Universidade Brasil – Campus Itaquera

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

LARISSA KAROLINE ZAGO ROGONI BELLO

ESTUDO DOS EFEITOS BIOQUÍMICOS DA LUZ AZUL NA PELE HUMANA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN CONFOCAL

STUDY OF THE BIOCHEMICAL EFFECTS OF BLUE LIGHT ON HUMAN SKIN BY RAMAN CONFOCAL SPECTROSCOPY

São Paulo - SP

2021

UNIVERSIDADE BRASIL

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

LARISSA KAROLINE ZAGO ROGONI BELLO

ESTUDO DOS EFEITOS BIOQUÍMICOS DA LUZ AZUL NA PELE HUMANA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN CONFOCAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Profa. Dra. Priscila Pereira Fávero

Orientadora

Prof. Dr. Airton Abrahão Martin

Coorientador

São Paulo - SP

2021

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

B386e BELLO, Larissa Karoline Zago Rogoni

Estudo dos efeitos bioquímicos da luz azul na pele humana por Espectroscopia Raman Confocal / Larissa Karoline Zago Rogoni Bello. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.
63 p.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Bioengenharia da Universidade Brasil.
Orientação: Profa. Dra. Priscila Pereira Fávero.
Coorientação: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin.

1. Espectroscopia Raman. 2. Luz azul. 3. Alterações bioquímicas. I. Fávero, Priscila Pereira. II. Martin, Airton Abrahão. III. Título.

CDD 620.82

UNIVERSIDADE BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

LARISSA KAROLINE ZAGO ROGONI BELLO

"ESTUDO DOS EFEITOS BIOQUÍMICOS DA LUZ AZUL NA PELE HUMANA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN CONFOCAL"

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

Prof.(a). Dr.(a) Priscila Pereira Fávero (presidente-orientadora)

Prof.(a). Dr.(a) Airton Abrahão Martin (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof.(a). Dr.(a) Lívia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Ediléia Bagatin (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

São Paulo, 03 de dezembro de 2020

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Priscila Pereira Fávero

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

UNIVERSIDADE BRASIL

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE E SIGILO

Eu**, Larissa Karoline Zago Rogoni Bello**, brasileiro(a), inscrita(o) no CPF/MF sob o nº **002.972.701-41**, abaixo firmado, assume o compromisso de manter confidencialidade e sigilo sobre todas as informações técnicas e outras relacionadas ao desenvolvimento do projeto **"Estudo dos Efeitos Bioquímicos da Luz Azul na Pele Humana por Espectroscopia Raman Confocal",** do qual sou autora da dissertação.

Por este termo de confidencialidade e sigilo compromete-se:

- A não utilizar as informações confidenciais a que tiver acesso, para gerar benefício próprio exclusivo e/ou unilateral, presente ou futuro, ou para o uso de terceiros;
- A não efetuar nenhuma gravação ou cópia da documentação confidencial a que tiver acesso, relacionado ao projeto acima mencionado;
- A não apropriar-se para si ou para outrem de material confidencial e/ou sigiloso que venha a ser disponível através do projeto ora mencionado;
- A não passar o conhecimento das informações confidenciais, responsabilizando-se por todas as pessoas que vierem a ter acesso às informações, por seu intermédio, e obrigando-se, assim, a ressarcir a ocorrência de qualquer dano e prejuízo oriundo de uma eventual quebra de sigilo das informações fornecidas.

Neste Termo, as seguintes expressões serão assim definidas:

Informação Confidencial: significará toda informação revelada através da apresentação da tecnologia, a respeito de, ou, associado com a Avaliação, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios.
Informação Confidencial: inclui, mas não se limita, à informação relativa às operações, processos, planos ou intenções, informações sobre produção, instalações, equipamentos, segredos de negócios, segredo de fábrica, dados, habilidades especializadas, projetos, métodos e metodologia, fluxogramas, especializações, componentes, fórmulas, produtos, amostras, diagramas, desenhos de esquema industrial, patentes, oportunidades de mercado e questões relativas a negócios revelados do projeto supra mencionada.
Avaliação: significará todas e quaisquer discussões, conversações ou negociações entre, ou com as partes, de alguma forma relacionada ou associada com a apresentação do projeto, acima mencionado.

A vigência da obrigação de confidencialidade e sigilo, assumida pela minha pessoa por meio deste termo, terá a validade enquanto a informação não for tornada de conhecimento público por qualquer outra pessoa, ou mediante autorização escrita, concedida à minha pessoa pelas partes interessadas neste termo.

Pelo não cumprimento do presente Termo de Confidencialidade e Sigilo, fica o abaixo assinado ciente de todas as sanções judiciais que poderão advir.

São Paulo, 24 de Janeiro de 2021

Larissa Karoline Zago Rogoni Bello

Assinatura

RESUMO

Introdução: A espectroscopia Raman é uma técnica recente e não invasiva a qual pode ser empregada para avaliar a estrutura bioquímica da pele em diferentes condições. Esta técnica já se mostrou útil em diversos contextos e apesar disso, estudos adicionais ainda são necessários. Já foi descrito na literatura o efeito da luz azul sobre a pele e suas consequências clínicas, tais como o fotoenvelhecimento. Além disso, o componente de luz da radiação solar se mostrou como um fator de risco para diversas doenças, tais como o melanoma, as manchas de pele, nevos pigmentado e outras lesões de pele. Deste modo, a investigação dos efeitos da luz azul por meio da espectroscopia Raman é algo útil e necessário para o cenário atual. **Objetivo:** Compreender as alterações bioquímicas da pele humana devido à incidência da luz azul , utilizando a Espectroscopia Raman Conforcal. **Método**: Trata-se de um estudo monocêntrico, retrospectivo, baseado na análise de um banco de dados com coleta prospectiva realizado de acordo com o procedimento operacional da DermoProbes. **Resultados:** Após a irradiação do LED azul por 15 minutos (100 J/cm^2) verificou-se a formação de dano no estrato córneo, que corresponde as ligações disulfeto, tirosina, fenilanina e betacaroteno, e danos a Amida I na epiderme viável. Após irradiação subsequente, na mesma área, por mais 15 minutos (totalizando 200 J/cm^2) observou-se um aumento no dano a epiderme viável, para esta irradiação destaca-se as assinaturas nas bandas da felilalanina, L-glutamano, valina, ácido lipóico e betacaroteno. Quando comparada a pele irradiada com a pele virgem por 45 minutos (correspondentes a 3 incidências de 15 minutos, totalizando 300 J/cm^2), observou-se que a separação por cluster da pele virgem e irradiada é completa, para esta irradiação, destaca-se as assinaturas do ácido oleico e da Amida III. Verificou-se que diferentes doses atuam em diferentes grupos moleculares do estrato córneo e da derme. Quando o dano é intenso as proteínas são as mais atingidas e quando o dano é menor aciona-se o antioxidante betacaroteno e aminoácidos como tirosina e fenilalanina. **Conlusão:** O presente estudo demonstrou, a partir da análise da espectroscopia Raman, as principais alterações bioquímicas na pele após diferentes intensidades de irradiação de luz azul. A partir dos resultados descritos, foi possível constatar que o dano à bioquímica da pele aumenta conforme

aumenta a exposição à luz azul, em um comprimento de onda semelhante ao componente visível da luz solar.
Palavras-chave: Espectroscopia Raman; Luz azul; Alterações bioquímicas.

ABSTRACT

Introduction: Raman spectroscopy is a recent and non-invasive technique that can be used to assess a biochemical structure of the skin under different conditions. This technique is already useful in several contexts, although additional studies are still being published. The effect of blue light on the skin and its clinical functions, such as photoaging, have been described in the literature. In addition, the light component of solar radiation is shown to be a risk factor for several diseases, such as melanoma, such as skin patches, pigmented nevi and other skin lesions. Thus, an investigation of the effects of blue light using Raman spectroscopy is useful and necessary for the current scenario. **Objective**: To understand biochemical changes in human skin due to the incidence of blue light, using Raman Conforcal Spectroscopy. **Method**: This is a monocentric, retrospective study, based on the analysis of a database with prospective collection carried out in accordance with DermoProbes' operational procedure. **Results**: After irradiation of the blue LED for 15 minutes (100 J / cm2), damage was observed in the stratum corneum, which corresponds to disulfide, tyrosine, phenylanine and beta-carotene bonds, and damage to Amide I in the viable epidermis. After subsequent irradiation, in the same area, for another 15 minutes (totaling 200 J / cm2), an increase in the damage to the viable epidermis was observed. For this irradiation the signatures in the bands of felilalanine, L-glutamano, valine, lipoic acid and beta-carotene stand out. When compared to irradiated skin with virgin skin for 45 minutes (corresponding to 3 incidences of 15 minutes, totaling 300 J / cm2), it was observed that the separation by cluster of virgin and irradiated skin is complete, for this irradiation, it stands out as signatures of oleic acid and Amide III. It was found that different doses act on different molecular groups of the stratum corneum and dermis. When the damage is intense as proteins are the most affected and when the damage is less, the antioxidant beta carotene and amino acids such as tyrosine and phenylalanine are activated. **Conclusion**: The present study, from the analysis of Raman spectroscopy, as the main biochemical changes in the skin after different intensities of blue light irradiation. From the results obtained, it was possible to verify that the damage to the biochemistry of the skin increases as the exposure to blue light increases, at a wavelength similar to the visible component of sunlight.

Keywords: Raman spectroscopy; Blue light; Biochemical changes.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A espectroscopia Raman é uma técnica recente e não invasiva a qual pode ser empregada para avaliar a estrutura bioquímica da pele em diferentes condições. Esta técnica já se mostrou útil em diversos contextos e apesar disso, estudos adicionais ainda são necessários. Nesse estudo esta técnica foi utilizada para compreender as alterações bioquímicas da pele humana devido à incidência da luz azul. Neste estudo, os danos a pele foram observados e descritos conforme as camadas da pele, foi possível observar o dano na camada córnea e epiderme. Além disso, foi descrito as assinaturas espectrais decorrente do dano gerado pela irradiação de luz azul. Uma constatação importante foi ter-se observado que quando o dano é intenso as proteínas são as mais atingidas e quando o dano é menor aciona-se o antioxidante betacaroteno e aminoácidos como tirosina e fenilalanina. Por fim, foi possível correlacionar os resultados encontrados com a fisiopatologia de alterações de pele e com o processo de melanogênese. Descreveu-se ainda a relação da exposição a luz azul com a ativação da cadeia de reações dos antioxidantes naturais, representados no estudo pelo betacaroteno.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura ilustrativa das camadas da pele. 19
Figura 2 - Camadas da Epiderme 20
Figura 3 - Esquema da estrutura da pele humana e penetração de diferentes comprimentos de onda de UV 28
Figura 4 - Fisiologia da indução da melanogênese..... 30
Figura 5 - Infraestrutura do Laboratório onde os Experimentos Foram Conduzidos 36
Figura 6 - Delimitação da região de interesse..... 38
Figura 7 - Instrumentos Utilizados Durante o Procedimento..... 39
Figura 8 - (A) Sala de realização das medidas e equipamento acoplado ao software onde são obtidas os espectros Raman. (B) Medição da expectroscopia na mão de um dos participantes do estudo. 40
Figura 9 - Espectros da pele virgem desde a superfície da pele (0 μm) até 11 μm.. 42
Figura 10 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele virgem, para as diversas profundidades. O cluster com T0_5 até T0_12 caracterizam o estrato córneo e o cluster de T0_13 até T0_20 mostram a epiderme viável. 43
Figura 11 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele após 15 minutos de irradiação com LED azul, para as diversas profundidades 44
Figura 12 - Dendograma comparativo entre o grupo virgem (T0) e o grupo irradiado com 100J/cm2 (T1) , em função da profundidade. T0_5 e T1_5 são superfícies do estrato córneo e T0_20 e T1_20 são medidas à 52 μm..... 45
Figura 13 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele após 30 minutos de irradiação com LED azul, para as diversas profundidades. 46
Figura 14 - Dendograma comparativo entre o grupo virgem (T0) e o grupo irradiado com 200J/cm2 (T2) , em função da profundidade. T0_5 e T2_5 são superfícies do estrato córneo e T0_20 e T2_20 são medidas à 52 μm..... 47
Figura 15 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele após 45 minutos de irradiação com LED azul, para as diversas profundidades 48
Figura 16 - Dendograma comparativo entre o grupo virgem (T0) e o grupo irradiado com 300J/cm2 (T3) , em função da profundidade. T0_5 e T3_5 são superfícies do estrato córneo e T0_20 e T3_20 são medidas à 50 μm..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Assinaturas espectrais dos dados devido a 100 J/cm2 45
Tabela 2 - Assinaturas espectrais dos danos devido a 200 J/cm2 47
Tabela 3 - Assinaturas espectrais dos danos devido a 300 J/cm^2 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 JUSTIFICATIVA 17

3 OBJETIVOS 18

3.1. OBJETIVO GERAL **18**

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **18**

3 REVISÃO DA LITERATURA 19

4.1. PELE HUMANA E SUA ESTRUTURA **19**

4.1.1. Epiderme 19

4.1.2 Camada córnea 21

4.1.3. Estrato granuloso 22

4.1.4. Estrato espinhoso 23

4.1.5. Camada basal 23

4.1.6. Melanócitos 24

4.1.7. Células de Merkel 25

4.1.8. Células de Langerhans 25

4.1.9. Junção dermoepidérmica 25

4.1.10. Derme 25

4.1.12. Hipoderme 26

4.2. EFEITOS DA LUZ SOLAR NA PELE HUMANA **27**

4.2.1. O papel da radiação UV na melanogênese. 29

4.3. ALTERAÇÕES DE PELE RELACIONADAS À EXPOSIÇÃO DE LUZ SOLAR **31**

4.3.1. Envelhecimento cutâneo **31**

4.3.2. Melasma **31**

4.3.3. Nevos melanocíticos **32**

4.3.4. Melanomas **32**

4.4. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA PELE **33**

4.4.1 Espectroscopia Raman **33**

4.4.1.2. Aplicações **34**

4.5. HIPÓTESE DO ESTUDO **35**

5 MATERIAIS E MÉTODO 36

5.1. ASPECTOS ÉTICOS 36

5.2. TIPO DE ESTUDO 36

5.3. LOCAL DO ESTUDO 36

5.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO 37

5.5. PROCEDIMENTOS 38

5.5.1. Irradiação da Luz Azul **38**

5.5.2. Obtenção dos Espectros da Pele **39**

6 RESULTADOS 41

6.1. PERFIL DA AMOSTRA 41
6.2. CARACTERIZAÇÃO DO DANO À PELE HUMANA DEVIDO À INCIDÊNCIA DA LUZ AZUL. 41
6.2.1 Caracterização do dano após 15 minutos de irradiação do LED (100 J/cm^2) 43
6.2.2 Caracterização do dano após 30 minutos de irradiação do LED (200 J/cm^2) 46
6.2.3 Caracterização do dano após 45 minutos de irradiação do LED (300 J/cm^2) 48
7 DISCUSSÃO 51
8 CONCLUSÃO 56
REFERÊNCIAS 58

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, com uma área de aproximadamente 2m² em uma pessoa de idade adulta, é a principal barreira de proteção do corpo humano. A pele está ligada ao corpo por uma tela subcutânea, formada por camadas de célula do tecido conjuntivo adiposo, que permitem a movimentação e vascularização adequada (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além do tecido adiposo, encontram-se duas camadas importantes: o tecido fibroelástico, um tecido conjuntivo frouxo, que se subdivide em: derme papilar, onde predominam os feixes fibrilares finos com predomínio de colágeno tipo III e pouco do tipo I, além das fibras oxitalânicas (precursoras de fibras elásticas) fundidas perpendicularmente à membrana basal; e derme reticular, que constitui a maior parte da derme, composta por fibras de colágeno mais espessas do tipo I (80 a 90%) e fibras do tipo III (10 a 20%) entremeadas em uma rede de fibras elásticas dispostas horizontalmente, conferindo importante função de extensibilidade e elasticidade ao tegumento, que é a derme, e o epitélio estratificado com células pavimentosas e queratinizadas localizado logo acima, a epiderme. A pele faz parte do sistema tegumentar humano, que além desta inclui a tela subcutânea e os anexos cutâneos (HUDSON *et al.*, 2020; KLEINPENNING *et al.*, 2010; OGBECHIE-GODEC; ELBULUK, 2017).

O ambiente externo pode afetar gravemente a integridade da pele humana. Esses fatores externos podem ser, por exemplo, poluição ou luz solar. Os efeitos nocivos do excesso de luz solar na pele humana têm sido extensivamente estudados nos últimos anos (HUDSON *et al.*, 2020; LIEBEL *et al.*, 2012; LOPES, Monica Bergamo *et al.*, 2016). Os estudos descritos na literatura associam os dados à pele causados pela luz solar com diversas afecções de pele, como por exemplo os efeitos da radiação ultravioleta (UV) e sua relação com o aparecimento de câncer de pele, o envelhecimento cutâneo, a hiperpigmentação cutânea e outras patologias (HUDSON *et al.*, 2020; LIEBEL *et al.*, 2012; NAKASHIMA; OHTA; WOLF, 2017).

Embora a maioria dos efeitos conhecidos da exposição solar na pele esteja ligada à radiação ultravioleta, é importante notar que a radiação ultravioleta representa apenas 2 a 5% do espectro solar. Curiosamente, a luz visível representa quase metade do espectro solar e seus efeitos na pele ainda são amplamente desconhecidos (REGAZZETTI *et al.*, 2018).

Nesse sentido, alguns autores destacam que esses outros comprimentos de onda da luz solar também podem causar danos à pele humana, dependendo da dose recebida. Liebel et al. (2012) demonstrou que a luz visível ativa as metaloproteinases e diminui a produção de colágeno por meio da indução do estresse oxidativo. A radiação no comprimento de onda infravermelho, por exemplo, foi recentemente estudada para verificar os danos causados no colágeno da pele humana (LIEBEL *et al.*, 2012; LOPES, 2016).

Embora a luz azul tenha sido aplicada em vários tratamentos cutâneos humanos (ARJMANDI *et al.*, 2018; WALKER; VOLLMER-SNARR; EBERTING, 2012) e mesmo sendo indicada para práticas dermatológicas, a superexposição de doses relativamente altas de luz azul, como as advindas do componente visível da luz solar, pode desencadear a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio – NO e peroxinitrito (NO3 – junção de radical superóxido + NO), levando ao envelhecimento prematuro de pele humana.

Nakashima et al. (2017) estudou os efeitos da luz azul na pele de camundongos e humanos e encontrou a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e demonstrou que as ERO produzidas pela luz azul eram provavelmente de radicais superóxidos(O2-) formados após a exposição (NAKASHIMA; OHTA; WOLF, 2017).

Os principais efeitos negativos produzidos pela radiação de luz azul superexposta na pele humana podem ser determinados pelos danos no DNA e pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio; danos à camada mais profunda da pele em comparação com a luz UVA e UVB; diminuir o conteúdo de colágeno na derme e danos à elastina. O efeito de risco da luz azul na pele precisa de mais pesquisas ante de conclusões sólidas serem aferidas (LIEBEL *et al.*, 2012).

Diversas técnicas têm sido utilizadas no entendimento do efeito da luz visível na pele. Muitas pesquisas se utilizam de técnicas morfológicas, que exigem extração da amostra, como por exemplo a biópsia. Essas técnicas não fornecem informações dos constituintes bioquímicos e estruturais da pele, além de serem invasivas. Nos últimos anos, com os avanços da tecnologia, na avidez por técnicas menos invasivas, mais sensíveis, precisão aguçada, em menor tempo e manutenção do equilíbrio no binômio custo/benefício, a espectroscopia Raman desponta vertiginosamente, como uma ferramenta poderosa e promissora neste segmento, galgando novas áreas de atuação (JONES *et al.*, 2019).

Tendo isso em vista, no presente estudo são investigados os efeitos da luz azul visível com uma faixa de 400 a 480nm e concentrados em 450 nm, na pele normal de voluntários saudáveis a partir da espectroscopia Raman.

2 JUSTIFICATIVA

A espectroscopia Raman é uma técnica recente e não invasiva a qual pode ser empregada para avaliar a estrutura bioquímica da pele em diferentes condições. Esta técnica já se mostrou útil em diversos contextos, apesar disso estudos adicionais ainda são necessários. Outrossim, o maior conhecimento que se tem sobre o impacto da luz solar na pele humana é referente ao componente ultravioleta, apesar disso, alguns estudos já demonstraram que a luz azul desencadeia consequências fisiopatológicas com repercussões clínicas e se mostrou como um fator de risco para diversas doenças, tais como o melanoma, as manchas de pele, nevos pigmentado e outras lesões de pele. Deste modo, é necessário melhor descrever as alterações bioquímicas que a luz azul pode desencadear na pele saudável e a espectroscopia é uma técnica bastante acurada para se realizar tal análise.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Compreender, a partir da Espectroscopia Raman, as alterações bioquímicas da pele a partir da irradiação de luz azul corresponde ao comprimento de onda da radiação solar direta em pele humana saudável.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o espectro da pele virgem e irradiada com luz azul a partir da Espectroscopia Raman;

Descrever as assinaturas espectrais dos danos devido a irradiação de luz azul na pele humana saudável;

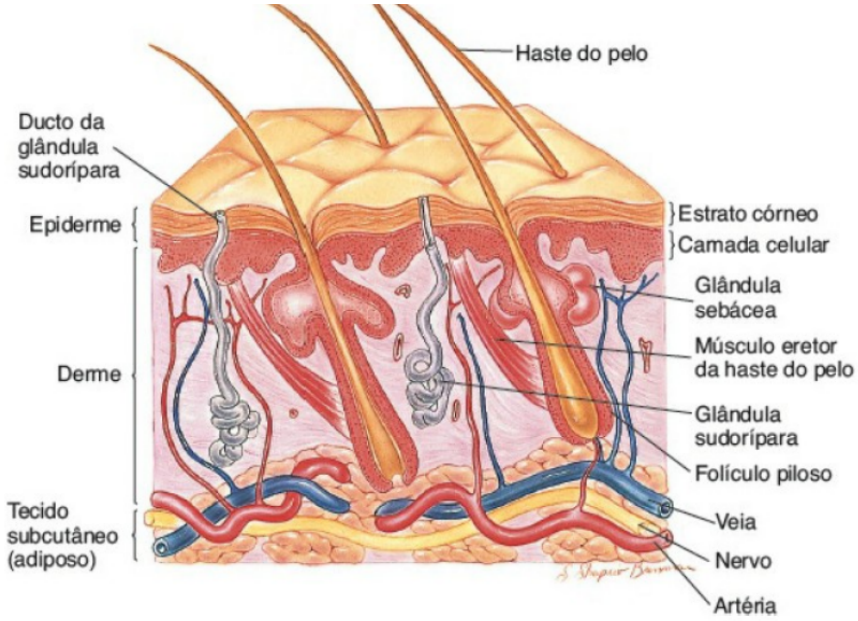
Comparar os achados encontrados pelo estudo com as alterações presentes na fisiopatologia de doenças de pele;

3 REVISÃO DA LITERATURA

4.1. PELE HUMANA E SUA ESTRUTURA

A pele é o maior órgão do corpo humano, e é a barreira física entre o meio ambiente e o corpo humano. Diferentes áreas do corpo exigem diferentes características na pele, como variações na espessura das camadas e quantidade de anexos cutâneos (COLONNA, 2014). A pele humana pode ser dividida em três camadas, sendo as mais importantes a epiderme e derme, como demonstrado na Figura 1. A epiderme é a camada mais extensa, estruturada por células com epitélio estratificado e dividida em várias sub-camadas: camada córnea, granulosa, espinhosa e basal. A derme é localizada abaixo da epiderme e é constituída por tecido fibroelástico e outras estruturas como tecidos nervosos com fibras sensitivas e motoras, vasos sanguíneos, vasos do sistema linfático e músculos (HARRIS, 2005).

Figura 1 - Figura ilustrativa das camadas da pele.



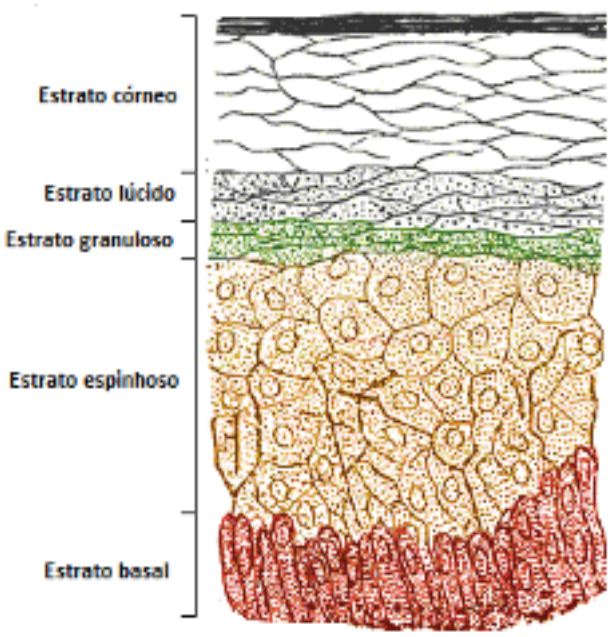
Fonte: Bear *et al.* (2002).

4.1.1. Epiderme

A principal função da epiderme seria proteger a pele das agressões externas como, por exemplo, penetração de agentes químicos, pela entrada de

microrganismos e proteção contra a radiação ultravioleta (UV) e regulação da temperatura corporal, bem como perda excessiva de água. Para isso a epiderme produz sua principal célula, o corneócito (queratinócitos), que em condições favoráveis atua como barreira de proteção. Essa barreira conta também com quatro camadas que têm funções e composições bioquímicas diferentes: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea, como demonstrado na Figura 2 (KALININ; MAREKOV; STEINERT, 2001).

Figura 2 - Camadas da Epiderme



Fonte: Bear *et al.* (2002).

Em cada camada, iniciando-se na camada basal (interna), as células denominadas queratinócitos sofrem um processo contínuo de diferenciação e migram em um movimento ascendente até chegarem à camada córnea (superficial), onde ocorre a etapa final da maturação. A partir da camada basal as células levam aproximadamente 30 dias ou mais para atingir o estrato córneo, acumulando em cada camada que passa uma quantidade crescente de queratina. Nesse estágio de diferenciação final as células são denominadas corneócitos (CASPERS, 2003).

4.1.2 Camada córnea

O estrato córneo ou camada córnea, é a camada mais superficial da epiderme, é formado por uma estrutura heterogênea de células achatadas (corneócitos) sem núcleo e queratinizadas, envoltas por matriz lipídica. Essas células são o produto final da diferenciação celular (AV *et al.*, 1994). A célula fornece uma barreira física vital para esses tecidos em mamíferos e consiste em uma camada de 10 a 20 nm de espessura de proteínas insolúveis altamente reticuladas. No caso especializado da epiderme, uma camada de 5 nm de espessura de ceramida lipídica é covalentemente ligada às proteínas. Estes organizam os lipídios extracelulares em lamelas ordenadas e, juntos, o envelope celular e os lipídios extracelulares são essenciais para a função de barreira física e de água eficaz na pele (KALININ; MAREKOV; STEINERT, 2001).

Além da queratina que preenche os corneócitos e dos lipídeos que os cercam encontramos também, entre a composição bioquímica desta camada, as moléculas de aminoácidos, que formarão o fator natural de hidratação (NMF). O NMF é fundamental no controle da hidratação do estrato córneo e em sua composição encontram-se cerca de 15 aminoácidos (entre eles a serina, glicina, arginina, ornitina, citrulina, alanina, histidina, fenilalanina), o ácido pirrolidona-carboxílico (PCA), o ácido urocânico e também lactato e ureia. Todas essas moléculas tornam o NMF uma mistura altamente higroscópica, absorvendo água da atmosfera, mesmo em condições de baixa umidade. Isso ocorre porque os aminoácidos que compõe o NMF têm grande afinidade pela água (AV *et al.*, 1994).

A grande fonte dos aminoácidos que compõe o NMF é a proteína filagrina, que tem como proteína precursora a profilagrina (rica em monômeros de histidina, contém de dez a doze repetições de filagrina). Os monômeros de glutamina são convertidos a ácido pirrolidona-carboxílico, um poderoso umectante e os monômeros de histidina convertidos a ácido trans urocânico, que atua na proteção da pele contra a radiação solar. Assim, essa mistura de diferentes aminoácidos está intimamente relacionada ao conteúdo hídrico da camada córnea (KALININ; MAREKOV; STEINERT, 2001).

A camada córnea é um tecido composto de células mortas, mas ocorrem diversas reações químicas que são vitais para o seu funcionamento. As reações são na maioria enzimáticas e totalmente dependentes de água. Logo, a função de barreira exercida pelo estrato córneo é de extrema importância para reter a água nesta camada, por estar na superfície da pele esta camada sofre diretamente as agressões

de seca e outros danos externos. Uma dessas reações enzimáticas que ocorrem é a descamação, processo delicadamente controlado pelas proteases. Os corneodesmossomos (estrutura diferenciada de desmossomo) são a principal força de ligação entre os corneócitos (CORDEIRO, 2014).

A principal barreira contra a perda excessiva de água no estrato córneo é a barreira lipídica, composta de vários os lipídeos biológicos. Na epiderme eles estão organizados estrategicamente para cumprir com eficácia a função de barreira cutânea. Os principais lipídeos encontrados na camada córnea são os ácidos graxos, as ceramidas e o colesterol. Os ácidos graxos são cadeias longas de hidrocarbonetos (variando de 4 a 36 átomos de carbono) e uma molécula de ácido carboxílico. Sua propriedade física é determinada justamente pelo tamanho dessas cadeias (LIEBEL *et al.*, 2012).

Outra classe de lipídeos que compõe o estrato córneo, os esteróis, são naturalmente moléculas de função estrutural. O colesterol, um importante representante da classe, está presente em grande quantidade no tecido animal e possui em sua estrutura uma porção polar (grupo hidroxil), um núcleo esteroide (que o caracteriza) e uma cadeia hidrocarbonada apolar (HUANG; HEIKAL; WEBB, 2002; KRAMARENKO *et al.*, 2006).

Todos esses lipídeos são sintetizados na camada granulosa e armazenados em estruturas denominadas corpos lamelares. Dentro dos corpos lamelares os lipídeos estão em cadeias mais polares, que são o sulfato de colesterol, fosfolipídeos e glucosilceramidas (DOS SANTOS *et al.*, 2017). Quando eles são descarregados das células no meio extracelular do estrato córneo, o conteúdo lipídico sofre alterações bioquímicas resultando em moléculas menos polares (colesterol, ceramidas e ácidos graxos). Então esses lipídeos são organizados em camadas lamelares (em grupos de três bicamadas lipídicas) unidas por moléculas de ceramidas, fortemente envolvidas na formação das bicamadas lipídicas que circundam os corneócitos do estrato córneo. São no mínimo seis tipos diferentes de estrutura molecular que variam no comprimento da cadeia de ácidos graxos e pelo radical (KALININ; MAREKOV; STEINERT, 2001).

4.1.3. Estrato granuloso

A camada granulosa está localizada logo abaixo do estrato córneo, com exceção dos locais onde a pele sofre grande pressão e fricção (como na região plantar

e palmar) que encontramos uma camada extra denominado estrato lúcido. O estrato granuloso é composto de células achatadas com aproximadamente 3 a 4 camadas de células poligonais e achatadas com citoplasma repleto de grânulos de histidina fosforilada e cisteína precursores químicos de queratina, querato-hialina, que darão origem a filagrina, que são responsáveis por agregar queratina e outras proteínas nos corneócitos,

Além dos grânulos encontram-se também, nesta camada, pequenos corpos lamelares, com uma mistura de diferentes lipídeos polares em seu interior. Esses corpos lamelares serão posteriormente extrudados da membrana plasmática do estrato granuloso, passando então para o estrato córneo. O seu conteúdo lipídico será liberado no meio extracelular onde serão modificados bioquímicamente a lipídeos menos polares (ceramidas, colesterol e ácidos graxos). Em seguida esses lipídeos se reorganizam, formando então a estrutura lamelar lipídica de barreira. Por fim, o estrato granuloso tem intensa participação na formação da estrutura de barreira da epiderme (KALININ; MAREKOV; STEINERT, 2001).

4.1.4. Estrato espinhoso

O estrato espinhoso é composto por várias camadas de células, ocupando maior volume da epiderme, com cerca de 10 a 13 camadas. Nesta camada as células queratinócitas já encerraram a sua multiplicação celular e começam a acumular uma quantidade de proteínas específicas que fazem parte do processo final de diferenciação. À medida que as células migram para a superfície elas sofrem algumas diferenciações como a diminuição do núcleo e o aumento do citoplasma. O estrato espinhoso tem este nome devido à arquitetura de sua membrana plasmática com projeções espiculadas, devido a união com células adjacentes por meio de desmossomos, que dão a superfície da pele uma aparência rugosa (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

4.1.5. Camada basal

A camada basal pode também ser chamada de camada germinativa ou proliferativa, já que é neste local a proliferação celular é intensa. É a camada mais profunda, composta por células prismáticas ou cúbicas, ricas em células tronco. As células originadas no processo proliferativo são os queratinócitos cuja principal função

é produzir queratina (uma proteína fibrosa que apresenta duas conformações: α-helice ou folhas-β). As células dessa camada possuem alta capacidade mitótica por estar diretamente ligada ao processo de renovação da pele, que ocorre em um tempo médio de 15 a 30 dias, podendo sofrer variações de acordo com a idade, região e outros fatores metabólicos do corpo (WIEGELL *et al.*, 2008).

Das células originadas nesta camada, 50% migram ascendentemente para as camadas superiores, sofrendo diversas alterações bioquímicas. Os outros cinquenta por cento permanecem no estrato e são arranjadas logo acima da junção dermo-epidermica em uma única fileira de células colunares, com grandes núcleos. Além dos queratinócitos iniciais, encontram-se também algumas células com funções específicas: os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (KLEINPENNING *et al.*, 2010).

4.1.6. Melanócitos

Os melanócitos correspondem a 2% a 5% das células epidérmicas e estão localizadas na camada basal. São células dendríticas (dendritos – prolongamentos do citoplasma) responsáveis pela produção de melanina, pigmento que envolve a célula protegendo-a dos raios solares. Existem dois tipos de melanina na pele humana: a eumelanina, de coloração castanho enegrecido e a feomelanina, de coloração amarelo-avermelho. A coloração da pele é determinada pela quantidade, composição e localização dos grânulos de melanina, formados pelas unidades melanoepidérmicas, ou seja, junção de 1 melanócito com seus queratinócitos adjacentes. Em geral, cada melanócitos pigmenta cerca de 30 a 40 queratinóticos adjacentes.. Na pele branca, os grânulos estão localizados nas camadas mais profundas da epiderme, já na pele negra esses grânulos encontram-se em toda a epiderme, inclusive no estrato córneo (DE RIGAL *et al.*, 2010). Assim justifica-se que a pele negra tem maior proteção contra os raios ultravioleta, em relação à pele branca (KLEINPENNING *et al.*, 2010). A quantidade de melanócitos é semelhante entre todos os tipos de pele, entretanto o que difere é a atividade do melanócitos. Em peles escuras estão presentes melanócitos maiores e mais ativos, que produzem mais melanossomas, com maior distribuição de melanina nos queratinócitos. Enquanto em peles claras, estão presentes melanócitos menores e menos ativos, logo existe uma distribuição menor da melanina nos queratinócitos (VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013).

4.1.7. Células de Merkel

As células de Merkel correspondem a 3% das células epidérmicas. São células geralmente encontradas na camada basal de peles da região palmar e plantar. Essas auxiliam no tato, pressão e estiramento, destaca sua associação com o tato devido a sua associação com nervos cutâneos. As células de Merkel não são facilmente identificadas, podendo ser confundidas com os melanócitos ou células de Langerhans (KEDE, MARIA PAULINA VILLAREJO; SABATOVICH, 2004).

4.1.8. Células de Langerhans

As células de Langerhans representam de 2% a 8% da barreira física contra patógenos e estão ligadas a resposta imunológica cutânea, quando ocorre uma reação alérgica, por exemplo. São células dendríticas, situadas na porção superior da epiderme, mais precisamente entre os queratinócitos da camada espinhosa (KEDE, MARIA PAULINA VILLAREJO; SABATOVICH, 2004).

4.1.9. Junção dermoepidérmica

A junção dermoepidérmica está localizada na fronteira entre a camada germinativa e a derme e possui aproximadamente 200 nm de diâmetro. É composta de uma rede intrincada de macromoléculas, com destaque para laminina e colágeno do tipo IV, que se ligam os filamentos intermediários de queratina dos queratinócitos basais com as fibras de colágeno da derme superficial dando origem às cristas epidérmicas e papilas dérmicas. 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 contem 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 dermoepidérmica concede a mesma as funções de aderência entre as camadas epiderme-derme e ainda suporte mecânico para a epiderme (BRIGGAMAN; WHEELER, 1975; TORTORA, 2016).

4.1.10. Derme

Como função estrutural que tem, a derme é o tecido que suporta a epiderme. Em cada local do corpo ela apresenta uma espessura diferente, chegando a ser até

quarenta vezes mais espessa que a epiderme. Tecido conjuntivo constituído por proteínas como colágeno, elastina e reticulina, a derme (Figura 12) abriga ainda os chamados anexos cutâneos (folículos pilossebáceos, glândulas sudoríparas e sebáceas) terminações nervosas e vasos sanguíneos e linfáticos que lhes conferem uma superfície irregular. Os fibroblastos são as células de destaque desta camada, responsáveis pela produção de elementos fibrilares como colágeno e elastina, assim como componentes não fibrilares compondo a substância fundamental amorfa ou matriz extracelular (MEC) como as glicoproteínas, proteoglicanos e ácido hialurônico. Esta camada encontra-se dividida em duas regiões: a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar, localizada próxima à epiderme, é a porção mais fina composta por fibras elásticas que se organizam perpendicularmente a superfície, representando aproximadamente dez por cento da espessura da derme e apresenta colágeno do tipo III e elastina, dispersas e orientadas perpendicularmente em direção à superfície, além disso, possui abundante quatidade de vasos sanguíneos, de pequeno diâmetro, responsáveis pela oxigenação e nutrição. Já a derme reticular é um tecido denso de colágeno tipo I e fibras elásticas organizadas paralelamente a superfície. Esse tecido apresenta então um volume maior na derme, conferindo força e elasticidade da pele (HENDRIKS, 2005).

As fibras que constituem a derme são as colágenas e as elásticas. As fibras de colágeno se encontram em maior quantidade formando uma rede emaranhada, conferindo rigidez à derme. Em menor quantidade encontram-se as fibras de elastina, com mais flexibilidade que o colágeno elas são responsáveis pelas propriedades retráteis da pele (HENDRIKS, 2005).

4.1.12. Hipoderme

A hipoderme é formada pelo tecido adiposo e também podem variar em espessura, como as demais camadas da pele, conforme a localização do corpo humano. Esta camada está localizada logo abaixo da derme e é constituída de lobos gordurosos e algumas fibras colágenas que se conectam a músculos e aos ossos. As principais células da hipoderme são denominadas adipócitos e estão localizadas dentro dos lobos gordurosos. Essas células são arredondadas, podendo chegar a um diâmetro de aproximadamente 150 μm. Quando ocorre um intenso acúmulo, localizado, de lipídeos em conjunto com a retenção de água nesta camada, formam-se as chamadas celulites. Esta camada desempenha função importante de reserva

energética, armazenada através de triglicerídeos no citoplasma dos adipócitos; atua como isolamento térmico, e atua na defesa mecânica além de sua função endócrina, fundamental na regulação da glicose, colesterol e metabolismo de hormônios sexuais (KALININ; MAREKOV; STEINERT, 2001).

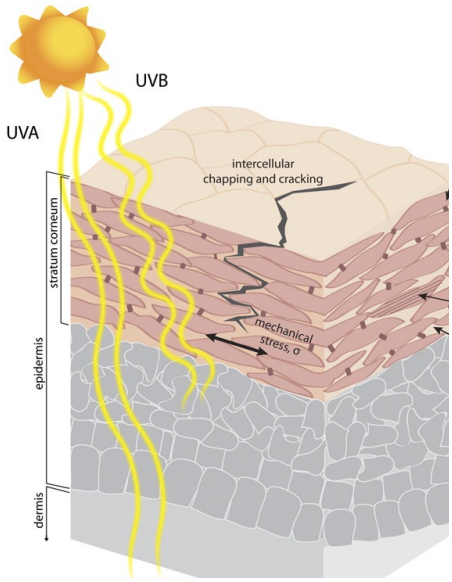
No próximo tópico, será abordada uma breve revisão sobre os efeitos da luz solar na pele e sobre algumas patologias que possuem relação com estes mecanismos.

4.2. EFEITOS DA LUZ SOLAR NA PELE HUMANA

A radiação solar UV desempenha um papel duplo na vida humana: é fundamental para a produção de vitamina D, ao mesmo tempo que é um carcinógeno potente e responsável por grande parte do câncer de pele e outras alterações na população humana (BINIEK; LEVI; DAUSKARDT, 2012).

A radiação Ultravioleta (UV) é dividida em três tipos principais com base no comprimento de onda: a radiação UVC (200–280 nm) é predominantemente filtrada pela camada de ozônio na estratosfera, a radiação UVB (280–320 nm) é absorvida principalmente pela epiderme e UVA (320-400 nm) penetra mais profundamente na derme, mas interage com o estrato córneo e também com a epiderme (BINIEK; LEVI; DAUSKARDT, 2012; ZASTROW *et al.*, 2009). A figura 3 demonstra um esquema da estrutura da pele e a penetração de diferentes comprimentos de onda UV.

Figura 3 - Esquema da estrutura da pele humana e penetração de diferentes comprimentos de onda de UV



Fonte: Adaptado de Biniek et al (2012)

A absorção da luz visível ou radiação ultravioleta (UV) pelos cromóforos na pele é o principal fator responsável por exercer os efeitos biológicos da luz na pele. Cromóforos endógenos podem ser as moléculas alvo desse processo (LIEBEL *et al.*, 2012). Eles podem causar danos diretos ou induzir danos indiretos às moléculas adjacentes. A interação da luz UV com cromóforos pode levar a uma infinidade de efeitos tais como a indução de estresse oxidativo, ativação de fatores de transcrição, danos à membrana celular e danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA), iniciando a imunossupressão da pele (NAKASHIMA; OHTA; WOLF, 2017).

A UVB é responsável por 80% dos efeitos cancerígenos da luz solar, enquanto a UVA contribui apenas com os 20% restantes (ZASTROW *et al.*, 2009). No caso do UVB, as moléculas absorventes de luz mais importantes são as de DNA, o ácido urocânico e a melanina. O dano direto causado pela absorção de UVB não é o único mecanismo para induzir modificações no DNA celular. Um segundo mecanismo indireto para induzir danos ao DNA envolve as espécies reativas de oxigênio, resultante da fotoexcitação de fotossensibilizadores após irradiação com UVA ou luz visível (YAAR; GILCHREST, 2007).

A radiação ultravioleta é capaz de induzir fotoprodutos mutagênicos ou lesões no DNA e acredita-se que desempenhe um papel importante no início do câncer de pele. A melanina, a espessura epidérmica e o estrato córneo atuam como filtros, absorvendo e espalhando UVB, UVA, bem como a radiação visível (YAAR; GILCHREST, 2007).

Além da fotocarcinogênese, a exposição crônica repetida à radiação UV leva ao fotoenvelhecimento. A pele fotoenvelhecida é caracterizada clinicamente por rugas finas e grossas, aspereza, ressecamento, flacidez, teleangiectasia, perda de resistência à tração e alterações pigmentares. Vários processos estão envolvidos na patogênese do fotoenvelhecimento. A característica mais proeminente do fotoenvelhecimento é a elastose (ARJMANDI *et al.*, 2018; VELARDE *et al.*, 2012).

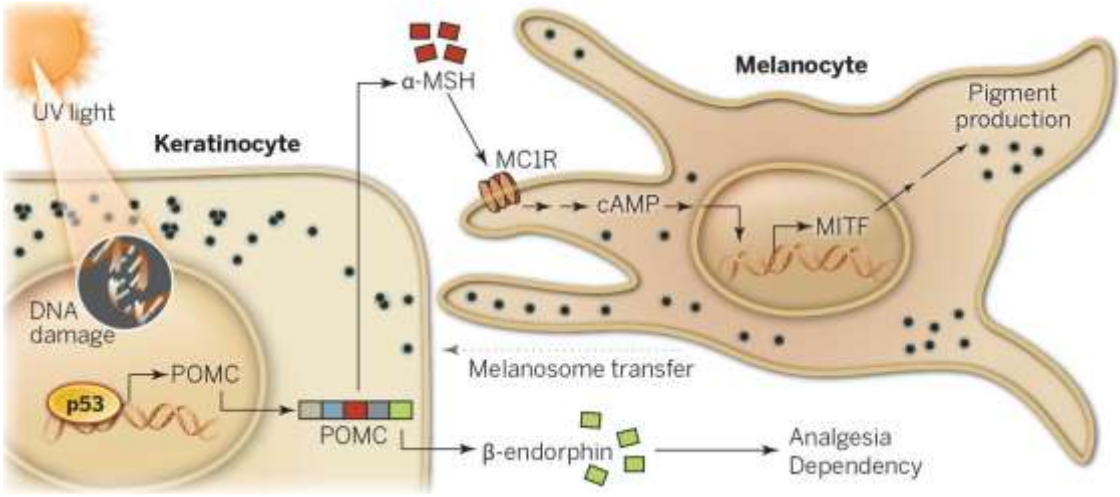
4.2.1. O papel da radiação UV na melanogênese.

O processo de pigmentação da pele, conhecido como melanogênese, depende da síntese da melanina pelos melanócitos da epiderme, da transferência deste pigmento para os queratinócitos presentes na epiderme e da secreção de fatores pró-melanogênicos por fibroblastos que estão na derme.

Quando a pele é exposta à irradiação UV, o gene da proteína p53 no núcleo dos queratinócitos é ativado em resposta ao dano do DNA. Esta ativação de p53 leva à clivagem da proopiomelanocortina (POMC), um precursor hormonal, que origina vários produtos como a β-endorfina e o *α*-hormônio estimulante de melanócitos (α-MSH). O α-MSH quando se liga aos receptores de melanocortina 1 (MCR1) em melanócitos adjacentes, ativa via adenosina monofosfato cíclico (cAMP), o principal fator de transcrição da melanogênese, o fator de transcrição associado à microftalmia MITF ativa a transcrição da enzima tirosinase (TYR), responsável pela hidroxilação de *L*-tirosina a *L*-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que, além de ser precursor na biossíntese das melaninas, é também encaminhado para a via das catecolaminas, atuando separadamente nestas vias. A oxidação de L-DOPA para dopaquinona (DQ) é o próximo passo da rota e também é catalisada pela TYR, sendo que a presença de cisteína ou glutationa a partir daqui direcionará este subproduto para a formação de eumelanina (pigmento preto/marrom) ou feomelanina (pigmento vermelho/ amarelo) (LO; FISHER; HOSPITAL, 2016; VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013). O processo de formação da melanina é detalhado na Figura 4**.** O aumento da síntese da eumelanina

protege o tecido do estresse oxidativo e da radiação UV e aumenta a ativdade de reparação do DNA. Enquanto a feomelanina, é menos ativa em proteger a pele contra os raios UV além de ser fotossensibilizante, o que culmina no aumento de espécies reativas de oxigênio que podem lesionar o DNA (SCHIAFFINO, 2010).

Figura 4 - Fisiologia da indução da melanogênese



Fonte: Adaptado de Lo & Fisher (2016)

Atualmente diversas pesquisas têm sido conduzidas para melhor compreender todos os fatores envolvidos na melanogênese (SERRE; BUSUTTIL; BOTTO, 2018). O estudo recente de Regazzetti et al. (2017) demonstrou que a luz azul está envolvida na hiperpigmentação na pele humana. Os autores usaram luz azul-violeta com comprimento de onda de 415 nm e observaram uma cascata de reações que levaram à ativação de MITF, que por sua vez controla o aumento de tirosinase e consequentemente a melanogênese (REGAZZETTI *et al.*, 2018; SERRE; BUSUTTIL; BOTTO, 2018).

Nos últimos anos, a fototerapia com luz visível vem ganhando interesse na prática dermatológica. No entanto, os efeitos da luz visível na pele são apenas parcialmente conhecidos (KLEINPENNING *et al.*, 2010).

Teoricamente, a luz azul poderia induzir efeitos biológicos comparáveis à radiação UVA, porque os comprimentos de onda da luz azul estão intimamente relacionados ao espectro UVA. Está estabelecido que o UVA tem efeitos sobre o fotoenvelhecimento e está associado a efeitos colaterais cancerígenos a longo prazo.

Alguns estudos têm mostrado que a irradiação próxima aos UVA resulta em efeitos semelhantes aos da luz azul (KLEINPENNING *et al.*, 2010; REGAZZETTI *et al.*, 2018).

4.3. ALTERAÇÕES DE PELE RELACIONADAS À EXPOSIÇÃO DE LUZ SOLAR

4.3.1. Envelhecimento cutâneo

As mudanças histológicas e bioquímicas causadas pelo envelhecimento cutâneo são resultados de fatores endógenos (alterações genéticas, hormonais ou metabólicas) e fatores exógenos (agressões de produtos químicos, poluição ou radiação ultravioleta). Assim, os fatores endógenos estão relacionados ao envelhecimento intrínseco ou envelhecimento natural. As modificações cutâneas ocorrem progressivamente e são mais moderadas, acometendo a morfologia do tecido que está protegido da radiação solar. Já os fatores exógenos estão relacionados ao envelhecimento extrínsecos (ou actínico). As alterações, neste caso, são mais intensas e tem como alvo as áreas que estão desprotegidas ou expostas à radiação solar com mais frequência. Sendo assim, os acúmulos dessas alterações tanto intrínsecas quanto extrínsecas atuam sinergicamente afetando as estruturas celulares do tecido cutâneo e resultando em alguns efeitos visuais como as rugas, por exemplo (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

4.3.2. Melasma

Melasma é uma hipermelanose comum, adquirida, simétrica, caracterizada por máculas acastanhadas, mais ou menos escuras, de contornos irregulares, e limites nítidos, nas áreas fotoexpostas, especialmente, face, fronte, temporas e, mais raramente, no nariz, pálpebras, mento e membros superiores.(MIOT *et al.*, 2009) Trata-se de uma patologia cutânea facilmente diagnosticada ao exame clínico, porém, apresenta uma cronicidade característica, com recidivas frequentes, grande refratariedade aos tratamentos existentes e ainda muitos aspectos fisiopatológicos desconhecidos (OGBECHIE-GODEC; ELBULUK, 2017).

Diversas etiologias distintas parecem estar envolvidas no desenvolvimento do melasma, entretando nenhum pode ser categorizado como fator de desenvolvimento individual. Dentre estes: influências genéticas, exposição à radiação UV, gravidez, terapias hormonais, cosméticos, drogas fototóxicas, endocrinopatias, fatores

emocionais, medicações anticonvulsivantes e outros com valor histórico (MIOT *et al.*, 2009; OGBECHIE-GODEC; ELBULUK, 2017). Porém, parece que predisposição genética e exposição às radiações solares desempenham um papel importante, tendo em vista que as lesões de melasma são mais evidentes, durante ou logo após períodos de exposição solar (MIOT *et al.*, 2009; OGBECHIE-GODEC; ELBULUK, 2017). O ponto chave para determinar o dano real à pele é a dose acumulativa de luz natural e artificial durante o dia, além da crescente exposição noturna à luz artificial emitida pelas telas dos dispositivos eletrônicos. Portanto, mais estudos levando em consideração mais parâmetros além dos comprimentos de onda, como doses totais recebidas, irradiância e tempos de exposição crônica, são necessários para avaliar o real dano acumulativo à pele (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

4.3.3. Nevos melanocíticos

Os nevos melanocíticos são proliferações benignas de células melanocíticas (também conhecidas como células nevo) organizadas em ninhos na epiderme, derme ou em outro tecido (VIANA; GONTIJO; BITTENCOURT, 2018). Os nevos podem representar tanto lesões precursoras quanto marcadoras para o desenvolvimento de melanomas (CARTAXO, 2008). O uso generalizado de diodos emissores de luz (LEDs) e o uso cada vez maior de *smartphones*, *tablets*, *laptops* e computadores de mesa levaram a um aumento significativo na exposição da pele à luz visível de curto comprimento de onda. Estudos recentes mostram que a exposição de células da pele humana à luz emitida por dispositivos eletrônicos, mesmo para exposições de apenas 1 hora, pode causar geração de ERO, apoptose e necrose (ARJMANDI *et al.*, 2018; CARTAXO, 2008; GODLEY *et al.*, 2005; NAKASHIMA; OHTA; WOLF, 2017).

4.3.4. Melanomas

Pouco se sabe sobre os efeitos da luz visível nas células de mamíferos. Recentemente, descobrimos que a luz azul não apenas suprimiu o crescimento das células de melanoma B16 de uma maneira dependente do tempo, mas também inibiu a metástase das células de melanoma B16 para o pulmão. Essas descobertas sugerem que a exposição à luz azul modifica as funções das células de melanoma B16. a luz azul suprime a formação de melanina após a exposição repetida aos UVB.

Investigações adicionais com várias luzes, como a luz azul, podem levar a uma nova abordagem para o cuidado da pele afetada por ultravioleta, como a hiperpigmentação (OHARA *et al.*, 2004).

4.4. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA PELE

4.4.1 Espectroscopia Raman

A técnica de espectroscopia Raman in vivo permite identificar e caracterizar, em tempo real, as alterações bioquímicas de tecidos vivos. Além de alta sensibilidade e especificidade, não é invasiva e pode ser utilizada no estudo dos principais constituintes da pele, como lipídeos, proteínas e água. O efeito Raman constitui-se no espalhamento da luz após interação com o material, alterando suas vibrações moleculares. O espectro vibracional fornece a impressão digital da amostra, ou seja, reflete seus grupos funcionais (CARTAXO, 2008).

O efeito Raman é descrito sendo a análise das frequências de oscilação das moléculas contidas em uma determinada amostra (DOS SANTOS *et al.*, 2017). Essa oscilação (vibração) está intimamente relacionada com a característica da geometria e as ligações químicas das moléculas (DAS, R. S., AGRAWAL, 2011). Sendo assim, a luz laser (radiação monocromática) incide sobre uma molécula e a espectroscopia Raman mede o espalhamento inelástico do laser, caracterizado pela conservação de energia. Existem três tipos de espalhamentos:

- Espalhamento Rayleigh: quando o fóton da radiação incide sobre a amostra, sofre interação com a mesma, mas não há troca de energia (fóton incidente tem a mesma energia que o fóton espalhado).
- Espalhamento Stokes: quando o fóton que incide sobre a amostra perde energia (absorção) ao interagir com as moléculas ali contidas, retornando um espectro com menor frequência.
- Espalhamento anti-Stokes: fóton incidente interage com as moléculas da amostra (que estavam previamente em estado de maior energia), ganhando energia.

Portanto, cada molécula que compõe a amostra biológica a ser analisada, dá origem a um espectro diferente, dependente do seu modo vibracional (LOPES, Monica Bergamo *et al.*, 2016).

A espectroscopia Raman Confocal tem grande aplicabilidade no campo da medicina. A fonte de luz é emitida pelo laser e focada diretamente na amostra por uma objetiva de microscópio. O sinal Raman é retroespalhado e reorientado para uma abertura, que funcionará como um filtro. Esse sinal filtrado é direcionado para o espectrômetro onde é medido em um detector CCD (dispositivo acoplado) que produzirá o espectro.(DOS SANTOS *et al.*, 2017)

Essa tecnologia traz informações da composição química da pele em diferentes profundidades, com imagens tridimensionais, sendo as identificações moleculares rápidas e com uma elevada resolução espacial. Assim, a espectroscopia Raman Confocal é hoje um método não invasivo que permite a obtenção de informações detalhadas da pele humana, in vivo, sem desconforto físico (como dissecação) para os voluntários em estudo e em tempo real (TEIXEIRA, 2013).

A espectroscopia Raman Confocal tem grande aplicabilidade na pesquisa de pele humana. A análise dos constituintes bioquímicos bioquímicos da pele tem sido utilizado no campo da dermatologia e cosmética tem ajudado na busca de novas formulações farmacêuticas, contribuindo com a prevenção e manutenção da saúde da pele, bem como para caracterizar alterações decorrentes da exposição a fatores exógenos, como por exemplo, diferentes espectros de luz (DAS, R. S., AGRAWAL, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2016).

4.4.1.2. Aplicações

A espectroscopia vibracional tem avançado muito na sua tecnologia. Esse desenvolvimento emerge de diferentes campos da ciência (campos como defesa militar e agricultura), sendo de uso multidisciplinar e com interesse em solucionar da melhora maneira os problemas biomédicos. É uma metodologia revolucionária que permite a aquisição de grande volume de dados e com ágil processo de interpretação e análise. Na medicina, esta ferramenta tem uma excepcional participação nos cuidados da saúde, envolvendo os seguimentos diversos como análises químicas, patológicas e imagens médicas (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Na cosmetologia o método Raman se destaca na análise da composição química da pele, trazendo informações qualitativas e quantitativas dos seus constituintes. São possíveis estudos da concentração hídrica das camadas superficiais da pele (que tem como ponto principal a análise da função de barreira da

pele), análise de transporte de ativos transepidermais administrados topicamente (podendo monitorar o tempo-dependente para as modificações bioquímicas ou profundidade em que o ativo atinge para obter seu efeito terapêutico), estudos das concentrações dos constituintes bioquímicos em diferentes locais do corpo, antes e/ou após o uso de uma formulação farmacêutica, diagnóstico de patologias cutâneas (pela análise das concentrações ou alterações bioquímicas) (DOS SANTOS *et al.*, 2017; LOPES, 2016). Outrossim, diversos estudos têm se utilizado da espectroscopia Raman para avaliar o efeito bioquímico na pele frente a exposição a diferentes agentes externos, como por exemplo, a luz UV, radiação infravermelho e outros (ASHTIKAR *et al.*, 2013; DARVIN *et al.*, 2010, 2011; DAS, R. S., AGRAWAL, 2011).

4.5. HIPÓTESE DO ESTUDO

A hipótese do presente estudo é de que a exposição a luz azul correspondente a luz da radiação solar direta promove alterações bioquímicas nas pele humana e a espectroscopia Raman é capaz de identifica-las.

5 MATERIAIS E MÉTODO

5.1. ASPECTOS ÉTICOS

O procedimento experimental foi submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Brasil sob o número de protocolo 88542518.0.0000.5494. Todos os sujeitos da pesquisa concordaram e assinaram o consentimento pós-informado.

5.2. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo monocêntrico, retrospectivo, baseado na análise de um banco de dados com coleta prospectiva realizado de acordo com o procedimento operacional da DermoProbes, estabelecido para a realização de um projeto teste. Os dados considerados para este estudo foram apenas aqueles referentes à pele virgem, sem a aplicação de qualquer produto, deste modo os objetivos propostos de avaliar apenas o efeito da luz azul nas características gerais da pele poderão ser contemplados.

5.3. LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, filiado a DermoProbes, que possui infraestrutura adequada para recepção adequada dos participantes do estudo, bem como para coleta e análise dos dados de interesse. A Figura 5 apresenta infraestrutura do laboratório onde a pesquisa foi realizada.

Figura 5 - Infraestrutura do Laboratório onde os Experimentos Foram Conduzidos

Fonte: Acervo Próprio

5.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os participantes de pesquisa foram selecionados por uma empresa especializada no recrutamento e conferência da aptidão dos mesmo para participação do estudo.

Critérios de inclusão:

- Participantes de pesquisa do sexo feminino ou masculino;
- Participantes de pesquisa com idade entre 19 a 55 anos;
- Pele íntegra na região a ser testada;
- Concordância em obedecer aos procedimentos do ensaio e comparecer ao centro de pesquisa nos dias e horários determinados para as avaliações;
- Assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de exclusão

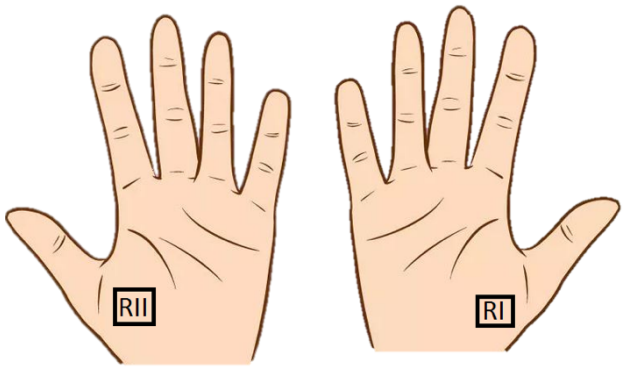
- Gestação/ lactação ou intenção de engravidar no período do estudo;
- Uso dos seguintes medicamentos de uso tópico ou sistêmico: imunossupressores, anti-histamínicos, anti-inflamatórios não hormonais, e corticoides até 30 dias antes da seleção ou considerando-se imunossupressores, o intervalo deverá ser de 3 meses antes da seleção;
- Antecedentes atópicos ou alérgicos a produtos cosméticos;
- Afecções e/ou lesões cutâneas ativas (local e/ou disseminadas) na área de avaliação;
- Marcas na área experimental que interfiram na avaliação de possíveis reações na pele;
- Patologias que causam supressão da imunidade, tais como diabetes, HIV, etc.;
- Patologias endócrinas tais como tireoidopatias, distúrbios ovarianos ou de glândula adrenal;
- Participantes de pesquisa portadores de imunodeficiência congênita ou adquirida conhecidas;
- Histórico clínico relevante ou atual evidência de abuso de álcool ou outras drogas;
- Histórico conhecido ou intolerância suspeita a produtos da mesma categoria;

- Tratamento estético ou dermatológico na área de avaliação até 02 semanas antes da seleção;
- Outras condições consideradas pelo médico avaliador como razoáveis para desqualificação da participação do estudo. Se sim, deverá ser descrito em observação na ficha clínica.

5.5. PROCEDIMENTOS

As regiões da pele de interesse foram previamente definidas como a região distal inferior da pele sob a primeira falange das mãos, conforme apresentado na Figura 6**.** A escolha dessa região advém do pressuposto na literatura de se tratar de uma área rica em betacaroteno (RINNERTHALER *et al.*, 2015), o que permitiu ao estudo compreender o comportamento dessa substância frente à exposição a luz azul.

Figura 6 - Delimitação da região de interesse



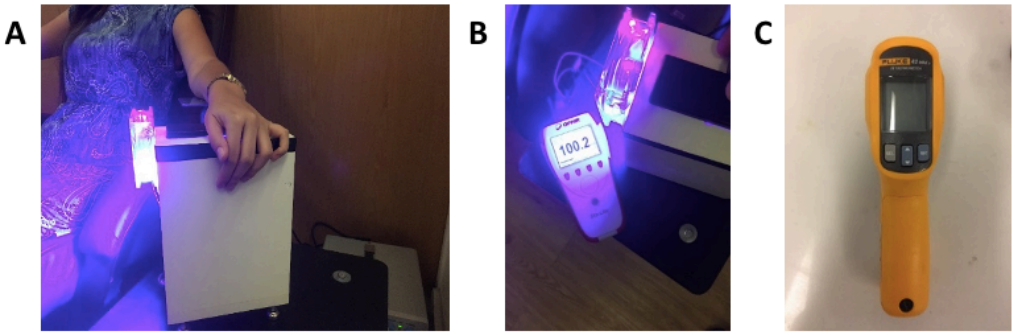
Fonte: Acervo Próprio

5.5.1. Irradiação da Luz Azul

Após a delimitação exata e marcação da pele na região de interesse de forma padronizada em todos os sujeitos, essas regiões das mãos direitas e esquerdas foram expostas à irradiação de luz azul, conforme apresentado na Figura 7A**.** A distância entre a fonte do LED e a mão foi padronizada e controlada em todos os participantes, de aproximadamente 1cm. A luz utilizada foi proveniente de LEDs azuis que emitem comprimento de onda de 400 a 480nm e centrados em 450 nm, equivalente ao componente da luz solar direta (KLEINPENNING *et al.*, 2010). A região de interesse das mãos dos sujeitos foi exposta ao LED por 15, 30 e 45 minutos, o que corresponde a uma dose média de luz de 100 J/cm^2, 200 J/cm^2 e 300 J/cm^2, respectivamente. A

potência do LED foi de 100mW. Antes, durante e após o procedimento, a temperatura da superfície de pele foi medida utilizando-se um termômetro sem contato (Fluke 62 Max+, Figura 7B) para evitar o aquecimento local e a interfência do calor nas medições. A intensidade da luz foi rigorosamente controlada a partir de um medidor de dose de radiação LED azul (OPHIR Starling -EUA, Figura 7C).

Figura 7 - Instrumentos Utilizados Durante o Procedimento



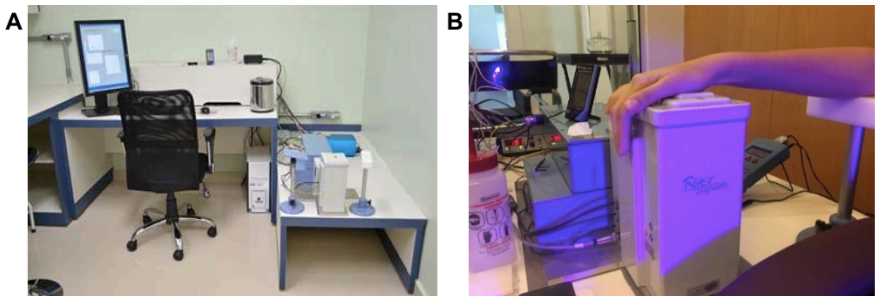
Fonte: Acervo Próprio

5.5.2. Obtenção dos Espectros da Pele

A coleta dos espectros da pele foi obtida em quatro tempos distintos. No T0 antes da irradiação com luz azul descrita no item anterior, e no T1, T2 e T3 imediatamente após a irradiação com luz azul, após 15, 30 e 45 minutos de irradiação.

Para análise bioquímica da pele foi utilizado o espectrômetro Raman Confocal *in vivo*, da River Diagnostics, modelo 3520, específico para análises de pele humana, apresentado na figura 8A. Neste aparelho, foi utilizado um laser de excitação de 785 nm com uma potência de 21 nW. A faixa espectral foi entre 400-1800 cm^{-1}. A palma da mão do participante da pesquisa foi posicionada no foco de uma lente objetiva de microscópio sob uma janela de quartzo, conforme apresentado na Figura 8B.

Figura 8 - (A) Sala de realização das medidas e equipamento acoplado ao software onde são obtidas os espectros Raman. (B) Medição da expectroscopia na mão de um dos participantes do estudo.



Fonte: Acervo Próprio

A medição da pele dos participantes foi realizada de 0 a 60 µm, a partir de 2 procedimentos de coleta:

1) De 0 a 20 µm de profundidade, que corresponde ao estrato córneo da epiderme. Nesta etapa as medições foram a cada 2 µm;

2) De 20 a 60 µm de profundidade, que corresponde as demais camadas da epiderme, descritas no presente estudo como – epiderme viável. Nesta etapa as medições foram a cada 5 µm.

As medidas foram separadas dessa forma pois a espectroscopia Raman é capaz de caracterizar bem a diferenciação dessas duas camadas (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Para a análise dos espectros Raman, os dados espectrais foram comparados com a pele antes e após a irradiação. Os softwares Minitab, Skintools® e Origin 8.5 Pro foram usados para processar os dados.

Para identificar as assinaturas espectrais que evidenciam as alterações entre a pele virgem e as peles irradiadas com 100 J/cm^2, 200 J/cm^2 e 300 J/cm^2, foi realizado o método estatístico de Análise de Componentes Principais. Este método revela os modos de vibração em que as principais diferenças acontecem. Os modos de vibração das assinaturas na região do estrato córneo e epiderme são apresentados separadamente para a incidência de LED em 100 J/cm^2, 200 J/cm^2 e 300 J/cm^2, baseados nas análises dos picos e vales que analisados como assinaturas das diferenças entre o grupo virgem e irradiado.

6 RESULTADOS

6.1. PERFIL DA AMOSTRA

A amostra consistiu de 10 participantes de pesquisa sendo 50% masculinos e 50% femininos. Quanto ao fototipo da pele, 50% foram classificados como fototipo II e 50% como fototipo III segundo a tabela de Fitzpatrick. A idade média dos participantes foi de 34 anos.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DO DANO À PELE HUMANA DEVIDO À INCIDÊNCIA DA LUZ AZUL.

O presente estudo identificou quais os danos causados pela incidência da luz azul.

Neste sentido, o seguinte teste foi realizado:

T0: medida da pele virgem do participante sem irradiação LED;

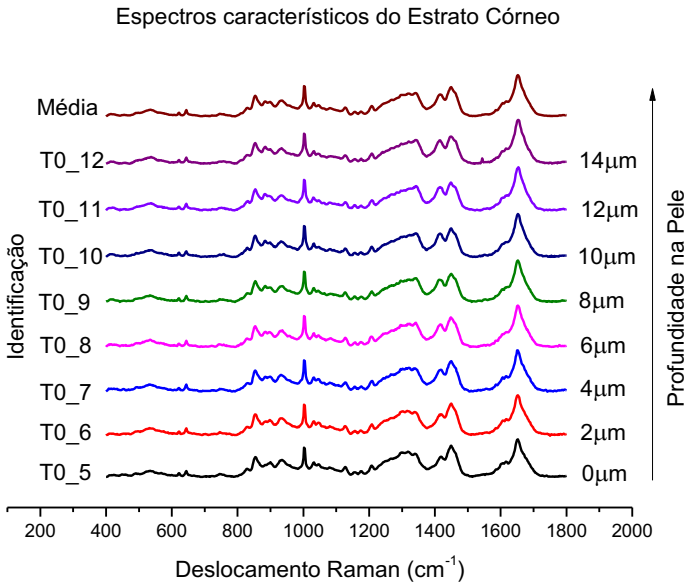
T1: medida da pele do participante após 15 minutos de irradiação do LED;

T2: medida da pele do participante após 30 minutos de irradiação do LED;

T3: medida da pele do participante após 45 minutos de irradiação do LED;

Um exemplo de espectros coletados na pele virgem (**T0**) é mostrado na Figura 9. Assim, foi caracterizada a constituição bioquímica inicial da pele antes da irradiação, em profundidade, desde a superfície até a epiderme.

Figura 9 - Espectros da pele virgem desde a superfície da pele (0 µm) até 11 µm

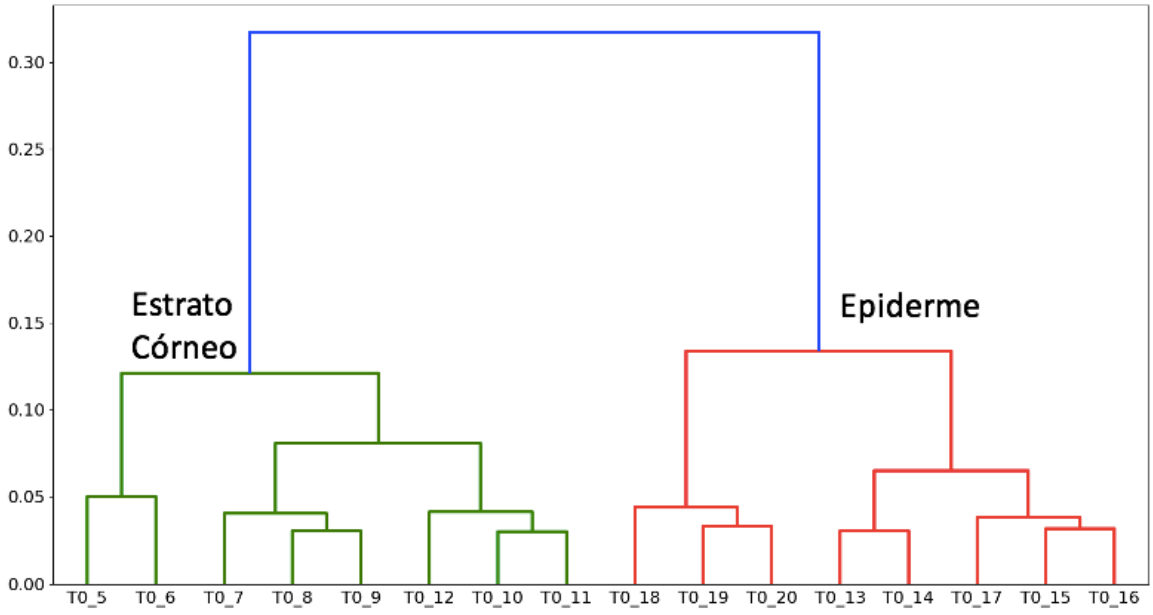


Fonte: Autoria Própria

Os espectros Raman foram coletados de 0 a 60 µm de profundidade na pele. Assim, foi possível avaliar os danos causados no estrato córneo e na epiderme viável. Os dendogramas mostrados a seguir (Figuras 10 - 13) revelam a similaridade entre os espectros coletados a cada profundidade. Para a construção deste dendograma foi realizado o método estatístico de análise de cluster (Ward com distâncias Euclidianas).

A Figura 10 apresenta um dendograma da análise de similaridade da pele virgem. Os dois braços do dendograma mostram que duas regiões da pele foram medidas. Assim, é possível distinguir quais os espectros correspondem ao estrato córneo e quais correspondem à epiderme viável. Com isso, pode-se comparar as diferenças entre um estrato córneo virgem e o com dano devido à luz azul. O mesmo é feito para epiderme.

Figura 10 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele virgem, para as diversas profundidades. O cluster com T0_5 até T0_12 caracterizam o estrato córneo e o cluster de T0_13 até T0_20 mostram a epiderme viável.

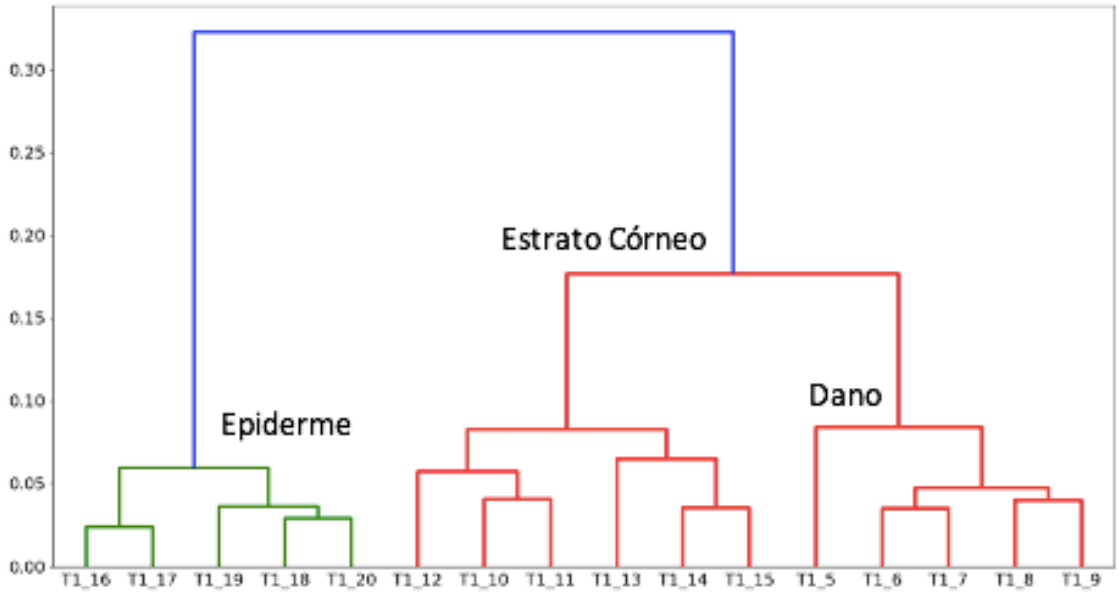


Fonte: Autoria Própria

6.2.1 Caracterização do dano após 15 minutos de irradiação do LED (100 J/cm^2)

Após a irradiação do LED azul por 15 minutos verificou-se a formação de um subgrupo no estrato córneo, como pode ser visto na Figura 11. A diferença entre os dois subgrupos é de aproximadamente 20%. Este subgrupo mostra que existe uma maior formação de danos nos 10 primeiros micrômetros.

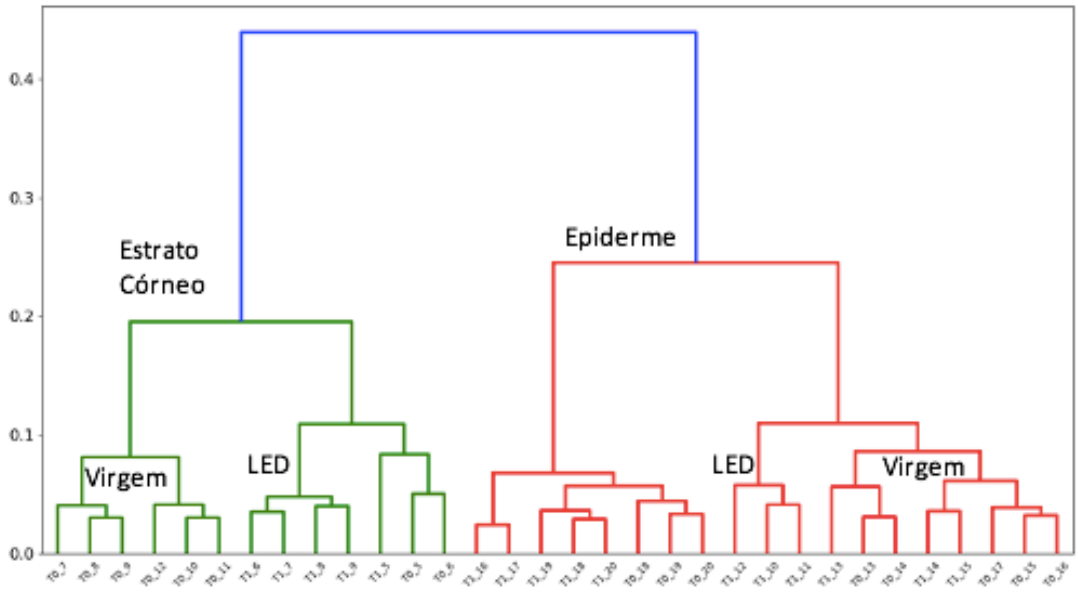
Figura 11 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele após 15 minutos de irradiação com LED azul, para as diversas profundidades



Fonte: Autoria Própria

O dendograma da Figura 12 mostra a diferença principal entre as camadas do estrato córneo e da epiderme para T0 e T1, ou seja, compara a pele irradiada com a pele virgem e demonstra a formação de dois subgrupos em cada braço. Cada subgrupo é identificado como predominantemente de T0 ou T1. Assim, mostra-se que existe diferença de aproximadamente 20% entra o estrato córneo virgem e o irradiado com 100J/cm^2. Também verifica-se, no braço vermelho, a diferença de aproximadamente 25% entre a epiderme virgem e a epiderme irradiada.

Figura 12 - Dendograma comparativo entre o grupo virgem (T0) e o grupo irradiado com 100J/cm2 (T1) , em função da profundidade. T0_5 e T1_5 são superfícies do estrato córneo e T0_20 e T1_20 são medidas à 52 µm



Fonte: Autoria Própria

A Tabela 1 mostra todos os modos de vibração assinaturas na região do estrato córneo e epiderme para incidência de LED em 100 J/cm^2, baseados nas análises dos picos e vales que analisados como assinaturas das diferenças entre o grupo virgem e irradiado.

Tabela 1 - Assinaturas espectrais dos dados devido a 100 J/cm2

Estrato Córneo		Epiderme	
	Assinatura (cm^{-1})		Assinatura (cm^{-1})
T0xT1 100 J/cm^2	424, **534**, 636, 728, 856, 884, 908, 938 966, 1002, **1008**, 1028, 1062, 1102, 1126, 1204, 1264, 1282, 1354, 1410, 1420, 1458, 1576, 1610, 1650	T0xT1 100 J/cm^2	534, 630, 808, 854, **884, 902, 938**, 1002, 1032, 1043, 1088, 1126, 1160, 1176, 1202, 1226, **1260, 1314, 1350**, 1408, 1450, 1490, **1654**

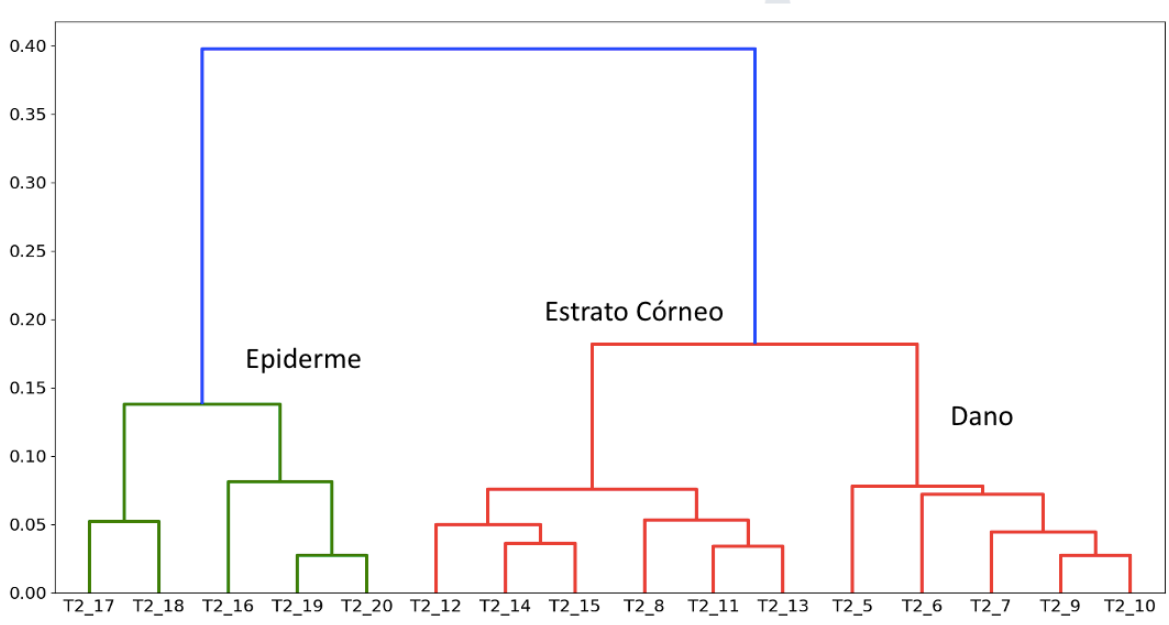
Fonte: Autoria Própria

Destacam-se na tabela, as assinaturas espectrais na banda de 534 cm^{-1} (ligações disulfeto), 856 cm^{-1} (tirosina), 1002 cm^{-1} (fenilalanina), 1008 cm^{-1} (betacaroteno) e 1650 cm^{-1} (Amida I).

6.2.2 Caracterização do dano após 30 minutos de irradiação do LED (200 J/cm^2)

Após 200J/cm^2 de incidência de LED, a formação de subgrupos se manteve e o valor das diferenças entre eles também (20%). No entanto, a diferença verificada entre o estrato córneo e a epiderme aumentou para 40%, como pode ser observado no “nó” de união entre os braços principais da Figura 13 (linha azul).

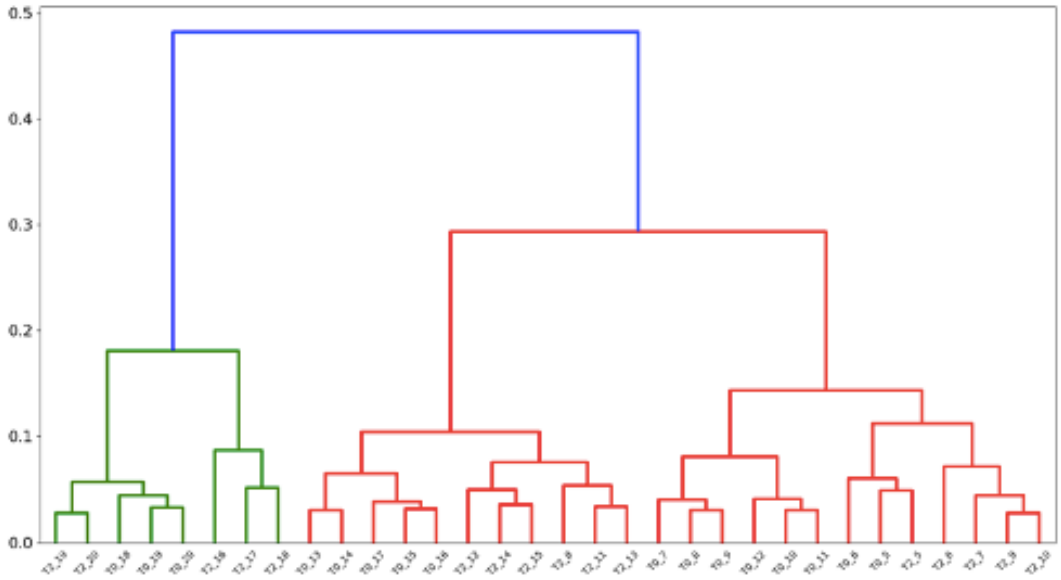
Figura 13 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele após 30 minutos de irradiação com LED azul, para as diversas profundidades.



Fonte: Autoria Própria

Quando comparada a pele virgem com irradiada, verificou-se que a divisão entre os grupos verdes e vermelhos, apresentados na Figura 14, não tem como fator de diferenciação a constituição bioquímica da camada, mas sim, a formação de dano. Assim, o efeito do dano na diferença da pele é superior à constituição bioquímica das camadas. A Figura mostra ainda, que no braço vermelho existe a presença de dano alto até aproximadamente 10 µm, dano moderado de 10 a 33 µm e dano leve, de 38 a 52 µm.

Figura 14 - Dendograma comparativo entre o grupo virgem (T0) e o grupo irradiado com 200J/cm2 (T2) , em função da profundidade. T0_5 e T2_5 são superfícies do estrato córneo e T0_20 e T2_20 são medidas à 52 µm



Fonte: Autoria Própria

A Tabela 2 mostra todos os modos de vibração assinaturas na região do estrato córneo e epiderme para incidência de LED em 200 J/cm^2

Tabela 2 - Assinaturas espectrais dos danos devido a 200 J/cm2

Estrato Córneo		Epiderme	
	Assinatura (cm^{-1})		Assinatura (cm^{-1})
T0xT2 200 J/cm^2	534, 596, 634, 776, **852, 876, 902, 944, 1000, 1008**, 1026, 1078, 1166, 1208, 1262, 1311, 1354, **1404, 1438, 1458,** 1597, 1650, 1690	T0xT2 200 J/cm^2	508, 620, 824, 880, 944, 1002, 1028, 1086, 1126, 1210, 1242, 1350, 1404, 1476, **1654**

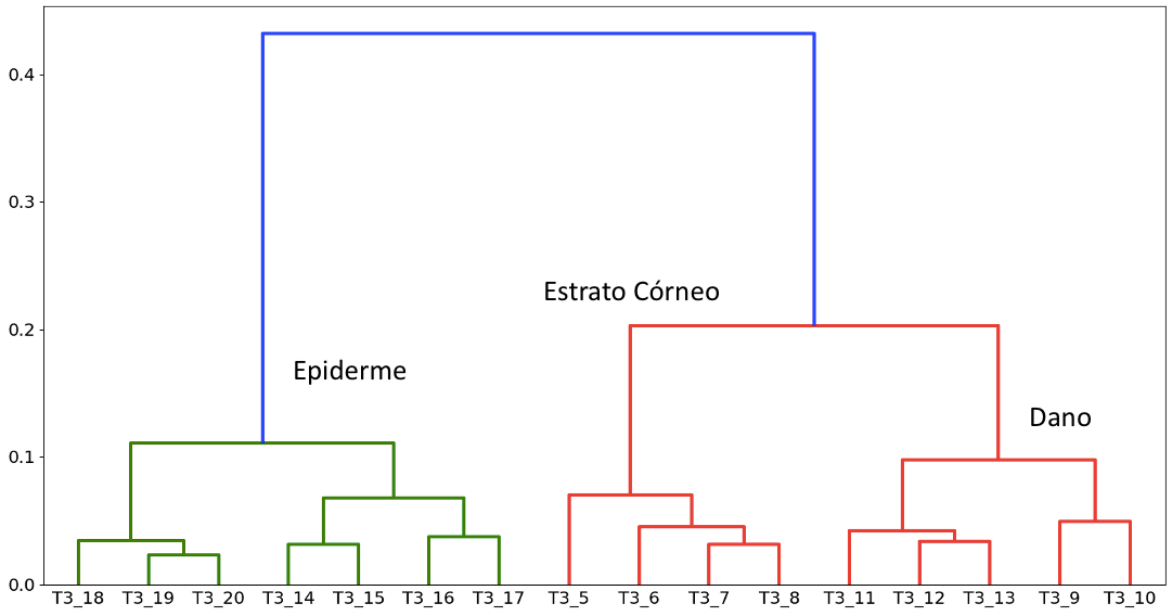
Fonte: Autoria Própria

Destacam-se na tabela para o estrato córneo as assinaturas espectrais na banda de 852 cm^{-1} (Fenilanina), 876 cm^{-1} (L – Glutamato), 902 cm^{-1} (Valina), 904 cm^{-1} (Ácido Lipoico), 1008 cm^{-1} (Betacaroteno) e as bandas entre 1400 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} que representam os lipídeos. E na epiderme viável, destaca-se as assinaturas na banda de 1654 cm^{-1} referente a amida I.

6.2.3 Caracterização do dano após 45 minutos de irradiação do LED (300 J/cm^2)

Após 300J/cm^2 de incidência da luz azul, a pele apresentou a manutenção dos dois subgrupos com 20% de diferenças. No entanto, as diferenças entre estrato córneo e epiderme aumentaram para aproximadamente 45%, como é possível observar na Figura 15.

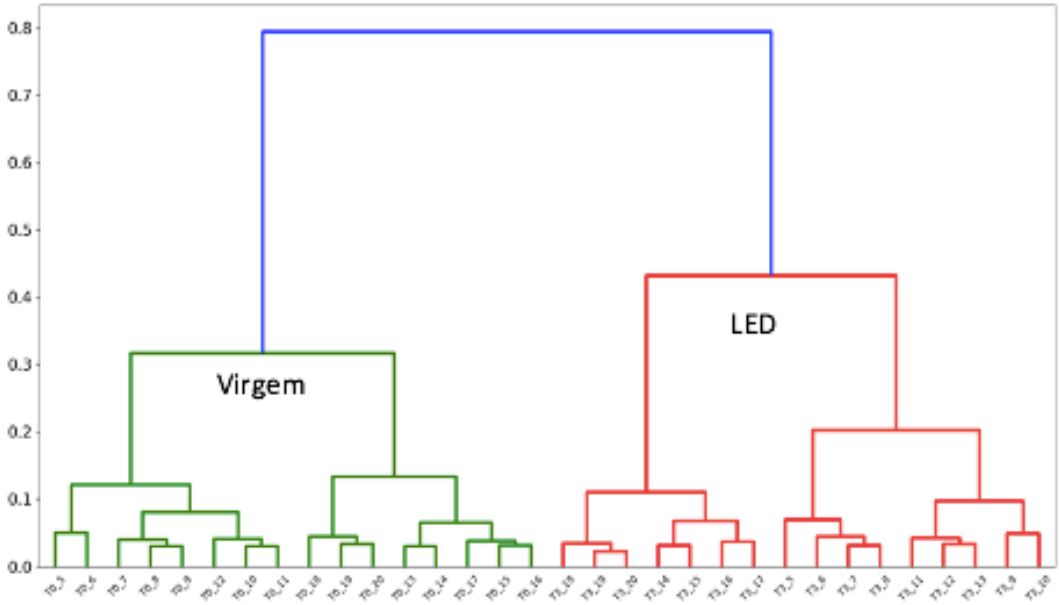
Figura 15 - Análise de similaridade entre os espectros coletados em uma pele após 45 minutos de irradiação com LED azul, para as diversas profundidades



Fonte: Autoria Própria

Quando comparada a pele virgem com a pele irradiada por 45 minutos, observa-se, na Figura 16, que a separação entre o grupo virgem e o grupo irradiado é completa: todas medidas de T0 estão no braço verde e todas as medidas de T3 estão no braço vermelho. Além disso, as diferenças entre os grupos são de aproximadamente 80%.

Figura 16 - Dendograma comparativo entre o grupo virgem (T0) e o grupo irradiado com 300J/cm2 (T3) , em função da profundidade. T0_5 e T3_5 são superfícies do estrato córneo e T0_20 e T3_20 são medidas à 50 µm



Fonte: Autoria Própria

A Tabela 3 mostra todos os modos de vibração assinaturas na região do estrato córneo e epiderme para incidência de LED em 300 J/cm^2

Tabela 3 - Assinaturas espectrais dos danos devido a 300 J/cm^2

Estrato Córneo		Epiderme	
	Assinatura (cm^{-1})		Assinatura (cm^{-1})
T0xT3 300 J/cm^2	534, 634, 850, 944, 1028, 1076, 1128, 1178, 1204, 1264, 1354, 1408, 1440, 1458, **1654**	T0xT3 300 J/cm^2	498, 624, 856, 880, 932, 1002, 1028, 1046, 1088, 1124, 1176, 1210, 1256, 1310, 1350, 1380, 1402, 1420, 1450, **1652**

Fonte: Autoria Própria

Para 300 J/cm^2, no estrato córneo, verifica-se que a maior alteração ocorre no pico da Amida I. Na epiderme destaca-se as assinaturas espectrais nas bandas **856** (ácido oleico) e **1652** cm^{-1} (Amida III).

Desta forma, verifica-se que diferentes doses atuam em diferentes grupos moleculares do estrato córneo e da derme. Quando o dano é intenso as proteínas são as mais atingidas e quando o dano é menor aciona-se o antioxidante betacaroteno e aminoácidos como tirosina e fenilalanina.

Apesar de identificarmos estes estágios de dano, uma mesma dose aplicada nos participantes de pesquisa pode resultar em danos diferentes devido à condição inicial da pele do participante. Assim, uma pele de um participante pouco saudável, com pouco betacaroteno e com processos oxidativos espúrios, quando irradiada com 100 J/cm^2 pode apresentar como primeiro efeito os danos nas proteínas e não em aminoácidos e betacaroteno.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo se destaca por apresentar os efeitos de diferentes exposições de luz azul à pele de pacientes saudáveis a partir da espectroscopia Raman. Com as análises apresentadas, foi possível identificar que a irradiação azul de 100 J/cm^2, 200 J/cm^2 e 300 J/cm^2 causam danos na pele e a Espectroscopia Raman Confocal é capaz de detectar as alterações existentes.

Esta técnica é baseada na irradiação do tecido biológico por um laser. A energia espalhada pela amostra tem informações sobre as ligações químicas, podendo determinar o aumento ou decréscimo da quantidade de um dado grupo molecular. Estes dados podem ser monitorados em tempo real, sem nenhuma degradação da amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2012; TEIXEIRA, 2013). De fato, a espectroscopia Raman tem mostrado ser uma ferramenta bastante versátil, sendo utilizada tanto no diagnóstico de doenças, quer seja *in vivo,* (RANIERO *et al.*, 2011) como também na análise de fluídos corporais.

A obtenção das características vibracionais de várias moléculas biológicas em escala celular e tissular foram obtidas instantaneamente em nosso estudo, não necessitando de um pré-processamento da amostra ou preparo do tecido, uma vantagem que também já foi destacada por outros autores (DOS SANTOS *et al.*, 2017; FÖRSTER *et al.*, 2011; LOPES, Monica Bergamo *et al.*, 2016).

Muitas técnicas são adotadas para monitorar mudanças na pele, a maioria das metodologias, que são comumente empregadas, envolvem a remoção de partes do tecido ou biópsia (LOPES, Monica Bergamo *et al.*, 2016). Neste contexto, a espectroscopia ópitca tem sido considerada uma ferramenta potencial para avaliar e diagnosticar alterações de forma não invasiva (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A luz utilizada neste estudo foi proveniente de LEDs azuis que emitem comprimento de onda de 400 a 480nm e concentrados em 450 nm. As doses médias utilizadas correspondem a um componente de luz de alta energia da radiação solar direta (GODLEY *et al.*, 2005; KLEINPENNING *et al.*, 2010; NAKASHIMA; OHTA; WOLF, 2017). As alterações moleculares encontradas aqui permitem, então, estimar o efeito do componente visível da luz solar nas estruturas da camada córnea e da epiderme da pele e comparar esses achados com alterações específicas de determinadas doenças e patologias.

Foram identificadas as assinaturas espectrais que evidenciam as alterações entre a pele virgem e a pele irradiada. Nesta comparação, tanto para o extrato córneo da pele, quanto para epiderme, foi observada assinaturas espectrais na banda da tirosina. O estudo de Oliveira *et al.* (2012) demonstrou que as bandas dos modos vibracionais centradas aproximadamente em 808, 839, 1217 e 1591 cm^{-1} são relacionadas a tirosina.

Este é um aminoácido responsável pela síntese de melanina, sua produção se concentra no aparelho de golgi dos melanócitos. O pigmento é originado a partir da polimerização do aminoácido tirosina por intermédio da ação da tirosinase, a qual passa de um aminoácido incolor para um pigmento castanho enegrecido. A tirosina, então polimerizada, deposita-se em vesículas chamadas de menalossomas, as quais se deslocam pelos prolongamentos citoplasmáticos dos melanócitos e são transferidos para os queratinócito através de secreção citócrina, ou seja, é transferida célula a célula. Os grânulos de melanina permanecem no citoplasma dos queratinócitos (JULIANA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A descrição dos efeitos da luz visível é algo relativamente recente na literatura. Liebel et al (2012) demonstrou que a irradiação de luz visível na pele humana induz a produção de espécies reativas de oxigênio, de citocinas pró inflamatórias e a expressão de metaloproteinases de matriz. Utilizando-se de modelos clínicos, avaliou a geração de radicais livres advindos do estresse oxidativo em níveis mais elevados após a exposição à luz visível. Os autores sugerem que outras partes do espectro solar além da luz ultravioleta, particularmente a luz visível, também podem contribuir para os sinais de fotoenvelhecimento prematuro e para outras alterações na pele (LIEBEL *et al.*, 2012).

O trabalho de Oliveira *et al.* (2012) estudou a composição bioqumímica da pele a partir da espectroscopia Raman e comparou os achados da pele de em pacientes com diferentes idades, os autores observaram que em pacientes de idade mais avançada houve um predomínio da tirosina. O que pode ser explicado pelo fato de essa substância ser metabolicamente sintetizada a partir da fenilalanina e contem um anel aromático ligado a um grupo hidroxila, o que a faz mais hidrofílica do que a fenilalanina. Esse aminoácido com a hidroxila participa de diversas sínteses importantes, dentre elas o pigmento da melanina, como já fora descrito nessa revisão. Os autores do trabalho e Nicoletti *et al*. Sugeriram que com o aumento da idade ocorre

maior concentração desse pigmento levando ao aparecimento de manchas indesejadas na pele senil (NICOLETTI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Como constatado pelo presente estudo, a exposição à luz azul na frequência correspondente ao componente da luz solar induz efeitos que a longo prazo podem culminar em manchas e no processo de envelhecimento precoce. Em concordância com isso, o estudo de Kleinpenning *et ai* (2009) que avaliou clínica e histologicamente a pele de indivíduos com pele normal expostos a curtos períodos à luz azul encontrou achados de hiperpigmentação clínica mínima na pele irradiada e pela histopatologia encontrou um aumento significativo das células positivas para Melan-A, molécula envolvida no processo da melatogênese (KLEINPENNING *et al.*, 2010).

Além do fotoenvelhecimento, a expressão de tirosina na pele pela exposição à luz solar também está relacionada a outros processos fisiopatológicos. Como foi descrito uma molécula sintetizada a partir dela é a melanina. Considera-se a principal função da melanina a proteção celular contra possíveis danos causados pela radiação UV, por sua capacidade de absorver fótons principalmente em relação aos raios ultravioleta B (YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007). Além disso, este pigmento pode atuar como *scavenger* de espécies reativas de oxigênio (EROS) (DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007; TADA; KOHNO; NIWANO, 2010). No entanto, estudos demostram que a melanina pode exercer um papel tanto fotoprotetor como fotossensibilizador (HILL *et al.*, 2013). A fotoproteção da melanina relaciona-se com a radiação UVB, a qual é absorvida pela epiderme. Já a fotossensibilização está relacionada com a radiação UVA e luz visível. sendo sua penetração mais profunda alcançando a camada da derme na pele (CHIARELLI-NETO *et al.*, 2011).

Durante muito tempo considerou-se que apenas a radiação UV era capaz de induzir a produção de melanina. Com os dados do presente estudo não se pode afirmar diretamente que o componente que utilizamos induziu a melanogênese, entretanto as assinaturas de tirosina induzidas pela luz solar sugerem tal processo. Regazzetti et al. (2017) demonstrou que a luz azul-violeta no comprimento de onda de 415, valores próximos aos utilizados em nosso estudo, estimularam a encefalopsina e ao aumento do cálcio intracelular, que culminou na ativação da MITF, proteína que controla o aumento de tirosinase, finalmente levando a melanogênese (REGAZZETTI *et al.*, 2018).

A melanina quando excitada pode levar a geração de espécies como o oxigênio molecular singleto ($^1O2$), podendo levar por consequência à formação de danos às

biomoléculas (HALLIDAY *et al.*, 2007). O $^{1}O2$ é caracterizado como o estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular, sendo uma das formas mais reativas e tóxicas entre as EROS.

Cunha et al. (2012) demostraram que o estímulo com L-tirosina e NH4Cl para aumentar a síntese de melanina em células foi capaz de gerar EROS, demostrando que além da interação da melanina e seus precursores com a irradiação UV, a própria melanogênese pode contribuir na geração de EROS (CUNHA *et al.*, 2012).

Estudos realizados com os dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina, e seu precursor, o ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA), mostraram que esses compostos são capazes de promover quebras no DNA, podendo até mesmo impossibilitar a ação de enzimas de reparo (SUZUKAWA, 2012). Quando submetidos à luz visível, os melanócitos também podem sofrer danos, através da fotossensibilização da melanina e geração do $^{-1}O2$, o que pode levar a fotoxidação do DNA e a morte celular (CHIARELLI-NETO *et al.*, 2011).

Todo esse processo descrito pode culminar em alterações específicas do DNA e predisporem os indivíduos à ocorrência de melanomas, que são tumores considerados os mais agressivos entre os tipos de câncer de pele e os que possuem maior letalidade e sabidamente a luz ultravioleta é um dos principais fatores ambientias relacionados ao surgimento desse tumor (MARTINS, 2011). Outros autores já demonstraram que a influência da luz UV na fisiopatogênese do melanoma é dose dependente (GAJULA; GADDAMEEDHI, 2015; HAYWOOD *et al.*, 2003; HILL *et al.*, 2013), um achado que sugere e corrobora com o que foi encontrado por esses autores é o fato de quando houve maior intensidade de irradiação de luz, no nosso caso 300 J/cm^2, as proteínas são mais atingidas, enquanto quando o dano é menor aciona-se o antioxidante betacaroteno e aminoácidos como tirosina e fenilalanina.

Os radicais livres são compostos importantes no sistema de processamento de sinais no ser humano organismo e na ação contra vírus e bactérias. Por outro lado, se o número de radicais livres exceder um limite crítico, eles destroem células e componentes celulares e causam danos à pele em diferentes formas como já descritos, por exemplo, envelhecimento prematuro da pele e até câncer de pele (BIESALSKI; OBERMUELLER-JEVIC, 2001). Um sistema de proteção foi desenvolvido pelo ser humano organismo para combater a ação destrutiva dos radicais livres. Este sistema de proteção é composto por substâncias antioxidantes que formam cadeias de proteção.

Essas estruturas antioxidantes, que também foram assinaturas espectrais encontradas pelo estudo, desempenham um mecanismo de defesa contra a quantidade excessiva de radicais livres, e se baseia na interação dessas substâncias como carotenoides (betacaroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e seus isômeros), vitaminas (A, C, D e E), enzimas (superóxido desmutase, catalase, glutationa peroxidade) e outros compostos como o ácido lipoico, selêlio e coenzima Q10. Esses antioxidantes atual como uma “cadeia de proteção”, ou seja, possuem uma ação sinérgica, portanto protegendo uns aos outros contra destruição direta durante a neutralização de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (DARVIN *et al.*, 2011; STAHL; SIES, 2012).

O estudo de Haag *et al* (2011) demonstrou a partir da espectroscopia Raman que os carotenoides podem servir como substâncias marcadoras para rede do antioxidante da pele humana, apoiando a tese de que diferentes antioxidantes protegem uns aos outros em uma rede ou cadeia de reações (HAAG *et al.*, 2011). Diversas situações são capazes de ativar essa cadeia de proteção dos antioxidantes, a literatura descreve, por exemplo, agressões físicas e exposições ambientais, sendo a principal delas a exposição a luz ultravioleta (THIELE *et al.*, 2003). Entretanto, a formação de radicais livres e consequente ativação dessa cadeia não se da apenas pela luz ultravioleta. O estudo de Darvin *et al.* (2010) demonstrou que a irradiação infravermelha (IV) pode produzir radicais livres na pele a partir de dois métodos. Neste estudo, os autores observaram a degradação dos antioxidantes carotenoides – betacaroteno e licopeno – in vivo por espectroscopia Raman, após a irradiação IV e descreveram também a observação direta dos radicais livres após irradiação da pele por espectroscopia de ressonância paramagnética (DARVIN *et al.*, 2010).

No presente estudo, foi observado dano nos picos correspondentes ao betacaroteno, demonstrando que essas estruturas foram ativadas e indiretamente sugerindo a formação de radicais livres após a irradiação de luz azul. Sabe-se que o efeito das interações com grandes quantidades de radicais é a destruição de alguns compostos da rede oxidativa e como resultado o esgotamento do sistema antioxidade de defesa do organismo, ampliando ainda mais os danos a pele (DARVIN *et al.*, 2011; HAAG *et al.*, 2011; NAKASHIMA; OHTA; WOLF, 2017). O presente estudo identificou as assinaturas do betacaroteno principalmente após a irradiação de 100 J/cm^2 e de 200 J/cm^2, entretanto não se observou na irradiação de 300 J/cm^2, o que pode sugerir um dano intenso a pele e o consumo dessas estruturas antioxidantes.

Observou-se também danos as estruturas de colágeno. Os espectros Raman característicos das moléculas de colágenos apresentam três bandas intensas em aproximadamente 1.249, 1.283 e 1.293 cm^{-1}, que estão relacionadas a amida III e uma banda em 1654 cm^{-1}, referente a amida III. Essas bandas são captadas a partir da vibração molecular dos grupos funcionais C=O, CH e NH (CASPERS, 1998).

O colágeno tem como função dar resistência estrutural aos tecidos em que se encontram. São tipo de proteínas fibrosas, compostas por diferentes aminoácidos entre eles os majoritários: glicina, prolina e hidroxiprolina (NELSON, 2011). Existem hoje aproximadamente 19 tipos moleculares de colágeno e esses são classificados conforme as suas diferentes formas agregadas (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A síntese do colágeno tende a diminuir tanto em peles cronologicamente envelhecidas quanto em peles fotoenvelhecidas (CASTRO; BARBOSA; SILVA, 2020).

Griffiths *et al.* (1993) analisaram imunohistologicamente peles exposta a radiação solar (fotoenvelhecidas) e peles protegidas do sol (envelhecimento cronológico). O estudo mostrou uma diminuição do colágeno funcional tipo I na derme papilar em peles expostas ao sol por longo prazo. Uma consequência da destruição ou do dano a essas estruturas é o envelhecimento precoce e a formação de rugas. As rugas são dobramentos da pele causados por atrofia da junção dermo-epidermica devido a diminuição do colágeno e proliferação acentuada do tecido elástico na derme. Os colágenos, responsáveis pela estabilidade mecânica e ancoragem, se encontram diminuídos. Audonneau *et al.* (1999) demonstraram por imunohistoquímica a diminuição de colágeno funcional tipo VII e IV na parte inferior das rugas em pele fotoenvelhecida. Com isso ocorre um enfraquecimento da ligação epiderme e derme formando a ruga (CONTET-AUDONNEAU; JEANMAIRE; PAULY, 1999).

8 CONCLUSÃO

Com base em nosso estudo, pode-se concluir que a espectroscopia Raman Confocal é uma ferramenta eficiente para avaliar a composição bioquímica da pele em diferentes profundidades, como a camada córnea e a epiderme, em tempo real, o que confirma o potencial que esse método tem na obtenção de dados seguros e ágeis para análise da pele humana.

O presente estudo demonstrou, a partir da análise da espectroscopia Raman, as principais alterações bioquímicas na pele após diferentes intensidades de irradiação de luz azul. A partir dos resultados descritos, foi possível constatar que o dano à bioquímica da pele aumenta conforme aumenta a exposição à luz azul, em um comprimento de onda semelhante ao componente visível da luz solar.

Os danos foram observados e descritos conforme as camadas da pele, foi possível observar o dano na camada córnea e epiderme. Outrossim, o presente estudo descreveu as assinaturas espectrais decorrente do dano gerado pela irradiação de luz azul. Uma constatação importante foi ter-se observado que quando o dano é intenso as proteínas são as mais atingidas e quando o dano é menor aciona-se o antioxidante betacaroteno e aminoácidos como tirosina e fenilalanina. Por fim, foi possível correlacionar os resultados encontrados com a fisiopatologia de alterações de pele e com o processo de melanogênese. Descreveu-se ainda a relação da exposição a luz azul com a ativação da cadeia de reações dos antioxidantes naturais, representados no estudo pelo betacaroteno.

REFERÊNCIAS

ARJMANDI, N. *et al.* Can light emitted from smartphone screens and taking selfies cause premature aging and wrinkles? **Journal of Biomedical Physics and Engineering**, v. 8, n. 4, p. 447–452, 2018. Available at: https://doi.org/10.31661/jbpe.v0i0.599

ASHTIKAR, M. *et al.* Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: First insights into the method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 5, p. 601–608, 2013. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.030

AV, R. *et al.* **Stratrum Corneum Moisturization at the Molecular Level**. [*S. l.: s. n.*], 1994.

BIESALSKI, H. K.; OBERMUELLER-JEVIC, U. C. UV Light, Beta-carotene and Human Skin—Beneficial and Potentially Harmful Effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 389, n. 1, p. 1–6, 2001. Available at: https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2313

BINIEK, K.; LEVI, K.; DAUSKARDT, R. H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 42, p. 17111–17116, 2012. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1206851109

CARTAXO, S. B. **ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE MELANOMA CUTÂNEO E NEVO PIGMENTADO**. 2008. 2008.

CASTRO, M. F. de; BARBOSA, L. R. P.; SILVA, L. L. da. Ação da terapia a laser de baixa intensidade na cicatrização de ulcerações diabéticas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e6239109109, 2020. Available at: https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9109

CHIARELLI-NETO, O. *et al.* Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1195–1202, 2011. Available at: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.013

COLONNA, M. AHR: Making the keratinocytes thick skinned. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 863–864, 2014. Available at: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.001

CONTET-AUDONNEAU, J. L.; JEANMAIRE, C.; PAULY, G. A histological study of human wrinkle structures: Comparison between sun-exposed areas of the face, with

or without wrinkles, and sun-protected areas. **British Journal of Dermatology**, v. 140, n. 6, p. 1038–1047, 1999. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02901.x

CORDEIRO, R. M. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 1 PARTB, p. 438–444, 2014. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.09.016

CUNHA, E. S. *et al.* Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 15, p. 1913–1925, 2012. Available at: https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.05.019

DARVIN, M. E. *et al.* Radical production by infrared A irradiation in human tissue. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 1, p. 40–46, 2010. Available at: https://doi.org/10.1159/000257262

DARVIN, M. E. *et al.* Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 125–129, 2011. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01191.x

DAS, R. S., AGRAWAL, Y. K. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, 2011.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941–950, 2007. Available at: https://doi.org/10.1038/nature05978

DE RIGAL, J. *et al.* The effect of age on skin color and color heterogeneity in four ethnic groups. **Skin Research and Technology**, v. 16, n. 2, p. 168–178, 2010. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2009.00416.x

DOS SANTOS, L. *et al.* In vivo confocal Raman spectroscopy and molecular dynamics analysis of penetration of retinyl acetate into stratum corneum. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 174, p. 279–285, 2017. Available at: https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.11.042

FÖRSTER, M. *et al.* Confocal raman microspectroscopy of the skin. **European Journal of Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 851–863, 2011. Available at: https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1494

GAJULA, R. P.; GADDAMEEDHI, S. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. OCT,

p. 842–848, 2015. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00276

GODLEY, B. F. *et al.* Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21061–21066, 2005. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M502194200

HAAG, S. F. *et al.* Determination of the antioxidative capacity of the skin in vivo using resonance Raman and electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 483–487, 2011. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01246.x

HALLIDAY, G. . *et al.* Fingerprint Mutations in Human Skin Cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 1, p. 3–8, 2007.

HARRIS, M. I. N. C. Pele, estrutura, propriedade e envelhecimento. **2 ed.**, v. São Paulo:, p. 201–220, 2005.

HAYWOOD, R. *et al.* Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implications for Skin Aging and Melanoma? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 4, p. 862–868, 2003. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12498.x

HILL, V. K. *et al.* The genetics of melanoma: Recent advances. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 14, n. July, p. 257–279, 2013. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153429

HUANG, S.; HEIKAL, A. A.; WEBB, W. W. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 5, p. 2811–2825, 2002. Available at: https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75621-X

HUDSON, L. *et al.* Individual and combined effects of the infrared, visible, and ultraviolet light components of solar radiation on damage biomarkers in human skin cells. **FASEB Journal**, v. 34, n. 3, p. 3874–3883, 2020. Available at: https://doi.org/10.1096/fj.201902351RR

JONES, R. R. *et al.* Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, n. 1, 2019. Available at: https://doi.org/10.1186/s11671-019-3039-2

JULIANA, L. *et al.* Ensaio radiométrico de tirosinase Enzymatic activity assay of tyrosinase. **Rev. Bras. Farm**, v. 85, n. 1, p. 5–6, 2004.

KALININ, A.; MAREKOV, L. N.; STEINERT, P. M. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 17, p. 3069–3070, 2001.

KEDE, MARIA PAULINA VILLAREJO; SABATOVICH, O. Dermatologia Estética.

Atheneu, p. 795, 2004.

KLEINPENNING, M. M. *et al.* Clinical and histological effects of blue light on normal skin. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 26, n. 1, p. 16–21, 2010. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2009.00474.x

KRAMARENKO, G. G. *et al.* Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 6, p. 1634, 2006. Available at: https://doi.org/10.1562/2006-01-12-rn-774

LIEBEL, F. *et al.* Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1901–1907, 2012. Available at: https://doi.org/10.1038/jid.2011.476

LO, J. a; FISHER, D. E.; HOSPITAL, M. G. in Therapeutics. v. 346, n. 6212, p. 945–949, 2016. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1253735.The

LOPES, Monica Bergamo *et al.* In vivo Confocal Raman Spectroscopic Analysis of the Effectes of IR Radiation in the Human Skin. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016. Available at: https://doi.org/10.1111/ijlh.12426

LOPES, Mônica Bergamo. **Efeitos Bioquímicos da radiação infraveermelha na pele humana: Espectroscopia Raman Confocal**. 2016. - Universidade do Vale do Parabíba, 2016.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. Molecular mechanisms of skin aging: State of the art. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1119, n. 1, p. 40–50, 2007. Available at: https://doi.org/10.1196/annals.1404.027

MARTINS, S. I. R. Melanoma maligno e radiação solar. 2011.

MIOT, L. D. B. *et al.* Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623–635, 2009. Available at: https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000600008

NAKASHIMA, Y.; OHTA, S.; WOLF, A. M. Blue light-induced oxidative stress in live skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 300–310, 2017. Available at: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.010

NICOLETTI, M. A. *et al.* Hipercromia s: Aspectos Gerais e Uso de Despigmentantes Cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 14, n. June, p. 46–51, 2002. Available at: http://www.tecnopress-editora.com.br/pdf/NCT_443.pdf

OGBECHIE-GODEC, O. A.; ELBULUK, N. Melasma: an Up-to-Date Comprehensive Review. **Dermatology and Therapy**, v. 7, n. 3, p. 305–318, 2017. Available at:

https://doi.org/10.1007/s13555-017-0194-1

OHARA, M. *et al.* Blue light inhibits melanin synthesis in B16 melanoma 4A5 cells and skin pigmentation induced by ultraviolet B in guinea-pigs. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 20, n. 2, p. 86–92, 2004. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2004.00077.x

OLIVEIRA, P. K. *et al.* Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v. 28, n. 3, p. 278–287, 2012. Available at: https://doi.org/10.4322/rbeb.2012.032

RANIERO, L. *et al.* In and ex vivo breast disease study by Raman spectroscopy. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 130, n. 4–6, p. 1239–1247, 2011. Available at: https://doi.org/10.1007/s00214-011-1027-4

REGAZZETTI, C. *et al.* Melanocytes Sense Blue Light and Regulate Pigmentation through Opsin-3. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 1, p. 171–178, 2018. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.833

RINNERTHALER, M. *et al.* Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 545–589, 2015. Available at: https://doi.org/10.3390/biom5020545

SCHIAFFINO, M. V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 7, p. 1094–1104, 2010. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.023

SERRE, C.; BUSUTTIL, V.; BOTTO, J. M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 4, p. 328–347, 2018. Available at: https://doi.org/10.1111/ics.12466

STAHL, W.; SIES, H. β-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 5, p. 1179–1184, 2012. Available at: https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034819

SUZUKAWA, A. A. Papel da feomelanina na formação de lesões oxidativas pelo oxigênio molecular singlete em DNA e em células de melanoma humano. **Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica)**, n. Universidade Federal do Paraná, Curitiba., p. 194, 2012.

TADA, M.; KOHNO, M.; NIWANO, Y. Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 224–228, 2010. Available at: https://doi.org/10.3164/jcbn.09-84

TEIXEIRA, A. P. Avaliação in vivo da pele humana facial, por espectroscopia Raman

confocal: ação de cosmético. **São José dos Campos**, v. 1, n. 1, p. 1–77, 2013.

THIELE, J. J. *et al.* Impact of ultraviolet radiation and ozone on the transepidermal water loss as a function of skin temperature in hairless mice. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 16, n. 5, p. 283–290, 2003. Available at: https://doi.org/10.1159/000072068

VELARDE, M. C. *et al.* Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. **Aging**, v. 4, n. 1, p. 3–12, 2012. Available at: https://doi.org/10.18632/aging.100423

VIANA, A. C. L.; GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. V. Giant congenital facial melanocytic nevus. **Oman Journal of Ophthalmology**, v. 11, n. 3, p. 265–266, 2018. Available at: https://doi.org/10.4103/ojo.OJO_216_2017

VIDEIRA, I. F. dos S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **An Bras Dermatol.**, v. 88, n. 1, p. 76–83, 2013. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-45407-3_24

WALKER, D. P.; VOLLMER-SNARR, H. R.; EBERTING, C. L. D. Ocular hazards of blue-light therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 1, p. 130–135, 2012. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.11.040

WIEGELL, S. R. *et al.* Pain during photodynamic therapy is associated with protoporphyrin IX fluorescence and fluence rate. **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 4, p. 727–733, 2008. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08451.x

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 5, p. 874–887, 2007. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08108.x

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 27557–27561, 2007. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.R700026200

ZASTROW, L. *et al.* The missing link - Light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 1, p. 31–44, 2009. Available at: https://doi.org/10.1159/000188083