medidas Raman nos tecidos biológicos *ex vivo* do grupo I com exposição solar excessiva (ESE) com quatro amostras e do grupo II com exposição solar reduzida (ESR) também com quatro amostras.

Em seguida, realizou-se a análise multivariada para discriminação entre os grupos. A figura abaixo apresenta o espectro Raman de um tecido de pele com os principais constituintes que são Raman ativos.

Figura 5.1: Espectro Raman característico da pele humana da face interna do braço com seus respectivos constituintes bioquímicos que são Raman ativo.



Fonte: Adaptado da referência [50, 51, 52].

5.1. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA

Tabela 5.1: Principais picos dos constituintes bioquímicos que são Raman ativo. Com intervalo de confiança de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$.

Posição (cm^{-1})	Estrutura	Atribuição
618	Torção(C-C)	Proteínas
643	Torção(C-C)	Tirosina
815	ν (C-C)	Colágeno
855	ν (C-C)	Prolina e tirosina
874	ν (C-C)	Colágeno
920	ν (C-C) anel	Prolina, glicose e ácido láctico
937	ν (C-C) esqueleto do colágeno	Prolina e hidroxiprolina
1002	ν (C-C) anel aromático	Fenilalanina
1032	δ (CH ₂)(CH ₃); ν (C-C) esqueleto	Fosfolipídeos e colágeno;fenilalanina
1127	ν (C-C) esqueleto	Lipídeos
1246	Oscilação(CH ₂); ν (C-N)	Amida III do colágeno
1274	ν (C-N); δ (N-H)	Amida III α -helix
1317	Guanina bases(RNA/DNA,CH ₃)	Amida III α -helix
1340	Oscilação δ (CH ₂)(CH ₃)	Colágeno
1451	δ (CH ₂)	Lipídeos e proteína
1665	ν_s (C=O)	Amida I(colágeno)

Fonte: Adaptado da referência [50, 51, 52, 53].

5.1 Comparação do grupo com ESE e ESR da região cronoenvelhecida

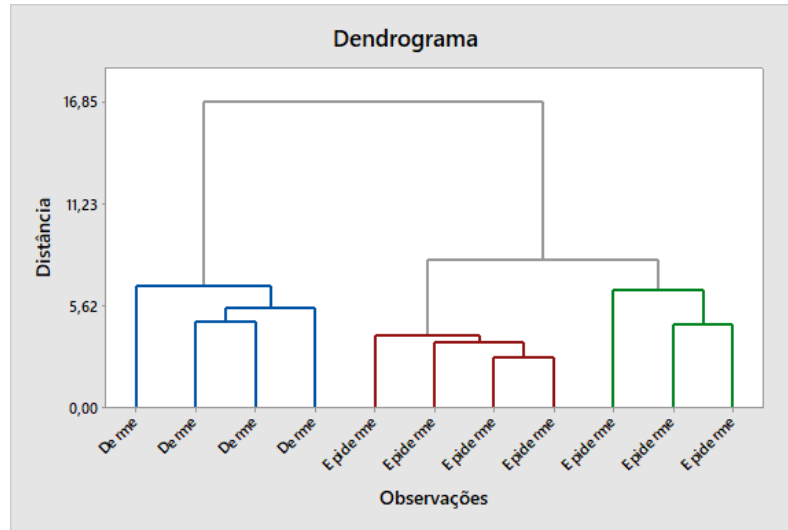
Primeiramente realizou-se o pré-processamento dos espectros de cada amostra (subtração da linha de base e normalização vetorial). Posteriormente a análise de HCA como é mostrado na figura (5.2,5.3,5.4,5.5) foi feita a fim de discriminar os espectros correspondentes de cada camada da pele. Foi realizada também uma análise estatística não supervisionada para diferenciar as amostras através da PCA, em que comparou-se o grupo com ESE *versus* ESR (face interna do braço).

Por componentes principais foi feito uma *matriz plot* como é mostrada na figura 5.6, que expõe um diagrama de dispersão para cada combinação de variáveis. Na PCA foram considerados valores de $p \leq 0,05$ em que as PCs com maior relevância foram PC₃ e PC₁ gerando um gráfico *scatterplot* das duas como é dado na figura 5.9(a), e a partir deste resultado elaborou-se o gráfico de *loading plot* usando a principal PC para ter uma discriminação entre as amostras.

Nota-se que através da *matriz plot* figura 5.6 e da tabela 5.2 que a primeira componente principal tem variância de 0,59708 (igual ao maior autovalor) e representa 0,474 (47,4%) da variação total dos dados, a segunda componente principal apresenta variância de 0,39514 e representa 0,314 (31,4%) da variação dos dados, da mesma forma, a terceira componente

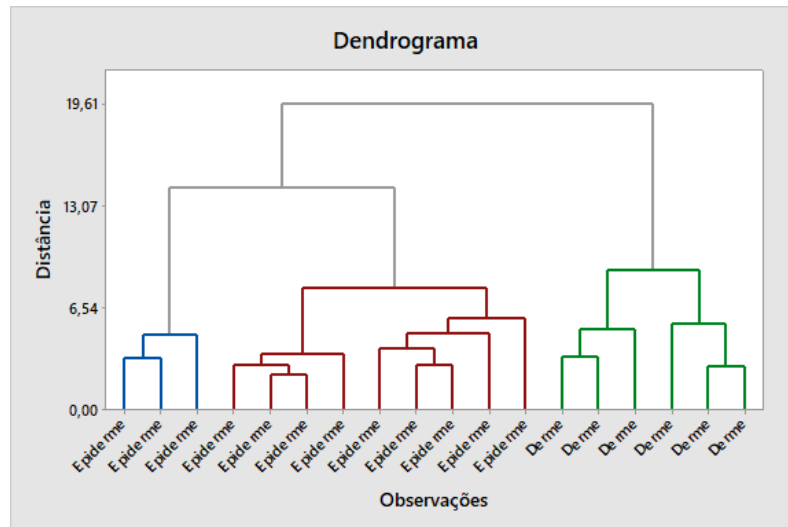
5.1. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA

Figura 5.2: Dendrograma do voluntário 1 com ESE da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 5.3: Dendrograma do voluntário 2 com ESE da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



Fonte: Acervo do autor.

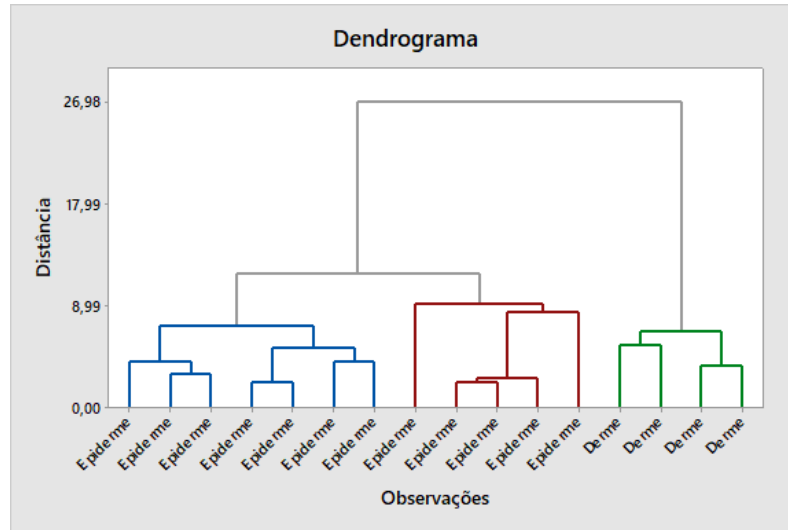
principal apresenta uma variância de 0,09526 e representa 0,076 (7,6%) da variação total dos dados. Então, observou-se na tabela 5.2 que as três primeiras componentes explicam adequadamente a variação nos dados com 86,3%.

Na figura 5.7 são expostos os resultados dos espectros da derme, onde as maiores alterações são observadas nas regiões dos números de onda entre $800-1000\text{ cm}^{-1}$, $1000-1200\text{ cm}^{-1}$, $1200-1400\text{ cm}^{-1}$ e $1600-1800\text{ cm}^{-1}$.

Na primeira região entre $800-1000\text{ cm}^{-1}$, observou-se intensidade maior na banda de

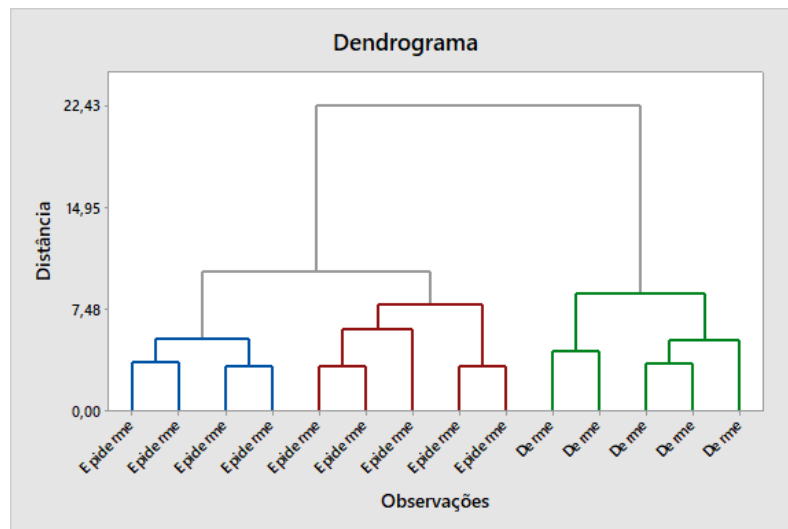
5.1. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA

Figura 5.4: Dendrograma do voluntário 1 com ESR da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 5.5: Dendrograma do voluntário 2 com ESR da face interna do braço com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



Fonte: Acervo do autor.

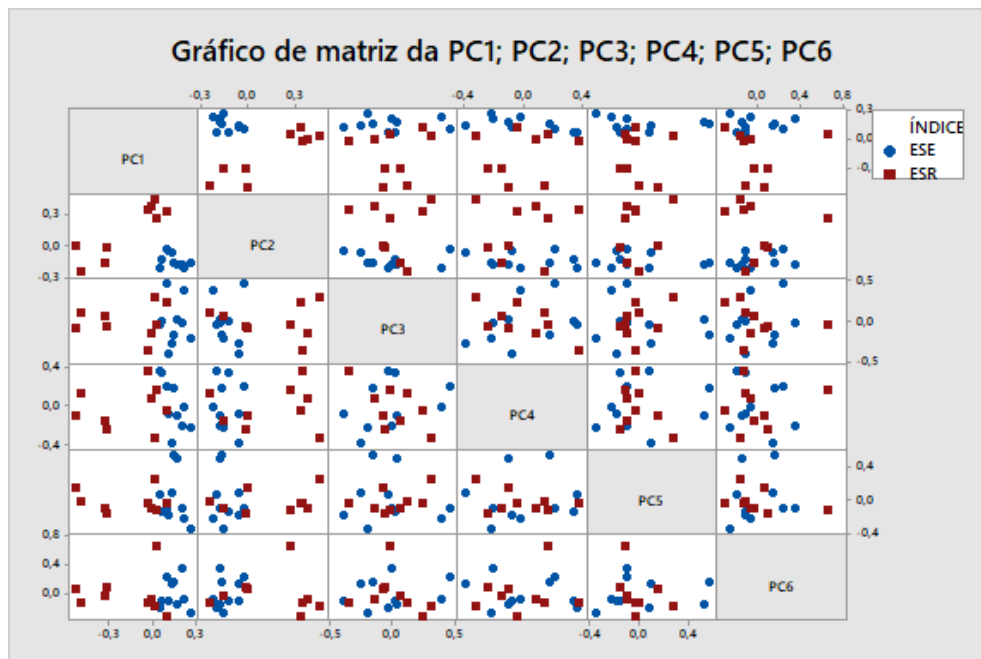
815 cm^{-1} dos voluntários com ESR devido à atribuição do $\nu(\text{C-C})$ do colágeno como é mostrado na figura 5.8.

Em 874 cm^{-1} observa-se que o grupo com ESR tem banda com maior intensidade que é característica de fosfolípidos e colágenos, já na banda de 920 cm^{-1} observa-se a que o grupo com ESE possui uma banda mais intensa que é a região de colágeno atribuída ao $\nu(\text{C-C})$ da prolina e hidroxiprolina.

Outra região em que apresentou-se alterações espectrais foi entre $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, onde

5.1. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA

Figura 5.6: Matriz plot de todas as amostras da face interna do braço normalizadas vetorialmente tanto do grupo de ESE e ESR.



Fonte: Acervo do autor.

Tabela 5.2: Autovalores do PCA de comparação entre os tecidos da face interna do braço dos voluntários com ESE *versus* ESR.

PCs	autovalores	proporção	acumulativo
PC ₁	0,59708	47,4	47,4
PC ₂	0,39514	31,4	78,7
PC ₃	0,09526	7,6	86,3
PC ₄	0,05079	4,0	90,3
PC ₅	0,04331	3,4	93,8
PC ₆	0,02344	1,9	95,6

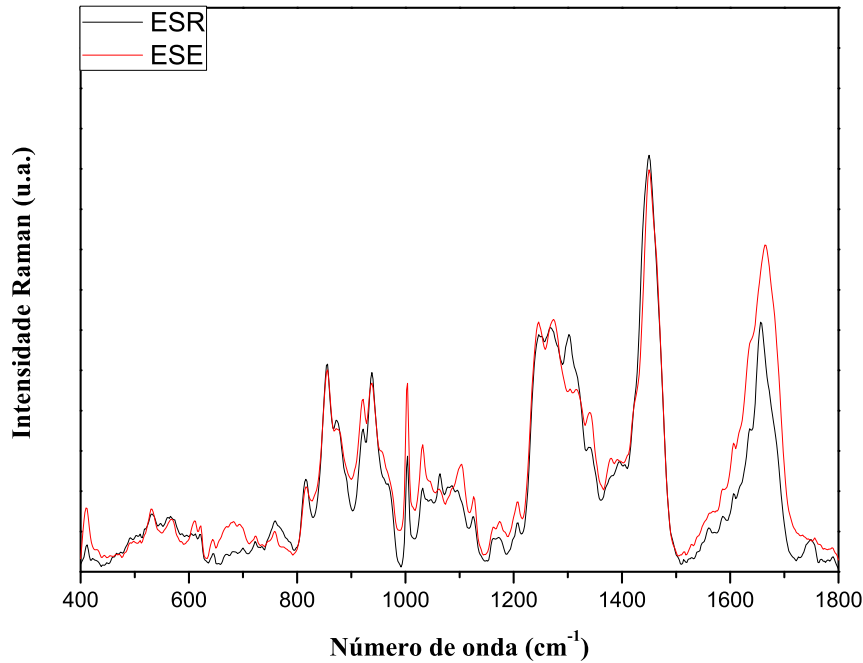
Fonte: Acervo do autor.

em 1032 cm^{-1} referente ao grupo de ESE com bandas intensas de prolina e fenilalanina do colágeno, e 1103 cm^{-1} são observadas bandas com maior intensidade de proteína no grupo com ESE. Na região de amida III entre $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ observa-se que os voluntários do grupo com ESR apresentaram bandas mais intensas de amida III (colágeno) em 1268 cm^{-1} e bandas mais intensas referente a $\delta(\text{CH}_2)$ de lipídeos e proteínas. E na região de amida I ocorreu um deslocamento para altas frequências situado em 1665 cm^{-1} dos voluntários com ESE.

Na figura 5.9 são expostos a diferenciação dos grupos com ESE *versus* ESR da face interna do braço, que apresentam o *loading plot* referente a PC₁ com a finalidade de verificar as áreas mais específicas que contribuíram para uma melhor separação e discriminação

5.1. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA

Figura 5.7: Média dos espectros de amostras da face interna do braço dos voluntários com ESE e ESR todos normalizados vetorialmente entre 400-1800 cm^{-1} .



Fonte: Acervo do autor.

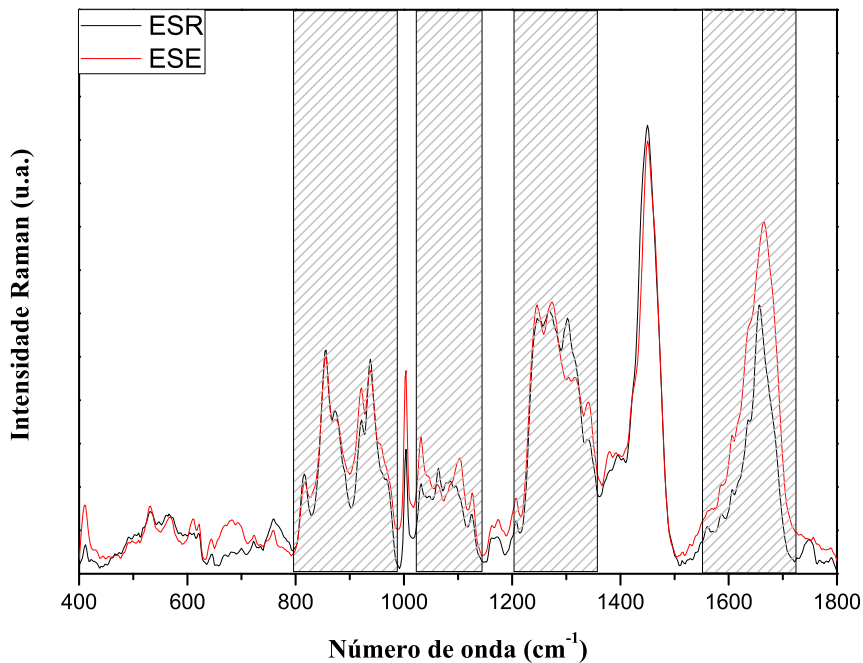
das amostras. No eixo y positivo do gráfico de *loading plot* temos os picos em (853, 920, 1002, 1032, 1241, 1440, 1637 e 1672 cm^{-1}) que são característicos dos voluntários com ESE.

Os picos situados no eixo y negativo são (770, 1080, 1302, 1437 e 1654 cm^{-1}), que como é representado pelo *scatterplot* na figura 5.9(a) são picos característicos dos voluntários com ESR. As respectivas atribuições de cada pico são apresentadas na tabela 5.1.

Através dos resultados obtidos na análise de *loading plot*, conclui-se que os voluntários com ESE tem uma maior quantidade de colágeno, prolina, hidroxiprolina e amida I, isso porque eles apesar de serem mais irradiados no dorso da mão, na face interna do braço a radiação que eles recebem está fora do visível, que é a infravermelho, onde dependendo da dosagem ela pode ser benéfica ou maléfica, e a radiação que os voluntários com ESE estão recebendo está fora do limiar maléfico, funcionando assim, como benéfico para a pele fazendo com que haja uma modulação na síntese de fibroblasto que aumenta a quantidade de colágeno.

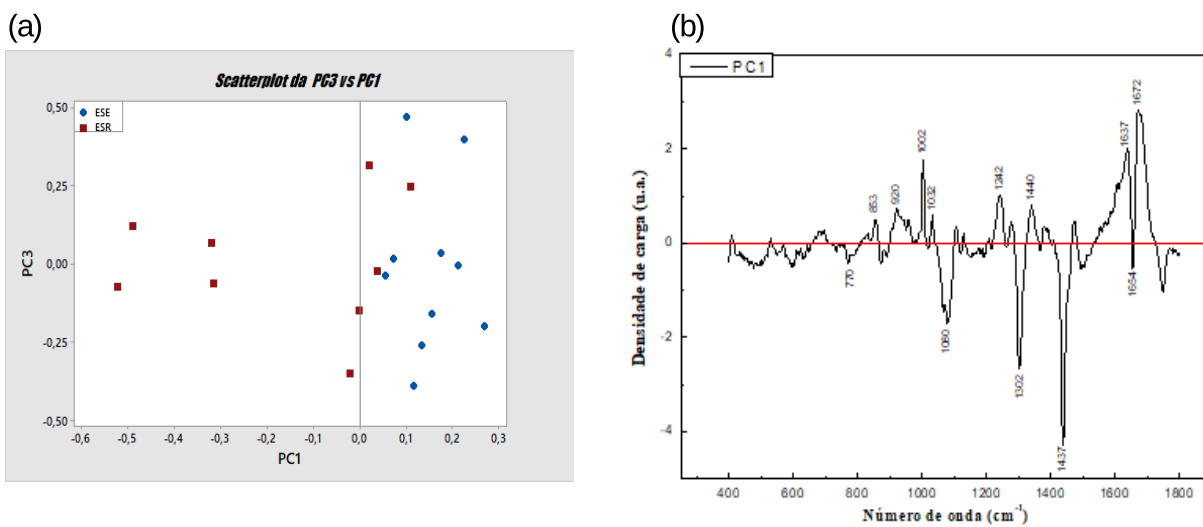
5.1. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA

Figura 5.8: Média dos espectros de amostras da face interna do braço com com maiores mudanças espectrais do grupo I e grupo II.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 5.9: (a) *Scatterplot* de amostras da face interna do braço de voluntários com ESE e ESR. (b) *Loading plot* de amostras da face interna do braço dos voluntários com ESE e ESR, normalizado vetorialmente entre 400-1800 cm⁻¹.

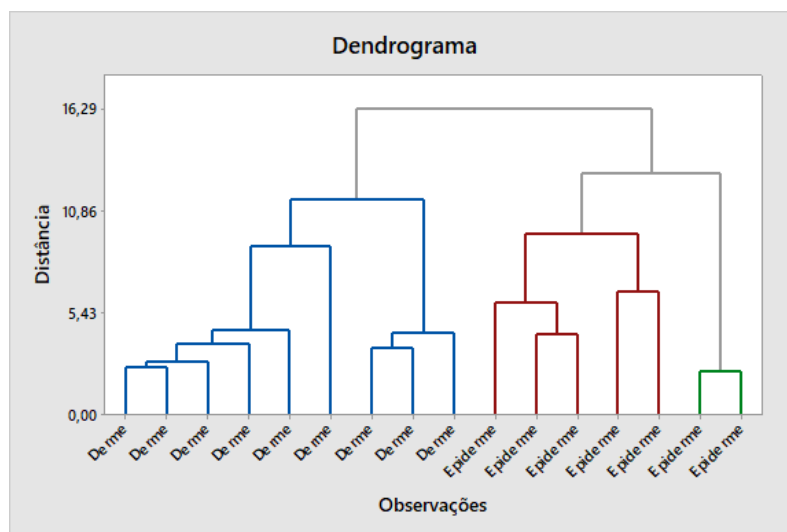


Fonte: Acervo do autor.

5.2 Comparação do grupo com ESE e ESR da região fotoenvelhecida

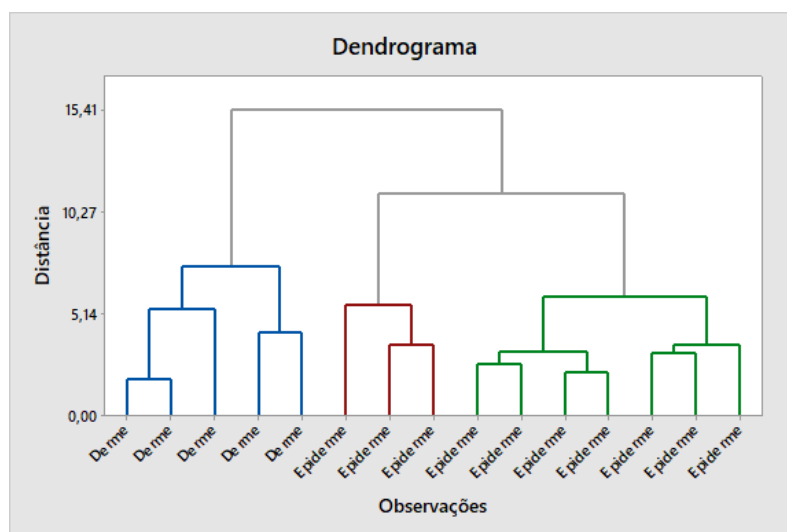
Foi realizado o pré-processamento dos espectros de cada amostra (subtração de linha de base e normalização vetorial). Posteriormente realizou-se a HCA a fim de diferenciar os espectros correspondentes a cada camada da pele, como é mostrado nas figuras (5.10,5.11,5.12,5.13).

Figura 5.10: Dendrograma do voluntário 1 com ESE do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



Fonte: Acervo do autor.

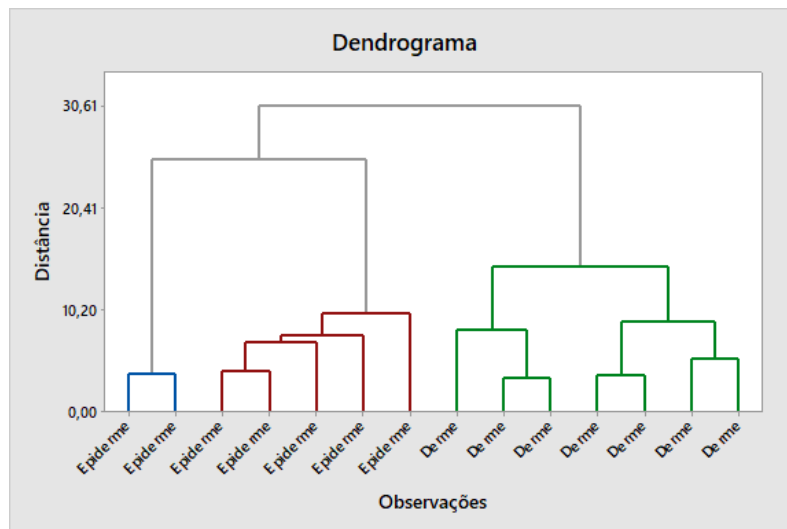
Figura 5.11: Dendrograma do voluntário 2 com ESE do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



Fonte: Acervo do autor.

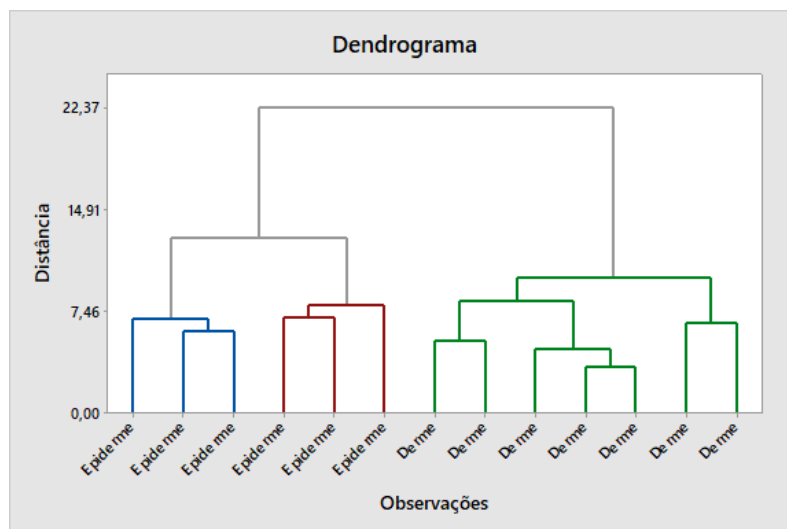
5.2. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO FOTOENVELHECIDA

Figura 5.12: Dendrograma do voluntário 1 com ESR do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 5.13: Dendrograma do voluntário 2 com ESR do dorso da mão com todos os espectros feitos linha de base e normalizado vetorialmente.



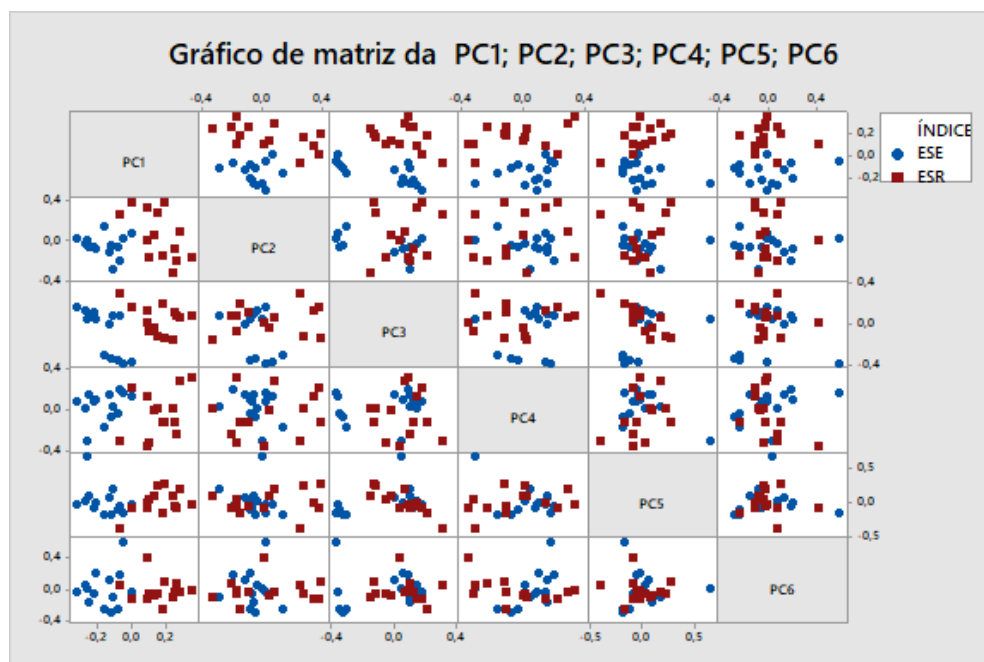
Fonte: Acervo do autor.

Após a realização do dendrograma, foram selecionados os espectros referentes à derme para cada grupo. Estes espectros foram utilizados para o cálculo de PCA como mostrado na figura 5.9, usando seis componentes que forneceram uma acumulativa de 94,5% dos resultados segundo a tabela 5.3, e através das mesmas calculou-se a *matriz plot* que permite avaliar a relação entre pares de variáveis ao mesmo tempo.

Nota-se que através da *matriz plot* figura 5.14 e da tabela 5.3 que a primeira componente principal tem variância de 0,78382 (igual ao maior autovalor) e representa 0,414

5.2. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO FOTOENVELHECIDA

Figura 5.14: Matriz plot de todas as amostras do dorso da mão normalizadas vetorialmente tanto do grupo de ESE e ESR .



Fonte: Acervo do autor.

(41,4%) da variação total dos dados, a segunda componente principal apresenta variância de 0,46475 e representa 0,245 (24,5%) da variação dos dados, da mesma forma, a terceira componente principal apresenta uma variância de 0,32794 e representa 0,173 (17,3%) da variação total dos dados. Então, observou-se na tabela 5.3 que as três primeiras componentes explicam adequadamente a variação nos dados com 83,2%. Através da figura 5.15 e 5.16 pode-se observar quais regiões estão tendo as maiores mudanças espectrais.

Tabela 5.3: Autovalores do PCA de comparação entre os tecidos dorso da mão dos voluntários com ESE versus ESR.

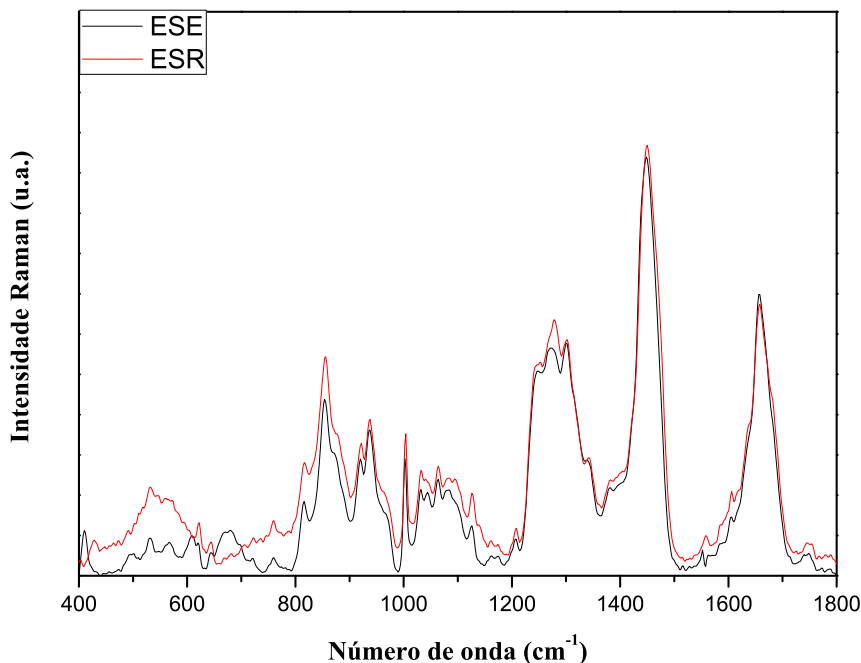
PCs	autovalores	proporção	acumulativo
PC ₁	0,78382	41,4	41,4
PC ₂	0,46475	24,5	65,9
PC ₃	0,32794	17,3	83,2
PC ₄	0,11370	6,0	89,3
PC ₅	0,06619	3,5	92,7
PC ₆	0,03377	1,8	94,5

Fonte:Acervo do autor.

Na região de 855 cm^{-1} atribuída a prolina e tirosina as bandas apresentaram maior intensidade assim como em 1002 cm^{-1} na região da fenilalanina relativo aos voluntários do grupo com ESR. E em 1127 cm^{-1} na banda relativa a lipídeos o grupo com ESR apresentou maior intensidade, já na banda de 1278 cm^{-1} onde é referente a proteínas

5.2. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO FOTOENVELHECIDA

Figura 5.15: Média dos espectros normalizados vetorialmente das amostras do dorso da mão de voluntários com ESE e ESR.



Fonte: Acervo do autor.

o grupo com ESE apresentou mudanças no pico e em 1655 cm^{-1} na região de amida I os voluntários com ESE. Na região de $800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ a figura 5.15 mostra a média dos espectros da derme do dorso da mão de quatro voluntários diferentes, em que foi observado mudanças espectrais relacionadas aos constituintes bioquímicos da pele humana.

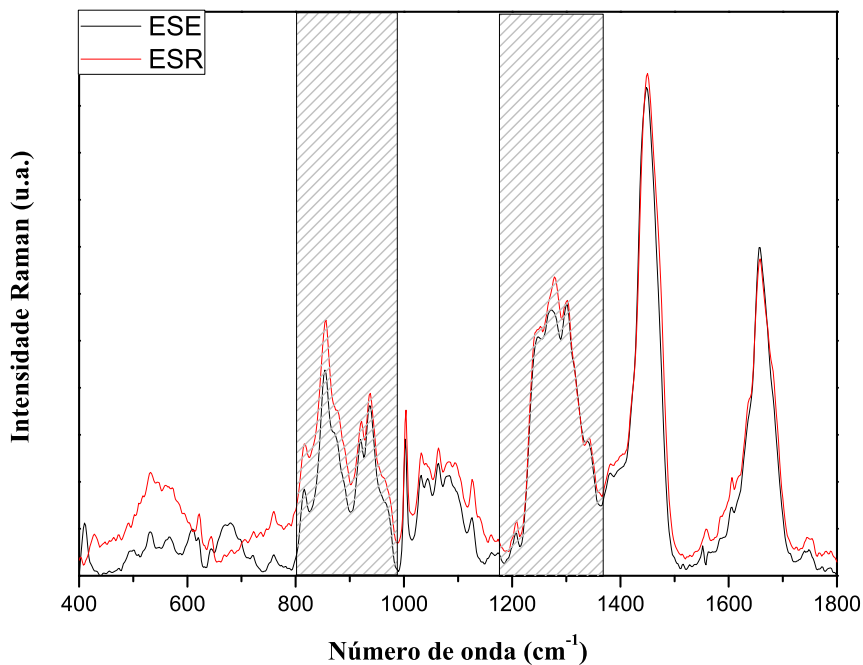
As regiões onde teve as maiores alterações bioquímicas foi de $800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, com pico situado em 815 cm^{-1} referente à prolina e hidroxiprolina que apresenta maior intensidade nos voluntários com ESR, e em 874 e 920 cm^{-1} com mudanças na região do colágeno dos voluntários com ESE. E na região de 1100 cm^{-1} a banda de lipídeo se apresenta em menor intensidade nos voluntários com ESE.

Na região de $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ observou-se mudanças na amida III do colágeno no voluntário do grupo com ESE em 1245 cm^{-1} e intensidade pequenas na banda de CH_2 e CH_3 . Como é mostrado na figura 5.16 na região de 1451 cm^{-1} as bandas dos espectros dos voluntários do grupo com ESE desloca-se para baixas frequências. Na região de amida I do colágeno observou-se mudanças das bandas dos voluntários do grupo I com ESE para baixas frequências.

Na figura 5.17 é exposto o gráfico de *loading plot* do grupo I *versus* grupo II da região do dorso da mão, que apresentam o loading plot referente a PC_1 com a finalidade de verificar as áreas mais específicas que contribuem para uma melhor separação e discriminação das

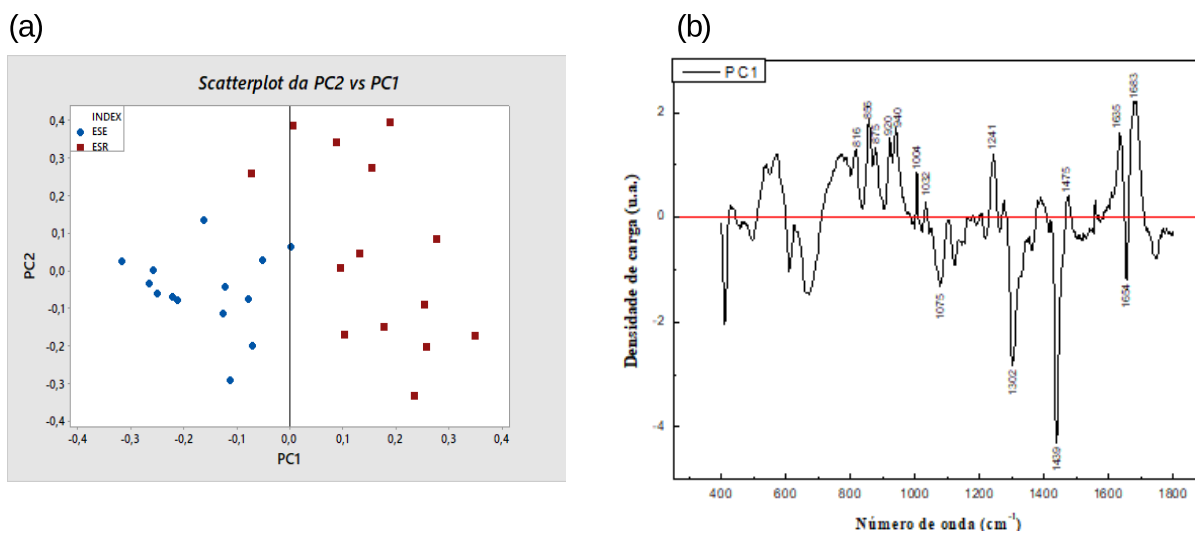
5.2. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO FOTOENVELHECIDA

Figura 5.16: Média dos espectros do dorso da mão com maiores mudanças espectrais do grupo I e grupo II.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 5.17: (a) *Scatterplot* de amostras do dorso da mão de voluntários com ESE e ESR. (b) *Loading plot* de amostras do dorso da mão dos voluntários com ESE e PES, normalizado vetorialmente entre 400-1800 cm⁻¹.



Fonte: Acervo do autor.

5.3. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA E FOTOENVELHECIDA

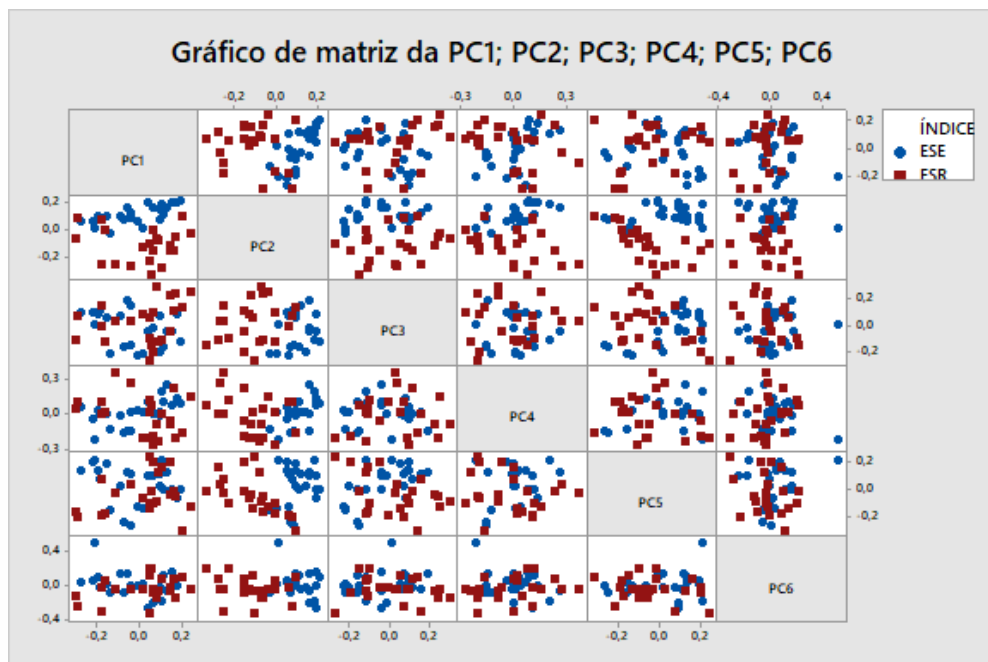
amostras. No eixo y positivo do gráfico de *loading plot* temos os seguintes picos (853, 920, 1002, 1032, 1241, 1440, 1637 e 1672 cm^{-1}) que de acordo com o gráfico de *scatterplot* figura 5.17 são característico de voluntários com ESE. E os picos situados no eixo y negativo são (770, 1080, 1302, 1437 e 1654 cm^{-1}), que como é representado no gráfico de *scatterplot* são picos característicos de voluntários com ESR.

Os resultados na análise de *loading plot* mostram que os voluntários com ESR apresentam maior quantidade de colágeno, prolina, hidroxiprolina, tirosina e amida I, enquanto os voluntários com ESE tem em menor quantidade esses componentes bioquímicos em relação aos outros voluntários, o que está de acordo com a literatura.

5.3 Comparação do grupo com ESE e ESR da região cronoenvelhecida e fotoenvelhecida

Nesta seção, realizou-se o *loading plot* para diferenciar os dois grupos, com ESE *versus* ESR possuindo em cada grupo as amostras tanto da região do dorso da mão como da face interna do braço. Na figura 5.18 a *matriz plot* de todas as componentes é apresentada através de um conjunto de variáveis individuais que representa um *scatterplot*, permitindo obter as PCs que fornece o melhor resultado como é mostrado na tabela 5.4, em que utiliza-se as PC_1 e PC_2 para conseguir o *scatterplot*, e a partir da componente que fornecer a maior discriminação no *scatterplot* à utilizamos para obter o *loading plot*.

Figura 5.18: *Matriz plot* de todas as amostras da face interna do braço e do dorso da mão normalizadas vetorialmente tanto do grupo de ESE e ESR.



Fonte: Acervo do autor.

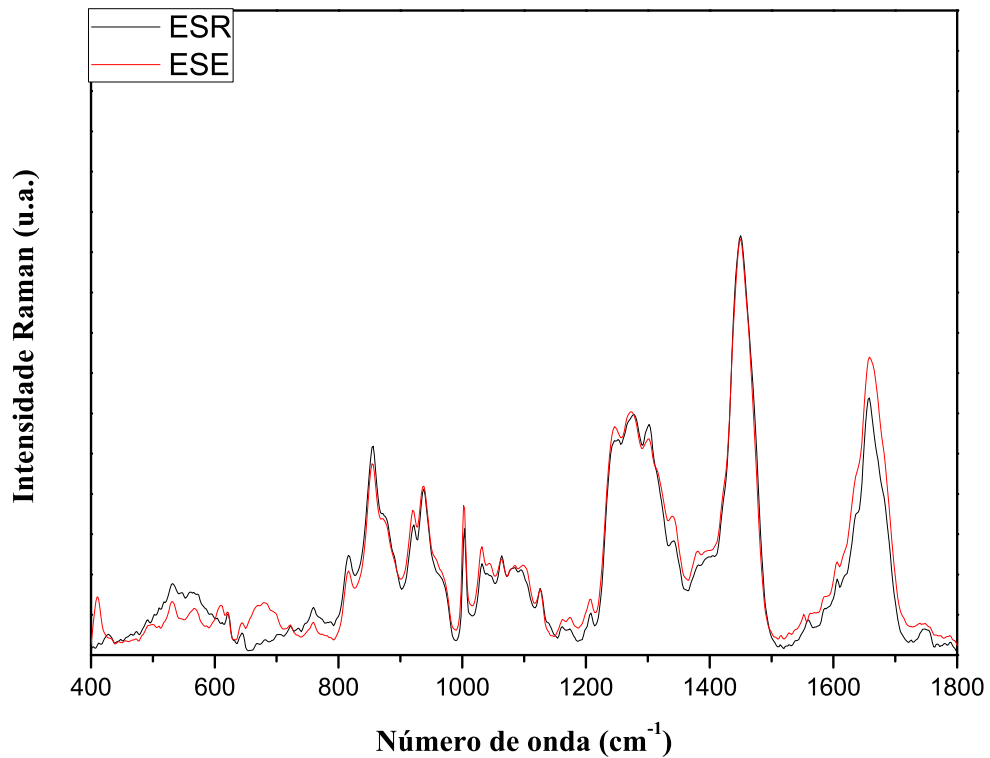
5.3. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA E FOTOENVELHECIDA

Tabela 5.4: Autovalores do PCA de comparação entre os tecidos dorso da mão e face interna do braço dos voluntários com ESE *versus* ESR.

PCs	autovalores	proporção	acumulativo
PC ₁	1,2662	37,0	37,0
PC ₂	0,8404	24,6	61,6
PC ₃	0,5278	15,4	77,1
PC ₄	0,2534	7,4	84,5
PC ₅	0,1469	4,3	88,8
PC ₆	0,0862	2,5	91,3

Fonte:Acervo do autor.

Figura 5.19: Espectro Raman médio do grupo I e grupo II.



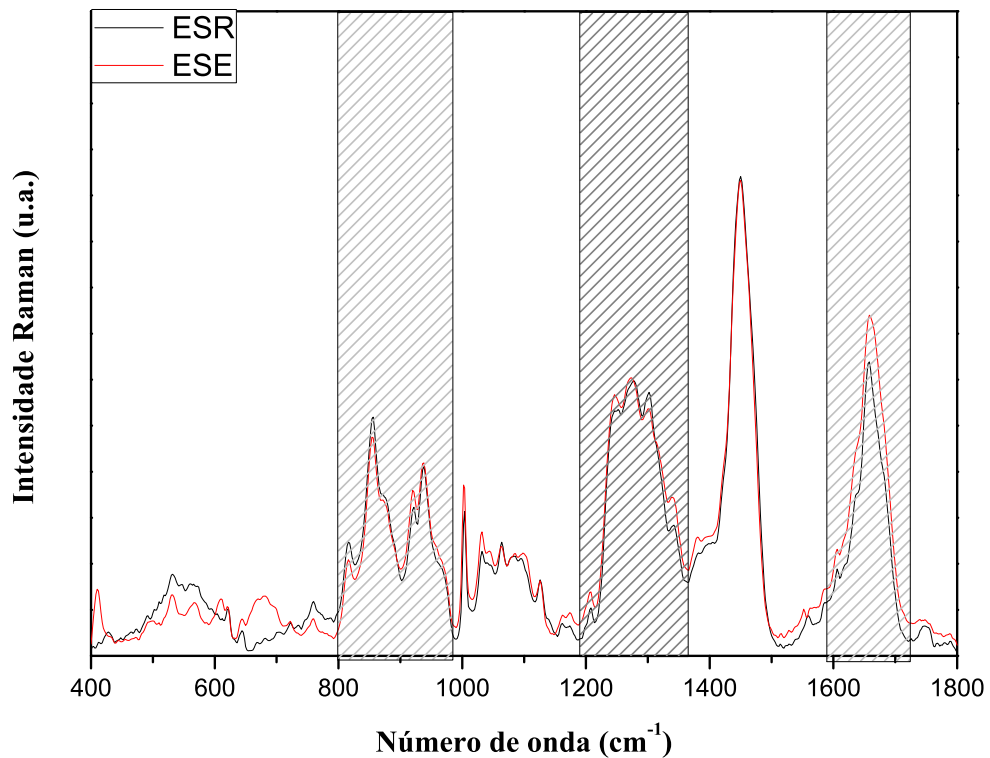
Fonte: Acervo do autor.

Como é mostrado na figura 5.19 tem-se a média dos espectros do grupo I (ESE) e grupo II (ESR), que foi observado três regiões com maiores mudanças como é mostrado na figura 5.20. Na região do $\nu(\text{C-C})$ da prolina e tirosina em 815cm^{-1} o grupo com ESR apresenta maior intensidade assim como na banda de 855cm^{-1} referente ao colágeno atribuído a prolina e tirosina, e em 940cm^{-1} atribuída ao colágeno do tipo I.

5.3. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA E FOTOENVELHECIDA

E os voluntários do grupo com ESE apresentam bandas em 1030 cm^{-1} e 1124 cm^{-1} que são respectivamente referente a $\nu(\text{C-C})$ da prolina e fenilalanina do colágeno e lipídeos. Na região de $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ os voluntários do grupo I apresentam mudanças nas bandas de 1245 e 1300 cm^{-1} que são respectivamente atribuídas a amida III e aos lipídeos. Já na região de amida I é apresentado uma maior intensidade dos picos relativos ao grupo I.

Figura 5.20: Média dos espectros com maiores mudanças espectrais do grupo I e grupo II.



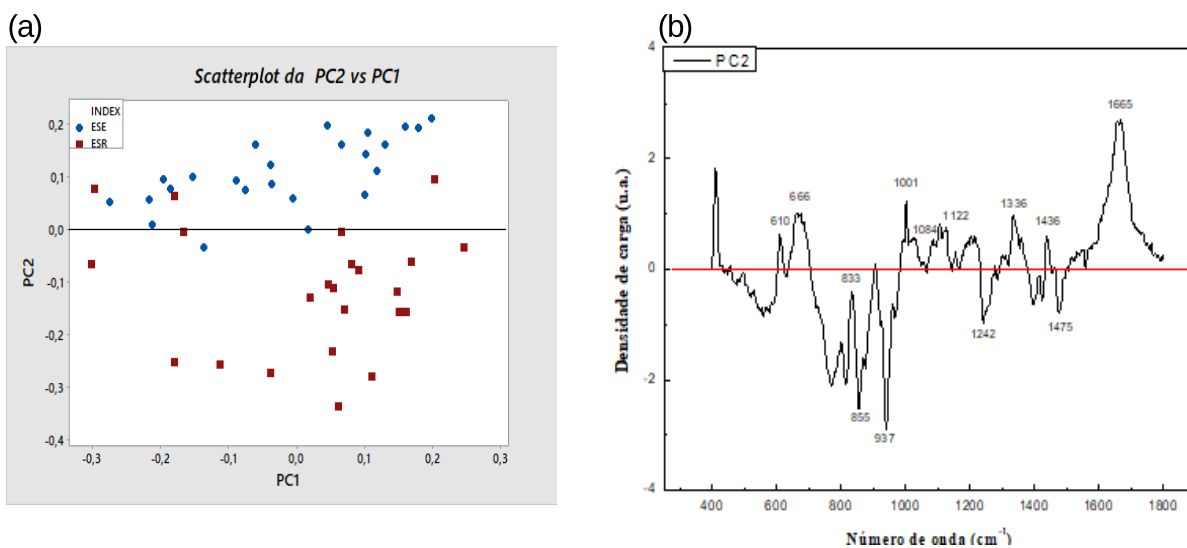
Fonte: Acervo do autor.

Na análise de *loading plot* como é mostrada na figura 5.21(b) pode-se observar que as amostras com ESE estão do lado positivo no gráfico de *scatterplot* e são correlacionadas com os picos que estão do lado positivo no gráfico de *loading plot*. Apresentando bandas como a do colesterol em 610 cm^{-1} , banda em 666 cm^{-1} característico dos modos de respiração do anel nas bases de DNA, picos na região de lipídeos e proteínas atribuída ao estiramento C-C em 1122 cm^{-1} e na região de amida I.

Na parte do negativa do *scatterplot* tem-se os picos correspondentes da parte negativa do *loading plot*, que apresenta bandas característica $\nu(\text{C-C})$ da prolina em 855 cm^{-1} , colágeno em 937 cm^{-1} atribuída ao esqueleto alifático da prolina e hidroxiprolina e na região de amida III do colágeno, mostrando que são característicos dos voluntários com ESR.

5.3. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA E FOTOENVELHECIDA

Figura 5.21: (a) *Scatterplot* de amostras do dorso da mão e da face interna do braço de voluntários com ESE e ESR. (b) *Loading plot* de amostras do dorso da mão dos voluntários com ESE e ESR, normalizado vetorialmente entre 400-1800 cm^{-1} .



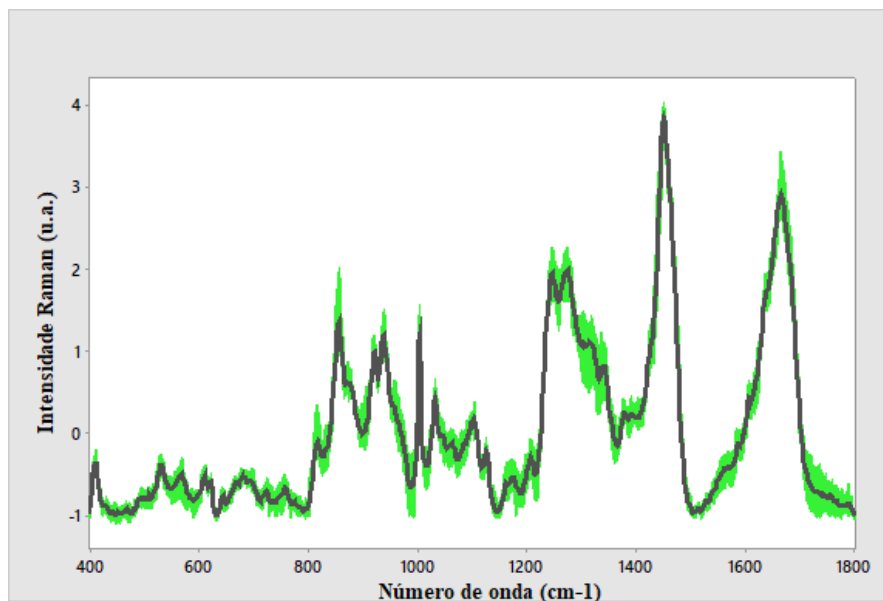
Fonte: Acervo do autor.

Através da figura (5.22,5.23,5.24,5.25) pode-se observar o desvio padrão entre as amostras de cada grupo, e que ao compararmos com a média dos espectros as regiões onde teve as maiores mudanças espectrais apresentam um maior desvio padrão. Na figura 5.7 as regiões onde são apresentadas as maiores alterações entre a média dos dois espectros é entre 800-1000 cm^{-1} , 1000-1150 cm^{-1} , 1200-1400 cm^{-1} e na região de amida I, que comparado com a figura (5.22,5.24) observa-se que o desvio padrão (borda verde) é maior nestas regiões.

E análogo ao que foi apontado anteriormente, na figura 5.15 os espectros das duas amostras apresentam maiores mudanças espectrais nas regiões de 800-1000 cm^{-1} , 1000-1150 cm^{-1} , 1200-1400 cm^{-1} e na região de amida I, como pode-se observar na figura (5.23,5.25).

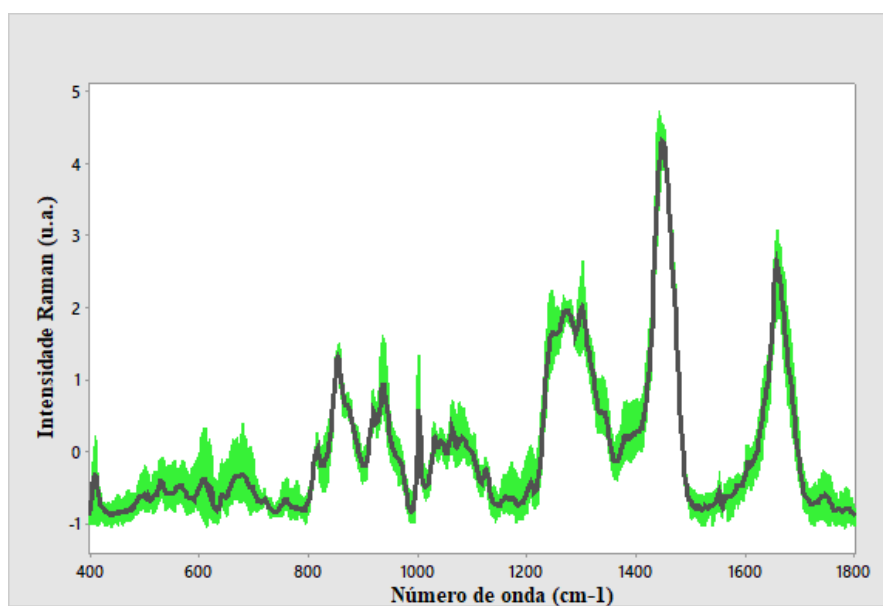
5.3. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA E FOTOENVELHECIDA

Figura 5.22: Média e desvio padrão da amostra com ESR da face interna do braço grupo 1.



Fonte: Acervo do autor.

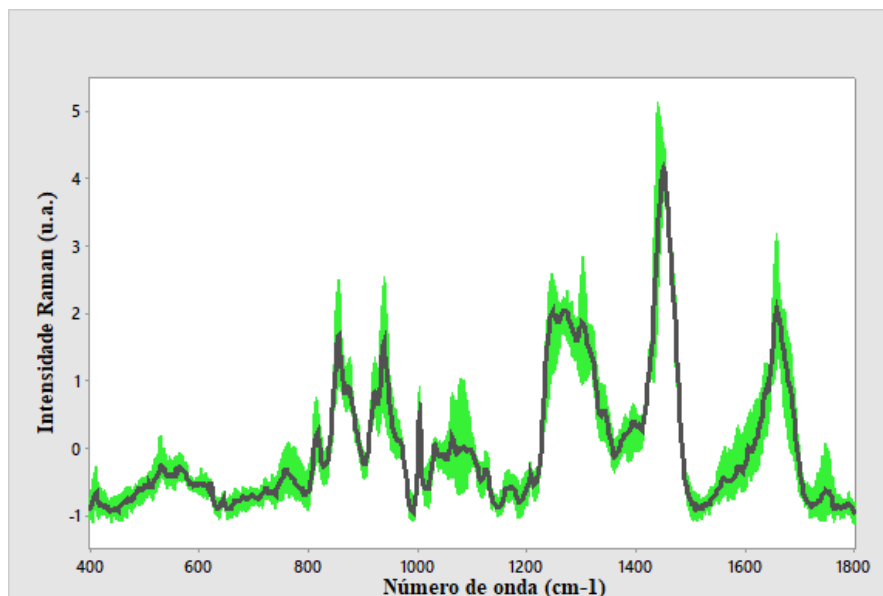
Figura 5.23: Média e desvio padrão da amostra com ESR do dorso da mão grupo 1.



Fonte: Acervo do autor.

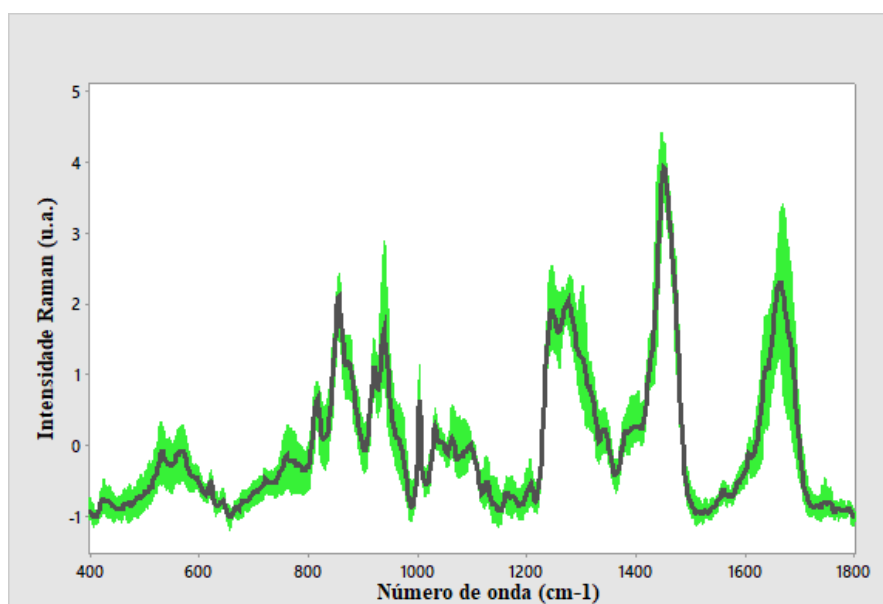
5.3. COMPARAÇÃO DO GRUPO COM ESE E ESR DA REGIÃO CRONOENVELHECIDA E FOTOENVELHECIDA

Figura 5.24: Média e desvio padrão da amostra com ESE da face interna do braço grupo 1.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 5.25: Média e desvio padrão da amostra com ESE do dorso da mão grupo 2.



Fonte: Acervo do autor.

Capítulo 6

Conclusão e Perspectivas

No presente trabalho, utilizou-se a espectroscopia Raman para entender as alterações bioquímicas na pele provocadas pela exposição à radiação solar.

Observou-se através do *loading plot* no grupo de exposição solar excessiva *versus* exposição solar reduzida da região da face interna do braço, que os voluntários com maior exposição solar apresentaram maior quantidade de prolina e hidroxiprolina, correspondente à banda observada em 855 cm^{-1} , colágeno em 920 cm^{-1} atribuído ao $\nu(\text{C-C})$ e amida I. Isso porque os voluntários com exposição solar excessiva apesar de serem mais irradiados no dorso da mão, na face interna do braço a radiação que eles recebem está fora do visível, que é a infravermelho, onde dependendo da dosagem ela pode ser benéfica ou maléfica, e esta radiação que eles estão recebendo está fora do limiar maléfico e funcionando como algo benéfico para a pele, fazendo com que haja modulação na síntese de fibroblasto que aumenta a quantidade de colágeno.

Já no grupo de exposição solar excessiva *versus* exposição solar reduzida do dorso da mão, observou-se que os voluntários com exposição solar reduzido apresentaram maior quantidade de prolina e hidroxiprolina em 855 cm^{-1} , colágeno do tipo I em 940 cm^{-1} , e amida I em 1635 cm^{-1} .

Para o grupo de exposição solar excessiva *versus* o exposição solar reduzida tanto da face interna do braço quanto do dorso da mão, é apresentado uma quantidade maior de prolina e hidroxiprolina em 855 cm^{-1} , colágeno do tipo I em 937 cm^{-1} e amida III no grupo com exposição solar reduzida, enquanto que os de exposição solar excessiva apresentam uma maior quantidade de amida I.

Estes resultados são coerentes com o que se tem na literatura sobre estudos dermatológicos sobre efeito da radiação solar na pele. E mostra que a espectroscopia Raman é uma técnica poderosa que pode ser utilizada no futuro como biópsia óptica para estudos em pele humana, fornecendo resultados em tempo real e não destrutiva.

Como perspectivas futuras pretende-se ter uma maior quantidade de voluntários para fazermos mais medidas Raman para poder aumentar a quantidade de dados, e fazer medidas de SHG(*second harmonic generation*) para poder observar as fibras de colágeno.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ADULTOS

Prezado Senhor:

Eu, Antonio Francisco Machado Pereira, professor do curso de Enfermagem do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Piauí, estou conduzindo a pesquisa que tem como título: **“EFEITOS BIOQUÍMICOS DA RADIAÇÃO SOLAR NO ENVELHECIMENTO DA PELE HUMANA: ESPECTROSCOPIA RAMAN”**, sob orientação do Prof. Dr. Airton Abrahão Martin.

O senhor está sendo convidado a responder às perguntas deste roteiro de forma totalmente voluntária. Antes de concordar em participar desta pesquisa e responder este instrumento, é muito importante que compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Por favor, não tenha pressa em tomar a decisão. Leia/ouça cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que tiver. Depois de esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de autorizar este estudo, assine este documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. O senhor tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade.

Esclarecimentos sobre a pesquisa

Objetivo primário: Este projeto tem como objetivo estudar as alterações bioquímicas decorrentes da exposição intensa da radiação solar sobre a pele humana, através da microscopia Raman confocal.

Objetivos secundários: Identificar por espectroscopia Raman confocal os componentes bioquímicos da pele humana (homens entre 50 a 60 anos) através das análises dos modos vibracionais adquiridos; Identificar as regiões

espectrais onde ocorrem as principais alterações estruturais da pele fotoenvelhecida, devido à radiação solar crônica; Comparar as alterações bioquímicas da pele humana fotoenvelhecida da região mais irradiada e com a região não irradiada; Analisar através da espectroscopia Raman confocal a histopatologia de colágeno da região mais irradiada e com a região não irradiada.

Procedimento: Os que aceitarem participar da pesquisa serão informados dos procedimentos de coleta; Realização da assepsia do local com algodão embebido em álcool etílico 97%; serão retirados dois (02) fragmentos de raspado da pele de aproximadamente 2mm de cada participante. As regiões anatômicas escolhidas foram: dorso da mão e face interna braço; a justificativa para a escolha das regiões supracitadas protela-se por serem considerados dois locais que estão maior e menor expostos à radiação solar respectivamente; a coleta dos fragmentos será realizada por um cirurgião dermatologista profissional devidamente habilitado e registro junto ao seu conselho de classe; Após a remoção, o material será acondicionado em tubos de ensaio contendo solução fisiológica e mantido sob refrigeração adequada para conservação e manutenção das propriedades do material a ser estudo; o projeto será desenvolvido no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica na Universidade do Vale do Paraíba, na Cidade de São José dos Campos – São Paulo, Brasil.

Benefício: Os participantes da pesquisa que apresentarem alterações na pele e que venham a necessitar de acompanhamento, serão comunicados e orientados a assim procederem o tratamento como paciente com cadastro no HU-UFPI, o médico dermatologista que integra este estudo se incumbirá desse retorno.

Riscos: A técnica aplicada, será minimamente invasiva, possui riscos mínimos, pois o procedimento trata-se de uma raspagem de pele superficial que não afeta estruturas localizadas abaixo da epiderme. Será aplicado anestésico tópico, dispensa a realização de curativo após o procedimento. No caso de

incidência de qualquer evento indesejável, o participante será imediatamente encaminhado a um médico que fará o acompanhamento do incidente. Mas o entrevistador estará pronto para prestar os esclarecimentos necessários, com a promoção de compreensão prévia de todos os participantes da pesquisa, acerca dos objetivos e instrumentos a serem utilizados, bem como a realização da entrevista de forma que respeite as condições do participante, em local adequado, com consentimento livre e esclarecido, privativo e garantia de sigilo e anonimato.

Sigilo: O senhor terá sua privacidade garantida pelos pesquisadores responsáveis, não sendo identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

A pesquisa será desenvolvida no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, no Estado de São Paulo, Brasil. A sua participação será autorizar a extração de dois (02) fragmentos de raspado de pele de regiões previamente estabelecida.

Eu _____
_____ discuti com o Prof. Msc Antônio Francisco Machado Pereira sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizadas, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Teresina, ___/___/_____

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com os pesquisadores: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin. Universidade Vale do Paraíba – UNIVAP, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IPD Av. ShishimaHifumi, 2911 - Urbanova, São José dos Campos - SP, 12244-000 **Telefone:** [\(12\) 3947-1000](tel:(12)3947-1000) e Prof. MscAntonio Francisco Machado Pereira – UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Departamento de Enfermagem, SG 12, tel; (86) 3215 – 5862 CEP 64.049-550; Bairro Ininga, Teresina – PI. machado@ufpi.edu.br

Referências Bibliográficas

- [1] M.I.N. Camargo Harris. *Pele - Estrutura, Propriedades e Envelhecimento*. Editora SENAC, São Paulo, 2009. 15, 16, 17, 18, 19, 20
- [2] L.P. Pinto. Análise dos efeitos do processo de glicação na pele humana através da espectroscopia Raman confocal in vivo, 2014. 15, 18, 20
- [3] L. D. B. Miot, H. A. Miot, M. G. Silva, and M. E. A. Marques. Fisiopatologia do melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2009. 15
- [4] J. A. Bouwstra, H. W. W. Groenink, J.A. Kempenaar, S. G. Romeijn, and M. Ponc. Water Distribution and Natural Moisturizer Factor Content in Human Skin Equivalents Are Regulated by Environmental Relative Humidity. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(2):378–388, 2008. 16
- [5] Camadas da pele, Março 2018. 17
- [6] P.J. Caspers, G.W. Lucassen, and G.J. Puppels. Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. *Biophysical Journal*, 85(1):572–580, 2003. 16
- [7] E.A. Rivitti. *Manual De Dermatologia Clinica De Sampaio E: RIVITTI*. ARTES MEDICAS. 16, 19
- [8] E. H. Choi, Mao-Qiang Man, F. Wang, X. Zhang, B. E. Brown, K. R. Feingold, and P. M. Elias. Is Endogenous Glycerol a Determinant of Stratum Corneum Hydration in Humans. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(2):288–293, 2005. 16
- [9] K. Biniek, K. Levi, and R. H. Dauskardt. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42):17111–17116, 2012. 16
- [10] T.S. Balogh, C.A. Pedriali, A.R. Baby, M.V.R. Velasco, and M. Kaneko, T. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2010. 17

- [11] A.N. Teixeira. Avaliação in vivo da pele humana facial por espectroscopia Raman confocal:ação de cosméticos, 2013. 18
- [12] E. F. Bernstein, Y. Q. Chen, J. B. Kopp, L. Fisher, D. B. Brown, P. J. Hahn, F. A. Robey, J. Lakkakorpi, and J. Uitto. Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis: Comparison of sun-protected and photoaged skin by Northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(2, Part 1):209–218, 1996. 19
- [13] G.P.A. Mendes and D.R. Green. The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, pages 1053 – 1061, 09 1999. 19
- [14] R. P. E. Sarkany. Ultraviolet Radiation and the Skin. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, pages –. Elsevier, 2018. 20
- [15] D. Barolet, F. Christiaens, and M. R. Hamblin. Infrared and skin: Friend or foe. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 155:78–85, 2016. 21
- [16] S. Eberli, G. Facchini, S. Eberlin, A.L.T.A. Pinheiro, M.S. Silva, A.S. Pinheiro, and A. Costa. Metodologia alternativa para o estudo dos efeitos da radiação infravermelha-a sobre a pele humana. *Surgical e cosmetic dermatology*, 2015. 21
- [17] M. Randhawa, I. Seo, F. Liebel, M. D. Southall, N. Kollias, and E. Ruvolo. Visible light induces melanogenesis in human skin through a photoadaptive response. *PLOS ONE*, 10(6):1–14, 06 2015. 21
- [18] B. H. Mahmoud, C. L. Hexsel, I. H. Hamzavi, and H. W. Lim. Effects of Visible Light on the Skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84(2):450–462, 2008. 21
- [19] V.N. Denisov, B.N. Mavrin, and V.B. Podobedov. Hyper-raman scattering by vibrational excitations in crystals, glasses and liquids. *Physics Reports*, 1987. 22
- [20] G.S. Pinheiro. Espectroscopia Vibracional em Cristais de L-histidina, 2009. 22, 24
- [21] P.R. Griffiths. Introduction to the theory and instrumentation for vibrational spectroscopy. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 2010. 23
- [22] J. E. Cyvin, S. J. Rauch and J. C. Decius. Theory of hyperraman effects (nonlinear inelastic light scattering): Selection rules and depolarization ratios for the second-order polarizability. *The Journal of Chemical Physics*, 1965. 22
- [23] *Física Quântica*. •, 1994. 23
- [24] O. Sala. *Fundamentos da espectroscopia Raman e infravermelho*. UNESP, 2008. 25

- [25] D. A. Long. *Raman spectroscopy*. McGraw-Hill International Book Company, 1977. 25
- [26] R. S. Das and Y. K. Agrawal. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*, 57(2):163–176, 2011. 25, 26, 39
- [27] M. Zanyar, R. Shazza, and U. R. Ihtesham. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5):493–541, 2007. 25
- [28] J. Depciuch¹, E. Kaznowska, I. Zawlik, R. Wojnarowska, M. Cholewa, P. Heraud, and J. Cebulski. Application of raman spectroscopy and infrared spectroscopy in the identification of breast cancer. *Applied spectroscopy*, 2015. 25
- [29] S. Wessel, M. Gniadecka, G. B. E. Jemec, and H. C. Wulf. Hydration of human nails investigated by NIR-FT-Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1433(1):210–216, 1999. 26
- [30] Y. Ye, Y. Chen, Y. Su, C. Zou, Y. Huang, L. Ou, and R. Chen. Raman spectral analysis of nasopharyngeal carcinoma cell line cne2 after microwave radiation. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012. 26
- [31] F.M. Lyng, D. Traynor, I.R.M. Ramos, F. Bonnier, and H.J. Byrne. Raman spectroscopy for screening and diagnosis of cervical cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015. 26
- [32] N. Howell and E. Li-Chan. Elucidation of interactions of lysozyme with whey proteins by Raman spectroscopy. *International Journal of Food Science Technology*, 31(5):439–451, 1996. 26
- [33] V. K. Tippavajhala, T. O. Mendes, and A. A. Martin. In Vivo Human Skin Penetration Study of Sunscreens by Confocal Raman Spectroscopy. *AAPS PharmSciTech*, 2017. 26
- [34] Confocal raman spectroscopy as an optical sensor to detect advanced glycation end products of the skin dermis. *Sensor Letters*, 13(9), 2015. 26
- [35] C.A.S. Téllez, L. Pereira, L. Santos, P. Fávero, and A.A. Martin. Rm1 semi empirical and dft: B3lyp/3-21g theoretical insights on the confocal raman experimental observations in qualitative water content of the skin dermis of healthy young, healthy elderly and diabetic elderly women's. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149:1009 – 1019, 2015. 27
- [36] M. B. Lopes, R. Rajasekaran, C. Lopes, C.A. Figueira, and A. A. Martin. In vivo confocal raman spectroscopic analysis of the effects of infrared radiation in the human skin dermis. *Photochemistry and Photobiology*, 93(2):613–618, 2017. 27

- [37] K. Lin, W. Zheng, C.M. Lim, and Z. Huang. Real-time in vivo diagnosis of laryngeal carcinoma with rapid fiber-optic raman spectroscopy. *Biomed. Opt. Express*, 7(9):3705–3715, Sep 2016. 27
- [38] D. Lunter and R Daniels. Measuring skin penetration by confocal raman microscopy (crm): correlation to results from conventional experiments. *Proc.SPIE*, 9788:9788 – 9788 – 7, 2016. 27
- [39] A. Gualerzi, S. Niada, C. Giannasi, S. Picciolini, C. Morasso, R. Vanna, V. Rossella, M. Masserini, M. Bedoni, F. Ciceri, M.E. Bernardo, A.T. Brini, and F. Gramatica. Raman spectroscopy uncovers biochemical tissue-related features of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells. *Nature*, 2017. 27
- [40] I.P. Santos, P.J. Caspers, T.C.B. Schut, R.V. Doorn, V.N. Hegt, S. Koljenović, and G.J. Puppels. Raman spectroscopic characterization of melanoma and benign melanocytic lesions suspected of melanoma using high-wavenumber raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2016. 27
- [41] G. Pezzotti, M. Boffelli, D. Miyamori, T. Uemura, Y. Marunaka, W. Zhu, and H. Ikegaya. Raman spectroscopy of human skin: looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age. *Journal of Biomedical Optics*, 2015. 27
- [42] M. Ashtikar, C. Matthäus, M. Schmitt, C. Krafft, A. Fahr, and J. Popp. Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal raman microscopy: First insights into the method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013. 27
- [43] A. C. Rencher. *Methods of Multivariate Analysis*. Wiley, second edition, 2002. 28, 29, 31
- [44] T. Korenius, J. Laurikkala, and M. Juhola. On principal component analysis, cosine and Euclidean measures in information retrieval. *Information Sciences*, 177(22):4893–4905, 2007. 28
- [45] P. Mobili, A. Londero, G. De Antoni, A. Gomez-Zavaglia, C. Araujo-Andrade, H. Avila-Donoso, R. Ivanov-Tzonchev, and I. Moreno. Multivariate analysis of raman spectra applied to microbiology: Discrimination of microorganisms at the species level. *Revista Mexicana de Física*, 2010. 28
- [46] S. Sharma. *Applied Multivariate Techniques*. John Wiley Sons, Inc., New York, NY, USA, 1996. 28
- [47] F. Bonnier and H. J. Byrne. Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems. *Analyst*, 137(2):322–332, 2012. 28

- [48] I.T. Jolliffe. *Principal Component Analysis*. Springer Series in Statistics. Springer, 2002. 29
- [49] G.A. Helfer, M.F. Ferrão, C.V. Ferreira, and Hermes N. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 2006. 31
- [50] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. Rehman. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42:493–541, 2007. 40, 41
- [51] J. Zhao, H. Zeng, S. Kalia, and H. Lui. Using raman spectroscopy to detect and diagnose skin cancer in vivo. *Dermatologic Clinics*, 2017. 40, 41
- [52] M.G. Tosato, D.E. Orall, S.M. Ali, M.S. Churio, A.A. Martin, and L. Dicelio. Confocal raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under uv radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015. 40, 41
- [53] L.P. Medeiros Neto, L.F.C.S. Carvalho, L. Santos, C.A.T. Soto, R.A. Canevari, A.B.O. Santos, E.S. Mello, M.A. Pereira, C.R. Cernea, L.G. Brandão, and A.A. Martin. Micro-raman spectroscopic study of thyroid tissues. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 17:164 – 172, 2017. 41