



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
BIOMÉDICA**

DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DEVIDO A
FOTOEXPOSIÇÃO CRÔNICA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN**

João Lucas Rangel Silva

São Paulo
2020



**ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DEVIDO A
FOTOEXPOSIÇÃO CRÔNICA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN**

João Lucas Rangel Silva

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin
Co-orientador: Dr. Felipe Bachion de Santana

São Paulo
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

S58e SILVA, João Lucas Rangel
Estudo dos marcadores bioquímicos na pele humana devido a
fotoexposição crônica por espectroscopia Raman / João Lucas
Rangel Silva -- São Paulo: Universidade Brasil, 2020.
140 p.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-
graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade
Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin.
Coorientação: Prof. Dr. Felipe Bachion de Santana.

1. Microscopia Raman. 2. Fotoenvelhecimento. 3. Pele. 4.
Biomarcadores. I. Martin, Airton Abrahão. II. Santana, Felipe
Bachion de. III. Título

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

JOÃO LUCAS RANGEL DA SILVA

“ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DE INDIVÍDUOS FOTOEXPOSTOS E NÃO FOTOEXPOSTOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN APROVAÇÃO CONDICIONAL”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a) Airton Abrahão Martin (presidente-orientador)

Prof(a). Dr(a) Priscila Pereira Fávero (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Lázaro Pinto Medeiros Neto (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Antônio Francisco Machado Pereira (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ)

Prof(a). Dr(a) Felipe Bachion de Santana (TEAGASC-IRLANDA)

Prof(a). Dr(a) Bartolomeu Cruz Viana (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ)

São Paulo, 12 de novembro de 2020.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Airton Abrahão Martin

Houve alteração do Título: sim (X) não ():

Estudo dos marcadores bioquímicos na pele humana devido a fotoexposição crônica
por espectroscopia Raman



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DE INDIVÍDUOS FOTOEXPOSTO E NÃO FOTOEXPOSTO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN APROVAÇÃO CONDICIONAL”**

Autor(es):

Discente: **João Lucas Rangel da Silva**

Assinatura: 

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Airton Abrahão Martin**

Assinatura: 

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Felipe Bachion de Santana**

Assinatura: 

Houve alteração do Título: sim (X) não ():

Estudo dos marcadores bioquímicos na pele humana devido a fotoexposição crônica
por espectroscopia Raman

Data: 12/11/2020

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por me conceder o sonho de me tornar doutor em Engenharia Biomédica.

Aos meus pais, que acompanharam meu crescimento e sacrificaram seus sonhos em favor dos meus.

A minha esposa Jeniffer Jorge Rangel que esteve sempre ao meu lado.

Aos Professores, Dr. Claudio Alberto Tellez e Dr. Thiago Mendes além de professores, grandes amigos, agradeço pelos ensinamentos, pela amizade e imenso incentivo.

Ao Dr. Antônio Francisco Machado Pereira, que compartilhou não só amostras e conhecimento, mas companheirismo e senso de equipe.

Ao meu orientador Professor Dr. Airton Abrahão Martin, agradeço pelos ensinamentos, orientação e atenção dispensada.

Ao meu Co-orientador Dr. Felipe Bachion de Santana, agradeço por todo o auxílio e apoio durante a construção desta tese.

A todo o corpo docente do curso de doutorado em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste doutorado.

E todos aqueles que direto ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

A todos vocês, o meu muito obrigado.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais João Bosco e Paula Rangel e minha esposa Jeniffer que me deram tudo o que mais me importa. Aos meus amigos, Thiago Richard, Leonardo Pimentel, Borys M. e tantos outros que me incentivaram a nunca desistir. Aos meus colegas de trabalho da empresa HORIBA Scientific, Igor Carvalho, Clyde C., Jeremy Brites e todos os outros que me apoiaram nesta dupla jornada, quase interminável. Esse título de doutor foi defendido por mim, mas a conquista e mérito é todos aqueles que estão sempre ao meu lado. Pela longa espera e compreensão durante essa difícil caminhada, eu não tenho palavras para agradecer tudo isso. Amo vocês.

RESUMO

A pele é um sistema epitelial que difere dos outros sistemas teciduais por estar em contato direto com o ambiente externo, considerada indispensável a vida. A exposição excessiva à radiação solar leva à redução significativa da elasticidade, atrofia, pigmentação excessiva, ressecamento, aparecimento de rugas, espessamento da pele, degeneração do colágeno e elastina, desenvolvimento de hiperpigmentações, telangiectasias e acentuação do processo de cronoenvelhecimento. Alguns estudos têm utilizado métodos ópticos no estudo das diferenças estruturais da pele para as mais variadas origens étnicas e sob a ação de diferentes tratamentos. A técnica de espectroscopia micro-Raman *in-vivo* e *in-vitro* vêm permitindo identificar e caracterizar em tempo real, as alterações bioquímicas decorrentes dos processos degenerativos de tecidos vivos. Além de sua alta sensibilidade e especificidade, a técnica é capaz de fornecer a impressão digital química da amostra estudada. A primeira parte deste estudo foi a validação da técnica, a fim de comprovar a sensibilidade e especificidade da técnica de microscopia Raman para aplicações em pele. Os resultados encontrados na fase de validação da técnica, corroboram com os estudos realizados por outros autores, onde apresentam a técnica de microscopia Raman como ferramenta de análise sensível e específica as mudanças químicas da pele. Após a comprovação da positividade do uso da técnica Raman para aplicações em pele, foi iniciada a segunda parte deste trabalho, com a intenção de verificar as diferenças químicas entre os grupos estudados, indivíduos com alta e baixa exposição solar. Nesta parte do estudo as amostras foram separadas em dois grupos, sendo um grupo com alta exposição solar e o outro de baixa exposição solar. Os resultados obtidos após a aplicação da metodologia estatística multivariada, evidenciaram diferenças espectrais nas camadas do estrato córneo, epiderme e derme. Para todos os grupos fotoexpostos e em todas as camadas foram observadas mudanças conformacionais de lipídeos e proteínas, prejudicando a função de barreira protetora no estrato córneo, e afetando as ceramidas na epiderme e colágeno tipo I, na derme. Também para os grupos fotoexpostos foi observado alterações de fenilalanina nas camadas do estrato córneo e epiderme. Os picos de prolina-hidroxiprolina foram identificados como adequados para avaliação do envelhecimento intrínseco *versus* extrínseco, e as regiões de amida I e III podem ser utilizadas para os estudos sobre a evolução do processo de fotoenvelhecimento, na camada da derme. Esse estudo revela a potencialidade da técnica de espectroscopia Raman como método alternativo, rápido e

confiável na avaliação das alterações bioquímicas presente na pele relacionadas a exposição solar continua.

ABSTRACT

Skin is an epithelial system that differs from other tissues because it is in direct contact with the external environment, which is considered essential for life. Excessive exposure to solar radiation leads to a significant reduction in elasticity, atrophy, excessive pigmentation, dryness, appearance of wrinkles, thickening of the skin, degeneration of collagen and elastin, development of hyperchromias, telangiectasias and accentuation of the process of aging. Some studies have used optical methods in the study of the structural differences of the skin for the most varied ethnic origins and under the action of different treatments. micro-Raman spectroscopy technique *in vivo* and *in vitro* has enabled the identification and characterization in real time of biochemical changes resulting from the degenerative processes of living tissues. In addition to its high sensitivity and specificity, the technique provides the chemical fingerprint of the studied sample. The first part of this study was the validation of the technique, in order to prove the sensitivity and specificity of the Raman microscopy technique for skin applications. The results found in the validation phase of the technique, corroborate with the studies carried out by other authors, where they present the Raman microscopy technique as a sensitive analysis tool for chemical changes on the skin. After the good results obtained on the validation phase, the second part of this work was carried out, characterizing the chemical differences between the study groups, individuals with high and low sun exposure. In this part of the study, the samples were separated into two groups, one with high sun exposure and the other with low sun exposure. The results obtained after multivariate statistical analysis, showed spectral differences in the stratum corneum, epidermis and dermis layers. For all photoexposed groups and in all layers, conformational changes in lipids and proteins were observed, impairing the protective barrier function in the stratum corneum, affecting ceramides in the epidermis and type I collagen in the dermis. Also, in the photoexposed groups, changes in phenylalanine were observed in the layers of the stratum corneum and epidermis. The proline-hydroxyproline peaks were identified as suitable for assessing intrinsic *versus* extrinsic aging, and the regions of amide I and III can be used for photoaging evolutionary studies in the dermis layer. This study reveals the potential of the Raman spectroscopy technique as an alternative, fast and reliable method to assess biochemical changes in the skin related to continuous sun exposure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do tecido epitelial, epiderme, derme e hipoderme. Fonte: SOUTER, 2013.

Figura 2 - Esquema representativo das camadas da pele. Fonte: SOUTER, 2013.

Figura 3 - Esquema representativo das camadas da derme. Fonte: RAMALHO, 2009.

Figura 4 - Esquema representativo da Hipoderme. Fonte: SOUTER, 2013.

Figura 5 - Esquema representativo do Fibroblasto da pele humana. Fonte: PINTO, 2014.

Figura 6 - Processo de formação, organização e estrutura de colágeno. Fonte: SILVA, 2012.

Figura 7 - Esquema representativo da síntese de colágeno tipo I. Fonte: DUARTE, 2011.

Figura 8 - Representação esquemática das microfibrilas, onde cada seta corresponde a moléculas de tropocolágeno. Fonte: DUARTE, 2011.

Figura 9 - Ligações cruzadas entre moléculas de tropocolágeno. Fonte: DUARTE, 2011.

Figura 10 - Penetração dos distintos comprimentos de onda emitidos pela radiação na pele humana.

Figura 11 - Esquema dos estados de energia vibracionais e energia da luz nas espectroscopias Raman (ν_0 = Frequência da radiação incidente, ν = frequência vibracional, h = constante de Planck).

Figura 12 - Espectro Raman ilustrativo. Espalhamento inelástico Stokes (menor energia) e anti-Stokes (maior energia) e espalhamento elástico Rayleigh. Linhas cinza tracejadas: diferença de intensidade entre Stokes e anti-Stokes. (ν_0 = Frequência da radiação incidente, ν = frequência vibracional, h = constante de Planck).

Figura 13 - Modos de vibração entre átomos. O símbolo \bullet indica vibração perpendicular fora do plano; o símbolo \otimes indica vibração perpendicular entrando no plano.

Figura 14 - Principais ruídos na espectroscopia Raman.

Figura 15 - Máxima homogeneidade de indivíduos dentro de grupos e máxima heterogeneidade entre os grupos.

Figura 16 - Figura 16 - Decomposição da matriz X nas matrizes de escores (T), pesos (P) e resíduos (E). Fonte: ZANETTI, 2014.

Figura 17 - Representação de duas componentes principais. Fonte: ZANETTI, 2014.

Figura 18 - Porcentagem de amostras classificadas corretamente em função do número de variáveis latentes. Fonte: ZANETTI, 2014.

Figura 19 - Distribuição dos valores previstos de y para determinação do valor limite entre as classes (verde/1 e azul/0) seguindo a estatística Bayesiana. A linha tracejada em vermelho representa o limiar ótimo para discriminação. Fonte: SANTANA, 2020.

Figura 20 - Regiões do antebraço (foto vertical) e braço (foto horizontal) onde foram realizadas biópsias da pele para estudo utilizando espectroscopia Raman. Fonte: SANTANA, 2020.

Figura 21 - Divisão dos grupos de amostras para o desenvolvimento deste estudo.

Figura 22 - Instrumento Raman confocal, marca River Diagnostics, modelo *Skin Composition Analyzer*.

Figura 23 - Dendrograma de uma amostra do grupo FTENV, onde mostra a separação obtida através da Análise Hierárquica de Cluster. Sendo estrato córneo (SC), epiderme viável (EP), derme papilar (DP) e derme reticular (DR).

Figura 24 - Exemplo de análise de PCA dos grupos FTENV vs FTGR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC2.

Figura 25 - Exemplo da análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura 26 - Matriz de correlação para comparação intraindividual na região de impressão digital estendida da superfície da pele até uma profundidade de 16 μm : (a) perfil da matriz de correlação em diferentes profundidades; (b) desvio padrão para todas as profundidades analisadas; (c) matriz média de correlação para 0 μm e 16 μm ; (d) matriz de desvio padrão para 0 μm e 16 μm . Fonte: SANTOS, 2016.

Figura 27 - Matriz de correlação para comparação interindividual na região de impressão digital estendida da superfície da pele até uma profundidade de 16 μm : (a) perfil da matriz de correlação em diferentes profundidades; (b) matriz de correlação na superfície da pele; (c) matriz de correlação na profundidade de 16 μm . Fonte: SANTOS, 2016.

Figura 28 - Teste de Kruskal Wallis para intensidades (entre 1800 e 400 cm^{-1}) considerando todos os espectros Raman de todos os participantes desde a superfície da pele até uma profundidade de 16 μm com um tamanho de passo de 2 μm . Fonte: SANTOS, 2016.

Figura 29 - Coloração por H&E do corte histológico da região fotoexposta, aumento de 100x, onde observa-se: (1) um espessamento do estrato córneo e (2) junção dermo-epidérmica.

Fonte: PEREIRA, 2019.

Figura 30 - Coloração por H&E do corte histológico da região não fotoexposta (face interna do braço), aumento de 100x, onde observa-se: (1) uma atrofia do estrato córneo e (2) uma redução notória da junção dermo-epidérmica. Fonte: PEREIRA, 2019.

Figura 31 - Dendrograma de uma amostra do grupo FTENV, onde mostra a separação obtida através da HCA. Sendo estrato córneo (SC), epiderme viável (EP), derme papilar (DP) e derme reticular (DR).

Figura 32 - Espectro médio das diferentes camadas da pele: Estrato Córneo (SC); Epiderme (EP) e Derme (DE), nos distintos grupos estudados: Fotoexposto Envelhecido (FTENV), Fotoexposto Cronológico (FTCR), Não Fotoexposto Envelhecido (NFENV) e Não Fotoexposto Cronológico (NFCR).

Figura 33 - Espectro médio das camadas da pele, estrato córneo, epiderme e derme para cada um dos grupos de estudo, Fotoexposto Cronológico (FTCR), Fotoexposto Envelhecido (FTENV), Não Fotoexposto Cronológico (NFCR) e Não Fotoexposto Envelhecido (NFENV).

Figura 34 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC2.

Figura 35 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 5 (PC5); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC5.

Figura 36 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura 37 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FTCR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC2.

Figura 38 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs FTCR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs FTCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura 39 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 3 (PC3); (c) Gráfico de *loading plot* da PC1, PC2 e PC3.

Figura 40 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura 41 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FTCCR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

Figura 42 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs FTCCR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs FTCCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura 43 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

Figura 44 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura 45 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FTCCR da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

Figura 46 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs FTCCR da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs FTCCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura 47 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FTCCR da camada da derme. Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2 na região de 800 - 1000 cm⁻¹.

Figura A1 - Análise de PCA dos grupos FTCCR vs NFCCR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente

principal 2 (PC2); (b) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 3 (PC3); (c) Gráfico de loading plot da PC1, PC2 e PC3.

Figura A2 - Análise de PLS-DA dos grupos FTCR vs NFCR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTCR vs NFCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Figura A3 - Análise de PCA dos grupos FTCR vs NFCR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de loading plot da PC1 e PC2.

Figura A4 - Análise de PCA dos grupos FTCR vs NFCR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de loading plot da PC1 e PC2.

Figura A5 - Análise de PLS-DA dos grupos FTCR vs NFCR da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTCR vs NFCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de colágeno fibrilares e sua distribuição nos tecidos. Fonte: HARRIS, 2012; PINTO, 2014.

Tabela 2 - Classificação da pele humana de acordo com o fototipo, seguindo a escala de Fitzpatrick. Fonte: ASTNER, 2003

Tabela 3 - Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) para comparações intraindividuais dos espectros Raman da região de impressão digital estendida.

Tabela 4 - Regiões espectrais com diferenças visíveis entre os grupos estudados.

Tabela 5 - Atribuição dos modos vibracionais Raman que apresentam maior variação espectral entre os grupos estudados (FTENV, NFENV, FTCCR e NFCR) nas distintas camadas da pele: (SC) Estrato Córneo, (EP) Epiderme e (DE) Derme.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	PELE: ESTRUTURA E FUNÇÃO	22
2.1.1	Principais constituintes bioquímicos da pele	23
2.1.2	Camadas da pele humana	24
2.1.2.1	Epiderme	24
2.1.2.2	Junção dermo-epidérmica	25
2.1.2.3	Derme	25
2.1.2.3.1	Derme papilar	26
2.1.2.3.2	Derme reticular	26
2.1.2.4	Hipoderme	27
2.1.3	Constituintes da Derme	27
2.1.3.1	Fibroblastos	27
2.1.3.2	Macrófagos	28
2.1.3.3	Matriz conjuntiva da Derme	28
2.1.3.3.1	Colágeno	28
2.1.3.3.1.1	Síntese do colágeno	31
2.1.3.3.2	Fibras Elásticas	34
2.1.3.3.3	Substância Fundamental (Matriz Extracelular)	34
2.2	ENVELHECIMENTO CUTÂNEO	34
2.3	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SOLAR NA PELE	35
2.4	ESPECTROSCOPIA RAMAN	38
2.4.1	Aplicações da Microscopia Raman	43
2.5	ANÁLISE MULTIVARIADA	45
2.5.1	Quimiometria	45
2.5.2	Análise Hierárquica de clusters - HCA	46
2.5.2.1	Similaridade	47
2.5.3	Análise de componentes principais - PCA	48
2.5.4	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais - PLS-DA	49
3	JUSTIFICATIVA	53
4	OBJETIVOS	54
5	METODOLOGIA	55
5.1	ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA- E INTER-GRUPO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	55

5.1.1	Instrumentação	55
5.1.2	Desenho clínico	55
5.1.3	Análise de dados	56
5.2	ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DE INDIVÍDUOS FOTEXPOSTOS E NÃO FOTEXPOSTOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	58
5.2.1	Procedimentos éticos e legais	58
5.2.2	População do Estudo.....	58
5.2.3	Local e procedimento das coletas das amostras	59
5.2.4	Processamento das amostra após coleta	60
5.2.5	Aquisição dos espectros Raman	61
5.2.6	Pré-processamento dos espectros Raman	62
5.2.7	Análise dos espectros Raman	63
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1	ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA- E INTER-GRUPO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	70
6.1.1	Resumo	70
6.1.2	Resultados e Discussão	70
6.1.2.1	Variabilidade intraindividual: região de impressão digital estendida.....	70
6.1.2.2	Variabilidade interindividual: região de impressão digital estendida.....	72
6.1.3	Conclusão do estudo de variabilidade intra- e inter-grupo por espectroscopia Raman	75
6.2	ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DE INDIVÍDUOS FOTEXPOSTOS E NÃO FOTEXPOSTOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	76
6.2.1	Histologia	76
6.2.2	Análise por Espectroscopia Raman	78
6.2.2.1	Análise das principais variações espectrais através dos espectros médios	78
6.2.2.2	Análise Multivariada: HCA, PCA e PLS-DA.....	84
6.2.2.2.1	Estrato Córneo - FTENV x NFENV.....	86
6.2.2.2.2	Estrato Córneo - FTENV x FTCTR	97
6.2.2.2.3	Epiderme - FTENV x NFENV.....	102
6.2.2.2.4	Epiderme - FTENV x FTCTR	109
6.2.2.2.5	Derme - FTENV x NFENV	113
6.2.2.2.6	Derme - FTENV x FTCTR	119
7	CONCLUSÃO	126
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
9	APÊNDICE.....	138

1 INTRODUÇÃO

A pele tem papel fundamental na manutenção e proteção de um indivíduo. Diversas funções são executadas pela pele, como por exemplo, secreção sebácea na camada córnea que impossibilita a perda de água e é relevante na manutenção eutrófica, controle da temperatura, meio de interface e proteção contra agentes externos e muitas outras. Contudo, a pele está sujeita a efeitos degradantes quando exposta ao sol de forma intensa e contínua. Esses efeitos aumentam a probabilidade do surgimento de patologias, de natureza benigna ou maligna (SARKANY, 2018). Outros efeitos podem ser observados com alto tempo e intensidade de exposição ao sol, como por exemplo: a redução significativa da elasticidade, atrofia, pigmentação excessiva de cores, ressecamento da pele e aparecimento de rugas. Além disso, a exposição do tecido cutâneo à radiação solar em excesso, leva ao espessamento da pele, degeneração do colágeno e elastina, desenvolvimento de hiperpigmentação, telangiectasia e acentuação do processo de cronoenvelhecimento (SARKANY, 2018). Para melhor compreensão dos efeitos causados pela alta exposição solar, diversas técnicas, em sua grande maioria técnicas morfológicas (*tape strip* ou biópsia), têm sido utilizadas no entendimento de processos advindos do envelhecimento da pele. Entretanto, além de serem técnicas invasivas ao indivíduo, não fornecem informações moleculares dos constituintes bioquímicos (CASPER, 2009). Tendo em vista que a integridade bioquímica e morfológica do tecido não pode ser afetada, alguns estudos têm empregado métodos ópticos no estudo das diferenças estruturais da pele para as mais variadas origens étnicas e sob a ação de diferentes tratamentos (MÉLOT, 2009). A técnica de espectroscopia Raman *in vivo* e *in vitro* vêm permitindo identificar e caracterizar em tempo real, as alterações bioquímicas decorrentes dos processos degenerativos de tecidos vivos. Além de sua alta sensibilidade e especificidade, a técnica fornece a impressão digital química da amostra como, por exemplo, os principais constituintes bioquímicos da pele: lipídeos, proteínas, água e colágeno (MARROT, 2008; SCHROEDER, 2008). A primeira parte deste estudo foi a validação da técnica como ferramenta de análise química de tecidos biológicos, comprovando sua sensibilidade e especificidade na identificação de variações bioquímicas da pele. Com esse intuito, foi comparado estatisticamente as variações bioquímicas intra- e intergrupo de um conjunto amostral. Esse estudo foi realizado com sucesso e os resultados obtidos podem ser revistos através da publicação científica intitulada, *In vivo intra- and inter-individual variability study of human stratum corneum by confocal Raman spectroscopy*

(SANTOS, 2016). Os dados analisados deste primeiro estudo, foram pré-processados com a aplicação de suavização de ruídos, linha de base e normalização vetorial. Posteriormente, os dados pré-processados foram analisados através de uma matriz de correlação, calculada usando o coeficiente de correlação de Pearson. Com base nos resultados obtidos foi possível indicar que as medidas obtidas por espectroscopia Raman são altamente precisas e exatas, mostrando que esta técnica é reproduzível para um estudo de pele humana considerando a quantidade de espectros analisados e a região da pele analisada. Após a obtenção dos resultados e comprovação da sensibilidade e especificidade da técnica de espectroscopia Raman para estudos de variação bioquímica da pele, iniciou-se a segunda parte deste trabalho, a aplicação da técnica na caracterização das mudanças bioquímicas na derme em indivíduos fotoexpostos e não fotoexpostos diariamente. Neste estudo, utilizamos o mesmo instrumento Raman utilizado na primeira parte do estudo, o instrumento Rivers Diagnostics (Modelo 3510 *Skin Composition Analyzer*). A metodologia desta parte do estudo baseia-se na análise por espectroscopia Raman confocal dos fragmentos de biopsias de pele de 24 indivíduos, sendo duas biopsias por indivíduo, uma na região interior do braço (área de menor exposição solar) e outra na região exterior do antebraço (área de maior exposição solar). As amostras foram separadas em dois grupos, alta exposição solar e baixa exposição solar. Todo esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí (HU-UFPI), sob o nº 64503316.6.0000.5214. Os espectros, foram pré-processados primeiramente de forma visual, excluindo espectros que não similares aos espectros referências e que não apresentem os picos característicos das camadas estudadas. Os espectros restantes foram processados através de suavização de ruído, linha de base e normalização. Os dados provenientes do pré-processamento foram então avaliados através de diferentes metodologias estatísticas multivariadas, Análise Hierárquica de *Cluster* - HCA, Análise de Componentes Principais - PCA e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais - PLS-DA, que evidenciou diferenças espectrais nas camadas do estrato córneo, epiderme e derme. Ressalta-se as modificações bioquímicas nos grupos fotoexpostos que apresentam mudança conformacional de lipídeos e proteínas. Essas mudanças ocorrem em todas as camadas da pele, sendo no estrato córneo prejudiciais a função de barreira protetora, na epiderme as ceramidas e na derme ao colágeno, especialmente o tipo I. Também foi observado nos grupos fotoexpostos as alterações espectrais na camada do estrato córneo e epiderme, em torno de 1000 cm^{-1} , relacionada ao estiramento C-C e atribuída ao modo de respiração simétrico do anel de

fenilalanina. Sugerindo que a fenilalanina sofre alterações bioquímicas devido a exposição solar. Na camada da derme foi possível observar que a região atribuída a prolina-hidroxiprolina (854 cm^{-1} e 940 cm^{-1}) são adequados para avaliação do envelhecimento intrínseco vs extrínseco, enquanto as intensidades espectrais das regiões de amida I e III, em 1275 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , respectivamente, podem ser utilizadas para os estudos de evolução do fotoenvelhecimento. Os resultados presentes neste trabalho mostram a importância do uso de ferramentas estatísticas na análise dos dados, tanto para caracterização das amostras quanto para distinção entre os grupos a partir de suas variações espectrais. As técnicas de PCA e PLS-DA, são técnicas complementares no ponto de vista matemático e oferecem uma outra perspectiva no momento de análise de dados. O uso de ambas as técnicas foi fundamental para uma análise mais profunda dos dados obtidos. Alguns modos vibracionais Raman foram apenas identificados por uma das técnicas estatísticas utilizadas, comprovando a importância do uso de ferramentas matemáticas complementares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE: ESTRUTURA E FUNÇÃO

A pele é um sistema epitelial que difere dos outros sistemas por estar em contato direto com o ambiente externo, considerada indispensável a vida. A manutenção de sua integridade é extremamente importante, tanto para o auxílio na homeostase corpórea, quanto pela sua função estética que é responsável pelo bem-estar físico e social do indivíduo. Está presente em todos os seres vivos e tem uma área de aproximadamente 2m², peso médio aproximado de 2 a 4 kg e sua espessura pode variar de 1,5 mm a 4 mm, sendo composta por diferentes células e estruturas, que trabalham de forma harmoniosa garantindo assim suas funções. Diversas alterações podem ser observadas com o passar do tempo e essas alterações podem ser potencializadas por hábitos de vida inadequados, como estresse, exposição a um ambiente físico poluído, radiação solar, uso de medicamentos, alimentação inadequada e patologias com hiperglicemia, tais como o diabetes mellitus.

O tecido cutâneo é um sistema complexo formado por diferentes células, tecidos e elementos de matriz extracelular, que se arranjam em determinadas estruturas para realizar diversas funções. Existem dois tipos de pele, a pele pilificada de menor espessura e que envolve a maior parte do corpo e a pele glabra, de maior espessura que recobre a palma das mãos, planta dos pés e superfícies flexoras dos dedos. A pele humana é constituída por três diferentes camadas: a epiderme, composta por tecido epitelial; a derme, camada média, formada por tecido conjuntivo e a hipoderme, camada interna, constituída por tecido adiposo, como ilustrado na Figura 1 (WOLFF, 2008; DUVIVIER, 1997).

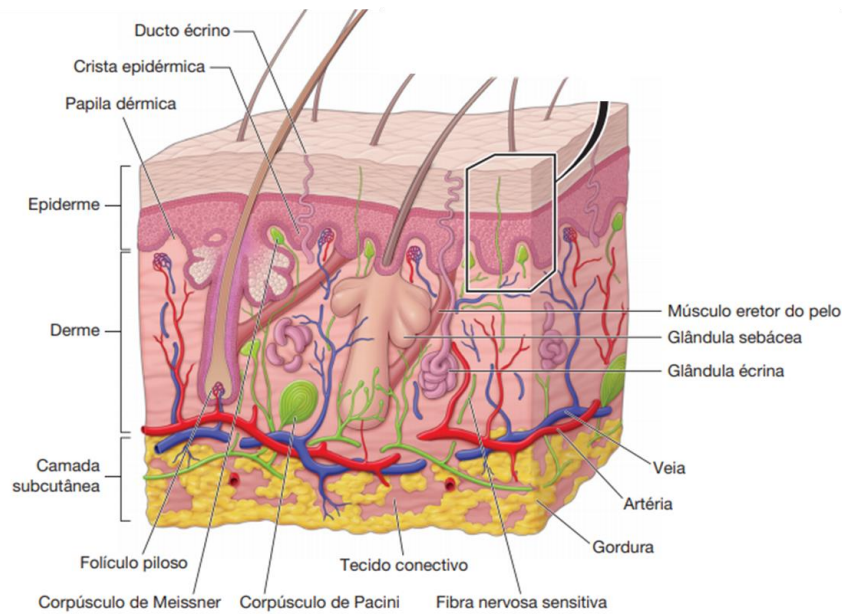


Figura 1 - Estrutura do tecido epitelial, epiderme, derme e hipoderme. Fonte: SOUTER, 2013.

A pele é um órgão extremamente complexo e por isso é capaz de exercer diferentes funções, tais como defesa contra agressões externas, absorção e secreção de líquidos, termorregulação, metabolismo de vitaminas, sensorial e estética. Em sua função de defesa, protege contra a radiação solar ultravioleta e efeitos danosos como: agentes químicos, físicos e biológicos; Sua função de termorregulação é caracterizada pela manutenção da temperatura e hidratação cutânea, através das glândulas sudoríparas; As terminações nervosas sensitivas são responsáveis pela função sensitiva, permitindo a comunicação entre o indivíduo e o meio, que serve como um grande receptor para as sensações como tato, dor, pressão e temperatura; A função metabólica e hormonal é representada pela conversão de moléculas precursoras de vitamina D; A exalação de odores característicos de cada pessoa é uma função fundamental para os aspectos humanos de reprodução e diferenciação de seres vivos e a função estética que através de sua aparência saudável promove a saúde psicossocial humana, por maior admissão instintiva da sociedade (JUNQUEIRA, 1995; HARRIS, 2012).

2.1.1 PRINCIPAIS CONSTITUINTES BIOQUÍMICOS DA PELE

Todos os tecidos orgânicos e células do corpo humano apresentam como base o átomo de carbono, que apresenta a capacidade de produzir moléculas grandes. Em sua última camada de distribuição eletrônica, o carbono, possui 4 elétrons que promovem 4 ligações

covalentes muito estáveis com outros átomos de carbono (C-C), originando moléculas complexas e que também podem se ligar a outros átomos, como o nitrogênio, hidrogênio e oxigênio. Existem pequenas unidades formadas pelas moléculas orgânicas que são conhecidas por monômeros, que ao se unir a outros monômeros, produzem macromoléculas denominadas polímeros. Os ácidos nucleicos, as proteínas, polissacarídeos e lipídeos são produtos de polimerização de dois ou mais monômeros e juntamente com a água são os maiores constituintes bioquímicos da pele humana (TOSATO, 2010).

2.1.2 CAMADAS DA PELE HUMANA

2.1.2.1 EPIDERME

A epiderme é constituída por cinco camadas distintas (Figura 2) formadas pela estratificação dos queratinócitos, tais como o estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e o estrato basal (JUNQUEIRA, 1995; HARRIS, 2012).

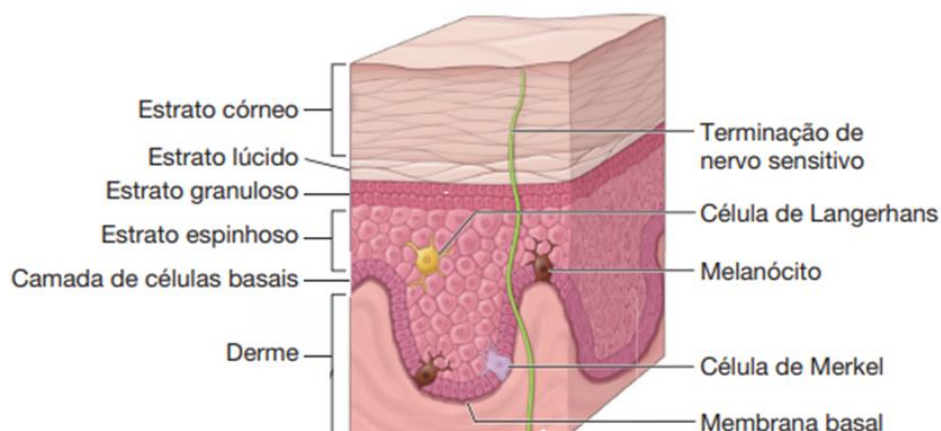


Figura 2 - Esquema representativo das camadas da pele. Fonte: SOUTER, 2013.

A epiderme é o tecido epitelial mais externo, compacto e impermeável, perfurada apenas por poros dos folículos pilossebáceos e das glândulas que se originam na derme, mas são apêndices da epiderme. A epiderme consiste em um epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado e que se encontra em constante renovação. Sua principal função é de barreira protetora contra o ambiente externo e manutenção do conteúdo interno, como os nutrientes, água e os eritrócitos. Não possui sistema de irrigação sanguínea própria, sendo nutrida pelos capilares da derme. Tem espessura média de 40 μm , sendo mais espessa na planta dos pés e palma das mãos (HARRIS, 2012; CASPERS, 2003). Origina estruturas denominadas apêndices, que são as glândulas sudoríparas e sebáceas, unhas, pelos e cabelos.

Os principais constituintes da epiderme são os queratinócitos, células especializadas que, além de produzir queratina, passam por um processo de estratificação, gerando os corneócitos. Os queratinócitos alteram-se conforme passam de uma camada a outra durante a maturação, até serem eliminados. Apresentam como função básica a produção de queratina, responsável pela hidratação da pele. A epiderme possui ainda os melanócitos, células produtoras de melanina responsáveis pela pigmentação da pele, as células de Merkel que atuam como receptores mecânicos na percepção tátil e as células de Langerhans responsáveis pela defesa imunológica do tecido cutâneo. Sua constituição bioquímica é composta por 40% de proteína, 40% de água e 15 a 20% de lipídeos. Apresenta como principal proteína a queratina e a maioria dos lipídeos corresponde a ceramidas, e em menor quantidade o colesterol, ácidos graxos livres, lipídeos neutros, lipídeos polares e esteróis livres, formando as estruturas lipídicas lamelares intercelulares com função de proteção (PRASCH,2000; HARRIS, 2012).

2.1.2.2 JUNÇÃO DERMO-EPIDÉRMICA

A junção dermo-epidérmica está localizada na fronteira entre a camada germinativa e a derme. Por meio da microscopia eletrônica pode-se observar a organização estrutural desta interface: membrana celular das células da camada basal ligadas à lâmina lúcida. Abaixo desta encontra-se a lâmina basal ou lâmina densa que contém filamentos de ancoragem ligados à camada inferior (derme) e por fim, uma camada sub-basal onde se encontram estruturas fibrosas e microfibrilas elásticas que se ligam a derme. Toda essa estrutura da junção dermo-epidérmica concede a mesma as funções de aderência entre as camadas epiderme-derme e ainda suporte mecânico para a epiderme (JUNQUEIRA, 1995; HARRIS, 2012).

2.1.2.3 DERME

Formada por tecido conjuntivo é a camada responsável pela sustentação, elasticidade e estrutura da pele. Sua espessura varia de 500 μm a 4000 μm , e apresenta menor espessura nas mulheres do que em homens e na região anterior em relação ao dorso do corpo (Figura 3). Nesta camada estão incluídas além dos apêndices da epiderme (glândulas sudoríparas e sebáceas e pelos), há também nervos, vasos, anexos e células, como os macrófagos, mastócitos, plasmócitos, linfócitos, leucócitos, miofibroblastos e os fibroblastos. A derme também apresenta caráter de termorregulação, pelo suporte da rede vascular e

defesa imunológica, em associação com as células de Langerhans da epiderme. Apresenta como principal proteína estrutural o colágeno, que corresponde a 90% das proteínas totais da derme, sendo a maioria tipo I e III e também em menor quantidade a elastina, responsável pela elasticidade cutânea. Divide-se em duas camadas a derme papilar e a derme reticular, como ilustrado pela Figura 3 (HARRIS, 2012).

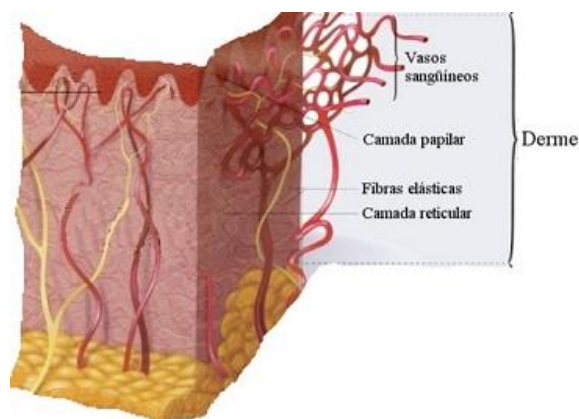


Figura 3 - Esquema representativo das camadas da derme. Fonte: RAMALHO, 2009.

2.1.2.3.1 Derme papilar

Camada da derme situada abaixo da epiderme, onde encontram-se inúmeras interdigitações, denominadas papilas dermais. Constituída por uma fina rede de fibras elásticas e perpendiculares a superfície, chamadas de oxitalanas, que são formadas por elastina imatura e duas glicoproteínas (fibrilina e glicoproteína associada à microfibrila). Sua função é fixar a membrana basal à rede de fibras elásticas da derme. Também está presente em pouca quantidade o colágeno tipo I e na maioria colágeno tipo II, III, IV, V e VII. Nesta região há maior concentração de fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e os nervos que promovem a sensibilidade da pele (HARRIS, 2012; ALI, 2011).

2.1.2.3.2 Derme reticular

É um tecido conjuntivo denso que garante a elasticidade, resistência, estrutura e força da pele. Todos os anexos cutâneos, tais como os folículos pilossebáceos, as glândulas sudoríparas estão amparadas na derme reticular. Possui principalmente o colágeno tipo I para promover força, estrutura e resistência da pele com suas fibras dispostas paralelamente à superfície. Apresenta fibras elásticas que promovem flexibilidade cutânea sendo esta flexibilidade estabilizada pelas fibras colágenas, evitando assim danos na pele (HARRIS, 2012; VENUS, 2010).

2.1.2.4 HIPODERME

Camada formada por tecido adiposo. As células adiposas que formam esta camada servem como isolante térmico, mecânico e reserva energética, além da função estética de modelagem corpórea. Está interligada na derme pelos anexos epidérmicos e por redes vasculo nervosas da derme (Figura 4).

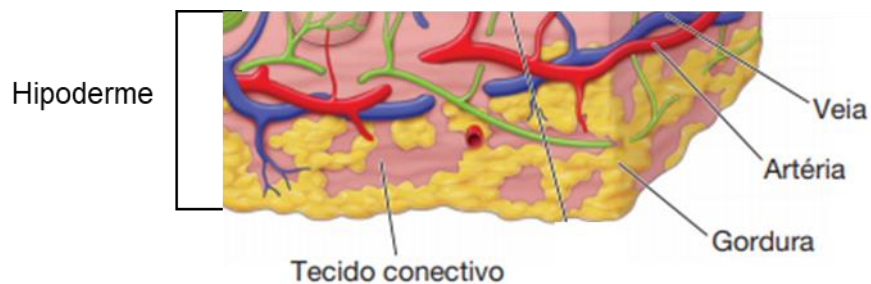


Figura 4 - Esquema representativo da Hipoderme. Fonte: SOUTER, 2013.

2.1.3 CONSTITUINTES DA DERME

2.1.3.1 FIBROBLASTOS

São células responsáveis pela síntese e degradação do tecido conjuntivo. Presente em maior quantidade na derme papilar, com núcleo denso e forma poliédrica e na derme reticular com forma fusiforme e citoplasma rico em organelas (Figura 5), sendo responsável pela biossíntese de colágeno do tipo I.

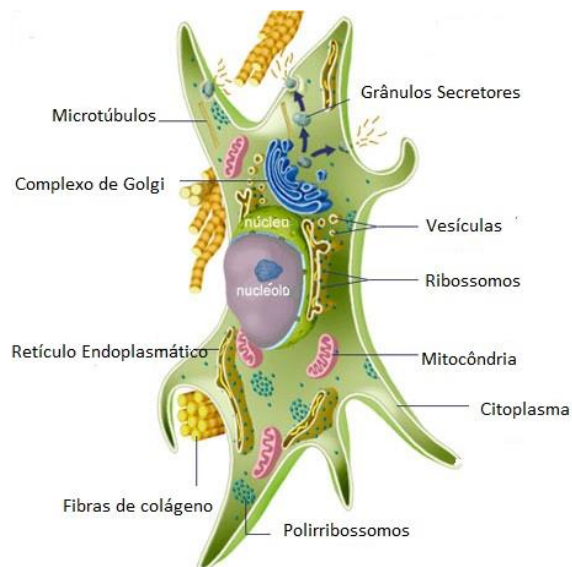


Figura 5 - Esquema representativo do Fibroblasto da pele humana. Fonte: PINTO, 2014.

Os fibroblastos apresentam três fatores de ativação, o fator básico de crescimento do fibroblasto (FGFb), produzido pelos próprios fibroblastos e também por células endoteliais que induz a mitose e a síntese dos componentes da matriz extracelular; o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sintetizado pelas plaquetas e macrófagos que induz a célula a passar da fase G0 para G1 e o fator beta de crescimento e transformação (IL-1), também sintetizado pelos macrófagos que estimulam os fibroblastos a produzir maior quantidade de colágeno. Os fibroblastos sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são capazes de modular sua capacidade metabólica, a qual vai refletir em sua morfologia. As células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, enquanto as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos. Entretanto, quando o indivíduo chega na idade adulta, os fibroblastos não se dividem com frequência, entrando em mitose apenas quando estimulados, sendo chamados de fibrócitos. Há também os miofibroblastos que são células encontradas em cicatrizes e são consideradas intermediárias entre os fibrócitos e as células musculares lisas (BADIN, 1998).

2.1.3.2 MACRÓFAGOS

Em citologia, chamam-se macrófagos as células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lisossomas, que fagocitam elementos estranhos ao corpo. Possuem características morfológicas variáveis que depende de seu estado de atividade funcional e do tecido que habitam. Medem entre 10 e 30 µm de diâmetro e usualmente possuem um núcleo oval ou em forma de rim localizado excentricamente. Os macrófagos derivam dos monócitos do sangue e de células conjuntivas ou endoteliais. São as células do sistema imune, responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T. Também secretam fator de crescimento e citoquinas e estão envolvidas no processo de coagulação e cicatrização (BADIN, 1998).

2.1.3.3 MATRIZ CONJUNTIVA DA DERME

2.1.3.3.1 Colágeno

O colágeno corresponde a 90% da concentração total de proteínas da derme e é a principal proteína estrutural e extracelular do corpo humano. Produzido por fibroblastos, miofibroblastos, células da musculatura lisa e células epiteliais. Para sua síntese várias

reações bioquímicas são necessárias entre elas a hidroxilação dos resíduos dos aminoácidos prolina e lisina processo no qual é dependente da presença de vitamina C, ferro e oxigênio (HARRIS, 2012). Sua molécula básica é um monômero tropocolágeno, com 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro que se organizam em fibras com diâmetro aproximado de 50 nm. Essa proteína é constituída por três cadeias polipeptídicas sendo que cada cadeia é formada por uma sequência três aminoácidos estruturais do tipo Glicina-XY, onde frequentemente X corresponde a prolina e Y a hidroxiprolina agrupadas em torno de si em uma tripla hélice (Figura 6).

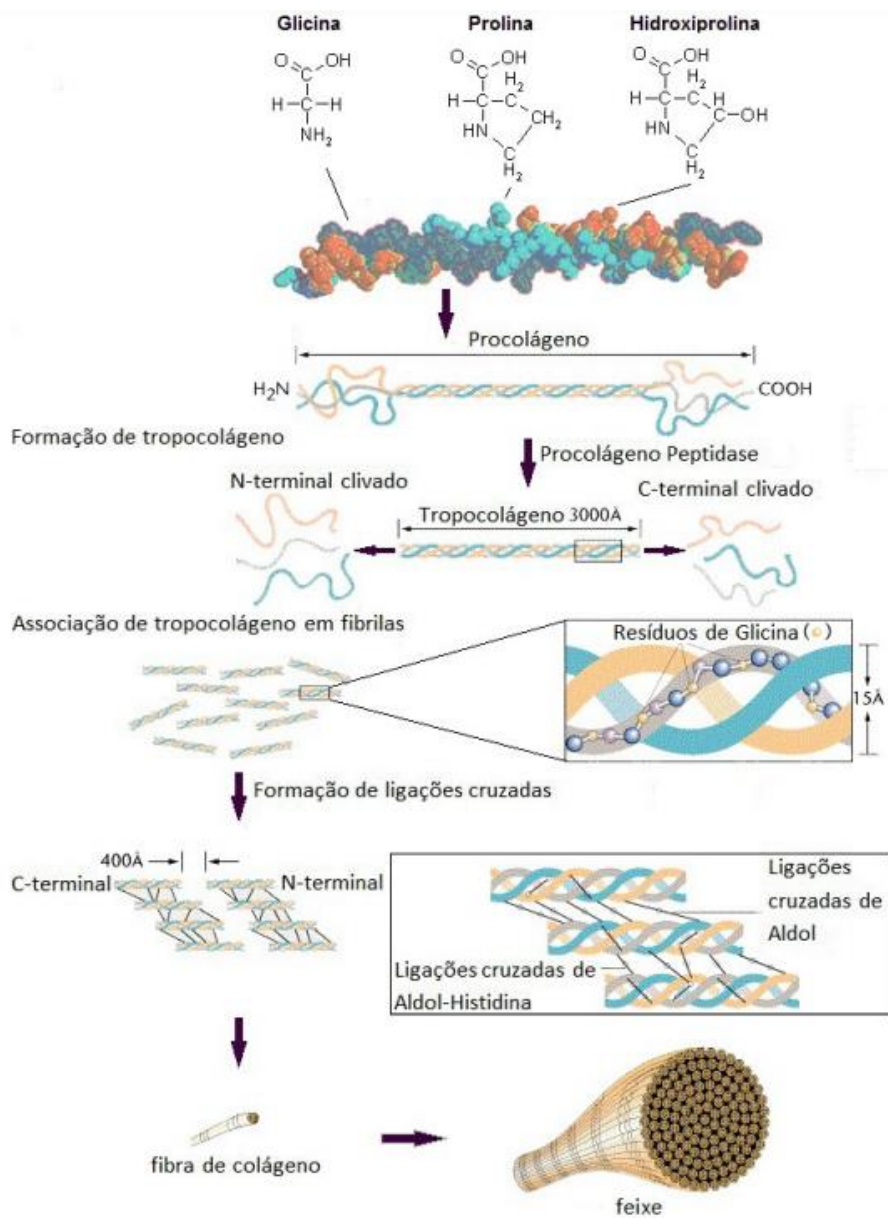


Figura 6 - Processo de formação, organização e estrutura de colágeno. Fonte: SILVA, 2012.

Em porcentagem, um terço corresponde a glicina, outros 15 - 30% à prolina e hidroxiprolina além de outros aminoácidos que complementam a cadeia. Há em média 1000 aminoácidos por cadeia. O colágeno é secretado para a matriz conjuntiva na forma de procolágeno, constituindo três cadeias polipeptídicas unidas que formam a estrutura helicoidal. Na matriz extracelular o procolágeno sofre polimerização para formar o colágeno que é organizado em camadas de fibrilas laminares e trançados em diversos ângulos (NGUYEN, 2013; HARRIS, 2012). Na pele humana 80 % do colágeno é do tipo I, 15% do tipo III e os restantes 5 % existentes do tipo IV, V, VI e VII, XII e XIV (ALI, 2011; CASPERS, 2009). O colágeno tipo I tem como função primordial promover a estrutura dos tecidos em termos biomecânicos e está presente nas fibras mais espessas, sendo constituído por uma cadeia de aminoácidos alfa-2 e duas cadeias alfa-1. O colágeno tipo III, chamado reticulina, encontra-se na derme ao redor de vasos sanguíneos e nervos, apresenta uma estrutura fibrilar, três cadeias alfa-1, formado por cistina e hidroxiprolina. Os colágenos tipo IV e VII compõem a membrana basal, mantêm sua integridade e funcionalidade e são formados por cadeia interrompida e estendida. O colágeno tipo V apresenta estrutura fibrilar, distribuído em toda a derme e o colágeno tipo VI também está presente na membrana basal e encontra-se próximo aos nervos, folículos e vasos sanguíneos. Apresentam cadeias curtas, com estrutura ramificada, que formam uma fina rede espalhada na região entre as grandes fibras de colágeno (Tabela 1) (HARRIS, 2012; NGUYEN, 2013). A conformação particular da tripla hélice de colágeno e o seu arranjo em forma de fibras, podem ser estabilizados por meio de dois diferentes tipos de ligações de hidrogênio, de forma direta, através do grupo N-H do aminoácido glicina de uma cadeia e o grupo C=O de X resíduo de outra cadeia e de forma indireta, que ocorre com maior frequência através das moléculas de água. Esta ligação ocorre no interior da mesma cadeia de aminoácidos e entre duas cadeias de aminoácidos adjacentes, formando ligações de hidrogênio com o grupo carbonilo de todos os aminoácidos ou com o grupo hidroxilo de resíduos do aminoácido hidroxiprolina (NGUYEN, 2013). Na pele o envelhecimento cronológico pode ser determinado pelo colágeno, que sofre mudanças bioquímicas e estruturais ao longo do tempo. Há diminuição na espessura e solubilidade, redução da sua síntese e aumento da razão entre os colágenos do tipo III e I (NGUYEN, 2013).

Tabela 1 - Tipos de colágeno fibrilares e sua distribuição nos tecidos. Fonte: HARRIS, 2012; PINTO, 2014.

Tipo de Colágeno Fibrilar	Fórmula Molecular	Distribuição nos Tecidos
I	$[\alpha 1(I)_2] \alpha 2(I)$	Pele, tendões, ligamentos, córnea, órgãos internos. Corresponde a 90% do colágeno corpóreo e do colágeno cutâneo.
II	$[\alpha 1(II)_3]$	Cartilagem, disco intervertebral, notocorda, humor vítreo.
III	$[\alpha 1(III)_3]$	Pele, vasos sanguíneos, ossos
V	$[\alpha 1(V)_2] \alpha 2(V)$	Pele, tendões, ligamentos, córnea, órgãos internos.
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(IX) \alpha 3(XI)$	Cartilagem, disco intervertebral, notocorda, humor vítreo.

2.1.3.3.1.1 Síntese do colágeno

O colágeno contém aminoácidos específicos-glicina, prolina, hidroxiprolina e arginina. Estes aminoácidos têm um arranjo regular em cada uma das três cadeias destas subunidades de colágeno. A sequência muitas vezes segue o padrão Gly-Pro-X ou Hyp-Gly-X, onde X pode ser qualquer um dos vários outros resíduos de aminoácidos. Prolina ou hidroxiprolina constituem cerca de 1/6 da sequência total. Glicina (Gly) é encontrada em quase cada resíduo de terceiro.

A glicina é responsável por 1/3 da sequência que significa que aproximadamente metade da sequência de colágeno não é glicina, prolina e hidroxiprolina. Prolina (Pro) torna-se cerca de 17% de colágeno. A hidroxiprolina é derivada de prolina e hidroxilisina derivado da lisina. Dependendo do tipo de colágeno, diferentes números de hidroxilisinas são glicosiladas (principalmente tendo dissacarídeos anexados).

A obtenção de colágeno pelos fibroblastos dermais consiste na síntese de cadeias polipeptídicas individuais de colágeno tipo I e III conhecidas como moléculas precursoras chamadas procolágeno. Durante a formação das fibras de colágeno insolúvel, proteases específicas clivam os domínios carboxi e amino terminais, originando colágeno - N (pN), procolágeno originado pela clivagem do propeptídeo carboxi terminal, e colágeno - C (pC), procolágeno originado da clivagem do propeptídeo amino terminal, respectivamente. Procolágeno tipo I e III, colágeno pN e colágeno pC são moléculas precursores do colágeno maduro, geralmente os níveis destas moléculas reflete no nível de colágeno.

A síntese de colágeno tipo I, como a de qualquer proteína, se inicia no núcleo onde os genes codificadores das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são ativados e produzem os respectivos RNA mensageiros (Figura 7 - Passo 1). Estes se deslocam do núcleo para o citoplasma, onde são

traduzidos em cadeias polipeptídicas que são imediatamente internalizadas nas cisternas do retículo endoplasmático (Figura 7 - Passo 2). No interior do retículo estes polipeptídeos sofrem processamento, sendo que o evento mais importante inclui a hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina (Figura 7 - Passo 3). Posteriormente lisina hidroxilada (hidroxilisina) ainda sofre um processo de glicosilação (Figura 7 - Passo 4). Cada cadeia α contém peptídeos de registro nas suas extremidades, que garantem o alinhamento correto destas cadeias, bem como previnem a formação de fibrilas no interior da célula. As cadeias α se organizam no interior do retículo endoplasmático em grupos de 3, formando as moléculas de procolágeno, precursora da molécula de colágeno madura. Os resíduos de hidroxiprolina garantem a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias α , mantendo a coesão entre as mesmas (Figura 7 - Passo 5). As moléculas de procolágeno são então secretadas dos fibroblastos por meio de vesículas (Figura 7 - Passo 6). Na matriz extracelular as moléculas de procolágeno são digeridas (clivadas) por uma enzima também produzida e secretada pelos fibroblastos, o procolágeno peptidase (Figura 7 - Passo 7). Finalmente o tropocolágeno se associa espontaneamente para formar as fibrilas de colágeno (isso também ocorre nas moléculas de colágeno II e III). Certas proteoglicanas e glicoproteínas estruturais desempenham papel importante na agregação do tropocolágeno para formar as fibrilas e mesmo as fibras de colágeno (Figura 7 - Passo 8) (DUARTE, 2011).

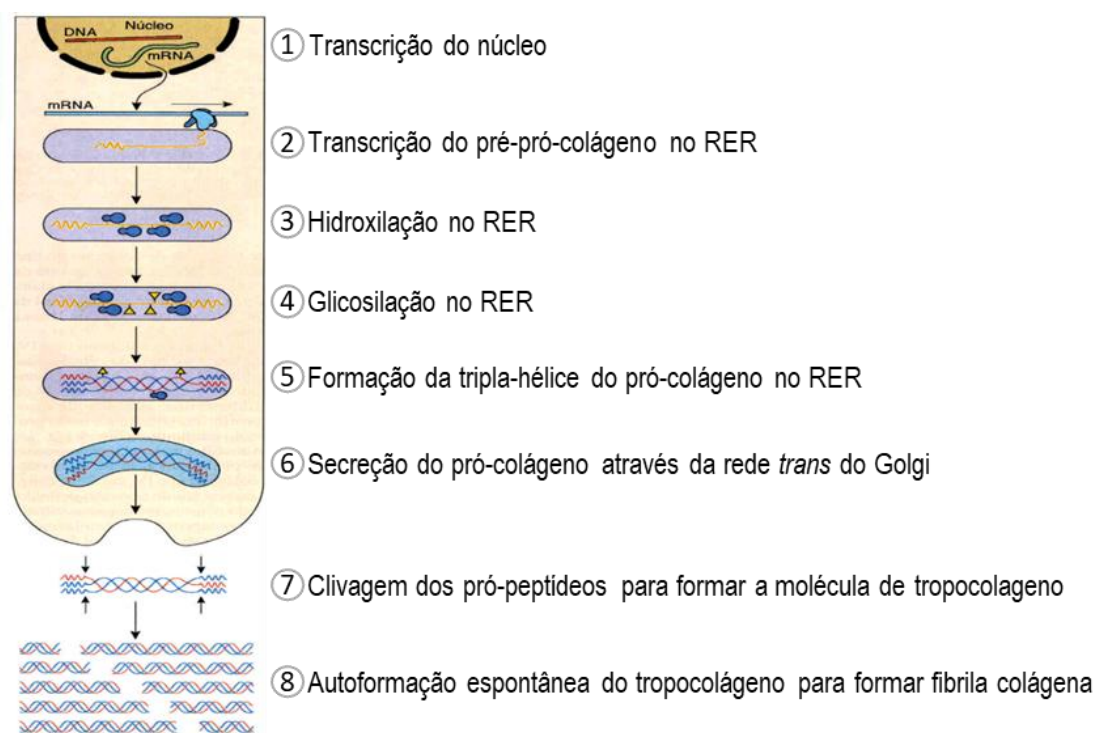


Figura 7 - Esquema representativo da síntese de colágeno tipo I. Fonte: DUARTE, 2011.

A agregação final do pró- colágeno e a conseqüente formação de fibrilas requerem a remoção dos domínios N e C terminais para formação de moléculas de tropocolágeno. Esta clivagem é realizada pelas proteinases extracelulares C- e N- garantindo a agregação espontânea das moléculas de tropocolágeno que se agruparão em polímeros dando origem às fibrilas que se associarão em feixes maiores formando então as fibras de colágeno (DUARTE, 2011).

A disposição ordenada das moléculas de tropocolágeno para formação das microfibrilas ocorre de forma regular e específica onde a quinta molécula coincide com a primeira (Figura 8), contribuindo para que as fibras colágenas, posteriormente originadas, obtenham um padrão estriado.

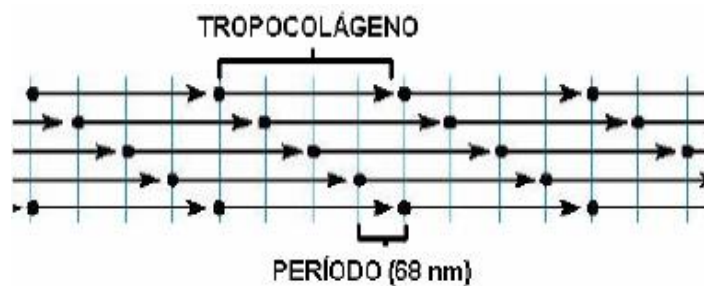


Figura 8 - Representação esquemática das microfibrilas, onde cada seta corresponde a moléculas de tropocolágeno. Fonte: DUARTE, 2011.

Esta configuração estriada se dá devido à presença de interações de grupos apolares e polares. Tais forças são suficientes para agrupar as microfibrilas, entretanto, não conferem estabilidade mecânica suficiente ao colágeno que só é alcançada pela formação de ligações cruzadas covalentes intra ou intermoleculares (Figura 9) (DUARTE, 2011).

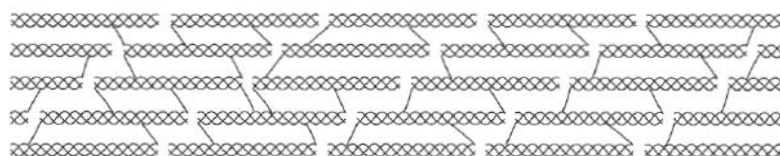


Figura 9 - Ligações cruzadas entre moléculas de tropocolágeno. Fonte: DUARTE, 2011.

Sendo o colágeno um dos constituintes majoritários na composição da derme, principalmente o colágeno do tipo I (85-90%) (MCGRATH, 2010), o espectro Raman da derme assemelha-se ao do colágeno tipo I, com importante influência das interações colágeno-água (ZHANG, 2011). Na maioria dos estudos Raman realizados na derme, os

principais picos relacionados ao colágeno podem ser observados, com isso estudos mais específicos podem ser realizados.

2.1.3.3.2 Fibras Elásticas

Sintetizadas por fibroblastos são formadas por microfibrilas que são proteínas de estrutura fibrilar e elastina que consiste em uma proteína de aspecto amorfo. Apresenta como função realizar as propriedades retráteis e elásticas do tecido cutâneo e encontram-se geralmente associadas ao colágeno para que este possa controlar a extensibilidade e evitar a lesão cutânea além de ajudar na sustentação. Encontram-se dispostas irregularmente na derme reticular (ALI, 2011; HARRIS, 2012).

2.1.3.3.3 Substância Fundamental (Matriz Extracelular)

A substância fundamental é essencial para o bom funcionamento da pele, pois funciona como um suporte para locomoção das células, permite a ligação das células em tecidos e funciona como um reservatório para muitos hormônios que atuam no crescimento e na diferenciação celular. É constituída por proteínas especializadas multiadesivas, solúveis que são a fibronectina, laminina e fibrilina e por proteínas estruturais que são a elastina e o colágeno, insolúveis, que proporcionam resistência e força e também pelos mucopolissacarídeos sulfatos, os condroitinsulfatos e os mucopolissacarídeos ácidos, principalmente o ácido hialurônico que atua na regulação hídrica da pele (BADIN, 1998).

2.2 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

A ocorrência de alterações moleculares e celulares de forma contínua e progressiva na pele acarretam o envelhecimento da pele, esse processo é complexo e determinado por fatores endógenos, genéticos e extrínsecos, sendo multifatorial. Com o envelhecimento da pele, ocorre a diminuição progressiva da capacidade de manter a homeostase corpórea, diminuição da biossíntese e proliferação celular, desencadeando atrofia da epiderme e da matriz extracelular dérmica, redução da mitose nos queratinócitos basais, envelhecimento dos fibroblastos na derme e uma síntese lenta do colágeno (BAGATIN, 2008; PAGEON, 2010).

Estudos comparativos entre a pele de indivíduos jovens e idosos, mostram uma menor transferência de nutrientes entre as camadas da pele e diminuição na absorção de substâncias em indivíduos idosos. Essas características observadas afetam diretamente no

tempo de renovação celular e reparo tecidual, onde esse tempo pode ser de duas a três vezes mais lentos em indivíduos idosos (SANTOS, 2016; CAETANO, 2016, PEZZOTI, 2015). Outro estudo revela que a partir dos 60 anos de idade há pouca adesão entre as camadas da epiderme e derme, corroborando com o fato de idosos possuírem menor resistência a traumas cutâneo (PEZZOTI, 2015).

O envelhecimento se divide em cronológico/intrínseco e fotoenvelhecimento/extrínseco.

O envelhecimento cronológico ou intrínseco é o que ocorre de forma natural e acumulativa com o passar do tempo e é comum a todos os seres humanos, esse tipo de envelhecimento é previsível e evolutivo, sendo o mesmo impossível de ser revertido ou parado. É caracterizado pela redução da resistência e elasticidade, atrofia da pele, aumento da heterogeneidade das células basais, diminuição da atividade mitótica, redução da espessura da derme, achatamento da junção dermo-epidérmica, substituição lenta de lipídeos, surgimento de rugas, entre outras alterações. Sendo esse processo determinado majoritariamente por fatores genéticos.

O envelhecimento extrínseco está relacionado a fatores externos, como fotoenvelhecimento, uso de tabaco, poluição do ar, estresse, consumo excessivo de álcool, falta de prática de exercício físico periódica e alimentação desequilibrada. As alterações relacionadas ao envelhecimento extrínseco da pele se somam as alterações do processo intrínseco, causando um efeito cumulativo e maiores danos a pele. Os tipos de alterações do processo extrínseco são basicamente os mesmos vistos no processo intrínseco (BAGATIN, 2008).

2.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SOLAR NA PELE

A exposição cumulativa a luz solar é considerada um fator extrínseco no processo de envelhecimento cutâneo. O fotoenvelhecimento, como também conhecido, pode ocasionar ou mesmo intensificar as alterações na pele, como por exemplo, a perda de elasticidade, aparecimento de rugas, alterações na pigmentação, entre outros. Os efeitos do envelhecimento intrínseco e extrínseco progridem lentamente ao longo dos anos e décadas (QUAN, 2015). Eles são distintos nas características clínicas, mas compartilham certas características bioquímicas e celulares⁹ que levam a interferências mútuas (QUAN, 2015; RITTIÉ, 2015).

Os danos gerados pela exposição solar de forma cumulativa podem variar de acordo com o fototipo do indivíduo. A pele humana pode ser classificada em seis fototipos distintos, sendo que sua classificação é relacionada a quantidade de melanina, refletida em distintas tonalidades (HARRIS, 2012).

Tabela 2 - Classificação da pele humana de acordo com o fototipo, seguindo a escala de Fitzpatrick. Fonte: ASTNER, 2003

Classificação	Cor	Chance de Queimadura	Chance de Bronzeamento	Sensibilidade ao Sol
I	Branca-Pálida	Extrema	Nenhuma	Extrema
II	Branca	Alta	Baixa	Alta
III	Morena Clara	Moderada	Moderada	Moderada
IV	Morena Moderada (Castanha)	Moderada	Moderada	Moderada
V	Morena Escura (Parda)	Baixa	Alta	Baixa
VI	Negra	Nenhuma	Extrema	Nenhuma

Diagrama de cores para os tipos de pele I a VI, mostrando uma progressão de tons de branco a negro.

A exposição aos distintos comprimentos de onda emitidos pela radiação solar, podem provocar inúmeros efeitos a pele do indivíduo. Cada faixa do comprimento de onda emitido, interage de formas distintas com a pele. A região de emissão dos comprimentos de onda entre 280 a 320 nm, interage com os queratinócitos e é absorvida na camada mais superficial da pele, a epiderme. A região de emissão dos comprimentos de onda entre 320 a 400 nm, interage e causa lesão nos queratinócitos e os fibroblastos na derme. Além do fato que a estrutura genética intrínseca sofre danos celulares acumulativos (estresse oxidativo) (JUNQUEIRA, 2012). Outros estudos mostram que a radiação do ultravioleta ocasiona o processo de fotoenvelhecimento, levando à perda de elasticidade, atrofia, ressecamento da pele, rugas e até mesmo pigmentação excessiva. A radiação solar ultravioleta também ativa os receptores dos fibroblastos e queratinócitos e os mesmos produzem citocinas, que induzem a apoptose dessas células (RITTIÉ, 2015). O câncer de pele também pode ser proveniente de uma exposição crônica a luz do sol, sendo que esse câncer pode ser do tipo benigno ou maligno (RITTIÉ, 2015).

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 (MAHMOUD, 2008).

Outro estudo mostra que a radiação infravermelha associada ao calor induzem o processo de angiogênese cutânea e inflamatória celular, afetando a matriz extracelular dérmica. Caetano e colaboradores em 2016, demonstraram que a o conteúdo no colágeno é danificado, na ocorrência de radiação infravermelha, sendo isso ocasionado pelo aumento da matriz metaloproteinases.

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 (EBERLI, 2015; TANAKA, 2012).

A pele intrinsecamente envelhecida é caracterizada por numerosas rugas finas (KERSCHER, 2009) enquanto a pele fotoenvelhecida é dominado por rugas profundas, pele flácida e aumento de manchas pigmentação (QUAN, 2015; KERSCHER, 2009; WLASCHEK, 2001). No envelhecimento intrínseco da pele, as propriedades de ligação de água na derme não mudam dramaticamente (GNIADCKA, 1998). No entanto, o número de moléculas de água que não estão ligadas às proteínas aumenta (GNIADCKA, 1998), formando água bruta ou tetraedro (MAEDA, 1995; NIELSEN, 1979). O conteúdo total de água aumenta com a idade (NAKAGAWA, 2010; KLIGMAN 1979; PEARCE, 1972). Neste mesmo estudo, também foi observado que a pele fotoenvelhecida apresenta maior conteúdo de água livre na derme, comprovando que são efeitos sinérgicos (KOURBAJ, 2020).

Como é possível observar na Figura 10, as radiações da região do ultravioleta penetram menos na pele quando comparada com as radiações do infravermelho. Essa é uma constatação teórica baseada no conceito de que quanto maior o comprimento de onda, maior a sua penetração. Contudo para sistemas biológicos deve-se considerar que as camadas da pele são extremamente complexas e compostas por inúmeros constituintes que podem absorver diferentes comprimentos de onda. Além deste fato, é necessário considerar que a energia dos fótons irradiados pelo sol e que atingem a pele podem facilmente penetrar

até as camadas mais profundas da pele. Por esse motivo, diversos estudos relatam interações da luz ultravioleta em constituintes localizados nas camadas mais profundas da pele, da mesma forma que as interações da luz infravermelha também são observadas nas camadas mais superficiais (PEZZOTI, 2015; LEROY, 2014; ALI, 2013; GREVE, 2008; CHIRT,2005).

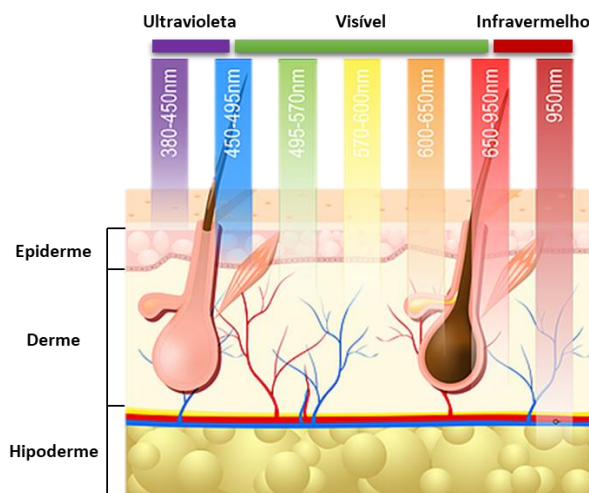


Figura 10 - Penetração dos distintos comprimentos de onda emitidos pela radiação na pele humana.

2.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Em 1923, Smekal postulou de forma teórica o fenômeno de espalhamento inelástico, mas foi em 1928 que pela primeira vez o físico indiano Chandrasekhara V. Raman comprovou experimentalmente esse fenômeno após uma série de experimentos, que consistiam na iluminação de diferentes meios (sólidos, líquidos e gasosos), utilizando uma lâmpada de mercúrio. A luz espalhada pela amostra era analisada por um espectrógrafo e apresentava algumas linhas e bandas diferentes do espectro da luz da lâmpada de mercúrio. Estas diferenças apresentavam deslocamentos simétricos de frequências em relação às linhas da radiação incidente, polarização independente da frequência de excitação e o número de linhas que apareciam no lado de maior comprimento de onda eram mais intensas e numerosas do que as linhas que apareciam no lado oposto à linha da radiação incidente. Desta forma, Raman concluiu que as frequências deslocadas representavam as frequências de oscilação das moléculas da amostra dependentes de suas ligações químicas e geometria. Por essa descoberta, em 1930 o físico indiano recebeu o prêmio Nobel e este novo fenômeno de espalhamento foi chamado de efeito Raman. A espectroscopia Raman baseasse na medição do espalhamento inelástico (efeito Raman) de uma radiação

monocromática que incide sobre a molécula. Um dos grandes saltos evolutivos da técnica de espectroscopia Raman, foi com a descoberta do laser em 1960, por ser uma radiação incidente monocromática, coerente, de pouca divergência e polarização linear, favorecendo os estudos de caracterização e identificação de diversos materiais.

O efeito Raman é um mecanismo que segue o princípio da conservação de energia. Se o fóton da radiação incidente possui mesma energia que o fóton espalhado pela amostra, após sofrer interação com a mesma, a radiação espalhada apresenta frequência igual à da radiação incidente (espalhamento Rayleigh); se o fóton incidente perde energia ao interagir com as moléculas da amostra então a radiação espalhada aparecerá no espectro com menor frequência (espalhamento Stokes), onde a diferença entre a energia incidente e a espalhada é absorvida pela amostra que sofre uma transição para níveis vibracionais mais altos; se o fóton incidente interage com as moléculas da amostra já no estado excitado pode receber energia deixando as moléculas em níveis de energia mais baixo (espalhamento anti-Stokes). Frequentemente a região Stokes do espectro Raman é mais intensa do que a região anti-Stokes uma vez que a maioria dos elétrons se encontra no estado vibracional em temperatura ambiente, aumentando assim sua probabilidade de ocorrência.

Na maioria dos experimentos Raman, a radiação incidente não está próxima ou exatamente no mesmo comprimento de onda de absorção e, portanto, não haverá acesso a um estado de excitação real (estado estacionário). O estado excitado observado na espectroscopia Raman é chamado de estado virtual, ou até mesmo imaginário. Esse estado é chamado desta forma por ser considerado um estado momentâneo e dependente da incidência de radiação para seu surgimento, diferentemente dos outros estados excitados que podem ser descritos pela mecânica quântica. Esse estado possui diversas interpretações de sua existência e formas de descrevê-lo matematicamente.

O estado virtual pode ser descrito como uma soma ou superposição de estados excitados reais, ou estados estacionários, de seu hamiltoniano. Esse estado não é um autoestado de seu hamiltoniano, portanto, sua energia é indefinida.

Para sistemas quânticos, os estados próprios de energia são geralmente obtidos resolvendo a equação de onda de Schrodinger independente do tempo. Os estados quânticos obtidos são estacionários e correspondem a valores de energia bem definidos. Em contraste, na espectroscopia Raman, os estados virtuais não são estados estacionários e não são soluções da equação de onda independente do tempo e não correspondem a um valor próprio de energia bem definido. Esses estados virtuais são introduzidos por

conveniência matemática na teoria de perturbação, onde são descritos por uma combinação linear dos autoestados eletrônicos do sistema com uma grande incerteza de energia e uma pequena vida útil para compensar a incerteza do princípio. Esses estados são usados para mediar a transição de um sistema quântico de seu estado inicial para o estado final. Em outras palavras, a soma de todos os estados virtuais resulta na transição de um sistema quântico de seu estado estacionário inicial para um estado estacionário final. Na Figura 11 mostra-se o diagrama de níveis de energia para o espalhamento Raman (JORIO, 2011).

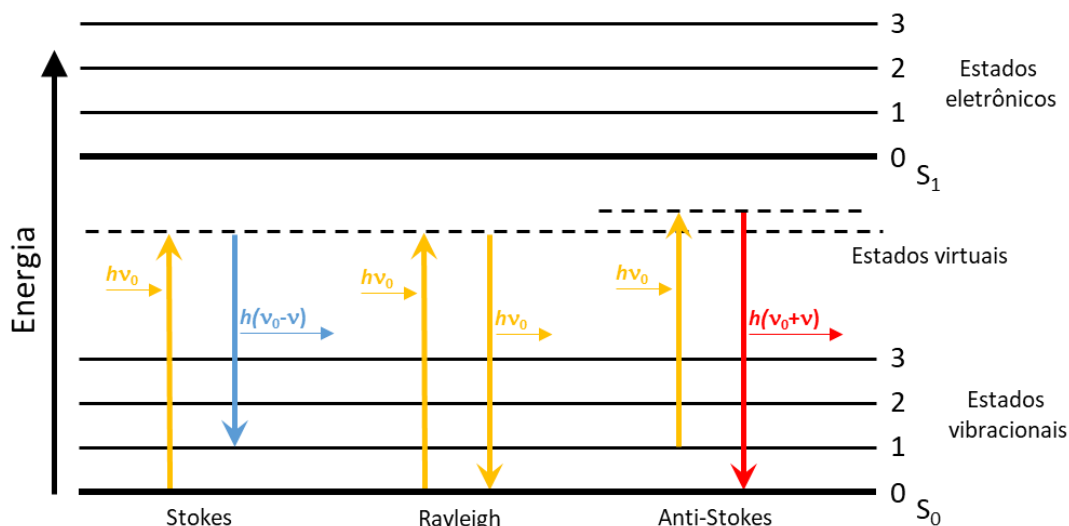


Figura 11 - Esquema dos estados de energia vibracionais e energia da luz nas espectroscopias Raman (ν_0 = Frequência da radiação incidente, ν = frequência vibracional, h = constante de Planck).

É o deslocamento no comprimento de onda da radiação espalhada inelasticamente (Stokes e anti-Stokes) que fornece as informações químicas e estruturais. Os fótons Raman podem ser de maior ou menor energia, dependendo do estado vibracional da molécula em estudo. Denomina-se Stokes, quando a energia da radiação espalhada (espalhamento Raman) é menor do que a radiação incidente e anti-Stokes quando a energia da radiação espalhada é maior do que a radiação incidente. Normalmente as medidas empregando a espectroscopia Raman são realizadas analisando-se os espalhamentos do tipo Stokes, isso porque as linhas anti-Stokes são menos intensas do que as linhas Stokes. O motivo desta diferença de intensidade está relacionado com a população das moléculas no estado fundamental. Em temperatura ambiente a grande maioria das moléculas estarão em seu estado de menor energia, alterando para um estado mais energético (estado virtual) apenas quando ocorra incidência de uma radiação externa. Em contrapartida, para ocorrência do

fenômeno anti-Stokes as moléculas precisam estar excitadas (estado vibracional) antes da irradiação para dar origem às linhas anti-Stokes. Portanto, o fenômeno Stokes possui maior probabilidade de ocorrência devido sua alta população no estado fundamental, e menor probabilidade de uma molécula já estar excitada no momento da incidência de uma radiação Raman, fenômeno anti-Stokes. Desta forma, as linhas Stokes possuem maior intensidade sendo mais facilmente detectadas pelo instrumento Raman.

A aplicação mais frequente utilizando ambos os espalhamentos Stokes e anti-Stokes diz respeito a determinação da temperatura a partir da razão de intensidade das linhas Stokes e anti-Stokes do mesmo pico Raman. Mesmo que a posição e largura de uma linha Raman variem com a temperatura, apenas a dependência da relação de intensidade de Stokes / anti-Stokes pode ser explorada de forma eficiente para medir em tempo real e localmente a temperatura. Em particular, esta metodologia pode ser usada para estimar a temperatura gerada apenas pelo efeito da radiação luminosa (KAUFFMANN, 2019). Outras aplicações também podem ser desenvolvidas a partir da correlação das linhas Stokes e anti-Stokes, como por exemplo, no estudo de informação quântica, onde tais fótons surgem como uma importante fonte de pares de fótons correlacionados a implementação da memória quântica de uma molécula (JUNIOR, 2016) e no estudo em materiais de carbono para revelar a relação entre suas estruturas de banda eletrônica características e a dispersão de fônons (CONG, 2018).

A representação espectral do diagrama da Figura 11 pode ser observada na Figura 12.

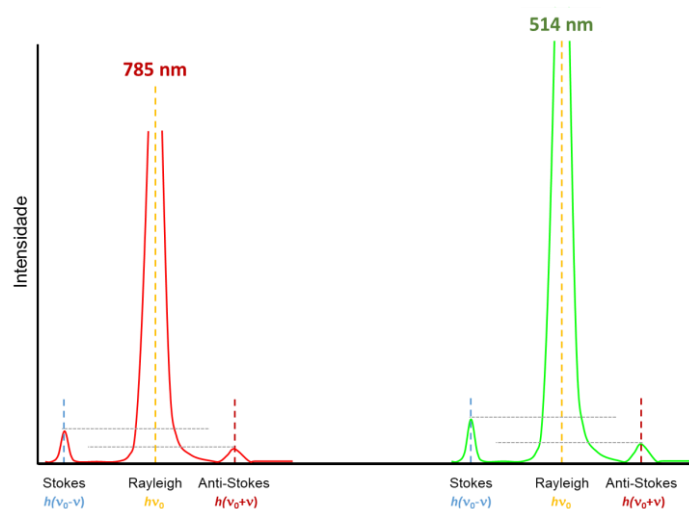


Figura 12 - Espectro Raman ilustrativo. Espalhamento inelástico Stokes (menor energia) e anti-Stokes (maior energia) e espalhamento elástico Rayleigh. Linhas cinza tracejadas: diferença de intensidade entre Stokes e anti-Stokes. (ν_0 = Frequência da radiação incidente, ν = frequência vibracional, h = constante de Planck).

O estudo de uma molécula diatômica pode ser simplificado pelo modelo do oscilador harmônico onde os núcleos estão ligados entre si por uma mola (ligações químicas) com constante de força k . Assim, quando os átomos oscilam, em torno de uma posição de equilíbrio, variando a distância internuclear, a representação é dada por uma curva de energia potencial. A frequência de oscilação desta molécula diatômica é dada por $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$, onde μ é a massa reduzida ($\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$).

Para sistema com moléculas poliatômicas o modelo clássico também se limita em explicar o movimento destas. Cada átomo possui 3 graus de liberdade correspondentes aos movimentos nas direções x , y e z . Como a espectroscopia Raman refere-se a movimentos vibracionais, 3 graus de liberdade translacional e outros 3 graus para o movimento rotacional em moléculas lineares podem ser descartados resultando em $3N-6$ graus de liberdade relacionados aos modos vibracionais fundamentais. Em moléculas lineares o resultado corresponde a $3N-5$.

Em geral é necessário o uso da Teoria de Grupos para saber se um modo vibracional é ativo ou não. Estas vibrações dependem das mudanças angulares entre os átomos e da direção das ligações tirando-os da posição de equilíbrio. As simetrias definidas pelas características espaciais das moléculas definirão como a molécula poderá vibrar, com isso, uma molécula pode ter diversas frequências de vibração (Figura 13).

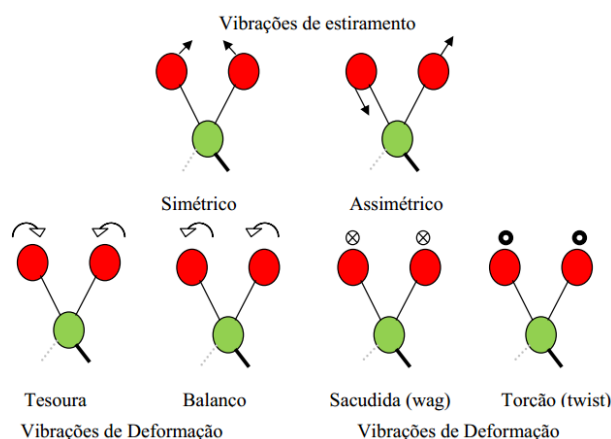


Figura 13 - Modos de vibração entre átomos. O símbolo \odot indica vibração perpendicular fora do plano; o símbolo \otimes indica vibração perpendicular entrando no plano.

A espectroscopia Raman oferece contribuições notáveis para o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia proporcionando informações da estrutura molecular de modo minimamente invasivo, com alta resolução espectral e em tempo real.

Apesar destas características, unido ao efeito Raman se produz também a Fluorescência (fenômeno de absorção da luz). A Fluorescência ocorre quando a radiação incidente é absorvida pelo material e os elétrons passam para estados eletrônicos excitados onde permanecem algumas dezenas de nanosegundos até saltarem para outro estado excitado de menor energia liberando um fóton de frequência mais baixa que o incidente. Nos espectros Raman a Fluorescência apresenta-se como uma suave curva na linha de base do espectro e a intensidade pode ser alta a ponto de mascarar as bandas Raman. Outros fatores, caracterizados como artefatos ao espectro Raman podem interferir no espectro, tais como: detecção de raios cósmicos por parte do detector, outras fontes de luz externas, montagem óptica incorreta, desalinhamento, entre outros. Na Figura 14 é mostrado o aparecimento dos principais artefatos em um espectro Raman.

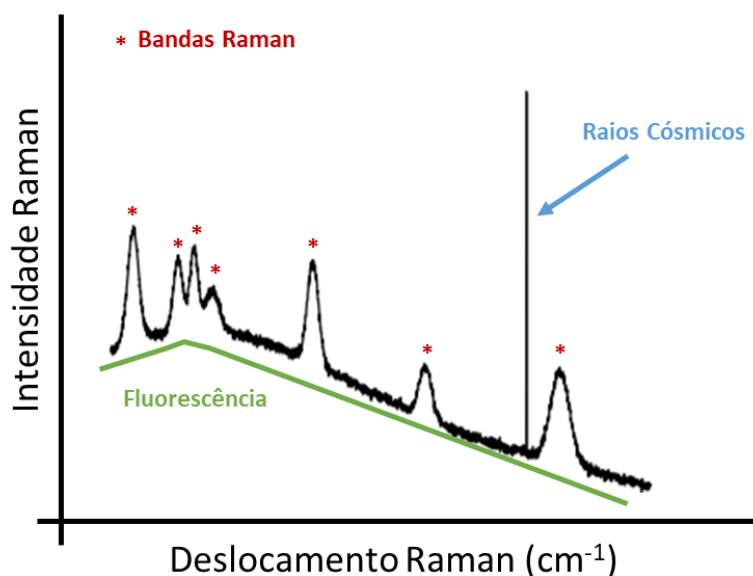


Figura 14 - Principais ruídos na espectroscopia Raman.

2.4.1 APLICAÇÕES DA MICROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman vem se destacando em diversas linhas de pesquisa como uma ferramenta de caracterização e classificação dos diferentes tipos de materiais. Na biomedicina, destaca-se no diagnóstico de câncer, estudos da pele e suas interações com fármacos, odontologia, entre outros.

Atualmente, técnicas ópticas têm sido utilizadas para o estudo da pele humana, com a vantagem de não afetar sua composição molecular, morfologia e integridade. Dentre essas técnicas a espectroscopia Raman in vivo permite detectar em tempo real as alterações bioquímicas presentes no tecido cutâneo, com grande sensibilidade e especificidade e sem

necessidade de dissecação do tecido (TOSATO, 2010; CASPERS, 2000 CASPERS, 2009). Adicionalmente a técnica Raman apresenta vantagens como minimamente invasiva, alta resolução espectral, rápida, precisa e mais sensível quando comparadas as técnicas consideradas padrão ouro nos estudos de pele. Essas vantagens ocorrem devido ao fenômeno de interação causado pela luz incidente (laser) e a matéria. Essa interação luz-tecido, fornece informações bioquímicas sobre a estrutura analisada, criando uma própria assinatura espectral. Podem ser analisados os carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos entre outras moléculas de baixo peso molecular fornecendo informações espectrais que codificam vários dados utilizáveis tanto para o diagnóstico como para a terapia. Através desta técnica, é possível estabelecer padrões de concentração dos constituintes naturais responsáveis pelo processo de envelhecimento cutâneo, como as proteínas (CASPERS 2000; WASCOTTE, 2007). A Espectroscopia Raman Confocal em sido utilizada recentemente no estudo da pele em várias pesquisas (CASPERS, 2000). Um estudo piloto foi realizado na pele humana in vivo por Chrit e colaboradores em 2006, percebendo as mudanças na estrutura e composição do estrato córneo, em diferentes regiões da pele em função de sua profundidade a fim de avaliar nas diferentes camadas da pele o gradiente de concentração de água (CHRIT, 2006). O trabalho de Mélot e colaboradores em 2009, demonstrou o perfil de distribuição da vitamina A na pele através da espectroscopia Raman confocal (MELOT, 2009). Neste contexto, esta técnica tem alcançado ótimos resultados e sua aplicação em diferentes estudos da pele humana tem sido cada vez mais importante.

Estudos relacionados a exposição solar e ativos com função solar protetora, também foram realizados. Dentre estes, podemos citar o trabalho realizado por Tosato e colaboradores em 2012, no qual avaliou a penetração dos princípios ativos micosporina e gadusol, géis extraídos de algas do litoral Atlântico, na pele de voluntárias. Os ativos, tinham as funções de proteção solar e antioxidante, respectivamente, no qual apresentaram resultados promissores quanto sua semelhante profundidade de penetração, fator esse, necessário para uma ação específica na região de interesse da pele (TOSATO, 2012).

Em estudo correlato, avaliou a penetração de alguns tipos de filtros protetor solar na pele humana. Os resultados obtidos mostraram que os produtos analisados penetraram até a camada do estrato córneo em medidas in vivo na pele.

Avaliando os efeitos do envelhecimento cronológico *versus* os efeitos do fotoenvelhecimento, Caetano e colaboradores em 2017, estudaram esses efeitos na derme através da técnica Raman confocal. Realizando medidas no antebraço e braço, áreas de

envelhecimento cronológico e fotoexposta, respectivamente, observou que as regiões espectrais entre 798 e 994 cm^{-1} , atribuída a região de prolina e hidroxiprolina, são úteis para a análise das alterações de colágeno através do processo intrínseco de envelhecimento (cronológico), enquanto o fotoenvelhecimento é melhor observado pela razão de intensidades entre os picos Raman de 1275 / 1450 cm^{-1} , modos vibracionais atribuídos a amida III e amida I, respectivamente (CAETANO, 2017).

Com base nos diversos estudos publicados com o uso da técnica de espectroscopia Raman confocal, pode-se inferir que essa técnica é uma ferramenta analítica, semi-quantitativa e não destrutiva, com potencial de auxílio e melhoria no entendimento bioquímico da pele e suas respectivas camadas.

2.5 ANÁLISE MULTIVARIADA

2.5.1 QUIMIOMETRIA

Com a evolução dos computadores e instrumentos computadorizados, a quantidade de dados obtidos aumentou de forma significativa, a obtenção desses dados tornou-se rápida (VANDEGINSTE, 1998) e a quimiometria vai ao encontro dessa situação como uma ferramenta viável na resolução desses problemas. Conforme o objetivo de estudo, a quimiometria pode ser dividida em várias áreas como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, métodos de inteligência artificial, calibração multivariada, dentre outras (FERRÃO, 2011; VANDEGINSTE, 1998). Dentre as áreas apresentadas acima, as de maior destaque são: planejamento e otimização de experimentos na qual se busca encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre essas variáveis (FERREIRA, 1999); calibração multivariada, que se busca estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade (concentração, por exemplo) (FERREIRA, 1999); reconhecimento de padrões e classificação de dados em que a partir de uma grande quantidade de informações (medidas químicas ou espectrais, por exemplo) sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras (objetos) que são similares entre si e, assim, detectar tendências nos dados (FERREIRA, 1999). Em geral, estes métodos têm sido aplicados com sucesso na visualização dos dados, na classificação, na resolução de curvas multivariadas e na predição em química analítica, química ambiental, engenharia, investigação médica e na indústria (LIU, 2009; BENNINGHOFF, 1997). Nesse

trabalho trataremos sobre a Análise Hierárquica de *Clusters* (HCA, do inglês, Hierarchical Cluster Analysis), Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, Principal Components Analysis) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês, Partial Least Squares for Discriminant Analysis).

2.5.2 ANÁLISE HIERÁRQUICA DE *CLUSTERS* - 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 (RENCHER, 2002).

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 (HELPER, 2006). A análise procura maximizar a homogeneidade dos indivíduos dentro dos grupos, como também alcançar a máxima heterogeneidade entre os grupos, como pode-se observado na Figura 15. O intuito é buscar as grandes variações entre os dados, resultando em uma separação aceitável em *clusters*, devido ao alto grau de similaridade, mas que também sejam o mais distinto possível do *cluster* vizinho. 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 (RENCHER, 2002).

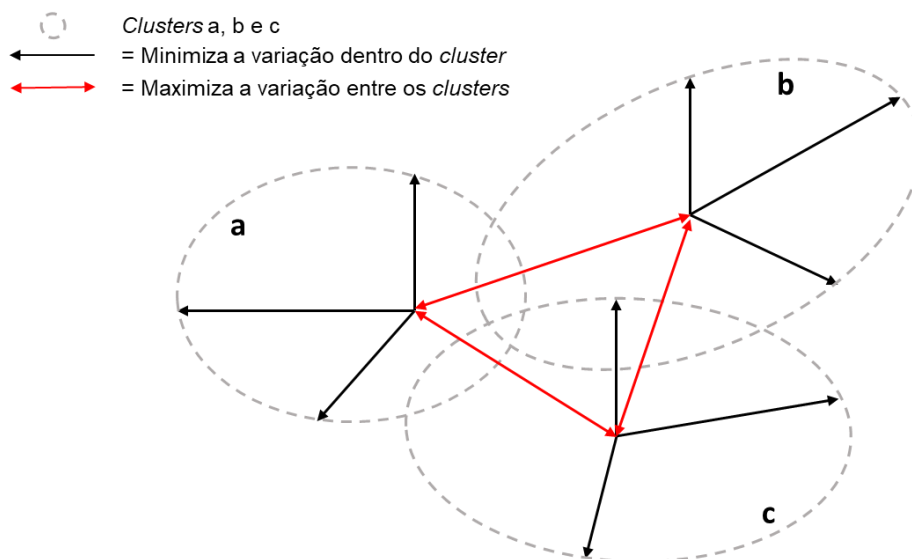


Figura 15 - Máxima homogeneidade de indivíduos dentro de grupos e máxima heterogeneidade entre os grupos.

2.5.2.1 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:

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

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

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

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 têm cluster naturais, utiliza-se por isso geralmente a distância euclidiana (ZANETTI, 2014).

Após os cálculos de distâncias e obtenção de vetores representativos a similaridade dos dados. Outros métodos são utilizados para a construção dos clusters, sendo as técnicas aglomerativas as mais abordadas em análise multivariada. Existem duas formas de técnicas aglomerativas, o modo hierárquico que é responsável por identificar agrupamentos e o provável número g de grupos e o modo não hierárquico quando esse número g é pré-especificado (ZANETTI, 2014).

Dentre as técnicas aglomerativas, destacam-se diferentes métodos como, *Single Linkage*, *Complete Linkage*, *Average Linkage*, *Centroid*, *Median* e *Ward* (ZANETTI, 2014).

O mais comum e utilizado neste trabalho foi o método Ward, que consiste em um procedimento de agrupamento hierárquico no qual a medida de similaridade usada para juntar agrupamentos é calculada como a soma de quadrados entre os dois agrupamentos feita sobre todas as variáveis. Esse método tende a resultar em agrupamentos de tamanhos aproximadamente iguais devido a sua minimização de variação interna. Em cada estágio, combinam-se os dois agrupamentos que apresentarem menor aumento na soma global de quadrados dentro dos agrupamentos (ZANETTI, 2014).

2.5.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS - PCA

Na análise de componentes principais ocorre a projeção dos dados originais de grandes dimensões para dimensões menores. Essa projeção é realizada pela PCA em que o objetivo é transformar dados multivariados para que as informações importantes possam ser visualizadas mais facilmente (MARTENS, 1996; GELADI, 1986). Nesse caso, a matriz X é decomposta em duas matrizes menores de *scores* ou *escores* (T) e de *loadings* ou pesos (P) e mais uma matriz de resíduos (E) que indica a parte que não é modelada, como é mostrado na Figura 16.

$$X = TP^T + E$$

O diagrama ilustra a equação $X = TP^T + E$ usando retângulos para representar as matrizes e seus tamanhos. A matriz X é um retângulo com m linhas e n colunas. A matriz T é um retângulo com m linhas e d colunas. A matriz P^T é um retângulo com d linhas e n colunas. A matriz E é um retângulo com m linhas e n colunas. O símbolo de igualdade está entre X e T , e o símbolo de adição está entre P^T e E .

Figura 16 - Decomposição da matriz X nas matrizes de *escores* (T), pesos (P) e resíduos (E). Fonte: ZANETTI, 2014.

Neste caso, X é a matriz original constituída de “ m ” linhas (amostras) e “ n ” colunas (variáveis); T é a matriz de *escores* com “ m ” linhas e “ d ” colunas (número de componentes principais); P é a matriz de pesos com dimensões “ d ” e “ n ” em que d é o número de linha e “ n ” o de colunas e E é a matriz de resíduos com “ m ” linhas e “ n ” colunas (ZANETTI, 2014).

Os *escores* representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelos componentes principais. Cada componente principal é constituído pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são denominados pesos. Matematicamente, os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais (PC), representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. Já os *escores*, representam as relações de similaridade entre as amostras. A avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos *escores*. Através da análise conjunta do gráfico de *escores* e pesos, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras (SOUZA, 2012).

O número de componentes principais a ser utilizado no modelo PCA é determinado pela porcentagem de variância explicada. Assim, seleciona-se um número de componentes de tal maneira que a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais seja capturada. A primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido da maior variação no conjunto de dados; a segunda (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, com o intuito de descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante (SOUZA, 2012). Ou seja, cada componente principal subsequente descreve um máximo de variância contida nos dados, sendo que a primeira componente principal determina a maior variância dos dados. No segundo componente principal, há menos informação do que no primeiro e, assim, sucessivamente. A Figura 17, representa graficamente duas componentes principais no caso de 2 variáveis (X_1 e X_2) em que a maior variância dos dados está sendo explicada pela primeira componente principal (PC1) (ZANETTI, 2014).

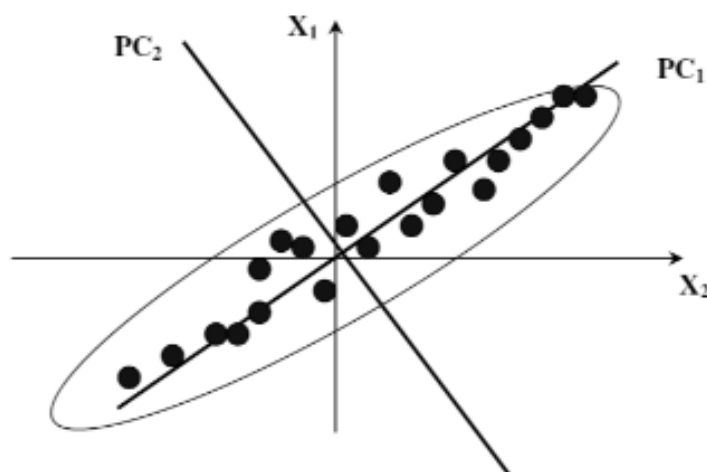


Figura 17 - Representação de duas componentes principais. Fonte: ZANETTI, 2014.

Geralmente a variância dos dados está sendo explicada na ordem decrescente, ou seja, $PC1 > PC2 > PC3 > \dots > PC$, o que torna possível a visualização dos dados através dos *escores* de um componente *versus* outro. Os *escores* e os pesos podem ser calculados segundo o algoritmo NIPALS (do inglês, Nonlinear Iterative Partial Least Squares) ou SIMPLS (do inglês Singular Value Decomposition) (DE JONG, 1993).

2.5.4 ANÁLISE DISCRIMINANTE POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS - PLS-DA

Dentre as técnicas de classificação multivariada supervisionada, a mais utilizada em dados de origem química é a PLS-DA [33], que é baseada no método de calibração PLS. O

modelo PLS-DA assim como o modelo PLS relacionam a matriz X com uma propriedade de interesse (vetor y), neste caso a classe da amostra. Em geral, em problemas de classificação binária é utilizado o valor 1 para as amostras da classe de interesse e 0 ou -1 para as outras classes (YI, 2016).

Assim como no PLS, a escolha correta do número de variáveis latentes e a remoção de amostras anômalas são essenciais para construir o modelo PLS-DA. A escolha do número ideal de variáveis latentes é realizada de maneira semelhante a utilizada pelo PLS. No entanto ao invés de analisar os valores do erro quadrático médio da validação cruzada é analisado o número de amostras da validação cruzada corretamente classificadas ou a taxa de erro. A Figura 18 ilustra de maneira genérica o comportamento da porcentagem de amostras classificadas corretamente em função do número de variáveis latentes. A remoção de amostras anômalas pelo método PLS-DA é feita de maneira semelhante a remoção de amostras anômalas no PLS, todavia esta avaliação só é realizada no bloco X (SANTANA, 2020).

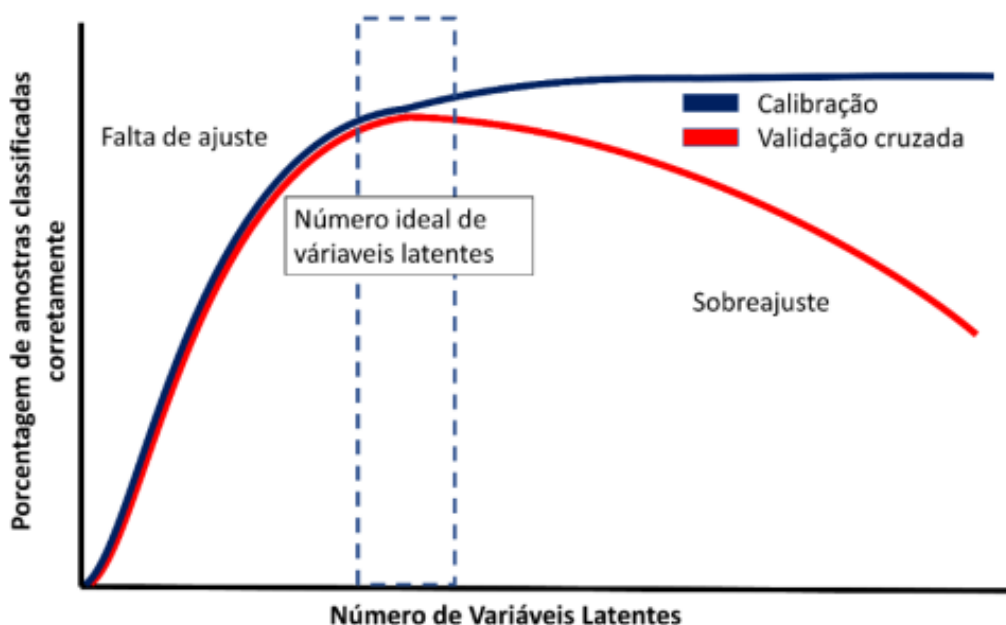


Figura 18 - Porcentagem de amostras classificadas corretamente em função do número de variáveis latentes. Fonte: SANTANA, 2020.

Os resultados fornecidos pelo vetor \hat{y} representam a previsão da classe à qual pertence cada amostra. No entanto, como a variável categórica é modelada de maneira contínua, na prática, os valores previstos não são exatamente 0 ou 1 (JAMES, 2013). Dessa forma, é

necessário estabelecer um valor limite (limiar/threshold) entre as classes. Esse valor pode ser estimado utilizando curvas ROC (receiver operating characteristic) (HIBBERT, 2009) ou mais comumente empregando estatística Bayesiana (JAMES, 2013).

Usando a ideia da estatística Bayesiana, inicialmente é construído um histograma dos valores previstos de \hat{y} para as amostras da classe 0 e 1, conforme ilustrado na Figura 19. Onde a classe 0 é representada pela cor azul e a classe 1 é representada pela cor verde. Em seguida é ajustada uma distribuição normal para cada uma das classes. Após isso, utiliza-se esta distribuição para calcular qual a probabilidade de a amostra pertencer a classe 0 ou 1 em função do valor previsto pelo modelo. Na Figura 19, a linha em azul representa a probabilidade da amostra pertencer a classe 0 em função do seu valor previsto e a linha verde representa a probabilidade da amostra pertencer a classe 1 (SANTANA, 2020). No cruzamento destas linhas temos o ótimo limiar para a discriminação, ou seja, a probabilidade de amostra pertencer a classe 0 ou 1 é de 50%, deste modo minimizamos o número de resultados falsos positivos ou negativos (JAMES, 2013).

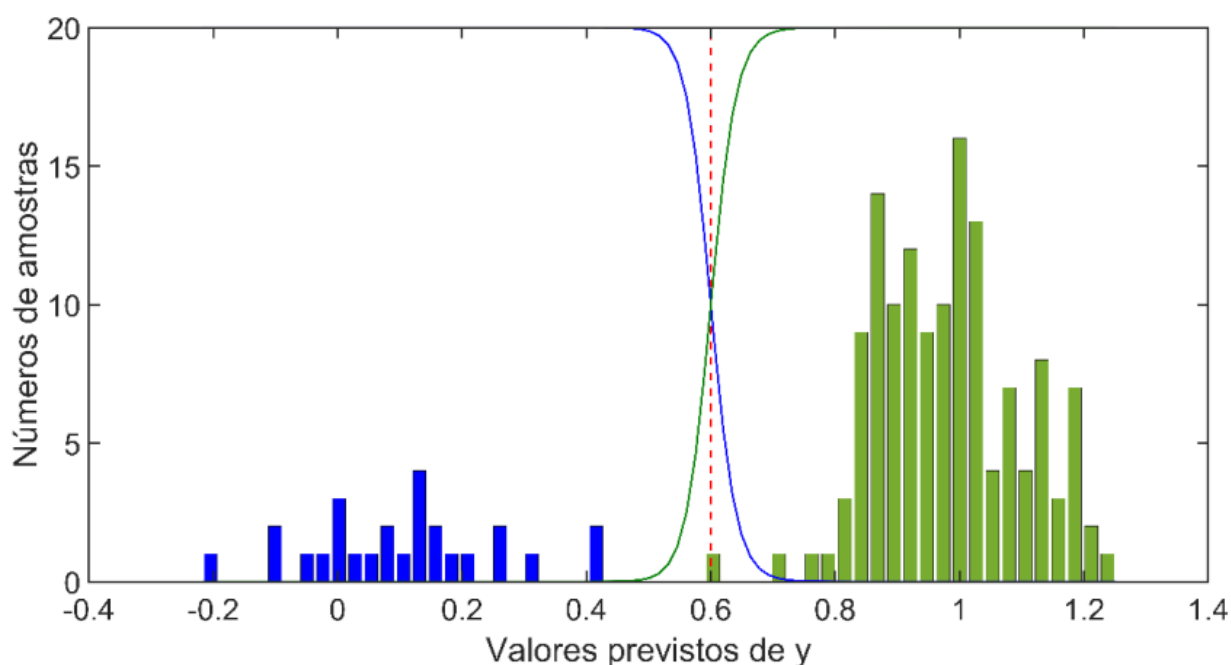


Figura 19 - Distribuição dos valores previstos de y para determinação do valor limite entre as classes (verde/1 e azul/0) seguindo a estatística Bayesiana. A linha tracejada em vermelho representa o limiar ótimo para discriminação. Fonte: SANTANA, 2020.

Após a construção do modelo de classificação PLS-DA é possível identificar as variáveis mais importantes para a separação das classes. Dentre os métodos empregados

para este propósito podemos destacar as variáveis importantes na projeção (do inglês, variable importance in projection - VIP), seu cálculo é realizado através da equação abaixo.

$$VIP_j = \sqrt{p \sum_{r=1}^R \left[SS_r \left(\frac{W_{rj}}{\|W_r\|} \right)^2 \right] / \sum_{r=1}^R SS_r}$$

Onde R é o número de variáveis latentes, SS_r é a soma dos quadrados explicados pela r -ésima variável latente e $\left(\frac{W_{rj}}{\|W_r\|} \right)^2$ representa o peso da j -ésima variável em relação ao peso total das variáveis para a variável latente a (MEHOMOOD, 2012).

Assim como o PLS, o método de classificação PLS-DA é construído rapidamente e apresenta, de modo geral, excelentes resultados de classificação. Entretanto, em conjuntos que apresentam grande variabilidade entre amostras de uma mesma classe ou que apresentem um número de amostras muito desbalanceado para cada classe, este método tende a não apresentar bons resultados de classificação. Para estas situações os métodos de aprendizagem de máquina com maior capacidade de generalização são mais recomendados (SANTANA, 2020).

Uma das grandes vantagens de utilizar a análise VIP é que esse tipo de cálculo maximiza a covariância entre x e y , melhorando a classificação dos dados. PLS-DA e VIP maximizam a diferença entre os dados, que em muitos casos não são observados através de outras metodologias estatísticas, como por exemplo a técnica de PCA.

3 JUSTIFICATIVA

A exposição cumulativa a luz solar é considerada um fator extrínseco no processo de envelhecimento cutâneo e pode ocasionar ou mesmo intensificar os efeitos degenerativos na pele. Esses efeitos aumentam a probabilidade do surgimento de patologias de natureza benigna ou maligna, como por exemplo, redução significativa da elasticidade, atrofia, pigmentação excessiva de cores, ressecamento da pele, aparecimento de rugas, espessamento da pele, degeneração do colágeno e elastina e até mesmo o câncer de pele. Com isso, a busca por técnicas que sejam rápidas, sensíveis e minimamente invasivas para a caracterização das alterações bioquímicas da pele é de fundamental importância. Sendo a espectroscopia Raman uma técnica óptica de alta sensibilidade e especificidade, a mesma apresenta-se como uma excelente candidata nas análises *in vivo* e *in vitro* da pele, podendo caracterizar os principais constituintes bioquímicos da pele, como lipídeos, proteínas, água e colágeno. Os resultados obtidos com uso da técnica Raman aplicada a pele, podem direcionar pesquisadores e indústrias no entendimento dos efeitos cumulativos do sol na pele e no desenvolvimento de ativos mais eficientes e eficazes na proteção da pele contra os raios solares.

Além disso, existem diversos resultados na literatura que são divergentes em suas conclusões e várias lacunas ainda precisam ser preenchidas e elucidadas neste campo de estudo para melhor compreensão dos efeitos bioquímicos que ocorrem na pele. Estudos utilizando ferramentas ópticas, como a microscopia Raman podem auxiliar na elucidação mais precisa sobre os processos bioquímicos que ocorrem na pele fotoexposta *versus* o efeito cronológico de envelhecimento.

4 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Encontrar os principais marcadores bioquímicos nas distintas camadas da pele humana de indivíduos fotoexpostos e não fotoexpostos por microscopia Raman associada à análises multivariada (análise de componentes principais e análise discriminante por mínimos quadrados parciais).

Objetivo específico:

Utilizar as ferramentas de análise estatística multivariada, como análise de componentes principais e análise discriminante por mínimos quadrados parciais, para determinar as sutis alterações espectrais e atribuí-las as mudanças bioquímicas observadas nas camadas do estrato córneo, epiderme e derme para os grupos estudados.

5 METODOLOGIA

5.1 ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA- E INTER-GRUPO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Antecedente ao estudo dos marcadores bioquímicos na pele humana de indivíduos fotoexpostos e não fotoexpostos por espectroscopia Raman, foi realizado uma avaliação da variabilidade intra- e intergrupo da pele humana na camada do estrato córneo. Essa avaliação foi fundamental para comprovar a sensibilidade e especificidade da técnica na avaliação de tecidos biológicos.

5.1.1 INSTRUMENTAÇÃO

As análises Raman foram realizadas por um espectrômetro Raman confocal da River Diagnostics (Rotterdam - Holanda), modelo 3510 *Skin Composition Analyzer*, com um microscópio confocal invertido que contém uma objetiva de óleo de imersão (aumento de 40x e abertura numérica de 1,3). O experimento foi realizado em duas diferentes regiões espectrais: impressão digital estendida ($400 - 1800 \text{ cm}^{-1}$) e na região de alto número de onda ($2500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$). A região de impressão digital foi adquirida usando um diodo laser de comprimento de onda de 785 nm, com uma potência máxima na amostra de 28 mW. Enquanto, para a região de alto número de onda foi utilizado um diodo laser de comprimento de onda de 671 nm, com uma potência máxima na amostra de 20 mW. Ambos estes lasers de diodo não são destrutivos para material biológico. O diâmetro do laser “spot” nas amostras era de 1 mm de diâmetro. O espectrômetro Raman possui uma grade de difração de 600 ranhuras / mm e um detector resfriado termoeletricamente do tipo dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês, charge-coupled device) da marca Newton, Andor Technology. Nesta configuração, a resolução espectral do sistema é 4 cm^{-1} em toda a faixa espectral ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$). A imagem de vídeo (software da câmera uEye - 128×1024 pixels) foi usada para localizar a posição precisa do laser na amostra. Aquisição espectral e pré-processamento dos dados foram realizadas usando o software RiverIcon (River Diagnostics, Rotterdam, Holanda).

5.1.2 DESENHO CLÍNICO

O protocolo experimental foi realizado no antebraço das 16 participantes brancas, saudáveis, sexo feminino, com idade entre 18 e 37 anos e pertencente aos fototipos II de Fitzpatrick e III (NAKAGAWA, 2010). Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes

éticas e regras para pesquisas envolvendo seres humanos e foi previamente submetido e aprovado pelo comitê de ética da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap). Todos os participantes receberam informações sobre o protocolo e os procedimentos, e assinaram um termo de consentimento antes do início do estudo. Os participantes do estudo com histórico de patologias dermatológicas ou recentes, irritação ou sensibilidade a produtos cosméticos, gravidez ou lactação e sob medicação durante o estudo foram excluídos. Nenhuma reação adversa foi observada ou relatado durante a execução dos experimentos e todos os participantes completaram o estudo. Antes do início de cada medição, o participante do estudo permaneceu em um ambiente com temperatura controlada de $23,0 \pm 2,0$ °C e umidade relativa de $40,0 \pm 5,0\%$ por 15 minutos. Antes da série de medições Raman, a área da pele (antebraço) que seria analisada foi limpa suavemente com algodão embebido em 1,5 ml de álcool etílico 70% para limpeza da superfície da pele. O protocolo experimental foi dividido em duas partes: região de impressão digital e região de alto número de onda, onde o objetivo principal era avaliar a variabilidade entre os espectros Raman independentemente da região espectral analisada. O protocolo experimental da região de impressão digital envolve três pontos diferentes (S1, S2 e S3, cada ponto separado por 1 cm de distância) do antebraço e em cada ponto, três espectros diferentes foram coletados por profundidade (P1, P2 e P3). Este protocolo inicia a análise na superfície da pele ($0 \mu\text{m}$) e penetra $16 \mu\text{m}$ na pele, com um passo (resolução espacial) de $2 \mu\text{m}$. Os parâmetros de aquisição por espectro foram 10 segundos de tempo de exposição e 3 acumulações. Os espectros da região de alto número de onda foram adquiridos em um único ponto do antebraço e nesse local dois espectros diferentes foram coletados por profundidade. O mesmo modelo de perfil de profundidade da região da impressão digital foi aplicado no protocolo de aquisição para a região de alto número de onda. Os parâmetros de aquisição por espectro para a região de alto número de onda foram de 1 segundo de tempo de exposição e 2 acumulações. O braço foi levantado após cada série de medições por 2 min e reposicionado de volta no dispositivo para completar a série. Esse procedimento foi realizado visando evitar qualquer efeito de oclusão que pudesse hidratar a pele.

5.1.3 ANÁLISE DE DADOS

Todos os espectros Raman adquiridos na região de impressão digital foram pré-processados, sendo aplicado a linha de base usando uma função de subtração polinomial automática (grau: 7 e 55 pontos) e então normalizado pela aplicação do vetor normalização.

Os espectros da região de alto número de onda foram pré-processados através da linha de base pela subtração polinomial função (21 pontos) e, em seguida, normalizado pela função de normalização vetorial. O software LabSpec 6 (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, França) foi usado para o pré-processamento dos dados. Para compreender a variabilidade intra- e interindividual, a matriz de correlação foi calculada usando a correlação de coeficiente Pearson (r) (PEARSON, 1895). Para obter o coeficiente r para variabilidade intraindividual, todo o conjunto de espectros foi organizado de acordo com as medições dos pontos de cada participante, ou seja, os três espectros do primeiro ponto, os espectros do segundo ponto e os espectros de terceiro ponto, como ilustrado na Figura 26. A mesma organização foi usada para avaliar a variabilidade interindividual.

Esses procedimentos foram aplicados nas faixas espectrais de 2500 - 4000 cm^{-1} e 400 - 1800 cm^{-1} para regiões com alto número de onda e impressão digital, respectivamente. O cálculo da matriz de correlação foi realizado em Matlab® (MathWorks). O coeficiente r mede a relação entre duas variáveis. Neste caso, ele mede a força da relação entre dois espectros (por exemplo X e Y):

$$|r(x, y)| = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

onde x_i e y_i são os pontos dos espectros comparados, $i = 1, \dots, n$, e n é o tamanho do espectro e \bar{x} , \bar{y} são a média dos espectros, respectivamente. O intervalo de coeficiente $|r|$ é de +1 a 0, onde $r \sim 1$ indica uma relação linear perfeita e $r = 0$ indica ausência de relação linear entre os espectros comparados (PARTIDOS, 2001). Cada $|r|$ valor obtido por comparação espectral é representado por uma cor na matriz de pixel. Esta matriz de correlação é simétrica com a linha diagonal central que representa os valores de identidade.

Para comparar as intensidades dos espectros Raman usando os coeficientes r , um teste de Kruskal Wallis foi realizado. Para cada profundidade por indivíduo, nove espectros foram comparados com um total de 144 espectros Raman para a região de impressão digital e para a região de alto número de onda, dois espectros por profundidade foram comparados com um total de 32.

5.2 ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DE INDIVÍDUOS FOTOEXPOSTOS E NÃO FOTOEXPOSTOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

5.2.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS E LEGAIS

Este estudo, envolvendo o uso de fragmentos de pele retirado através de biópsias, foi previamente submetido e aprovado pela Comissão de Avaliação de Projetos e Pesquisa (CAPP), do Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí (HU-UFPI) e em seguida submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) sob o 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.

Esse estudo foi conduzido utilizando dados já coletados por estudos antecessores e correlatos. Contudo, o objetivo deste estudo, juntamente com a análise estatística dos dados, resultados obtidos e conclusões são independentes a qualquer outro trabalho. A razão pela qual foi tomada esta decisão, é baseada no fato que os trabalhos necessitavam do mesmo perfil de participantes da pesquisa (SANTOS, 2018; PEREIRA, 2019).

Os trabalhos são complementares, sendo este uma continuidade dos trabalhos anteriores, aumentando o entendimento das alterações bioquímicas na pele humana relacionadas a exposição solar.

5.2.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Alguns critérios de inclusão e exclusão foram definidos com o intuito de garantir padronização no momento das análises.

Previamente, todos os participantes da pesquisa foram submetidos a uma triagem de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Após enquadrar-se nos critérios de inclusão, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado aos participantes da pesquisa, lido e assinado pelo os mesmos. Todos os termos foram encaminhados ao ambulatório de dermatologia do HU-UFPI para correto armazenamento das informações. Por fim, todos os participantes da pesquisa preencheram um questionário sobre o seu modo de vida e exposição solar.

Os critérios de inclusão foram: sexo masculino com idade entre 50 e 60 anos, fototipos II e III de acordo com a classificação de Fitzpatrick, ausência de dermatoses (auto informado), sem histórico de doenças de pele prévia (auto informado), autonomia para

comparecer ao local de coleta, concordar em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e preencher um questionário sobre seu modo de vida e exposição solar.

Os critérios de exclusão foram: tabagismo, diabetes, doença do sistema circulatório (auto informado), histórico de irritação ou sensibilidade a produtos cosméticos e luz solar (auto informado) e pacientes sob qualquer tipo de tratamento antienvhecimento (SANTOS, 2018; PEREIRA, 2019).

5.2.3 LOCAL E PROCEDIMENTO DAS COLETAS DAS AMOSTRAS

No total foram selecionados 24 participantes da pesquisa e coletadas 2 biópsias de cada voluntário, totalizando 48 biópsias. Todas as coletas foram realizadas no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí (HU-UFPI).

Os 24 participantes da pesquisa foram divididos em dois grupos: Não Fotoexpostos - NF (indivíduos sem histórico de exposição diária ao sol) e Fotoexpostos - FT (indivíduos que possuíam histórico de exposição diária ao sol). Outro fator relevante que foi considerado durante a seleção dos participantes da pesquisa foi a sua localização geográfica, hábitos de vida e tipo de trabalho exercido, neste caso os participantes da pesquisa classificados como Não Fotoexpostos (NF) foram advindos da região de zona urbana e os participantes da pesquisa classificados como Fotoexpostos (FT) foram escolhidos da região de zona rural, ambos do estado do Piauí, nordeste do Brasil.

Cada um dos dois fragmentos de pele coletados de cada voluntário foram retirados de regiões distintas do corpo (Figura 20). Cada fragmento possuía um tamanho de aproximadamente 3 mm de diâmetro e foram coletados por meio da técnica de biópsia dermatológica (*Punch Dermatológico*).

Previamente a coleta das amostras e com o objetivo de estabilizar a temperatura corporal e da pele, todos os participantes da pesquisa permaneceram durante 15 minutos em uma sala com a temperatura controlada em ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar entre 40 e 50%. Ao final deste tempo de climatização, todos os participantes da pesquisa foram reorientados sobre o procedimento a ser realizado e após consentimento verbal, foi realizada uma assepsia com álcool etílico 70% do local a ser realizado a biópsia.



Figura 20 - Regiões do antebraço (foto vertical) e braço (foto horizontal) onde foram realizadas biópsias da pele para estudo utilizando espectroscopia Raman. Fonte: PEREIRA, 2019.

A biópsia ocorreu em duas regiões do corpo de cada voluntário, sendo a primeira na região externa do antebraço, definida como área de maior exposição solar e nomeada de Envelhecido (ENV) e uma segunda biópsia na região interna do braço, definida como área de menor exposição solar e nomeada de Cronológico (CR). Com isso, os grupos presentes no estudo foram (Figura 21): Fotoexposto Envelhecido (FTENV), Fotoexposto Cronológico (FTCR), Não Fotoexposto Envelhecido (NFENV) e Não Fotoexposto Cronológico (NFCR).

As biópsias foram colocadas em recipientes apropriados e mantidas refrigeradas em temperatura aproximada de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a manutenção e conservação das propriedades do material a ser estudado. Todas as coletas dos fragmentos foram feitas por uma cirurgia dermatologista com registro junto ao seu conselho regulamentador

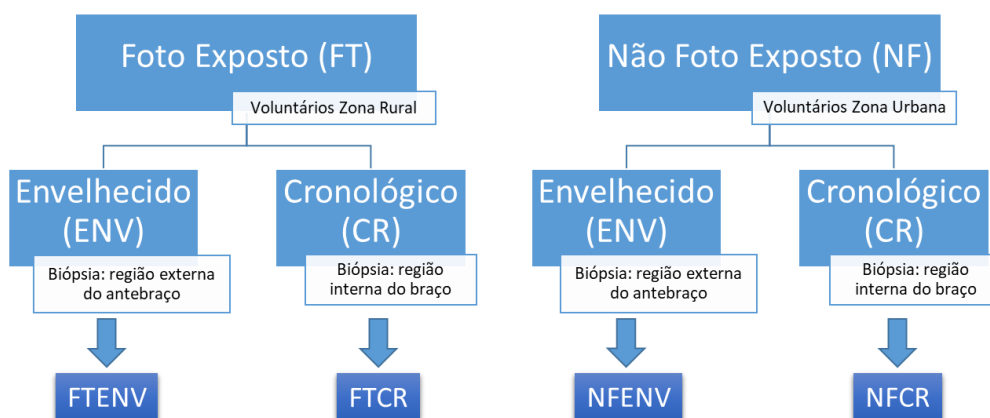


Figura 21 - Divisão dos grupos de amostras para o desenvolvimento deste estudo.

5.2.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRA APÓS COLETA

Duas microsecções em sentido transversal foram realizadas em todas as amostras coletadas de modo que a integridade das camadas da pele fosse mantida. As microsecções

foram realizadas com o auxílio de um criostato (Lupetec - MRP 2015). A primeira microsecção foi realizada com 16 μm de espessura e depositada sobre uma janela de fluoreto de cálcio (CaF_2) para as medidas no instrumento Raman. A segunda microsecção foi realizada com 5 μm de espessura e depositada sobre uma lâmina histopatológica para coloração Hematoxilina - Eosina (H&E). A amostra corada por H&E é fundamental para auxiliar na correta identificação das camadas no mesmo da aquisição dos espectros, já que a visualização através do instrumento Raman é apenas de uma imagem em tons de cinza, dificultando a identificação das camadas e suas interfaces.

Ao final da montagem das lâminas, as amostras voltaram a ser mantidas e preservadas a uma temperatura de -80°C a fim de evitar possíveis degradações no tecido.

5.2.5 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN

As aquisições dos espectros Raman foram conduzidas utilizando o instrumento Raman confocal da marca River Diagnostics, modelo *Skin Composition Analyzer*, instalado no laboratório de pesquisa DermoProbes em São José dos Campos/SP.

Foi utilizado para aquisição dos espectros Raman, um laser de comprimento de onda de 785 nm acoplado via fibra óptica ao instrumento base. A potência do laser foi fixada em 20 mW. O laser de excitação passa através de uma objetiva de 40x localizada sob uma janela de quartzo onde se deposita a amostra a ser analisada. Ao ocorrer a excitação da amostra e consequente emissão do sinal Raman, o instrumento através de seu caminho óptico composto por lentes e espelhos, direciona o sinal Raman até a entrada do espectrômetro, onde ocorre a difração da luz incidente pelas grades de difração e detecção pela câmera do tipo dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês, charge-coupled device) (Figura 22). Esses sinais detectados são convertidos em sinais digitais através do computador conectado e seu respectivo software de controle e análise.

Em cada amostra depositada sobre a janela de CaF_2 , foram adquiridos 20 espectros, sendo 5 espectros por camada: estrato córneo (SC), epiderme viável (EP), derme papilar (DP) e derme reticular (DR). A definição da posição de cada espectro é feita através de análise visual da amostra através de uma câmera embutida

A metodologia utilizada para aquisição dos espectros é baseada na visualização e identificação das camadas da pele, através de uma câmera acoplada ao instrumento Raman, sendo que a imagem visualizada não possui coloração específica, somente tons de cinza. Por esse fato e devido a morfologia da amostra, a identificação correta de camada da pele

e aquisição dos 5 espectros em cada camada torna-se um grande desafio. A identificação das camadas da pele, ocorria a partir de uma visualização comparativa entre a imagem visualizada na câmera do instrumento Raman (tons de cinza) e uma foto do corte subsequente corado pelo método de coloração de Hematoxilina - Eosina (H&E) da mesma amostra. A definição das camadas baseava-se na busca em encontrar as mesmas características morfológicas em ambas as imagens. É importante enfatizar que cortes subsequentes não garantem perfeita correlação morfológica entre o corte primário e secundário. Diversos problemas, como dobra do tecido, rompimento do tecido, sobreposição de cola, perda da amostra e muitos outros podem ocorrer em ambos os cortes prejudicando sua correlação morfológica. Deste modo, deve-se considerar que provavelmente alguns espectros foram nomeados com referência a uma determinada camada da pele, baseados na visualização do “spot” do laser sob a amostra, porém apresentam características espectrais de outra camada da pele.

Os espectros Raman foram adquiridos na faixa espectral entre 400 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} , conhecida como “*fingerprint*” - impressão digital, na qual corresponde a maior porção do espectro com informações dos principais modos vibracionais das moléculas. O tempo de aquisição espectral foi de 15 segundos com 5 acumulações.

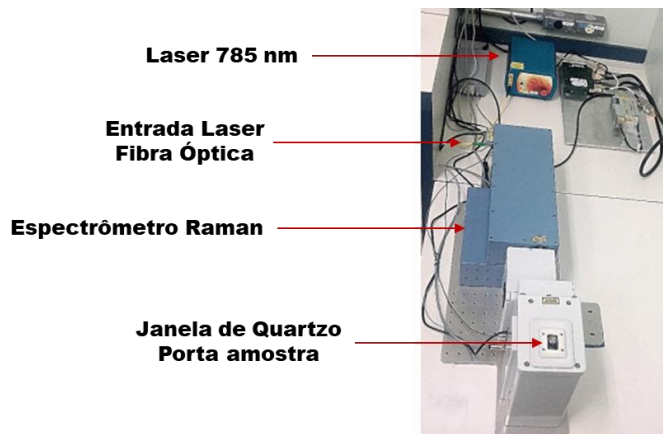


Figura 22 - Instrumento Raman confocal, marca River Diagnostics, modelo *Skin Composition Analyzer*

5.2.6 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS RAMAN

Os resultados deste experimento, foram avaliados primeiramente de forma visual, sendo esses comparados de forma individualizada com espectros referência já publicados na literatura (CASPER, 2000; TFAILI, 2012; ALI, 2013; SANTOS, 2016). Esse procedimento baseou-se na comparação visual dos espectros obtidos com os espectros

referência já publicado na literatura, buscando observar as mesmas características espectrais apresentadas nos espectros das publicações e que o mesmo apresente qualidade visual de observação dos picos Raman em relação ao ruído. Os espectros remanescentes foram cortados entre 440 - 1800 cm^{-1} , pois na região 400 - 440 cm^{-1} , foi possível visualizar uma banda que aparentemente é devida ao sinal do vidro de quartzo pertencente ao instrumento e sem nenhuma informação da amostra. Após essa seleção da faixa espectral, iniciou-se o processamento dos dados para futura análise estatística, sendo todos os dados submetidos ao mesmo procedimento, correção da linha de base por mínimos quadrados assimétricos, normalização pelo vetor unitário, primeira derivada com suavização de ruído pelo método Savitzky-Golay, 7 pontos e polinômio de grau 2 e centralização dos dados na média. Todos os dados foram centrados na média para maximizar as evidências na primeira componente na análise de PCA e da mesma forma maximizar a primeira variável latente para a análise de PLS-DA.

5.2.7 ANÁLISE DOS ESPECTROS RAMAN

Cada amostra possui no mínimo 20 espectros, sendo 5 espectros de cada camada da pele. Com a intenção de avaliar a capacidade da técnica de espectroscopia Raman em diferenciar bioquimicamente os espectros das distintas camadas, mas ao mesmo tempo agrupar os espectros pertencentes a mesma camada, foi aplicada a técnica de HCA. Ao final da separação dos espectros e agrupamento em detrimento de cada camada da pele (SC, EP, DP e DR), foi realizado o cálculo do espectro médio de cada camada da pele em cada um dos grupos estudados - FTCCR, FTENV, NFCR e NFENV. Os resultados obtidos pela técnica de HCA podem ser apresentados através de um dendrograma, onde as separações em vizinhos - "*cluster*" representam a similaridade entre os espectros. Quanto menor a escala de variância mais similar o espectro é de seu vizinho. Como representado na Figura 23, com o uso desta metodologia pode-se avaliar a similaridade dos espectros de uma mesma camada (intragrupo) e entre distintas camadas da pele (intergrupo). Os números representam a ordem dos espectros adquiridos: SC (1-5), EP (6-10), DP (11-15) e DR (16-20). Os dados que estão agrupados de forma desordenada (fora do seu grupo teórico) ou que não foram agrupados junto de seus vizinhos e estão isolados, foram avaliados individualmente para melhor compreensão. Diversos motivos podem acarretar no incorreto agrupamento dos dados, entre eles podemos citar espectros que visualmente são similares aos seus espectros referências, mas estatisticamente apresentam diferenças relevantes no

momento de sua classificação por HCA; variação bioquímica intrínseca dos indivíduos participantes do estudo, e como mencionado na sessão aquisição dos espectros Raman, dificuldade em localizar as camadas através da imagem em tons de cinza, o que leva a uma incorreta nomenclatura e conseqüente organização dos dados.

Contudo, após avaliação individual de cada espectro classificado erroneamente, os mesmos foram reorganizados e então refeitas as análises por HCA. Ainda assim, alguns dados permaneceram isolados e/ou classificados incorretamente. Esses dados não foram utilizados nas análises de PCA e PLS-DA, não prejudicando os resultados finais obtidos.

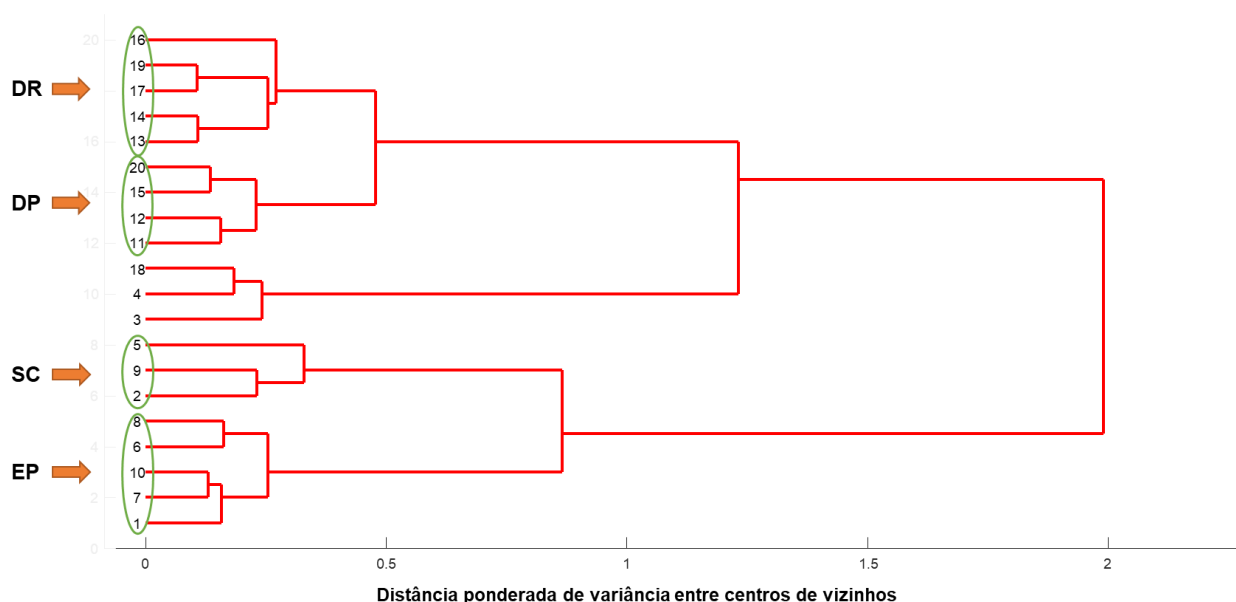


Figura 23 - Dendrograma de uma amostra do grupo FTENV, onde mostra a separação obtida através da Análise Hierárquica de Cluster. Sendo estrato córneo (SC), epiderme viável (EP), derme papilar (DP) e derme reticular (DR).

Com o objetivo de reduzir a dimensão dos dados em grupamentos menores e identificar os componentes principais que distinguem os espectros analisados, sendo esses o que representam a variabilidade amostral. Duas metodologias estatísticas foram utilizadas, a Análise de Componentes Principais - PCA e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais - PLS-DA. Ambas as metodologias foram executadas com a finalidade de identificar as regiões espectrais de maior representatividade da variabilidade amostral.

Os resultados obtidos por PCA são apresentados através de um gráfico de dispersão de dados - “scatter plot” e um gráfico da variação espectral dos componentes principais - “loading plot”, que representam a variabilidade amostral. Na Figura 24, pode-se observar um exemplo do tipo de resultado obtido através da metodologia PCA, sendo o gráfico de

dispersão de dados (Figura 24a), responsável por ilustrar a tendência de agrupamento dos dados com base nas componentes principais definidas. Como é possível observar, os dados FTCT (dados em vermelho) apresentam tendência de agrupamento ao lado direito da Figura 24a, indicando que os *scores* positivos da componente principal 1 (PC1), são os que mais contribuem para a diferenciação deste grupo. Os dados FTENV apresentam menor tendência de agrupamento (dados em verde), orientando-se ao lado esquerdo da Figura 24a, indicando que os *scores* negativos da componente principal 1 (PC1) são os que representam esse grupo.

A Figura 24b representa o gráfico de *loading* e sua interpretação deve ser conduzida baseada nas conclusões obtidas através da análise do gráfico de dispersão de dados (Figura 24a). Esse gráfico de *loading* representa os *scores* positivos e negativos de cada componente principal (PC) analisada. Os *scores* positivos e negativos de cada PC, referem-se às posições dos picos Raman que apresentam maior relevância para diferenciação dos dados. Quando maior a intensidade do pico, maior sua contribuição para diferenciação do grupo analisado. Como foi possível concluir na análise da Figura 24a, os dados FTCT são representados pelos *scores* positivos da PC1 e os dados FTENV são representados pelos *scores* negativos da PC1. Algumas posições foram destacadas (linhas em verde) na Figura 24b, sendo essas as regiões espectrais que apresentam as maiores intensidades e conseqüentemente são as que possuem maior contribuição para a caracterização de cada grupo.

As linhas verdes que destacam os principais *scores* positivos da PC1, apresentaram maior contribuição no grupo FTCT foram relacionados às bandas em 1294 cm^{-1} atribuída ao constituinte cerâmica presente na camada do estrato córneo, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1560 cm^{-1} atribuída ao constituinte triptofano, 1590 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O da proteína, 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída à Amida I e em 1690 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída à Amida I na conformação β -folha.

As linhas verdes que destacam os principais *scores* negativos da PC1, apresentaram maior contribuição no grupo FTENV foram relacionados às bandas em 998 cm^{-1} relacionada ao constituinte fenilalanina, 1276 cm^{-1} relacionada aos modos vibracionais Raman de estiramento de C-N e deformação de N-H, atribuída à Amida III na conformação α -hélice, 1302 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de torção da ligação CH₂ de lipídeos, adenina e citosina, 1388 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de deformação de CH₃ atribuída aos

lipídeos, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas e em 1642 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de torção de CH_2 de proteínas.

A partir da identificação dos modos vibracionais para cada grupo, é possível realizar correlações e atribuições aos constituintes de cada camada da pele e assim buscar melhor compreensão dos efeitos da exposição solar nas áreas analisadas.

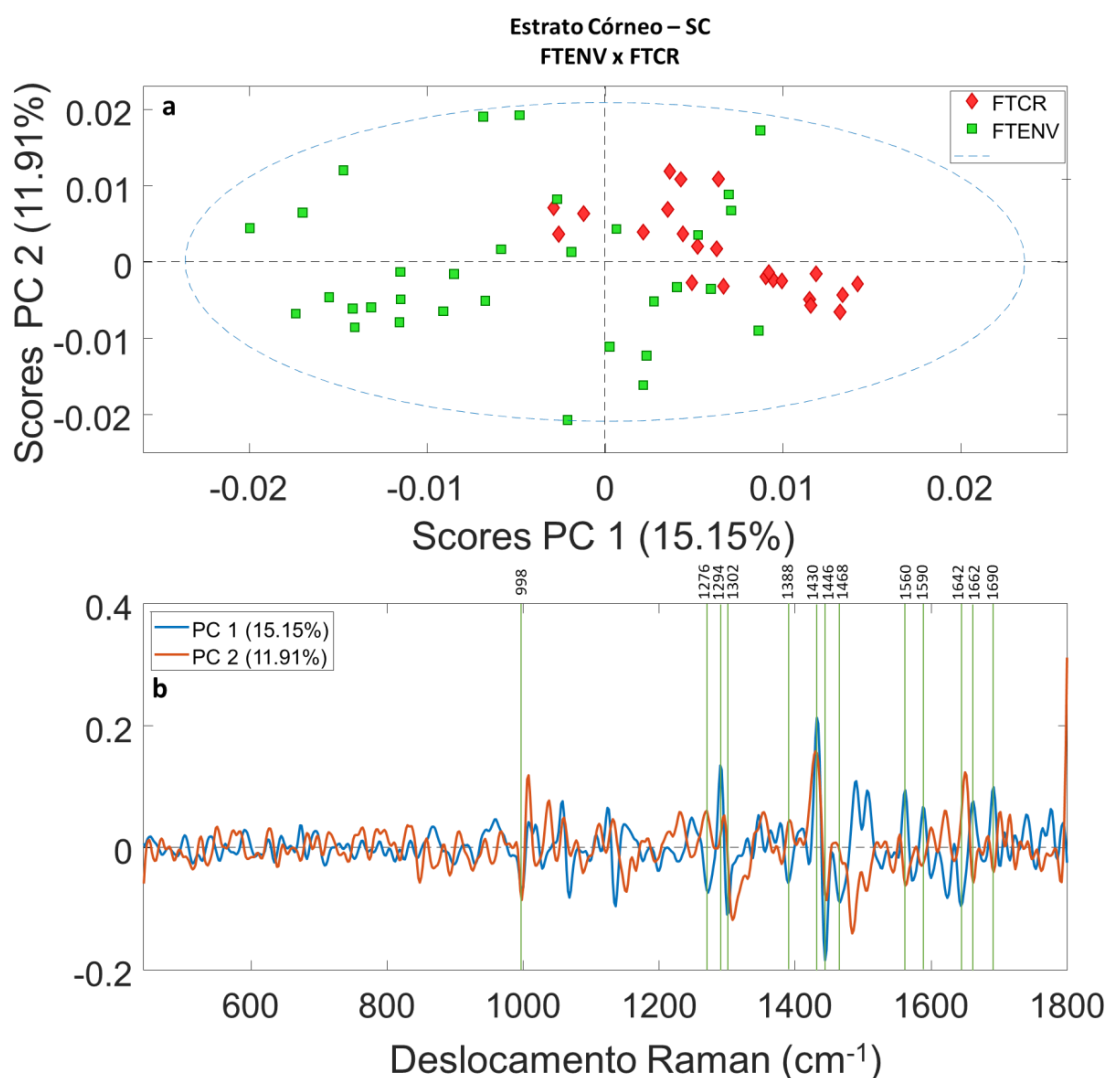


Figura 24 - Exemplo de análise de PCA dos grupos FTENV vs FTGR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC2.

O método PLS-DA baseia-se na construção de um modelo de classificação. Para a construção do modelo de classificação, primeiramente são selecionados alguns espectros para o processo de calibração do método PLS-DA, essa fase é fundamental para ensinar ao

modelo de classificação a variabilidade amostral em estudo, e assim o mesmo poderá prever as classes dos novos dados inseridos no modelo. Essa previsão, é conhecida como validação do modelo, comprovando a capacidade do modelo na classificação de novos dados de entrada.

A análise dos resultados por PLS-DA parte de um pressuposto simples, que a ferramenta já recebe os dados de entrada conhecendo sua classe pertencente e após a aplicação do método é avaliado se a nova classificação dos dados permanece como antes ou se houve alterações. O desempenho do modelo pode ser mensurado através de sua sensibilidade e especificidade na classificação dos dados em distantes classes. A sensibilidade é medida pela capacidade do modelo em classificar os dados de uma determinada classe de forma correta. A especificidade do modelo pode ser medida através da capacidade do modelo em classificar os dados de uma classe adjacente corretamente após a aplicação do método PLS-DA. O objetivo é mensurar a capacidade do modelo em distinguir os dados entre a classe referência “classe A” e a “classe B”, classificando corretamente os dados da “classe B”, por exemplo.

Como exemplo, na Figura 25c é possível avaliar sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA na comparação FTENV x NFENV que resultou em uma sensibilidade aproximada para o conjunto de validação de 90% e 66% para os grupos FTENV e NFENV, respectivamente. O primeiro resultado a ser analisado é o gráfico de dispersão de dados - “*scatter plot*” (Figura 25a), que mostra a classificação dos dados utilizados para a calibração e os dados utilizados para a validação do método. A numeração ao lado de cada ponto é uma referência interna do estudo para identificação da amostra e espectro. A numeração é composta por 3 dígitos, sendo o primeiro dígito (da esquerda para a direita), 1 ou 2, e esse representa o grupo proveniente. Os dois dígitos restantes referenciam a amostra analisada. Como é possível observar na Figura 25a, algumas numerações se repetem, isso por que em cada camada da pele foram adquiridos 5 espectros e após a classificação por HCA alguns deles foram removidos. A partir da interpretação da Figura 25a, observa-se que alguns dados foram classificados incorretamente considerando a metodologia estatística escolhida, onde estão próximos a linha limiar entre os grupos ou mesmo já estão dispersos em outro grupo. Esse fato pode ser justificado pela variação bioquímica intrínseca da camada de cada indivíduo participante.

Para identificar quais foram as principais bandas espectrais responsáveis pela separação das classes, o estudo do gráfico de variáveis importantes faz-se necessário

(Figura 25b). Este tipo de gráfico fornece informações a respeito das bandas discriminantes características na diferenciação dos grupos. Quanto mais intenso o pico, maior é a sua importância para a discriminação dos dados. Na Figura 25b, é possível observar que as regiões das bandas em 1008 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1294 cm^{-1} atribuída ao constituinte ceramida presente na camada do estrato córneo, 1308 cm^{-1} relacionada aos modos de torção de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas, 1650 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação α -hélice, atribuída a queratina presente no estrato córneo e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I, apresentaram as maiores intensidades.

Os picos Raman mais intensos em 1008 cm^{-1} , 1294 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , são relacionados ao grupo NFENV e os picos em 1308 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} , são relacionados ao grupo FTENV.

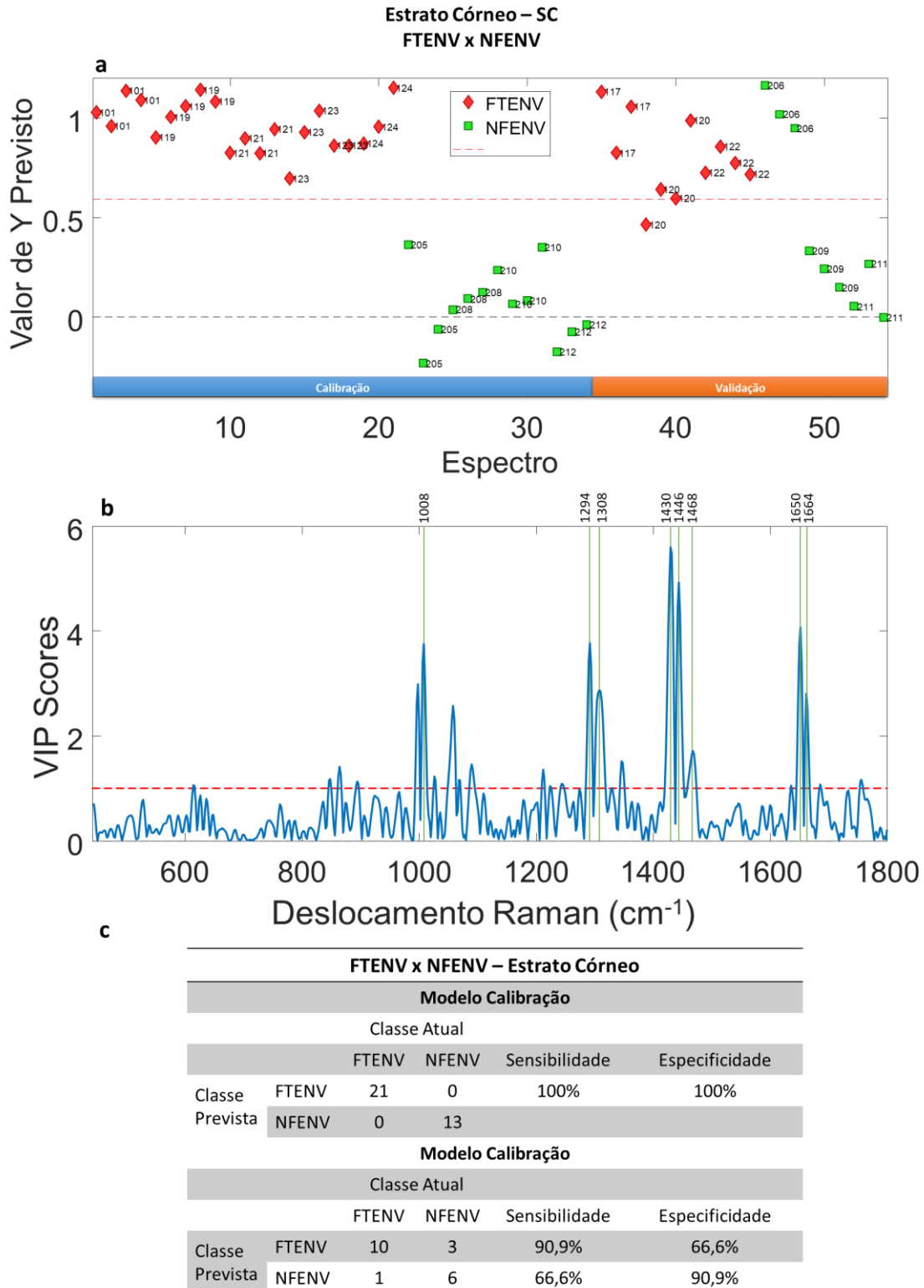


Figura 25 - Exemplo da análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA- E INTER-GRUPO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

6.1.1 RESUMO

Esse estudo trata-se da determinação *in vivo* da variabilidade bioquímica intra- e interindividual do estrato córneo humano usando espectroscopia Raman confocal. Este estudo foi realizado em três pontos diferentes na região volar do antebraço de participantes saudáveis nas regiões espectrais de 400 - 1800 cm^{-1} (região de impressão digital estendida) e de 2500 - 4000 cm^{-1} (região de alta frequência). Todos os espectros pré-processados foram comparados por matrizes de correlação, que foram calculadas usando o coeficiente de correlação de Pearson (r). Os resultados indicam que os participantes da pesquisa deste estudo são homogêneos com relação ao estrato córneo na região do antebraço nas regiões de impressão digital estendida e alta frequência, visto que há alta correlação entre seus espectros Raman em níveis intra- e interindividuais. Este estudo confirma a aplicação da espectroscopia Raman confocal como uma técnica exata e precisa para estudos *in vivo* envolvendo pele humana.

Os resultados apresentados na próxima subseção são referentes a região espectral entre 400 - 1800 cm^{-1} (região de impressão digital estendida), mantendo-se dentro do mesmo escopo metodológico desenhado para o estudo principal sobre os marcadores bioquímicos na pele humana de indivíduos fotoexpostos e não fotoexpostos por espectroscopia Raman. Resultados referentes a região de 2500 - 4000 cm^{-1} (região de alta frequência) podem ser revistos diretamente na publicação intitulada: *In vivo* intra- and inter-individual variability study of human *stratum corneum* by confocal Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 87, p. 199 - 206, 2016.

6.1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.2.1 VARIABILIDADE INTRAINDIVIDUAL: REGIÃO DE IMPRESSÃO DIGITAL ESTENDIDA

A análise estatística para a variabilidade bioquímica intraindividual da região espectral de impressão digital estendida (400 - 1800 cm^{-1}) envolve o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os espectros obtidos nesta região espectral para cada voluntário, de acordo com o protocolo experimental definido.

Na Figura 26a é exibido a matriz de correlação média de comparações intraindividuais na região de impressão digital estendida para os espectros Raman confocal obtidos da superfície da pele até 16 μm de profundidade. Na Figura 26b é representado o desvio padrão da comparação intraindividual do protocolo experimental da região de impressão digital estendida. Cada pixel na Figura 26a representa o valor r para correlação entre quaisquer dois espectros Raman. Os valores de desvio padrão muito baixos para comparações intraindividuais na região de impressão digital estendida (Figura 26b) indicam que a matriz de correlação média na Figura 26a é válida para determinar a variabilidade intraindividual. Os detalhes da distribuição do coeficiente r das matrizes de média e desvio padrão dos espectros Raman de acordo com os pontos são mostrados na Figura 26c e d, respectivamente, onde os três espectros por ponto seguiram uma organização semelhante para todos os participantes do estudo. Na Tabela 3 são apresentados os valores de r nas respectivas profundidades para os espectros Raman obtidos da superfície até a profundidade de 16 μm na região espectral de impressão digital. A partir desses resultados, os valores de correlação encontrados foram maiores na superfície da pele quando comparados às profundidades internas. Conforme demonstrado na Tabela 3, os valores mínimos de r obtidos foram de 0,9429 e 0,9125 na superfície da pele e na profundidade de 16 μm , respectivamente. No entanto, esses valores não são representados na Figura 26a, pois a figura demonstra os valores de correlação média. De acordo com os valores de correlação, os valores de desvio padrão também aumentaram com a profundidade, indicando uma correlação maior entre os espectros na superfície da pele do que entre os espectros nas profundidades internas.

Tabela 3 - Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) para comparações intraindividuais dos espectros Raman da região de impressão digital estendida.

Mícrons	Profundidade		Valores r	
	Mínimo	Máximo	Média \pm Desvio Padrão	Mediana
0	0.9429	0.9953	0.9774 \pm 0.0156	0.9803
2	0.9309	0.9963	0.9803 \pm 0.0168	0.9834
4	0.9345	0.9973	0.9791 \pm 0.0178	0.9845
6	0.9385	0.9942	0.9758 \pm 0.0162	0.9831
8	0.9469	0.9972	0.9754 \pm 0.0140	0.9821
10	0.9089	0.9953	0.9691 \pm 0.0252	0.9803
12	0.9200	0.9912	0.9702 \pm 0.0184	0.9815
14	0.9149	0.9912	0.9681 \pm 0.0200	0.9804
16	0.9125	0.9912	0.9655 \pm 0.0214	0.9787

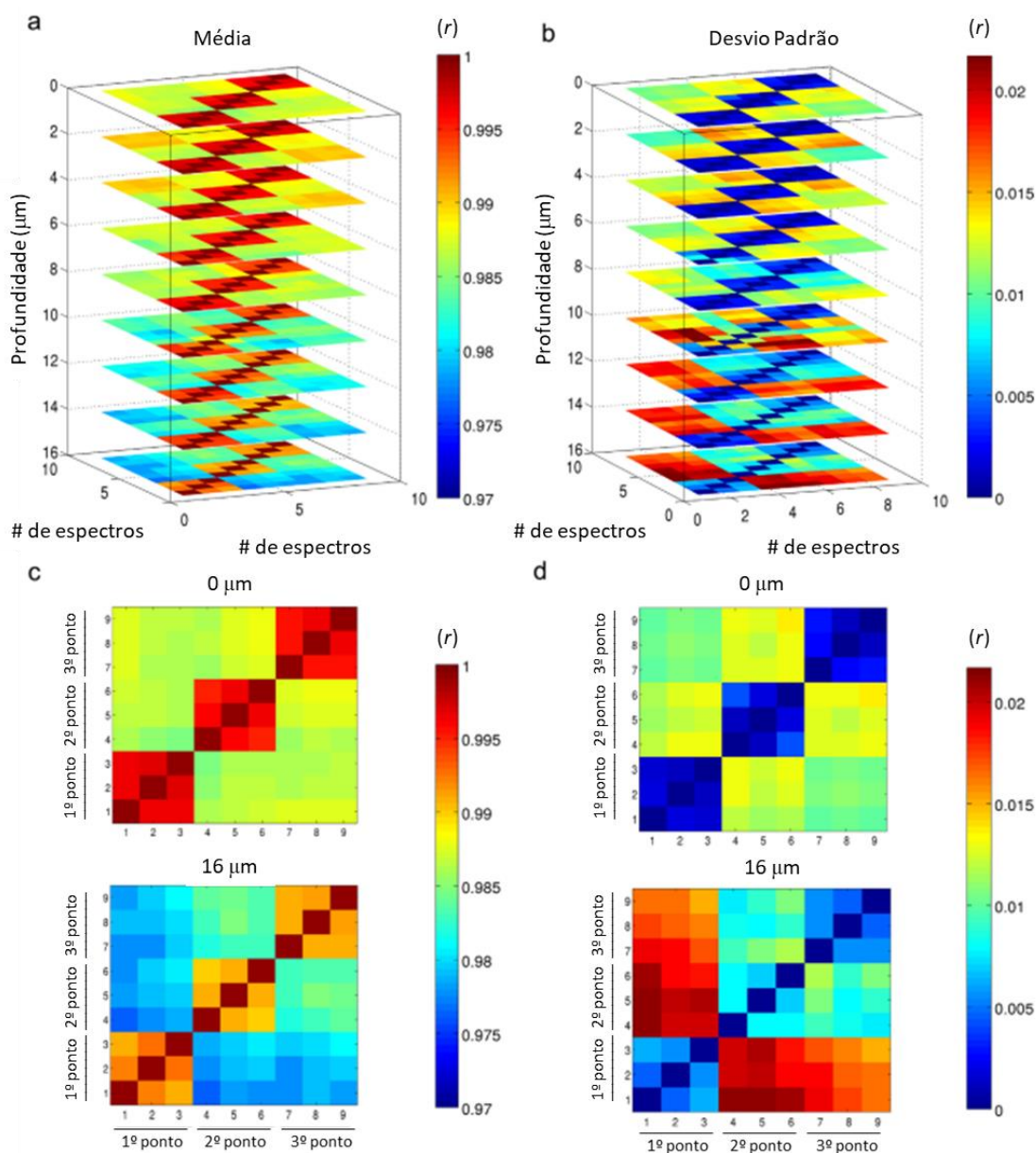


Figura 26 - Matriz de correlação para comparação intraindividual na região de impressão digital estendida da superfície da pele até uma profundidade de 16 μm : (a) perfil da matriz de correlação em diferentes profundidades; (b) desvio padrão para todas as profundidades analisadas; (c) matriz média de correlação para 0 μm e 16 μm ; (d) matriz de desvio padrão para 0 μm e 16 μm . Fonte: SANTOS, 2016.

6.1.2.2 VARIABILIDADE INTERINDIVIDUAL: REGIÃO DE IMPRESSÃO DIGITAL ESTENDIDA

Na Figura 27a é representado a matriz de correlação de comparações interindividuais na região espectral de impressão digital estendida para os espectros Raman confocal obtidos da superfície da pele até 16 μm de profundidade com um tamanho de passo de 2

μm , enquanto as distribuições do coeficiente r para $0 \mu\text{m}$ e $16 \mu\text{m}$ foram mostrados em detalhes nas Figura 27b e c.

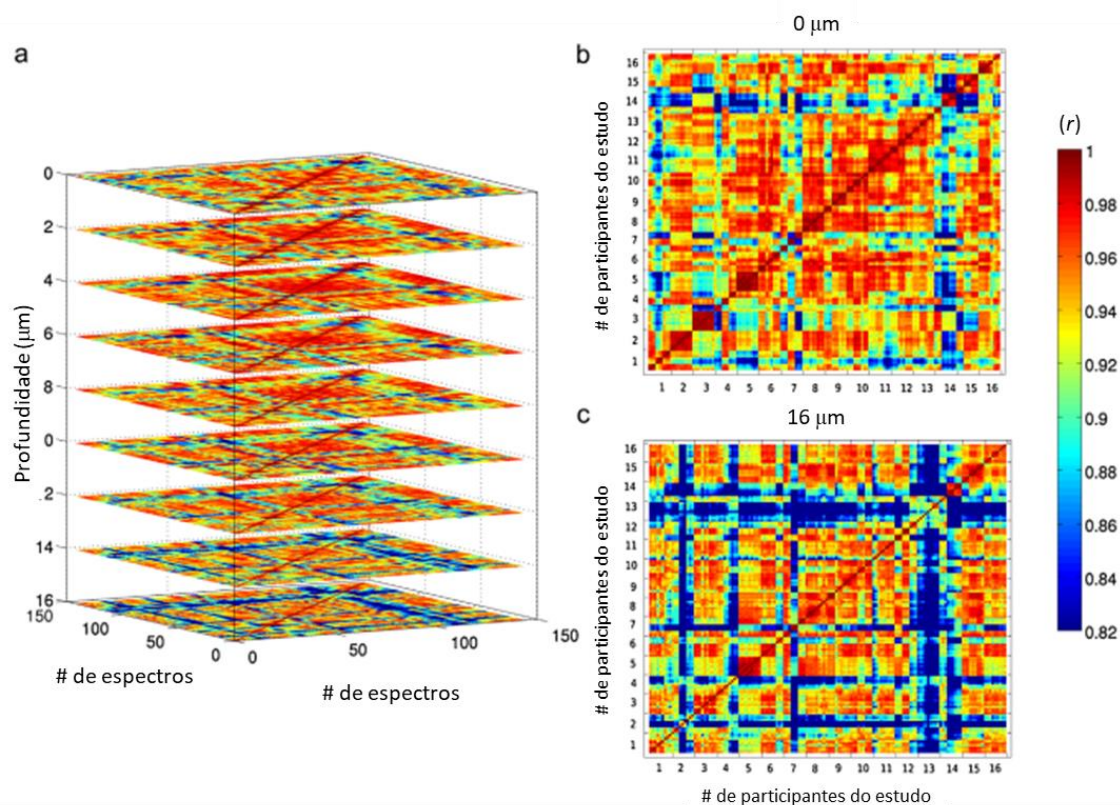


Figura 27 - Matriz de correlação para comparação interindividual na região de impressão digital estendida da superfície da pele até uma profundidade de $16 \mu\text{m}$: (a) perfil da matriz de correlação em diferentes profundidades; (b) matriz de correlação na superfície da pele; (c) matriz de correlação na profundidade de $16 \mu\text{m}$. Fonte: SANTOS, 2016.

A correlação entre os espectros foi maior na superfície da pele e menores profundidades quando comparada com as profundidades internas do estrato córneo. Os valores mínimos de r obtidos para essas comparações dos espectros Raman confocal na superfície da pele e profundidade de $16 \mu\text{m}$ foram $0,8937$ e $0,8291$, respectivamente. Esses valores de r indicam intensa correlação dos espectros relacionados as comparações interindividuais. Nota-se também que alguns participantes do estudo obtiveram menor correlação quando comparado ao grupo amostral pertencente. Além deste fato, também é possível observar que a variabilidade bioquímica é maior nas profundidades mais altas do estrato córneo. Alguns fatores podem justificar os fatos mencionados acima, entre eles, é correto considerar as grandes variações na composição bioquímica do estrato córneo em profundidades internas, a composição bioquímica específica de cada participante do estudo

e seu respectivo estágio de constante renovação celular e por fim, a ocorrência da maior absorção de fótons Raman nas profundidades mais altas do estrato córneo, diminuindo a relação sinal/ruído e conseqüentemente afetando na qualidade dos dados e correlação dos mesmos.

Na Figura 28 é apresentado o valor p para intensidades entre 1800 e 400 cm^{-1} , onde $p > 0,05$ representa que não há diferença significativa entre os espectros Raman dos 16 participantes do estudo (total de 144 espectros por profundidade). As intensidades de diferentes bandas, por exemplo, a 1652 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ Amida I) e a 850 cm^{-1} ($\delta(\text{CCH})$ tirosina aromática) (Santos, 2016), exibiram uma média e desvio padrão de $0,15 \pm 0,01$ (u.a.) e $0,05 \pm 0,01$ (u.a.) para a superfície e $0,13 \pm 0,01$ (u.a.) e $0,04 \pm 0,01$ (u.a.) para uma profundidade de $16\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente. Esses resultados sugerem que os espectros Raman pertencentes à mesma profundidade eram homogêneos em diferentes profundidades.

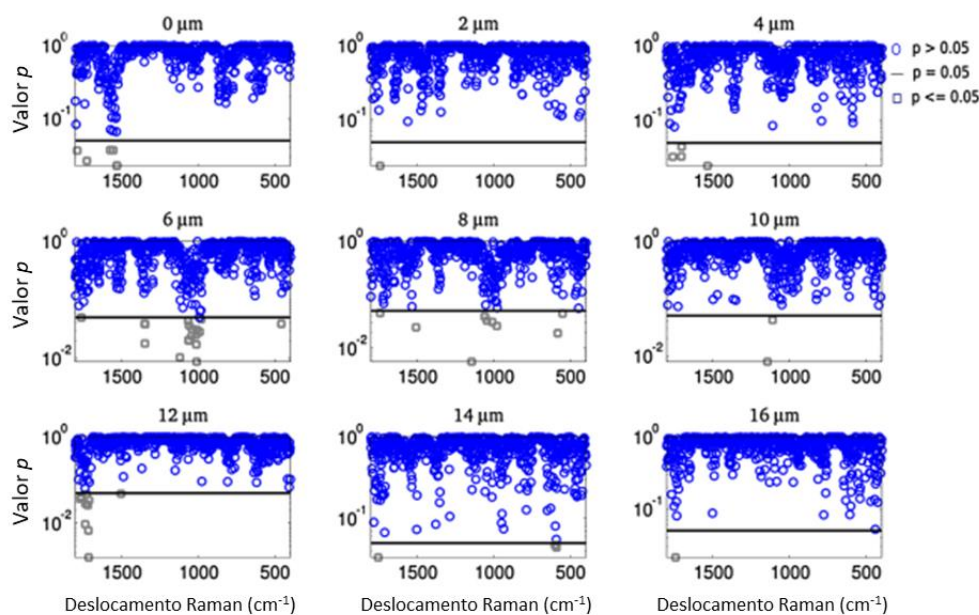


Figura 28 - Teste de Kruskal Wallis para intensidades (entre 1800 e 400 cm^{-1}) considerando todos os espectros Raman de todos os participantes desde a superfície da pele até uma profundidade de $16\text{ }\mu\text{m}$ com um tamanho de passo de $2\text{ }\mu\text{m}$. Fonte: SANTOS, 2016.

Os resultados obtidos indicam claramente que a variabilidade é muito baixa, pois os valores do coeficiente de correlação de Pearson estavam bem acima de $0,82$ entre os espectros da região de impressão digital estendida para as comparações intra- e interindividuais. O valor de p mostrou que não há diferença significativa entre os valores de

intensidade dos participantes do estudo considerando a mesma profundidade. Para o conjunto de dados analisado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à reprodutibilidade dos dados em várias profundidades. Esses resultados indicam que o grupo de participantes testado foi homogêneo no que diz respeito aos espectros do estrato córneo do antebraço. A excelente correlação na comparação intraindividual entre os espectros de impressão digital estendida (Figura 26a) obtidos em cada profundidade para um ponto específico de análise (S1 vs S1, S2 vs S2 e S3 vs S3) no antebraço prova que a espectroscopia Raman confocal é uma técnica altamente precisa para estudar o estrato córneo em diferentes profundidades. Mesmo que os valores de r entre os espectros do mesmo ponto mostrem uma tendência decrescente com o aumento da profundidade, (S1 vs S1, S2 vs S2 e S3 vs S3) eles ainda eram maiores do que os valores de r obtidos entre os espectros para os diferentes pontos de análise (S1 vs S2, S1 vs S3 e S2 vs S3) no antebraço.

Como esperado, a correlação nas comparações intraindividuais foi maior do que nas comparações interindividuais, sendo para as comparações intraindividuais os valores mínimos de r de 0,9429 e 0,9125 na superfície da pele e na profundidade de 16 μm , respectivamente. E nas comparações interindividuais os valores mínimos de r de 0,8937 e 0,8291 na superfície da pele e na profundidade de 16 μm , respectivamente. Considerando que quanto maior o valor de r , maior correlação entre os dados. Portanto, a extensão da variabilidade intraindividual é relativamente baixa quando comparada à variabilidade interindividual. Observou-se que a correlação é maior entre os espectros na superfície da pele em comparação com as profundidades internas do estrato córneo. Isso indica que a variabilidade bioquímica é maior nas profundidades mais altas do estrato córneo. Isso é atribuído principalmente à ocorrência de grandes variações na composição bioquímica do estrato córneo em profundidades internas devido à renovação contínua das células mortas dessa camada. Em termos da técnica Raman, nas profundidades internas da pele há mais absorção de fótons, o que leva a uma baixa relação sinal/ruído. A este respeito, a micro espectroscopia Raman forneceu medições estáveis refletindo a variabilidade em diferentes profundidades da pele (Santos, 2016).

6.1.3 CONCLUSÃO DO ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA- E INTER-GRUPO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

A boa correlação entre os espectros Raman da região espectral de impressão digital estendida em comparações intra- e interindividuais indica que as medições obtidas por

espectroscopia Raman confocal são altamente acuradas e precisas, mostrando assim que esta técnica é reproduzível para um estudo da pele humana considerando a quantidade de espectros analisados. Devido a essa homogeneidade, espera-se que esses indivíduos apresentem características semelhantes enquanto a sua função de barreira cutânea. Além disso, espera-se que a pele do antebraço desses participantes mostre um tipo de resposta semelhante a vários agentes externos. Esta característica de homogeneidade é um resultado extremamente importante deste estudo e é comprovada a partir dos resultados obtidos, pois os espectros Raman medidos (considerando a mesma profundidade) independentemente da região do antebraço foram consistentes. Esta alta correlação é um aspecto importante para a indústria cosmética testar a eficácia *in vivo* de várias formulações, determinar a penetração dos ingredientes da formulação e detectar vários efeitos bioquímicos após o uso prolongado desses produtos na pele humana.

Os resultados obtidos neste estudo, ainda que somente da camada do estrato córneo e analisados de forma *in-vivo*, foram fundamentais para o correto direcionamento metodológico e analítico do estudo apresentado a seguir.

Aprofundamentos sobre os resultados obtidos podem ser visualizados através da consulta do artigo publicado e intitulado, *In vivo* intra- and inter-individual variability study of human *stratum corneum* by confocal Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 87, p. 199 - 206, 2016.

6.2 ESTUDO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PELE HUMANA DE INDIVÍDUOS FOTOEXPOSTOS E NÃO FOTOEXPOSTOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

6.2.1 HISTOLOGIA

O envelhecimento da pele humana é um fenômeno dinâmico, multifatorial e progressivo, que pode ser acelerado com o advento de agentes agressivos ao organismo a nível celular e tecidual (PAGEON, 2010). Neste estudo foi evidenciado de forma consistente diferenças nos espectros Raman das camadas da pele entre as regiões com envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento dos indivíduos estudados. Zouboulis e colaboradores relataram que a pele fica sujeita não somente ao envelhecimento intrínseco, mas também a vários fatores externos, que favorecem alterações estruturais, prejudicando sua fisionomia jovial, permeabilidade desordenada, angiogênese, poiquilodermia, vulnerabilidade a

estímulos, perda da elasticidade, além de atividades fisiológicas específicas deste órgão. Estas alterações foram observadas e correlacionadas nos resultados obtidos através da espectroscopia Raman (PEREIRA,2019).

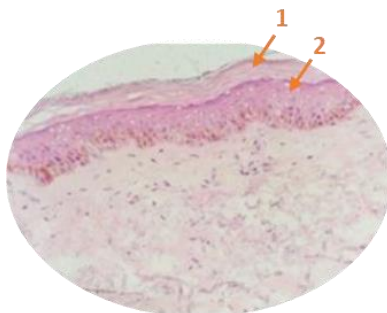


Figura 29 - Coloração por H&E do corte histológico da região fotoexposta, aumento de 100x, onde observa-se: (1) um espessamento do estrato córneo e (2) junção dermo-epidérmica. Fonte: PEREIRA, 2019.

Na Figura 30 é apresentado uma lâmina de um corte histológico de pele da face interna do antebraço, região mais protegida contra as agressões do meio externo. Observa-se uma atrofia do estrato córneo indicando que a ação do envelhecimento intrínseco apresenta importante contribuição para as alterações morfológicas e bioquímicas do tecido podendo levar ao desenvolvimento de desordens na pele (PEREIRA, 2019).

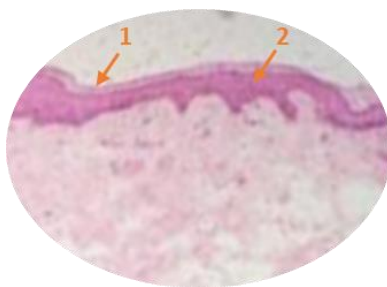


Figura 30 - Coloração por H&E do corte histológico da região não fotoexposta (face interna do braço), aumento de 100x, onde observa-se: (1) uma atrofia do estrato córneo e (2) uma redução notória da junção dermo-epidérmica. Fonte: PEREIRA, 2019.

Ambas as constatações representadas pelas Figuras 29 e 30, foram avaliadas primeiramente baseando-se nos indícios relatados por outros estudos correlatos (ALI, 2013; LEROY, 2014; CAETANO, 2017; PEREIRA, 2019). Adicionalmente, resultados provenientes da aplicação da técnica de espectroscopia Raman foram associados as mudanças morfológicas apresentadas. Esses resultados podem ser visualizados nas sessões a seguir.

6.2.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

6.2.2.1 ANÁLISE DAS PRINCIPAIS VARIAÇÕES ESPECTRAIS ATRAVÉS DOS ESPECTROS MÉDIOS

Com o interesse em realizar uma análise visual das variações espectrais de cada camada da pele nos distintos grupos estudados, foi realizado o cálculo do espectro médio para cada camada da pele (SC, EP e DE) dos distintos grupos. Antecedente ao cálculo do espectro médio, os espectros foram agrupados de acordo com sua similaridade através da Análise Hierárquica de Clusters - HCA. Essa estratégia foi utilizada pois visualmente não foi possível identificar com clareza para todos os espectros, as regiões espectrais características que o identificam de forma única para uma determinada camada da pele. É importante ressaltar, que além das variações intrínsecas das camadas da pele de cada indivíduo, a metodologia utilizada para aquisição dos espectros é baseada na visualização e identificação das camadas da pele, através de uma câmera acoplada ao instrumento Raman, sendo que a imagem visualizada não possui coloração específica, somente tons de cinza. Por esse fato e devido a morfologia da amostra, a identificação correta de camada da pele e aquisição dos 5 espectros em cada camada torna-se um grande desafio. Para identificar as camadas da pele em cada amostra, o operador dos instrumentos Raman comparava a imagem em tons de cinza (instrumento Raman) e a imagem com coloração Hematoxilina - Eosina (H&E), buscando encontrar estruturas similares em ambas as imagens para localizar então as camadas da pele. Contudo esse procedimento não era simples, pois a movimentação da amostra, quando posicionada no instrumento Raman, não era simples e poderia danificar a amostra dependendo do tipo de movimento necessário. É importante enfatizar que cortes subsequentes não garantem perfeita correlação morfológica entre o corte primário e secundário. Diversos problemas, como dobra do tecido, rompimento do tecido, sobreposição de cola, perda da amostra e muitos outros podem ocorrer em ambos os cortes prejudicando sua correlação morfológica. Deste modo, deve-se considerar que provavelmente alguns espectros foram nomeados com referência a uma determinada camada da pele, baseados na visualização do “spot” do laser sob a amostra, porém apresentam características espectrais de outra camada da pele.

O uso da análise hierárquica de cluster foi fundamental como ferramenta de agrupamento dos espectros de acordo com a sua similaridade. Neste estudo, em sua maioria e salvo exceções, cada amostra possuía 20 espectros, sendo 5 de cada camada (SC, EP,

DE [DP e DR]). Todos os espectros de cada amostra foram utilizados e a partir da classificação por similaridade, um dendrograma foi gerado demonstrando a classificação de *clusters* de uma determinada amostra (Figura 31). Quanto menor a escala de variância mais similar o espectro é de seu vizinho. Os números apresentados a esquerda do dendrograma são referentes a ordem lógica criada para aquisição dos espectros, sendo de 1 - 5 da camada do estrato córneo, 6 - 10 da camada da epiderme, 11 - 15 da camada da derme papilar e 16 - 20 da camada da derme reticular.

Os espectros referentes as camadas da derme papilar (DP) e derme reticular (DR) não apresentaram variação espectral suficiente para classificação em grupos independentes através da metodologia de HCA. Os dados da camada da derme papilar apresentaram alta heterogeneidade e se misturavam com os dados de derme reticular. O incorreto agrupamento entre os espectros provenientes da derme papilar e derme reticular, pode ser justificado pela complexa composição bioquímica de ambas as camadas, o que dificulta na diferenciação espectral, e também associado ao fato de que a morfologia de ambas as camadas são, em diversos casos, difíceis de serem identificadas separadamente, mesmo com o auxílio das imagens coradas por coloração Hematoxilina - Eosina (H&E) (BRINGEL, 2011). Deste modo, os dados referentes a região da derme papilar foram descartados do estudo e agora considerado apenas a derme reticular (DR) como representante da camada dérmica (DE). A escolha pela derme reticular como representante da derme, também se baseou nos resultados encontrados na literatura, onde descrevem que os maiores efeitos da exposição solar na camada da derme ocorrem nos constituintes que estão localizados na derme reticular (VILLARET, 2019; NGUYEN, 2013; NGUYEN, 2012).

De modo geral foram observados excelentes agrupamentos nas camadas do estrato córneo (SC), epiderme (EP), derme (DE). Entretanto, alguns espectros apresentaram agrupamentos anômalos, sendo estes descartados das análises estatísticas seguintes. Esse tipo de resultado pode ser devido à uma variação bioquímica intrínseca da pele do indivíduo em determinada profundidade, ou mesmo fatores internos e externos que podem afetar a composição química da pele. Além dos fatos já citados, deve-se considerar a metodologia realizada, baseada na busca de correlação das estruturas da pele através da imagem corada por H&E e da imagem em tons de cinza através de uma câmera acoplada ao instrumento Raman. Sendo que alguns espectros podem ter sido adquiridos em uma determinada camada da pele, considerando as estruturas observadas e a posição do laser na amostra. Contudo, quando avaliado o espectro observa-se características espectrais de outra

camada, ocasionando uma incorreta nomenclatura do dado e equivocada classificação por HCA. Isso pode ocorrer, pois a identificação visual das camadas através da imagem em tons de cinza, nem sempre se apresenta perfeitamente correlata a imagem corada por H&E, dificultando a identificação das camadas. Esse possível equívoco foi reduzido através da comparação individual de cada espectro com os espectros referência retirados da literatura e de estudos anteriores. Por fim, outro fato relevante é que a amostra está depositada sob um vidro de quartzo durante a aquisição dos espectros. Esse tipo de material não apresenta picos Raman na região estudada, contudo já se é sabido que o mesmo apresenta um efeito de fundo na região entre 400 - 480 cm^{-1} , o que pode interferir na classificação dos dados por meio da metodologia estatística HCA, deste modo os espectros foram cortados na faixa espectral entre 480 - 1800 cm^{-1} .

Sendo a técnica de análise hierárquica de cluster, uma ferramenta muito sensível a variação entre os espectros, pode-se pressupor que resultados como os vistos em algumas amostras são passíveis de ocorrer e que representam a realidade amostral estudada. Contudo, os dados classificados incorretamente ou isolados de seus vizinhos, foram reavaliados de forma independente e inseridos novamente nos casos pertinentes.

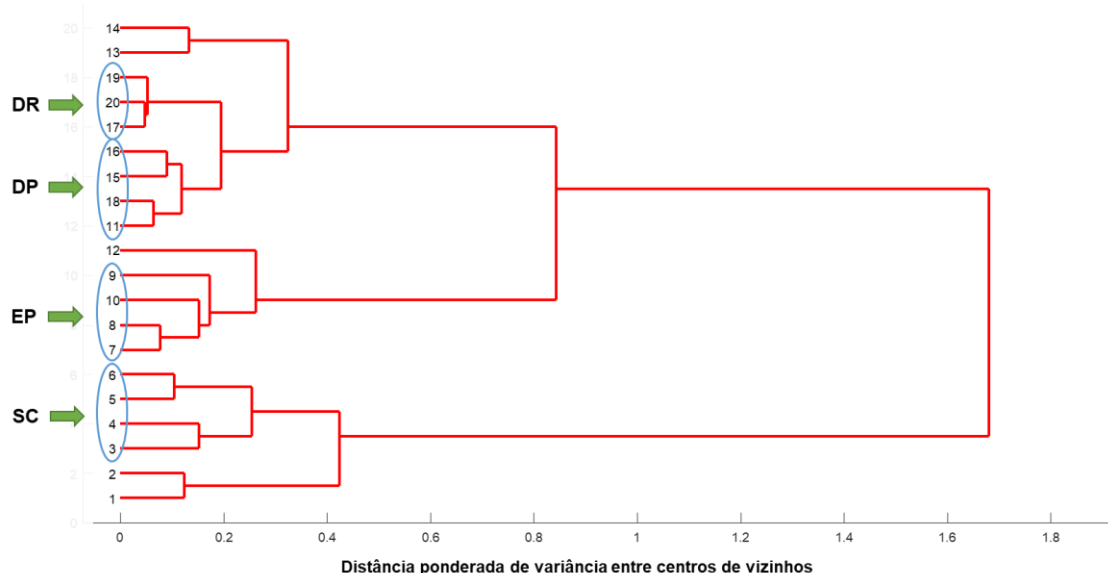


Figura 31 - Dendrograma de uma amostra do grupo FTENV, onde mostra a separação obtida através da HCA. Sendo estrato córneo (SC), epiderme viável (EP), derme papilar (DP) e derme reticular (DR).

Com base nos agrupamentos gerados pela análise hierárquica de clusters, definiu-se os espectros válidos de cada camada da pele para cada amostra. Esses espectros foram

então utilizados para o cálculo do espectro médio e posterior avaliação visual das diferenças espectrais para os distintos grupos e camadas da pele.

Destaca-se a variação observada nas camadas superficiais da pele, como o estrato córneo (SC) e epiderme (EP), que apresentam maior variância em relação ao espectro médio, quando comparada a camada dérmica (DE). Como pode ser observado na Figura 32, as variações intragrupo encontradas (FTENV, NFENV, FTCT e NFCT) são consideradas satisfatórias, pois essa variação pode ser um efeito intrínseco da pele de cada indivíduo. Esse estudo previu este tipo de variação e minimizou seus efeitos através dos critérios de inclusão e exclusão de participantes da pesquisa. Na Figura 32, pode-se observar o espectro médio e seus respectivos espectros individuais de cada camada da pele em cada grupo. Variações como a apresentada podem ser devidas a inúmeros fatores como já relatados anteriormente. Além destes fatores, podemos citar a hidratação da pele, diferenças mínimas de pigmentação e exposição solar como outros fatores importantes na diferenciação bioquímica intra- e intergrupo.

Nas camadas mais profundas da pele, encontra-se a derme (DE), onde visualmente observar-se maior homogeneidade comparada com as camadas mais superficiais. Com base nos espectros médios e seus respectivos espectros individuais, algumas regiões espectrais podem ser visualmente observadas e diferenciadas entre os distintos grupos, indicando diferenças bioquímicas entre os indivíduos fotoexpostos e não fotoexpostos, como destacado na Figura 32 e 33.

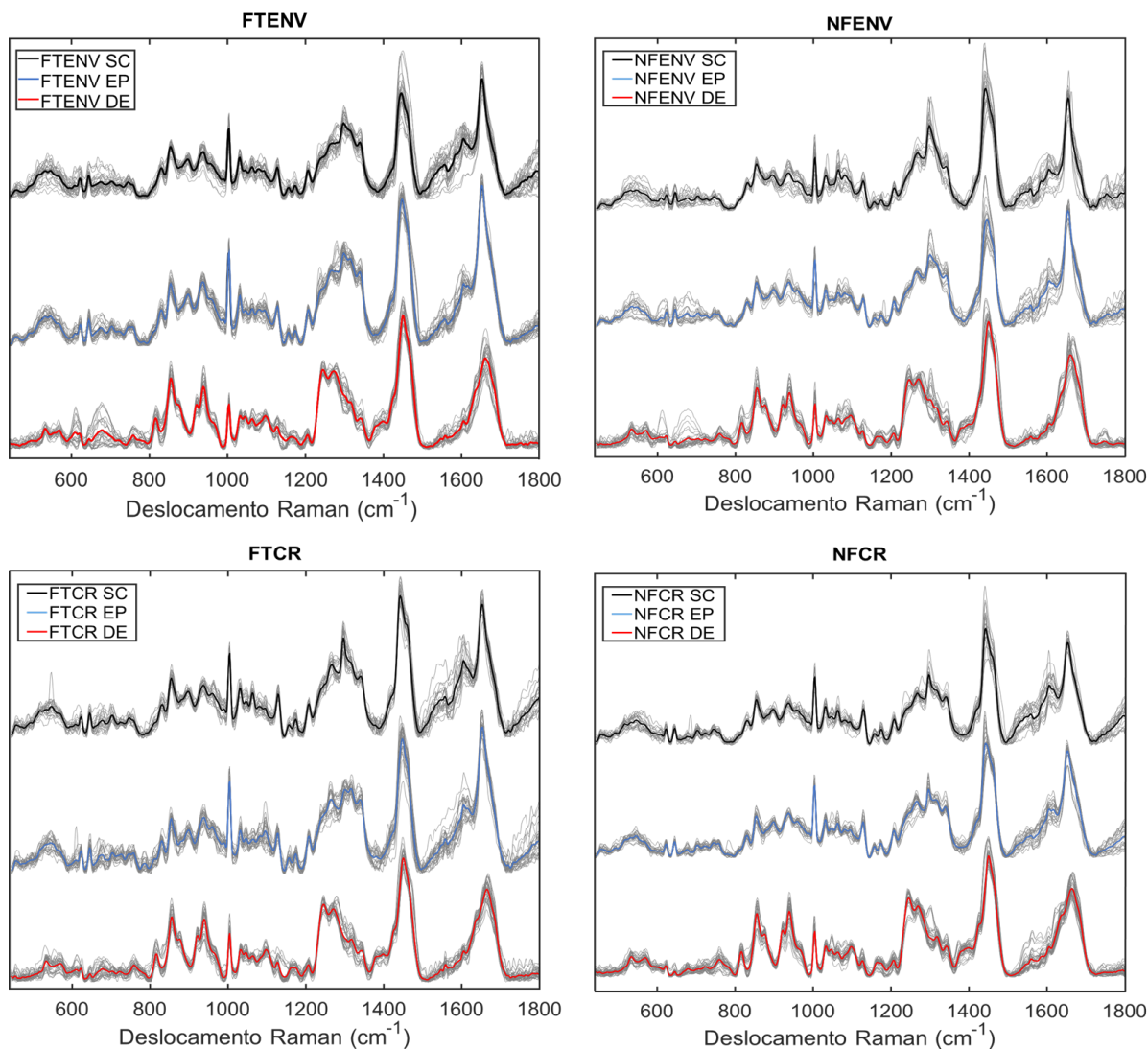


Figura 32 - Espectro médio das diferentes camadas da pele: Estrato Córneo (SC); Epiderme (EP) e Derme (DE), nos distintos grupos estudados: Fotoexposto Envelhecido (FTENV), Fotoexposto Cronológico (FTCR), Não Fotoexposto Envelhecido (NFENV) e Não Fotoexposto Cronológico (NFCR).

Após a análise visual das diferenças espectrais a partir da comparação dos espectros médios dos distintos grupos estudados e separados por camada da pele, foi possível indicar, ainda que de forma visual, que os indivíduos fotoexpostos, grupo com as siglas ENV, possuem maior variabilidade intragrupo quando comparados aos grupos do envelhecimento cronológico. Além disso, a variabilidade nas camadas do SC e EP são maiores do que na região da DE. Essa forma de visualização foi eficaz em uma análise prévia e visual dos dados obtidos. Contudo, não possibilita a comparação dos grupos de indivíduos por camada da pele. Neste intuito, para facilitar a visualização destas diferenças espectrais entre os

grupos em uma mesma camada, uma nova figura com os espectros médios foi gerada (Figura 33). Esse modo de comparação foi mais efetivo para evidenciar as variações nos espectros por camada da pele.

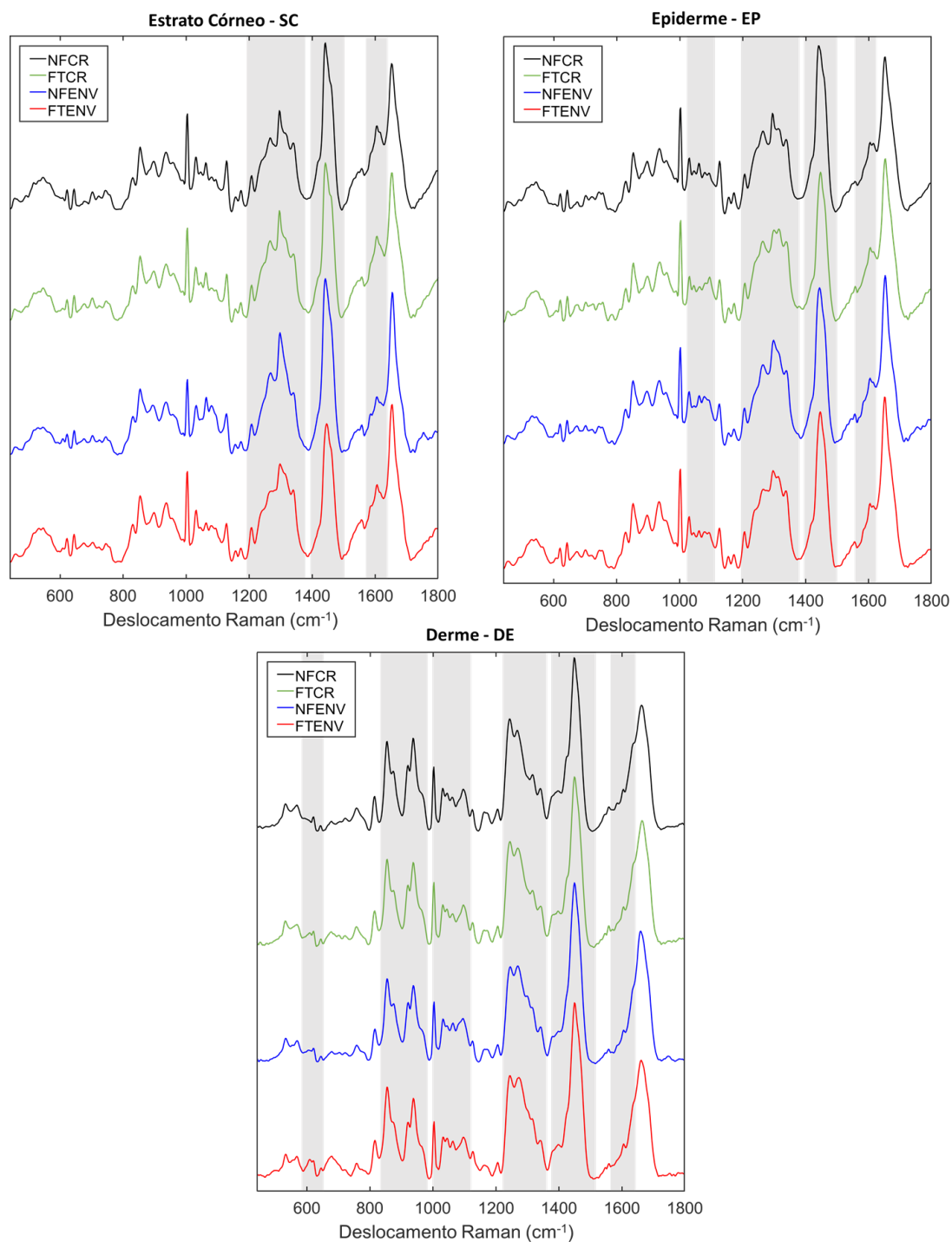


Figura 33 - Espectro médio das camadas da pele, estrato córneo, epiderme e derme para cada um dos grupos de estudo, Fotoexposto Cronológico (FTCR), Fotoexposto Envelhecido (FTENV), Não Fotoexposto Cronológico (NFCR) e Não Fotoexposto Envelhecido (NFENV).

As regiões indicadas em cinza na Figura 33, mostram as variações espectrais observadas visualmente entre os grupos estudados em uma mesma camada da pele.

Nota-se que os espectros médios obtidos são comuns a maioria dos estudos já realizados (PEREIRA, 2019; VILLARET, 2019; SANTOS, 2016; NGUYEN, 2013; CASPERS, 2000). Além disso, através de uma simples análise visual não é possível identificar todas as variações ao longo do espectro. Visando identificar possíveis variações espectrais entre os grupos foram empregues métodos quimiométricos de exploração e classificação supervisionada

As regiões destacadas na Figura 33, estão descritas correlacionando a posição dos picos, modos de vibração e atribuição na Tabela 4.

Tabela 4 - Regiões espectrais com diferenças visíveis entre os grupos estudados.

**Modo de vibração - ν : estiramento; δ : deformação; γ : torção*

***Deve-se considerar que a posição do pico Raman pode variar $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$.*

Posição (cm^{-1})	Modo de Vibração	Atribuição	Referência
850 - 940	$\nu(\text{C-C})$	Prolina - Hidroxiprolina	CHIRT, 2005; NGUYEN, 2012; ALI, 2012; PEZZOTI, 2015
1000 - 1130	$\nu(\text{C-C})$	Fenilalanina e lipídeos intracelulares	ALI, 2012; KOURKOUHELIS, 2015
1200 - 1400	$\nu(\text{C-N})$ $\delta(\text{N-H})$	Amida III	CASPERS, 1998; TFAILI, 2012; LEROY, 2014; PEZZOTI, 2015
1400 - 1500	$\delta(\text{CH}_2)$ $\delta(\text{CH}_3)$	Proteína +Lipídeos	GREVE, 2008; ALI, 2012; LEROY, 2014; PEZZOTI, 2015
1500 - 1700	$\nu(\text{C=O})$	Amida I	GNIADCKA, 1998; GREVE, 2008; ALI, 2012; LEROY, 2014; PEZZOTI, 2015

6.2.2.2 ANÁLISE MULTIVARIADA: HCA, PCA E PLS-DA

Em busca de uma análise qualitativa dos dados implementou-se o uso de ferramentas estatísticas multivariadas. Os espectros foram classificados em camadas (SC, EP e DE) empregando o HCA, em seguida visando buscar agrupamentos referentes as classes estudadas foram utilizadas as ferramentas quimiométricas de PCA e PLS-DA. Ambas as metodologias foram executadas de forma complementar e com a finalidade de identificar as regiões espectrais de maior representatividade da variabilidade amostral. As técnicas de PCA e PLS-DA foram aplicadas em todos os grupos estudados para cada camada da pele.

Para cada camada da pele (SC, EP e DE) foi realizado 2 comparações entre os grupos: (1) FTENV vs NFENV - comparação que melhor evidencia as diferenças espectrais entre o

grupo com alta exposição solar (rural) e menor exposição solar (urbana). Essa comparação de grupos é fundamental para determinar o impacto na pele da exposição solar intensa e cumulativa de indivíduos que vivem em zona rural *versus* os indivíduos de menor exposição que vivem na zona urbana e possuem diferentes hábitos de exposição solar. Nesta comparação a biópsia realizada foi da mesma região do corpo em todos os indivíduos, na área do antebraço. (2) FTENV vs FTCT - comparação que melhor evidencia as diferenças espectrais entre a área do corpo com maior exposição solar (antebraço), *versus* área de menor exposição solar (braço). Essa comparação de grupos é fundamental para inferir os efeitos do fotoenvelhecimento na pele em regiões expostas e não expostas. Os indivíduos deste grupo vivem na zona rural, com maior exposição solar devido aos seus hábitos. Contudo, possuem áreas do corpo de maior e menor exposição solar.

As comparações NFENV x NFCT para as camadas de estrato córneo, epiderme e derme e as comparações FTCT x NFCT para as camadas epiderme e derme foram consideradas inconclusivas através da metodologia aplicada, o uso das análises de PCA e PLS-DA. Os resultados de PCA não apresentaram tendência de agrupamento dos dados em diferentes grupos e os resultados de PLS-DA apresentaram sensibilidade e especificidade igual ou menor a 50% de potencial de classificação dos dados para os grupos estudados. Deste modo, essas comparações não foram descritas em mais detalhes neste trabalho. Diversos fatores podem levar a esse tipo de resultado e avaliações mais aprofundadas dos dados e aplicação de outras metodologias estatísticas podem auxiliar na elucidação dos resultados sobre os grupos não conclusivos neste momento. Exemplos dos resultados obtidos a partir das comparações citadas acima, podem ser observados na Figuras A1 – A5, na seção Apêndice deste trabalho.

A comparação NFENV x NFCT é baseada na correlação de indivíduos da zona urbana avaliando a pele do antebraço (região de maior exposição) *versus* a pele do braço (região de menor exposição). Baseando-se que os indivíduos são da zona urbana, é possível pressupor um menor tempo exposição solar diária devido aos seus hábitos. E que esse tipo de exposição, mesmo nas regiões mais expostas da pele, pode ocasionar modificações bioquímicas nas camadas da pele, mas de difícil caracterização por espectroscopia Raman. Além deste fator, deve-se considerar a possibilidade de mudanças bioquímicas devido a interação com a luz infravermelha, que pode penetrar por entre as camadas da pele e desta forma causar modificações bioquímicas similares em ambos os grupos. Neste caso, não é

possível identificar variações espectrais entre os grupos, pois as modificações bioquímicas ocorrem em ambos de forma similar.

Na comparação FTCCR x NFCR, avalia-se a região do braço (menor exposição solar) de indivíduos provenientes da zona rural (FTCCR) e indivíduos da zona urbana (NFCR). Essa região da pele é a mais protegida à exposição solar devido a sua localização. Mesmo em indivíduos da zona rural, essa região não possui exposição contínua ao sol. Portanto, em ambos os grupos pode-se inferir que a composição da pele é similar, não apresentando modificações bioquímicas relevantes entre os grupos estudados.

6.2.2.2.1 Estrato Córneo - FTENV x NFENV

Na Figura 34 e Figura 35, podemos visualizar os resultados obtidos para a camada do estrato córneo na comparação entre os grupos FTENV x NFENV, com o uso da técnica de PCA.

A primeira análise de PCA foi realizada entre os grupos FTENV x NFENV (Figura 34). Essa comparação de grupos é fundamental para inferir os efeitos do fotoenvelhecimento na pele. Neste tipo de comparação pode-se determinar as possíveis variações bioquímicas provenientes a exposição solar intensa e acumulada. O grupo FTENV é formado por indivíduos da zona rural, que naturalmente possuem maior exposição solar ao longo do dia quando comparado ao grupo NFENV, formado por indivíduos que vivem na zona urbana, que usualmente tem menor exposição ao sol ao longo do dia. Essa comparação pode fornecer informações valiosas referente as mudanças bioquímicas na pele entre indivíduos expostos a luz solar, mas com diferente intensidade e duração. Em ambos os grupos a biópsia estudada foi da mesma região do corpo, área do antebraço, mais exposta ao sol.

A comparação entre os grupos FTENV x NFENV, pode ser avaliada através do gráfico de dispersão dos dados que apresenta intensa dispersão, mas com leve tendência de agrupamento dos dados referentes ao grupo FTENV - pontos em vermelho (Figura 34a). Essa tendência de agrupamento mostra-se localizada no lado esquerdo da Figura 34a, indicando que os scores negativos da PC1 são os maiores responsáveis na classificação do grupo FTENV e conseqüente diferenciação entre FTENV x NFENV. Ainda que apresentando menor tendência de agrupamento, os dados referentes ao grupo NFENV - pontos em verde, estão localizados em sua maioria ao lado direito do gráfico de dispersão de dados (Figura 34a). Sendo assim, os scores positivos da PC1 são os maiores responsáveis na

classificação dos dados do grupo NFENV e consequente diferenciação entre FTENV x NFENV.

Para essa comparação entre FTENV x NFENV, a PC2 não apresentou separação dos dados em distintas regiões. Essa afirmação é baseada na avaliação do gráfico de dispersão de dados (Figura 34a), que apresenta uma intensa dispersão de todos os dados ao longo do eixo Y (*scores* positivos e negativos da PC2). Observa-se que os dados de nenhum dos grupos apresentam tendência de agrupamento em qualquer região ao longo do eixo Y (região superior ou inferior do gráfico), criando um contraste ao grupo oposto.

Com base nas constatações observadas através do gráfico de dispersão de dados (Figura 34a), o gráfico de *loadings* pode ser avaliado. Na Figura 34b, é apresentado o gráfico de *loadings* da PC1 *versus* PC2. Como constato no gráfico de dispersão de dados, a PC1 apresentou-se como a melhor PC para classificação dos dados. Deste modo, deve-se considerar os *scores* positivos e negativos apenas da PC1, sendo que os *scores* positivos são relacionados ao grupo NFENV e os *scores* negativos relacionados ao grupo FTENV.

Essa metodologia de análise dos resultados da PCA foi aplicada para todos os outros resultados apresentados neste estudo.

Os principais *scores* positivos da PC1 que apresentaram maior contribuição no grupo NFENV foram destacados na Figura 34b, sendo a banda em 1008 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1060 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de estiramento das cadeias estruturais de C-C de lipídeos, 1294 cm^{-1} atribuída ao constituinte ceramida presente na camada do estrato córneo, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos e em 1650 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação α -hélice, atribuída a queratina presente no estrato córneo.

Os principais *scores* negativos da PC1 que apresentaram maior contribuição no grupo FTENV foram destacados na Figura 34b, sendo a banda em 998 cm^{-1} relacionada ao constituinte fenilalanina, 1308 cm^{-1} relacionada aos modos de torção de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1334 cm^{-1} atribuída a ceramida hidratada na conformação α -hélice, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I.

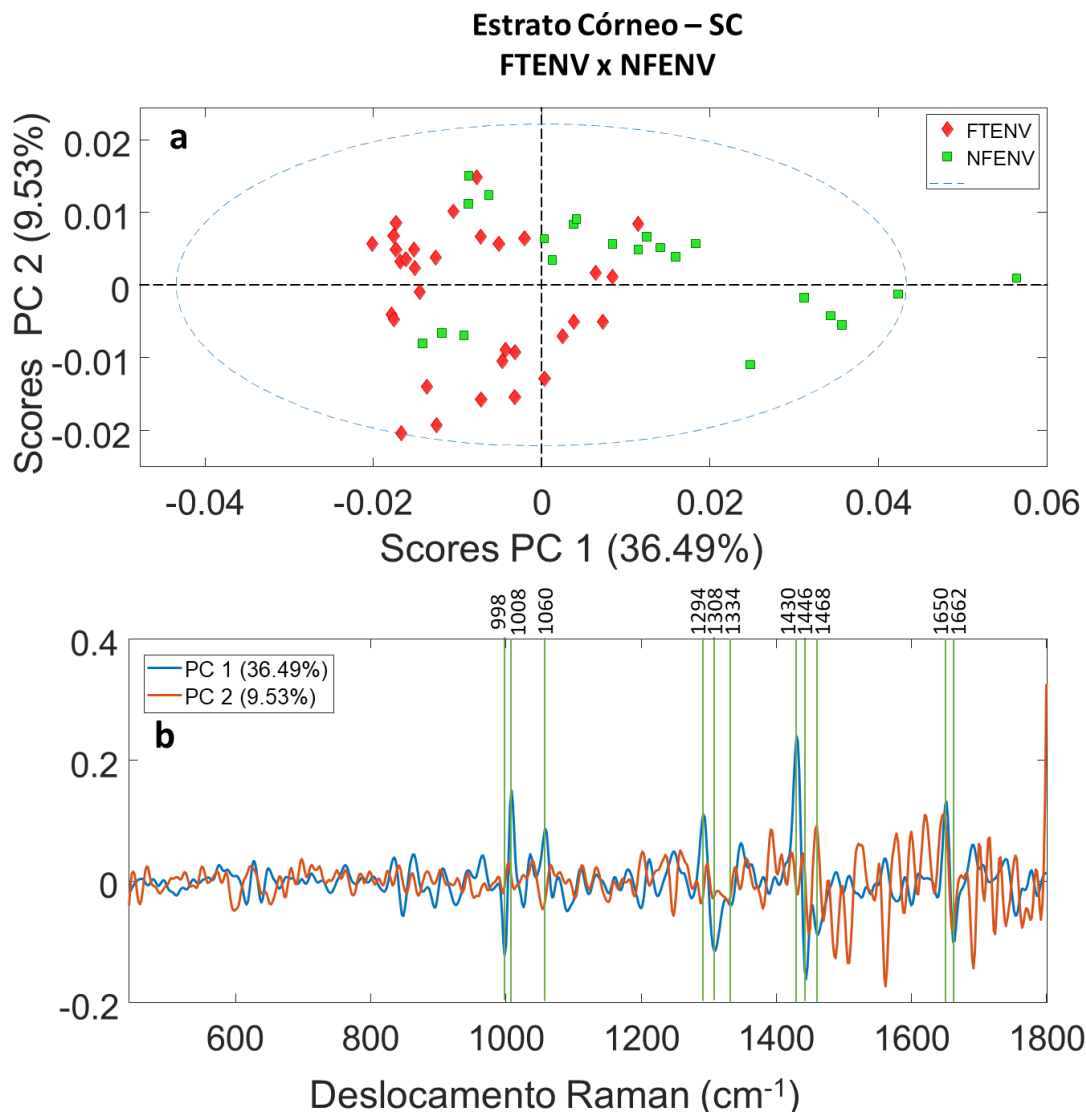


Figura 34 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC2.

Uma avaliação complementar foi realizada comparando a PC1 x PC5 (Figura 35). O uso de uma PC de menor relevância pode fornecer informações importantes sobre a diferenciação dos dados. Na maioria dos casos, as primeiras PCs, sendo elas as mais relevantes para diferenciação, fornecem informações suficientes sobre os modos de vibração mais importantes para distinção entre os grupos. Contudo, em dados com intensa heterogeneidade intrínseca e variações experimentais, o uso de uma PC de menor relevância pode ser fundamental para avaliação de modos de vibração que foram minoritariamente considerados pelas PCs anteriores (ZANETTI, 2014).

Na Figura 35a é possível analisar os resultados obtidos pela técnica de PCA analisando a PC1 x PC5 que mostraram uma intensa dispersão dos dados, com o mesmo tipo de separação pela PC1 e tendência de agrupamento dos dados FTENV, como já descrito na análise entre PC1 x PC2. Adicionalmente, pode-se observar uma distribuição dos dados ao longo do eixo X (linha tracejada - no meio), indicando que a PC5 tem atuação, ainda que pequena, na diferenciação dos grupos analisados. Como é possível visualizar, os dados NFENV apresentam leve tendência de organização acima da linha tracejada do eixo X. Sendo assim, os *scores* positivos da PC5 são relacionados as principais componentes do grupo NFENV. Nesta análise específica, os *scores* negativos da PC5 não foram relacionados com nenhum grupo estudado, como pode ser observado, os dados do grupo FTENV não apresentam tendência de agrupamento em relação a PC5 (*scores* positivos e negativos). Somente os *scores* positivos da PC5 relacionados ao grupo NFENV foram analisados.

Os principais *scores* positivos da PC5 que apresentaram maior contribuição no grupo NFENV foram destacados na Figura 35b, sendo a banda em 998 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1302 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de torção da ligação CH_2 de lipídeos, adenina e citosina e em 1380 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de deformação simétrica da ligação CH_3 .

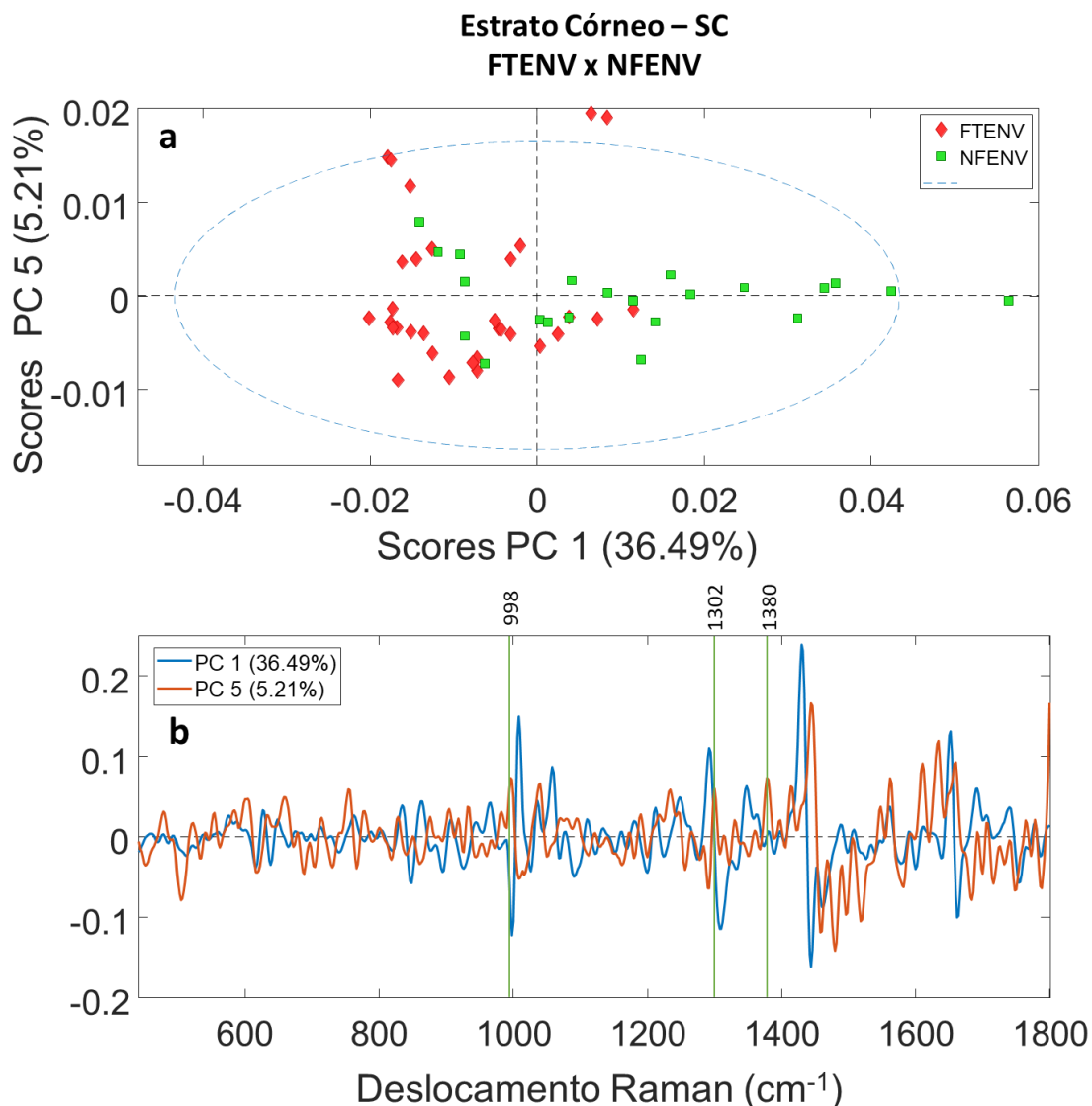


Figura 35 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 5 (PC5); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC5.

Visando destacar as possíveis diferenças espectrais dos grupos avaliados, foi empregado o método de classificação supervisionado mais utilizado em dados de origem espectroscópica, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais - PLS-DA. Esse método baseia-se na construção de um modelo de classificação, utilizando parte dos dados para calibrar o modelo e outra parte dos dados para validar sua sensibilidade e especificidade na classificação dos dados. Para a construção do modelo de classificação, primeiramente são selecionados alguns espectros para o processo de calibração do método PLS-DA, essa fase é fundamental para ensinar ao modelo de classificação a variabilidade

amostral em estudo, e assim o mesmo poderá prever as classes dos novos dados inseridos no modelo. A fase de calibração do modelo é essencial para a técnica PLS-DA, pois um modelo mal calibrado, como por exemplo, devido a número de dados insuficientes ou dados que não representem a variabilidade amostral, podem afetar na capacidade de predição de classes para os novos dados inseridos. Essa predição, é conhecida como validação do modelo, comprovando a capacidade do modelo na classificação de novos dados de entrada.

A análise dos resultados por PLS-DA parte de um pressuposto simples, que a ferramenta já recebe os dados de entrada conhecendo sua classe pertencente e após a aplicação do método é avaliado se a nova classificação dos dados permanece como antes ou se houve alterações. O desempenho do modelo pode ser mensurado através de sua sensibilidade e especificidade na classificação dos dados. Para analisar o desempenho do modelo, deve-se definir a classe de interesse, ou seja, a classe referência e que será conseqüentemente comparada a classe adjacente. Hipoteticamente, pode-se considerar a análise de duas classes, sendo uma a “classe A” e outra a “classe B”. Analisando a “classe A” como a classe de interesse, a sensibilidade do modelo é determinada pela capacidade do mesmo em classificar corretamente os dados da “classe A”, sendo ela a classe referência, na mesma “classe A” após aplicação do método de PLS-DA. Em resumo, a sensibilidade é medida pela capacidade do modelo em classificar os dados de uma determinada classe de forma correta. Em um dado exemplo, pode-se considerar que sensibilidade igual a 100%, significa que todos os dados foram classificados corretamente e que uma sensibilidade de 20%, significa que apenas 20% dos dados foram classificados corretamente, ou seja, os dados da “classe A” foram classificados em 20% na “classe A” e 80% na “classe B”. Mantendo a premissa que a “classe A” é a classe de interesse. A especificidade do modelo pode ser medida através da capacidade do modelo em classificar os dados da “classe B” em sua mesma classe após a aplicação do método PLS-DA. Sendo assim, a avaliação da especificidade do modelo leva em conta qual é a classe referência. O objetivo é mensurar a capacidade do modelo em distinguir os dados entre a classe referência “classe A” e a “classe B”, classificando corretamente os dados da “classe B”. Um dado modelo PLS-DA que apresente especificidade igual a 70%, significa que foi capaz de distinguir em 70% dos dados em relação a classe de referência, classificando-os corretamente na “classe B”. Neste exemplo, o modelo classificou 30% dos dados provenientes da “classe B” na classe de referência (“classe A”) e 70% dos dados na “classe B”, após a aplicação do método PLS-DA.

Essa forma de interpretação da sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA deve ser aplicada em todos os grupos e comparações.

Na Figura 36c é possível avaliar a comparação FTENV x NFENV que resultou em uma sensibilidade aproximada para o conjunto de validação de 90% e 66% para os grupos FTENV e NFENV, respectivamente. Resultado satisfatório considerando que o estrato córneo é a camada mais superficial da pele e mais heterogênea quando comparada com uma camada mais profunda como a derme. Mesmo com a alta variabilidade intrínseca desta camada devido sua composição química, constante renovação celular e variabilidade natural entre os indivíduos, a técnica de PLS-DA conseguiu classificar de modo adequado as amostras da classe FTENV e de modo satisfatório as amostras da classe NFENV. O primeiro resultado a ser analisado é o gráfico de dispersão de dados - “*scatter plot*” (Figura 36a), que mostra a classificação dos dados utilizados para a calibração e os dados utilizados para a validação do método. A numeração ao lado de cada ponto é uma referência interna do estudo para identificação da amostra e espectro, como já explicado na sessão 5.2.7. Análise dos espectros Raman.

A partir da interpretação da Figura 36a, observa-se que os dados utilizados para calibração e validação apresentam variabilidade bioquímica dentro de seu próprio grupo (dados em vermelho - FTENV e em verde - NFENV). Alguns dados foram classificados incorretamente considerando a metodologia estatística escolhida, onde estão próximos a linha limiar entre os grupos ou mesmo já estão dispersos em outro grupo. Esse fato pode ser justificado pela variação bioquímica intrínseca da camada do estrato córneo de cada indivíduo participante. Vale também ressaltar que essa camada está em constante renovação celular (mudanças bioquímicas), e que a pele de cada indivíduo interage de forma distinta a exposição solar. Todos esses fatos, indicam que mesmo considerando a variabilidade intrínseca da pele de cada indivíduo e seus hábitos a exposição solar, a combinação da espectroscopia Raman confocal e a técnica quimiométrica de classificação PLS-DA foi capaz de classificar em distintos grupos os dados analisados e evidenciar que existem diferenças espectrais entre o grupo de indivíduos da zona rural - de maior exposição solar - (FTENV) e o grupo de indivíduos da zonal urbana - de menor exposição solar - (NFENV).

Para identificar quais foram as principais bandas espectrais responsáveis pela separação das classes, o estudo do gráfico de variáveis importantes faz-se necessário (Figura 36b). Este tipo de gráfico fornece informações a respeito das bandas discriminantes

características na diferenciação dos grupos. Quanto mais intenso o pico, maior é a sua importância para a discriminação dos dados. Na Figura 36b, é possível observar que as regiões das bandas em 1008 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1294 cm^{-1} atribuída ao constituinte ceramida presente na camada do estrato córneo, 1308 cm^{-1} relacionada aos modos de torção de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas, 1650 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação α -hélice, atribuída a queratina presente no estrato córneo e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de $\text{C}=\text{O}$, atribuída a Amida I, apresentaram as maiores intensidades.

Os picos Raman em 1008 cm^{-1} , 1294 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} foram relacionados ao grupo NFENV e os picos em 1308 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} foram relacionados ao grupo FTENV.

A matriz de confusão gerada pela análise de PLS-DA (Figura 36c), mostra a sensibilidade e especificidade em classificar os dados a partir de um modelo. Sendo possível observar que os dados utilizados no processo de calibração do modelo obtiveram sensibilidade igual a 100%, ou seja, todos os dados foram corretamente classificados. Esse resultado indica que o modelo conseguiu identificar as principais diferenças entre os dados utilizados para calibração e distingui-los entre si em duas classes. Entretanto, para a validação foi observado uma sensibilidade de classificação do modelo de 90% e 66% para os grupos FTENV e NFENV, respectivamente. Neste caso, o modelo não conseguiu classificar corretamente alguns dados em suas respectivas classes. Isso pode ser devido ao fato de que os dados utilizados na calibração não contemplam algumas variações que estão apresentadas no modelo de validação.

Esse tipo de resultado, onde a calibração alcança 100% de sensibilidade e a validação apresenta valores inferiores, pode ser devido a um processo de sobre ajuste do modelo de calibração, onde o modelo treina demasiadamente sobre os dados no processo de calibração, mas não consegue generalizar o modelo para prever corretamente os dados na validação. O modelo treina de maneira sobre ajustada na calibração, mas não é capaz de generalizar na validação. Uma alternativa para minimizar essa limitação do modelo é a inserção de mais dados na etapa de calibração do modelo, ou reduzir o número de variáveis

latentes. Contudo, a última alternativa mencionada prejudicaria a qualidade do modelo devido ao perfil dos dados utilizados apresentarem alta variabilidade espectral.

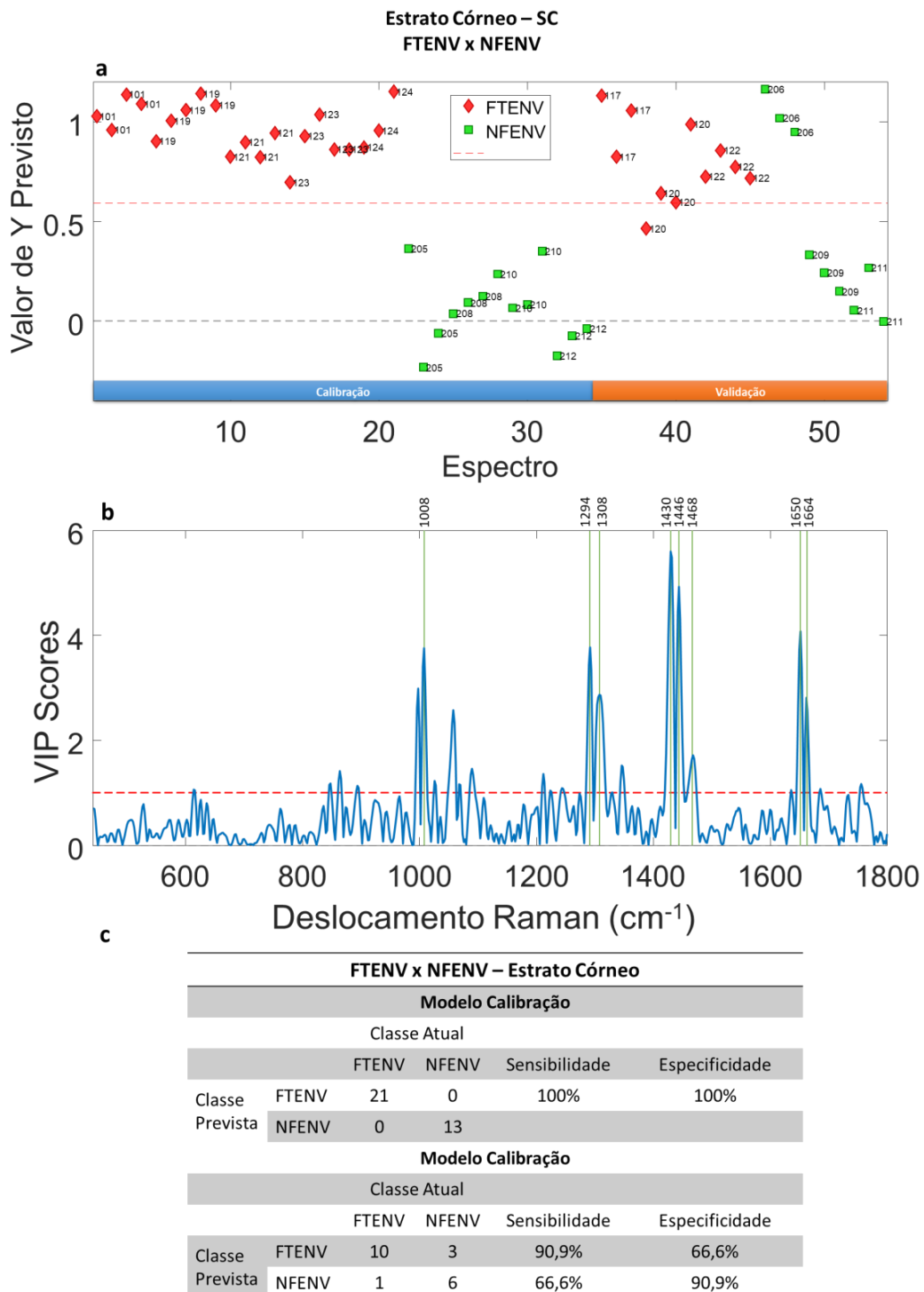


Figura 36 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Analisando os resultados obtidos através das técnicas de PCA e PLS-DA na comparação entre os grupos FTENV x NFENV, pode-se destacar a diminuição da contribuição da banda em 1650 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação α -hélice, e aumento da contribuição da banda em 1662 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação β -folha, ambas as bandas atribuídas a queratina do estrato córneo para o grupo FTENV. Esses resultados sugerem uma mudança de conformação da amida I devido a desnaturação térmica da pele. Esse efeito atua diretamente nas pontes de hidrogênio que se ligam ao longo da proteína e mantém sua conformação. Outros estudos sugerem conclusões correlatas relacionando essa banda como um sensor para modificações estruturais do grupo amida. Essa observação é baseada de que o modo de alongamento C=O na amida I é fracamente acoplado ao modo de alongamento da ligação carbono-nitrogênio e ao modo de deformação no plano da ligação nitrogênio-hidrogênio. Consequentemente, as mudanças na geometria molecular devido à degradação das cadeias de tripla-hélice do colágeno podem resultar na dissociação da tripla-hélice em uma fita simples ou uma fita dupla (PEZZOTI, 2015).

O conteúdo lipídico da pele é um fator chave na função de barreira de permeabilidade, incluindo efeitos cosméticos e administração transdérmica de medicamentos. Anormalidades na função de barreira, que estão relacionadas ao teor de lipídios, mostraram levar a dermatite atópica e outras doenças cutâneas comuns (PEZZOTI, 2015). Os ácidos graxos livres e triglicerídeos são afetados em suas composições por irradiação ultravioleta (PEZZOTI, 2015). Neste estudo, o grupo FTENV apresentou maior contribuição da banda em 1308 cm^{-1} e 1446 cm^{-1} ambas atribuídas ao modo de torção e deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, respectivamente, quando comparado ao grupo NFENV. Esse tipo de resultado fornece indícios de que a barreira lipídica sofre alterações quanto sua conformação e função mediante a exposição solar contínua e intensa.

Com base nos resultados obtidos, é possível observar um aumento da contribuição da banda em 1334 cm^{-1} no grupo FTENV, associada a ceramida hidratada em sua conformação α -hélice. Essa mudança pode indicar alterações de conformação e mudanças na função barreira da pele. Essas alterações, podem significar que fatores ambientais podem afetar fortemente os constituintes de conformação α -hélice relacionados a hidratação da pele, nas regiões mais expostas à luz solar (PEZZOTI, 2015).

Outros modos vibracionais também foram observados para a camada do estrato córneo e estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Atribuição dos modos vibracionais Raman que apresentam maior variação espectral entre os grupos estudados (FTENV, NFENV, FTCT e NFCT) nas distintas camadas da pele: (SC) Estrato Córneo, (EP) Epiderme e (DE) Derme.

**Modo de vibração - ν : estiramento; δ : deformação; γ : torção*

***Deve-se considerar que a posição do pico Raman pode variar $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$.*

Posição (cm^{-1})	Modo de Vibração	Atribuição	SC	EP	DE	Referência
670		Timina e Guanina (DNA/RNA)		X		TFAILI, 2012
700	$\nu(\text{C-S})$	Aminoácido metionina: conformação trans			X	TFAILI, 2012
848	$\delta(\text{CHH})$	Tirosina interna		X		CHIRT, 2016
854	$\nu(\text{C-C})$	Prolina			X	ALI, 2013
875		Anel de Hidroxiprolina			X	NGUYEN, 2012
884	$\gamma(\text{CH}_2)$	Lisina			X	TFAILI, 2012
922	$\nu(\text{C-C})$	Anel de Prolina			X	PEZZOTI, 2015
930	$\nu(\text{C-C})$	Carotenoide e colesterol: conformação α -hélice	X	X		PEZZOTI, 2015
940	$\nu(\text{C-C})$	Hidroxiprolina; Colágeno (estrutural)			X	ALI, 2013
998 - 1008	$\nu(\text{C-C})$	Modo de respiração simétrico do anel de fenilalanina	X	X	X	ALI, 2012; KOURKOU MELI S, 2015
1060	$\nu(\text{C-C})$	Lipídeo (estrutural)	X			TFAILI, 2012
1106	$\nu(\text{C-C})$	Lipídeo: conformação gauche		X		LEROY, 2014
1124	$\nu(\text{C-C})$	Lipídeo estrutural: conformação trans	X			CASPERS, 1998
1130	$\nu(\text{C-C})$	Lipídeo intracelulares		X	X	LEROY, 2014
1160		Glicosaminoglicano		X		VILLARET, 2019
1256		Amida III, conformação β -folha de adenina e citosina + Lipídeo		X		PEZZOTI, 2015
1270		Fragmentos não polares de prolina na conformação α -hélice; Colágeno rico em prolina		X	X	PEZZOTI, 2015
1276	$\nu(\text{C-N})$ $\delta(\text{N-H})$	Amida III: conformação α -hélice	X	X	X	LEROY, 2014
1294	$\delta(\text{CH}_2)$	Ceramida; Citosina	X	X		TFAILI, 2012; CASPERS, 1998
1302	$\gamma(\text{CH}_2)$	Lipídeo; Adenina e citosina	X	X		TFAILI, 2012; ALI, 2012
1308	$\gamma(\text{CH}_3)$ $\gamma(\text{CH}_2)$	Lipídeo	X	X	X	TFAILI, 2012
1315	$\delta(\text{CH}_2)$	Amida III: Colágeno conformação α -hélice			X	PEZZOTI, 2015
1334	$\nu(\text{C-N})$ $\delta(\text{N-H})$	Ceramida hidratada: conformação α -hélice	X			PEZZOTI, 2015
1342	$\delta(\text{C}_\alpha\text{H}) +$ $\nu(\text{CC}_\alpha) +$ $\delta(\text{NH})$	Proteína (estrutural)				LEROY, 2014
1372	$\nu(\text{C-N})$	Anel de citosina e guanina			X	PEZZOTI, 2015

1382	$\delta(\text{CH}_3)$		X	X		CHIRT, 2016
1388	CH_3 $\delta(\text{CH}_3)$	Lipídeo			X	TFAILI, 2012
1430	$\gamma(\text{CH}_2)$	Proteína e lipídeo	X	X	X	PEZZOTI, 2015
1446	$\delta(\text{CH}_2)$ $\delta(\text{CH}_3)$	Proteína e lipídeo	X	X		ALI, 2012
1468	$\delta(\text{CH}_2)$	Proteína e lipídeo	X	X	X	PEZZOTI, 2015
1560		Triptofano	X	X		TFAILI, 2012
1590	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Proteína: olefínico	X			LEROY, 2014
1642	$\delta(\text{CH}_2)$	Proteína	X	X		GREVE, 2008
1650	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amida I: conformação α -hélice; Queratina	X	X		NGUYEN, 2012; ALI, 2012
1658	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amida I: colágeno (interface epiderme-derme) na conformação α -hélice		X	X	NGUYEN, 2012; PEZZOTI, 2015
1662	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amida I	X		X	GNIADDECKA, 1998
1666	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amida I: colágeno tipo I			X	NGUYEN, 2012
1690	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amida I: conformação β -folha	X	X	X	GREVE, 2008

6.2.2.2.2 Estrato Córneo - FTENV x FTCCR

A investigação das diferenças entre os grupos FTENV x FTCCR também foi realizada para a camada do estrato córneo, sendo essa comparação fundamental na determinação de possíveis variações bioquímicas provenientes a exposição solar intensa e acumulada. Os indivíduos de ambos os grupos são os que vivem na zona rural, com maior exposição solar devido aos seus hábitos. Contudo, possuem áreas do corpo de maior e menor exposição solar (FTENV - antebraço | maior exposição solar e FTCCR - braço | menor exposição solar). Espera-se que essa comparação evidencie as mudanças espectrais relacionadas a pele fotoexposta e pele não fotoexposta. Similares aos resultados discutidos para os grupos FTENV x NFENV, observa-se uma alta dispersão dos dados e apenas leves tendências são visualizadas. Os dados FTCCR, apresentam moderada tendência de agrupamento em direção aos scores positivos da PC1, lado direito do gráfico (Figura 37a). Os dados do grupo FTENV apresentam leve tendência de agrupamento em direção aos scores negativos da PC1, podendo ser visualizados em sua maioria no lado esquerdo do gráfico de dispersão de dados. Com isso, é possível inferir que os scores positivos da PC1 são relacionados ao grupo FTCCR e os scores negativos da PC1 são relacionados ao grupo FTENV.

Com o objetivo de identificar as bandas Raman atribuídas para cada componente principal gerada pela análise PCA. A interpretação dos scores positivos e negativos deve ser realizada através do gráfico de *loading*, apresentado na Figura 37b.

Os principais *scores* positivos da PC1 que apresentaram maior contribuição no grupo FT-CR foram relacionados as bandas em 1294 cm^{-1} atribuída ao constituinte ceramida presente na camada do estrato córneo, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1560 cm^{-1} atribuída ao constituinte triptofano, 1590 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O da proteína, 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I e em 1690 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I na conformação β -folha.

Os principais *scores* negativos da PC1 que apresentaram maior contribuição no grupo FT-ENV foram relacionados as bandas em 998 cm^{-1} relacionada ao constituinte fenilalanina, 1276 cm^{-1} relacionada aos modos vibracionais Raman de estiramento de C-N e deformação de N-H, atribuída a Amida III na conformação α -hélice, 1302 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de torção da ligação CH₂ de lipídeos, adenina e citosina, 1388 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de deformação de CH₃ atribuída aos lipídeos, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH₂ e CH₃ de lipídeos e proteínas, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH₂ de lipídeos e proteínas e em 1642 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de torção de CH₂ de proteínas.

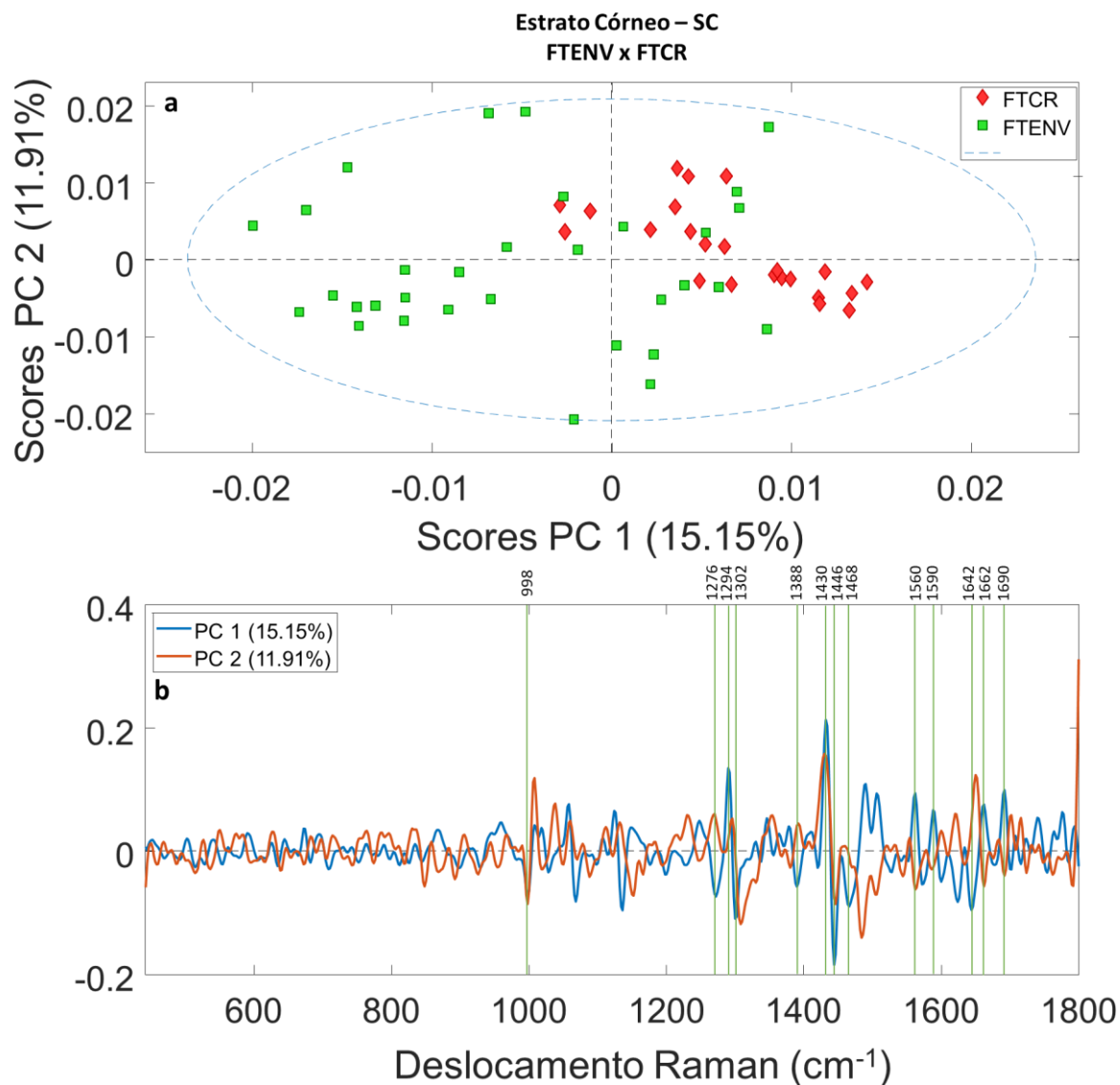


Figura 37 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FTGR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* das PC1 e PC2.

Os resultados de PLS-DA podem ser interpretados através da Figura 38a, onde é possível visualizar a dispersão dos dados para a etapa calibração e validação do modelo. Os dados foram corretamente classificados na calibração do modelo, contudo constata-se que alguns dados presentes na validação foram classificados de forma incoerente. Esse tipo de resultado já foi discutido e justificado nas sessões anteriores.

Como é possível observar na Figura 38b, a análise das variáveis importantes também foi conduzida e algumas regiões espectrais foram selecionadas como as mais importantes para discriminação dos grupos.

As bandas em 1124 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-C, atribuída a conformação trans de lipídeos estruturais, 1302 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de torção de CH_2 de lipídeos, adenina e citosina, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I, foram os que apresentaram as maiores intensidades e consideradas as mais relevantes para discriminação dos grupos.

A banda Raman em 1662 cm^{-1} foi relacionada ao grupo FTCT e as bandas Raman em 1124 cm^{-1} , 1302 cm^{-1} e 1446 cm^{-1} foram relacionadas ao grupo FTENV.

A matriz de confusão gerada pela análise de PLS-DA (Figura 38c), mostra a sensibilidade e especificidade em classificar os dados a partir de um modelo. Sendo possível observar que os dados utilizados no processo de calibração do modelo foram classificados corretamente em 100%. Entretanto para a validação foi observado uma sensibilidade de classificação do modelo de 63% e 85% para os grupos FTENV e FTCT, respectivamente. Com base nos valores de sensibilidade apresentados é possível indicar que um maior número de dados por grupo pode favorecer positivamente na construção do modelo e na validação do mesmo. Como descrito na seção materiais e métodos, ambos os grupos iniciaram o estudo com o mesmo número de dados em cada grupo, porém após a etapa de classificação por HCA e remoção de *outliers*, alguns dados foram removidos para a etapa de análise por PLS-DA. Esse fato resultou em uma quantidade final de dados para calibração do modelo de 12 e 18 dados para os grupos FTCT e FTENV, respectivamente. Para a fase de validação do modelo foram utilizados 11 e 14 dados para os grupos FTCT e FTENV, respectivamente. Além disso, deve considerar que a camada do estrato córneo está em constante processo de renovação celular e que para cada indivíduo apresenta-se em estágios distintos. Com isso, pode-se considerar satisfatório os resultados apresentados, baseando-se nos valores de sensibilidade de classificação para cada grupo.

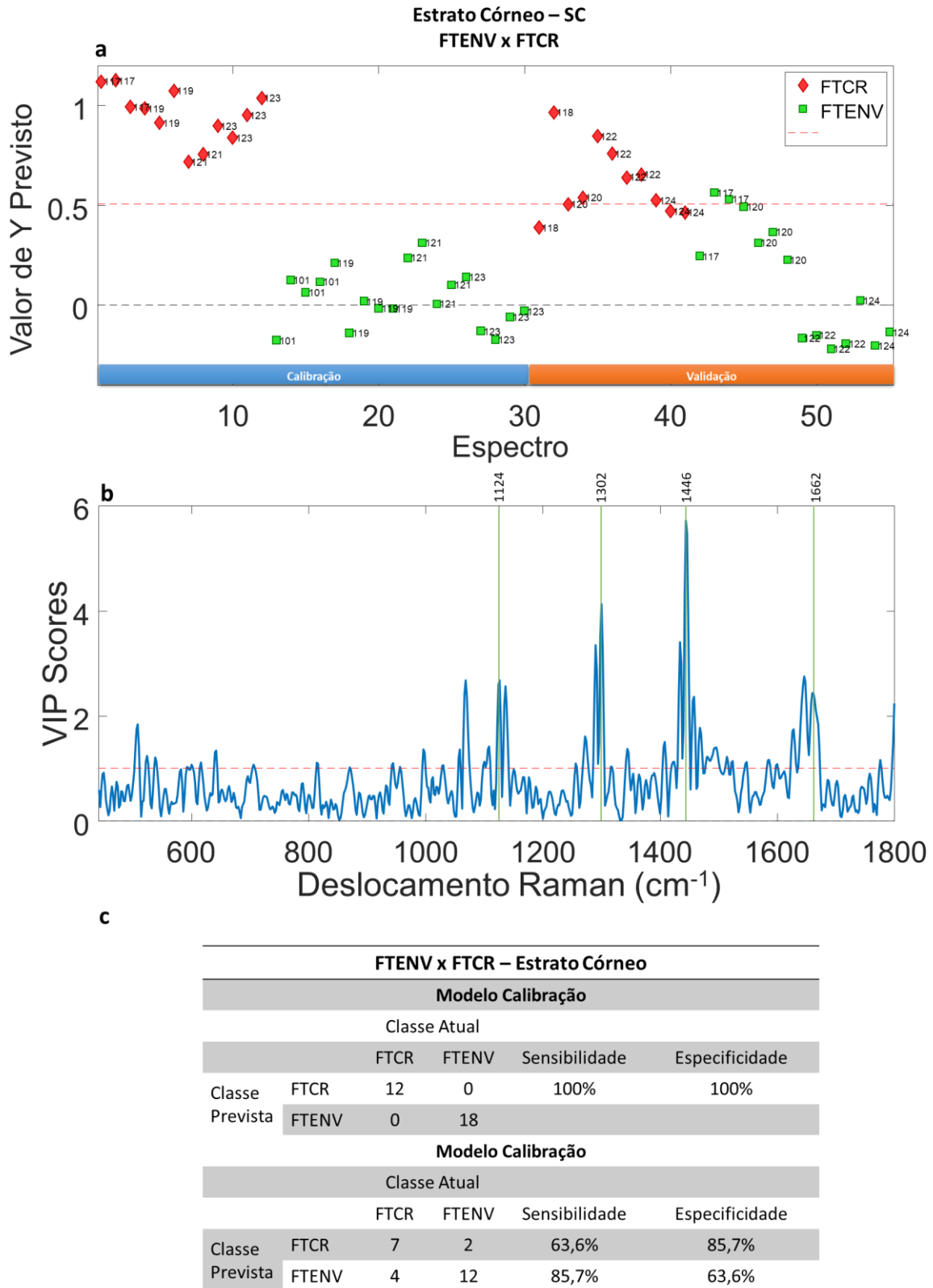


Figura 38 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs FTCR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs FTCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Os picos Raman relacionados amida III ($1267 - 1279 \text{ cm}^{-1}$) originam-se de modos vibracionais Raman das ligações peptídicas das proteínas e refletem a estrutura secundária das proteínas (α -hélice, β -folha, ρ -pregueada, ρ -curva ou estrutura de espiral aleatória (PEZZOTI, 2015; LEROY, 2014; TFAILI, 2012). A posição encontrada do pico Raman para a amida III foi em 1276 cm^{-1} , indicando que a maioria das proteínas do estrato córneo estão na conformação α -hélice para o grupo FTCCR. Essa evidência, corrobora com o que foi apresentado na comparação entre o grupo FTENV x NFENV, onde sugere uma mudança conformacional de α -hélice para β -folha das proteínas nos grupos mais fotoexpostos (FTENV). Essa mudança conformacional foi relatada por outros trabalhos como um efeito da desnaturação térmica na pele (PEZZOTI, 2015).

Na pele normal, a banda em torno de 1000 cm^{-1} relacionada ao estiramento C-C e atribuída ao modo de respiração simétrico do anel de fenilalanina, origina-se muito provavelmente da queratina no estrato córneo. Com base nos resultados obtidos nas comparações FTENV x NFENV e FTENV x FTCCR, somente os grupos fotoexpostos (FTENV e NFENV), apresentaram variação nesta banda, tendo um aumento de contribuição em todas as comparações. Sugerindo que a pele fotoexposta apresenta aumento na contribuição de fenilalanina quando comparada ao grupo FTCCR, relacionado à região mais protegida da exposição solar. Outros estudos, descrevem que a fenilalanina tem forte relação com o processo de pigmentação da pele, sendo mais afetada pela luz ultravioleta (TFAILI, 2012). Essa constatação corrobora com a ideia de que a luz ultravioleta atua nas camadas mais externas, não sendo capaz de penetrar a pele até o outro lado do braço (região analisada - FTCCR) e causar qualquer tipo de efeito.

As bandas em 1124 cm^{-1} , 1302 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} são atribuídas aos distintos modos vibração de proteínas e lipídeos. A partir dos resultados obtidos pode-se observar um aumento na contribuição destes picos no grupo FTENV, indicando que o efeito de exposição solar acumulada e intensa, promove mudanças nestes constituintes tão fundamentais para as funções desempenhadas no estrato córneo.

Outros modos vibracionais também foram observados para a camada do estrato córneo e estão descritos na Tabela 5.

6.2.2.2.3 Epiderme - FTENV x NFENV

Na Figura 39 é possível observar os resultados obtidos para a camada da epiderme, através da técnica de PCA na comparação dos grupos FTENV x NFENV.

Na comparação FTENV x NFENV, busca-se identificar as diferenças espectrais entre os indivíduos da zona rural e zona urbana na região mais exposta ao sol, área do antebraço.

Alta dispersão dos dados foi observada através do gráfico de PCA (Figura 39a), todavia os dados do grupo FTENV apresentam leve tendência de agrupamento em direção aos *scores* negativos da PC1 (lado direito da figura). O grupo NFENV (dados em verde) apresentou uma sutil tendência de agrupamento e por isso não foi analisado neste momento.

Com base no agrupamento observado para o grupo FTENV, a análise do gráfico de *loading* (Figura 39c) foi realizada considerando os *scores* negativos da PC1 como os que representam os dados do grupo FTENV e que o diferenciam do grupo NFENV.

Os principais *scores* negativos da PC1, relacionados ao grupo FTENV, foram destacados na Figura 39c (linhas em verde). Os *scores* negativos destacados são correlacionados as bandas em 998 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1308 cm^{-1} relacionada aos modos de torção de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de $\text{C}=\text{O}$, atribuída a Amida I.

Como informação complementar e na busca da obtenção de outros componentes que possam discriminar os grupos avaliados, a análise da componente principal 3 (PC3) foi realizada. No gráfico de dispersão de dados entre PC1 x PC3 (Figura 39b), observa-se a mesma tendência já descrita para o grupo FTENV, entretanto, com o estudo da PC3 é possível visualizar uma tendência de agrupamento dos dados do grupo NFENV para os *scores* positivos da PC3, indicando que os *scores* positivos da PC3 apresentam as maiores contribuições para o grupo NFENV.

Os principais *scores* positivos da PC3, relacionados ao grupo NFENV, foram destacados na Figura 39b (linhas em preto). Os *scores* positivos destacados são correlacionados as bandas em 670 cm^{-1} atribuída a timina e guanina, 1160 cm^{-1} atribuída ao glicosaminoglicano, 1256 cm^{-1} atribuída amida III, adenina e citosina na conformação β -folha e lipídeos e em 1650 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação α -hélice, atribuída a queratina presente na epiderme.

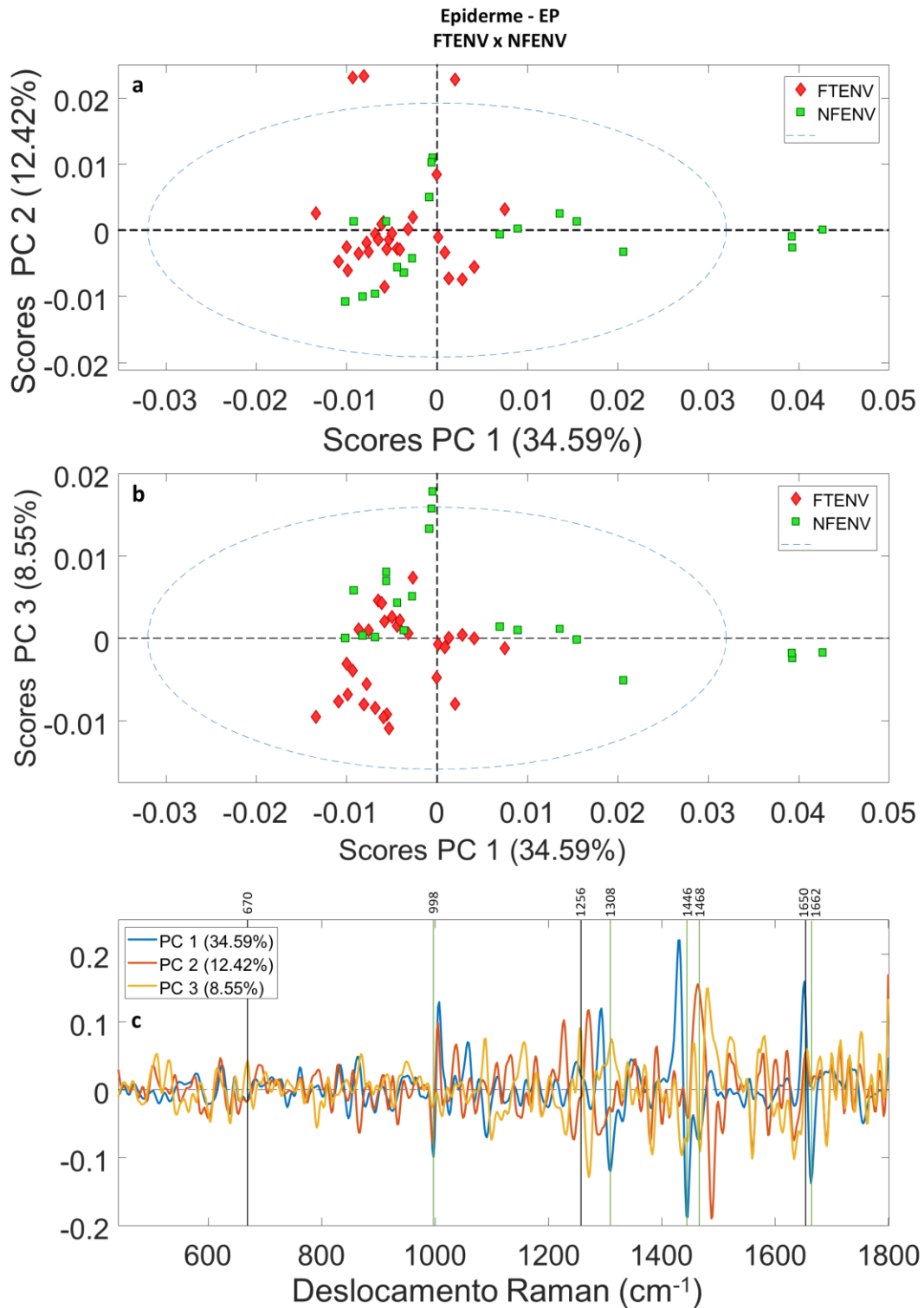


Figura 39 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 3 (PC3); (c) Gráfico de *loading plot* da PC1, PC2 e PC3.

A técnica PLS-DA foi utilizada com o intuito de enaltecer as alterações espectrais entre os grupos FTENV e NFENV. Os resultados provenientes desta análise podem ser visualizados através da Figura 40.

Mesmo com a intra-variabilidade dos dados, a técnica de PLS-DA conseguiu classificá-los de forma satisfatória. O primeiro resultado a ser analisado é o gráfico apresentado na Figura 40a, que mostra a distribuição dos dados utilizados para a etapa de calibração e validação do método.

A partir da interpretação da Figura 40a, observa-se que alguns dados foram classificados incorretamente considerando a metodologia estatística escolhida. Esse fato pode ser justificado pela variação bioquímica intrínseca da camada da epiderme que está em constante modificação bioquímica, e que cada indivíduo pode apresentar alterações bioquímicas distintas a partir da exposição solar. Todos esses fatos, indicam que mesmo considerando a variabilidade intrínseca da pele de cada indivíduo e seus hábitos a exposição solar, a técnica de PLS-DA conseguiu classificar os dados em distintos grupos e evidenciar que existe diferenças espectrais entre os indivíduos da zona rural (FTENV) e indivíduos da zona urbana (NFENV), considerando a mesma área de análise, região do antebraço.

Um indicativo adicional sobre o desempenho do método na classificação dos dados em grupos distintos é a avaliação dos resultados gerados na matriz de confusão do PLS-DA (Figura 40c), onde é possível observar a sensibilidade e especificidade obtida na classificação dos dados a partir de um modelo. Os dados utilizados no processo de calibração do modelo foram classificados corretamente em 100%. Contudo, a sensibilidade alcançada para o conjunto de validação do modelo foi de 50% e 88% para os grupos FTENV e NFENV, respectivamente. Como já visto, esse tipo de resultado é considerado satisfatório, levando em consideração a variabilidade amostral de cada conjunto de dados e número de dados utilizados.

Para determinação das principais diferenças espectrais entre os grupos analisados, deve-se realizar a interpretação do gráfico de variáveis importantes (Figura 40b). Este tipo de gráfico fornece informações a respeito das bandas discriminantes características na diferenciação dos grupos.

Na Figura 40b, é possível observar que as regiões que apresentam maiores intensidades. As bandas em 1008 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1130 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C-C, atribuída aos lipídeos intracelulares, 1294 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de

ceramidas e citosina, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas, 1650 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação α -hélice, atribuída a queratina presente na epiderme e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de $\text{C}=\text{O}$, atribuída a Amida I.

As bandas em 1008 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} e 1662 cm^{-1} foram relacionadas ao grupo FTENV, enquanto as bandas em 1294 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} foram relacionadas ao grupo NFENV.

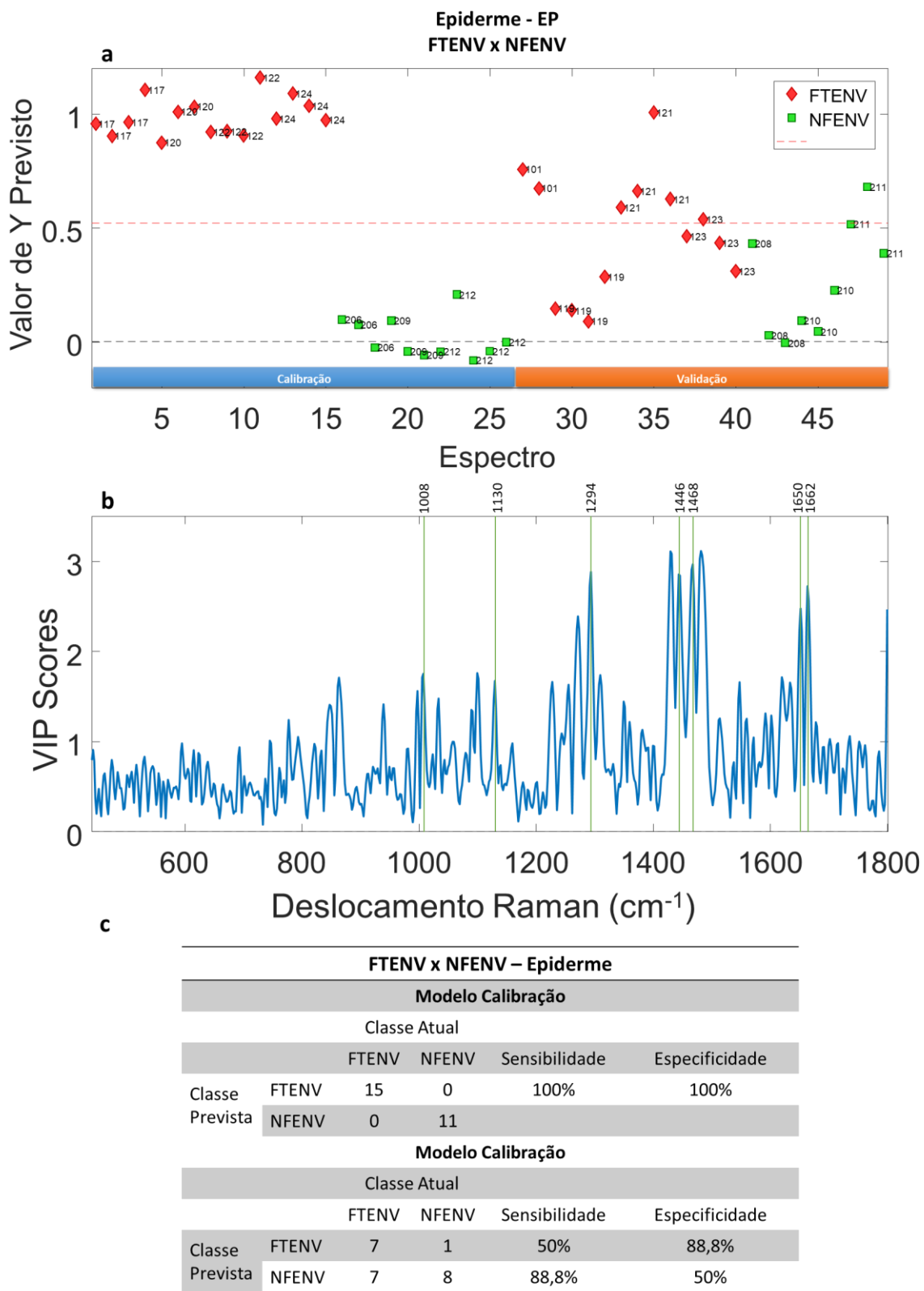


Figura 40 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

A banda em 1650 cm^{-1} atribuída ao modo vibracional da amida I, que envolve principalmente o estiramento $\text{C}=\text{O}$ e, em menor extensão, a deformação no plano de $\text{N}-\text{H}$ de grupos de peptídeos (PEZZOTI, 2015; LEROY, 2014; TFAILI, 2012), foi identificada em maior contribuição no grupo NFENV. Esse modo vibracional Raman é mais proeminente no estrato córneo e epiderme. A localização espectral exata desta banda depende fortemente da estrutura secundária da cadeia polipeptídica e, portanto, pode ser útil para estimar frações da estrutura secundária de proteínas (CAETANO, 2016; PEZZOTI, 2015; ALI, 2013; TFAILI, 2012). Em contraste a maior intensidade do pico em 1650 cm^{-1} atribuído a amida I na conformação α -hélice para o grupo NFENV, observou uma maior intensidade do pico 1690 cm^{-1} atribuído a amida I na conformação β -folha para o grupo FTENV. De acordo com o estudo de (PEZZOTI, 2015), lidando com mudanças estruturais em proteínas aquecidas após interação com lipídeos, o aumento da formação de β -folha é devido a interações proteínas-lipídeos e proteínas-proteínas durante a exposição ambiental. Essa evidência corrobora com os resultados obtidos neste estudo para a camada do estrato córneo e epiderme, onde sugere uma mudança conformacional de α -hélice para β -folha das proteínas nos grupos mais fotoexpostos (FTENV).

Também na epiderme foi observado um aumento da contribuição da banda em 1662 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração da amida I na conformação β -folha para o grupo FTENV. Esses resultados sugerem uma mudança de conformação da amida I devido a desnaturação térmica da pele. Esse efeito atua diretamente nas pontes de hidrogênio que se ligam ao longo da proteína e mantém sua conformação.

Correlato aos resultados encontrados no estrato córneo, foi observado para a epiderme uma maior contribuição da banda em 1446 cm^{-1} , 1308 cm^{-1} e 1468 cm^{-1} para o grupo FTENV. Essas bandas são atribuídas ao modo de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas. Esse tipo de resultado fornece indício de que a barreira lipídica sofre alterações quanto sua conformação e função, mediante a exposição solar contínua e intensa.

A cor da pele se deve à quantidade de um polímero natural, a melanina, um pigmento biológico que é produzido na epiderme. Esse polímero é quimicamente sintetizado pelos melanócitos que são células situadas na camada basal da pele, entre a epiderme e a derme. A produção da melanina pelos melanócitos é feita a partir da oxidação progressiva do aminoácido tirosina. Neste estudo, o grupo FTENV apresentou maior contribuição do pico Raman em 848 cm^{-1} atribuído ao modo de vibração de torção de CHH da tirosina interna.

Esse indício pode sugerir que os indivíduos fotoexpostos sofram alterações quanto ao conteúdo de melanina e conseqüente pigmentação da pele.

Outros modos vibracionais também foram observados para a camada da epiderme e estão descritos na Tabela 5.

6.2.2.2.4 Epiderme - FTENV x FTCT

A correlação entre os grupos FTENV x FTCT para a camada da epiderme foi analisada através da técnica de PCA (Figura 41) e posteriormente por PLS-DA (Figura 42).

Essa comparação é a que melhor evidencia as diferenças espectrais entre a área do corpo com maior exposição solar (antebraço), *versus* área de menor exposição solar (braço).

Os resultados obtidos por PCA podem ser analisados pelas Figuras 41a e b. Observa-se tendência de agrupamento dos dados FTENV em direção aos *scores* negativos da PC2 (parte inferior do gráfico). Os dados do grupo FTCT apresentaram moderada tendência de agrupamento em direção aos *scores* positivos da PC2, esse perfil de agrupamento é visualizado na parte superior do gráfico (Figura 41a), onde a maioria dos dados se encontram.

Com base nas constatações extraídas da Figura 41a, considera-se os *scores* positivos da PC2 como os representantes do grupo FTCT e os *scores* negativos da PC2 como representantes do grupo FTENV.

Os principais *scores* positivos da PC2 e relacionados ao grupo FTCT, foram identificados na Figura 41b, sendo as bandas mais importantes localizadas em 1060 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de estiramento das cadeias estruturais de C-C de lipídeos, 1302 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de torção da ligação CH_2 de lipídeos, adenina e citosina, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas e em 1658 cm^{-1} identificada como modo vibracional de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ atribuída a Amida I e relacionada ao colágeno presente na interface epiderme-derme.

Os principais *scores* negativos da PC2 e relacionados ao grupo FTENV, foram identificados na Figura 41b, sendo as bandas mais importantes localizadas em 998 cm^{-1} relacionada ao constituinte fenilalanina, 1106 cm^{-1} atribuída ao modo de vibração de estiramento das cadeias estruturais de C-C de lipídeos na conformação *gauche*, 1294 cm^{-1} atribuída ao constituinte ceramida presente na camada da epiderme, 1430 cm^{-1} ao modo de

vibração C-H de proteínas e lipídeos e em 1642 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de torção de CH_2 de proteínas.

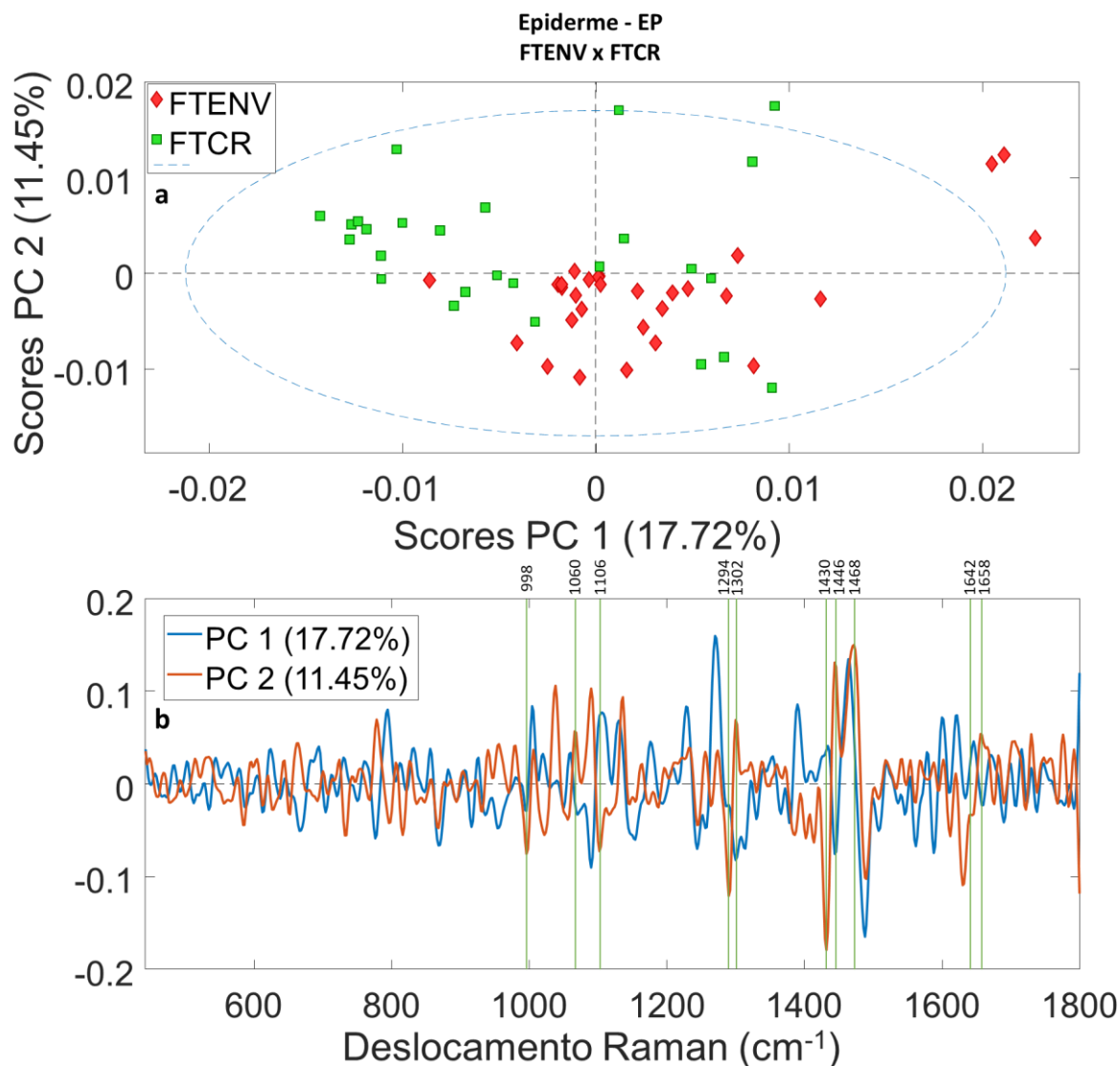


Figura 41 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FTCR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

Os resultados de PLS-DA para a comparação FTENV x FTCR na camada da epiderme foram superiores em termos de desempenho de classificação dos dados quando comparado com os resultados obtidos na avaliação FTENV x NFENV (Figura 42a). O desempenho do modelo pode ser medido por sua sensibilidade em classificar os dados em suas classes, como é mostrado na Figura 42c. A sensibilidade na etapa de calibração foi de 100% e na etapa de validação do modelo foi de 100% e 78% para os grupos FTENV e FTCR,

respectivamente. Essa alta sensibilidade de classificação é fundamental para identificação precisa dos modos vibracionais Raman de maior relevância para a discriminação dos grupos estudados.

Com base no gráfico das variáveis importantes (Figura 42b), algumas regiões espectrais foram selecionadas como as mais importantes na classificação dos grupos. As bandas localizadas em 998 cm^{-1} relacionada ao constituinte fenilalanina, 1270 cm^{-1} atribuídas aos fragmentos não polares de prolina relacionados a amida presente na epiderme, 1388 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de deformação de CH_3 atribuída aos lipídeos, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas, 1642 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de torção de CH_2 de proteínas e em 1658 cm^{-1} identificada como modo vibracional de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ atribuída a Amida I e relacionada ao colágeno presente na interface epiderme-derme.

Os picos em 998 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} e 1642 cm^{-1} foram relacionados ao grupo FTENV, enquanto os picos em 1388 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} foram relacionados ao grupo FTCCR.

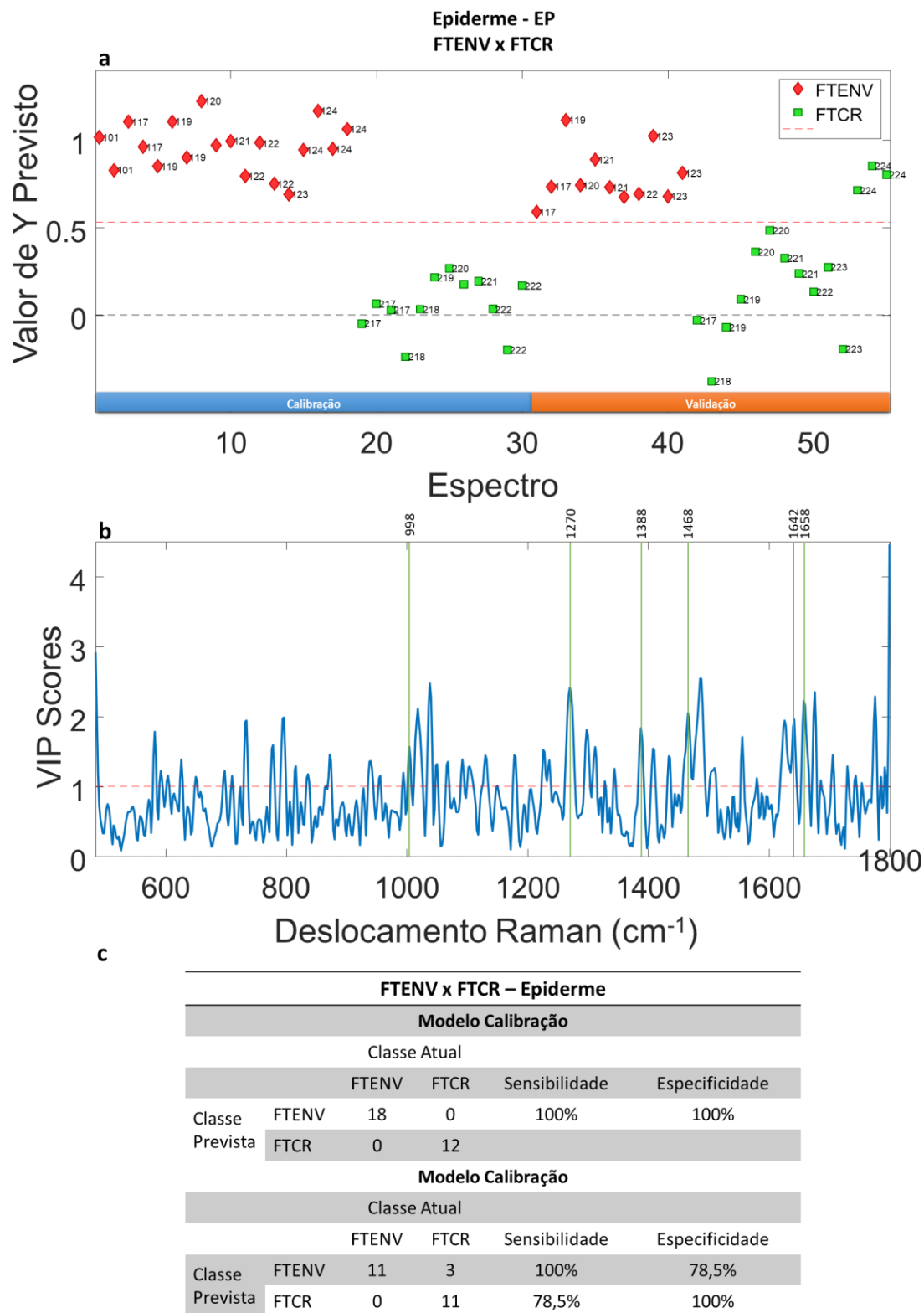


Figura 42 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs FTGR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs FTGR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

Como observado para a camada do estrato córneo, a banda em torno de 1000 cm^{-1} relacionada ao estiramento C-C e atribuída ao modo de respiração simétrico do anel de fenilalanina, apresenta intensa contribuição nos grupos fotoexpostos estudados. Sugerindo que a fenilalanina sofre alterações bioquímicas devido a exposição solar. Mesmo no grupo NFENV, onde os indivíduos possuem menor exposição solar devido os seus hábitos urbanos, foi possível constatar alteração espectral nesta banda. Essa alteração pode estar relacionada as modulações no processo de pigmentação da pele (TFAILI, 2012).

Também nesta comparação foi observado diversas alterações relacionadas aos lipídeos e proteínas entre os grupos FTENV e FTCCR. As bandas em 1060 cm^{-1} , 1302 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} e 1468 cm^{-1} são todos relacionadas aos modos de vibrações CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas e apresentam maior contribuição no grupo FTCCR. Esses resultados são opostos aos observados na camada do estrato córneo, onde as mesmas variações foram identificadas para o grupo FTENV. Com isso, sugere-se que as alterações referentes as proteínas e lipídeos são mais intensas na camada do estrato córneo e menores na camada da epiderme.

Outra banda foi observada com intensa contribuição no grupo FTCCR, a banda de 1658 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ da Amida I. Essa banda é atribuída ao colágeno presente na interface epiderme-derme, região que foram coletados vários espectros. Confirmando que alguns espectros foram adquiridos nesta região de interface, apesar de não ser possível identificar a mesma visualmente através do tecido colorado por Hematoxilina - Eosina (H&E).

Similar aos resultados encontrados na camada do estrato córneo, foi observado um aumento da contribuição da banda 1294 cm^{-1} para o grupo FTENV, atribuída ao constituinte ceramida, sugerindo uma possível mudança de conformação e alteração de função como barreira de proteção.

Outros modos vibracionais também foram observados para a camada da epiderme e estão descritos na Tabela 5.

6.2.2.2.5 Derme - FTENV x NFENV

O resultado obtido pela metodologia de PCA na comparação entre os grupos FTENV x NFENV, pode ser observado na Figura 43. A comparação FTENV x NFENV pode fornecer informações valiosas referente as mudanças bioquímicas na pele entre indivíduos expostos a luz solar, mas com diferente intensidade e duração.

Observa-se uma intensa dispersão dos dados tanto para o grupo FTENV, quanto para o grupo NFENV (Figura 43a). Uma leve tendência de agrupamento é visualizada para ambos os grupos, sendo possível determinar que o grupo FTENV possui maior quantidade de dados (pontos em verde) localizados na região inferior do gráfico, direcionados para os *scores* negativos da PC2 e em oposição é possível visualizar que os dados em vermelho, referentes ao grupo NFENV estão localizados na região superior do gráfico, sendo passíveis de serem classificados pelos *scores* positivos da PC2. Os *scores* representam os modos vibracionais que possuem maior contribuição para cada grupo analisado.

Os principais *scores* positivos da PC2 e relacionados ao grupo NFENV foram destacados na Figura 43b, sendo a banda em 922 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-C do anel de prolina, 1315 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de deformação de CH_2 , atribuída a amida III na conformação α -hélice de colágeno, 1372 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-N do anel de citosina e guanina e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I.

Os principais *scores* negativos da PC2 e relacionados ao grupo FTENV, foram identificados como as bandas em 884 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração de torção de CH_2 atribuída a lisina, 1130 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C-C, atribuída aos lipídeos intracelulares, 1276 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-N e deformação de N-H, atribuída a amida III na conformação α -hélice, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1468 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de deformação de CH_2 , atribuída a lipídeos e proteínas, 1666 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O da Amida I, atribuída a colágeno tipo I e em 1690 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I na conformação β -folha.

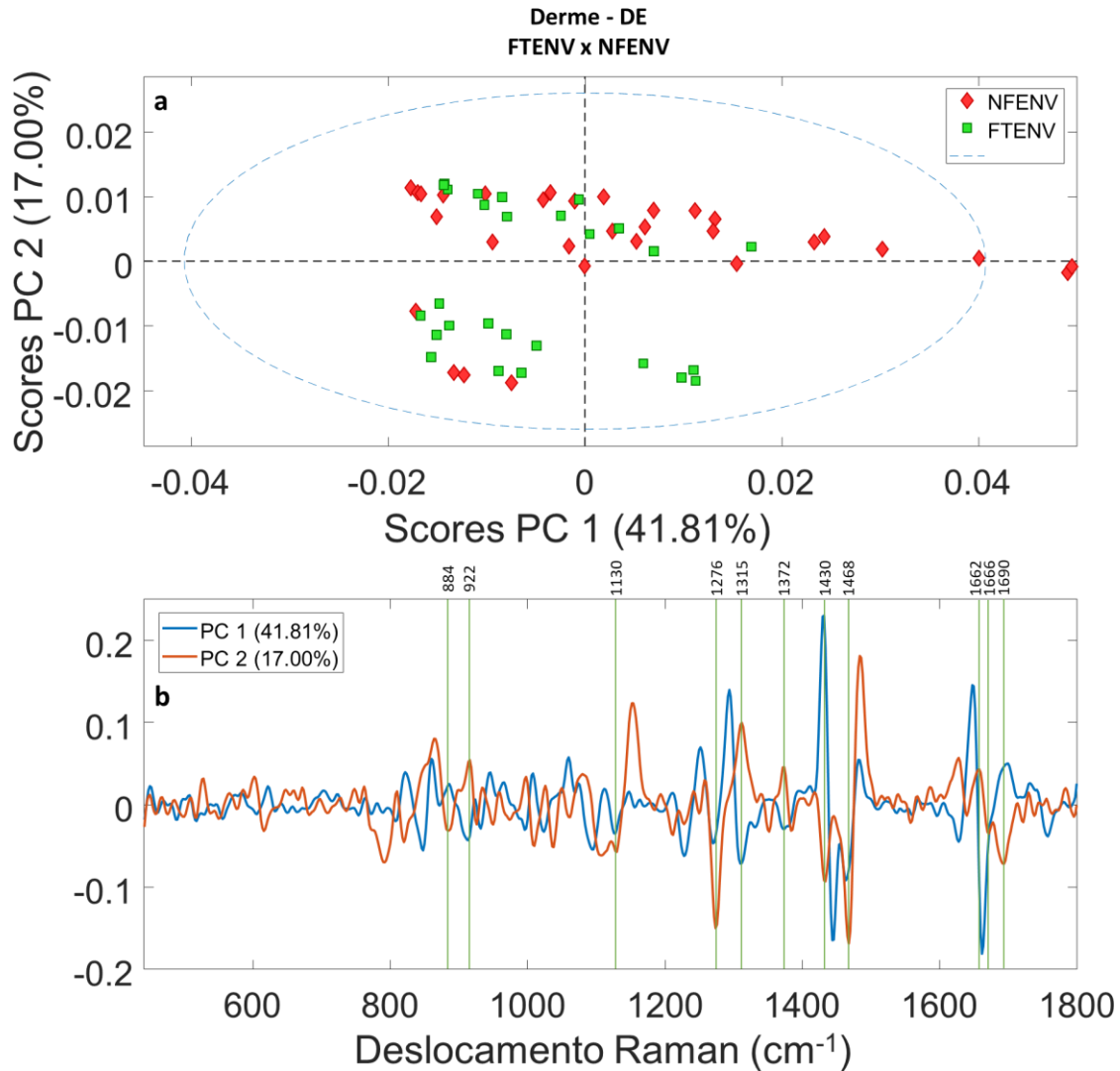


Figura 43 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

Os resultados de PLS-DA da correlação entre os grupos FTENV e NFENV da camada da derme foram representados na Figura 44. Observa-se através da Figura 44a, a dispersão dos dados na calibração e validação do modelo, que novamente apresenta perfeita classificação dos dados na etapa de calibração e inconsistências na classificação dos dados na etapa de validação. Os motivos e possíveis soluções já foram apresentados nas subseções anteriores. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados obtidos para a camada da derme foram inferiores aos encontrados no estrato córneo e epiderme, quando comparado a sensibilidade e especificidade do modelo de PLS-DA. Essa menor sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA pode estar relacionada a complexa

composição bioquímica da camada da derme, afetando na construção do modelo que não compreende toda a variabilidade amostral.

A matriz de confusão gerada pela análise de PLS-DA (Figura 44c), apresenta a sensibilidade e especificidade em classificar os dados a partir de um modelo. Pode-se observar que os dados utilizados na etapa de calibração do modelo foram classificados corretamente em 100% para o grupo FTENV e 92% para o grupo NFENV. Entretanto, para a etapa de validação foi observado uma menor sensibilidade de classificação do modelo de 42% e 100% para os grupos FTENV e NFENV, respectivamente.

A partir da análise das variáveis importantes é possível identificar quais os modos vibracionais mais importantes na discriminação dos grupos avaliados. Quanto mais intenso o pico, maior é a sua importância para a discriminação dos dados. Na Figura 44b, é possível observar que as regiões das bandas em 700 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-S atribuída ao aminoácido metionina na conformação trans, 1130 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C-C, atribuída aos lipídeos intracelulares, 1276 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-N e deformação de N-H, 1315 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de deformação de CH_2 , atribuída a amida III na conformação α -hélice de colágeno, 1430 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1446 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, atribuída a amida III na conformação α -hélice, 1468 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de deformação de CH_2 , atribuída a lipídeos e proteínas e em 1666 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O da Amida I, atribuída a colágeno tipo I.

Os picos Raman em 1130 cm^{-1} , 1276 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} e 1666 cm^{-1} foram relacionados ao grupo FTENV e o pico em 1315 cm^{-1} foi relacionado ao grupo NFENV.

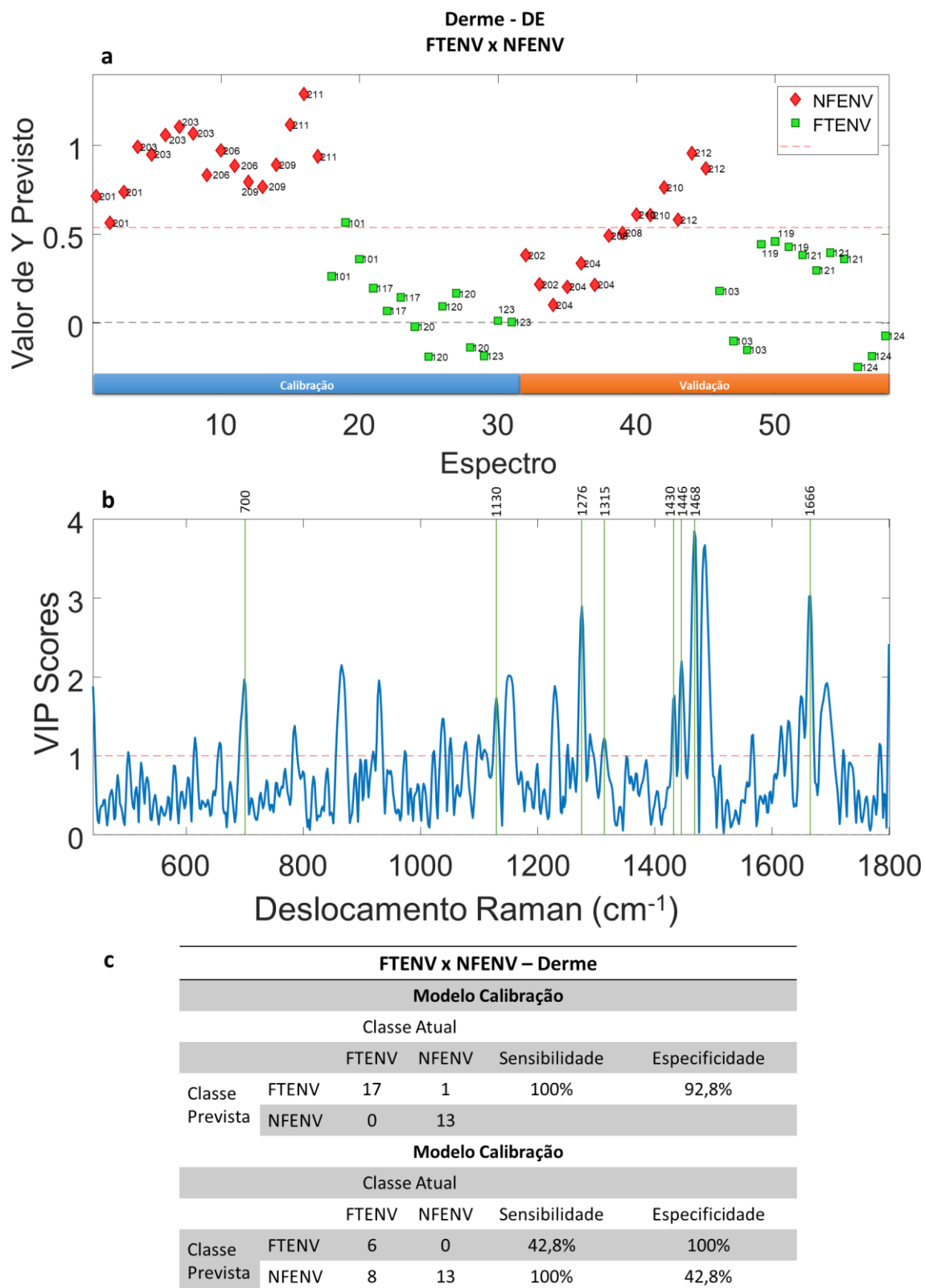


Figura 44 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs NFENV da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs NFENV; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

O modo vibracional 1666 cm^{-1} foi observado em maior contribuição no grupo FTENV. Esse modo vibracional está relacionado com o estiramento C=O fracamente ligado a hidrogênio (isto é, grupo carbonil no qual possui apenas uma molécula de água) e é atribuído a banda da amida I, relacionada à fibra de colágeno tipo I (NGUYEN, 2013). Seguindo esta atribuição e associando essa evidência com os estudos já realizados, o modo vibracional em 1666 cm^{-1} é considerado um marcador direto das interações água/colágeno, uma vez que reflete a transição de ligações de hidrogênio de fracas para fortes dos grupos carbonila. Dentro da tripla-hélice do colágeno, quanto mais espaçamento entre as cadeias polipeptídicas, mais moléculas de água podem entrar e interagir com grupos carbonila por meio da formação de ligações de hidrogênio. Conseqüentemente, a comparação dessa relação entre diferentes amostras de pele pode refletir diferenças de compactação dos feixes de fibras de colágeno.

Associado a contribuição do pico em 1666 cm^{-1} para o grupo NFENV, observou-se um aumento de contribuição do modo vibracional em 1690 cm^{-1} relacionado ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuído a Amida I na conformação β -folha e uma diminuição de contribuição para o mesmo grupo na banda em 1662 cm^{-1} relacionado ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuído a Amida I. Indicando uma possível transição de conformação de α -hélice para conformação β -folha, com aumento de exposição solar. Esse mesmo fenômeno foi descrito para todas as camadas analisadas, embasando os indícios observados.

O modo vibracional relacionado ao DNA/RNA (1372 cm^{-1}) apresentou alta contribuição no grupo NFENV. Estudos mais específicos são necessários para melhor compreensão dos efeitos da exposição solar intensa nos níveis genéticos, entretanto, outros autores associaram essas alterações ao estresse oxidativo (JUNQUEIRA, 2007).

A elastina é a principal proteína estrutural das fibras elásticas e está presente na camada da derme. É hidrofóbica, ou seja, é insolúvel em água graças a extensivas ligações cruzadas entre resíduos de lisina. No grupo FTENV foi observado alta contribuição do pico em 884 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração de torção de CH_2 atribuída a lisina. Indicando que os indivíduos de maior exposição solar podem apresentar alterações que afetam a função da elastina presente na derme.

Apenas através da análise dos dados por PLS-DA foi possível identificar o modo vibracional em 700 cm^{-1} relacionado ao estiramento de C-S e atribuído ao aminoácido metionina na conformação trans. Esse tipo de aminoácido não é produzido pelo corpo e

normalmente ingerido através de uma alimentação balanceada e saudável. A metionina é essencial para o corpo e participa na síntese de proteínas. É o primeiro aminoácido na cadeia de qualquer proteína. Na pele a metionina é responsável por parte do processo de síntese de colágeno na derme e também atua na proteção da pele contra a ação agressiva de meios externos, retardando o processo de envelhecimento das células. Com base nos resultados obtidos através do PLS-DA e estudos na literatura, é coerente sugerir que esse modo de vibração, associado ao aminoácido metionina, apresenta-se em maior contribuição no grupo NFENV. Contudo, pouco ainda se sabe sobre sua relação com a pele fotoexposta e possíveis efeitos em sua conformação.

Outros modos vibracionais também foram observados para a camada da derme e estão descritos na Tabela 5.

6.2.2.2.6 Derme - FTENV x FTCT

Na camada da derme também foi conduzido o estudo entre o grupo de indivíduos da zona rural (FTENV), com intensa e contínua exposição solar e grupo de indivíduos da zona rural (FTCT) com efeito cronológico de envelhecimento devido a região analisada. Essa comparação entre os grupos reflete o efeito cumulativo da fotoexposição solar.

Os resultados da análise comparativa dos grupos FTENV x FTCT por PCA são ilustrados na Figura 45. Destaca-se a tendência de agrupamento dos dados do grupo FTCT ao lado direito da Figura 45a, sugerindo que os *scores* positivos da PC1 são os mais importantes para caracterização deste grupo. Ainda que apresentando uma leve tendência, os dados do grupo FTENV podem ser descritos pelos *scores* negativos da PC1, sendo esses *scores* os que apresentam as maiores contribuições espectrais correlacionada ao grupo FTENV.

Os principais *scores* positivos da PC1 e relacionados ao grupo FTCT foram destacados na Figura 45b, sendo as bandas em 922 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-C do anel de prolina, 998 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1308 cm^{-1} relacionada aos modos de torção de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas e em 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I.

Os principais *scores* negativos da PC1 e relacionados ao grupo FTENV foram destacados na Figura 45b, sendo as bandas em 884 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração de torção de CH_2 atribuída a lisina, 1008 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do

anel aromático de fenilalanina, 1270 cm^{-1} atribuídas aos fragmentos não polares de prolina relacionada ao colágeno rico em prolina, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas, 1666 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O da Amida I, atribuída a colágeno tipo I e em 1690 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I na conformação β -folha.

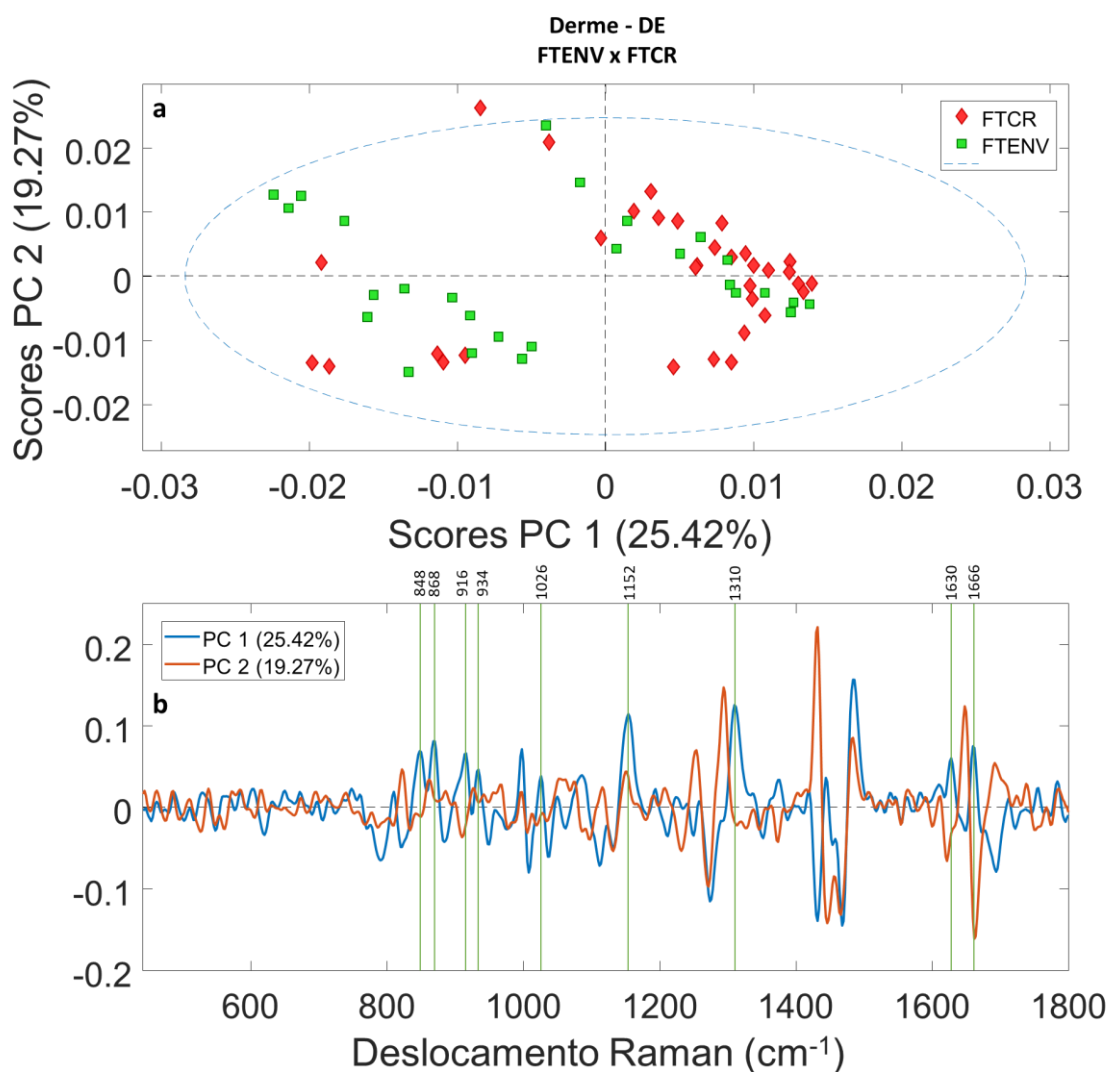


Figura 45 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FTCCR da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

Os resultados de PLS-DA apresentam-se semelhantes aos obtidos na comparação entre os grupos FTENV x NFENV, em relação a dispersão dos dados, onde observa-se uma baixa sensibilidade na classificação dos dados. Para os dados utilizados na validação do

modelo, ambos os grupos tiveram dados classificados erroneamente. Até mesmo na fase de calibração houve a classificação de um dado de forma incorreta (Figura 46a). Esses resultados reforçam a tese já descrita sobre a complexidade bioquímica presente na camada da derme e as consequências sobre os efeitos da intra-variabilidade das amostras no processo de análise estatística.

A matriz de confusão gerada pela análise de PLS-DA (Figura 46c), mostra a sensibilidade e especificidade em classificar os dados a partir de um modelo. Sendo possível observar que os dados utilizados no processo de calibração do modelo foram classificados 100% e 92% para os grupos FTENV e FTCT, respectivamente. Entretanto, para a validação foi observado uma sensibilidade de classificação do modelo de 31% e 69% para os grupos FTENV e FTCT, respectivamente. Para essa análise o modelo PLS-DA aplicado apresentou seus piores resultados de sensibilidade de classificação, afetando a discriminação das variáveis importantes (Figura 46b) e consequente correlação dos resultados obtidos entre a técnica de PCA e PLS-DA. Considerando as justificativas apresentadas nas subseções anteriores, pode-se inferir que a inserção de mais dados no modelo, tanto para a etapa de calibração quanto para a etapa de validação, tenderiam a aumentar a robustez do modelo e alcançar melhores previsões. Contudo, mesmo com valores de sensibilidade e especificidade inferiores aos demais apresentados, a análise das variáveis importantes foi conduzida, como é mostrado na Figura 46b.

Como é possível observar na Figura 46b, a análise das variáveis importantes também foi conduzida e algumas regiões espectrais foram selecionadas como as mais importantes para classificação dos grupos. As bandas em 1008 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel aromático de fenilalanina, 1270 cm^{-1} atribuídas aos fragmentos não polares de prolina relacionada ao colágeno rico em prolina, 1308 cm^{-1} relacionada aos modos de torção de CH_2 e CH_3 de lipídeos e proteínas, 1430 cm^{-1} ao modo de vibração C-H de proteínas e lipídeos, 1468 cm^{-1} atribuída aos modos de deformação de CH_2 de lipídeos e proteínas, 1662 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I e em 1690 cm^{-1} relacionada ao modo vibracional de estiramento de C=O, atribuída a Amida I na conformação β -folha.

Os picos em 1008 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} e 1690 cm^{-1} foram relacionados ao grupo FTENV, enquanto os picos em 1308 cm^{-1} e 1662 cm^{-1} foram relacionados ao grupo FTCT.

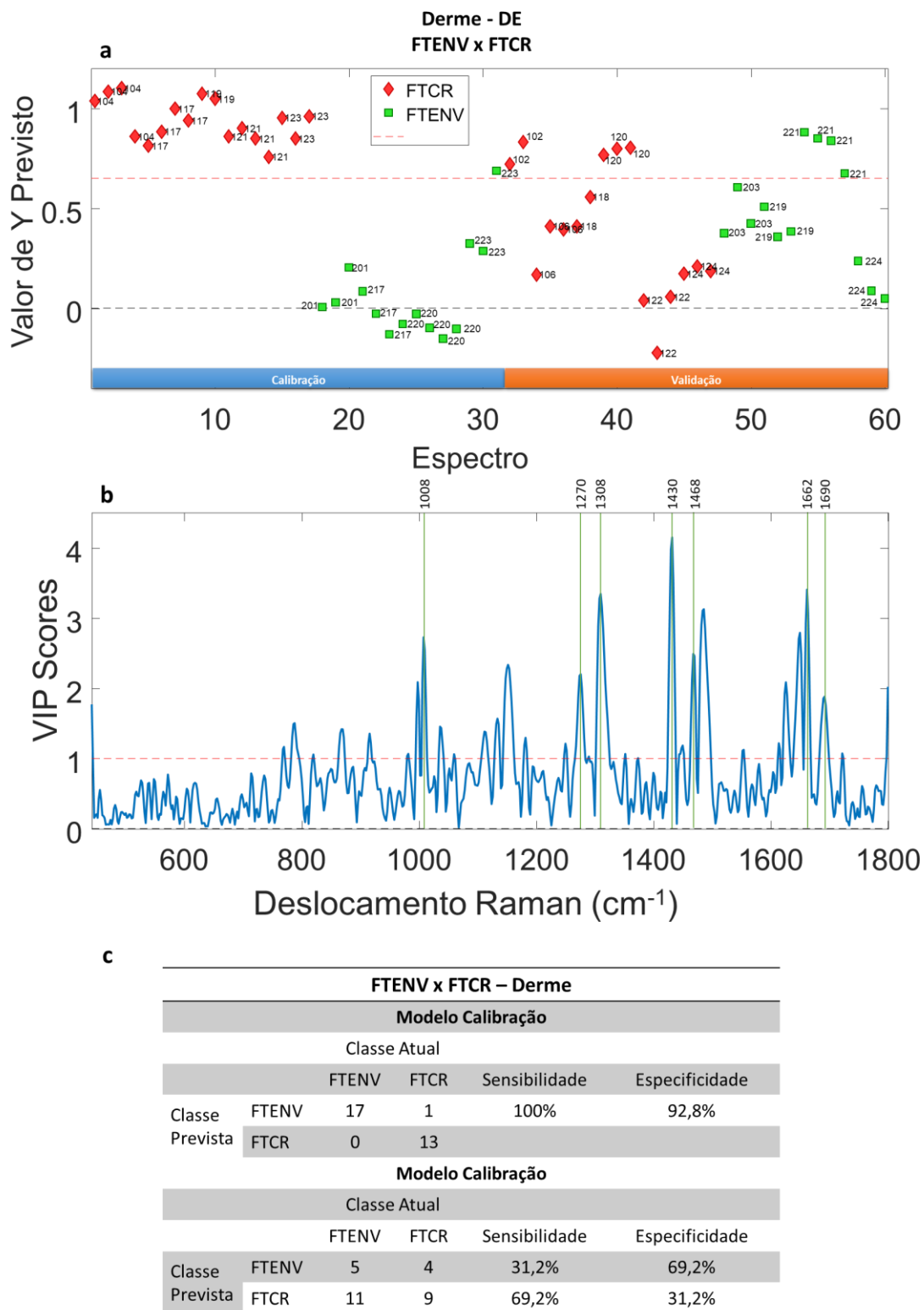


Figura 46 - Análise de PLS-DA dos grupos FTENV vs FTCR da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTENV vs FTCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

A mudança conformacional de α -hélice para conformação β -folha também foi observada nesta comparação. Onde o modo vibracional em 1662 cm^{-1} atribuído a Amida I na conformação α -hélice, foi relacionado ao grupo FTCT e o modo vibracional em 1690 cm^{-1} , atribuído a Amida I na conformação β -folha foi relacionado ao grupo FTENV. Esses resultados foram observados em todas as camadas da pele e são correlatos a vários outros estudos presentes na literatura.

Assim como na comparação FTENV x NFENV, também foi observado no grupo FTENV uma alta contribuição do pico em 884 cm^{-1} relacionada aos modos de vibração de torção de CH_2 atribuída a lisina. Indicando que os indivíduos de maior exposição solar podem apresentar alterações que afetam a função da elastina presente na derme. Um estudo de perfil de expressão gênica mostrou expressão acentuadamente aumentada de componentes de fibra elástica na pele fotoenvelhecida (MCGRATH, 2012).

Os resultados que mais se destacam na comparação FTENV x FTCT são os relacionados ao conteúdo de prolina e colágeno. A banda em 1270 cm^{-1} atribuída aos fragmentos não polares de prolina relacionada ao colágeno rico em prolina, apresenta intensa contribuição no grupo FTENV, enquanto no grupo FTCT é evidenciado um aumento na contribuição da banda em 922 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-C do anel de prolina. Esses resultados, reforçam a tese das mudanças dos aminoácidos presentes na formação do colágeno mediante a exposição solar.

Seguindo os indícios observados na análise PCA do espectro por completo, a região espectral entre $800 - 1000\text{ cm}^{-1}$ foi analisada de forma exclusiva através do PCA. Mesmo obtendo um gráfico de dispersão similar ao apresentado na Figura 45a, o estudo desta região pelo gráfico de *loading* mostrou-se muito promissor (Figura 47).

No gráfico de *loading* pode-se observar uma intensa contribuição dos *scores* positivos da PC1 para caracterizar o grupo FTCT, as bandas relacionadas estão localizadas em 854 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-C de prolina, 922 cm^{-1} relacionada ao modo de vibração de estiramento de C-C do anel de prolina e em 940 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-C de hidroxiprolina relacionada ao colágeno estrutural. A banda em 875 cm^{-1} atribuída ao anel aromático de hidroxiprolina apresenta sua maior contribuição para os *scores* negativos, caracterizando o grupo FTENV.

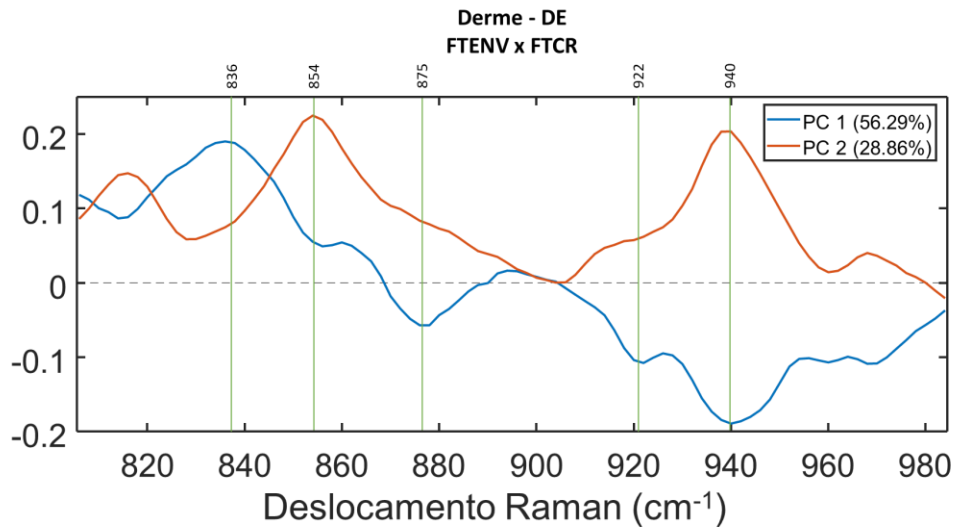


Figura 47 - Análise de PCA dos grupos FTENV vs FPCR da camada da derme. Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2 na região de 800 - 1000 cm^{-1} .

No envelhecimento intrínseco, os fibroblastos dérmicos mostram uma capacidade menos replicativa e síntese reduzida de procolágeno tipo I. Níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, diminuição dos níveis de antioxidantes, maior expressão de várias matrizes metaloproteinases (MMPs) e o acúmulo de produtos de glicação no colágeno dérmico resultam em efeitos catabólicos (GARCES, 2014; MCFRATH, 2012; KAWABATA, 2014). Estudos histopatológicos no envelhecimento da pele (pele abdominal) mostram que a espessura dos feixes de colágeno e sua área diminuem com a idade, tanto na derme papilar quanto na reticular, a partir dos 40 anos de idade em diante (GARCES, 2014). O envelhecimento extrínseco, também chamado de fotoenvelhecimento, ocorre principalmente devido aos efeitos da radiação UV, que induz a produção de enzimas catabólicas, como as MMPs, que cliva os principais colágenos intersticiais (GARCES, 2014; MCFRATH, 2012).

Porque o principal constituinte molecular da derme é a água (60%) e o colágeno do tipo I (85-90%) (MCGRATH, 2010), o espectro Raman da derme assemelha-se ao do colágeno tipo I, com importante influência das interações colágeno-água (ZHANG, 2011). O colágeno é uma macromolécula que consiste em um conjunto de três cadeias polipeptídicas α -hélices (tropocolágeno) dispostas em uma conformação helicoidal tripla. A cadeia polipeptídica é caracterizada por uma sequência de tri-aminoácido do tipo Glicina-XY, onde X geralmente corresponde a prolina ou Y corresponde a hidroxiprolina. Os espectros Raman de colágeno e outras moléculas de peptídeo mostram bandas associadas com ao grupo CONH. Na região de baixa frequência, amida I (vibração de alongamento de C=O) e amida

III (associada ao alongamento C-N e vibrações de flexão N-H do grupo de peptídeos) são úteis para a identificação de diferentes conformações de *backbone* de proteínas e estruturas secundárias (RYGULA, 2013). Na amida III, as vibrações em 1246 cm^{-1} e 1271 cm^{-1} são atribuídas a ricos em prolina e regiões pobres em prolina, respectivamente.

Os modos vibracionais Raman em 854 cm^{-1} e 922 cm^{-1} são atribuídas a prolina e os picos em 875 cm^{-1} e 940 cm^{-1} relacionados a hidroxiprolina. (NGUYEN, 2013; RYGULA, 2013). Caetano e colaboradores em 2017, atribuíram a redução das intensidades das bandas de 854 cm^{-1} e 940 cm^{-1} às alterações do colágeno durante o envelhecimento intrínseco. Zhang e colaboradores em 2011, mostraram que a banda de 940 cm^{-1} fornece uma medida do colágeno altamente ligado à água. Eles também estudaram o efeito de mudanças ambientais (temperatura, concentração de sal) na isomerização de prolina trans para cis e hidroxiprolina. Eles demonstraram que o pico de 940 cm^{-1} também foi um bom indicador de mudanças de isomerização trans para cis nos resíduos de prolina e hidroxiprolina no colágeno. Nguyen e colaboradores em 2013, estudaram o conteúdo de água na pele em amostras de diferentes grupos etários, calculando duas razões $940/922\text{ cm}^{-1}$ e $1658/1666\text{ cm}^{-1}$. Eles observaram uma tendência ascendente para a razão $940/922\text{ cm}^{-1}$ e um aumento significativo da razão $1658/1666\text{ cm}^{-1}$ na amostra de pele mais velha, provando que a compactação das fibras de colágeno diminui durante envelhecimento da pele. Villaret e colaboradores 2018, observaram na derme papilar o envelhecimento cronológico através da diminuição da relação $940/922\text{ cm}^{-1}$, indicando uma diminuição no estado de hidratação do colágeno. Outro estudo demonstra que a banda de 940 cm^{-1} aumenta de acordo com a umidade relativa do ambiente e diminui com o aumento da temperatura (o que leva à liberação da água livre). Essas descobertas sugerem que este pico fornece uma medida do conteúdo de água ligada ao colágeno (NGUYEN, 2013; ZHANG, 2011). Neste estudo foi observado intensa contribuição da banda em 922 cm^{-1} para o grupo FTCT na comparação FTENV x FTCT e também para o grupo NFENV na comparação FTENV x NFENV. E a banda situada em 940 cm^{-1} apresentou maior contribuição para o grupo FTENV em ambas as comparações. Esses resultados corroboram com os apresentados na literatura, onde no grupo FTENV (maior exposição solar) destaca-se a mudança de conformacional do colágeno e sua relação com água, afetando o conteúdo de água na pele e compactação das fibras.

Outros modos vibracionais também foram observados para a camada da derme e estão descritos na Tabela 5.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo identificou diversos marcadores espectrais nas camadas do estrato córneo, epiderme e derme, que estão relacionados ao processo de envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento.

Ressalta-se as modificações bioquímicas nos grupos fotoexpostos que apresentam mudança conformacional de lipídeos e proteínas. Essas mudanças ocorrem em todas as camadas da pele, sendo no estrato córneo prejudiciais a função de barreira lipídica protetora, na epiderme as ceramidas e na derme ao colágeno, especialmente o tipo I.

Também foi observado nos grupos fotoexpostos as alterações espectrais na camada do estrato córneo e epiderme, em torno de 1000 cm^{-1} , relacionada ao estiramento C-C e atribuída ao modo de respiração simétrico do anel de fenilalanina. Sugerindo que a fenilalanina sofre alterações bioquímicas devido a exposição solar. Essa alteração pode estar relacionada as modulações no processo de pigmentação da pele.

Na camada da derme foi possível observar que a região atribuída a prolina-hidroxi prolina (854 cm^{-1} e 940 cm^{-1}) são adequados para avaliação do envelhecimento intrínseco vs extrínseco, enquanto as intensidades espectrais das regiões de amida I e III, em 1275 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , respectivamente, podem ser utilizadas para os estudos de evolução do fotoenvelhecimento.

Os resultados apresentados neste estudo, reforçam a importância do uso da técnica de espectroscopia Raman na caracterização de diferentes tecidos biológicos e na discriminação de indivíduos ou grupos. Essa técnica associada com as ferramentas estatísticas de análise multivariada são poderosas na caracterização de mínimas mudanças bioquímicas que antecedem as mudanças morfológicas.

Os resultados presentes neste trabalho mostram a importância do uso de ferramentas estatísticas na análise dos dados, tanto para caracterização das amostras quanto para distinção entre os grupos a partir de suas variações espectrais. As técnicas de PCA e PLS-DA, apresentam formas de representação de dados similares, como tabelas, gráficos de dispersão de dados, *loading plot* e outros. Contudo são técnicas complementares no ponto de vista matemático e oferecem uma outra perspectiva no momento de análise de dados. O uso de ambas as técnicas foi fundamental para uma análise mais profunda dos dados obtidos. Alguns modos vibracionais Raman foram apenas identificados por uma das técnicas estatísticas utilizadas, comprovando a importância do uso de ferramentas matemáticas complementares.

Essa associação entre espectroscopia Raman e métodos de análise multivariada podem ser um aspecto importante para futuras pesquisas na busca do entendimento sobre as mudanças bioquímicas da pele, doenças e malefícios da exposição solar intensa e cumulativa. Também é possível considerar que os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar a indústria cosmética nos testes de eficácia *in vivo* de várias formulações, na determinação da penetração dos ingredientes da formulação e detecção de vários efeitos bioquímicos após o uso prolongado desses produtos na pele humana.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. M., Vibrational Spectroscopy of Human Skin Radiation and Environmental Science Center, *Research Institute Dublin Irland*, 2011

ALI, S. M., BONNIER, F., TFAYLI, A., LAMBKIN, H., FLYNN, K., MCDONAGH, V., HEALY, C., LEE, T. C., LYNG, F. M., BYRNE, H. J., Raman spectroscopic analysis of human skin tissue sections ex-vivo: evaluation of the effects of tissue processing and dewaxing, *Journal of Biomedical Optics*, v. 18, p. 6, 2013.

ASTNER, S., ANDERSON R. R., Skin Phototypes 2003, *The Society for Investigative Dermatology, Inc*, 2003.

BADIN, A. Z. D., MORAES, L. M., ROBERTS, T. L., Rejuvenescimento Facial a Laser, *Editores Revinter*, 1998.

BAGATIN, E., Envelhecimento cutâneo e o papel dos Cosméticos, *Boletim Dermatológico Unifesp*, v. 17, p. 1-4, 2008.

BENNINGHOFF, L., CZARNOWSKI, D., DENKHAUS, E., LEMKEM, K. Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition. *Spectrochim. Acta B*, v. 52, p. 1039-1046, 1997.

BRINGEL, F. A., Avaliação morfofuncional de pele humana conservada em glicerol e submetida à radiação gama: estudo em camundongos atômicos, *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo*, (Tese Doutorado), 2011.

CASPERS, P., G. LUCASSEN, H. BRUINING, G. PUPPELS, Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid *in vivo* determination of water concentration profiles in human skin, *J. Raman Spectrosc.* v. 31 p. 813 -818, 2000.

CASPERS, P. J., LUCASSEN, G. W., PUPPELS, G. J., Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin, *Biophysical Journal*. v. 85, p. 572 - 580, 2009.

CHOE, C., LADEMANN, J., Darvin, M. E., Confocal Raman microscopy for investigating the penetration of various oils into the human skin *in vivo*, *J. Dermatol. Sci.*, v. 79, p. 171-178, 2015.

CHRIT, L. et al., An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerolbased hydration cream, *Skin Pharm Phys*, v. 19, p. 207-215, 2016.

CHRIT, L., HADJUR, C., MOREL, S., SOCKALINGUM, G., LEBOURDON, G., LEROY, F., MANFAIT, M., In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe, *Journal of Biomedical Optics*, v. 104, 2005.

DE JONG, S., SIMPLS - An alternative approach to partial least-squares regression, *Chemometrics Intell. Lab. Syst*, v. 18, p. 251-263, 1993.

DUARTE, F. O. S., Propriedades funcionais do colágeno e sua função no tecido muscular, *Universidade Federal de Goiás*, (Seminário de mestrado), 2011.

DUVIVIER, A., Atlas de Dermatologia Clínica, *São Paulo: Manole*, 2^o edição, 1997.

EBERLI, S., FACCHINI, G., EBERLIN, S., PINHEIRO, A. L. T. A., SILVA, M. S., PINHEIRO A. S., COSTA, A., Metodologia alternativa para o estudo dos efeitos da radiação infravermelha sobre a pele humana. *Surgical e cosmetic dermatology*, 2015.

EL-DOMYATI, M., ATTIA, S., SALEH, F., BROWN, D., BIRK, D.E., GASPARRO F., Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, *Exp. Dermatol*, v. 11, p. 398-405, 2002.

FERRÃO, M. F., VIERA, M. S., PAZOS, R. E. P., FACHINI, D., GERBASE, A. E., MARDER, L., Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions. *Fuel, London*, v. 90, p. 701-706, 2011.

FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S., VOLPE, L. O., Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v. 22, p. 724-731, 1999.

GARCÉS, V., MARCOS, P., AGUILAR, M., SERRANO, C. B., BUSTOS, V. G., SEGUÍ, J. B., IZQUIERDO, A. F., RUIZ-SAURÍ, A., Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study, *J. Anat*, v. 225, 2014.

GELADI, P., KOWALSKI, B., Partial Least-Squares Regression: A Tutorial, *Analytical Chimica Acta*, v. 185, p. 1, 1986.

GNIADACKA, M., NIELSEN, O. F., WESSEL, S., HEIDENHEIM, M., CHRISTENSEN, D. H., WULF, H.C., Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin, *J. Invest. Dermatol*, v. 111, p. 1129-1133, 1998.

GONZÁLEZ, F. J., CASTILLO-MARTÍNEZ, C., MARTÍNEZ-ESCANAMÉ, M., RAMÍREZ-ELÍAS M.G., GAITAN-GAONA F.I., OROS-OVALLE C., MONCADA B., Non-invasive estimation of chronological and photo-induced skin damage using Raman spectroscopy and principal component analysis, *Skin Res. Technol*, v. 18, p. 442-446, 2012.

GREVE, T. M. A. B., KRISTINE, B., ANDERSEN, A., NIELSEN, O. F., ATR-FTIR, FT-NIR and near-FT-Raman spectroscopic studies of molecular composition in human skin in vivo and pig ear skin in vitro, *Spectroscopy*, v. 22, p. 437-457, 2008.

HARRIS, M. I. N. C., Pele: estrutura, propriedade e envelhecimento, *Senac*, 2012.

HELFER, G. A., FERRÃO, M. F., FERREIRA, C. V., HERMES, N., Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2006.

HIBBERT, D. B., ARMSTRONG, N., An introduction to Bayesian methods for analyzing chemistry data. Part II: A review of applications of Bayesian methods in chemistry, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, v. 97, p. 211-220, 2009.

JAMES, G., WITTEN, D., HASTIE, T., TIBSHIRANI, R., An Introduction to statistical learning with application in R, *Springer Science*, 2013.

JORIO, A., DRESSELHAUS, M. S., SAITO, R., DRESSELHAUS, G., Quantum Description of Raman Scattering, *Handbook of Raman Spectroscopy in Graphene Related Systems*, 2011.

JUNIOR, F. S. A., Estudo da Correlação no Espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes da água, *Departamento de Física, Universidade Federal Minas Gerais*, (Dissertação Mestrado), 2016.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., Pele e Anexos: Histologia Básica, *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 1995.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., Biologia Molecular e celular, *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 2012.

KAUFFMANN, T. H., KOKANYAN, N., FONTANA, M., Use of Stokes and anti-Stokes Raman scattering for new applications, *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 50, p. 418-424, 2019.

KAWABATA, K., KOBAYASHI, M., KUSAKA-KIKUSHIMA, A., AKASAKA, E., MABUCHI, T., FUKUI, T., SUGIYAMA, Y., TAKEKOSHI, S., MIYASAKA, M., OZAWA, A., SAKAI, S., A new objective histological scale for studying human photoaged skin, *Skin Res. Technol*, v. 20, p. 155-163, 2014.

KERSCHER, M., WILLIAMS, S., Dermatocosmetik, *Heidelberg: Steinkopff publisher*, 2009.

KLIGMAN, A., Perspectives and problems in cutaneous gerontology, *J Invest Dermatol.*, v. 73, p. 39-46, 1979.

KOURBAJ, G., BIELFELDT, S., SEISE, M., WILHELM, K-P., Measurement of dermal water content by confocal RAMAN spectroscopy to investigate intrinsic aging and photoaging of human skin in vivo. *Skin Res. Technol.*, p. 1-10, 2020.

KOURKOUMELIS, N., BALATSOUKAS, I., MOULIA, V., ELKA, A., GAITANIS, G., BASSUKAS, I. D., Advances in the *in Vivo* Raman Spectroscopy of Malignant Skin Tumors Using Portable Instrumentation, *Int. J. Mol. Sci.*, v. 16, p. 14554-14570, 2015.

LEROY, M., LABBÉ J.F., OUELLET M., JEAN J., LEFÈVRE T., LAROCHE G., AUGER M., POULIOT R., A comparative study between human skin substitutes and normal human skin using Raman microspectroscopy, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 2703 - 2711, 2014.

LIU S., KOKOT S., WILL G. J. Photochem. Photobio. C: *Photochemistry Reviews*, v. 10, p.159-172, 2009.

MAEDA Y, KITANO H. The structure of water in polymer systems as revealed by Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* v. 51, p. 2433 - 2446, 1995.

MAHMOUD, B. H., C. L. HEXSEL, I. H. HAMZAVI, AND H. W. LIM. Effects of Visible Light on the Skin. *Photochemistry and Photobiology*, v. 84, p. 450 - 462, 2008.

MARROT, L.; MEUNIER, J. R., Skin DNA photodamage and its biological consequences, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 58, p. 139 - 148, 2008.

MARTENS, H., NAES, T. Multivariate calibration. *New York: Wiley*, 1996.

MCGRATH J. A., UITTO J., Anatomy and Organization of Human Skin, *Rook's Textbook of Dermatology*, 2010.

MCGRATH J. A., ROBINSON M. K., BINDER R.L., Skin differences based on age and chronicity of ultraviolet exposure: results from a gene expression profiling study, *Br. J. Dermatol.*, v. 166 p. 9-15, 2012.

MEHMOOD T., LILAND K.H., SNIPEN L., SÆBØ S., A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, v. 118, p. 62 - 69, 2012.

MÉLOT M.; PUDNEY P.D.A., Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, v. 138, p. 32 - 39, 2009.

NAKAGAWA, N., MATSUMOTO, M., SAKAI, S., *In vivo* measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy, *Skin Res. Technol*, v. 16, p. 137-141, 2010.

NGUYEN, T. T., GOBINET, C., FERU, J., BRASSART-PASCO, S., MANFAIT, M., PIOT, O., Characterization of Type I and IV Collagens by Raman Microspectroscopy: Identification of Spectral Markers of the Dermo-Epidermal Junction, *Spectroscopy: An International Journal*, v. 27, p. 421-427, 2012.

NGUYEN T. T., HAPPILLON, T., FERU, J., BRASSART-PASSCO, S., ANGIBOUST, J. F., MANFAIT, M., PIOT, O., Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration, *J. Raman Spectrosc*, v. 44, p. 1230-1237, 2013.

NIELSEN, O., The structure of liquid water. A low frequency (10 - 400 cm⁻¹) Raman study. *Chem Phys Lett.*, v. 60, p. 515-517, 1979.

PAGEON, H. Reaction of glycation and human skin: The effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. *Pathologie Biologie*, v. 58, p. 226-231, 2010.

PARTIDOS, C. D., BEIGNON, A. S., SEMETÉY, V., BRIAND, J. P., MULLER, S., The bare skin and the nose as non-invasive routes for administering peptide vaccines, *Vaccine*, v.19, p. 2708-2715, 2001.

PEARCE, R., GRIMMER, B., Age and the chemical constitution of normal human dermis. *J Invest Dermatol*, v. 58, p. 347-361, 1972.

PEARSON, K., Note on regression and inheritance in the case of two parents, *Proc. Royal Soc. Lond.*, v. 58, p. 240-242, 1895.

PEREIRA, A. F. M., Efeitos bioquímicos da radiação solar no envelhecimento da pele humana: espectroscopia Raman, *Universidade Brasil*, (Tese de doutorado), 2019.

PEZZOTTI, G., BOFFELLI, M., MIYAMORI, D., UEMURA, T., MARUNAKA, Y., ZHU, W., IKEGAYA, H., Raman spectroscopy of human skin: looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age, *Journal of Biomedical Optics*, v. 20, 2015.

PINTO, L. P., Análise dos efeitos do processo de glicação na pele humana através da espectroscopia Raman Confocal *in-vivo*, *Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba*, (Dissertação de mestrado), 2014.

PRASCH, T. H., et al., Infrared spectroscopy of the skin: influencing the stratum corneum with cosmetics products. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 22, p. 371-383, 2000.

QUAN, T., FISHER, G., Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review, *Gerontology*, v. 61, p. 427-434, 2015.

RAMALHO, A. C. V. L., DINIZ, S. R. R., Combinação de tratamentos estéticos tradicionais e técnicas orientais no combate à acne, *Faculdade de Educação, Ciência e Tecnologia*, (Monografia), 2009.

RENCHER, A. C., *Methods of Multivariate Analysis*, Wiley Interscience, 2nd edition, 2002.

RITTIÉ, L., FISHER, G., Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015.

RYGULA, A., MAJZNER, K., MARZEC, K. M., KACZOR, A., PILARCZYK, M., BARANSKA, M., Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.*, v. 44, p. 1061-1076, 2013.

SANTANA, F. B., Floresta aleatória para desenvolvimento de modelos multivariados de classificação e regressão em química analítica, *Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas*, (Tese de doutorado), 2020.

SANTOS, A. S., Análise de envelhecimento cutâneo intrínseco e extrínseco por espectroscopia Raman confocal *ex-vivo*: colágeno dérmico, *Departamento de Física, Universidade Federal do Piauí*, (Dissertação de mestrado), 2018.

SANTOS, L., et al., *In vivo* intra- and inter-individual variability study of human *stratum corneum* by confocal Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 87, p. 199-206, 2016.

SARKANY, R. P. E., Ultraviolet Radiation and the Skin, *In Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 2018.

SCHROEDER, P., HAENDELER, J., KRUTMANN, J., The role of near infrared radiation in photoaging of the skin, *Exp Gerontology*, v. 43, p. 629-632, 2008.

SILVA, T. F., PENNA, A. L. B., Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais, *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 71, p. 530-539, 2012.

SOUTER, C., HORDINSKY, M. K., Clinical Dermatology, *Lange Medical Books*, 1st edition, 2013.

SOUZA, A. M., POPPI, R. J., Experimento didático de Quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I, *Química Nova*, v. 35, p. 223-229, 2012.

TANAKA, Y., Impact of near-infrared radiation in dermatology, *World J Dermatol*, v. 1, p. 30-37, 2012.

TÉLLEZ, C. A., PEREIRA, L., DOS SANTOS, L., FÁVERO, P., MARTIN, A. A., 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, *Spectrochim. Acta A Mol. Spectrosc*, v. 149, p. 1009-1019, 2015.

TFAILI, S., GOBINET, C., JOSSE, G., ANGIBOUST, J. F., MANFAIT, M., PIOT, O., Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin, *Analyst*, v. 137, p. 3673, 2012.

TOSATO, M., Análise dos Constituintes Bioquímicos da pele humana sob efeito dos cosmeceuticos por Espectroscopia Raman, *Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba*, (Dissertação Mestrado), 2010.

TOSATO, M. G., *et al.* Raman Spectroscopic Investigation of the Effects of Cosmetic Formulations on the Constituents and Properties of Human Skin, *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 30, p. 85-91, 2012.

VANDEGINSTE, B. G. M., MASSART, D. L., BUYDENS, L. M. C., JING, S., LEWI, P. J., SMEYERS-VERBEKE, J., Handbook of chemometrics and qualimetrics: part B, *Amsterdam: Elsevier*, 1998.

VENUS, M., WATERMAN, J., MCNAB, I., *Surgery*, v. 29, p. 471-474, 2010.

VILLARET, A., IPINAZAR, C., SATAR, T., GRAVIER, E., MIAS, C., QUESTEL, E., SCHMITT, A. M., SAMOUEILLAN V., NADAL, F., JOSSE, G., Raman characterization of human skin aging, *Skin Res Technol*, v. 25, p. 270-276, 2019.

WASCOTTE, V., Assessment of the "Skin Reservoir" of Urea by Confocal Raman Microspectroscopy and Reverse Iontophoresis in vivo, *Pharm. Res.*, v. 24, p. 1897-1901, 2007.

WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POÓR, I., NADERI, L., *et al.*, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J Photochem Photobiol B.*, v. 63, p. 41-51, 2001.

WOLFF, K., *et al.*, Fitzpatrick's Dermatology In: General Medicine, *New York: McGraw Hill*, 2008.

YI, L., DONG, N., YUN, Y., DENG, B., REN, D., LIU, S., LIANG, Y., Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review, *Anal. Chim. Acta*, v. 914, p. 17-34, 2016.

ZANETTI, C. A. T., Aplicação de espectroscopia no infravermelho médio e análise de discriminante por mínimos quadrados parciais para classificação de biodieseis e misturas biodiesel/diesel, *Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia*, (Dissertação Mestrado), 2014.

ZHANG, Q., ANDREW, CHAN, K. L., ZHANG, G., GILLECE, T., SENAK, L., MOORE, D. J., MENDELSON, R., FLACH, C. R., Raman micro spectroscopic and dynamic vapour sorption characterization of hydration in collagen and dermal tissue, *Biopolymers*, v. 95, p. 607-615, 2011.

9 APÊNDICE

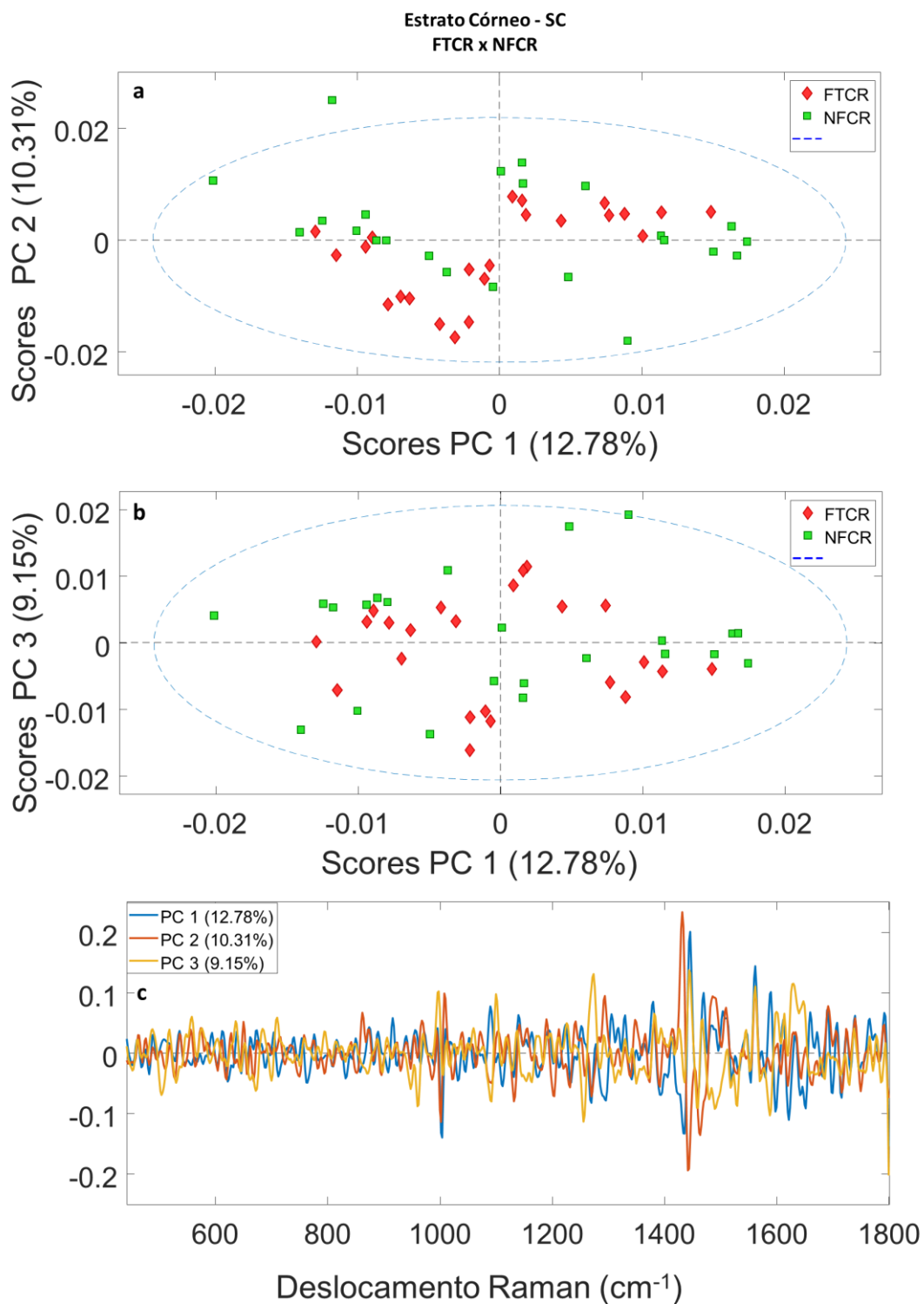


Figura A1 - Análise de PCA dos grupos FTFCR vs NFCR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 3 (PC3); (c) Gráfico de *loading plot* da PC1, PC2 e PC3.

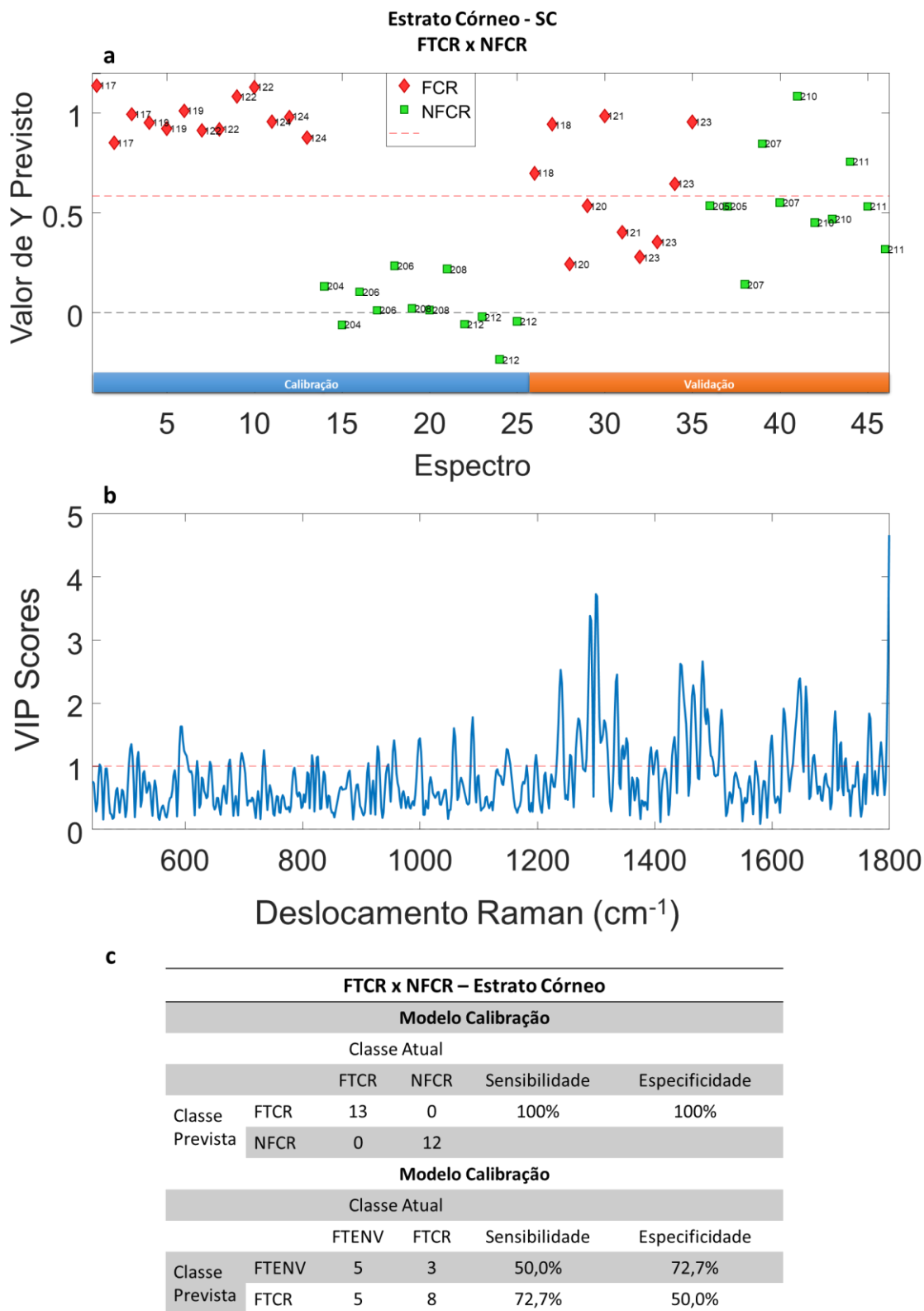


Figura A2 - Análise de PLS-DA dos grupos FTCR vs NFCR da camada do estrato córneo. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTCR vs NFCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.

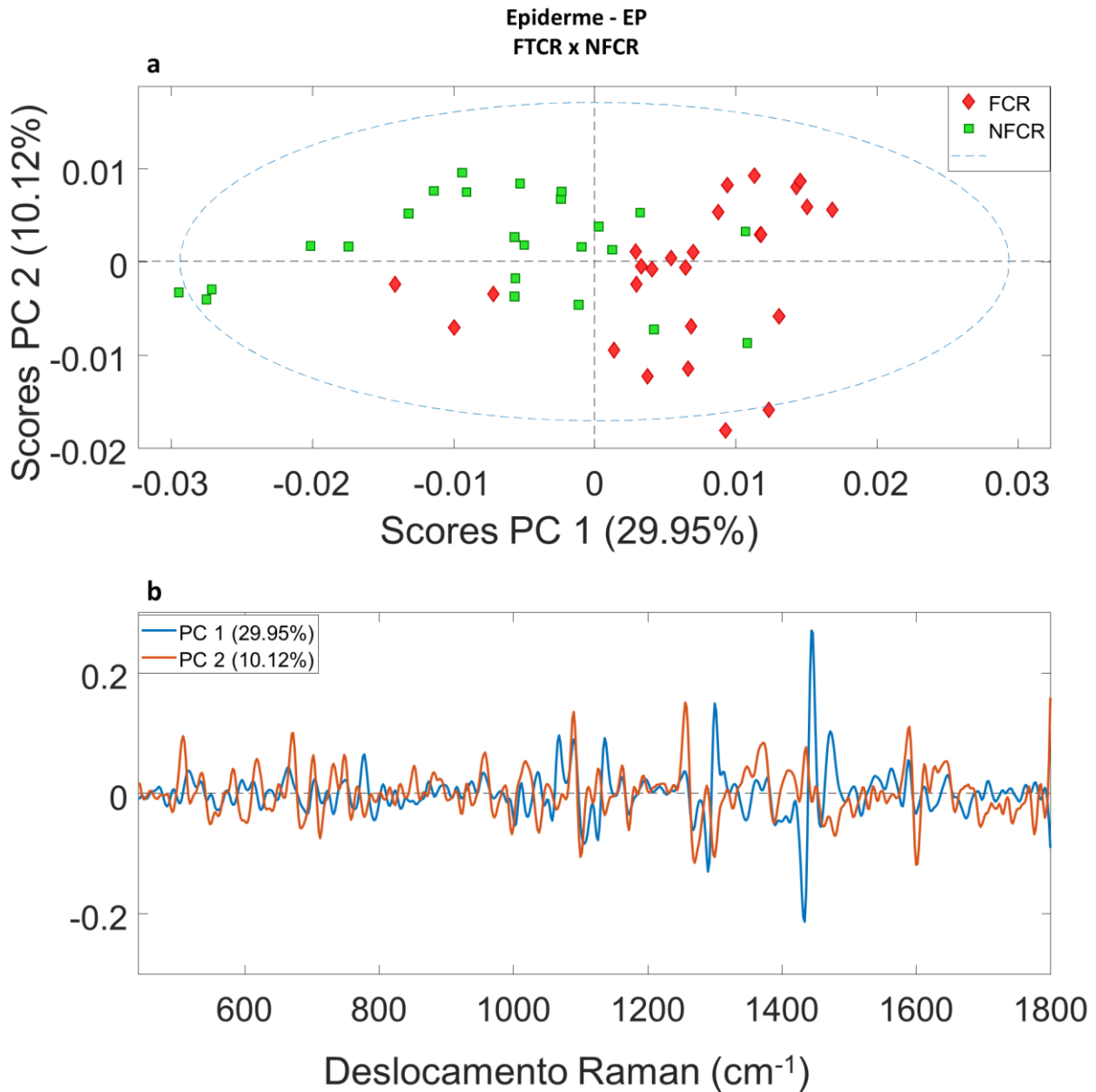


Figura A3 - Análise de PCA dos grupos FTCR vs NFCR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

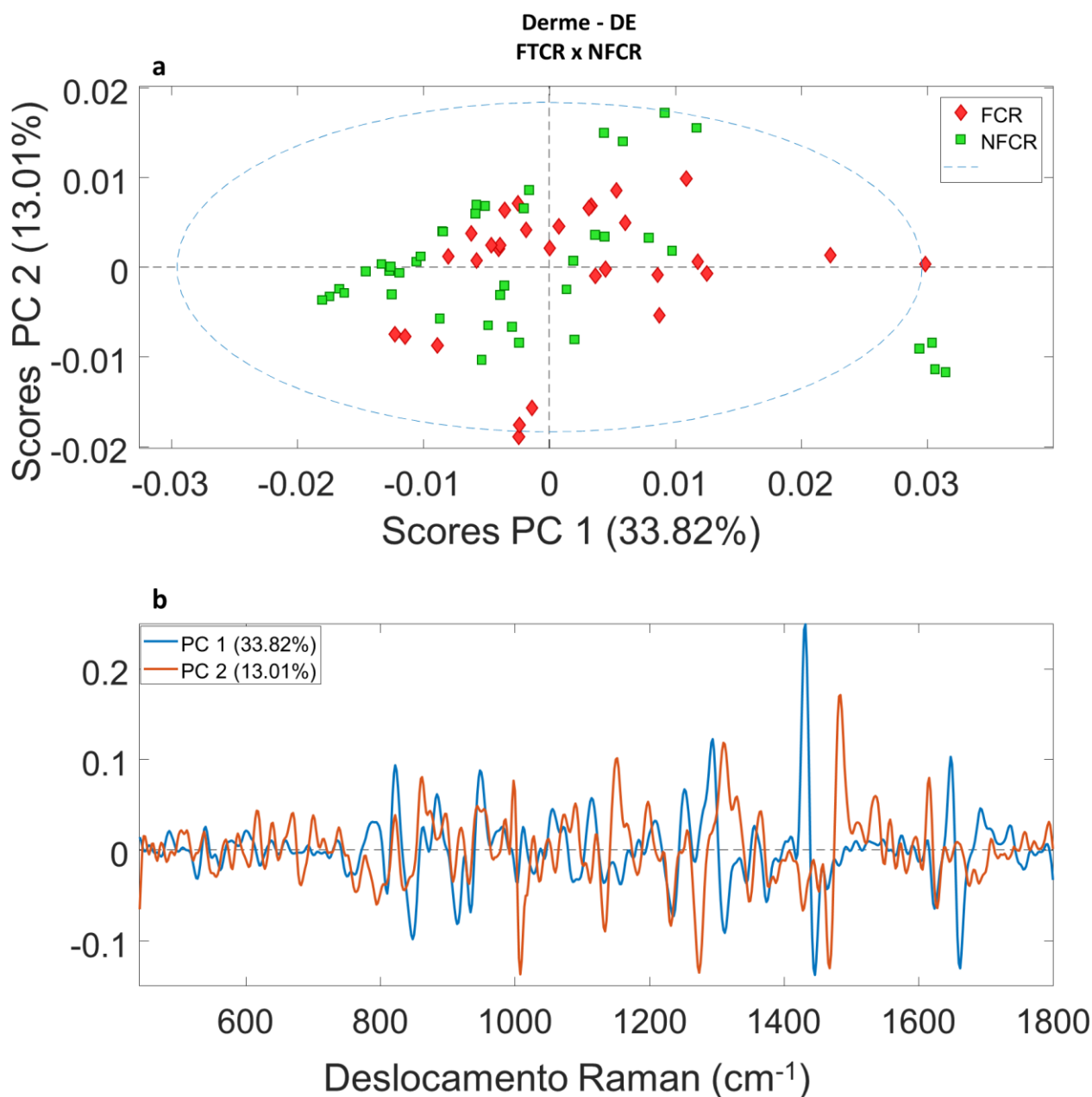


Figura A4 - Análise de PCA dos grupos FTCR vs NFCR da camada da epiderme. (a) Gráfico de distribuição de dados da componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2); (b) Gráfico de *loading plot* da PC1 e PC2.

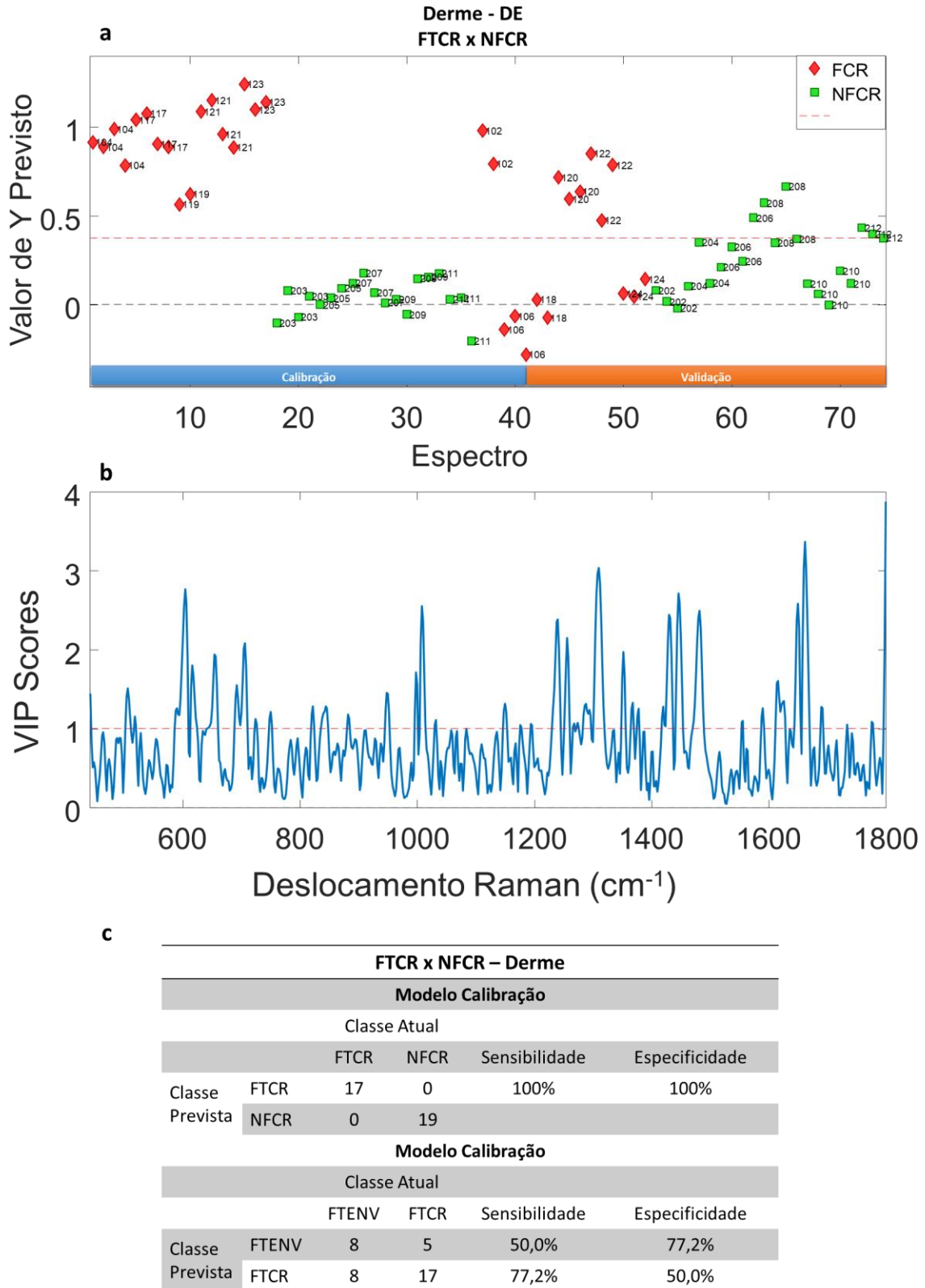


Figura A5 - Análise de PLS-DA dos grupos FTCR vs NFCR da camada da derme. (a) Gráfico de distribuição de dados do modelo de calibração e validação; (b) Gráfico das variáveis importantes para discriminação espectral entre os grupos FTCR vs NFCR; (c) Figuras de mérito de classificação por PLS-DA.