

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

Guelton Hirano Guedes

Espectroscopia de reflexão *in vivo* do líquen escleroso vulvar

São Paulo

2018

Guelton Hirano Guedes

Espectroscopia de reflectância *in vivo* do líquen escleroso vulvar

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

Orientadora:

Prof.^a Dra. Daniela de Fátima Teixeira da Silva

São Paulo

2018

Guedes, Guelton Hirano.

Espectroscopia de reflectância in vivo do líquen escleroso vulvar. /
Guelton Hirano Guedes. 2018.

118 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São
Paulo, 2018.

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

1. PDT. 2. Fotobiomodulação. 3. Reflectância difusa. 4.
Absorbância aparente. 5. Propriedades ópticas.

I. Silva, Daniela de Fátima Teixeira da. II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 26 de fevereiro de 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Guelton Hirano Guedes

Título da Tese: "Espectroscopia de reflectância in vivo do líquen escleroso vulvar"

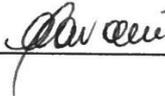
Presidente: PROF^a. DR^a. DANIELA DE FÁTIMA TEIXEIRA DA SILVA



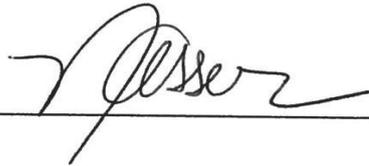
Membro: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DEANA



Membro: PROF^a. DR.^a CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROF. DR. NASSER ALI DAGHASTANLI



Membro: PROF. DR. THIAGO MICHEL DE BRITO FARIAS



Dedico este trabalho às mulheres de minha vida: Magali e Giovana, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de ausência e de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos e aos meus pais Joaquim (in memoriam) e Mercedes, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e da persistência.

AGRADECIMENTOS

À **prof.^a Dra. Daniela de Fátima Teixeira da Silva**, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém inspira respeito e admiração por sua serenidade seu conhecimento científico.

À **minha esposa Magali e à minha filha Giovana**, pelo constante estímulo, paciência e confiança.

À **minha família**, mãe, irmãos, cunhados e sobrinhos, por ser meu porto seguro, onde encontrei apoio e incentivo nos momentos de dificuldade e dúvida.

À **UNINOVE**, Universidade Nove de Julho, pela estrutura e pela oportunidade de ter retomado minha carreira acadêmica e pela bolsa de estudos concedida.

Aos diretores, **professores Mestres Marcos Antônio Naldi e Jan Recicar Novaes**, respectivamente, dos departamentos de exatas I e II, pelo apoio e pela oportunidade de participar desse programa de pós-graduação.

Aos **coordenadores dos departamentos de exatas I e II**, pela compreensão na atribuição de aulas e atividades.

A **todos os professores do programa** de Pós-graduação de Reabilitação, de Medicina e de Biofotônica aplicada às ciências da saúde da UNINOVE, pela oportunidade de aprender e compartilhar experiências.

Aos **alunos de Iniciação Científica**, Yhago, Wellington, Nadja e Bárbara, e de **mestrado** Mariana e Gabriela, sem os quais a coleta e análise dos dados seria muito mais árdua.

Aos **professores do departamento de exatas**, em especial aos professores Fabio Lopes, Cláudio Magalhães, Ana Cláudia, Renata Trovão e Dante, e Sílvio, técnico de laboratório, pelas longas conversas e constante incentivo nos momentos de alegrias, dúvidas e incertezas.

Ao **Hospital Pérola Byington** pela parceria, pela estrutura e pelo espaço cedido no ambulatório da clínica ginecológica onde foi possível a aquisição dos dados.

À **Dra. Renata Aparecida Belotto**, pela parceria antes e durante a coleta dos dados.

À **equipe de enfermagem** do ambulatório do Hospital Pérola Byington pelo apoio e constante incentivo.

À **ASLMS**, American Society for Laser Medicine & Surgery, Inc.®, pelo apoio financeiro na forma de Travel Grant, que propiciou a realização do módulo internacional em San Diego, CA, EUA.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela”.

Albert Einstein

RESUMO

Foi utilizada espectroscopia de reflectância difusa *in vivo* para comparar os tratamentos com corticosteroide (COR), fotobiomodulação (FBM) e terapia fotodinâmica (PDT) em líquen escleroso vulvar (LEV). Quinze pacientes foram recrutadas no ambulatório do Hospital Pérola Byington, divididas em três grupos, de cinco pacientes cada, e. Espectros de reflectância foram obtidos a partir de duas regiões de pele vulvar de cada paciente, uma com LEV e outra sem. Também, foram determinados os espectros de absorvância aparente a partir dos espectros de reflectância difusa. Os dados foram analisados com os softwares estatísticos Origin® Pro 8 e Minitab® 18. Os espectros de reflectância difusa foram suavizados com a técnica de Savitzky-Golay e integrados. As áreas sob as curvas foram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ao teste Levene de homogeneidade de variâncias. A comparação entre os grupos foi realizada por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLM), tendo como cofatores idade, tempo de prurido e escala Fitzpatrick. Em todos os testes estatísticos foi considerada significância $\alpha = 0,05$. Não houve diferenças significantes entre os tratamentos antes e após um mês de tratamento. Por meio dos espectros de absorvância aparente, observou-se que há pontos de máximo em duas bandas. A primeira tem ponto de máximo em $\lambda_1 = (422,6 \pm 5,4) \text{ nm}$ e a segunda, em $\lambda_2 = (492,6 \pm 3,1) \text{ nm}$, que podem estar relacionados com a banda de absorção Soret da oxihemoglobina (412 nm), da deoxihemoglobina (430 nm) ou da bilirrubina (460 nm). Por intermédio do coeficiente linear da regressão linear do logaritmo natural da razão entre os espectros de reflectância difusa de região com LEV pelo de região sem LEV, verifica-se que a paciente do grupo FBM apresentou a menor redução na concentração de melanina, na ordem de 28%, enquanto que a do grupo COR apresentou uma redução de 81,7% e a do grupo PDT, 73,8% de redução na concentração de melanina após um mês de tratamento.

Palavras-chave: PDT, fotobiomodulação, reflectância difusa, absorvância aparente, propriedades ópticas.

ABSTRACT

Diffuse reflectance spectroscopy was used *in vivo* to compare treatments with corticosteroid (COR), photobiomodulation (PBM) and photodynamic therapy (PDT) in vulvar lichen sclerosus (VLS). Fifteen patients were recruited at the outpatient clinic of Pérola Byington Hospital. They were divided into three groups of five patients each and treated for one month. Reflectance spectra were collected from two regions of vulvar skin of each patient, one with VLS and one without. Also, the absorbance spectra were determined from the diffuse reflectance spectra. The data were analyzed using the statistical softwares Origin® Pro 8 and Minitab® 18. The reflectance spectra were smoothed by Savitzky-Golay method and integrated. The areas under the curves were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test and to the Levene test of homogeneity of variances. The comparison between the groups was performed using Generalized Linear Models (GLM) test, having as cofactors age, time of pruritus and Fitzpatrick scale. All statistical significance was $\alpha = 0.05$. There were no differences between treatments before and after one month of treatment. By means of the apparent absorbance spectra, it has been observed that there are maximum points in two bands. The first has a maximum point at $\lambda_1 = (4226 \pm 54) \text{ nm}$ and the second, at $\lambda_2 = (4926 \pm 31) \text{ nm}$, which may be related to the Soret absorption band of oxyhemoglobin (412 nm), deoxyhemoglobin (430 nm) or bilirubin (460 nm). By means of the linear regression coefficient of the natural logarithm of the ratio between the diffuse reflectance spectra of the region with VLS and that of the non-VLS region, it was verified that the patient of the PBM group had the lowest reduction in the concentration of melanin, in the order of 28%, while that of the COR group had a reduction of 81.7% and that of the PDT group, 73.8%, of reduction in the melanin concentration.

Keywords: PDT, photobiomodulation, diffuse reflectance, apparent absorbance, optical properties.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

TABELA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	23
1.1	LUZ - PRINCÍPIOS BÁSICOS.....	23
1.2	ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO	25
1.3	INTERAÇÃO DA LUZ COM UM MEIO	27
1.3.1	<i>Reflexão e Refração.....</i>	27
1.3.2	<i>Absorção</i>	29
1.3.3	<i>Espalhamento</i>	30
1.3.4	<i>Transmissão.....</i>	31
1.4	PROPRIEDADES ÓPTICAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS	32
1.4.1	<i>Cromóforos.....</i>	33
1.5	ESPECTROSCOPIA	35
1.5.1	<i>Método de Suavização de Savitzky e Golay.....</i>	38
1.6	ESPECTROSCOPIA DE TECIDOS.....	40
1.7	FOTOTERAPIAS	45
1.7.1	<i>Fotobiomodulação (FBM).....</i>	46
1.7.2	<i>Terapia Fotodinâmica (PDT).....</i>	48
1.8	PELE	50
1.8.1	<i>Epiderme.....</i>	51
1.8.2	<i>Derme</i>	52
1.8.3	<i>Espessura da pele</i>	52
1.8.4	<i>Escala de Fitzpatrick.....</i>	54
1.9	LÍQUEN ESCLEROSO VULVAR.....	54
1.9.1	<i>Tratamento do LEV.....</i>	56
1.10	JUSTIFICATIVAS	56
2	OBJETIVOS	57
2.1	OBJETIVO GERAL.....	57
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57

3	METODOLOGIA	58
4	RESULTADOS	67
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÕES	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
	APÊNDICE 1 – ESPECTROS DE TODAS AS PACIENTES	89
	APÊNDICE 2 – TESTES DE NORMALIDADE E DE HOMOGENEIDADE.....	119

TABELA DE SÍMBOLOS

\vec{E}	Vetor campo elétrico
\vec{B}	Vetor campo magnético
\vec{z}	Vetor direção e sentido
c	Velocidade da luz no vácuo
λ	Comprimento de onda
ν	Frequência
v	Velocidade da luz em um meio
SI	Sistema Internacional de Unidades
ϵ	Permissividade elétrica de um meio
μ	Permeabilidade magnética de um meio
ϵ_0	Permissividade elétrica no vácuo
μ_0	Permeabilidade magnética no vácuo
$\bar{\nu}$	Número de onda
x	Eixo de um sistema de referências cartesiano
t	Instante de tempo
$E(x,t)$	Campo elétrico em função da posição x e ao instante t
E_0	Amplitude do campo elétrico
ϵ	Energia quantizada
h	Constante de Planck
I	Brilho ou intensidade
IV	Infravermelho
UV	Ultravioleta
T	Transmitância

θ_1	Ângulo de incidência
θ'_1	Ângulo de reflexão
θ_2	Ângulo de refração
n_1	Índice de refração do meio 1
n_2	Índice de refração do meio 2
r	Refletividade de um meio
E'	Amplitude do campo elétrico refletido
E	Amplitude do campo elétrico incidente
R	Reflectância de um meio
I'	Intensidade da radiação refletida
I	Intensidade da radiação incidente
$\%R$	Reflectância percentual
I_0	Intensidade da radiação incidente em $z=0$
z	Comprimento do caminho óptico
μ_a	Coefficiente de absorção óptica de um meio
ω	Frequência angular
C	Concentração de determinado agente absorvedor
μ_s	Coefficiente de espalhamento óptico de um meio
g	Coefficiente de anisotropia óptica de um meio
φ	Ângulo de espalhamento
μ_T	Coefficiente de atenuação óptica de um meio
μ'_s	Coefficiente de espalhamento reduzido de um meio
HpD	Derivado de hematoporfirina purificado

<i>P</i>	Potência luminosa transmitida
<i>P₀</i>	Potência luminosa incidente
<i>%T</i>	Transmitância percentual
<i>A</i>	Absorbância aparente
<i>LED</i>	Diodo emissor de luz
<i>LLLT</i>	Terapia com laser ou luz em baixa intensidade
<i>PDT</i>	Terapia fotodinâmica
<i>FBM</i>	Fotobiomodulação
<i>FS</i>	Fotossensibilizador
<i>ROS</i>	Espécies reativas de oxigênio
¹O₂	Oxigênio singlete
<i>H₂O₂</i>	Peróxido de oxigênio
<i>·OH</i>	Radical hidroxila
<i>e⁻</i>	Elétron
<i>k</i>	Fator de proporcionalidade
FPS	Escala Fitzpatrick

<i>EC</i>	Estrato córneo
SGS	Método de suavização de Savitzky-Golay
<i>a(λ)</i>	Coefficiente de absorção em função do comprimento de onda
<i>DRS</i>	Espectroscopia de reflectância difusa
<i>LEV</i>	Líquen escleroso vulvar
<i>HAS</i>	Hipertensão arterial sistêmica
<i>COR</i>	Corticosteroide
CW	Modo contínuo
<i>USB</i>	Barramento serial universal
<i>PVC</i>	Policloreto de polivinila
<i>α</i>	Significância estatística estimada
<i>u. a.</i>	Unidade arbitrária de área
<i>DP</i>	Desvio padrão da amostra
KS	Kolmogorov-Smirnov
R²	Coefficiente de determinação
GLM	Modelos lineares generalizados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores para a anisotropia e seu significado.....	31
Tabela 2 - Principais cromóforos e faixas espectrais de absorção em tecidos moles ou mineralizados.....	33
Tabela 3 - Espessuras médias de epiderme e de derme de pele de abdome humano ⁹¹	53
Tabela 4 – Escala Fitzpatrick e suas características com relação à aparência da pele e reação aos raios UV	54
Tabela 5 – Características das pacientes do grupo COR.....	67
Tabela 6 – Características das pacientes do grupo FBM	67
Tabela 7 – Características das pacientes do grupo PDT.....	67
Tabela 8 - Áreas espectros de reflectância das pacientes, em $\times 1000 \text{ u.a}$	70
Tabela 9 - Resultados das significâncias, p , do teste GLM, na comparação entre os valores das áreas dos espectros de reflectância, por grupo em relação ao momento do tratamento, considerando como cofatores a idade, o tempo de prurido e a escala FPS	70
Tabela 10 - Valores de p para o teste GLM, na comparação entre os tratamentos, em relação aos momentos inicial e final, para regiões sem e com LEV.....	71
Tabela 11 - Valores dos coeficientes R^2 , linear e angular referentes à regressão linear realizada com os gráficos de $\ln(L/F)$ por tratamento, paciente e momento dos tratamentos	76
Tabela 12 - Valores da significância, p , para o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para os fatores idade e tempo de prurido das pacientes deste estudo, divididos por grupo de tratamento.....	119
Tabela 13 - Valores de significância, p , para o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ao analisar as áreas sob as curvas dos espectros de reflectância difusa após suavização com a técnica de SGS	119
Tabela 14 - Valores de significância de homogeneidade de variâncias, p , para o teste de Levene.	119

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão esquemática de um campo eletromagnético de comprimento de onda λ e frequência ν , formado pelos campos elétrico E e magnético B , perpendiculares entre si, que se propagam na direção e no sentido do eixo de propagação z com velocidade c	24
Figura 2 - Esquema de um feixe de luz que incide a partir do meio 1, sob um ângulo de incidência θ_1 em relação à normal à superfície da interface. Parte do feixe pode ser refletido, retornando ao meio 1 sob um ângulo de reflexão θ'_1 em relação à normal e outra parte da luz incidente atravessa a interface, passando para o meio 2 sob um ângulo de refração θ_2 em relação à normal	28
Figura 3 – (a) Espalhamento de Rayleigh. (b) Espalhamento de Mie.....	30
Figura 4 - Coeficientes de absorção molar de típicos cromóforos em tecidos: oxihemoglobina, deoxihemoglobina, água e melanina. Adaptado de Sandell e Zhu ³¹	34
Figura 5 – Visão esquemática do Diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado a partir de Dai <i>et al.</i> (55).....	49
Figura 6 – Imagem esquemática de pele humana com suas três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo e suas principais estruturas. Imagem obtida do site https://www.teresewinslow.com/skin/rrw12kvqo9r3oxymwqo5a6tywltxnb , acessado em 09/03/2018.....	50
Figura 7 – Fotos de pacientes com LEV.....	55
Figura 8 - Organograma das 15 pacientes diagnosticadas com LEV, recrutadas no Hospital Pérola Byngton e divididas em três grupos randomicamente	58
Figura 9 - Localização dos oito pontos, em azul, de aplicação do laser tanto na FBM quanto na PDT	59
Figura 10 - Photon Lase® III. Imagem retirada do site da empresa: http://www.dmcgroup.com.br/en/detalhe-produto/dental/equipments/laser-therapy/photon-lase-iii/392 , link acessado em 05/11/2017.	59
Figura 11 - (a) Medidor de potência; (b) Sensor de termopilha; e (c) Calibração prévia da potência do laser na ponteira da fibra óptica. Imagens obtidas no site da empresa: https://www.coherent.com/measurement-control/measurement/laser-power-and-energy-meters/fieldmaxii-to , e https://www.coherent.com/measurement-control/measurement/sensors-laser-power/high-peak-power-thermopile-sensors-rohs , links acessados em 05/11/2017.....	60
Figura 12 - Fonte de luz HD-2000-BAL®. Imagem retirada do site da empresa: https://oceanoptics.com/product/dh-2000-bal/ , link acessado em 05/11/2017.	60

Figura 13 - Espectrofotômetro modelo USB 2000+®. Imagem retirada do site da empresa: https://oceanoptics.com/product/usb2000-custom/ , link acessado em 05/11/2017.	61
Figura 14 – Imagem da fibra óptica bifurcada utilizada para a obtenção dos espectros de reflectância. No detalhe, abaixo, a extremidade da ponteira, contendo sete fibras ópticas. Imagem retirada do site da empresa: https://oceanoptics.com/product/premium-grade-reflection-probes/ , link acessado em 05/11/2017.....	61
Figura 15 - Dispositivo na extremidade da fibra óptica protegida com filme fino de PVC	62
Figura 16 - Imagem do Spectralon® utilizado para a calibração do branco do espectrofotômetro.	62
Figura 17 - Método de medição da reflectância das regiões com (à esquerda) e sem (à direita) LEV	62
Figura 18 – Imagem da tela do Origin® Pro-8, em que se realiza a suavização de espectros.	63
Figura 19 – Imagem da tela do Origin® Pro-8, em que se escolhe o tipo de suavização de espectros e as opções relativas ao tratamento de dados. No canto superior direito, observa-se a pré-visualização do espectro original, em preto, e sua suavização, em vermelho.....	63
Figura 20 – a) Exemplo de um espectro de reflectância obtido a partir de uma região com LEV; b) O espectro foi suavizado com a técnica de SGS. Acima, à direita, está indicada a área da região hachurada em unidades arbitrárias (u.a.)	64
Figura 21 – a) Exemplo de espectro de reflectância suavizado de uma região com LEV; b) O espectro de absorbância aparente.....	65
Figura 22 – a) Exemplo de espectro de reflectância de pele sadia; b) O espectro de absorbância aparente de pele sadia	65
Figura 23 – Espectros da paciente F07. (a) Razão, L/F, entre os espectros de reflectância difusa de região com LEV pelo espectro de região sem LEV. (b) Logaritmo natural, $\ln(L/F)$, da razão L/F do espectro relativo entre 620 e 720 nm e a respectiva regressão linear.....	66
Figura 24 – Espectros de reflectância difusa de região livre de LEV. Referentes a pacientes dos grupos: COR a) Antes do início do tratamento e b) Um mês após o início do tratamento; FBM c) Antes do início do tratamento e d) Um mês após o início do tratamento; e PDT e) Antes do início do tratamento e f) Um mês após o início do tratamento.	68
Figura 25 – Espectros de reflectância difusa de região com LEV. Referentes a pacientes dos grupos: COR a) Antes do início do tratamento e b) Um mês após o início do tratamento; FBM c) Antes do início do tratamento e d) Um mês após o início do tratamento; e PDT e) Antes do início do tratamento e f) Um mês após o início do tratamento.	69

Figura 26 – Espectros de absorvância aparente de região sem LEV, antes (esquerda) a após (direita) um mês de tratamento. No canto superior direito de cada gráfico há uma legenda identificando as pacientes de cada grupo de tratamento. Gráficos a) e b) Grupo COR; Gráficos c) e d) Grupo FBM; Gráficos e) e f) Grupo PDT.....	72
Figura 27 – Espectros de absorvância aparente de região com LEV, antes (esquerda) a após (direita) um mês de tratamento. No canto superior direito de cada gráfico há uma legenda identificando as pacientes de cada grupo de tratamento. Gráficos a) e b) Grupo COR; Gráficos c) e d) Grupo FBM; Gráficos e) e f) Grupo PDT.....	73
Figura 28 - Espectros relativos à razão (L/F) entre o espectro de reflectância difusa de região com LEV pelo espectro de região sem LEV, antes (esquerda) a após (direita) um mês de tratamento. No canto superior direito de cada gráfico há uma legenda identificando as pacientes de cada grupo de tratamento. Gráficos a) e b) Grupo COR; Gráficos c) e d) Grupo FBM; Gráficos e) e f) Grupo PDT	74
Figura 29 - Gráficos referentes à regressão linear. O eixo vertical representa o $\ln(L/F)$, logaritmo natural da razão entre os espectros de reflectância de região com LEV (L) pelo espectro de região sem LEV (F) das pacientes: do grupo COR, (a) antes (I) e (b) após um mês (F) de tratamento; do grupo FBM, (c) antes e (d) após um mês de tratamento; e do grupo PDT, (e) antes e (f) após um mês de tratamento.	75
Figura 30 – Grupo COR, paciente C01 de 53 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorvância aparente no início; f) Absorvância após um mês de tratamento.	89
Figura 31 – Grupo COR, paciente C01 de 53 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorvância aparente no início; f) Absorvância após um mês de tratamento.	90
Figura 32 – Grupo COR, paciente C02 de 75 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=V, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorvância aparente no início; f) Absorvância após um mês de tratamento.	91

Figura 33 – Grupo COR, paciente C02 de 75 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=V, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	92
Figura 34 – Grupo COR, paciente C03 de 75 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	93
Figura 35 – Grupo COR, paciente C03 de 75 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	94
Figura 36 – Grupo COR, paciente C04 de 44 anos, com tempo de prurido de 38 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	95
Figura 37 – Grupo COR, paciente C04 de 44 anos, com tempo de prurido de 38 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	96
Figura 38 – Grupo COR, paciente C05 de 66 anos, com tempo de prurido de 10 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	97
Figura 39 – Grupo COR, paciente C05 de 66 anos, com tempo de prurido de 10 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no	

início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	98
Figura 40 – Grupo FBM, paciente F06 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	99
Figura 41 – Grupo FBM, paciente F06 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	100
Figura 42 – Grupo FBM, paciente F07 de 59 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	101
Figura 43 – Grupo FBM, paciente F07 de 59 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	102
Figura 44 – Grupo FBM, paciente F08 de 72 anos, com tempo de prurido de 11 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	103
Figura 45 – Grupo FBM, paciente F08 de 72 anos, com tempo de prurido de 11 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	104
Figura 46 – Grupo FBM, paciente F09 de 55 anos, com tempo de prurido de 8 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a)	

Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	105
Figura 47 – Grupo FBM, paciente F09 de 55 anos, com tempo de prurido de 8 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	106
Figura 48 – Grupo FBM, paciente F10 de 62 anos, com tempo de prurido de 20 anos e FPS=IV, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	107
Figura 49 – Grupo FBM, paciente F10 de 62 anos, com tempo de prurido de 20 anos e FPS=IV, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	108
Figura 50 – Grupo PDT, paciente P11 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	109
Figura 51 – Grupo PDT, paciente P11 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	110
Figura 52 – Grupo PDT, paciente P12 de 65 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=VI, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f) Absorbância após um mês de tratamento.	111

Figura 53 – Grupo PDT, paciente P12 de 65 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=VI, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.	112
Figura 54 – Grupo PDT, paciente P13 de 63 anos, com tempo de prurido de 7 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.	113
Figura 55 – Grupo PDT, paciente P13 de 63 anos, com tempo de prurido de 7 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.	114
Figura 56 – Grupo PDT, paciente P14 de 71 anos, com tempo de prurido de 3 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.	115
Figura 57 – Grupo PDT, paciente P14 de 71 anos, com tempo de prurido de 3 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.	116
Figura 58 – Grupo PDT, paciente P15 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.	117
Figura 59 – Grupo PDT paciente P15 de 71 anos, com tempo de prurido de 3 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no	

início; d) Reflectância suavizada após um mês; e) Absorbância aparente no início; f)
Absorbância após um mês de tratamento. 118

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O tratamento de doenças dermatológicas com luz requer que fótons provenientes de uma fonte externa sejam absorvidos por cromóforos endógenos ou exógenos presentes em células da epiderme ou da derme. O aprimoramento da fototerapia só será possível se houver informações suficientes quanto à fração da luz incidente capaz de chegar até o cromóforo alvo. Além disso, é necessário conhecer a capacidade que o cromóforo tem de absorver a luz e qual será a resposta biológica a curto, médio e longo prazo.

De acordo com Van Gemet *et al.* ¹, a pele não é um tecido homogêneo e tem forma irregular, possui folículos e glândulas capilares. Tem várias camadas e possui propriedades físicas anisotrópicas. Esses fatores dificultam a elaboração de uma teoria que explique rigorosamente o comportamento da luz ao incidir sobre a pele. Para facilitar essa análise, pode-se considerar que a pele seja um meio túrbido, composto por camadas homogêneas e paralelas, com propriedades físicas isotrópicas.

Considera-se que a absorção e o espalhamento da luz incidente ocorram devido a uma distribuição aleatória, porém homogênea, de absorvedores e de dispersores dentro de um volume. A dispersão local pode ser anisotrópica. Por conveniência, assume-se que o sangue esteja distribuído homogeneamente dentro do volume dérmico ¹.

Esse trabalho foi realizado em parceria com Renata Aparecida Belotto, médica ginecologista do ambulatório do Hospital Pérola Byington, que estudava ² o tratamento de líquen escleroso vulvar com fototerapias. O objetivo deste trabalho foi analisar a óptica de pele com líquen escleroso vulvar, comparando espectros de reflectância difusa, *in vivo*, e espectros de absorbância aparente em relação às propriedades ópticas de pele com líquen escleroso vulvar quando tratada com corticosteroide, fotobiomodulação ou terapia fotodinâmica.

1.1 LUZ - PRINCÍPIOS BÁSICOS

No final do século XIX, o físico e matemático escocês, James Clerk Maxwell (1831-1879), concluiu que a luz era uma onda eletromagnética composta por um campo elétrico (\vec{E}) e por um campo magnético (\vec{B}), perpendiculares entre si e se propagam no sentido de um eixo z , perpendicular aos dois campos (Figura 1) ³.

As equações de Maxwell possibilitaram estudar a propagação dos campos elétrico e magnético que compõe uma radiação eletromagnética. Ao analisar a velocidade dessas ondas por intermédio dessas equações, foi possível afirmar que elas viajam a uma alta velocidade conhecida como velocidade da luz (c) ³.

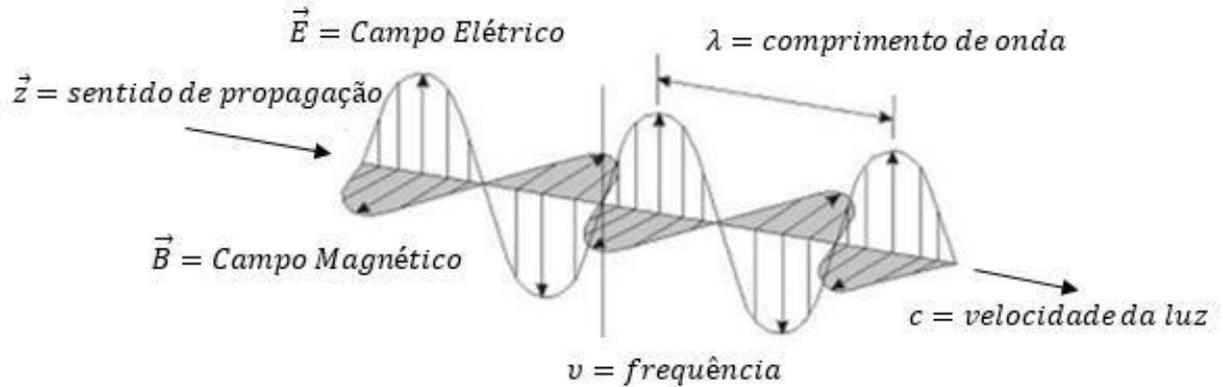


Figura 1 - Visão esquemática de um campo eletromagnético de comprimento de onda λ e frequência ν , formado pelos campos elétrico (\vec{E}) e magnético (\vec{B}), perpendiculares entre si, que se propagam na direção e no sentido do eixo de propagação z com velocidade c .

A velocidade, c , da luz em um meio, dada em m/s (metros por segundo), é o recíproco da raiz quadrada do produto entre a permissividade elétrica ϵ e a permeabilidade magnética μ do meio, então, $c = 1 / \sqrt{\epsilon \mu}$

No vácuo, $\epsilon_0 = 885 \times 10^{-12} \text{ C}^2/\text{N} \cdot \text{m}^2$ e $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{ N}/\text{A}^2$ e a velocidade da luz no vácuo é: $c = 1 / \sqrt{\epsilon_0 \cdot \mu_0} = 3 \times 10^8 \text{ m}/\text{s}$.

Considerando uma função senoidal que descreva o campo elétrico ou magnético, então define-se comprimento de onda (λ) à distância, em nm (nanometro = 10^{-9} m), entre duas cristas consecutivas da onda.

Frequência (ν) indica, em Hz (hertz que equivale ao recíproco de segundo), a quantidade de vezes que um pico se repete por unidade de tempo. A frequência da radiação, no vácuo, é dada pela razão entre a velocidade da luz e o comprimento de onda, dada por: $\nu = c / \lambda$

Número de onda ($\bar{\nu}$, dado em cm^{-1} , é o recíproco do comprimento de onda e representa a quantidade de comprimentos de onda por unidade de distância: $\bar{\nu} = 1 / \lambda$.

Então, a frequência também pode ser dada pelo produto entre a velocidade da luz pelo número de onda: $\nu = c \times \bar{\nu}$.

A componente na direção x do campo elétrico E_x , perpendicular à direção de propagação z , é dada em uma função da posição, x , e do tempo, t : $E(x,t) = E_0 \text{ sen}(2\pi \bar{\nu} x - \omega t)$. Onde E_0 representa a amplitude do campo elétrico, $\bar{\nu} = 1 / \lambda$ é o número de onda e ω é a frequência angular da onda.

A componente do campo magnético B , na direção de um eixo X , perpendicular à direção de propagação Z em função do tempo, t , é dada por: $B(x,t) = B_0 \cdot \text{sen}(2\pi \bar{v} \cdot x - \omega \cdot t)$. Onde B_0 representa a amplitude do campo magnético.

Considerando que a luz se propague com uma velocidade (v) ao atravessar um meio homogêneo, define-se o índice de refração de um meio pela razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz no meio, dado por: $n = c/v = \sqrt{\epsilon \mu}$

Um fóton de comprimento de onda λ e frequência ν terá uma energia quantizada proporcional à constante de Planck, $h = 6,626 \times 10^{-34}$ Js, no SI, dada por: $\epsilon = h \cdot \nu$

Em 1905, o físico alemão, Albert Einstein (1879-1955), descreveu o efeito fotoelétrico, a partir do qual, a luz pode atuar como uma partícula em alguns momentos, sendo uma explicação para esse efeito. No entanto, há ocasiões em que a luz se comporta como uma onda, por exemplo quando atravessa um prisma ou uma lente. De acordo com a dualidade partícula-onda da mecânica quântica, é natural que, de acordo com as circunstâncias em que esteja, a luz apresente comportamento de onda ou de partícula.

Em 1926, o físico e químico americano, Gilbert Newton Lewis (1875-1946), introduziu o termo fóton para designar o quantum de energia ⁴. Ele é a partícula elementar intermediadora da força eletromagnética ⁵. Fótons são bósons que possuem spin igual a um.

Então, o que se entende por luz é composto uma grande quantidade de fótons, tendo brilho ou intensidade (I), correspondente a essa quantidade que equivale ao quadrado do módulo do campo elétrico: $I = E^2$

No início da década de 60, com a produção do primeiro laser (acrônimo do inglês para “light amplification by stimulated emission of radiation”) de rubi, pelo físico americano Theodore Harold Maiman (1927-2007) ⁶ e, principalmente, com a fabricação do primeiro laser de Hélio-Neônio (He-Ne), que a utilização da luz em várias áreas do conhecimento foi impulsionada. O laser é uma radiação eletromagnética monocromática, ou seja, com precisão espectral.

1.2 ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

Os gregos tinham a ideia de que a luz viajava em linha reta. Com base nesse conceito, eles estudaram as propriedades da luz e desenvolveram os conceitos da óptica geométrica. Nos séculos XVI e XVII, o estudo de algumas propriedades da luz gerou hipóteses e teorias conflitantes com relação à sua natureza, embora hoje saibamos de sua característica dual.

Em 1666, o físico e matemático inglês, Sir Isaac Newton (1643-1727) decompôs a luz do Sol utilizando um prisma ⁷. Em geral, o olho humano é sensível à luz na região visível, com comprimentos de onda entre 400 nm e 700 nm. Há indivíduos que são sensíveis a comprimentos de onda mais curtos, na ordem de 380 nm e mais longos, na ordem de 780 nm⁸.

Em 1800, o astrônomo e compositor alemão, William Herschel (1738-1822), estudando a temperatura da luz decomposta por um prisma, percebeu que, ao medir a temperatura desde o violeta até o vermelho, a temperatura aumentava e que, depois do vermelho, mesmo sem haver luz visível, a temperatura continuava aumentando. Assim, foi identificada a radiação infravermelha (IV) ⁹.

Em 1801, o físico alemão, Johann Wilhelm Ritter (1776-1810), ao estudar o outro extremo do espectro visível, percebeu a presença do que ele chamou, na época de raios químicos, posteriormente denominada radiação ultravioleta (UV), não visível ¹⁰.

A luz foi relacionada com o eletromagnetismo pela primeira vez em 1845, pelo físico e químico inglês, Michael Faraday (1791-1867). Ele descreveu o efeito Faraday ao observar que a direção de polarização de um feixe de luz respondia a um campo magnético ao atravessar um material transparente ¹¹.

Em 1886, o físico alemão, Heinrich Rudolf Hertz (1857-1894), construiu um aparelho capaz de gerar e detectar radiações de baixa frequência, como previam as equações de Maxwell. Assim, Hertz descobriu as ondas de rádio. Ao medir seu comprimento de onda e sua frequência inferiu que elas viajavam à velocidade da luz e que poderiam ser refletidas e refratadas como a luz visível ^{12,13}.

Em 1895, o físico alemão, Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923) descobriu que um tubo a vácuo sujeito à alta voltagem emitia um outro tipo de radiação. Ele percebeu que essa radiação era capaz de atravessar estruturas moles do corpo humano, mas que eram refletidas ou espalhadas por estruturas densas, como os ossos. Ele chamou essa radiação de raios-X, que passaram a ser muito utilizados na medicina ¹⁴.

Em 1900, físico e químico francês, Paul Ulrich Villard (1860-1934), estudava elementos radioativos como o urânio e o rádio. Um novo tipo de radiação foi identificado. Inicialmente, Villard levantou a hipótese de que se tratavam de partículas semelhantes às partículas alfa e beta, mas com a diferença de serem muito mais penetrantes que ambas. Foi completada a última porção do espectro eletromagnético com a descoberta dos raios gama ¹⁵.

Em 1910, o físico inglês, Sir William Henry Bragg (1862-1942) comprovou que os raios gama eram um tipo de radiação eletromagnética e que não era composto por partículas ¹⁶.

Em 1914, o físico e químico neozelandês, Ernest Rutherford, 1º Barão de Rutherford de Nelson, e o físico, escritor e poeta inglês, Edward Neville da Costa Andrade (1887-1971) demonstraram que os raios gama eram semelhantes aos raios-x, porém com comprimento de onda menor e frequência (energia) maior.

13 INTERAÇÃO DA LUZ COM UM MEIO

Quando um feixe de luz atinge a interface entre dois meios de índices de refração diferentes, n_1 e n_2 , sob um ângulo de incidência θ_1 , podem ocorrer cinco fenômenos: reflexão, refração, absorção, espalhamento e transmissão.

13.1 Reflexão e Refração

Reflexão e Refração são fenômenos relacionadas pela lei de Fresnel ¹⁷.

Quando um feixe de luz incide, sob um ângulo de incidência θ_1 , em uma interface de separação entre dois meios de índices de refração, n_1 e n_2 , parte poderá ser refletida de volta para o meio de origem sob um ângulo de reflexão $\theta' = \theta_1$, em relação à normal à superfície, e parte poderá atravessar a interface sob um ângulo de refração θ_2 (Figura 2).

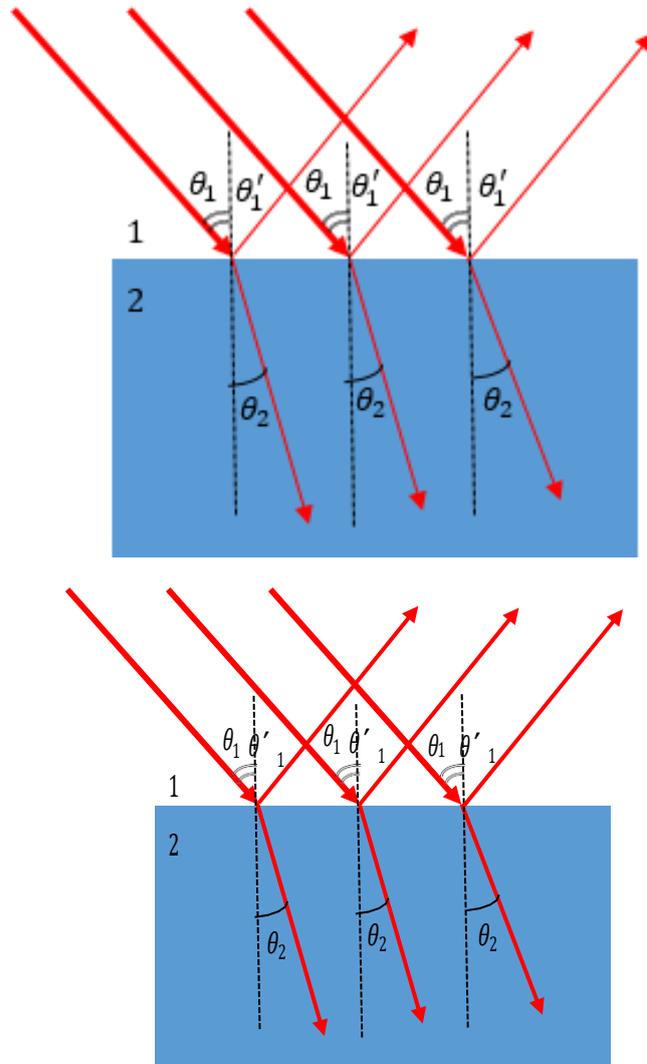


Figura 2 - Esquema de um feixe de luz que incide a partir do meio 1, sob um ângulo de incidência θ_1 em relação à normal à superfície da interface. Parte do feixe pode ser refletido, retornando ao meio 1 sob um ângulo de reflexão θ'_1 em relação à normal e outra parte da luz incidente atravessa a interface, passando para o meio 2 sob um ângulo de refração θ_2 em relação à normal.

De acordo com a Lei de Snell ¹⁸: $n_1 \cdot \text{sen } \theta_1 = n_2 \cdot \text{sen } \theta_2$

Como o índice de refração depende da frequência da radiação incidente, ou seja, de seu comprimento de onda, o ângulo de refração será diferente para diferentes comprimentos de onda.

Refletividade (r) de uma superfície é a medida da quantidade de radiação refletida, sendo determinada pela razão entre as amplitudes dos campos elétricos refletido (E') e incidente (E):

$$r = \frac{E'}{E} \times 100.$$

Reflectância (R) corresponde ao quadrado da refletividade e representa a razão entre as intensidades das radiações refletida (I') e incidente (I):

$$R = r^2 = \left(\frac{E'}{E} \right)^2 = \frac{I'}{I}$$

A reflectância percentual (%R) é dada por: $\%R = \frac{I'}{I} \times 100$

Quando uma radiação eletromagnética atravessa a interface entre duas superfícies de índices de refração diferentes, podem ocorrer, simultaneamente, três fenômenos: absorção, espalhamento e transmissão.

1.3.2 Absorção

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

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

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_a z} \quad (1)$$

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

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

$$I(z) = I_0 e^{-k.Cz} \quad (2)$$

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

De acordo com a Lei de Beer-Lambert, o caminho óptico é proporcional ao inverso do coeficiente de absorção óptica do meio:

$$z = \frac{1}{\mu_a} \ln \frac{I_0}{I(z)} \quad (3)$$

Define-se por profundidade de transmissão à distância para a qual 63% da luz incidente seja absorvida e, por comprimento de extinção à distância na qual 90% da luz incidente seja absorvida pelo meio.

Quando partículas carregadas são expostas a ondas eletromagnéticas, elas reagem devido a interações com o campo elétrico incidente. Se a frequência da onda incidente corresponde à frequência natural de vibração das partículas livres, ocorrerá ressonância, acompanhada por uma considerável absorção ^{19,20}.

133 Espalhamento

O espalhamento, por sua vez, ocorre quando a frequência da radiação incidente não corresponde exatamente à frequência natural das partículas do meio. As oscilações resultantes são determinadas por vibrações forçadas com frequências diferentes da frequência natural. Nesses casos, a amplitude da vibração será, proporcionalmente, menor do que na absorção, pois não há ressonância.

A maneira como a energia do fóton se comporta ao ser espalhada indicará o tipo de espalhamento: elástico, quando a energia do fóton incidente é igual à energia do fóton espalhado; inelástico, quando há perda de energia da radiação ao penetrar em um meio denso. O espalhamento está relacionado com a origem básica da dispersão.

Duas teorias que tentam explicar o fenômeno de espalhamento. No espalhamento Rayleigh, considera-se que as partículas responsáveis pelo espalhamento sejam menores do que o comprimento de onda da radiação incidente. Essa relação pode chegar a até um décimo do comprimento de onda incidente (Figura 3a). No espalhamento Mie, por sua vez, as partículas espalhadoras têm dimensões na mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda incidente, assim, o espalhamento será muito dependente delas (Figura 3b).

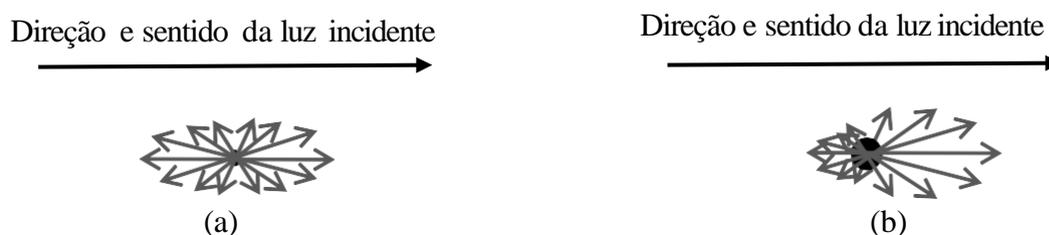


Figura 3 – (a) Espalhamento de Rayleigh. (b) Espalhamento de Mie

O coeficiente de espalhamento μ_s , dado em cm^{-1} , está relacionado aos componentes do meio responsáveis pelo espalhamento da radiação.

De fato, nem o espalhamento Rayleigh nem o Mie descrevem completamente o espalhamento que ocorre quando uma radiação é refratada para um meio, sendo necessário desenvolver outros modelos.

Um dos modelos utilizado para descrever o espalhamento considera o coeficiente de anisotropia, g , do meio espalhador ²¹. Ele representa o valor médio do cosseno do ângulo de espalhamento (φ).

Na **Tabela 1 - Valores para a anisotropia e seu significado**, são indicados valores limite da anisotropia e seu significado quanto ao tipo de espalhamento.

Tabela 1 - Valores para a anisotropia e seu significado.

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

134 Transmissão

A transmissão de luz por um meio ocorrerá quando uma radiação incidente atravessar um meio não sendo nem absorvida nem espalhada por suas partículas.

O coeficiente de atenuação (μ_T), dado em cm^{-1} , indica a parcela da radiação incidente que não é nem absorvida nem espalhada pelo meio e é dado pela soma dos coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento (μ_s):

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

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

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

Transmitância (T) é a razão entre a potência transmitida (P) pelo meio em relação à potência incidente (P₀):

$$T = P / P_0 \quad (6)$$

Transmitância percentual (%T) é dada por:

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100 \quad (7)$$

Absorbância aparente. (A) é dada pelo logaritmo da recíproca da transmitância:

$$A = \log_{10} \frac{P_0}{P} \quad (8)$$

$$A = \log_{10} \frac{1}{\%T} \quad (9)$$

Então,

$$A = 2 - \log_{10}(T) \quad (10)$$

14

15 PROPRIEDADES ÓPTICAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS

A interação da luz com sistemas biológicos é estudada há tempos. De acordo com a biofísica estoniana, Tiina Karu (1947) ²²⁻²⁴, há registros sobre os efeitos da radiação em comprimentos de onda na região do visível (400 nm a 700 nm) sobre organismos e células desde a segunda metade do século 19 ²³. No século 20, entre as décadas de 20 e 30, há relatos sobre os efeitos da luz com comprimentos de onda nos extremos do espectro visível sobre vários processos bioquímicos.

No início da década de 70, em Budapeste, Hungria, um trabalho pioneiro foi desenvolvido na aplicação de laser de rubi *in vitro* e *in vivo* em úlceras crônicas obtendo resultados efetivos no processo de cicatrização ^{25,26}.

O laser de He-Ne, com emissão em 632,8 nm, foi o primeiro laser disponível comercialmente, o que levou ao rápido e intenso desenvolvimento do estudo dos efeitos da luz com este comprimento de onda em aplicações médicas.

Atualmente, a luz é amplamente utilizada na área da saúde para finalidades terapêuticas, cirúrgicas e diagnósticas. O sucesso de terapias utilizando LEDs ou laser de baixa potência ou operando em baixa intensidade depende de vários fatores que englobam características individuais, como condições clínicas a serem tratadas, características do tecido alvo e dosimetria ²⁷.

151 Cromóforos

Cromóforo é o termo geral dado a uma partícula ou molécula que tem a propriedade de absorver uma radiação eletromagnética em determinada região do espectro eletromagnético. Diferentes tipos de tecidos biológicos têm cromóforos endógenos específicos, além disso, nem sempre são conhecidas suas concentrações e suas distribuições espaciais.

Na **Tabela 2** abaixo, estão indicados os principais cromóforos em tecidos biológicos de mamíferos e as respectivas faixas do comprimento de onda de absorção.

Tabela 2 - Principais cromóforos e faixas espectrais de absorção em tecidos moles ou mineralizados

<i>Faixa de comprimento de onda (nm)</i>	<i>Principais Cromóforos</i>	<i>Forma de interação</i>
200 a 400	Proteínas e DNA	Absorvem fortemente
400 a 600	Oxihemoglobina, hemoglobina e melanina	Absorve e espalha Espalham pouco
600 a 1500	Oxihemoglobina, hemoglobina e melanina	Altamente espalhadora Fracamente espalhadores
Acima de 1500	Água e hidroxiapatita	Absorção pela água

UV do espectro, na faixa entre 200 nm e 400 nm (UV) os principais cromóforos são proteínas e DNA. Esta é uma região não visível do espectro, altamente energética e ionizante. Radiação nessa faixa do espectro é fortemente absorvida por tecidos biológicos, tanto moles quanto mineralizados. Nessa faixa, o espalhamento é relativamente pequeno e a radiação não penetra profundamente no tecido biológico (28).

Em parte da região visível do espectro eletromagnético, entre 400 nm e 600 nm, os principais cromóforos (Figura 4) são a oxihemoglobina, com picos de absorção em 412 nm (banda Soret), 541 nm e 577 nm (bandas q), a deoxihemoglobina, com picos de absorção em 430 nm (banda Soret) e 555 nm, bilirrubina, com picos de absorção em 460 nm (banda Soret) e 550 nm, e a melanina, com absorção decrescente em relação ao aumento do comprimento de onda. Nessa faixa há tanto absorção quanto espalhamento. A profundidade de penetração da radiação está na faixa entre 0,5 mm e 2,5 mm. Os tecidos moles podem ser tanto absorvedores quanto espalhadores e os tecidos duros são pouco absorvedores ²⁸⁻³⁰.

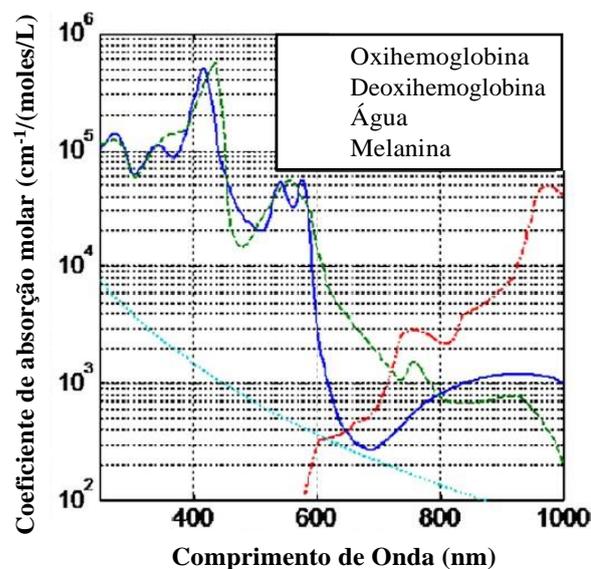


Figura 4 - Coeficientes de absorção molar de típicos cromóforos em tecidos: oxihemoglobina, deoxihemoglobina, água e melanina. Adaptado de Sandell e Zhu ³¹.

Entre 600 nm e 1500 nm, final da região visível e início do infravermelho próximo, os principais cromóforos continuam sendo a oxihemoglobina, a hemoglobina e a melanina. No entanto, predomina o espalhamento em comparação com a absorção. A profundidade de penetração aumenta, ficando entre 8 mm e 10 mm. Os tecidos moles são altamente espalhadores e os duros continuam fracamente absorvedores ^{20,32}.

Acima 1500 nm, na região do IV, os principais cromóforos são a água e a hidroxiapatita. Os tecidos moles são muito pouco absorvedores e os tecidos duros são fortemente absorvedores a partir de 2000 nm ²⁰.

Denomina-se janela terapêutica óptica à faixa de comprimentos de onda entre 650 nm e 1100 nm ³³, pois nela não há grandes picos de absorção devido às macromoléculas ou às

moléculas de água. Portanto, nessa faixa do espectro eletromagnético, a radiação penetra mais profundamente em tecidos biológicos, aumentando a probabilidade de ocorrer biomodulação.

A Lei de Grotthus-Draper, ou primeira lei da fotoquímica, diz que um efeito fotoquímico só ocorrerá após a absorção da luz pela molécula receptora. Portanto, se uma amostra não absorve luz, não haverá efeito fotoquímico ³⁴.

De acordo com a Lei de Stark-Einstein, ou a segunda lei da fotoquímica, o efeito fotoquímico nem sempre ocorrerá quando uma molécula absorver radiação eletromagnética, mas se ela o fizer, será necessária apenas a absorção de um único fóton para cada molécula absorvedora ³⁴.

1.6 ESPECTROSCOPIA

Entre 1666, o físico inglês Isaac Newton demonstrou que a luz branca, como a do Sol, se decompõe em diferentes cores ao passar por um prisma.

Em 1802, o médico, químico e físico inglês William Hyde Wollaston (1766-1828), utilizava a refração da luz para testar a pureza de óleos e de outras substâncias. Durante suas observações ele notou que, ao fazer com que a luz do sol passasse por uma fenda e, depois, por um prisma, surgiam linhas escuras no espectro. Em 1804, ele inventou o prisma de Wollaston ³⁵, com dois prismas de calcita ortogonais, que separavam luz polarizada em dois feixes com polarizações ortogonais, usado em polarimetria. Atualmente, sabe-se que essas linhas são imagens da fenda do espectrógrafo em diferentes comprimentos de onda.

Até 1820, o fabricante alemão de instrumentos de vidro e inventor do espectroscópio, Joseph Ritter von Fraunhofer (1787-1826), já havia contado 574 linhas escuras no espectro solar. Algum tempo depois, elas foram denominadas linhas de Fraunhofer ^{36,37}.

Em 1856, o químico alemão, Robert Wilhelm Eberhard Bunsen (1811-1899) inventou o bico de gás, cuja vantagem era fornecer uma chama incolor ao ser aceso. Quando uma substância era exposta à chama do bico de Bunsen, as cores emitidas por ela estavam relacionadas aos elementos que compunham a substância.

Em 1856, o físico Gustav Robert Kirchhoff (1824-1887) sugeriu que as cores poderiam ser melhor distinguidas se passassem através de um prisma. Foi colocado um prisma na frente de um conjunto de lentes e, assim, foi possível identificar linhas espectrais com os elementos químicos. Os gases quentes observados por Kirchhoff e Bunsen não emitiam um espectro contínuo. Cada elemento químico gerava um conjunto diferente de linhas. Desta forma, o gás nobre neônio apresenta um conjunto de linhas na região do vermelho, o sódio, um conjunto de

linhas na região do amarelo e o mercúrio conjuntos de linhas nas regiões do amarelo e do verde. Diferente das linhas de Fraunhofer que eram escuras, essas se tornaram todas brilhantes.

A partir de suas experiências, Kirchhoff formulou as três leis empíricas da espectroscopia ³⁸, para determinar a composição de uma mistura de elementos:

- Um corpo opaco, quando aquecido, emite um espectro contínuo, independentemente de seu estado físico.

- Um gás transparente, quando aquecido, produzirá um conjunto de linhas brilhantes. A quantidade e as posições dessas linhas dependerão dos elementos químicos presentes no gás.

- Quando um espectro contínuo passar por um gás a uma temperatura mais baixa, será formado um espectro de absorção devido à presença de linhas escuras referentes ao gás frio. A quantidade e a posição das linhas do espectro de absorção dependerão dos elementos químicos do gás.

Em 1883, o químico suíço Jacques-Louis Soret (1827-1890) descreveu que havia um pico intenso de absorção na região azul do espectro, posteriormente denominado pico Soret ou banda Soret. Atualmente, a banda Soret é muito utilizada em espectroscopia de absorvância e corresponde a um comprimento de onda de máxima absorção em torno de 400 nm.

Com o passar do tempo, a análise de espectros foi sendo ampliada. No início, foi desenvolvida para estudar a luz do Sol. Depois, para estudar as estrelas. Atualmente, o termo espectroscopia é utilizado em Física e em Química para designar as técnicas de levantamento de dados físico-químicos através de espectros de transmitância, absorvância ou reflectância, resultantes da incidência de uma energia radiante sobre uma amostra. Espectroscopia de massa é uma técnica para detectar e identificar moléculas por meio da medição de sua massa, permitindo caracterizar sua estrutura química.

Espectro ou espectrograma é o nome dado ao gráfico resultante de uma técnica espectroscópica em função do comprimento de onda, do número de onda ou da frequência.

No início, o termo espectroscopia era o nome dado ao estudo da interação de uma radiação eletromagnética com a matéria em função do comprimento de onda. Atualmente, esse conceito foi ampliado, pois engloba qualquer medida de uma grandeza em função do comprimento de onda ou da frequência.

Com a espectroscopia, tornou-se possível analisar elementos simples, estruturas químicas de compostos inorgânicos ou grupos funcionais de uma amostra orgânica utilizando radiação eletromagnética. O ensaio pode ser destrutivo ou não destrutivo. Os não destrutivos são mais indicados por preservar as características da amostra após o ensaio.

Quando uma amostra é excitada por uma fonte de energia, ela pode reagir, absorvendo a radiação em determinado nível energético, ou comprimento de onda e, posteriormente, emitir radiação ao retornar ao seu estado fundamental. Assim, pode-se analisar o comportamento da amostra ou de seus elementos. A análise espectroscópica pode fornecer informações sobre a estrutura do analito, como a geometria de suas ligações, a natureza química de seus ligantes etc. A natureza ondulatória das radiações eletromagnéticas constitui a base da espectroscopia.

O tipo de grandeza física que se deseja analisar indicará qual deverá ser a técnica espectroscópica a ser utilizada. Em geral, a grandeza que se mede é a intensidade da energia, seja ela absorvida, transmitida, espalhada ou refletida. A espectroscopia pode ser:

- a. Eletromagnética é aquela que relacionada às interações da matéria com radiação eletromagnética.
- b. De elétrons, indicada quando se deseja analisar interações com raios catódicos;
- c. De efeito Auger, é aquela que envolve a medição da energia cinética do elétron como variável;
- d. Acústica, quando envolver frequências sonoras;
- e. Dielétrica, que relaciona a interação da amostra com a frequência de um campo elétrico externo;
- f. Mecânica, quando se deseja analisar a relação da frequência de um stress mecânico externo, como uma torção, uma tração ou uma compressão aplicada sobre uma.

Apesar de sua natureza ser diferente, pode-se citar a espectrometria de massa, que consiste em uma técnica analítica para detectar e identificar moléculas por meio da medição de sua massa.

Os três principais tipos de processo pelos quais uma radiação eletromagnética interage com uma amostra são:

- a. Espectroscopia de absorbância ou de absorbância aparente, na qual se correlaciona a quantidade de energia absorvida por uma amostra em relação aos comprimentos de onda da radiação incidente.
- b. Espectroscopia de emissão consiste na análise da quantidade de energia emitida por uma amostra em função do comprimento de onda absorvido. A absorção pode ser tanto da radiação incidente quanto da reemitida ou espalhada dentro da própria amostra.
- c. Espectroscopia de reflectância, de espalhamento ou de dispersão, consiste na análise da quantidade de energia refletida ou espalhada dentro da amostra em função de

parâmetros tais como o comprimento de onda, o ângulo de incidência e a polarização da radiação incidente.

Há diversas técnicas de análise espectroscópica, tais como: a espectroscopia rotacional ou de micro-ondas; de infravermelho; Raman; UV/visível; de fluorescência ou fluorometria; de raios-X; de plasma ICP; fotoacústica; de absorção atômica; de absorção molecular; de ressonância magnético nuclear; de ressonância magnética eletrônica ou de ressonância paramagnética eletrônica; de Mössbauer e de massa.

Em geral, os equipamentos destinados à análise de radiação eletromagnética são os denominados espectrômetros ou espectroscópios. Eles permitem que seja realizada uma análise físico-química de uma amostra a partir dos espectros. Espectrômetros são compostos por uma fonte de energia radiante, um sistema colimador, um local destinado à amostra, um sistema monocromador e um sistema detector. Espectrofotômetro é um tipo de espectrômetro que utiliza radiação eletromagnética na região visível do espectro, podendo contemplar as regiões UV e IV próximos.

A espectroscopia de reflectância difusa de pele *in vivo* pode fornecer informações morfológicas relacionadas a lesões cutâneas como as dimensões e a distribuição de dispersores. Uma vez que o sinal referente à reflectância difusa detectada é uma superposição da dispersão e da absorção de pigmentos do tecido, o espectro resultante pode revelar informações a respeito dos principais absorvedores de tecidos biológicos como a melanina e a hemoglobina. A partir da reflectância difusa *in vivo* também pode ser utilizada para detectar informações indiretas a respeito de pigmentos de tecidos biológicos como a bilirrubina e a melanina que estão inter-relacionados com condições patológicas. A absorção causada por esses pigmentos ocasiona distorções significantes nos sinais da reflectância difusa que têm alto valor diagnóstico e podem ser aplicadas na avaliação de distúrbios da pele.

Técnicas como a espectroscopia de reflectância difusa surgiram devido à necessidade de haver métodos não invasivos e em tempo real que pudessem auxiliar os médicos a diagnosticar, monitorar e acompanhar o tratamento de lesões cutâneas³⁹.

1.6.1 Método de Suavização de Savitzky e Golay

Em 1964, Savitzky e Golay publicaram um algoritmo de filtragem para suavizar dados ruidosos de espectros por convolução⁴⁰. Eles foram pioneiros na abordagem de mínimos quadrados locais (probabilidade local) ao processo de suavização. As vantagens do método de suavização de Savitzky-Golay (SGS - Savitzky-Golay Smoother)⁴¹, em comparação com os filtros tradicionais, são que ele não apresenta atrasos de modo que os picos e vales dos sinais não se

deslocam, além disso, ele é capaz de interpolar pequenos trechos de dados faltantes com relativa acurácia. O princípio do SGS é o ajuste de um polinômio de baixa ordem por um intervalo de dados, ou janela da amostragem, mantendo o valor ajustado no meio do intervalo. Ao se mudar o intervalo para a direita, o processo se repete, até que todos os valores a serem suavizados tenham sido computados. É importante prestar atenção especial em regiões com valores faltantes e com os cálculos nos limites do domínio de dados ⁴².

A ideia central da suavização polinomial por mínimos quadrados consiste em considerar uma amostra de $x(n)$ pontos experimentais e uma janela amostral de $2M + 1$ amostras centradas em $n = 0$. Então, podem ser obtidos os coeficientes a_k de um polinômio da forma:

$$p(n) = \sum_{k=0}^N a_k \cdot n^k \quad (11)$$

Que minimiza o erro de aproximação do quadrado médio para o grupo de amostras centradas em $n = 0$:

$$\epsilon_N = \sum_{n=-M}^M [p(n) - x(n)]^2 = \sum_{n=-M}^M \left[\left(\sum_{k=0}^N a_k \cdot n^k \right) \cdot x(n) \right] \quad (12)$$

Pode-se referir a M como sendo a “meia largura” do intervalo de aproximação. A condição inicial, $y(0)$, será o valor de saída em $n = 0$, e será:

$$y(0) = p(0) = a_0 \quad (13)$$

Então, o valor de saída será igual ao coeficiente a_0 do polinômio. Em geral, a aproximação não precisa ser simétrica em relação ao ponto de avaliação. Isso permite a utilização de filtros não lineares que podem ser úteis para suavizar as extremidades de sequências de entrada. O valor de saída, na próxima janela de amostragem, será obtido ao se deslocar o intervalo para a direita e redefinindo a posição média do novo bloco de amostra, $2M + 1$, e repetindo o ajuste polinomial e a avaliação central. Esse processo deve ser repetido em cada janela amostral de entrada, produzindo, a cada vez, um novo polinômio de saída $y(n)$.

O artigo original de Savitzky e Golay⁴⁰ mostrou que, em cada posição, o valor de saída suavizado obtido por amostragem do polinômio ajustado é idêntico a uma combinação linear fixa

do conjunto local de amostras de entrada $2M + 1$, dentro do intervalo de aproximação e é, efetivamente, uma combinação de um conjunto fixo de coeficientes de ponderação que podem ser calculados um vez definida a ordem polinomial N e o comprimento do intervalo de aproximação $2M + 1$. Então, os valores de saída das amostras podem ser calculados por uma convolução discreta da forma:

$$y(n) = \sum_{m=-M}^M h(m)x(n-m) = \sum_{m=n-M}^{n+M} h(n-m)x(m) \quad (14)$$

Para demonstrar que é possível determinar uma única resposta de impulso de duração finita que seja equivalente à suavização polinomial pelo método dos mínimos quadrados para todos os intervalos de amostragem $2M + 1$, deve-se determinar os coeficientes ótimos do polinômio na equação (11), diferenciando $\epsilon(N)$, na equação (12), em relação a cada um dos $(N + 1)$ coeficientes e definindo a derivada igual a zero. Então, para $i = 0, 1, \dots, N$:

$$\frac{\partial \epsilon_N}{\partial a_i} = \sum_{m=-M}^M 2n^i [\sum_{k=0}^N a_k n^k - x(n)] = 0 \quad (15)$$

Que, trocando a ordem dos somatórios, torna-se um conjunto de $N + 1$ equações com $N + 1$ incógnitas:

$$\sum_{k=0}^N (\sum_{n=-M}^M n^{i+k}) \cdot a_k = \sum_{n=-M}^M n^i x(n), \quad i = 0, 1, \dots, N \quad (16)$$

Essas equações são conhecidas como as equações normais para o problema de aproximação pelo método dos mínimos quadrados. É importante notar que a obtenção de uma única solução requer que se tenha uma quantidade de dados experimentais na ordem de grandeza da quantidade de coeficientes na aproximação polinomial. Ou seja, é necessário que $N \leq 2M$.

1.7 ESPECTROSCOPIA DE TECIDOS

Kollias e Baqer ⁴³ realizaram um trabalho no qual são apresentadas as características de absorção da melanina humana com comprimentos de onda na faixa entre 620 nm e 720 nm a partir

de espectroscopia de reflectância. Foi estudada a espectroscopia da melanina medindo-se os espectros de pele normal e de pele acometida com vitiligo de voluntários. A hipótese era a de que as diferenças espectrais entre áreas adjacentes de pele normalmente pigmentada e de pele amelanótica só poderiam ser devido a variações do filtro de melanina. Para tanto, foi utilizada uma técnica de uso de um espectrômetro de reflectância. As análises foram realizadas filtrando os espectros em relação à hemoglobina e à melanina. Eles determinaram que, para pele de voluntários com vitiligo, o coeficiente de absorção multiplicado pela concentração de melanina pode ser descrito por:

$$a(\lambda).c = C_1 + C_2\lambda \quad (17)$$

Onde o coeficiente angular, C_2 , é proporcional ao coeficiente linear, C_1 , e a concentração de melanina, c , fator relacionado à pigmentação da pele, pode ser descrita como sendo:

$$c = C_1 \quad (18)$$

Van Gemert *et al*¹ realizaram uma revisão bibliográfica relacionada com a dosimetria para fototerapias com laser em pele. Foi analisada a óptica tecidual, distinguindo entre os casos de absorção predominante, dispersão dominante e dispersão, aproximadamente, igual à absorção. Foram descritos trabalhos publicados que continham dados sobre o estrato córneo, a epiderme e a derme. Esses dados foram analisados em termos dos coeficientes de absorção, de dispersão e o do fator de dispersão anisotrópica. A partir dos observa-se que as camadas de pele individuais apresentaram uma dispersão fortemente progressiva, com fatores de anisotropia entre 0,7 e 0,9. Os dados de absorção e de espalhamento mostram que, para todos os comprimentos de onda, a dispersão é muito mais importante do que a absorção. Eles assumiram que tanto epiderme quanto a derme teriam índices de refração na faixa entre 1,37 e 1,50.

Cheong *et. Al*⁴⁴, apresentaram uma compilação de trabalhos publicados sobre as propriedades ópticas como absorção, dispersão, atenuação total, atenuação efetiva, e coeficiente de anisotropia, de vários tecidos biológicos, *in vitro*, para diferentes comprimentos de onda. A maior parte dos trabalhos apresentam as relações entre os parâmetros de Kubelka-Munk e os coeficientes de transporte. Para $\lambda = 694 \text{ nm}$, o coeficiente de absorção da derme é de $6,8 \text{ cm}^{-1}$, e para a epiderme, de $25,7 \text{ cm}^{-1}$.

Wilson e Jacques⁴⁵ apresentam uma discussão sobre medições ópticas diagnósticas e dosimétricas em medicina e biologia, abrangendo as propriedades ópticas dos tecidos, as condições

dos contornos dos tecidos e as medidas invasivas em relação às não invasivas. Também se discute as aplicações clínicas de dosimetria terapêutica e diagnóstica. Além disso, são apresentados os princípios da reflectância difusa e das medidas de transmitância. Eles sugerem que, para estudar a hemoglobina, bastaria analisar o espectro de espalhamento difuso na faixa entre 577 nm e 805 nm, na qual estão os picos de absorção da hemoglobina e da oxihemoglobina.

Em 1993, Prahl *et al* ⁴⁶ descrevem um método para determinar propriedades ópticas de meios túrbidos como espalhamento, absorção e dispersão anisotrópica, utilizando reflexão total a partir de uma esfera integradora, estudaram a transmissão não difundida e transmissão total. Esse método se aplica à propagação de luz por camadas homogêneas de meios túrbidos. Neste trabalho, o coeficiente de absorção para a pele foi dado por $(115 \pm 02) \times 10^{-2} \text{cm}^{-1}$.

Em 1997, Tuchin ^{19,47} realizou uma revisão sistemática sobre a óptica de tecidos. Foram discutidas as propriedades ópticas de tecidos espalhadores como a pele, tecidos cerebrais, paredes de vasos sanguíneos e tecidos de alta transparência. Foram encontradas análises a partir da teoria do transporte de radiação e a simulação de Monte Carlo para descrever a propagação da luz, em especial, o laser. Também são discutidos métodos para determinar parâmetros ópticos de tecidos biológicos.

Em 2001, Zonios *et al* ²⁹ apresentam uma técnica para examinar a pele humana, com base na medição, *in vivo*, dos espectros de reflectância difusa nas faixas visíveis e do infravermelho próximo do espectro eletromagnético. Foram realizadas avaliações quantitativas da pele em relação à concentração de hemoglobina e de melanina, assim como das propriedades de dispersão de luz. Os espectros foram obtidos por intermédio de uma sonda de fibra óptica e foram analisados utilizando um modelo analítico de difusão de luz na pele.

Em 2005, Bashkatov *et al* ^{20,48} descrevem as propriedades ópticas de pele humana, tecido adiposo subcutâneo e mucosa humana medidas no intervalo entre 400nm e 2000 nm. Medidas por intermédio de espectrofotômetro com uma esfera integradora. Foram determinados os coeficientes de absorção e de espalhamento reduzido, utilizando o método inverso de duplicação de adição.

Em 2006, Zonios e Dimou ⁴⁹ descrevem a utilização de espectroscopia de reflectância difusa, na faixa espectral entre o visível e o IV próximo como sendo uma técnica eficaz e extensivamente utilizada para o estudo não invasivo e caracterização de vários tecidos biológicos. Apresenta-se uma revisão sobre as técnicas de modelagem disponíveis para analisar a reflectância difusa a partir de espectro obtidos a partir de um meio túrbido semi-infinito.

Em 2009, Wilson *et al* ⁵⁰ e Brown ⁵¹ descrevem um modelo empírico desenvolvido para interpretar as diferenças entre as técnicas de reflectância mediada e espectroscopia de fluorescência de tecidos pancreáticos humanos. O modelo forneceu as primeiras ligações

quantitativas entre medições espectroscópicas e características histológicas no pâncreas humano. O modelo de reflectância propiciou a obtenção dos coeficientes de absorção e de espalhamento reduzido para tecidos humanos normais e doentes. O método desenvolvido é simples, intuitivo e potencialmente útil para uma variedade de aplicações no diagnóstico de tecido óptico. Esta abordagem é potencialmente aplicável a estudos *in vivo*, pois pode explicar os efeitos absorventes do sangue nos tecidos.

Em 2010, Jacques ⁵² descreve como as ópticas de tecidos podem afetar a dosimetria da fototerapia com luz entre o vermelho e o IV próximo durante a PDT.

Em 2011, Sandell e Zhu ³¹ afirmam que se faz necessária uma compreensão completa das propriedades ópticas dos tecidos biológicos para que o planejamento de fototerapias seja efetivo. Novas tecnologias como, por exemplo, a espectroscopia difusa de banda larga, foram desenvolvidas para obter dados, *in vivo*, em seres humanos. Determinou-se que o coeficiente de absorção varia na faixa entre $0,03 \text{ cm}^{-1}$ e $1,6 \text{ cm}^{-1}$, e que o coeficiente de espalhamento reduzido varia no intervalo entre $1,2 \text{ cm}^{-1}$ e 40 cm^{-1} , apesar de que se deve considerar que o alcance real depende do tipo de tecido. Também foram analisadas as relações entre a tendência geral do espectro de absorção (para μ_a e μ'_s) como função do comprimento de onda, em um intervalo de confiança de 95% para vários tecidos *in vivo*.

Em 2011, Bashkatov *et al* ³² apresentam uma revisão sistemática com uma visão geral das propriedades de absorção e dispersão da pele e tecidos subcutâneos publicadas, medidos em ampla faixa de comprimento de onda. São delineados os princípios básicos das medidas das propriedades ópticas teciduais e as técnicas utilizadas para o processamento dos dados medidos.

Em 2011, Lister *et al* ⁵³ realizaram uma pesquisa da literatura relacionada com a análise das propriedades ópticas da pele humana, com especial atenção às suas aplicações em medicina. Foi incluída uma descrição das interações primárias da luz com a pele e como estas são comumente estimadas usando a teoria da transferência radiativa. São listados os coeficientes de absorção e de espalhamento reduzido publicados. As causas para essas discrepâncias são discutidas em detalhes, incluindo contrastes entre dados adquiridos *in vitro* e *in vivo*.

Em 2013, Jacques ⁵⁴ realizou uma revisão sistemática sobre as propriedades ópticas de tecido e apresenta um resumo sobre o comportamento da onda de espalhamento e de absorção. As fórmulas são apresentadas para gerar as propriedades ópticas de um tecido genérico com quantidades variáveis de cromóforos absorventes como sangue, água, melanina, gordura e pigmentos amarelos.

Em 2015, Jacques ⁵⁵ apresenta um novo artigo em que avalia a quantidade de melanina e o conteúdo sanguíneo da pele a partir de espectros de reflectância difusa total, $R(\lambda)$, onde λ

é o comprimento de onda. Uma análise espectral rápida usando apenas três comprimentos de onda (585 nm, 700 nm e 800 nm) é apresentada, com base em um trabalho de 1985 de Kollias e Baqer ⁴³ que documentou a melanina epidérmica da pele usando a densidade óptica (OD) entre 620 nm e 720 nm. O artigo descreve o caráter não retilíneo de uma análise tão rápida e mostra que quase qualquer escolha de dois comprimentos de onda na faixa de 600 nm a 900 nm pode caracterizar quantidade de melanina.

Em 2016, Fukutomi *et al* ⁵⁶ descreveram que o fator de anisotropia g , uma das propriedades ópticas dos tecidos biológicos, tem uma forte influência no cálculo do coeficiente de espalhamento μ_s em simulações inversas de Monte Carlo. Eles relataram que g depende do comprimento de onda e da absorção. No entanto, foram realizadas poucas tentativas para calcular μ_s usando valores g , levando em conta o comprimento de onda e a dependência da absorção. Neste estudo, as distribuições angulares de luz espalhadas para modelos fantasma de tecido biológico contendo hemoglobina como absorvente de luz foram medidas por uma configuração óptica de goniometria, com comprimento de onda fortemente absorventes em 405 nm e fraca em 664 nm, para obter o fator de anisotropia.

Em 2016, Wright *et al* ⁵⁷ analisaram os efeitos da melanina com relação ao excesso de exposição à radiação ultravioleta solar (UV) e seus efeitos adversos relacionados à saúde. Foi utilizada a espectroscopia de reflectância difusa (DRS) para calcular a quantidade de melanina cutânea e eritema, mas isso é complexo e tem sido usado principalmente para a pele com pigmentação de leve a média. Também foi utilizado um espectrofotômetro de reflectância de mão. Foram comparados os valores obtidos tanto para melanina quanto para eritema calculados a partir da DRS com os do espectrofotômetro manual. Dos quinhentos e três participantes, havia 68,5% de negros-africanos auto identificados, 9,9% de indianos ou asiáticos, 18,4% brancos e 2,9% coloridos. Os níveis de melanina medida aumentaram com a cor da pele autorrelatada mais escura. Os resultados de ambos instrumentos mostraram que os valores do eritema estavam fortemente correlacionados com seus próprios valores de melanina. Este achado é considerado espúrio e pode resultar da complexidade de separar o pigmento marrom e vermelho ao usar técnicas de reflectância de banda estreita.

Em 2016, Petruk *et al* ^{58,59} descreveram uma configuração experimental baseada em duas esferas integradoras, que permitiu medir rapidamente os espectros de reflectância óptica difusa, (coeficiente de refluxo difuso em função do comprimento de onda) da pele humana em condições clínicas *in vivo*. Para a faixa de comprimento de onda entre 520 nm e 1100 nm, foram determinados os valores do coeficiente de reflexão difusa para tecido saudável, pele com nevo benigno e pele com melanoma maligno para uma amostra grande de indivíduos. Foi

estabelecida, experimentalmente, uma série de comprimentos de onda na região do espectro que pode ser usada para o diagnóstico precoce diferencial de nevos e melanomas na triagem de câncer de pacientes.

Em 2017, Cortés *et al*⁶⁰ descreveram seu trabalho no qual a espectroscopia visível e de infravermelho próximo foi utilizada como técnica não invasiva e de avaliação rápida para o controle de qualidade dos produtos agrícolas. Neste estudo, 325 amostras de nectarinas foram analisadas por espectroscopia de reflectância difusa do visível e do infravermelho próximo. Os dados espectros foram tratados previamente e analisados para prever a qualidade interna das amostras e discriminar entre as duas variedades. Os espectros brutos de cada um dos três dispositivos de medição foram normalizados dividindo cada variável pelo seu desvio padrão. Desta forma, as intensidades espectrais foram redimensionadas para uma faixa comum, permitindo comparar os espectros adquiridos usando diferentes equipamentos com diferentes resoluções. Então, os espectros foram transformados em valores de absorbância aparente:

$$A = \log_{10}(1/R) \quad (19)$$

Desta forma é possível linearizar a correlação com a concentração dos constituintes⁶¹. Além disso, foram aplicadas duas técnicas de pré-processamento: o método SGS com uma lacuna de três pontos de dados combinado com correção de dispersão multiplicativa estendida (EMSC)^{62,63}.

1.8 FOTOTERAPIAS

A fototerapia com luz em baixa intensidade (LLLT, acrônimo do inglês para **Low Level Light Therapy**), em tecidos biológicos, pode ser dividida em dois tipos: fotobiomodulação (FBM, acrônimo do inglês para “**photobiomodulation**”) e terapia fotodinâmica (PDT – acrônimo do inglês: “**photodynamics therapy**”).

Denomina-se dosimetria ao conjunto de parâmetros físicos associados à radiação. Ela é a medida da energia ou da potência de radiação fornecida a um sistema ou da dose absorvida por ele. A questão que norteia a dosimetria, quando da aplicação de uma fototerapia, é justamente determinar quanto da dose aplicada é efetivamente absorvido pelo tecido biológico alvo. Deve-se considerar que grande parte dos tecidos biológicos são heterogêneos e compostos por diferentes absorvedores de luz que dependem do comprimento de onda da radiação incidente.

Dentre os parâmetros físicos envolvidos na dosimetria considera-se:

- a Comprimento de onda (em nanometro, $nm = 10^{-9} m$);
- b Energia (em joule, J);
- c Exposição radiante efetiva (quantidade de energia por unidade de área irradiada, em joule por centímetro quadrado, J/cm^2);
- d Potência efetiva (quantidade de energia por unidade de tempo, em watt, W);
- e Irradiância efetiva (quantidade de potência por unidade de área, em watt por centímetro quadrado, W/cm^2); e
- f Tempo de exposição (em segundos, s).

No caso de lasers pulsados, também devem ser considerados a taxa de repetição, a largura de pulso, o ciclo útil, a potência média e o modo de aplicação. A frequência e a duração do tratamento também devem ser consideradas.

O sucesso de uma fototerapia dependerá de quanto da energia entregue ao tecido esteja com a irradiância adequada para que seja obtido o tempo ideal de aplicação. A dosimetria, ou seja, a definição desses parâmetros não é uma tarefa simples. Quantificar quanto da energia aplicada será absorvida por um determinado tecido leva a outro obstáculo: como quantificar a energia necessária para desencadear o efeito esperado.

A compreensão do comportamento da luz incidente sobre tecidos biológicos é muito importante, pois os coeficientes de absorção e de espalhamento de um tecido sinalizam para uma série de efeitos da interação radiação-tecido. Assim, a efetividade de uma fototerapia dependerá da quantidade e da distribuição da luz no tecido alvo. A absorção da radiação dependerá, principalmente, da constituição do tecido ⁶⁴⁻⁶⁹.

Os princípios que indicam a probabilidade de que um efeito fotobiológico ocorra são ⁷⁰:

- A radiação incidente deve ser absorvida pelo sistema biológico para que se produza uma alteração física e/ou química, que ocasione em uma resposta biológica;
- Deve-se conhecer o espectro de absorção de um sistema biológico, ou seja, quais são os níveis energéticos de suas partículas para que se possa irradiar o sistema com comprimentos de onda que tenham chances de ser absorvidos pelo sistema e que possam gerar um efeito biológico.

18.1 Fotobiomodulação (FBM)

Fotobiomodulação é a técnica que se utiliza LLLT em tecidos biológicos de modo que a radiação interaja com cromóforos endógenos ⁷¹. Os principais cromóforos na região da janela

óptica terapêutica são a hemoglobina, em suas formas oxi e deoxihemoglobina, e a melanina^{32,48,53}. A FBM pode fotoestimular ou fotoinibir a função celular, reduzir a morte celular e de tecidos, auxiliar no processo de cicatrização, aumentar o processo de reparo de dano a tecido mole, nervos, osso e cartilagem. Além disso, a FBM tem efeito anti-inflamatório e analgésico, aliviando dores agudas e crônicas^{72,73}.

O primeiro marco no uso terapêutico da luz ocorreu em 1895, quando o médico dinamarquês, Niels Ryberg Finsen (1860-1904), utilizou luz para tratar várias doenças humanas, especialmente lupus vulgaris⁷⁴. Ele recebeu o Prêmio Nobel em medicina e fisiologia em 1903 por sua demonstração pioneira de que os raios concentrados da luz solar poderiam ser bactericidas e estimular o tecido circundante.

O segundo maior marco no uso terapêutico da luz foi a invenção da tecnologia laser, no início de 1960. Em 1967, o médico húngaro, Endre Mester (1903-1984), foi pioneiro ao estudar os efeitos do laser em baixas doses. Ele observou que havia aumento no crescimento de pelos em ratos a uma taxa acelerada, além de promover cicatrização de feridas^{25,75}.

Com o passar do tempo, muito tem sido aprendido sobre a base desta terapia, incluindo um fato fundamental de que a aplicação de luz em tecidos e órgãos pode provocar respostas tanto estimuladoras como inibidoras, dependendo dos parâmetros de luz utilizados e dos cromóforos envolvidos.

Apesar de não existir um consenso geral sobre a ocorrência da fotobioestimulação, ainda está por ser esclarecida a forma como a interação entre a radiação e um tecido biológico pode ocasionar fotobioestimulação. Atualmente, há duas hipóteses sendo consideradas e estudadas.

Na primeira, proposta por Karu^{23,76} em 1988, considera que a fotoexcitação induz mudanças na atividade do citocromo c oxidase, a principal molécula fotorreceptora, localizada nas mitocôndrias.

Na segunda hipótese, outras moléculas não fotossensíveis, mas que também estão presentes nas mitocôndrias, sejam alvo da radiação. Sugere-se que sejam prováveis mediadores de uma variedade de modificações na bioquímica celular, incluindo enzimas, ácidos nucleicos, nucleótidos de adenina e alguns metabólitos.

Apesar de ainda não haver comprovação de como realmente ocorre a fotobioestimulação, pode-se afirmar que a interação de radiação em baixa intensidade com cromóforos endógenos é capaz de desencadear modificações na bioquímica de tecidos, em células intactas, componentes celulares e biomoléculas, o que permite a aplicação de FBM em fotomedicina, bem como em uma variedade de aplicações biotecnológicas.

Atualmente, a FBM é realizada com laser ou LED em baixa intensidade, operando dentro na região da janela terapêutica óptica, entre 650 nm e 1100 nm ³³, para tratar de forma não destrutiva e não térmica uma variedade de alvos biológicos.

182 Terapia Fotodinâmica (PDT)

Há mais de 4000 anos, os egípcios usavam uma combinação de uma planta de Amni Majus ingerida oralmente com a luz solar para tratar o vitiligo, um distúrbio de pele de uma causa desconhecida. O ingrediente ativo da Amni Majus é o psoraleno, atualmente empregado com sucesso no tratamento da psoríase.

Os primeiros relatos de utilização da Terapia fotodinâmica contemporânea remontam a pesquisas realizadas no final do século XIX ⁷⁷. O médico dinamarquês, Niels Ryberg Finsen (1860-1904), realizou, com sucesso, uma fototerapia utilizando a luz filtrada de uma lâmpada de arco de carbono, a lâmpada Finsen, no tratamento de uma tuberculose de pele conhecida como lupus vulgaris.

No início do século XX, a equipe do médico e farmacologista alemão, Hermann Anton Joseph Franz Xaver Tappeiner (1847-1927), relatou os primeiros casos de utilização da PDT para o tratamento de pacientes com câncer com tumores sólidos.

Em 1913, outro cientista alemão, Meyer Betz, descreveu o principal obstáculo da PDT. Depois de injetar-se com o fotossensibilizador (FS) hematoporfirina (Hp), ele experimentou rapidamente uma sensibilidade geral na pele após exposição à luz solar - um problema ainda persistente com muitos dos FS de hoje (2, 3, 7, 18). Mais estudos, investigando o acúmulo de hematoporfirina e o derivado de hematoporfirina purificado (HpD) em tumores, culminaram no final dos anos 80 com o FS Photofrin.

Os FS mais utilizados são das classes das porfirinas, clorinas e ftalocianinas ^{78,79}. Quando comparado em termos de facilidade de acesso e ao baixo custo em relação aos outros fotossensibilizadores, o cloreto de metiltionínio ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) ou azul de metileno é um dos FS mais utilizados na PDT. O azul de metileno é um medicamento e um corante derivado da fenotiazina ⁸⁰. Quando em solução aquosa, apresenta-se em diferentes concentrações na forma de monômeros e dímeros. O espectro de absorção do azul de metileno apresenta dois picos em 665 nm, referente aos monômeros, e em 580 nm, relativo aos dímeros ⁸¹.

A PDT é um tratamento envolvendo luz e uma substância química fotossensível que, na presença do oxigênio molecular provoca citotoxicidade, podendo levar à apoptose. A PDT é um tipo de tratamento seletivo que visa a destruição local de células ou de tecidos doentes. A seletividade baseia-se na iluminação localizada e na capacidade do FS para se acumular,

preferencialmente, no tecido doente e gerar eficientemente oxigênio singlete ou outras espécies altamente reativas, como os radicais, que induzem a citotoxicidade.

Ao ser exposto à luz, (Figura 5), e na presença de oxigênio, a molécula de FS passa do estado fundamental para um primeiro estado singlete excitado, em um processo rápido entre 10^{-7} s e 10^{-5} s. Esse, por sua vez, pode retornar para o estado fundamental ou pode passar por um relaxamento para um estado triplete de energia ligeiramente menor, mas em um processo lento entre 10^{-4} s e 10s. O estado triplete reage por intermédio de caminhos fotoquímicos de tipo I, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS, acrônimo do inglês para “reactive oxygen species”), como o radical superóxido ($\cdot O_2^-$), com meia vida na ordem de 2 a 4 milissegundos, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com meia vida na ordem de um milissegundo e o radical hidroxila ($\cdot OH^-$), com meia vida na ordem de nanossegundos; ou de tipo II, para produzir oxigênio singlete (1O_2), com meia vida na ordem de centenas de nanossegundos, levando à citotoxicidade ⁸².

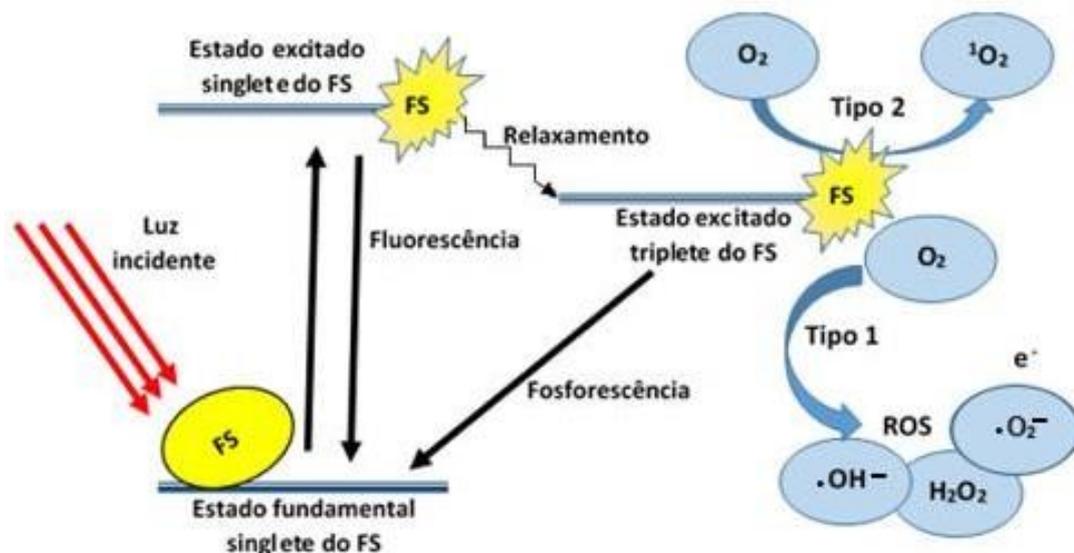


Figura 5 – Visão esquemática do Diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado a partir de Dai *et al.* (55).

A PDT é um processo constituído por vários estágios. No primeiro, administra-se um FS com toxicidade desprezível no tecido, seja de forma sistêmica ou tópica, na ausência de luz. Quando a proporção ótima de FS é alcançada no tecido doente, ele é ativado ao ser exposto a uma energia controlada de luz que incide diretamente na região do tecido doente, por um período de tempo especificado. Os parâmetros da luz são regulados para permitir que uma

quantidade suficiente de energia seja entregue para ativar o FS. O intervalo de tempo da exposição deve ser pequeno o suficiente para minimizar os danos infligidos ao tecido saudável vizinho. A forma ativada do FS ocasiona uma resposta tóxica no tecido, ocasionando apoptose, necrose ou autofagia. O sucesso da PDT está relacionado à composição entre a fonte luminosa e a concentração de FS no tecido doente^{82,83}.

A PDT é utilizada no tratamento de doenças como, por exemplo, diversos tipos de câncer, incluindo os presentes na cabeça, no pescoço, nos pulmões, na bexiga e na pele. Ela também foi utilizada com sucesso no tratamento de condições não cancerosas, como a degeneração macular relacionada à idade, a psoríase, a aterosclerose, além de demonstrar certa eficácia em tratamentos antivirais, incluindo herpes^{31,82,83}.

1.9 PELE

Pele ou *cúrtis* é o maior órgão do corpo humano. Ela é responsável pela proteção dos tecidos subjacentes, pela manutenção da temperatura corporal e da humidade e pela reserva de nutrientes. Em linhas gerais, a pele humana é idêntica em todos os grupos étnicos, na qual a quantidade de melanócitos é praticamente a mesma em todos os indivíduos, porém eles produzem mais melanina em indivíduos de pele mais escura, do que naqueles de pele clara.

A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo ou hipoderme (Figura 6)^{84,85}.

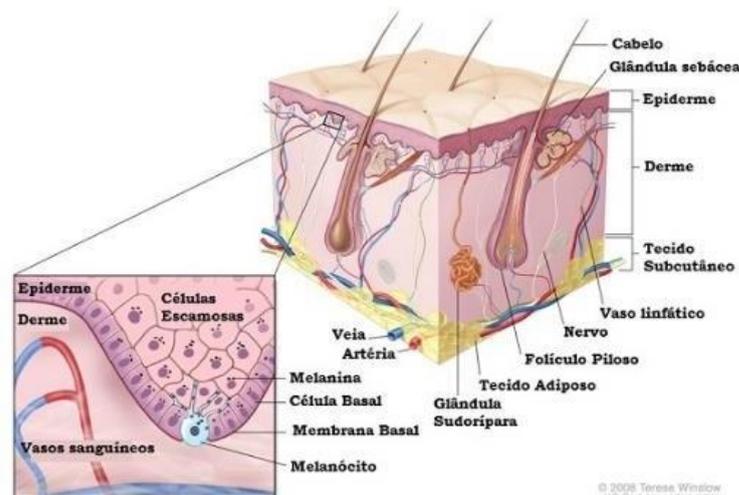


Figura 6 – Imagem esquemática de pele humana com suas três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo e suas principais estruturas. Imagem obtida do site <https://www.teresewinslow.com/skin/rrw12kvqo9r3oxymwqo5a6tywltxn> , acessado em 09/03/2018.

191 Epiderme

Epiderme é a camada mais superficial da pele. Ela está em contato direto com o meio externo, constituída por epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado, de origem ectodérmica, ela se renova continuamente. Sua espessura varia entre 0,04 mm e 1,5 mm, dependendo da região e da topografia. Ela é avascular e sua nutrição deriva de capilares dérmicos.

A epiderme é constituída por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado com várias camadas sobrepostas, resultante da proliferação basal de diversos queratinócitos suprabasais⁸⁶. Queratinócitos são células diferenciadas do tecido epitelial. A epiderme é subdividida em cinco estratos ou camadas, que são:

- a. Estrato basal ou germinativa é o mais profundo. Ele apresenta atividade mitótica e é constituído por uma única camada de células cúbicas que estão localizadas entre a derme e a epiderme. Os queratinócitos resultantes da divisão celular nessa camada, sofrem diferenciação ao serem empurrados para os estratos superiores, sintetizando quantidade crescente de queratina no seu citoplasma. O tempo de vida médio de uma célula do estrato basal é de, aproximadamente 26 dias, até atingir o estrato córneo. Melanócitos são células localizadas no estrato basal. De origem ectodérmica eles sintetizam pigmento melânico. Seus dendritos se estendem por longas distâncias na epiderme, estando em contato com muitos queratinócitos para os quais transfere melanina.
- b. Estrato espinhoso ou capa de Malpighi está localizado acima da camada basal. Ele é constituído por múltiplas fileiras de queratinócitos que apresentam prolongamentos citoplasmáticos, aplanados e unidos entre si por tonofilamentos. Constitui o estrato mais desenvolvido da epiderme por conter várias camadas de células.
- c. Estrato granuloso é constituído por até cinco camadas de células achatadas com o núcleo alongado que são os grânulos de queratina. A intensa basofilia citoplasmática é causada pelos inúmeros grânulos de querato hialina contidos nestas células;
- d. Estrato lúcido é caracterizado por ser muito delgado identificado por forte acidofilia, situado entre o granuloso e o córneo. A maior parte de suas células não possui núcleo.
- e. Estrato córneo (EC) ou camada córnea é composto por células mortas delgadas que perderam o núcleo formando a queratina. Existem duas formas de queratina. A queratina líquida que cobre a superfície cutânea e que constitui a maior parte do estrato córneo. A queratina dura forma os pelos e as unhas. Estruturalmente, o EC é

uma camada heterogênea fina (~ 15 µm) e compreende camadas de células epidérmicas terminalizadas, diferenciadas e queratinizadas separadas por um domínio lipídico intercelular.

192 Derme

Derme é a região mais profunda da pele. Ela é composta por tecido conjuntivo fibroelástico altamente vascularizado que serve de apoio para extensas redes vasculares e nervosas e anexos cutâneos que derivam da epiderme. Seus principais componentes são o colágeno, para resistência, a elastina, para elasticidade, e os proteoglicanos, substâncias amorfas em torno das fibras de colágeno e das elastinas. A derme apresenta duas camadas, o estrato reticular e o estrato papilar^{87,88}, que são:

- a. Estrato reticular é a região mais profunda da derme. Ele é composto por fibrócitos, formando tecido conjuntivo denso não modelado e é responsável por preencher e sustentar os estratos superiores da pele. O estrato reticular é rico em fibras colágenas espessas que se apresentam de forma dispersa, irregularmente, entremeadas por capilares sanguíneos.
- b. Estrato papilar está localizado abaixo da epiderme e é constituído por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado que, em alguns locais, projeta-se na epiderme e forma as papilas dérmicas. As fibras elásticas são delicadas e não podem ser identificadas por HE assim como os macrófagos aí presentes. Podem ser encontrados todos os tipos celulares encontrados no tecido conjuntivo.

A derme contém diversos tipos de células, incluindo fibroblastos, fibrócitos, macrófagos teciduais, melanófagos, mastócitos e leucócitos sanguíneos como neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos⁸⁹.

O suprimento vascular da pele é limitado à derme e é subdividido em plexo profundo e plexo superficial. Estes plexos correm paralelamente à superfície cutânea e estão interligados por uma rede de vasos comunicantes dispostos perpendicularmente.

193 Espessura da pele

Oriá *et al*⁹⁰ descrevem um processo em que foram medidas as espessuras da epiderme e da derme de pele da região abdominal, *ex-vivo*, de pessoas de ambos os sexos, divididas por grupos de idades: até 20 anos; entre 20 e 60 anos e acima de 60 anos, apresentadas na **Tabela 3**.

Com o tempo, a espessura da pele tende a se reduzir. Na derme, as alterações de espessura são mais pronunciadas do que na epiderme.

Na epiderme, a espessura do estrato córneo praticamente não se altera com a idade. Há estudos que demonstram que o estrato espinhoso de rugas é mais fino na base do que nas bordas pois poucos grânulos de querato-hialina estariam presentes na base do enrugamento em comparação com as bordas. Na pele envelhecida, o estrato basal apresenta-se achatado com uma área de conexão da derme com a epiderme diminuída. Tal perda de área de superfície de conexão pode contribuir para o aumento da fragilidade da pele associada à idade e, também, pode levar à redução da transferência de nutrientes entre as duas camadas. Outras mudanças importantes relacionadas à idade ocorrem na camada epidérmica. Entre a terceira e a oitava décadas de vida, a taxa de rotatividade epidérmica diminui de até 50%. O tempo de trânsito do estrato córneo passa de 20 dias, em adultos jovens, para até 30 dias ou mais, em adultos mais velhos. Esse aumento no ciclo celular em adultos mais velhos coincide com uma taxa prolongada de substituição do estrato córneo, atrofia epidérmica, cicatrização mais lenta e descamação menos efetiva⁹¹.

Tabela 3 - Espessuras médias de epiderme e de derme de pele de abdome humano⁹¹.

Idade	Espessura (média ± DP) mm	
	Epiderme	Derme
Até 20 anos	0,094 ± 0,003	2,716 ± 0,217
Entre 20 e 60 anos	0,080 ± 0,006	2,687 ± 0,112
Acima de 60 anos	0,059 ± 0,006	1,798 ± 0,306

A espessura da derme pode reduzir em até 20% com o passar do tempo. Ocorrem alterações na produção de colágeno e no desenvolvimento de fibras. Ao envelhecer, a derme apresenta fibrilas de colágeno desorganizadas e acúmulo de material contendo elastina anormal.

Componente estrutural primário da derme e proteína mais abundante encontrada em seres humanos, o colágeno é responsável por conferir força e suporte à pele humana. Ao longo do tempo, as proteínas estruturais e os principais componentes da pele deterioram-se, resultando nos sinais cutâneos do envelhecimento. Na pele jovem, o colágeno I compreende 80% e o colágeno III compreende cerca de 15% do colágeno total da pele. Na pele mais envelhecida, a proporção de colágeno tipo III para tipo I aumenta significativamente devido à perda de colágeno I.

Fibras elásticas envelhecidas da pele apresentam diminuição na elasticidade e na resiliência. Com o tempo, a pele apresenta reação degenerativa caracterizada por mudanças no padrão normal de fibras elásticas imaturas localizadas na derme papilar⁹¹.

194 Escala de Fitzpatrick

A escala Fitzpatrick (FPS, acrônimo do inglês para **Fitzpatrick Scale**), (

Tabela 4), é uma escala semiquantitativa que descreve a cor da pele em relação ao nível de melanina, à resposta inflamatória aos raios UV e ao risco de câncer⁹²⁻⁹⁴.

Tabela 4 – Escala Fitzpatrick e suas características com relação à aparência da pele e reação aos raios UV.

FPS	Aparência	Origem	Reação aos raios UV
I	Pele muito branca, podendo apresentar sardas; olhos azuis ou verdes.	Norte da Europa ou Grã-Bretanha	Queima sempre; descasca; nunca bronzeia
II	Pele branca; olhos azuis ou castanhos; cabelos ruivos, loiros ou castanhos	Europa ou Escandinávia	Queima facilmente; descasca; bronzeia minimamente
III	Pele clara; olhos castanhos e cabelos escuros	Regiões central ou sul da Europa	Queima moderadamente; bronzeamento moderado
IV	Pele marrom claro (morena); olhos e cabelos escuros	Mediterrâneo, Ásia ou latina	Raramente queima; bronzeamento fácil
V	Pele marrom escuro; olhos e cabelos escuros	Leste da Índia, África ou nativos das Américas	Raramente queima; bronzeamento rápido e substancial
VI	Pele negra; olhos e cabelos escuros	África ou aborígine	Quase nunca queima; bronzeamento rápido e profuso

1.10 LÍQUEN ESCLEROSO VULVAR

Em 1887, o médico dermatologista francês, François Henri Hallopeau (1842-1919), descreveu o quadro clínico de uma doente que apresentava pápulas pruriginosas em antebraço e tronco, além de áreas de liquenificação e esbranquiçamento em vulva (Figura 7), que ele classificou como líquen plano atrófico, variante do líquen plano^{95,96}.



Figura 7 – Fotos de pacientes com LEV.

Em 1889, o médico húngaro, Ferdinand-Jean Darier (1856-1938), descreveu o quadro definido por Hallopeau, do ponto de vista histológico, quando observou áreas de esclerose e atrofia aonde deveria haver o infiltrado subepidérmico característico do líquen plano. O termo escleroso o fez sugerir que seria o aspecto histológico da doença, enquanto a atrofia referia-se ao aspecto clínico do mesmo quadro.

Casos similares, definidos por Hallopeau, foram descritos com diferentes denominações por vários autores, sendo que a maioria deles os incluíam no grupo da esclerodermia. Em verdade, Hallopeau foi quem melhor descreveu clinicamente a doença, que passaria a ser conhecida como líquen escleroso, que significa condição de pele seca, enrugada e descamativa.

Em 1987, a Sociedade Internacional para Estudos da Vulva e Vagina (ISSVD) modificou a classificação de doenças de vulva, sugerindo a retirada do termo distrofia hiperplástica, substituindo por hiperplasia de células escamosas. Desde então, o termo distrofia mista foi abandonado e passou a ser reconhecido como líquen escleroso. Os casos que evidenciavam atipia foram caracterizados como neoplasia intraepitelial de vulva, levando a definir que a vulvectomy deveria ser abandonada como terapêutica convencional para doenças benignas da vulva e o tratamento clínico e tópico deveria ser instituído ^{97,98}.

Atualmente, o líquen escleroso vulvar (LEV) é considerado uma dermatose crônica autoimune linfócito mediada que afeta a pele genital causando prurido intenso, escoriações, esbranquiçamento, hiperqueratose e atrofia, sendo que esta pode causar estenose, resultando em vulvodínia, dor às micções e evacuações ^{95,97,99-102}.

Ele configura a segunda causa de doença não neoplásica vulvar, sendo considerada a causa mais comum de doença crônica vulvar com prevalência estimada de 1:300 - 1:1000 ².

A forma genital é de 5 a 10 vezes mais frequente em mulheres (10:1) acima de 50 anos e o acometimento anogenital é de 85% e o extragenital de 15% ^{103,104}.

A doença pode acometer crianças em 15% das vezes e o aspecto clínico é similar ao do adulto, necessitando assim um acompanhamento por longo prazo.

O LEV tem potencial de malignização ao redor de 4% e, por essa razão, é considerado como via de carcinogênese vulvar, sendo possível observar incidência de 32% a 76% de carcinoma escamoso de vulva em adjacência à área afetada pelo líquen.

1.10.1 Tratamento do LEV

O tratamento convencional do LEV é realizado com corticosteroide como, por exemplo, o propionato de clobetasol. Seus efeitos positivos são a imunossupressão, a diminuição da mobilidade dos neutrófilos e dos macrófagos, das citocinas, da ação linfocitária, na produção de anticorpos e de secreção de mediadores inflamatórios e da proliferação fibroblástica e a vasoconstrição, diminuindo eritema e edema.

No entanto, existem efeitos adversos como a atrofia da pele, a ocorrência de estrias permanentes e irreversíveis em áreas de dobra, alterações da imunidade, glaucoma, rosácea e efeitos raros como o hipercortisolismo (Sd Cushing), HAS, diabetes, hirsutismo, hipertricose, síndrome hipocalêmica, hipopigmentação, miliária rubra, laceração e maceração epidérmica e alopecia.

Por tantos possíveis efeitos colaterais, as fototerapias como a PDT e a FBM têm sido utilizadas como terapias alternativas ou coadjuvantes no tratamento do LEV ^{2,105,106}.

1.11 JUSTIFICATIVAS

Consultando a literatura, verifica-se que, até esse momento, não há estudos relacionados à caracterização das propriedades ópticas de pele acometida com líquen escleroso vulvar. Essa ausência de informações dificulta a caracterização da pele com LEV e a definição de protocolos para fototerapias.

Este estudo poderá fornecer subsídios para que se desenvolva métodos para estudar outros tipos de lesões em tecidos relacionados com propriedades ópticas, elucidando fatores importantes relacionados à aplicação da luz para fins terapêuticos.

Ao estudar as propriedades ópticas da pele acometida com LEV, busca-se conhecer a interação predominante da luz ao atingir e penetrar na pele afetada para saber quanto da luz incidente é absorvida e quanto é refletida para diferentes comprimentos de onda aplicados. A hipótese é que alguma propriedade óptica dos tecidos analisados seja alterada durante o tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os espectros de reflectância difusa *in vivo* de pele acometida com LEV em dois momentos: antes e após um mês quando tratada com corticosteroide, fotobiomodulação ou terapia fotodinâmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a relação entre as áreas sob as curvas dos espectros de reflectância difusa a partir da comparação entre três tipos de tratamento em função de cofatores idade das pacientes, tempo de prurido e escala de Fitzpatrick;

Obter o espectro de absorbância aparente de pele acometida com LEV, a partir do espectro de reflectância difusa, em dois momentos: antes e após um mês de tratamento com corticosteroide, FBM ou PDT. Analisar os picos de absorbância na faixa entre 400 nm e 600 nm.

Analisar a concentração de melanina a partir dos espectros de absorbância aparente, na faixa entre 620 nm e 720 nm, em relação ao tipo e momento de tratamento.

3 METODOLOGIA

Esse estudo foi realizado com 15 pacientes do ambulatório do Hospital Pérola Byington, em São Paulo, Brasil. Após ciência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elas participaram desse estudo, aprovado pelo Comitê de Ética sob número (CAAE 34715314.6.3001.0069) e contou com apoio financeiro da FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo nº 2015/05259-8.

Como critérios de inclusão, deveriam ser mulheres com idade maior ou igual a 18 anos, diagnosticadas com líquen escleroso vulvar por método histológico e com nível normal de cortisol confirmado por exame de sangue.

Foram excluídas do estudo mulheres com idade inferior a 18 anos, que estivesse m grávidas ou amamentando; HIV positivo ou manifestando a doença; que estivessem utilizando corticosteroides ou anticoagulantes; que tivessem insuficiência renal, hepática, pulmonar ou cardiovascular e pacientes que tivessem recebido transplante de órgãos nos últimos três anos antes do início do estudo.

Ao recrutar as pacientes para este estudo, foram coletadas informações sobre idade, tempo de prurido e tipo de pele de acordo com a escala de Fitzpatrick.

Foi utilizado o software Minitab® 18, da Minitab, Inc, USA, para separar as pacientes aleatoriamente em três grupos de cinco pacientes cada (Figura 8).

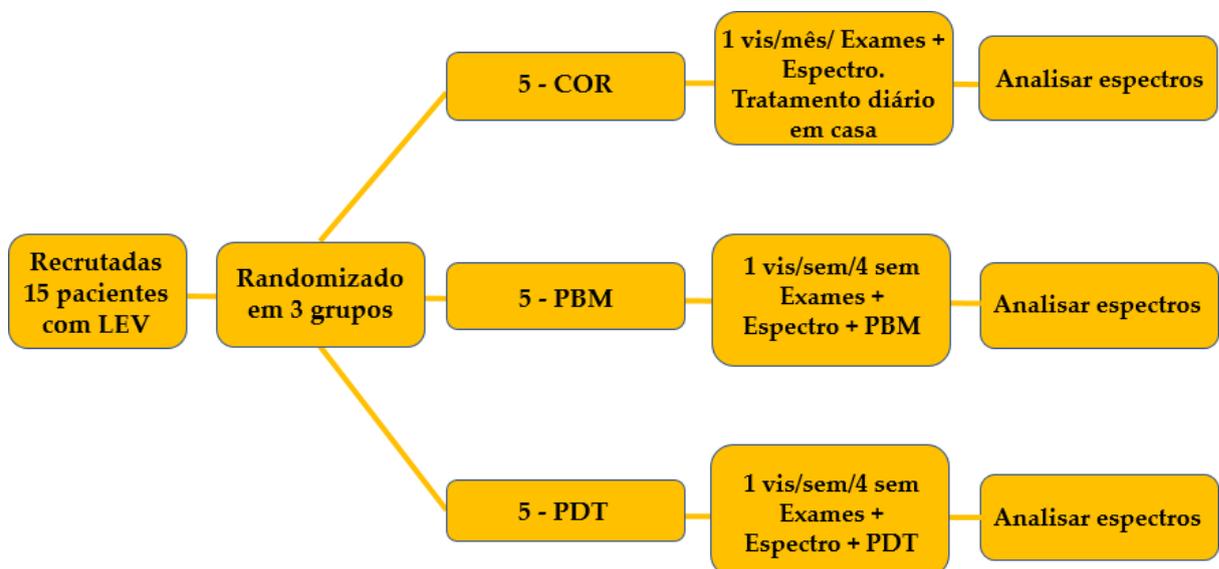


Figura 8 - Organograma das 15 pacientes diagnosticadas com LEV, recrutadas no Hospital Pérola Byington e divididas em três grupos randomicamente.

O primeiro grupo, COR, recebeu tratamento convencional com corticosteroide tópico. Cada paciente foi orientada a utilizar, uma vez por dia, à noite, durante um mês, o conteúdo de um sachê contendo pomada com 1g de propionato de clobetasol 0,05%, na região da vulva.

O segundo grupo, FBM, foi tratado com fotobiomodulação durante um mês, com aplicações ocorrendo uma vez por semana. Em cada sessão de tratamento foram irradiados oito pontos (Figura 9) da vulva com Photon Lase® III, DMC, BR, laser de diodo de InGaAlP, com comprimento de onda de $(660 \pm 10) \text{ nm}$ (Figura 10). Em cada ponto foram aplicados $(100 \pm 5) \text{ mW}$ de potência efetiva, com irradiância efetiva de 510 mW/cm^2 , 4 J de energia, com exposição radiante efetiva de 20 J/cm^2 e por um intervalo de tempo de exposição de 50s.



Figura 9 - Localização dos oito pontos, em azul, de aplicação do laser tanto na FBM quanto na PDT.



Figura 10 - Photon Lase® III. Imagem retirada do site da empresa: <http://www.dmcgroup.com.br/en/detalhe-produto/dental/equipments/laser-therapy/photon-lase-iii/392>, link acessado em 05/11/2017.

A potência efetiva do laser foi aferida antes de cada aplicação nos grupos FBM e PDT, com um medidor de potência Field Max® II – TOP, acoplado a um sensor de termopilha de alto pico PM10V1®, da Coherent Inc., USA, conforme Figura 11. Neste processo, verifico u- se que a potência nominal apresentava pequenas variações quando comparada com a potência medida na extremidade da ponteira.

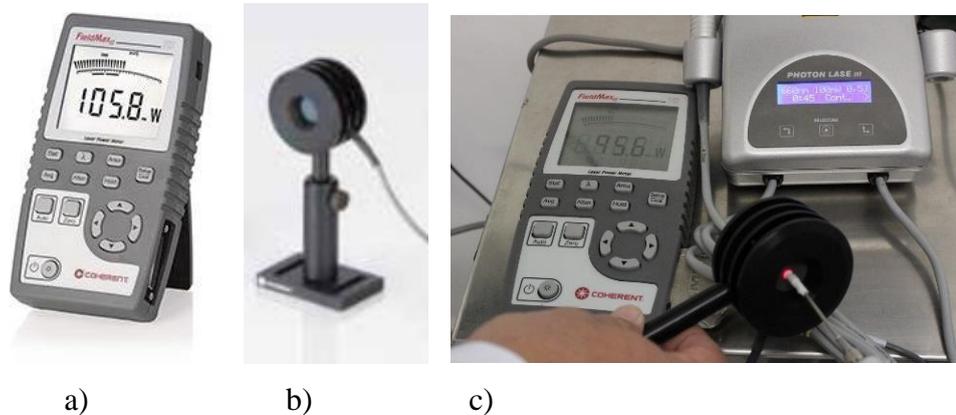


Figura 11 - (a) Medidor de potência; (b) Sensor de termopilha; e (c) Calibração prévia da potência do laser na ponteira da fibra óptica. Imagens obtidas no site da empresa: <https://www.coherent.com/measurement-control/measurement/laser-power-and-energy-meters/fieldmaxii-to>, e <https://www.coherent.com/measurement-control/measurement/sensors-laser-power/high-peak-power-thermopile-sensors-rohs>, links acessados em 05/11/2017.

O terceiro grupo, PDT, foi tratado com terapia fotodinâmica. O tratamento ocorreu uma vez por semana, durante um mês. Foram determinados oito pontos da vulva (Figura 9) a serem tratados. Em cada ponto foi injetado 0,1 mL uma solução de azul de metileno a 0,01% intralesional + lidocaína 2% ². Depois, cada ponto foi irradiado com laser seguindo as mesmas características do grupo FBM.

Para a realização da espectroscopia de reflectância difusa, foi utilizado um espectrofotômetro da Ocean Optics, Inc, USA, constituído por:

- a) Uma fonte de luz modelo HD-2000-BAL® (Figura 12), com duas lâmpadas, sendo uma de deutério e outra halógena de tungstênio, permitindo um intervalo de emissão de comprimentos de onda entre 230 nm e 2500 nm;



Figura 12 - Fonte de luz HD-2000-BAL®. Imagem retirada do site da empresa: <https://oceanoptics.com/product/dh-2000-bal/>, link acessado em 05/11/2017.

- b. Um espectrofotômetro modelo USB 2000+® (Figura 13);



Figura 13 - Espectrofotômetro modelo USB 2000+®. Imagem retirada do site da empresa:

<https://oceanoptics.com/product/usb2000-custom/>, link acessado em 05/11/2017.

- c. Um software Spectra Suite®; e
- d. Uma fibra óptica bifurcada, Premium-grade Reflection Probe®, de 2,0 m de comprimento, modelo QR200-7-UV-VIS (**Figura 14**), com ponteira de aço inox de 76,2 mm de comprimento e 6,35 mm de diâmetro, contendo um feixe de 7 fibras ópticas de 200 μm de diâmetro cada, sendo 6 para iluminação e uma, central, para leitura.



Figura 14 – Imagem da fibra óptica bifurcada utilizada para a obtenção dos espectros de reflectância. No detalhe, abaixo, a extremidade da ponteira, contendo sete fibras ópticas.

Imagem retirada do site da empresa: <https://oceanoptics.com/product/premium-grade-reflection-probes/>, link acessado em 05/11/2017.

A extremidade da ponteira foi adaptada a um dispositivo que permitia que ela permanecesse a uma distância de 1 mm da pele durante as medidas. Ela foi protegida com filme fino de PVC (Figura 15), trocada a cada paciente.

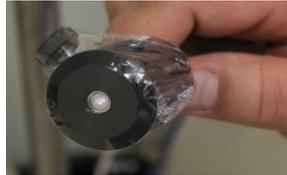


Figura 15 - Dispositivo na extremidade da fibra óptica protegida com filme fino de PVC.

A do espectrofotômetro foi realizada e um (Figura 16)®



Figura 16 - Imagem do Spectralon® utilizado para a calibração do branco do espectrofômetro.

Os espectros de reflectância difusa foram obtidos a partir de um média de 4 varreduras, com largura de banda de 4 nm, no intervalo desde 300 nm até 1040 nm, com tempo de integração de 120 ms.

Foram coletados espectros de reflectância difusa de duas regiões de tecido de cada paciente sendo uma com LEV e outra visualmente livre de LEV (Figura 17). As medições foram realizadas em dois momentos: no início e um mês após o início do tratamento.



Figura 17 - Método de medição da reflectância das regiões com (à esquerda) e sem (à direita) LEV.

Os espectros foram analisados com o software ORIGIN PRO-8 da Origin Lab Corporation, USA.

oi aplicada a técnica de suavização de Savitzky-Golay (SGS) nos espectros de reflectância difusa, com s espectros de reflexão foram estatísticoORIGIN®, para a reduzir o ruído do sinal medido. No Origin® foi aberta a planilha de dados referentes a um dos espectros de reflectância difusa. Foi marcada a coluna de dados a ser suavizada. No menu principal foram escolhidos os itens: “Analysis” > “Signal Processing” > “Smoothing” > “Open Dialog” (Análise > Processamento de Sinal > Suavização > Abrir Campo de Opções), Figura 18.

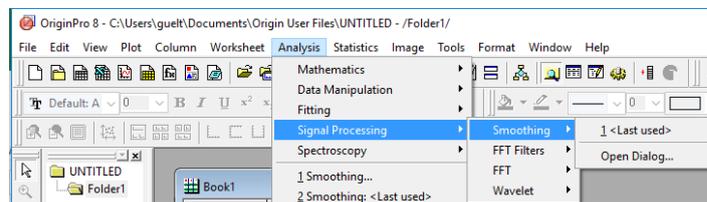


Figura 18 – Imagem da tela do Origin® Pro-8, em que se realiza a suavização de espectros.

Abre-se uma nova janela, Figura 19, na qual no campo “Input” (Entrada) fica indicada a coluna de dados a ser suavizada; em “Method” (Método), foi escolhido o método “Savitzky_Golay”; no campo “Points of Windows” (Pontos por Janela), foi digitado 150, correspondente à quantidade de pontos em cada janela de varredura do método de convolução ; em “Boundary Condition” (Condições de Contorno) foi mantida a opção “None” (nenhuma das opções sugeridas); Em “Polynomial Order” (Ordem do Polinômio), foi mantido o grau 2 para o polinômio. Clicando em “Preview” (Visualização prévia), pode-se observar, à direita, o espectro original e sua suavização de acordo com as opções escolhidas. Em testes prévios, foram escolhidas as opções que apresentaram melhores resultados no processo de suavização, ou seja, quando se observou a manutenção das regiões de picos e de vales, com redução significativa no ruído de fundo sem perda de informações essenciais.

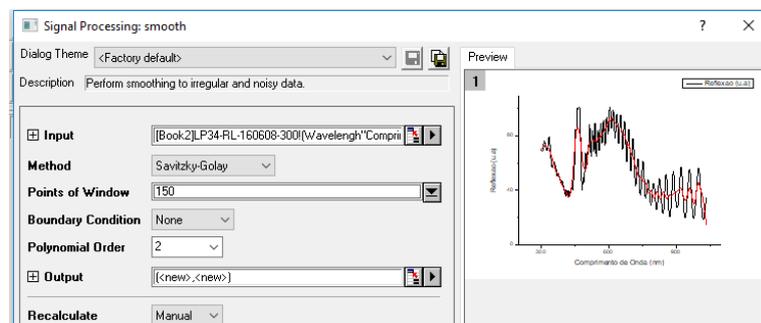


Figura 19 – Imagem da tela do Origin® Pro-8, em que se escolhe o tipo de suavização de espectros e as opções relativas ao tratamento de dados. No canto superior direito, observa-se a pré-visualização do espectro original, em preto, e sua suavização, em vermelho.

O ruído observado em um exemplo de espectro de reflectância (Figura 20a) referente à paciente F06, do grupo tratado com fotobiomodulação, antes do início do tratamento, de região com líquen, na Figura 20b, pode-se observar a redução no ruído de fundo e a preservação das posições de máximos e de mínimos locais.

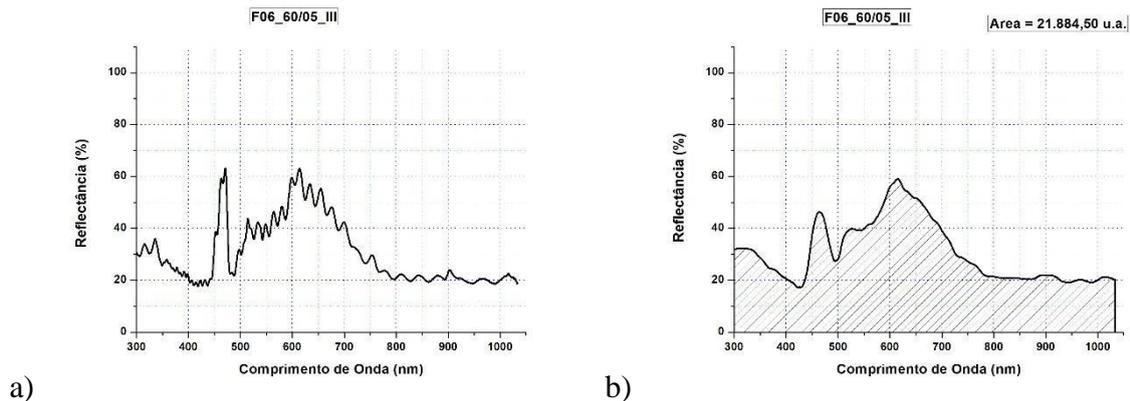


Figura 20 – a) Exemplo de um espectro de reflectância obtido a partir de uma região com LEV; b) O espectro foi suavizado com a técnica de SGS. Acima, à direita, está indicada a área da região hachurada em unidades arbitrárias (u.a.).

Os valores das variâncias de (KS) de variâncias de

Observou-se que alguns espectros de reflectância difusa obtidos apresentaram regiões em que a reflectância foi maior do que os 100%, apesar de ter sido realizada a calibração do sistema antes do início de cada espectroscopia. Então, os espectros dessas pacientes foram excluídos da análise.

As variâncias foram comparadas com o Minitab® 18, por intermédio do teste de modelos lineares generalizados (GLM, acrônimo do inglês para **General Linear Model**), de Bonferroni, para comparar as diferenças entre as áreas das regiões com LEV antes e depois de um mês de tratamento, considerando como cofatores a idade, o tempo de prurido, a escala FPS e o tipo de tratamento, com .

Posteriormente, foi utilizado o Origin® Pro 8 para transformar os espectros de reflectância difusa suavizados (Figura 22b) em espectros de absorvância aparente (Figura 22b), de acordo com Cortés *et al*⁶⁰, utilizando a equação ((19)). Pode-se observar que os pontos de máximo e de mínimo do espectro de reflectância suavizado foram invertidos no espectro de absorvância aparente.

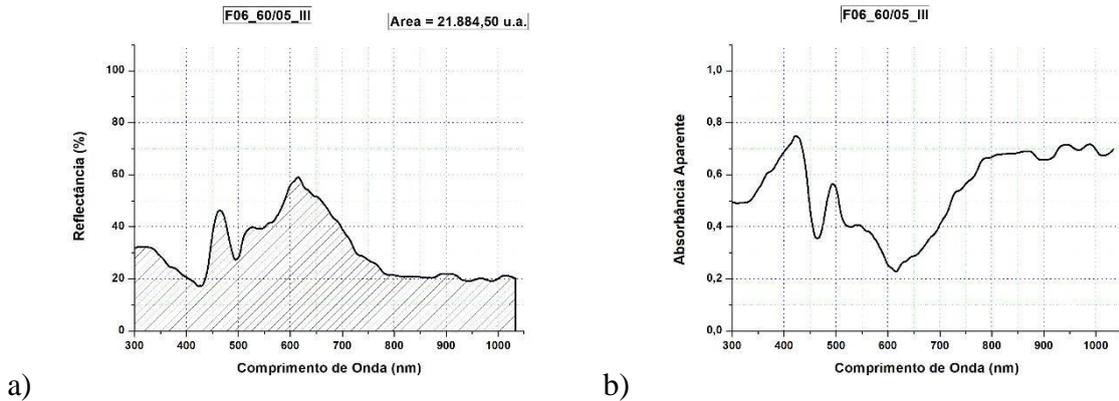


Figura 21 – a) Exemplo de espectro de refletância suavizado de uma região com LEV; b) O espectro de absorbância aparente.

Os espectros de refletância e de absorbância aparente de cada paciente foram comparados individualmente com os espectros de pele sadia (**Figura 22a e b**).

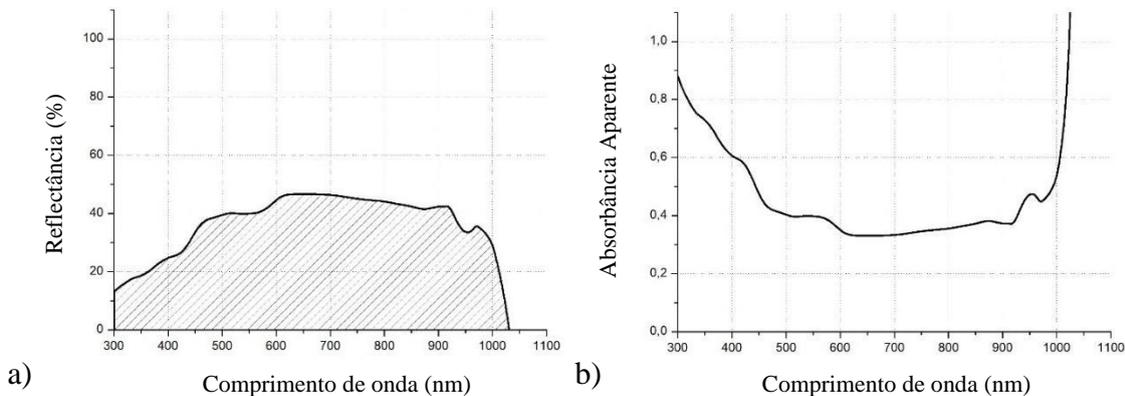


Figura 22 – a) Exemplo de espectro de refletância de pele sadia; b) O espectro de absorbância aparente de pele sadia.

Para cada paciente, o espectro de refletância referentes à região com LEV foi dividido pelo espectro de região sem LEV. Com o objetivo de analisar a concentração de melanina na pele, foi considerado o intervalo entre 620 nm e 720 nm e foi calculado o \ln (logaritmo natural) dos espectros relativos ⁴³. Foi realizada regressão linear e foram obtidos os valores do coeficiente de determinação (R^2), linear e angular.

Foi calculada a razão entre os espectros de refletância de região com LEV por espectros de região sem LEV. A Figura 23a mostra o gráfico da razão entre os espectros de refletância difusa de região com líquen em relação à região sem líquen, da paciente F07, antes do início do tratamento. Posteriormente, foi calculado o logaritmo natural da razão entre os espectros de

reflectância difusa, apenas na faixa entre 620 nm e 720 nm. A Figura 23b mostra o gráfico do logaritmo natural da mesma paciente antes do início do tratamento.

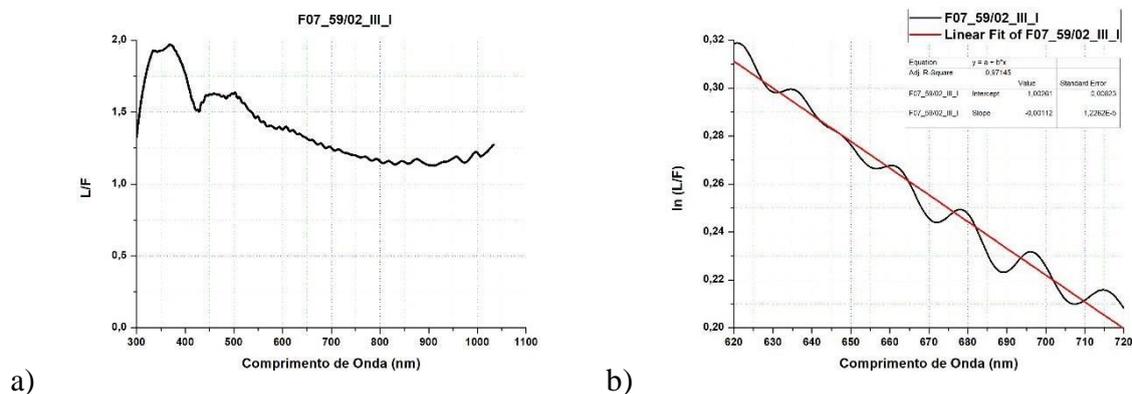


Figura 23 – Espectros da paciente F07. (a) Razão, L/F , entre os espectros de reflectância difusa de região com LEV pelo espectro de região sem LEV. (b) Logaritmo natural, $\ln(L/F)$, da razão L/F do espectro relativo entre 620 e 720 nm e a respectiva regressão linear.

4 RESULTADOS

O grupo de 15 pacientes tinha idade igual a $(62,7 \pm 9,4)$ anos. O tempo de prurido era de $(8,7 \pm 9,3)$ anos. Após separação randômica em três grupos de tratamento, a distribuição das pacientes ficou de acordo com tabelas abaixo, correspondentes aos grupos COR (Tabela 5), FBM (Tabela 6) e PDT (Tabela 7), respectivamente. No apêndice 2 são apresentados os resultados dos testes de normalidade e de homogeneidade de variâncias.

Tabela 5 – Características das pacientes do grupo COR.

Paciente	FPS	Idade (anos)	Tempo de Prurido (anos)
C01	III	53	6
C02	V	75	5
C03	III	75	2
C04	III	44	38
C05	III	66	10
Média ± DP		$62,6 \pm 13,8$	$12,2 \pm 14,7$

Tabela 6 – Características das pacientes do grupo FBM.

Paciente	FPS	Idade (anos)	Tempo de Prurido (anos)
F06	III	50	5
F07	III	59	2
F08	III	72	11
F09	III	55	8
F10	IV	62	20
Média ± DP		$59,6 \pm 8,3$	$9,2 \pm 6,9$

Tabela 7 – Características das pacientes do grupo PDT.

Paciente	FPS	Idade (anos)	Tempo de Prurido (anos)
P11	III	60	5
P12	VI	65	6
P13	III	63	7
P14	III	71	3
P15	III	71	3
Média ± DP		$66,0 \pm 4,9$	$4,8 \pm 1,8$

Na Figura 24 são apresentados os espectros de reflectância difusa referentes aos três tipos de tratamento com corticosteroide, fotobiomodulação e PDT, no início e após um mês de

tratamento, por tipo de tratamento, de regiões visualmente livres de LEV. São apresentados apenas os espectros de pacientes que não apresentaram regiões em que a reflexão foi máxima.

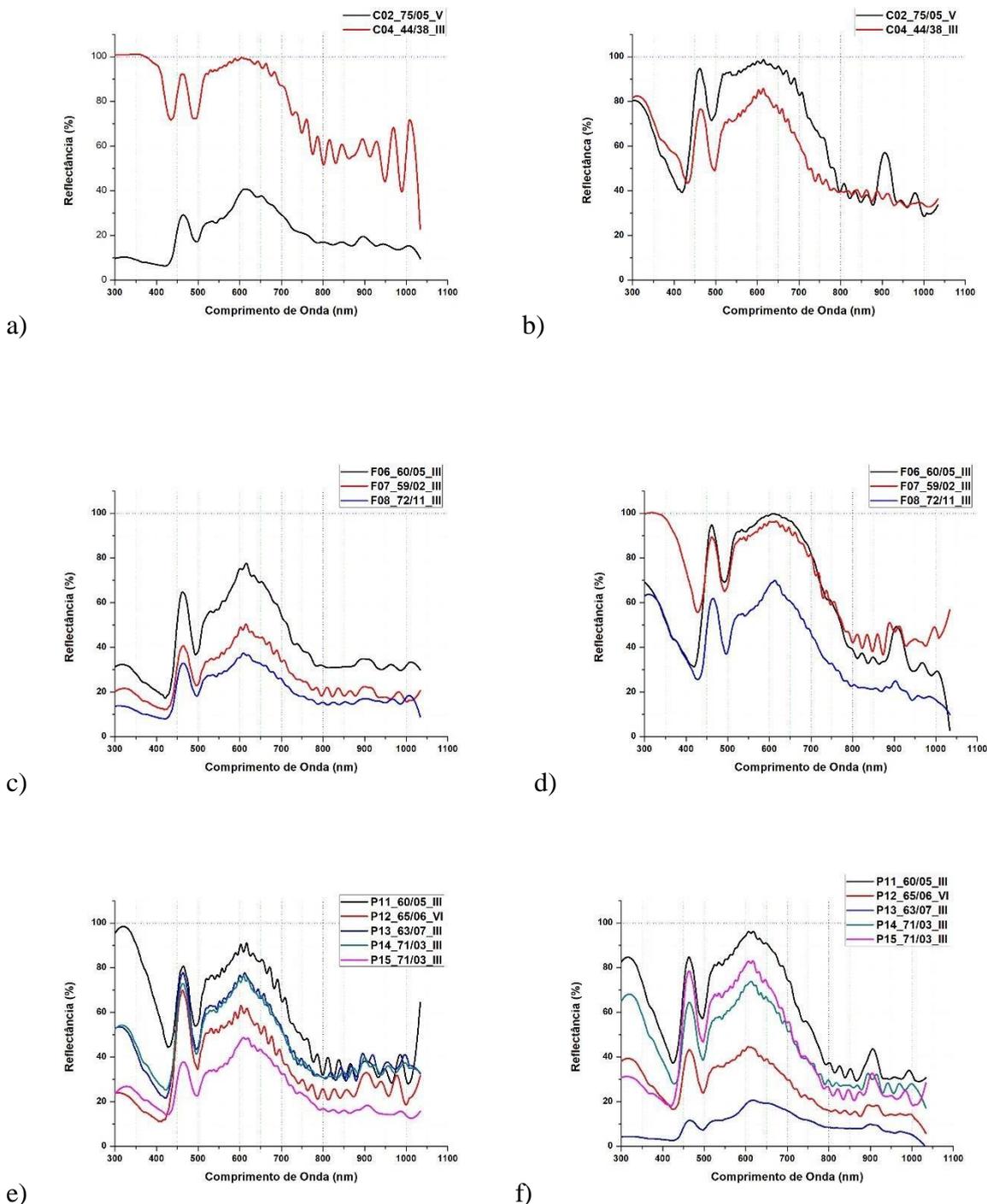


Figura 24 – Espectros de reflectância difusa de região livre de LEV. Referentes a pacientes dos grupos: COR a) Antes do início do tratamento e b) Um mês após o início do tratamento; FBM c) Antes do início do tratamento e d) Um mês após o início do tratamento; e PDT e) Antes do início do tratamento e f) Um mês após o início do tratamento.

Na Figura 25 são apresentados os espectros de reflectância difusa referentes aos três tipos de tratamento com corticosteroide, fotobiomodulação e PDT, no início e após um mês de tratamento, por tipo de tratamento, de regiões com LEV. São apresentados apenas os espectros de pacientes que não apresentaram regiões em que a reflexão foi máxima.

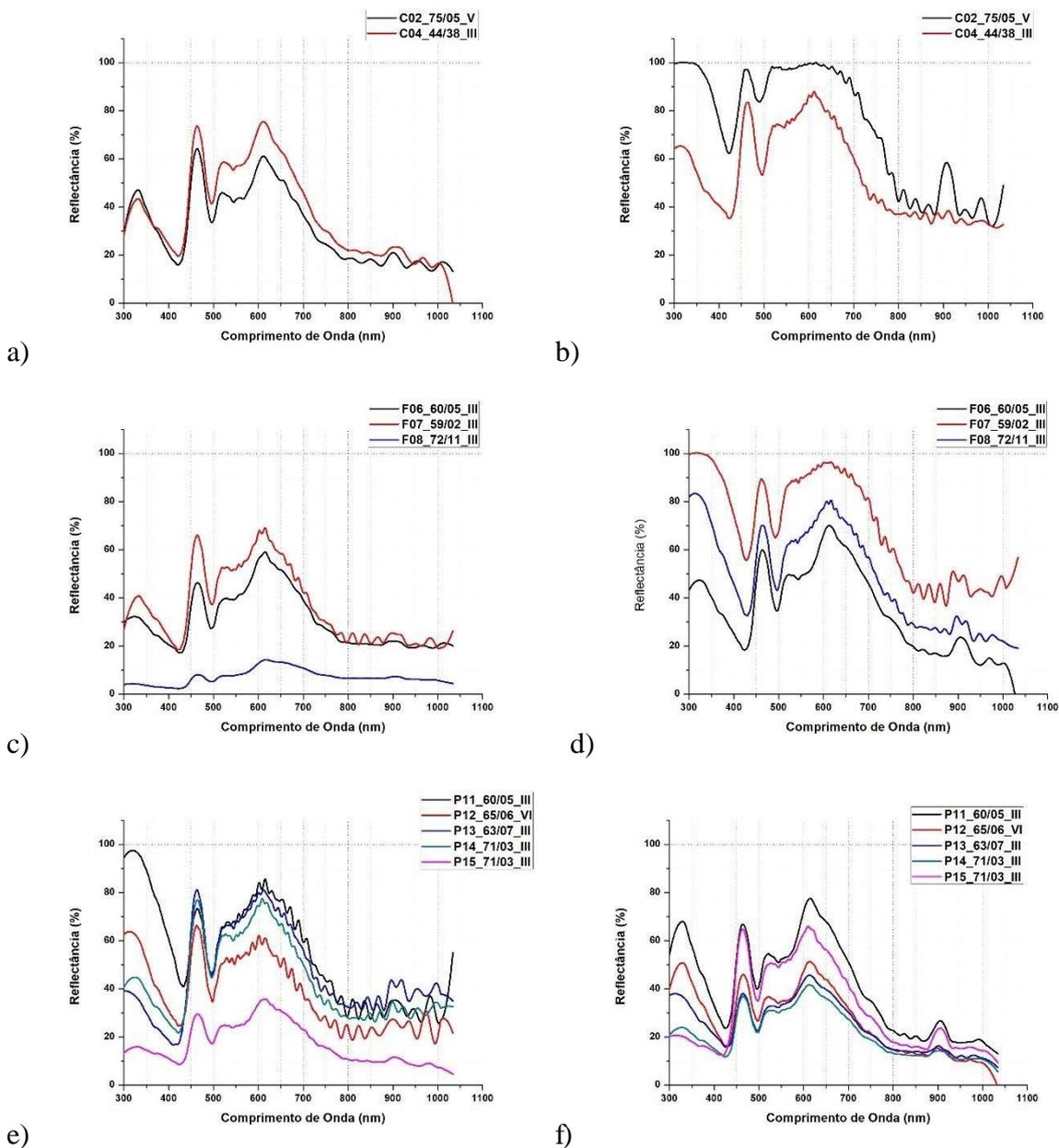


Figura 25 – Espectros de reflectância difusa de região com LEV. Referentes a pacientes dos grupos: COR a) Antes do início do tratamento e b) Um mês após o início do tratamento; FBM c) Antes do início do tratamento e d) Um mês após o início do tratamento; e PDT e) Antes do início do tratamento e f) Um mês após o início do tratamento.

No apêndice 1, são apresentados todos os espectros de reflectância difusa origina is, depois suavizados e os respectivos espectros de absorbância aparente de cada uma das 15 pacientes do estudo, antes e após um mês de tratamento, de regiões sem e com LEV.

Foram calculadas as áreas sob as curvas de cada espectro de reflectância difusa suavizado, no início e após um mês de tratamento, referentes às regiões sem e com LEV. Na **Tabela 8** são apresentados os valores das áreas sob as curvas dos espectros de reflectância difusa.

Tabela 8 - Áreas espectros de reflectância das pacientes, em ($\times 1000$ ua).

Paciente	Idade (anos)	Prurido (anos)	FPS	Sem LEV		Com LEV	
				Início	Final	Início	Final
C02	75	5	V	14,4	46,1	22,8	52,3
C04	44	38	III	55,4	39,7	27,1	37,7
F06	60	5	III	29,7	25,1	21,9	43,2
F07	59	2	III	18,7	49,2	26	29,5
F08	72	11	III	14,1	28,3	51	34,7
P11	60	5	III	42,5	42,4	39,2	29,4
P12	65	6	VI	24,2	18,8	26,9	19,6
P13	63	7	III	32,9	69,3	32,9	17,8
P14	71	3	III	32,5	31,9	30,8	15,4
P15	71	3	III	18	30,1	12,3	22,3

A Tabela 9 apresenta os resultados do teste GLM ao comparar os valores das áreas sob as curvas por grupo de tratamento, em relação aos momentos inicial e final, para regiões sem e com LEV, tendo como cofatores a idade, o tempo de prurido e a escala FPS, com post hoc de Bonferroni. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação a nenhum dos cofatores na região sem LEV antes ou depois dos tratamentos, pois $p > 0,05$.

Tabela 9 - Resultados das significâncias, p, do teste GLM, na comparação entre os valores das áreas dos espectros de reflectância, por grupo em relação ao momento do tratamento, considerando como cofatores a idade, o tempo de prurido e a escala FPS.

Cofator	Sem LEV		Com LEV	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Idade (anos)	0,073	0,523	0,440	0,878
Prurido (anos)	0,700	0,372	0,333	0,407
FPS	0,345	0,324	0,992	0,995

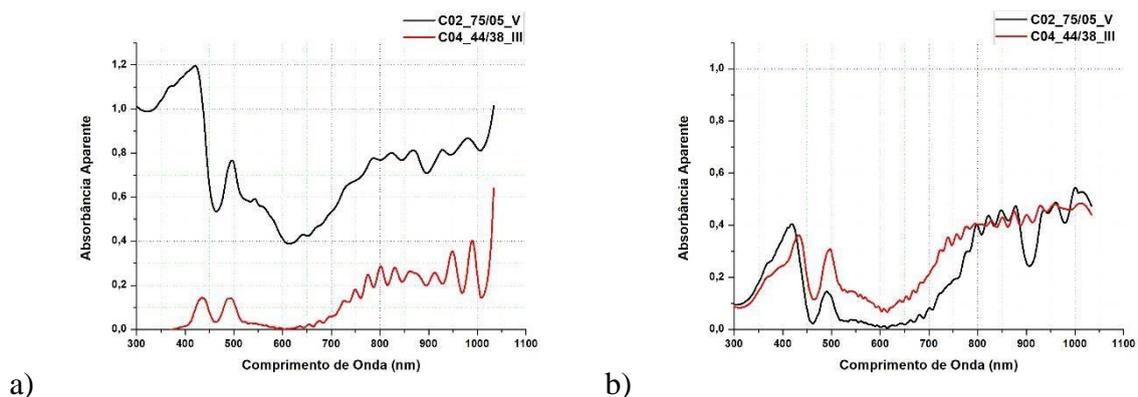
Na Tabela 10, são apresentados os valores das significâncias, p , para o teste GLM, ao se comparar as áreas dos espectros de reflectância dos tratamentos, em relação aos momentos inicial e final, e as regiões sem e com LEV, tendo como cofatores a idade, o tempo de prurido e o FPS. Não houve diferenças significantes entre os grupos de tratamento, pois $p > 0,05$.

Tabela 10 - Valores de p para o teste GLM, na comparação entre os tratamentos, em relação aos momentos inicial e final, para regiões sem e com LEV.

Tratamentos		Sem LEV		Com LEV	
		Início	Final	Início	Final
COR	FBM	1,000	0,815	1,000	0,591
	PDT	1,000	1,000	1,000	0,085
FBM	PDT	0,206	1,000	1,000	0,171

Os espectros de reflectância difusa suavizados foram transformados nos espectros de absorbância aparente, utilizando a equação (10). Os espectros de absorbância aparente de todas as pacientes são apresentados no apêndice 1.

Ao se observar os espectros de absorbância aparente, tanto das regiões sem LEV, Figura 26, quanto com LEV, no início ou um mês após o início dos tratamentos, apenas referentes aos espectros de reflectância difusa que não apresentaram problemas de escala, nota-se que entre 400 nm e 500 nm há duas bandas bem definidas. Há dois pontos de máximo em duas bandas observadas. A primeira banda está centrada em $\lambda_1 = (422,6 \pm 5,4) \text{ nm}$ e a segunda banda em $\lambda_2 = (492,6 \pm 3,1) \text{ nm}$.



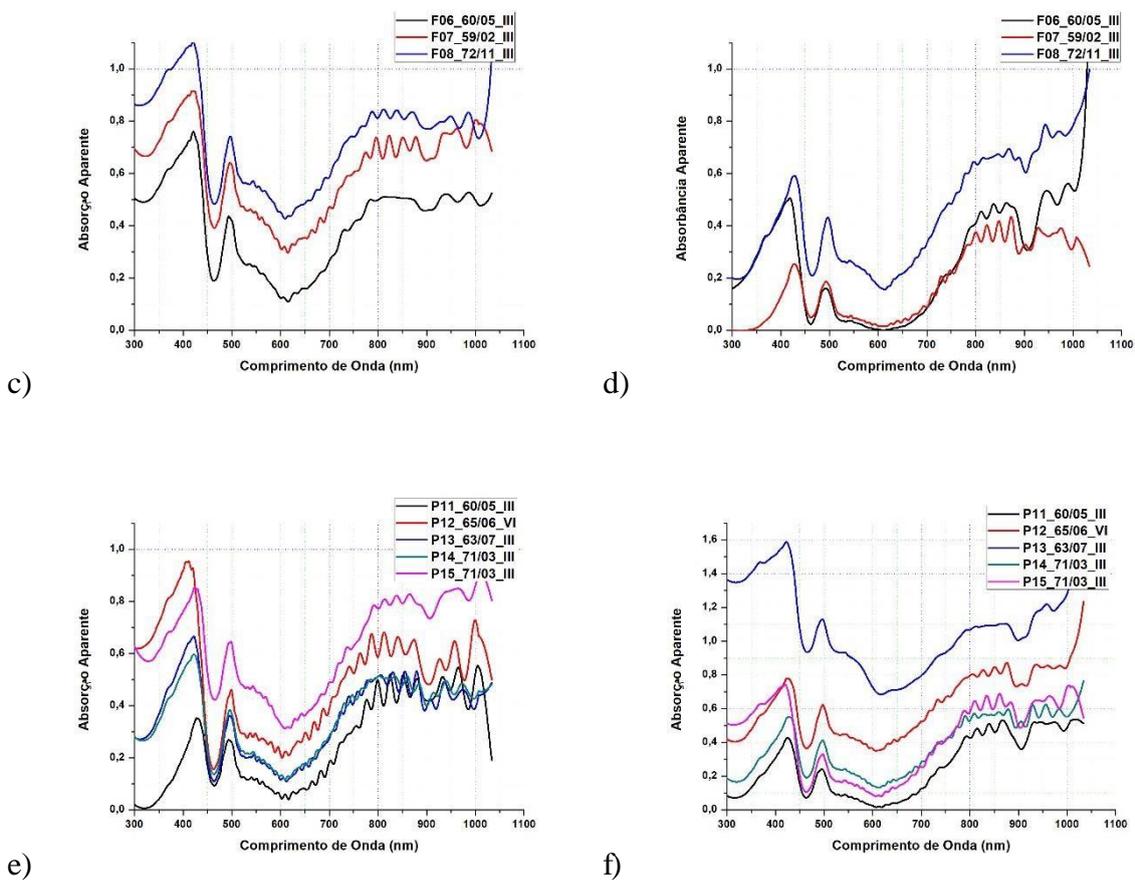
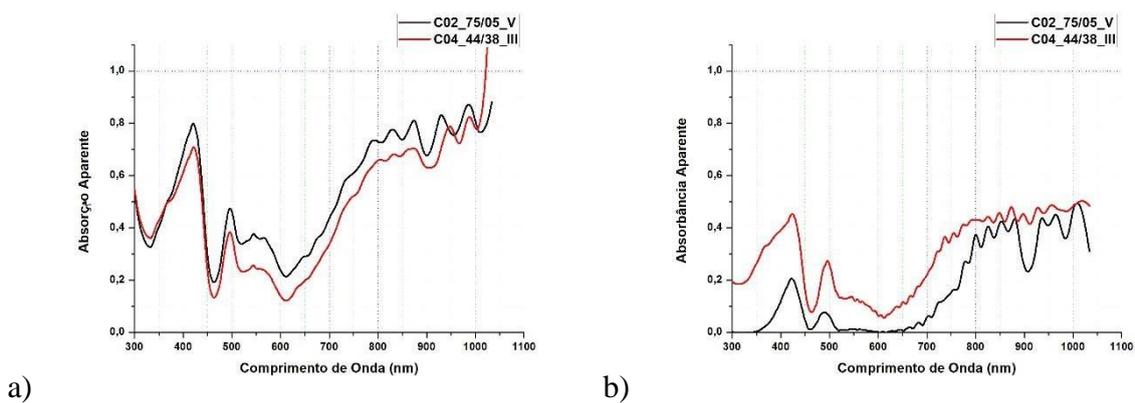


Figura 26 – Espectros de absorvância aparente de região sem LEV, antes (esquerda) a após (direita) um mês de tratamento. No canto superior direito de cada gráfico há uma legenda identificando as pacientes de cada grupo de tratamento. Gráficos a) e b) Grupo COR; Gráficos c) e d) Grupo FBM; Gráficos e) e f) Grupo PDT.



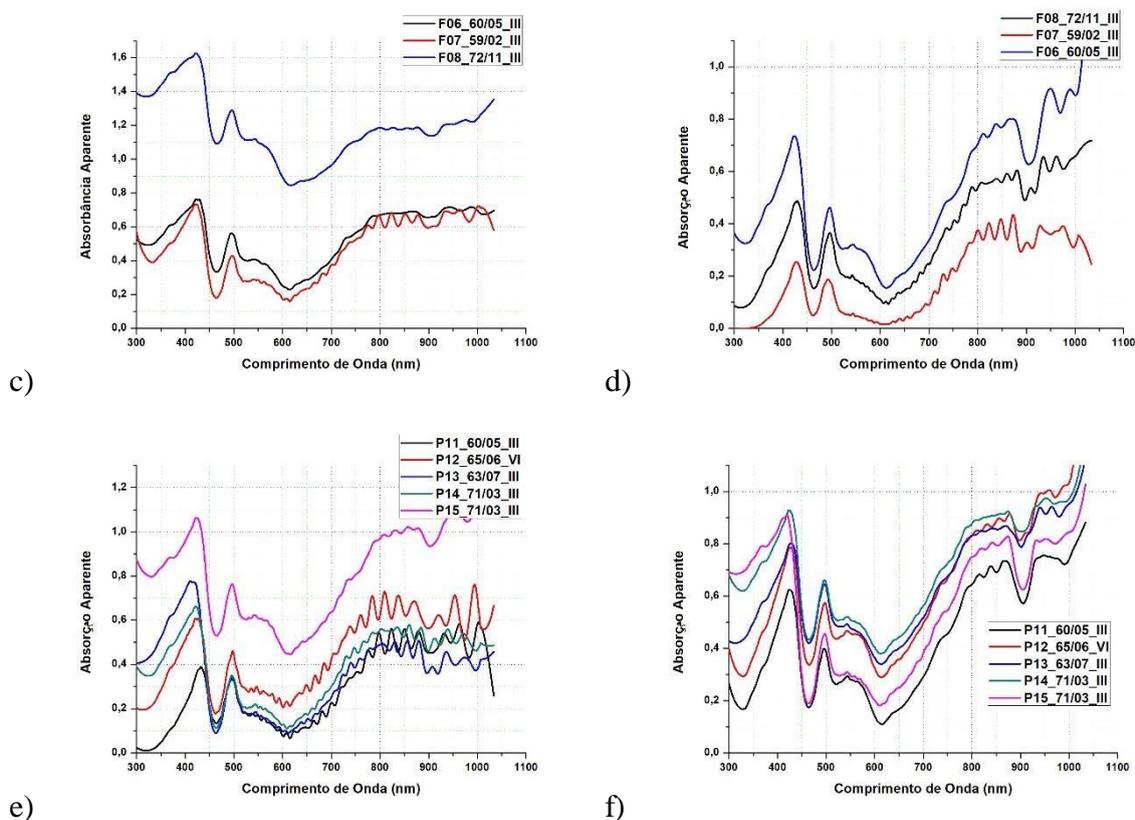
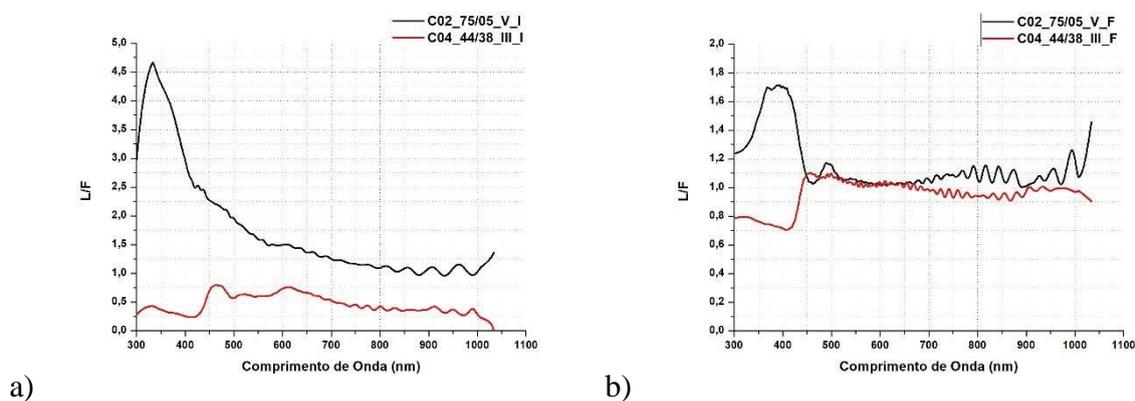


Figura 27 – Espectros de absorvância aparente de região com LEV, antes (esquerda) a após (direita) um mês de tratamento. No canto superior direito de cada gráfico há uma legenda identificando as pacientes de cada grupo de tratamento. Gráficos a) e b) Grupo COR; Gráficos c) e d) Grupo FBM; Gráficos e) e f) Grupo PDT.

Os gráficos da Figura 28 representam os espectros relativos, obtidos a partir da razão entre o espectro de reflectância difusa de região com LEV (L) pelo espectro de reflectância difusa de região sem LEV (F), por tipo e por período de tratamento. Nas legendas dos gráficos, no canto superior direito, cada cor representa uma paciente por tipo de tratamento, número da paciente, idade, tempo de prurido e classificação de acordo com a escala FPS, nesta ordem.



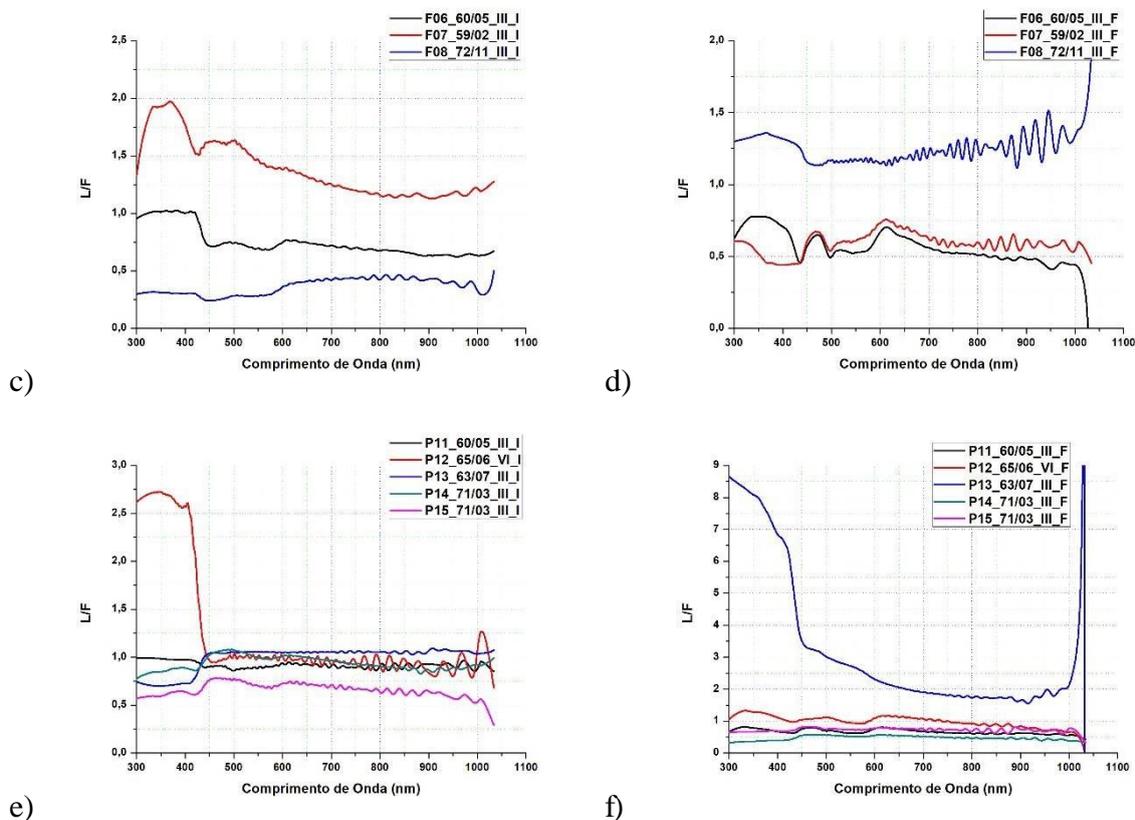


Figura 28 - Espectros relativos à razão (L/F) entre o espectro de reflectância difusa de região com LEV pelo espectro de região sem LEV, antes (esquerda) a após (direita) um mês de tratamento. No canto superior direito de cada gráfico há uma legenda identificando as pacientes de cada grupo de tratamento. Gráficos a) e b) Grupo COR; Gráficos c) e d) Grupo FBM; Gráficos e) e f) Grupo PDT.

Considerando os espectros relativos, no intervalo de comprimentos de onda entre 620 nm e 720 nm, para o qual a influência de cromóforos como deoxihemoglobina e oxihemoglobina se torna muito pequena, quando comparada à melanina^{29,43}, foi calculado o logaritmo natural do espectro relativo e, posteriormente, foi realizada regressão linear. Tendo como critério o valor de R^2 mais próximo de 1, foram traçados os gráficos (Figura 29) de uma paciente de cada grupo de tratamento.

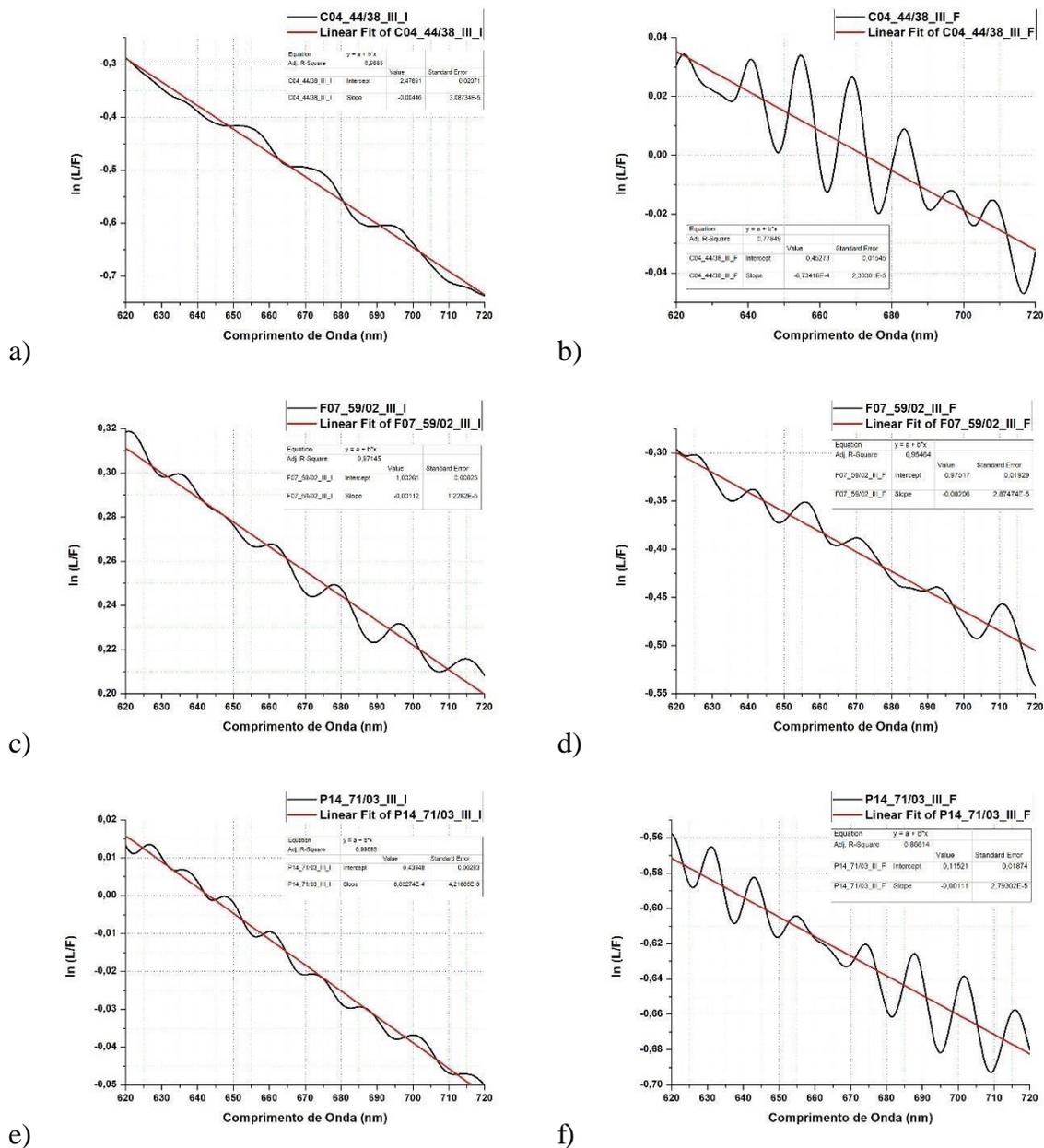


Figura 29 - Gráficos referentes à regressão linear. O eixo vertical representa o $\ln(L/F)$, logaritmo natural da razão entre os espectros de reflectância de região com LEV (L) pelo espectro de região sem LEV (F) das pacientes: do grupo COR, (a) antes (I) e (b) após um mês (F) de tratamento; do grupo FBM, (c) antes e (d) após um mês de tratamento; e do grupo PDT, (e) antes e (f) após um mês de tratamento.

Os valores dos coeficientes da regressão linear são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores dos coeficientes R², linear e angular referentes à regressão linear realizada com os gráficos de ln (L/F) por tratamento, paciente e momento dos tratamentos.

		Coefficientes		
		R ²	Linear (u.a.)	Angular
C04_44/38_III	Início	0,9885	2477 ± 0021	-(446 ± 003) × 10 ⁻³
	Após 1 mês	0,77849	0453 ± 0002	-(205 ± 003) × 10 ⁻⁴
F07_59/02_III	Início	0,97145	1003 ± 0008	-(112 ± 001) × 10 ⁻³
	Após 1 mês	0,95464	0975 ± 0019	-(206 ± 003) × 10 ⁻³
P14_71/03_III	Início	0,99083	0439 ± 0003	-(683 ± 004) × 10 ⁻⁴
	Após 1 mês	0,86614	0115 ± 0019	-(111 ± 003) × 10 ⁻³

De acordo com a equação (18), o coeficiente linear está relacionado à concentração de melanina. No início dos tratamentos, a paciente C04, do grupo COR, apresentava maior coeficiente linear, ou seja, tinha maior concentração de melanina em sua pele, por outro lado, a paciente P14, do grupo PDT, apresentou menor concentração de melanina.

Ao comparar os coeficientes lineares no início e após um mês de tratamento, verifica-se que todas as pacientes apresentaram redução na concentração de pigmento. A paciente do grupo COR, C04, teve a maior redução, relativo a 81,7%, enquanto que a paciente do grupo FBM, F07, teve menor redução, na ordem de 2,79%.

5 DISCUSSÃO

De acordo com as áreas obtidas por meio dos espectros de reflectância difusa *in vivo*, após um mês de tratamento, ao realizar comparações intra e intergrupos não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos.

Embora seja mais comum afetar a vulva, o líquen escleroso pode ser encontrado em outras partes da pele, acometendo homens e crianças, inclusive ¹⁰⁷. Não é uma lesão pré-maligna, mas o líquen escleroso sintomático pode aumentar as chances do desenvolvimento de carcinoma celular escamoso ¹⁰⁸. Dessa forma, o tratamento dessa doença visa aliviar os sintomas, sendo a corticoterapia o padrão ouro ¹⁰⁹. No entanto, outras modalidades terapêuticas têm sido estudadas, como as terapias fotônicas ¹¹⁰, onde não somente a reação fisiológica da pele deve ser compreendida, mas também a reação óptica do tecido frente aos fótons.

A espectroscopia de reflectância difusa *in vivo* permite a determinação não invasiva das propriedades de reflexão, absorção e espalhamento da pele, as quais podem oferecer informação importante a respeito de seus constituintes, fisiologia e morfologia ¹¹¹. O espectro de reflectância pode ser analisado por meio da intensidade do sinal detectado, o qual é diretamente relacionado à área sob sua curva ¹¹². Recentemente, Henricson e colaboradores desenvolveram um sistema óptico usando espectroscopia de reflectância difusa para quantificar e descrever a resposta vascular de capilares sanguíneos, onde a área sob a curva foi quantificada pelo algoritmo criado ¹¹³.

O líquen escleroso é uma desordem epitelial não neoplásica de etiologia desconhecida, caracterizada por afinamento da epiderme, hiperqueratose superficial e infiltrado inflamatório dérmico ¹¹⁴. A doença confere à pele uma aparência branco-leitosa, cujos mecanismos responsáveis pela leucodermia (deficiência de pigmentação nos tecidos) podem ser a diminuição da produção de melanina, transferência reduzida de melanosomas em queratinócitos e/ou perda de melanócitos ¹¹⁵.

Dessa maneira, com o propósito de associar a intensidade da reflectância com a pigmentação da pele, o espectro de absorbância aparente também foi estudado. A denominação “aparente” é necessária para distinguir a absorbância quando medida indiretamente, isto é, quando obtida por meio de um modelo analítico da reflectância difusa ²⁸.

As duas principais camadas da pele, epiderme e derme, têm índices de refração 1,5 e 1,8, respectivamente ¹¹⁶. Ou seja, além da reflexão difusa causada pela diferença entre os índices de refração do ar e da epiderme, há também reflexões internas da radiação difusa e retroespalhada, causadas entre a epiderme e a derme. No total, entre 4 e 7% dos fótons são refletidos ao atingirem a pele ¹¹⁷. Já em 1981 pesquisadores reportavam a importância clínica

da reflectância da pele, pois enquanto na pele normal há uma interface contínua entre ar e epiderme, o mesmo não ocorre quando há desordens dermatológicas, como a psoríase ¹¹⁷. Sendo o líquen escleroso uma leucodermia tal qual a psoríase, a utilização da espectroscopia por reflectância difusa para verificação da resposta da pele frente às diferentes abordagens de tratamento do líquen escleroso vulvar é promissora, ainda mais quando os resultados são complementados com os dados de absorvância aparente ¹¹⁸.

Em situação fisiológica normal, a pele não é homogênea, pois tem pelos, glândulas, camadas e propriedades físicas anisotrópicas. Suas duas principais camadas são a epiderme e a derme, sendo o estrato córneo a camada mais externa da epiderme, composto por células mortas depositadas numa matriz lipídica ¹¹⁹. Queratinócitos, Langerhans e melanócitos são as células que compõem o restante da epiderme, sendo estes últimos os sintetizadores da melanina. As organelas que contém a melanina são os melanosomos, os quais também estão restritos à epiderme ²⁸. As fibras colágenas são as principais estruturas da derme, assim como os nervos, capilares e vasos sanguíneos, mas também estão presentes elastina, fibroblastos, células endoteliais e de Schwann ¹²⁰. Os eritrócitos são as células sanguíneas, compostos principalmente por hemoglobina, tanto na sua forma oxihemoglobina ou deoxihemoglobina. Portanto, na faixa visível do espectro eletromagnético, os principais cromóforos da pele são a hemoglobina (formas oxi e deoxi) e a melanina ¹.

De fato, ao observar nossos espectros de absorvância aparente, tanto das regiões sem LEV quanto com LEV, no início ou um mês após os tratamentos, nota-se que entre 400 nm e 500 nm há duas bandas bem definidas, cujos picos estão centrados em $\lambda_1 = (4226 \pm 54) \text{ nm}$ e $\lambda_2 = (4926 \pm 31) \text{ nm}$. Segundo a literatura, a oxihemoglobina tem absorção máxima em 412 nm (banda Soret) e em 542 e 577 nm (bandas q), a deoxihemoglobina, tem banda Soret em 430 nm e uma banda q em 555 nm e a bilirrubina tem banda Soret em 460 nm e banda q em 550 nm. Na região vermelha do espectro (acima de 600 nm) a absorvância da bilirrubina, da oxi e da deoxihemoglobina diminuem, embora a absorvância da deoxihemoglobina ultrapasse aquela da oxihemoglobina ¹²¹. Assim, é razoável admitir que estas duas bandas correspondam à bilirrubina e às formas oxi e deoxi da hemoglobina.

O fato importante a ser exposto é que a melanina não apresenta picos na região visível e sua absorvância é decrescente com o aumento do comprimento de onda ¹²¹. Nossos resultados corroboram com isso. Embora a melanina, assim como a oxi e deoxihemoglobina tenham absorção na faixa vermelha do espectro eletromagnético, a absorção relativa da melanina é mais alta. Por esse motivo os espectros de absorção aparente foram investigados entre 620 e 720 nm, para ressaltar, majoritariamente, a influência da pigmentação da melanina.

O método para obtenção da concentração da pigmentação de melanina por meio da absorvância aparente foi descrito pela primeira vez em 1985, por Kollias e Baqer ⁴³ e até então tem se mostrado um método adequado, conforme publicação recente do mesmo grupo de pesquisadores ¹¹¹. Sendo assim, optou-se por determinar a concentração da melanina usando-se este mesmo método validado.

De acordo com nossos resultados, após um mês, o grupo PDT apresentou a menor concentração de melanina, proporcional a $(0,115 \pm 0,019)$. Já as pacientes tratadas com FBM apresentaram concentração cerca de 8 vezes maior, proporcional a $(0,975 \pm 0,019)$. Ao se comparar as concentrações de pigmento no início e um mês após os tratamentos, observa-se que a paciente do grupo FBM apresentou a menor redução na concentração de melanina, na ordem de 2,8%, enquanto que a do grupo COR apresentou uma redução de 81,7% e a do grupo PDT, 73,8% de redução na concentração de melanina. Então, enquanto o grupo PDT foi aquele com menor reflectância, o grupo FBM foi o tratamento que manteve o nível de pigmentação da pele. É preciso ressaltar que a pele é um meio cuja caracterização das propriedades ópticas ainda é um desafio, principalmente em medições *in vivo*, cuja fibra de detecção da reflectância tem diâmetro limitado (200 μm no dispositivo usado em nossa metodologia). Dessa forma, embora as medições tenham sido realizadas no mesmo local anatômico, não é possível garantir que todas foram submetidas às mesmas condições, devido ao fluxo sanguíneo, respiração e até instabilidade das pacientes, conforme relatado por Karsten ¹²².

Para uma incidência perpendicular de fótons em relação à superfície da pele, cerca de 4% da luz é refletida. Os 96% restantes dos fótons são atenuados devido absorção ou espalhamento. No entanto, essa é uma descrição genérica do comportamento óptico da pele. Os tratamentos fotônicos aqui descritos foram realizados com comprimento de onda (660 ± 10) nm que, de acordo com Mustafa e colaboradores, peles muito claras transmitem 93% dos fótons incidentes e peles negras transmitem 29% em um caminho óptico de 80 μm ¹¹⁶. Ou seja, para que compreendamos a resposta fotobiológica da pele após os tratamentos, tanto para a variável reflectância quanto para absorvância, é necessário considerarmos a escala Fitzpatrick e a interação da luz vermelha com a pele.

Embora a espessura das camadas da pele varie com a região anatômica, idade e estado de saúde, pode-se representar a espessura da epiderme com valores entre 20 e 150 μm , tendo o estrato córneo cerca de 10 μm . Já a derme possui espessura entre 2 e 4 mm ¹¹⁷. De acordo com a literatura, a hemoglobina situa-se tipicamente entre 50 e 500 μm abaixo da superfície da pele, enquanto a melanina, conforme já mencionado, encontra-se na epiderme ²⁹. Então, pode-se

estimar que os fótons vermelhos foram capazes de atingir os principais cromóforos da pele, o que é fundamental para o sucesso da fotobiomodulação ¹²³. No entanto, apesar da hemoglobina e melanina determinarem a absorção em comprimentos de onda maiores que 400 nm na pele, o espalhamento provocado pelas fibras colágenas também influencia o sinal da reflectância detectado e, logo, da absorbância ¹¹⁷.

Em estudo prévio realizado por nosso grupo (dados submetidos para publicação), os grupos FBM e PDT apresentaram fibras colágenas mais organizadas do que o grupo corticosteroide. No entanto, o grupo tratado com FBM mostrou-se promissor quanto à congestão vascular (maior que a PDT) e hialinização (menor que a PDT). A fotobiomodulação também tem sua utilização em doenças crônicas de pele, tais como eczemas, dermatite atópica e psoríase, devido a sua ação anti-inflamatória e regeneração tecidual, estimulando a proliferação de fibroblastos, síntese do colágeno e neovascularização de tecidos lesados, além da imunomodulação ¹²⁴. Portanto, pode-se hipotetizar que a maior concentração de pigmentação detectada no grupo FBM teve também influência do colágeno, o qual absorve na faixa vermelha do espectro eletromagnético ¹²⁵. Embora a PDT também tenha sido realizada com fótons vermelhos, é preciso considerar que devido à presença do azul de metileno a profundidade de penetração dos fótons não tenha sido tão eficiente quanto aquela do grupo FBM. A utilização da fotobiomodulação no líquen escleroso vulvar é inédita e, por essa razão, não foram encontrados trabalhos para corroborar com nossos achados.

Ao tratar distúrbios da pele com fotobiomodulação ou terapia fotodinâmica, cromóforos endógenos ou exógenos presentes nas células da derme ou epiderme devem absorver os fótons. O emprego assertivo das terapias fotônicas, portanto, requer o conhecimento óptico do tecido alvo para que sejam discutidas qual porção da luz incidente efetivamente atinge tais cromóforos e como a interação luz-tecido impacta na resposta biológica. Sendo assim, espera-se que o presente estudo contribua para a otimização das terapias fotônicas no líquen escleroso vulvar, por meio da melhor compreensão da reflectância e absorbância desse tecido.

6 CONCLUSÕES

Foi utilizado o método GLM (modelos lineares generalizados) para comparar as áreas sob as curvas dos espectros de reflectância difusa, *in vivo*, na faixa espectral de 300 nm até 1040 nm, em duas regiões de pele, uma acometida com LEV e outra visualmente sem LEV. Os espectros foram obtidos em dois momentos, um antes e outro após um mês após do início de tratamentos com corticosteroide, fotobiomodulação ou terapia fotodinâmica. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, considerando como cofatores a idade, o tempo de prurido e a escala de Fitzpatrick.

Os espectros de absorbância aparente foram determinados a partir dos espectros de reflectância difusa. A partir de sua análise, observou-se que há pontos de máximo em duas bandas. A primeira tem ponto de máximo em $\lambda_1 = (4226 \pm 54) \text{ nm}$ e a segunda, em $\lambda_2 = (4926 \pm 31) \text{ nm}$ que podem estar relacionadas às bandas de absorção Soret de três cromóforos: a oxihemoglobina (413 nm), a deoxihemoglobina (430 nm) ou a bilirrubina (460 nm).

Foi considerada uma paciente de cada grupo de tratamento e, para elas, foi calculada a razão entre os espectros de reflectância difusa de região com LEV e de região sem LEV, antes e após os tratamentos. Posteriormente, foi calculado o logaritmo natural dessa razão, na região entre 620 nm e 720 nm e foi realizada regressão linear. De acordo com Kollias e Baqer ⁴³, a concentração de melanina está relacionada ao coeficiente linear dessa regressão. Desta forma, verificou-se que a paciente do grupo FBM apresentou a menor redução na concentração de melanina, de 2,8%, enquanto que a do grupo COR apresentou a maior redução, de 81,7% e a do grupo PDT, 73,8% de redução quando comparados os momentos inicial e final dos tratamentos.

De acordo com os resultados, após um mês de tratamento, as pacientes tratadas com terapia fotodinâmica apresentaram a região da pele com líquen escleroso menos refletora. Enquanto as pacientes tratadas com fotobiomodulação apresentaram a menor redução na pigmentação.

Com relação aos tratamentos, A técnica mostrou que houve alterações ópticas diferentes para tipos diferentes de tratamento. No entanto, existe a necessidade de se aprofundar mais na análise espectroscópica e se realizar exames histológicos complementares afim de se conhecer maiores detalhes sobre a potencialidade da técnica no estudo de dermatoses.

Os resultados mostram que a técnica de espectroscopia de reflectância difusa *in vivo* foi sensível a pequenas alterações ópticas que ocorreram na pele com e sem LEV em um mês de tratamento. Portanto a técnica configura mais uma ferramenta para estudar e detectar alterações em pele com dermatoses.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectroscopia de reflectância difusa *in vivo* demonstrou ser uma técnica sensível a pequenas alterações em tecidos como a pele. Portanto, pode ser utilizada e aprimorada no estudo de dermatoses, mas ainda requer estudos complementares para determinar sua potencialidade na detecção de alterações ópticas sutis.

Com relação ao LEV, ainda há muito o que se conhecer e a se fazer com relação à espectroscopia de reflectância difusa e de absorbância aparente. Os resultados são bastante promissores e ainda devem ser comprovados por intermédio de outras técnicas histológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Gemert M, Jacques S, Sterenborg H, Star W. Skin Optics. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 1989;36(12):1146-1154.
2. Belotto R, Chavantes M, Tardivo J, et al. Therapeutic Comparison Between Treatments For Vulvar Lichen Sclerosus: Study Protocol Of A Randomized Prospective And Controlled Trial. *BMC Womens Health*. 2017;17.
3. Maruyama K, Nori F, Vedral V. Colloquium: The Physics Of Maxwell's Demon And Information. *Reviews of Modern Physics*. 2009;81(1):1-23.
4. Lewis G. The Conservation Of Photons. *Nature*. 1926;118:874.
5. Griffiths D. Introduction To Elementary Particles. In: KGaA W-VVGC. Introduction To Elementary Particles. Weinheim, Germany: John Wiley & Sons; 2008.
6. Maiman T. Stimulated Optical Emission In Ruby. *Journal of the Optical Society of America*. 1960;50(11):1134-1134.
7. Ribeiro J. "Of Colours" by Isaac Newton - A Commented Translation. *Revista Brasileira de Ensino de Física*. 2017;39(4).
8. Mehta A, Rief M, Spudich J, Smith D, Simmons R. Single-Molecule Biomechanics With Optical Methods. *Science*. 1999;283(5408):1689-1695.
9. Schmidt M, He J, Szczerba R, et al. Herschel/HIFI Observations Of The Circumstellar Ammonia Lines In IRC+10216. *Astronomy & Astrophysics*. 2016;592.
10. Frercks J, Weber H, Wiesenfeldt G. Reception And Discovery: The Nature Of Johann Wilhelm Ritter's Invisible Rays. *Studies in History and Philosophy of Science*. 2009;40(2):143-156.
11. Al-Khalili J. The Birth Of The Electric Machines: A Commentary On Faraday (1832) 'Experimental Researches In Electricity'. *Philosophical Transactions Of The Royal Society A Mathematical Physical and Engineering Sciences*. 2015;373(2039).
12. Schwab A, Fischer P. Maxwell, Hertz, and German Radio-Wave History. *Proceedings Of The Ieee*. 1998;86(7):1312-1318.
13. Smirnov-Rueda R. On Essential Incompleteness Of Hertz's Experiments On Propagation Of Electromagnetic Interactions. *Foundations of Physics*. 2005;35(1):1-31.
14. Widder J. The Origins Of Radiotherapy: Discovery Of Biological Effects Of X-Rays By Freund In 1897, Kienbock's Crucial Experiments In 1900, And Still It Is The Dose. *Radiotherapy and Oncology*. 2014;112(1):150-152.
15. Gerward L, Rassat A. Paul Villard's Discovery Of Gamma Rays - A Centenary. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iv Physique Astrophysique*. 2000;1(7):965-973.
16. Andrew B, Suit H. The Centenary Of The Discovery Of the Bragg Peak. *Radiotherapy And Oncology*. 2004;73(3):265-268.
17. Ferraro R, Sforza D. Arago (1810): The First Experimental Result Against The Ether. *European Journal of Physics*. 2005;26(1):195-204.
18. Dijksterhuis F. Once Snell Breaks Down: From Geometrical To Physical Optics In The Seventeenth Century. *Annals of Science*. 2004;61(2):165-185.
19. Tuchin V. Light Scattering Study Of Tissues. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*. 1997;167(5):517 - 539.
20. Bashkatov A, Genina E, Kochubey V, Tuchin V. Optical Properties Of The Subcutaneous Adipose Tissue In The Spectral Range 400-2500 nm. *Optics and Spectroscopy*. 2005;99(5):836-842.
21. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E. Quantitative Optical Spectroscopy For Tissue Diagnosis. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1996;47:555-606.
22. Karu T. The Molecular Mechanism Of The Low-Intensity Laser-Light Therapeutic Action. *Doklady Akademii Nauk Sssr*. 1986;291(5):1245-1249.
23. Karu T. Photobiological Fundamentals Of Low Power Laser Therapy. *Ieee Journal of Quantum Electronics*. 1987;23(10):1703-1717.
24. Karu T. Primary And Secondary Mechanisms Of Action Of Visible To Near-IR Radiation On Cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 1999;49(1):1-17.
25. Mester E, Szende B, Spiry T, Scher A. Stimulation Of Wound-Healing By Laser Rays. *Acta Chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 1972;13(3):315-324.

26. Kovacs I, Mester E, Gorog P. Stimulation Of Wound-Healing With Laser-Beam In Rat. *Experientia*. 1974;30(11):1275-1276.
27. Turnér J, ed *Low Laser Therapy: Clinical Practice And Scientific Background*. Sweden: Prima Books; 1999.
28. Young A. Chromophores In Human Skin. *Physics in Medicine and Biology*. 1997;42(5):789 - 802.
29. Zonios G, Bykowski J, Kollias N. Skin Melanin, Hemoglobin, And Light Scattering Properties Can Be Quantitatively Assessed In Vivo Using Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;117(6):1452-1457.
30. Zonios G, Dimou A. Melanin Optical Properties Provide Evidence For Chemical And Structural Disorder In Vivo. *Optics Express*. 2008;16(11):8263-8268.
31. Sandell J, Zhu T. A Review Of In Vivo Optical Properties Of Human Tissues And Its Impact On PDT. *Journal of Biophotonics*. 2011;4(11-12):773-787.
32. Bashkatov A, Genina E, Tuchin V. Optical Properties Of Skin, Subcutaneous, And Muscle Tissues: A Review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2011;4(1):9-38.
33. Sakudo A. Near-Infrared Spectroscopy For Medical Applications: Current Status And Future Perspectives. *Clinica Chimica Acta*. 2016;455:181-188.
34. Roberts AP, Alloy M, Oris J. Review Of The Photo-Induced Toxicity Of Environmental Contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 2017;191:160-167.
35. Tapis-Mercado J, Garcia-Weidner A, Galindo-Cavazos M, Khomenko A, Garcia-Zarate M. Differential Fiber Optic Sensor. *Revista Mexicana De Fisica*. 2004;50(2):208-212.
36. Minnaert M. The Fraunhofer Lines Of The Solar Spectrum. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*. 1947;107(3):274-&.
37. Wildey R, Burbidge E, Burbidge G, Sandage A. Effect Of Fraunhofer Lines On U, B, V Measurements. *Astrophysical Journal*. 1962;135(1):94-&.
38. Salisbury J, Wald A, Daria D. Thermal-Infrared Remote-Sensing And Kirchhoff Law .1. Laboratory Measurements. *Journal of Geophysical Research-Solid Earth*. 1994;99(B6):11897-11911.
39. Borisova E, Pavlova E, Kundurjiev T, Troyanova P, Genova T, Avramov L. Light-Induced Autofluorescence And Diffuse Reflectance Spectroscopy In Clinical Diagnosis Of Skin Cancer. presented at: Conference on Biophotonics - Photonic Solutions for Better Health Care IV; Apr 14-17, 2014; Brussels, BELGIUM.
40. Savitzky A, Golay M. Smoothing + Differentiation Of Data By Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*. 1964;36(8):1627-&.
41. Chen J, Jonsson P, Tamura M, Gu Z, Matsushita B, Eklundh L. A Simple Method For Reconstructing A High-Quality NDVI Time-Series Data Set Based On The Savitzky-Golay Filter. *Remote Sensing of Environment*. 2004;91(3-4):332-344.
42. Eilers P. A Perfect Smoother. *Analytical Chemistry*. 2003;75(14):3631-3636.
43. Kollias N, Baqer A. Spectroscopic Characteristics Of Human Melanin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 1985;85(1):38-42.
44. Cheong W, Prah SA, Welch A. A Review Of The Optical-Properties Of Biological Tissues. *Ieee Journal of Quantum Electronics*. 1990;26(12):2166-2185.
45. Wilson B, Jacques S. Optical Reflectance And Transmittance Of Tissues - Principles And Applications. *Ieee Journal of Quantum Electronics*. 1990;26(12):2186-2199.
46. Prah S, Vangemert M, Welch A. Determining The Optical-Properties Of Turbid Media By Using The Adding-Doubling Method. *Applied Optics*. 1993;32(4):559-568.
47. Tuchin V, Maksimova I, Zimnyakov D, Kon I, Mavlutov A, Mishin A. Light Propagation In Tissues With Controlled Optical Properties. presented at: Conference on Photon Propagation in Tissue II; 1996 Sep 07-08, 1996; Vienna, Austria.
48. Bashkatov A, Genina E, Kochubey V, Tuchin V. Optical Properties Of Human Skin, Subcutaneous And Mucous Tissues In The Wavelength Range From 400 To 2000 nm. *Journal of Physics D-Applied Physics*. 2005;38(15):2543-2555.
49. Zonios G, Dimou A. Modeling Diffuse Reflectance From Semi-Infinite Turbid Media: Application To The Study Of Skin Optical Properties. *Optics Express*. 2006;14(19):8661-8674.

50. Wilson R, Chandra M, Scheiman J, et al. Optical Spectroscopy Detects Histological Hallmarks Of Pancreatic Cancer. *Optics Express*. 2009;17(20):17502-17516.
51. Brown JQ, Vishwanath K, Palmer G, Ramanujam N. Advances In Quantitative UV-Visible Spectroscopy For Clinical And Pre-Clinical Application In Cancer. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;20(1):119-131.
52. Jacques SL. How Tissue Optics Affect Dosimetry Of Photodynamic Therapy. *Journal of Biomedical Optics*. 2010;15(5).
53. Lister T, Wright P, Chappell P. Optical Properties Of Human Skin. *Journal of Biomedical Optics*. 2012;17(9).
54. Jacques S. Optical Properties Of Biological Tissues: A Review. *Physics in Medicine and Biology*. 2013;58(14):5007-5008.
55. Jacques S. Quick Analysis Of Optical Spectra To Quantify Epidermal Melanin And Papillary Dermal Blood Content Of Skin. *Journal of Biophotonics*. 2015;8(4):309-316.
56. Fukutomi D, Ishii K, Awazu K. Determination Of The Scattering Coefficient Of Biological Tissue Considering The Wavelength And Absorption Dependence Of The Anisotropy Factor. *Optical Review*. 2016;23(2):291-298.
57. Wright C, Karsten AE, Wilkes M, et al. Diffuse Reflectance Spectroscopy Versus Mexameter (R) MX18 Measurements of Melanin and Erythema In An African Population. *Photochemistry and Photobiology*. 2016;92(4):632-636.
58. Petruk V, Ivanov A, Kvaternyuk S, Barun V. Spectrophotometric Method for Differentiation of Human Skin Melanoma. I. Optical Diffuse Reflection Coefficient. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2016;83(1):85-92.
59. Petruk V, Ivanov A, Kvaternyuk S, Barun V. Spectrophotometric Method for Differentiation of Human Skin Melanoma. II. Diagnostic Characteristics. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2016;83(2):261-270.
60. Cortes V, Blasco J, Aleixos N, Cubero S, Talens P. Visible and Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy for Fast Qualitative and Quantitative Assessment of Nectarine Quality. *Food and Bioprocess Technology*. 2017;10(10):1755-1766.
61. Gomez A, He Y, Pereira A. Non-Destructive Measurement Of Acidity, Soluble Solids And Firmness Of Satsuma Mandarin Using Vis/NIR-Spectroscopy Techniques. *Journal of Food Engineering*. 2006;77(2):313-319.
62. Martens H, Nielsen J, Engelsen S. Light Scattering And Light Absorbance Separated By Extended Multiplicative Signal Correction. Application To Near-Infrared Transmission Analysis Of Powder Mixtures. *Analytical Chemistry*. 2003;75(3):394-404.
63. Bruun S, Sondergaard I, Jacobsen S. Analysis Of Protein Structures And Interactions In Complex Food By Near-Infrared Spectroscopy. 1. Gluten Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(18):7234-7243.
64. Melo C, Lima A, Brasil I, et al. Characterization Of Light Penetration In Rat Tissues. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 2001;19(4):175-179.
65. Saager RB, Cuccia D, Durkin A. Determination Of Optical Properties Of Turbid Media Spanning Visible And Near-Infrared Regimes Via Spatially Modulated Quantitative Spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2010;15(1).
66. Vasefi F, MacKinnon N, Saager R, Durkin A, Chave R, Farkas D. Quantifying The Optical Properties Of Turbid Media Using Polarization Sensitive Hyperspectral Imaging (SkinSpect): Two-Layer Optical Phantom Studies. In: Farkas DL, Nicolau DV, Nicolau RC. *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XIII*. Vol 93282015.
67. Ding H, Lu J, Wooden W, Kragel P, Hu X. Refractive Indices Of Human Skin Tissues At Eight Wavelengths And Estimated Dispersion Relations Between 300 And 1600 nm. *Physics in Medicine and Biology*. 2006;51(6):1479-1489.
68. Kim B. Optical Property Measurements Of Turbid Media Using Continuous-Wave Light Sources. *Journal of the Korean Physical Society*. 2004;44(2):427-434.
69. Malsan J, Gurjar R, Wolf D, Vishwanath K. Extracting Optical Properties Of Turbid Media Using Radially And Spectrally Resolved Diffuse Reflectance. In: Raghavachari R, Liang R. *Design and Quality for Biomedical Technologies VII*. Vol 89362014.

70. Turnér J, Hode L, eds. *The Laser Therapy Handbook: A Guide for Reserach Scientists, Doctors, Dentists, Veterinarians and Other Interested Parties Within the Medical Field Sweden*: Prima Books; 2004.
71. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2015;33(4):183-184.
72. Hamblin M. Introduction to Experimental and Clinical Studies Using Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT). *Lasers in Surgery and Medicine*. 2010;42(6):447-449.
73. Hamblin M, de Sousa M, Arany P, Carroll J, Patthoff D. Low Level Laser (Light) Therapy and Photobiomodulation: The Path Forward. presented at: Conference on Mechanisms for Low-Light Therapy X; Feb 07-08, 2015; San Francisco, CA.
74. Mandavilli A. The Sunshine Cure. *Nature Medicine*. 2007;13(4):396-397.
75. Mester E, Szende B, Gärtner P. The Effect Of Laser Beams On The Growth Of Hair In Mice. *Radiobiol Radiother (Berl)*. 1968;9(5):621-626.
76. Karu T. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). *Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2014;20(2).
77. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The History Of Photodetection And Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2001;74(5):656-669.
78. Nseyo U, DeHaven J, Dougherty T, et al. Photodynamic Therapy (PDT) In The Treatment Of Patients With Resistant Superficial Bladder Cancer: A Long Term Experience. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 1998;16(1):61-68.
79. Zhou Z, Song J, Nie L, Chen X. Reactive Oxygen Species Generating Systems Meeting Challenges Of Photodynamic Cancer Therapy. *Chemical Society Reviews*. 2016;45(23):6597 - 6626.
80. Chala S, Wetchakun K, Phanichphant S, Inceesungvorn B, Wetchakun N. Enhanced Visible - Light-Response Photocatalytic Degradation Of Methylene Blue On Fe-Loaded BiVO4 Photocatalyst. *Journal of Alloys and Compounds*. 2014;597:129-135.
81. Junqueira H, Severino D, Dias L, Gugliotti M, Baptista M. Modulation Of Methylene Blue Photochemical Properties Based On Adsorption At Aqueous Micelle Interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2002;4(11):2320-2328.
82. Kharkwal G, Sharma S, Huang Y, Dai T, Hamblin M. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2011;43(7):755-767.
83. Dai T, Fuchs B, Coleman J, et al. Concepts And Principles Of Photodynamic Therapy As An Alternative Antifungal Discovery Platform. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3.
84. Hertle M, Adams J, Watt F. Integrin Expression During Human Epidermal Development In Vivo And In Vitro. *Development*. 1991;112(1):193-206.
85. Grando S, Kist D, Qi M, Dahl M. Human Keratinocytes Syntesize, Secrete, And Degrade Acetylcholine. *Journal of Investigative Dermatology*. 1993;101(1):32-36.
86. Netzaff F, Lehr C, Wertz P, Schaefer U. The Human Epidermis Models EpiSkin (R), SkinEthic (R) and EpiDerm (R): An Evaluation Of Morphology And Their Suitability For Testing Phototoxicity, Irritancy, Corrosivity, And Substance Transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):167-178.
87. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb R. In-Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy Of Human Skin - Melanin Provides Strong Contrast. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995;104(6):946-952.
88. Jablonski NG, Chaplin G. The Evolution Of Human Skin Coloration. *Journal of Human Evolution*. 2000;39(1):57-106.
89. Wu S, Grouard-Vogel G, Sun W, et al. Human Skin Langerhans Cells Are Targets Of Dengue Virus Infection. *Nature Medicine*. 2000;6(7):816-820.
90. Oriá R, Ferreira F, Santana E, Fernandes M, Brito G. Study Of Age-Related Changes In Human Skin Using Histomorphometric And Autofluorescence Approaches. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2003;78(4):425-434.
91. Baumann L. Skin Ageing And Its Treatment. *Journal of Pathology*. 2007;211(2):241-251.
92. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(6):12222-12248.

93. Matts P, Dykes P, Marks R. The Distribution Of Melanin In Skin Determined In Vivo. *British Journal of Dermatology*. 2007;156(4):620-628.
94. Ellers S, Bach D, Gaber R, et al. Accuracy Of Self-Report In Assessing Fitzpatrick Skin Phototypes I Through VI. *Jama Dermatology*. 2013;149(11):1289-1294.
95. Burrows LJ, Shaw HA, Goldstein AT. The Vulvar Dermatoses. *Journal of Sexual Medicine*. 2008;5(2):276-283.
96. Chan M, Zimarowski M. Vulvar Dermatoses: A Histopathologic Review And Classification Of 183 Cases. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2015;42(8):510-518.
97. Lynch P, Moyal-Barrocco M, Bogliatto F, Micheletti L, Scurry J. 2006 ISSVD Classification Of Vulvar Dermatoses: Pathologic Subsets And Their Clinical Correlates. *Journal of Reproductive Medicine*. 2007;52(11):20A-20A.
98. Goldstein A, Parneix-Spake A, McCormick C, Burrows L. Pimecrolimus Cream 1% For Treatment Of Vulvar Lichen Simplex Chronicus: An Open-Label, Preliminary Trial. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2007;64(4):180-186.
99. Goolamal S, Barnes E, Irvine W, Shuster S. Organ-Specific Antibodies In Patients With Lichen Sclerosus. *British Medical Journal*. 1974;4(5936):78-79.
100. Lorenz B, Kaufman R, Kutzner S. Lichen Sclerosus - Therapy With Clobetasol Propionate. *Journal of Reproductive Medicine*. 1998;43(9):790-794.
101. Bornstein J, Heifetz S, Kellner Y, Stolar Z, Abramovici H. Clobetasol Dipropionate 0.05% Versus Testosterone Propionate 2% Topical Application For Severe Vulvar Lichen Sclerosus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998;178(1):80-84.
102. Tong L, Sun G, Teng J. Pediatric Lichen Sclerosus: A Review of the Epidemiology and Treatment Options. *Pediatric Dermatology*. 2015;32(5):593-599.
103. Goldstein A, Marinoff S, Christopher K, Srodon M. Prevalence Of Vulvar Lichen Sclerosus In A General Gynecology Practice. *Journal of Reproductive Medicine*. 2005;50(7):477-480.
104. Rouzier R, Haddad B, Deyrolle C, Pelisse M, Moyal-Barracco M, Paniel B. Perineoplasty For The Treatment Of Introital Stenosis Related To Vulvar Lichen Sclerosus. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186(1):49-52.
105. Osiecka B, Nockowski P, Jurczynszyn K, Ziolkowski P. Photodynamic Therapy Of Vulvar Lichen Sclerosus Et Atrophicus In A Woman With Hypothyreosis - Case Report. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2012;9(2):186-188.
106. Helgesen A, Warloe T, Pripp A, et al. Vulvovaginal Photodynamic Therapy Vs. Topical Corticosteroids In genital Erosive Lichen Planus: A Randomized Controlled Trial. *British Journal of Dermatology*. 2015;173(5):1156-1162.
107. Thorstensen K, Birenbaum D. Recognition and Management of Vulvar Dermatologic Conditions: Lichen Sclerosus, Lichen Planus, and Lichen Simplex Chronicus. *Journal of Midwifery & Womens Health*. 2012;57(3):260-275.
108. Davick J, Samuelson M, Krone J, Stockdale C. The Prevalence of Lichen Sclerosus in Patients With Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2017;36(4):305-309.
109. Borghi A, Virgili A, Minghetti S, Toni G, Corazza M. Clearance In Vulvar Lichen Sclerosus: A Realistic Treatment Endpoint Or A Chimera? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2018;32(1):96-101.
110. Prodromidou A, Chatziioannou E, Daskalakis G, Stergios K, Pergialiotis V. Photodynamic Therapy for Vulvar Lichen Sclerosus-A Systematic Review. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2018;22(1):58-65.
111. Kalia S, Zhao J, Zeng H, McLean D, Kollias N, Lui H. Melanin Quantification By In Vitro And In Vivo Analysis Of Near-Infrared Fluorescence. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2018;31(1):31-38.
112. Zhu C, Chen S, Chui C, Tan B, Liu Q. Early Detection And Differentiation Of Venous And Arterial Occlusion In Skin Flaps Using Visible Diffuse Reflectance Spectroscopy And Autofluorescence Spectroscopy. *Biomedical Optics Express*. 2016;7(2):570-580.
113. Henricson J, John R, Anderson C, Wilhelms D. Diffuse Reflectance Spectroscopy: Getting the Capillary Refill Test Under One's Thumb. *Jove-Journal of Visualized Experiments*. 2017(130).

114. Monsálvez V, Rivera R, Vanaclocha F. Lichen Sclerosus. *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101(1):31-38.
115. Carlson JA, Grabowski R, Mu XC, Del Rosario A, Malfetano J, Slominski A. Possible Mechanisms Of Hypopigmentation In Lichen Sclerosus. *American Journal of Dermatopathology.* 2002;24(2):97-107.
116. Mustafa F, Jaafar M. Comparison of Wavelength-Dependent Penetration Depths Of Lasers In Different Types Of Skin In Photodynamic Therapy. *Indian Journal of Physics.* 2013;87(3):203 - 209.
117. Anderson R, Parrish J. The Optics Of Human-Skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 1981;77(1):13-19.
118. Tzeng S, Guo J, Yang C, et al. Portable Handheld Diffuse Reflectance Spectroscopy System For Clinical Evaluation Of Skin: A Pilot Study In Psoriasis Patients. *Biomedical Optics Express.* 2016;7(2):616-628.
119. Yudovsky D, Pilon L. Retrieving Skin Properties From In Vivo Spectral Reflectance Measurements. *Journal of Biophotonics.* 2011;4(5):305-314.
120. Terzi A, Storelli E, Bettini S, et al. Effects Of Processing On Structural, Mechanical And Biological Properties Of Collagen-Based Substrates For Regenerative Medicine. *Scientific Reports.* 2018;8.
121. Stamatias G, Zmudzka B, Kollias N, Beer J. Non-Invasive Measurements Of Skin Pigmentation In Situ. *Pigment Cell Research.* 2004;17(6):618-626.
122. Karsten A, Singh A, Karsten P, Braun M. Diffuse Reflectance Spectroscopy As A Tool To Measure The Absorption Coefficient In Skin: South African Skin Phototypes. *Photochemistry and Photobiology.* 2013;89(1):227-233.
123. Smith K. The Photobiological Basis Of Low Level Laser Radiation Therapy. *Laser Therapy.* 1991;3(1):19-24.
124. Xu Y, Liu T, Cheng L. Photobiomodulation Process. *International Journal of Photoenergy.* 2012.
125. Sekar S, Bargigia I, Mora A, et al. Diffuse Optical Characterization Of Collagen Absorption From 500 To 1700 nm. *Journal of Biomedical Optics.* 2017;22(1).

APÊNDICE 1 – ESPECTROS DE TODAS AS PACIENTES

Espectros de reflectância difusa originais, após suavização pela técnica SGS e de absorvância aparente de cada paciente antes e depois de um mês de tratamento, de regiões sem e com LEV.

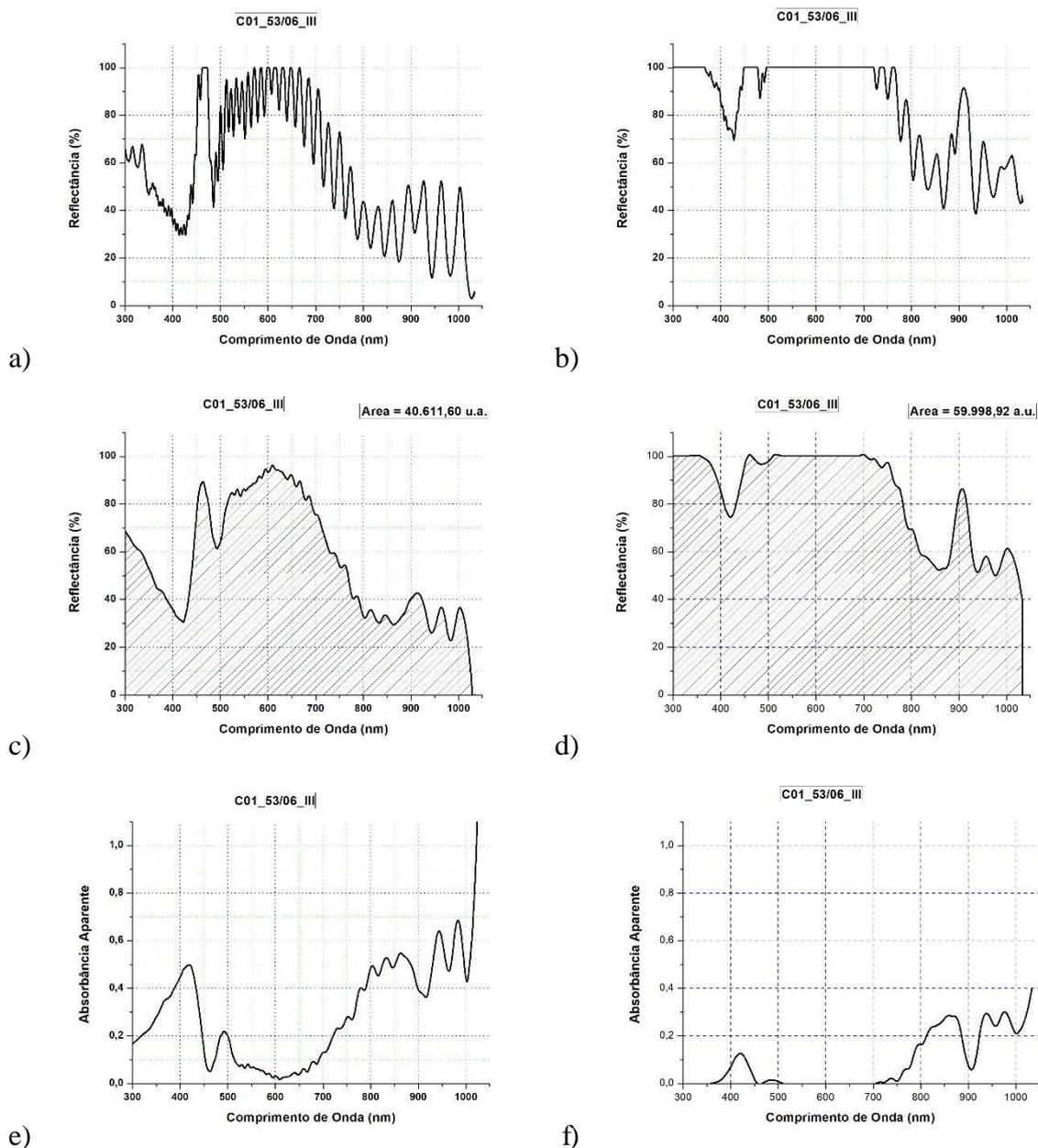


Figura 30 – Grupo COR, paciente C01 de 53 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

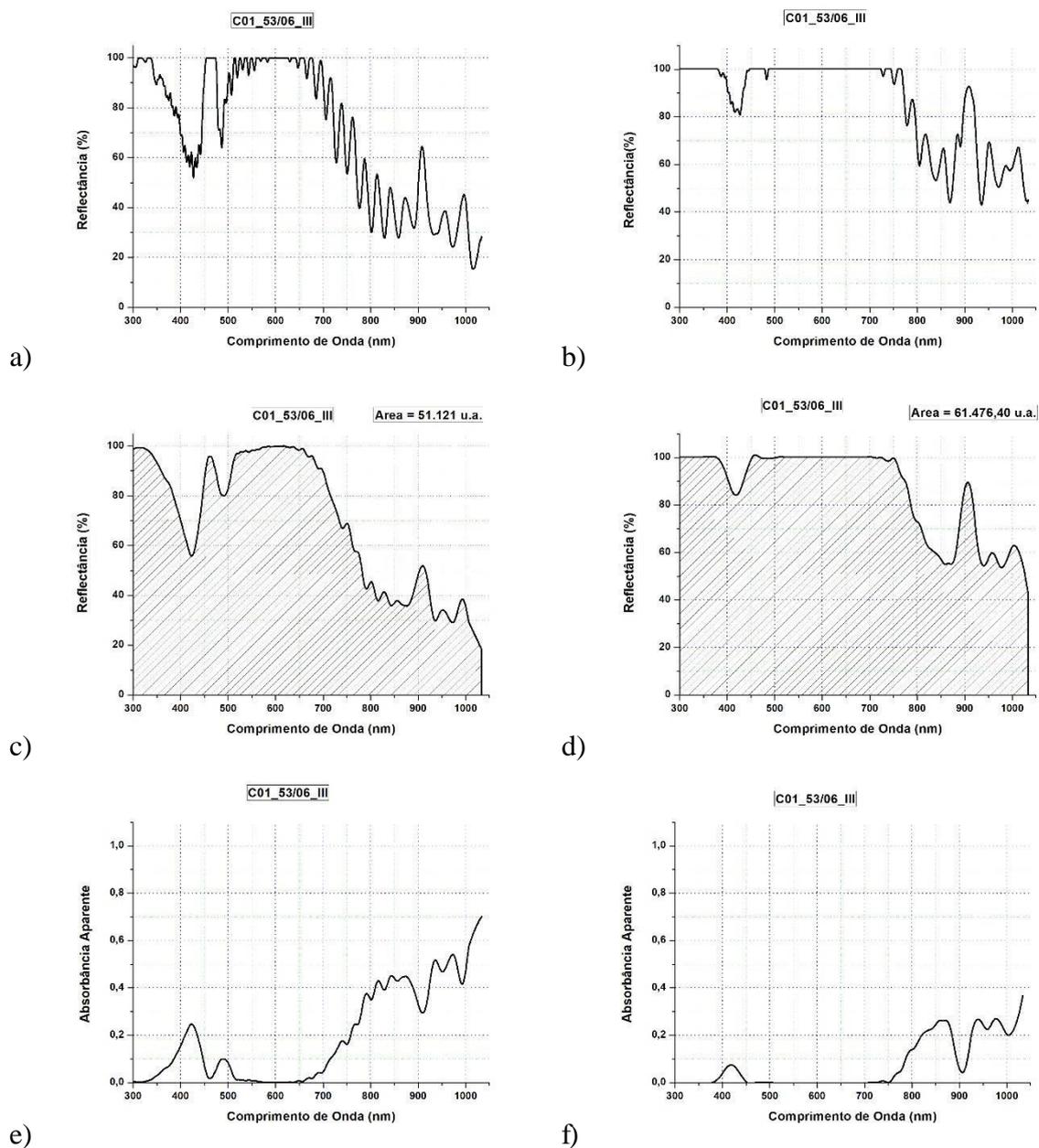


Figura 31 – Grupo COR, paciente C01 de 53 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

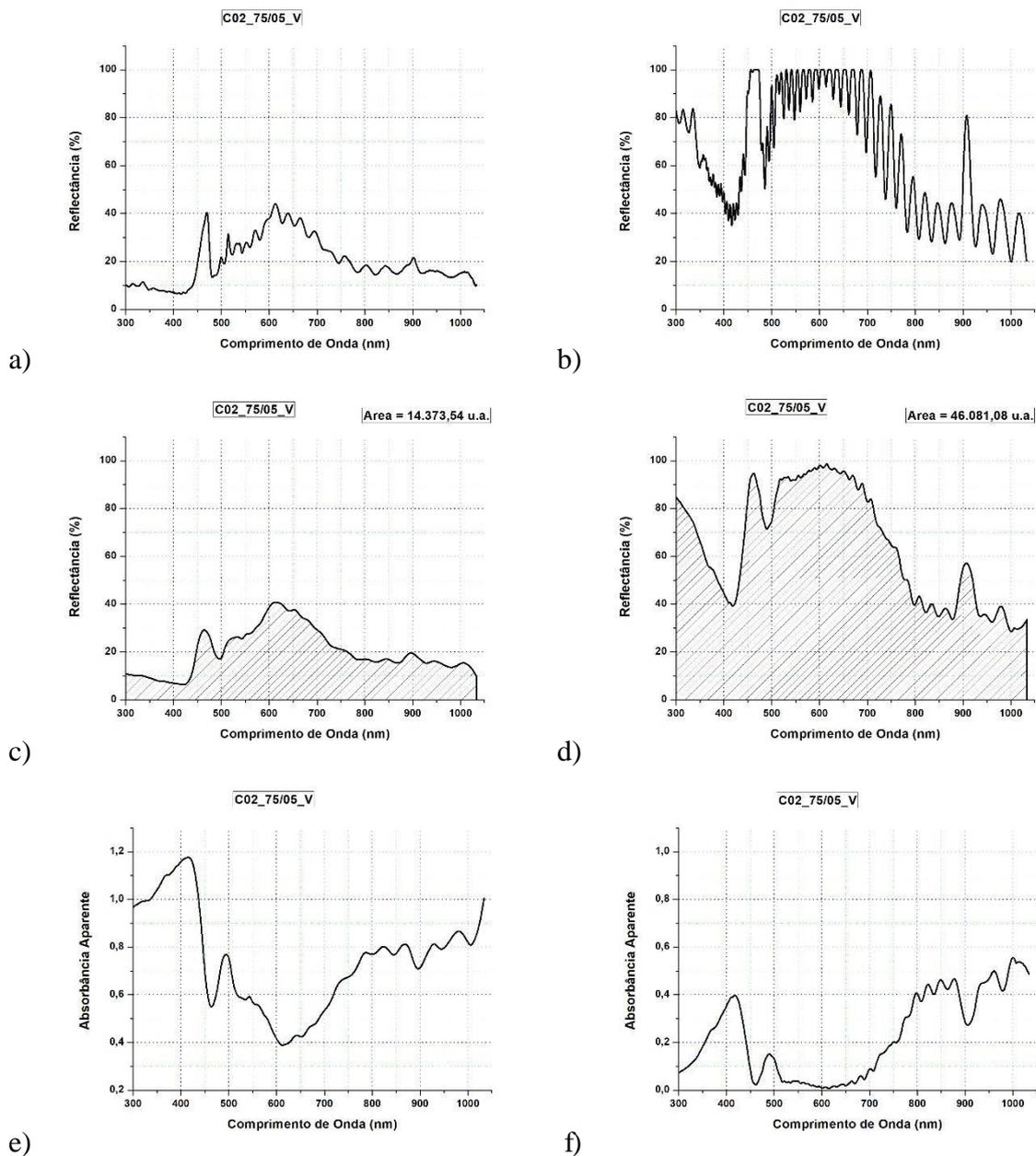


Figura 32 – Grupo COR, paciente C02 de 75 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=V, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

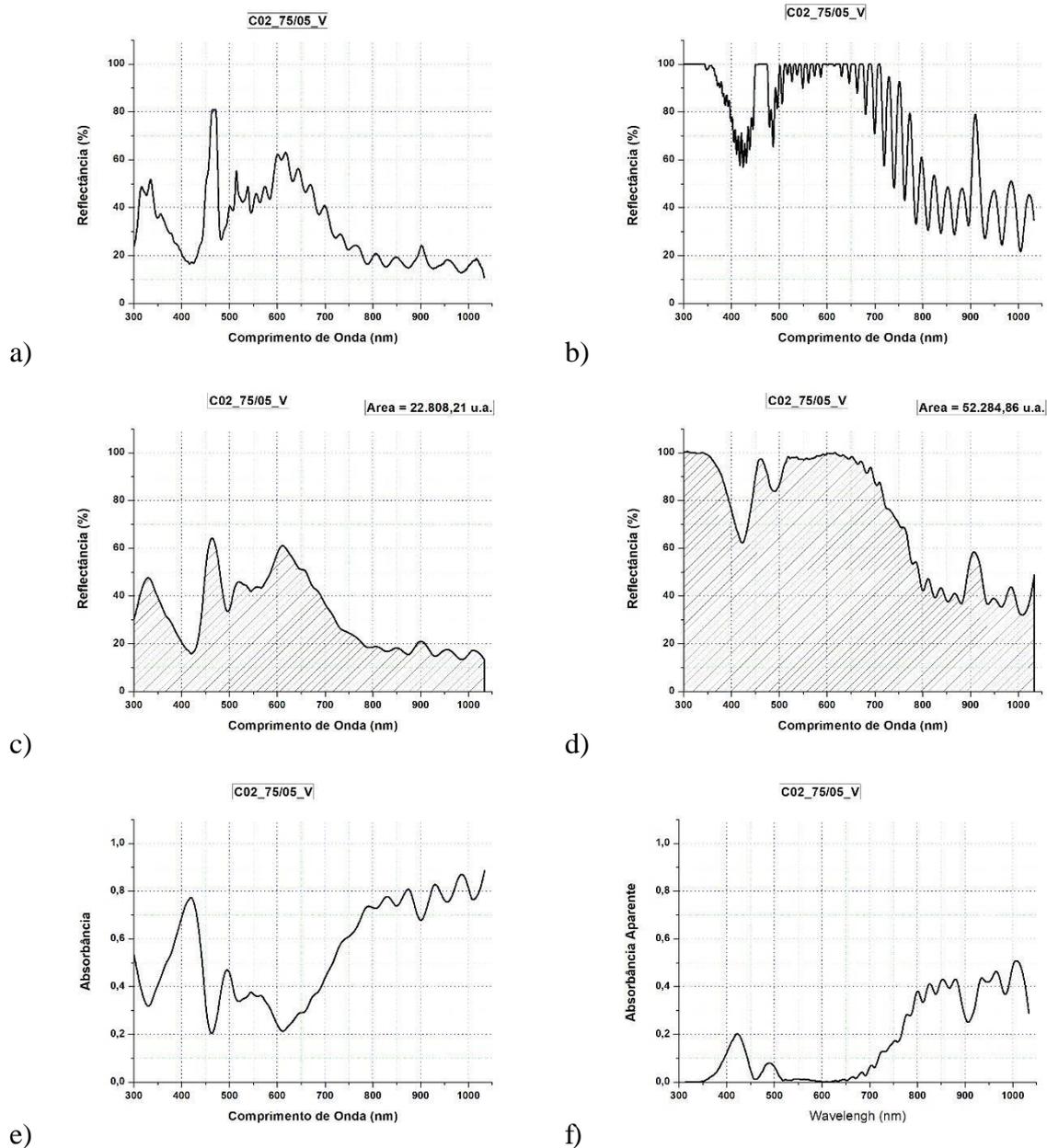


Figura 33 – Grupo COR, paciente C02 de 75 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=V, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

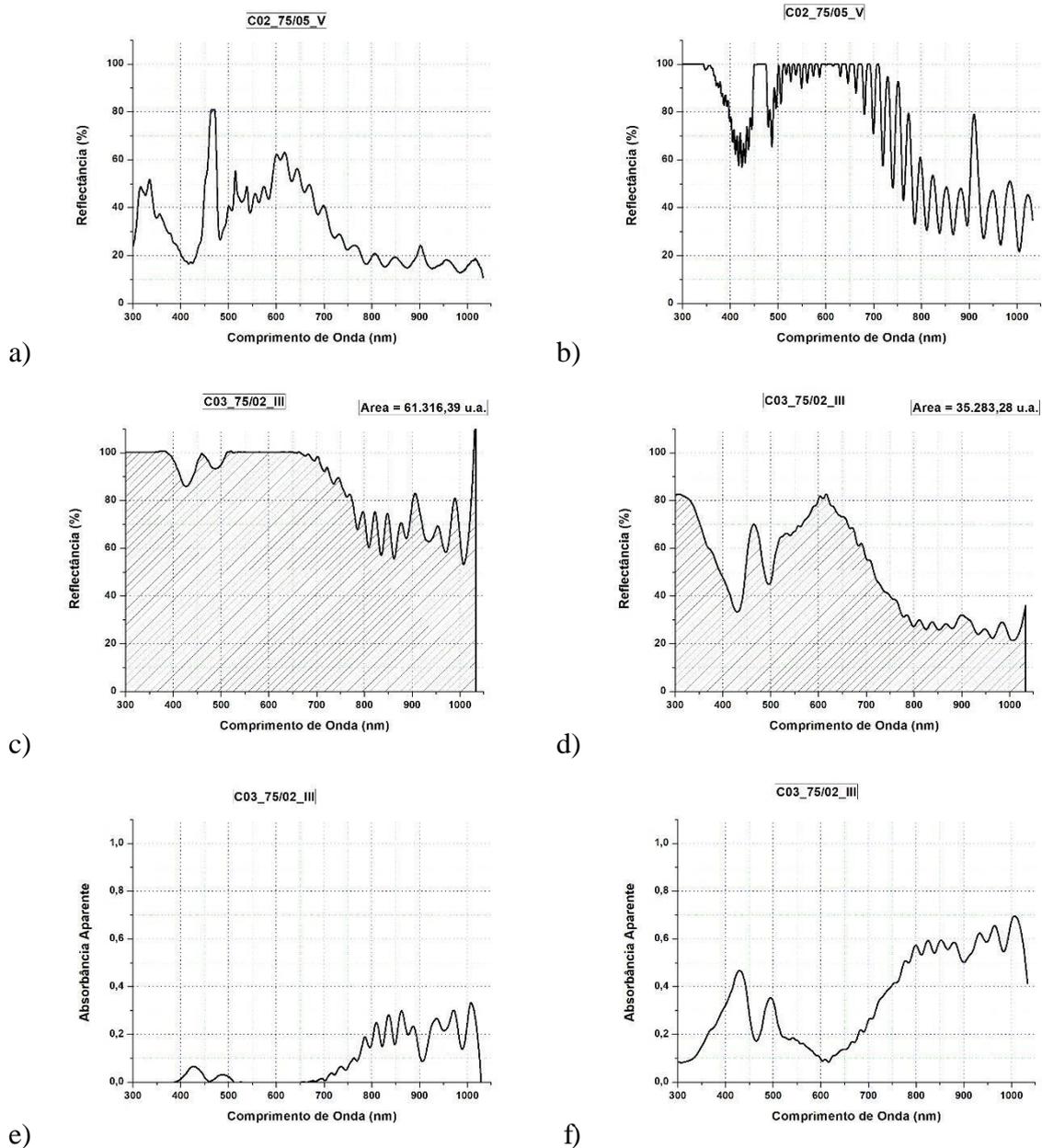


Figura 34 – Grupo COR, paciente C03 de 75 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

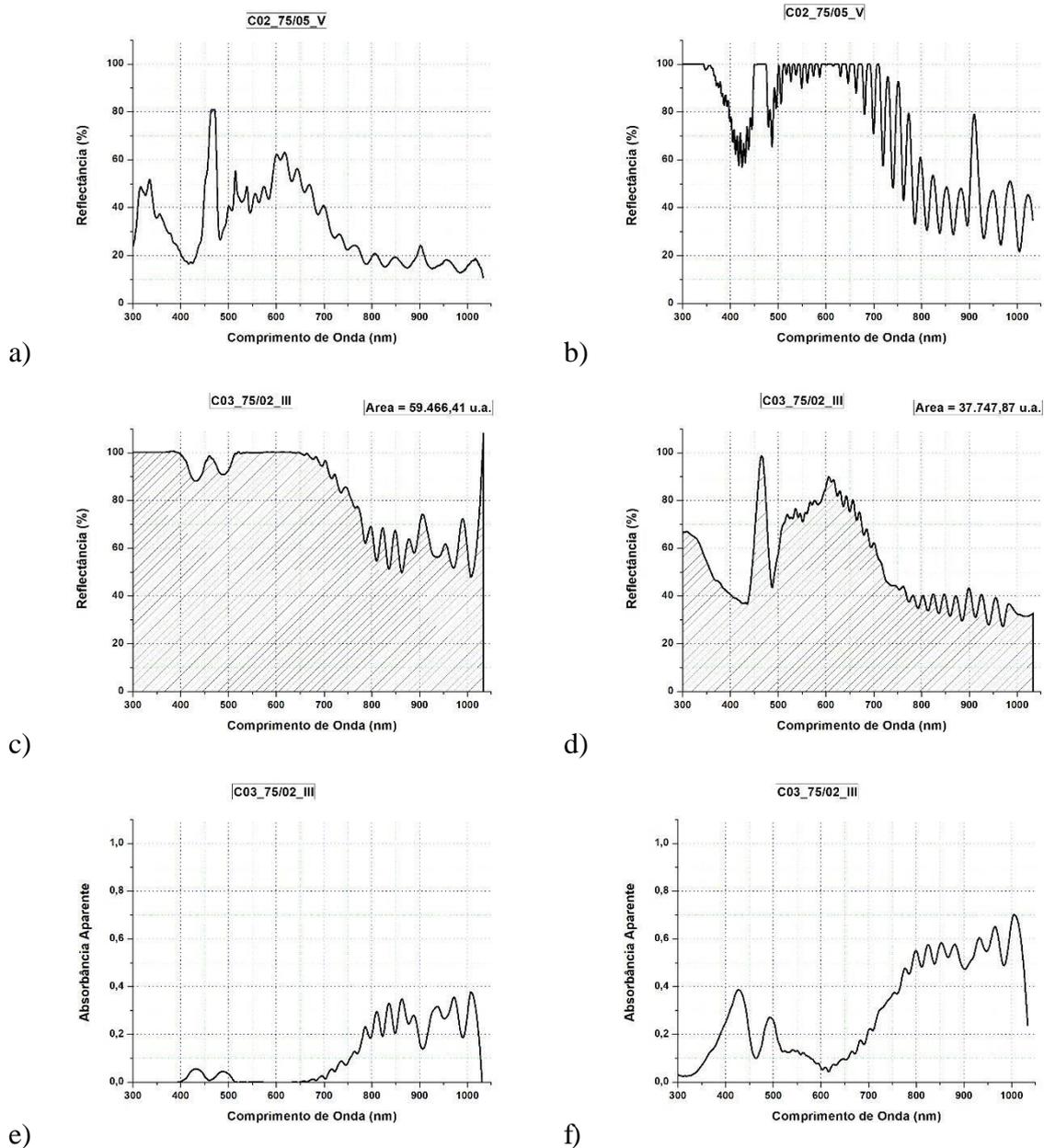


Figura 35 – Grupo COR, paciente C03 de 75 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

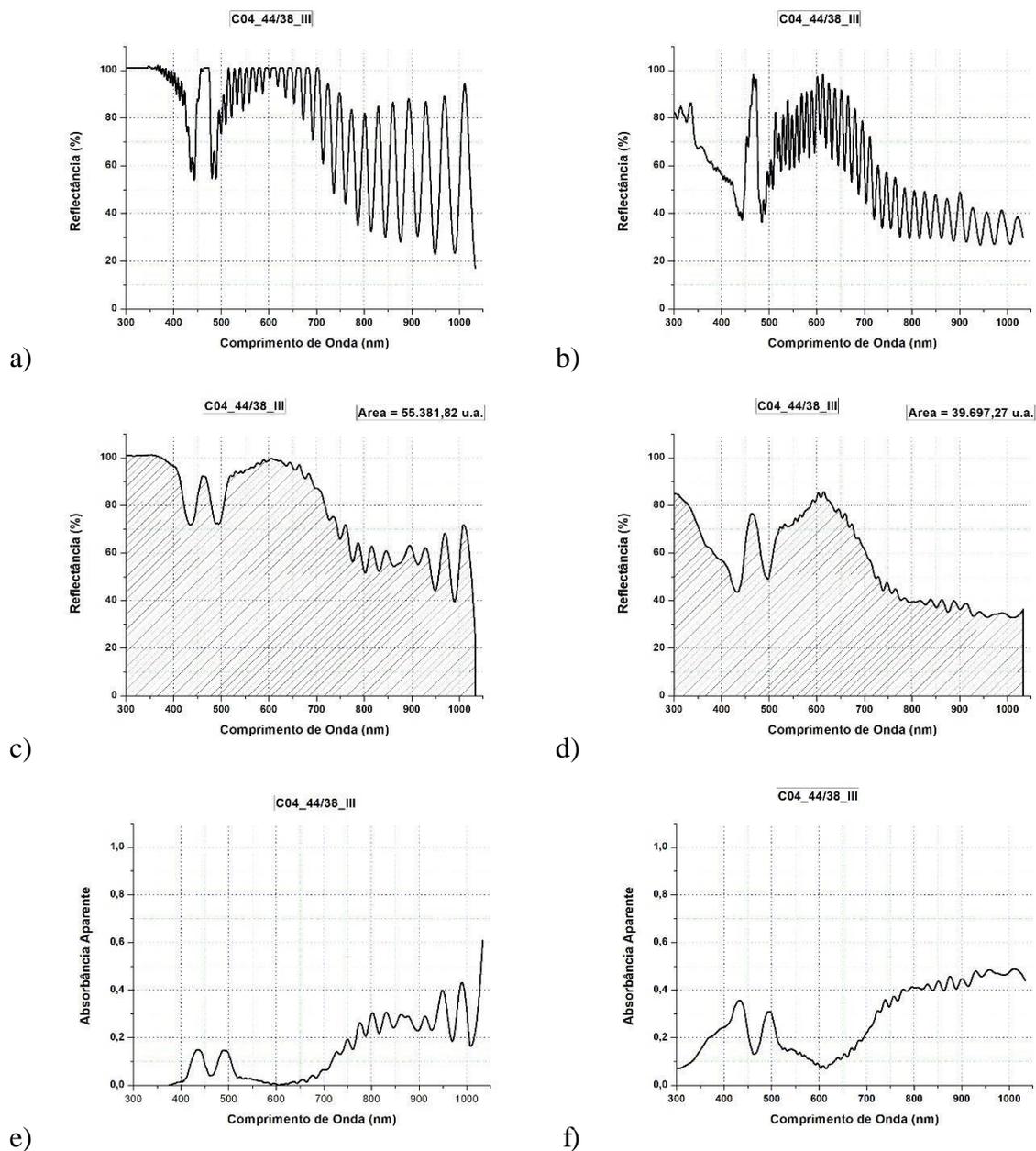


Figura 36 – Grupo COR, paciente C04 de 44 anos, com tempo de prurido de 38 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

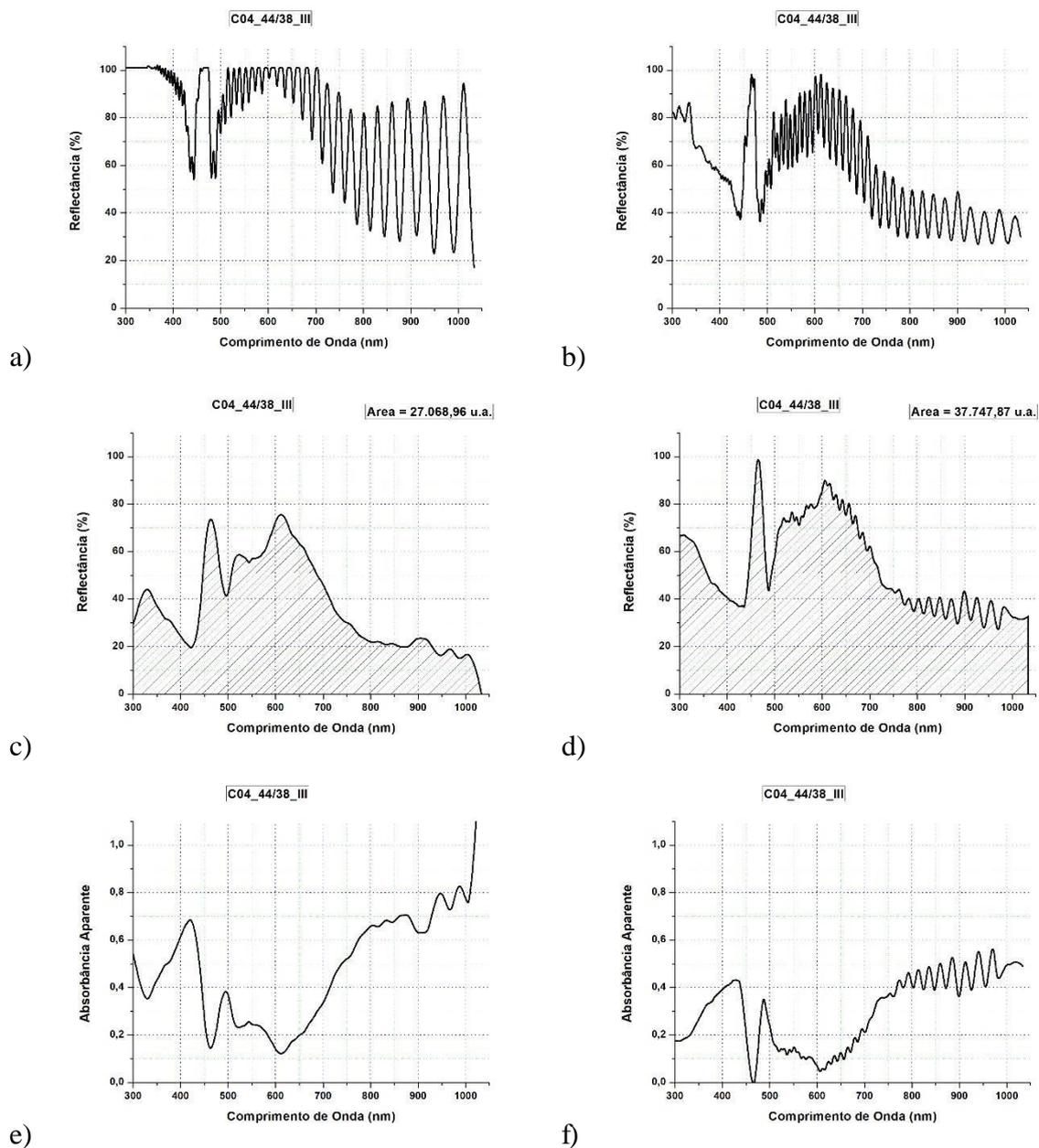


Figura 37 – Grupo COR, paciente C04 de 44 anos, com tempo de prurido de 38 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

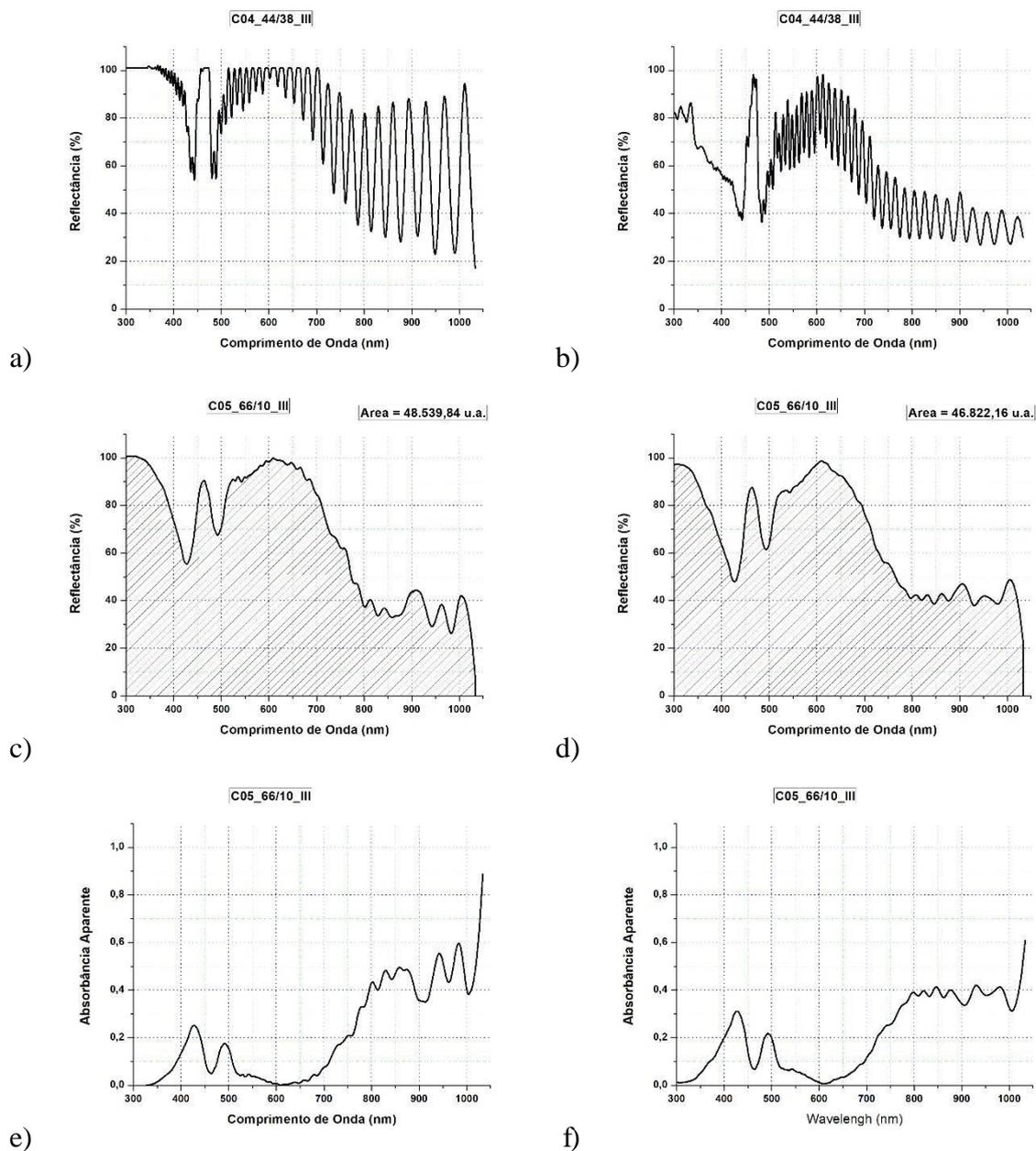


Figura 38 – Grupo COR, paciente C05 de 66 anos, com tempo de prurido de 10 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

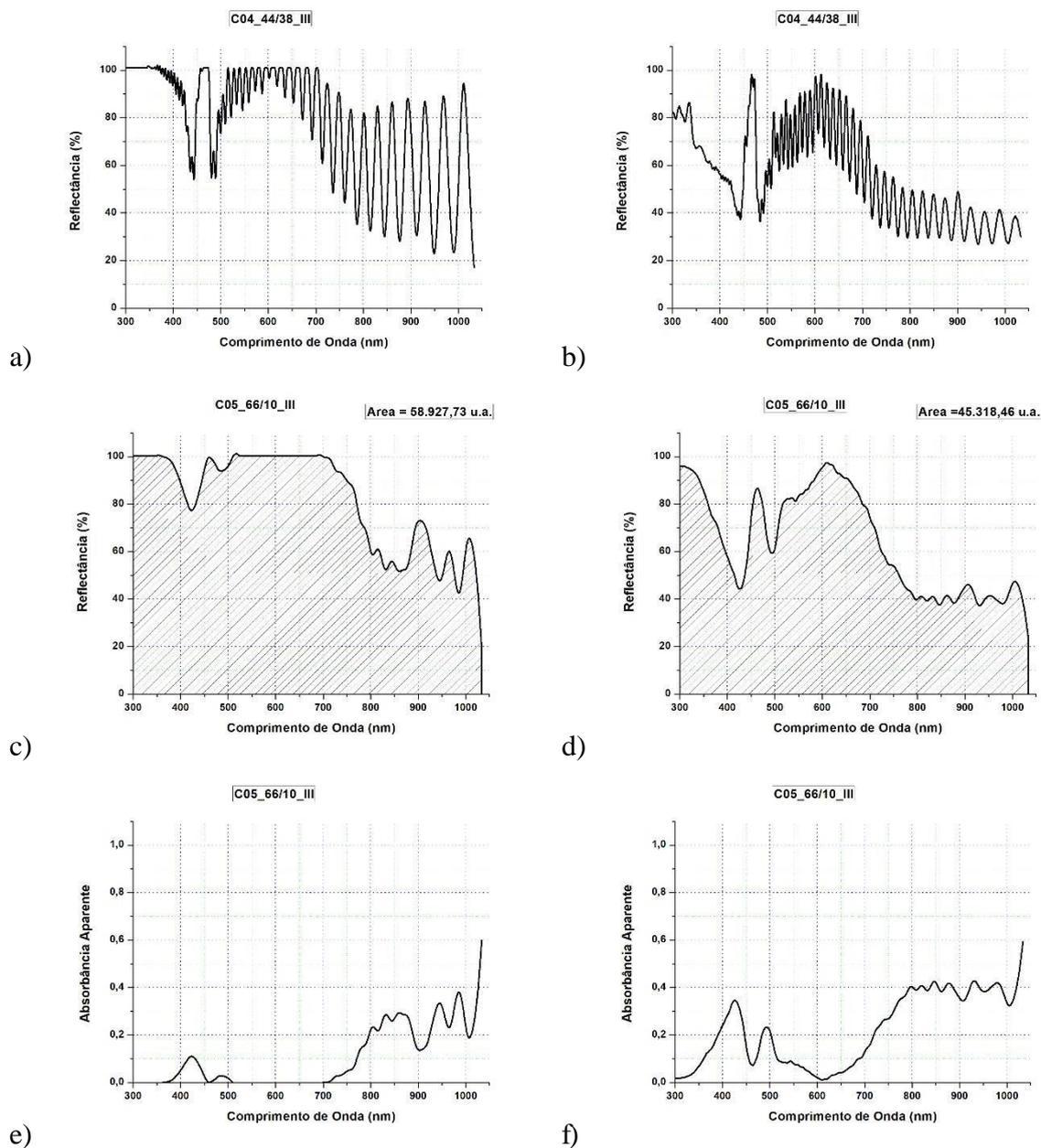


Figura 39 – Grupo COR, paciente C05 de 66 anos, com tempo de prurido de 10 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

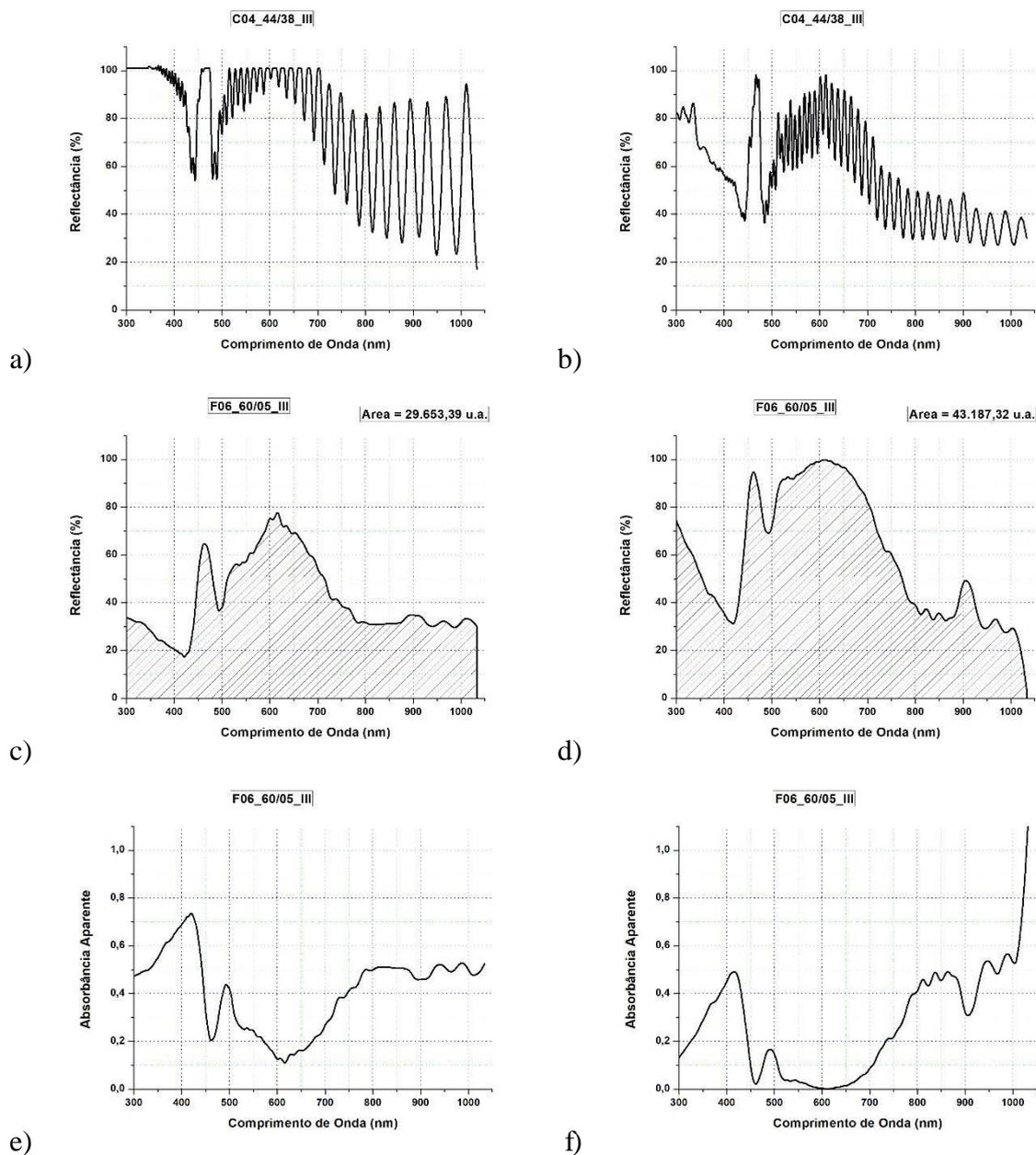


Figura 40 – Grupo FBM, paciente F06 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

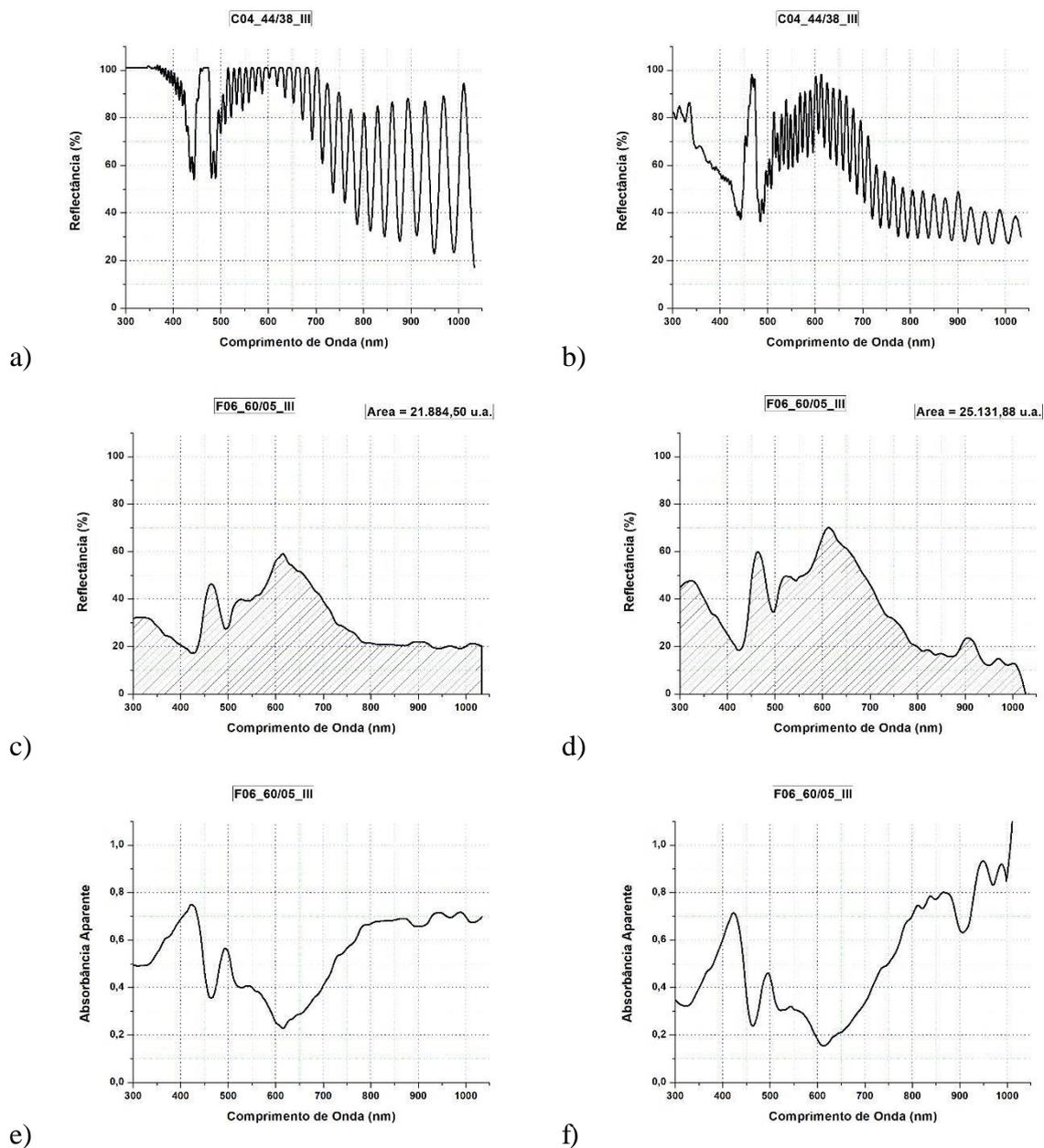


Figura 41 – Grupo FBM, paciente F06 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

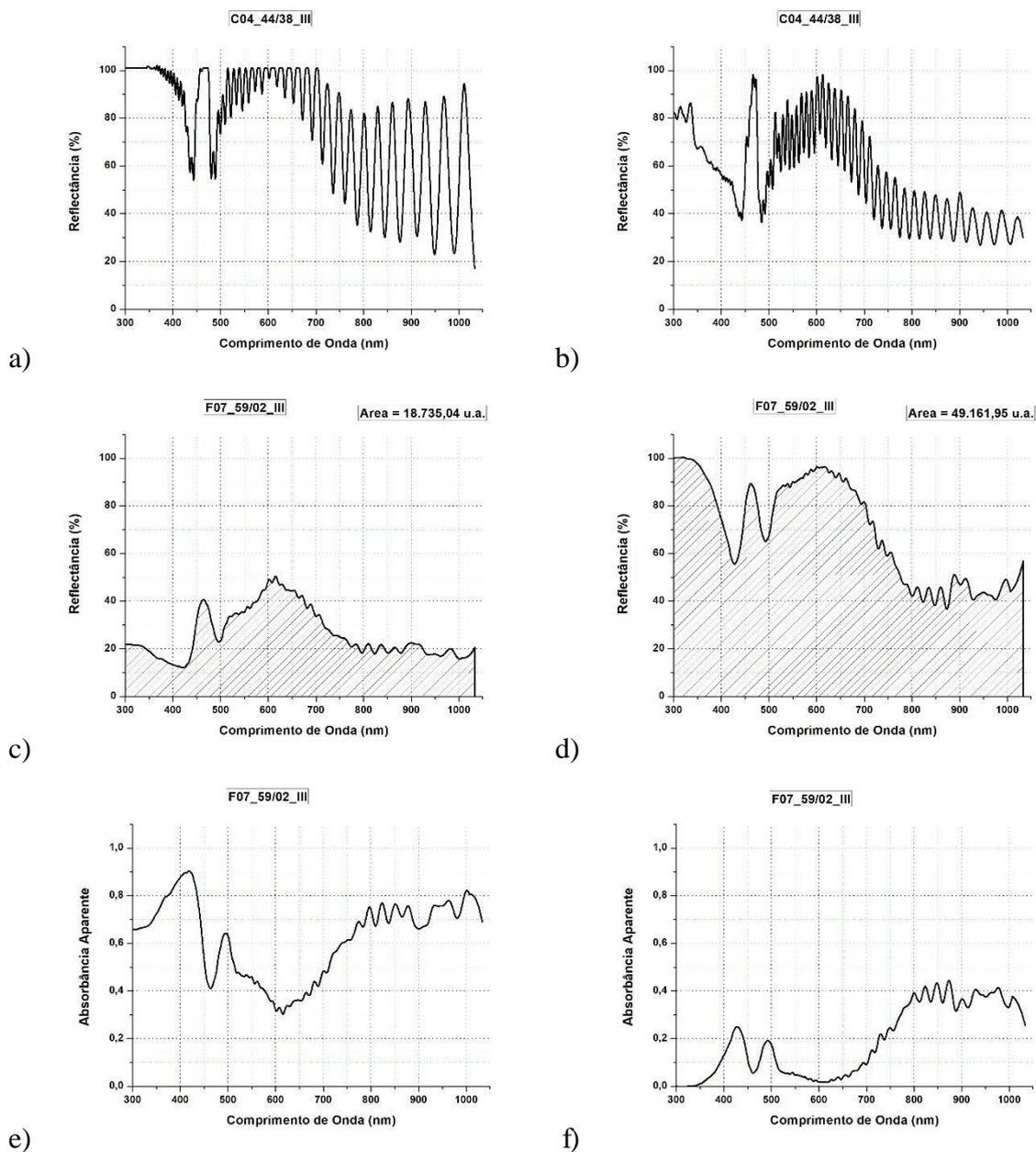


Figura 42 – Grupo FBM, paciente F07 de 59 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

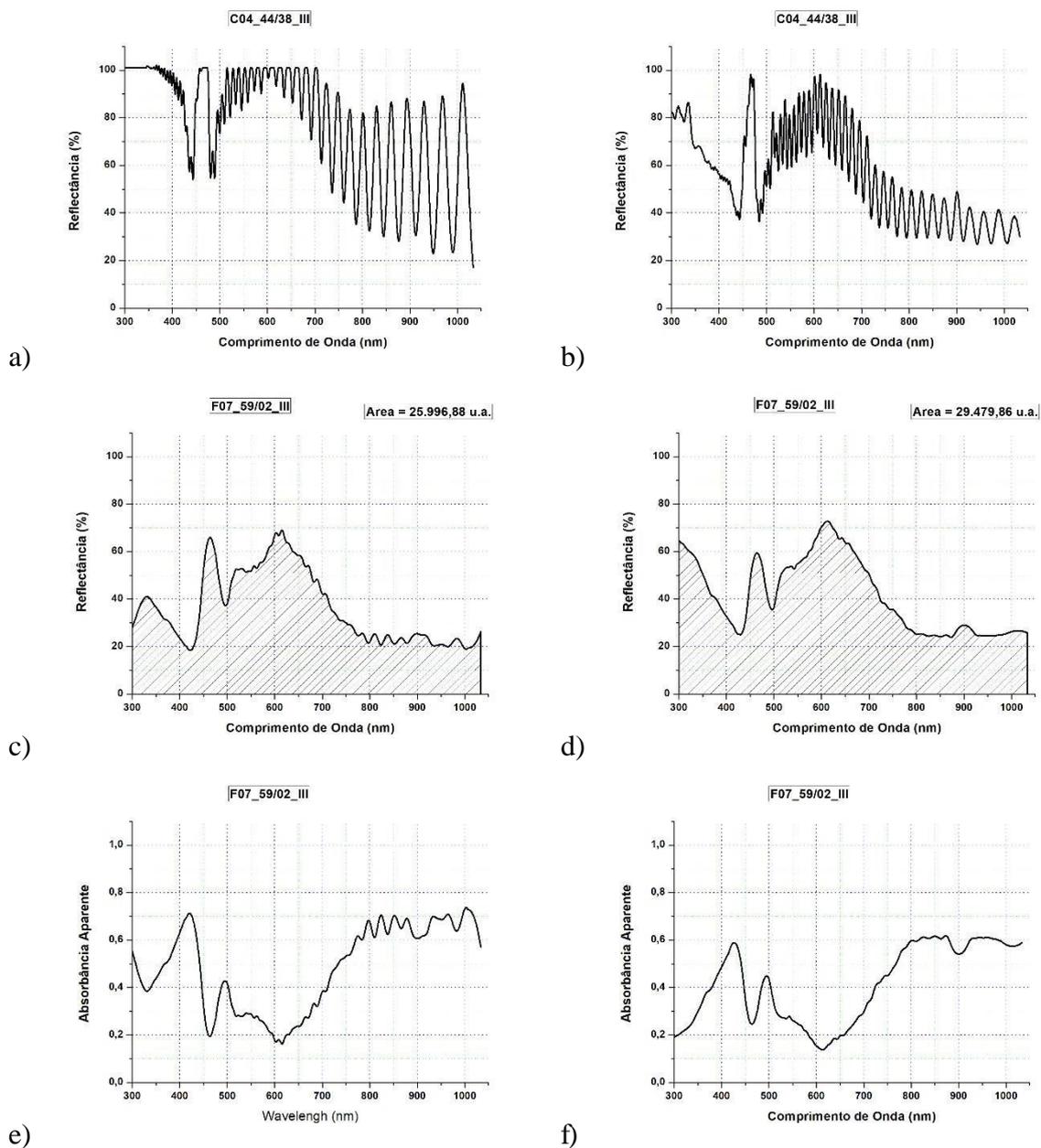


Figura 43 – Grupo FBM, paciente F07 de 59 anos, com tempo de prurido de 2 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

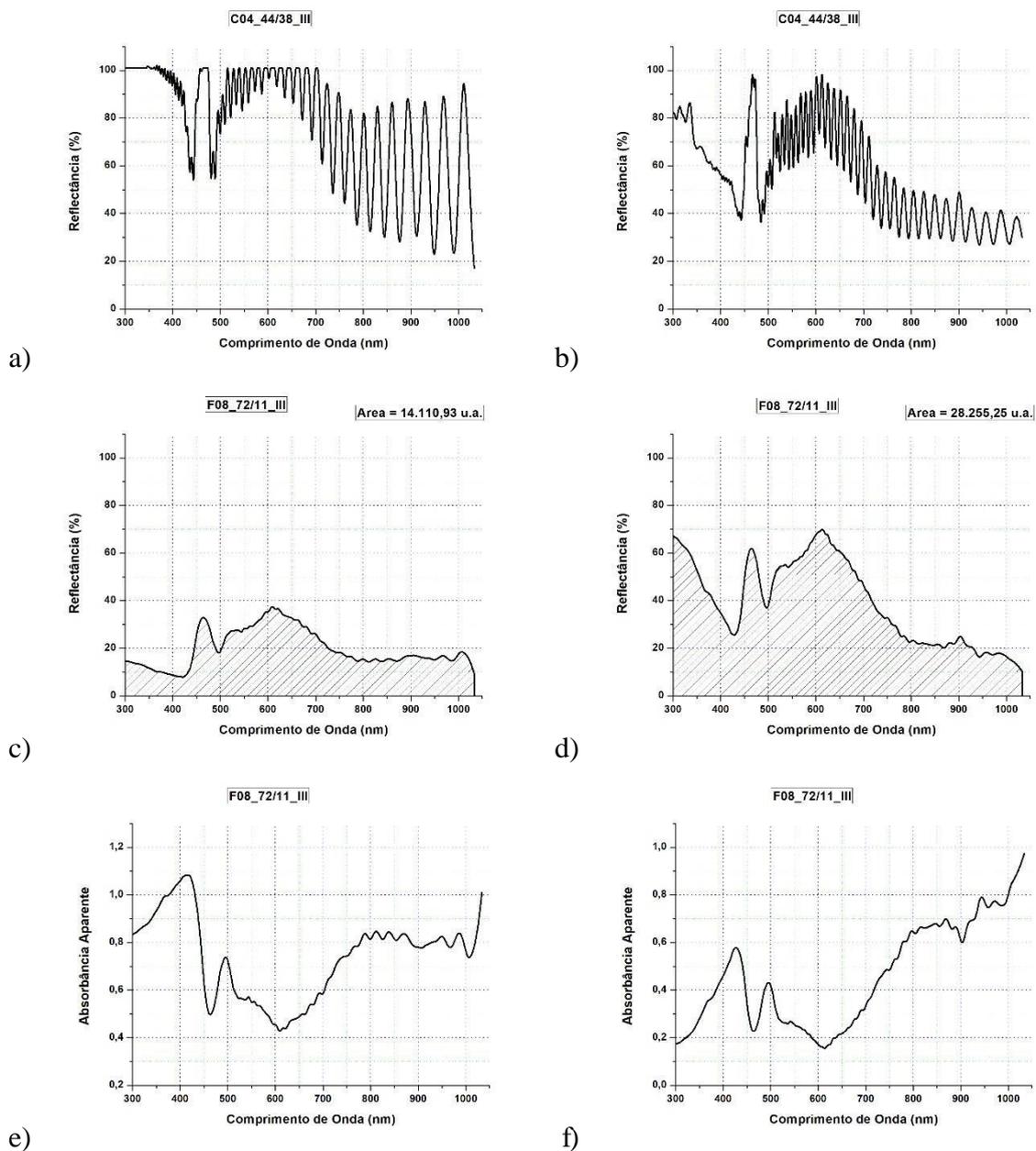


Figura 44 – Grupo FBM, paciente F08 de 72 anos, com tempo de prurido de 11 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

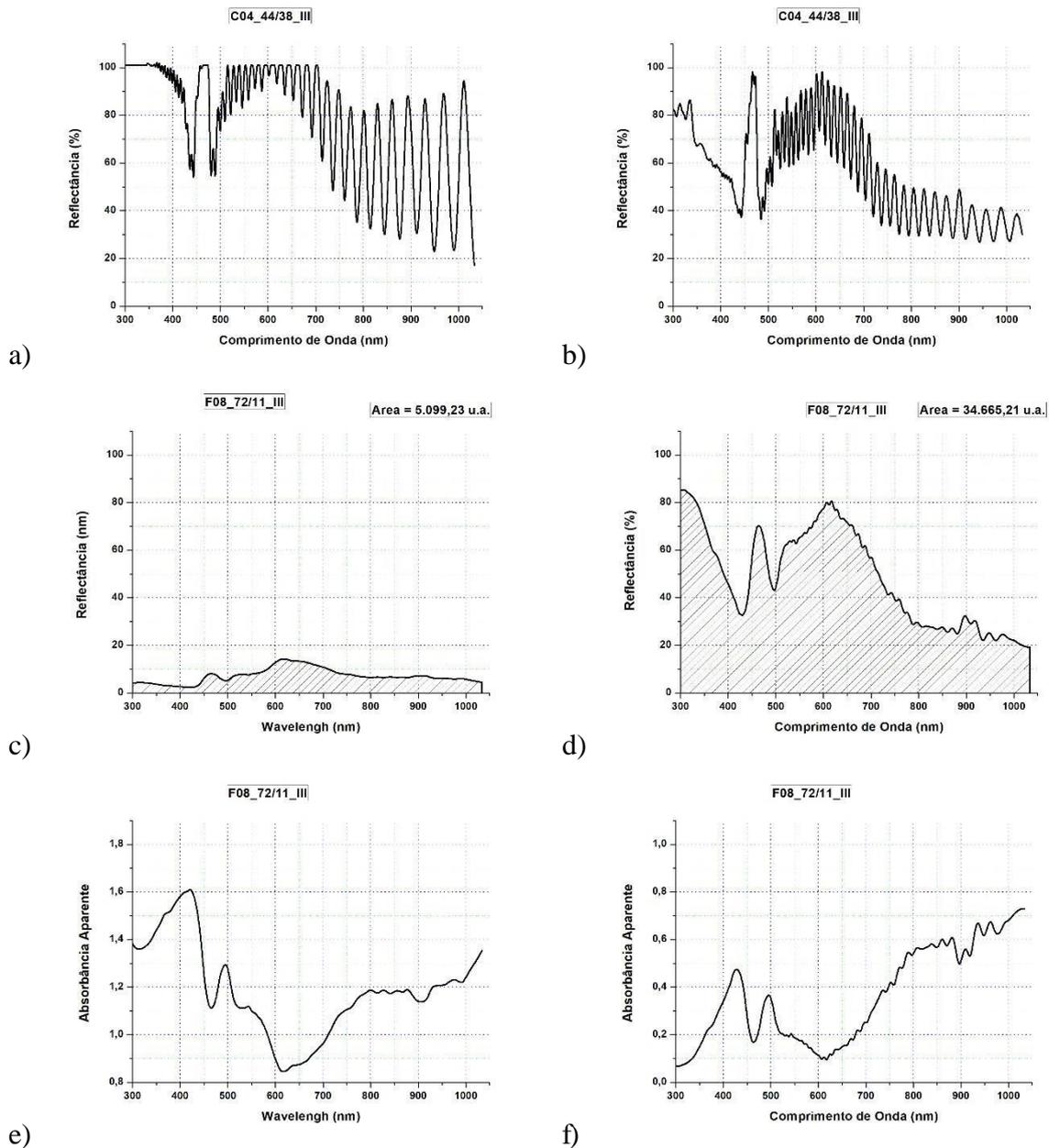


Figura 45 – Grupo FBM, paciente F08 de 72 anos, com tempo de prurido de 11 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

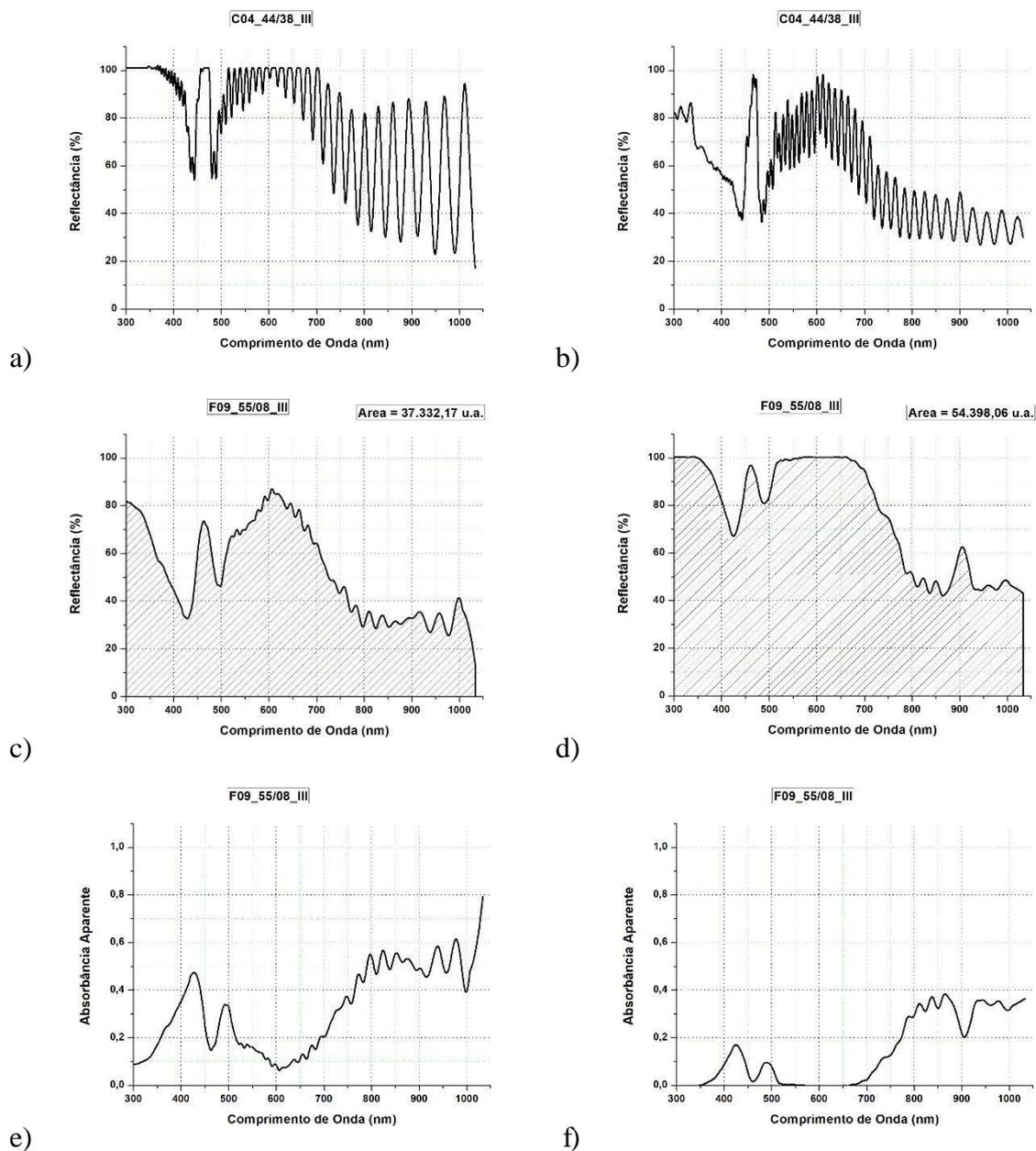


Figura 46 – Grupo FBM, paciente F09 de 55 anos, com tempo de prurido de 8 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

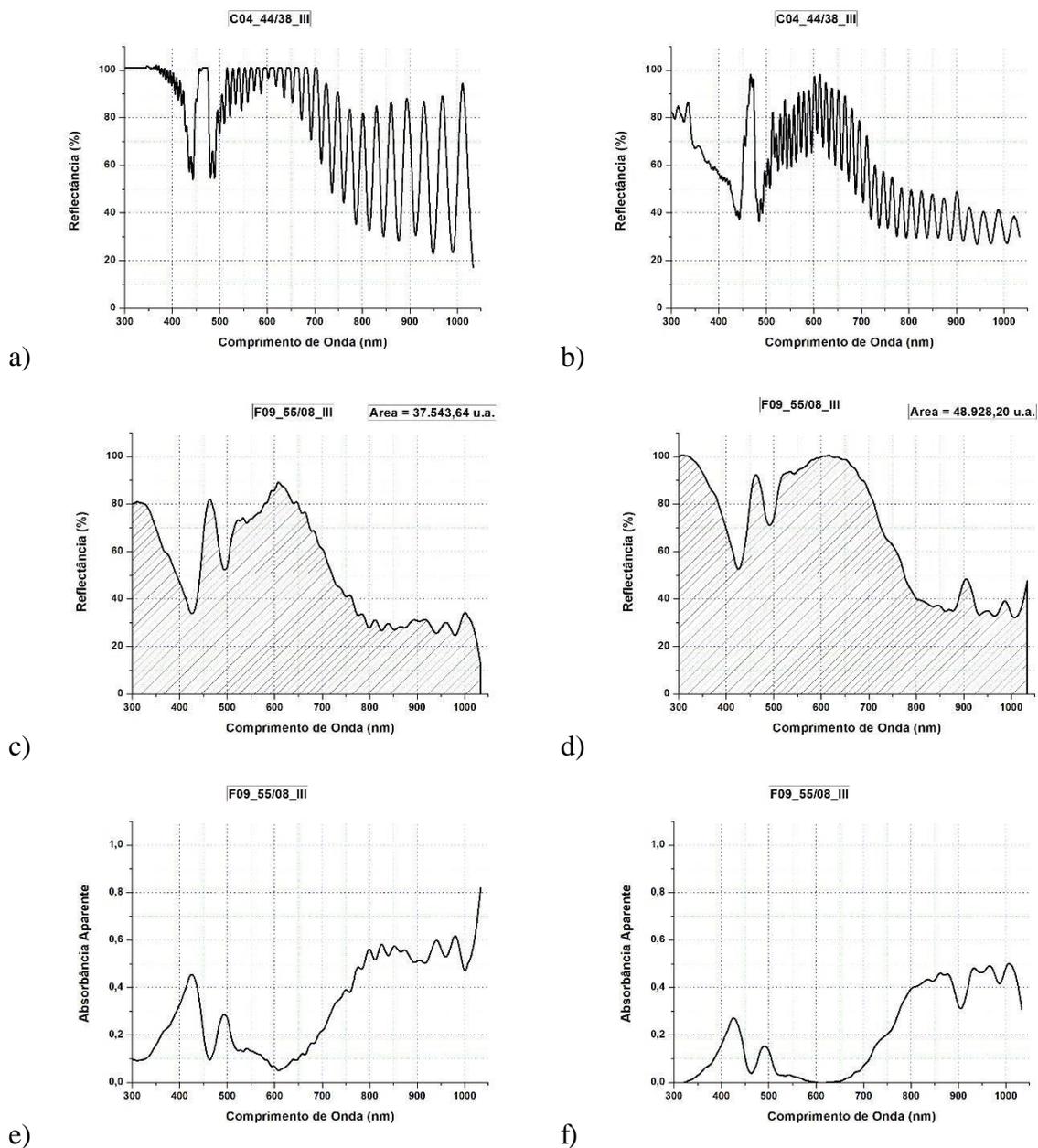


Figura 47 – Grupo FBM, paciente F09 de 55 anos, com tempo de prurido de 8 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

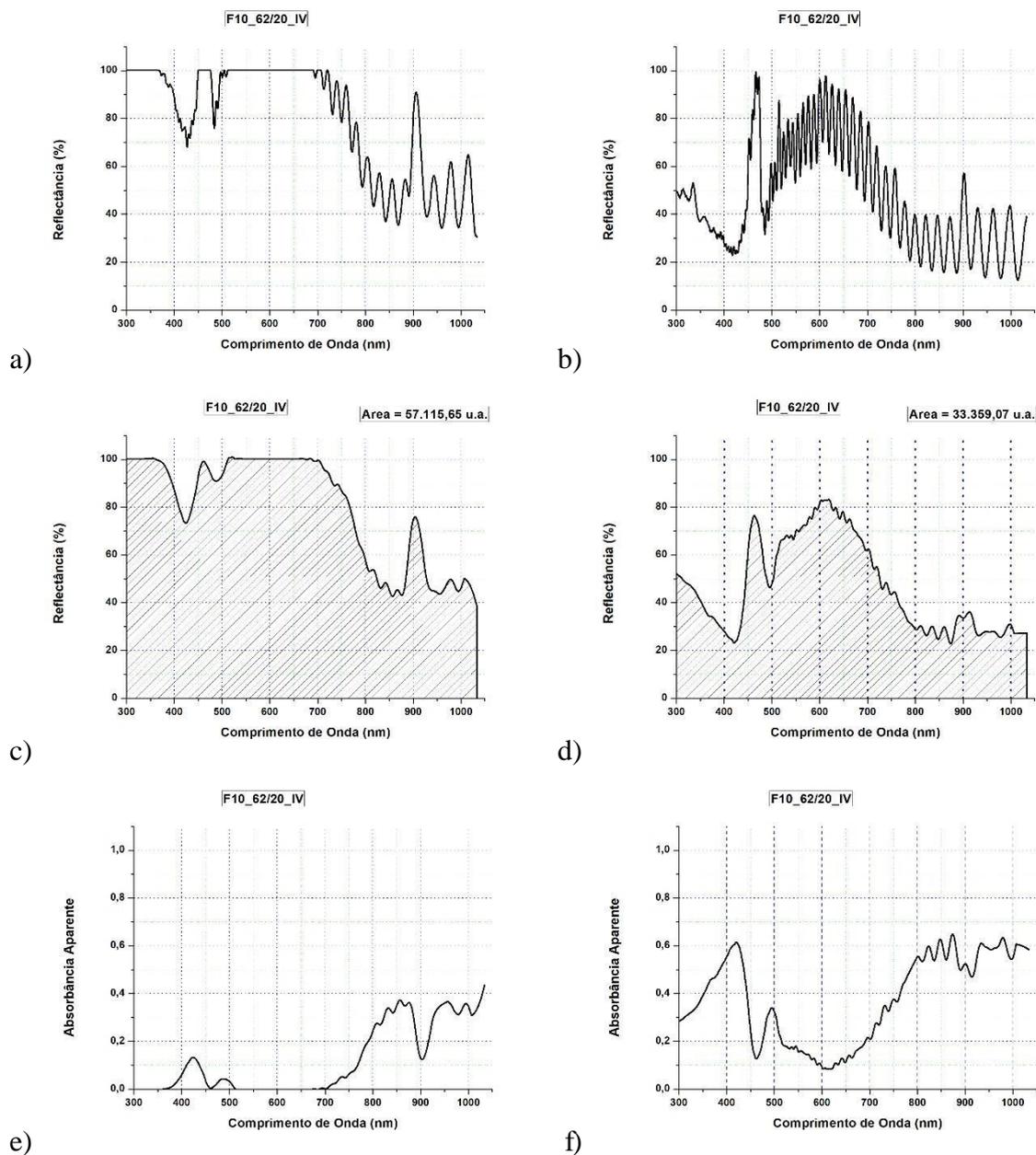


Figura 48 – Grupo FBM, paciente F10 de 62 anos, com tempo de prurido de 20 anos e FPS=IV, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

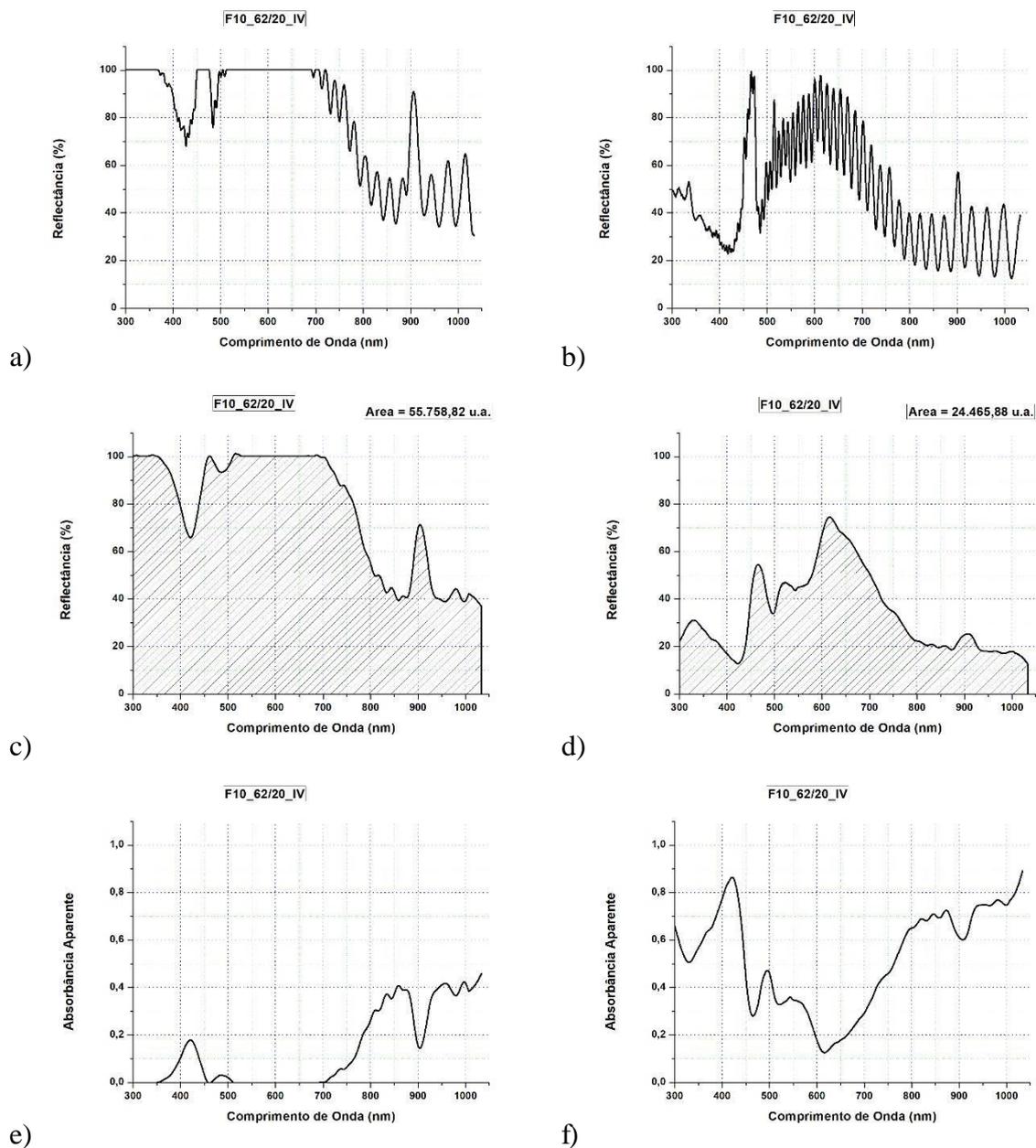


Figura 49 – Grupo FBM, paciente F10 de 62 anos, com tempo de prurido de 20 anos e FPS=IV, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

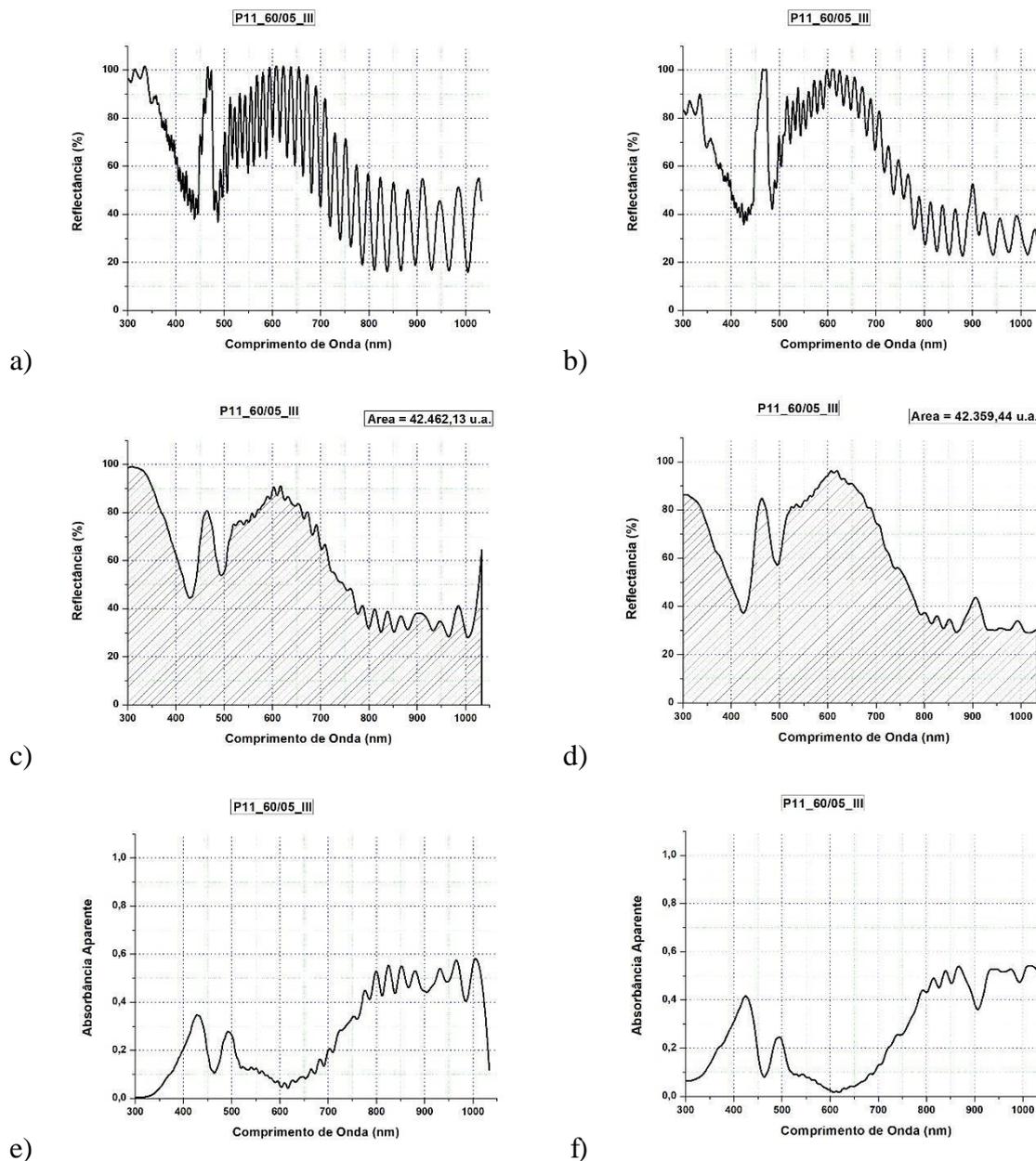


Figura 50 – Grupo PDT, paciente P11 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

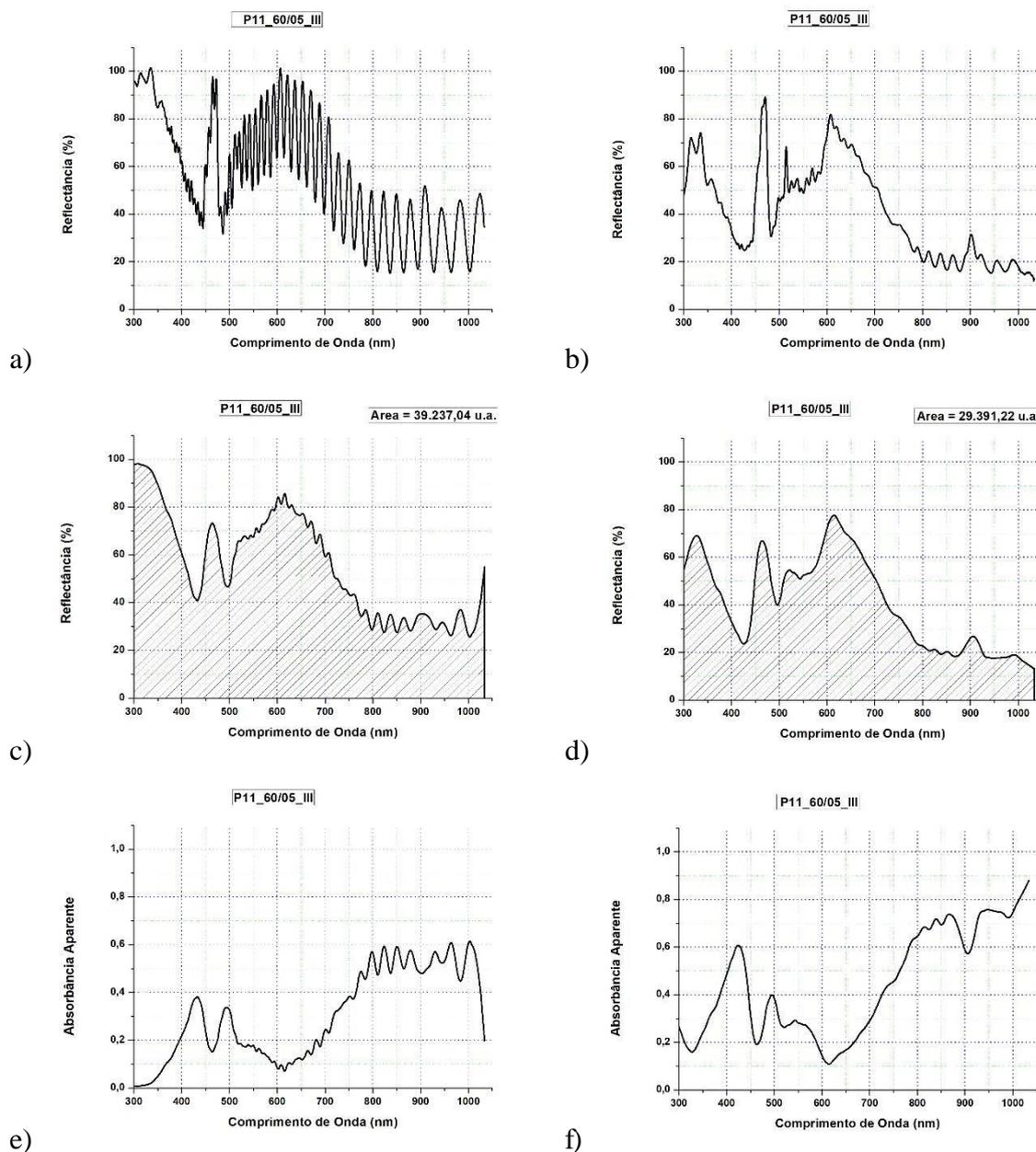


Figura 51 – Grupo PDT, paciente P11 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

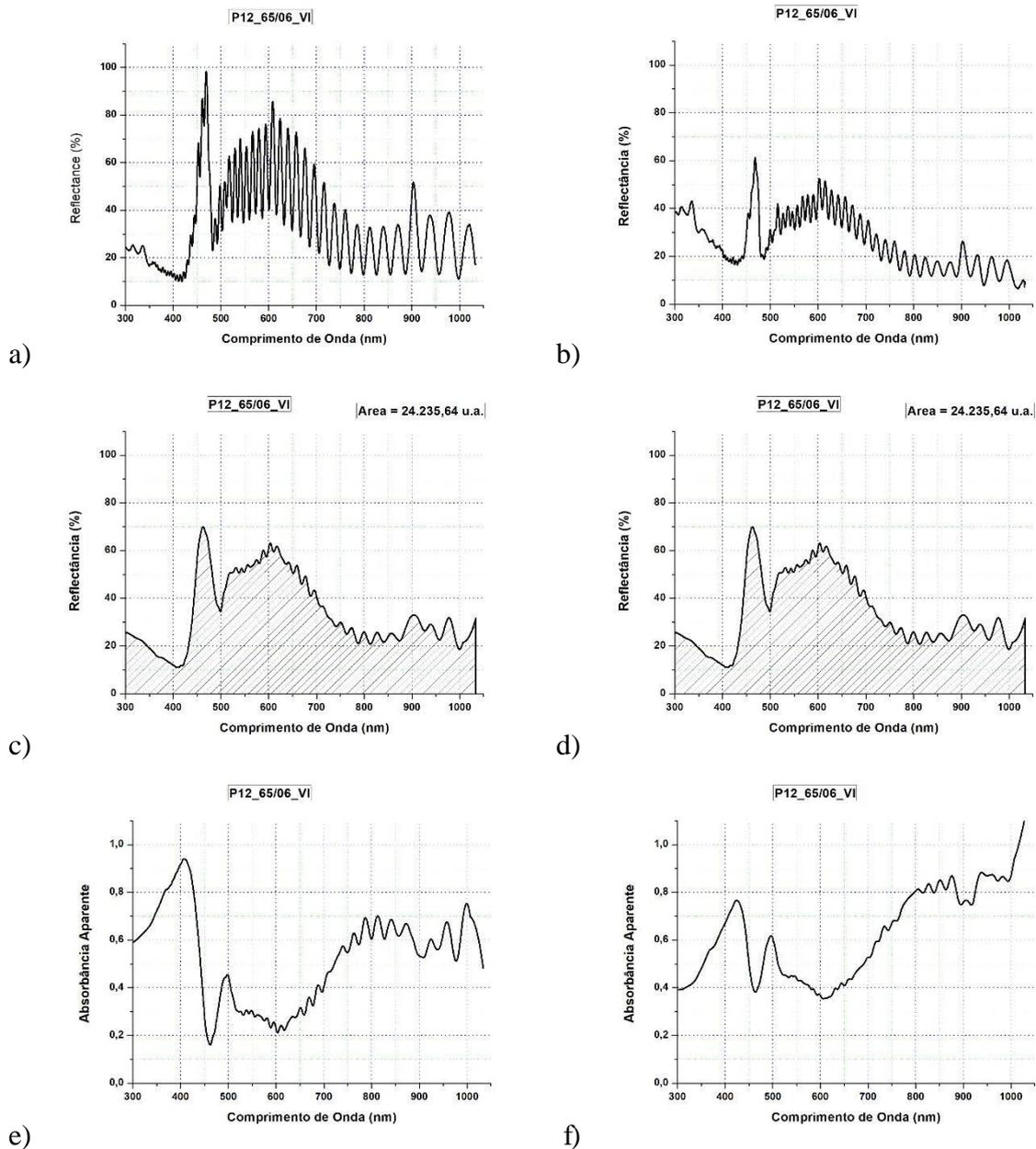


Figura 52 – Grupo PDT, paciente P12 de 65 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=VI, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

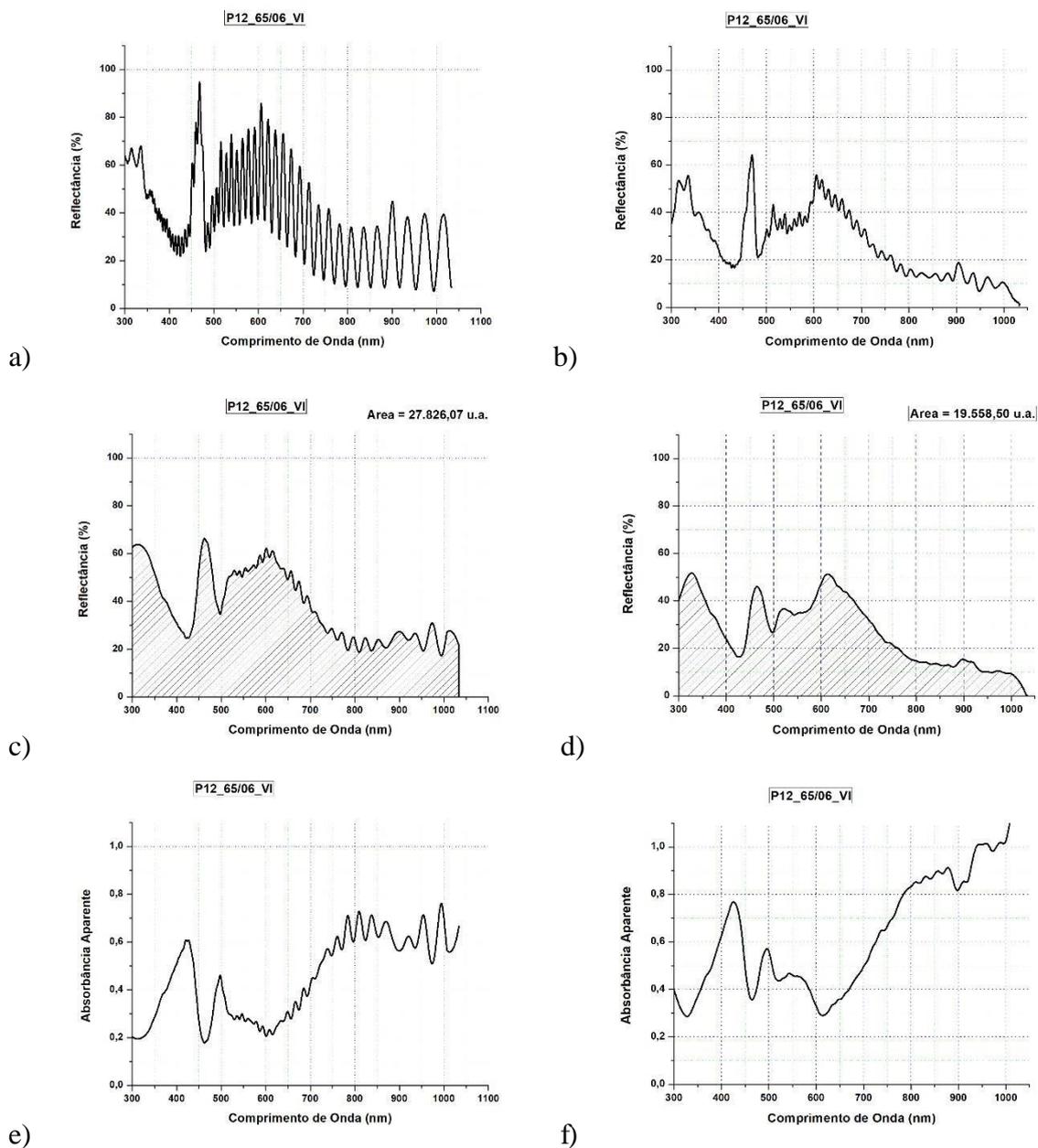


Figura 53 – Grupo PDT, paciente P12 de 65 anos, com tempo de prurido de 6 anos e FPS=VI, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

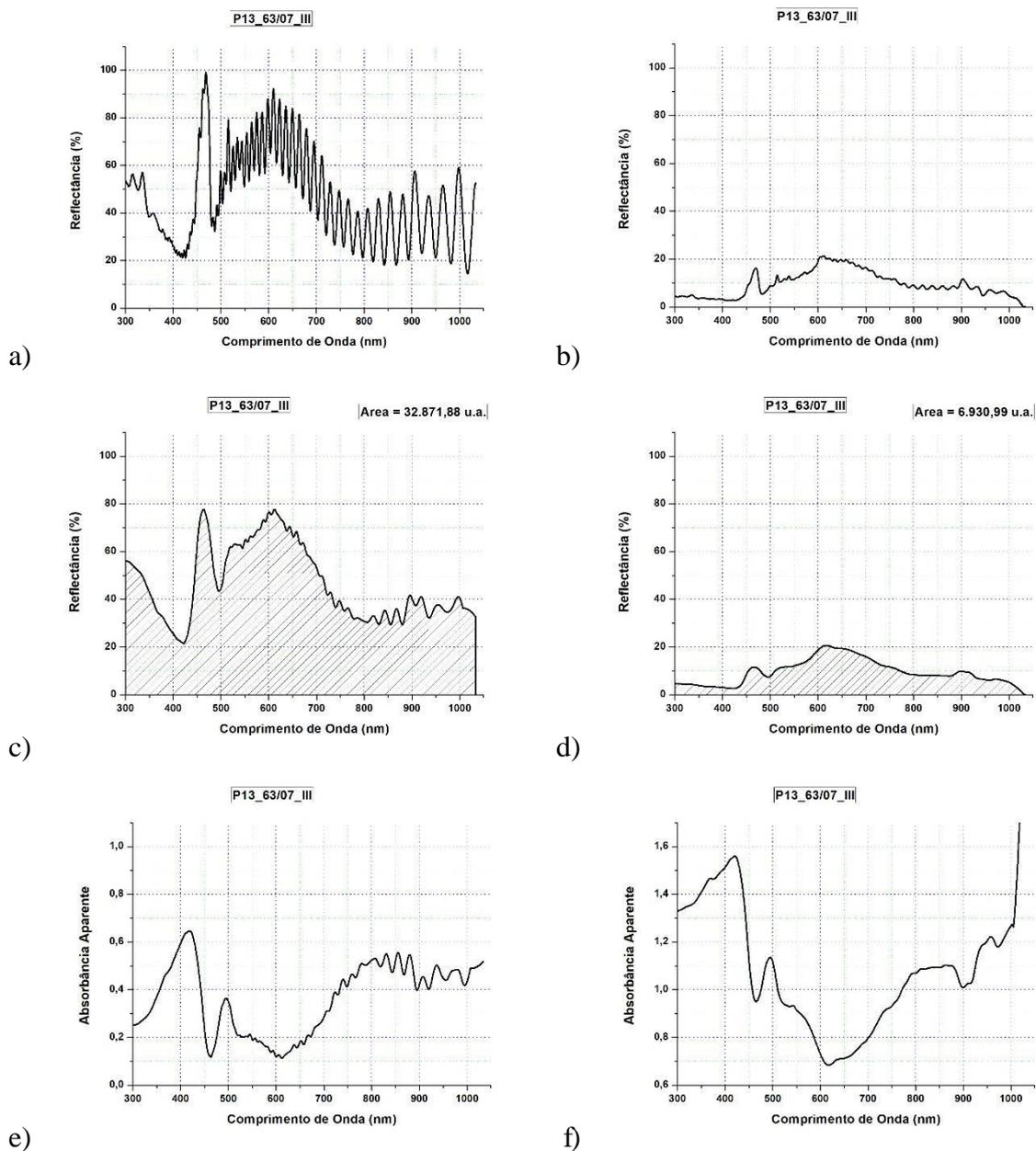


Figura 54 – Grupo PDT, paciente P13 de 63 anos, com tempo de prurido de 7 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

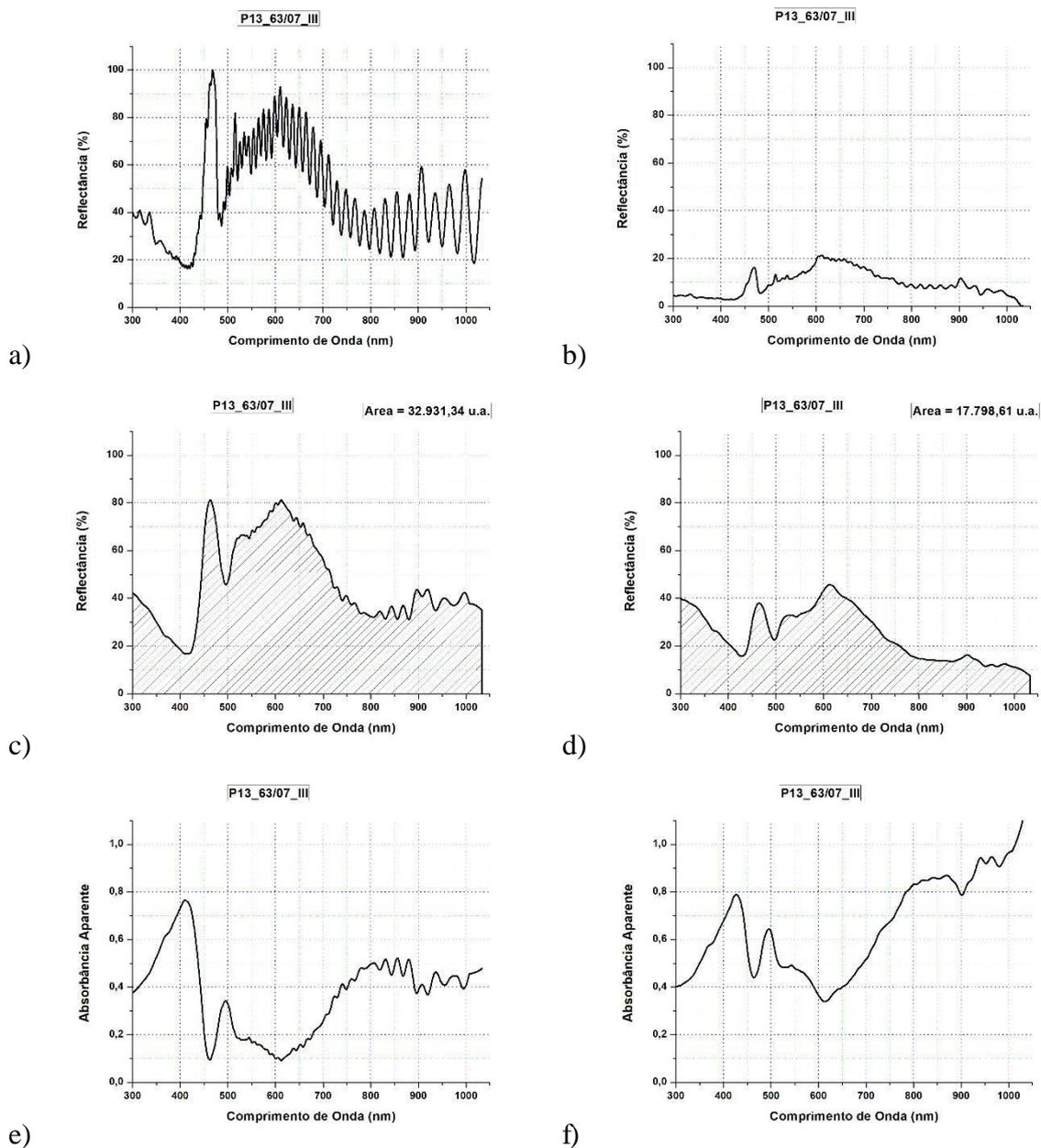


Figura 55 – Grupo PDT, paciente P13 de 63 anos, com tempo de prurido de 7 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

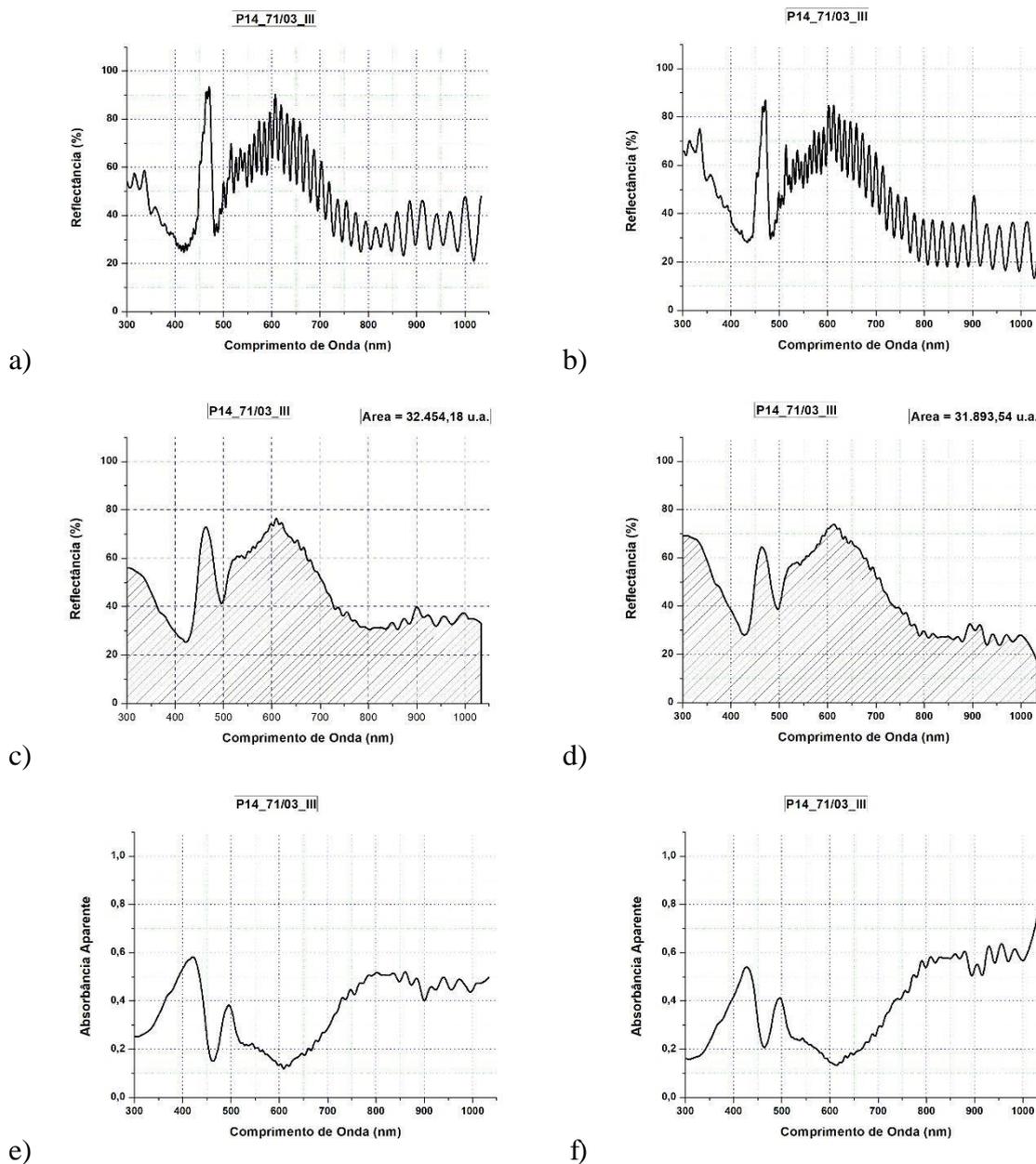


Figura 56 – Grupo PDT, paciente P14 de 71 anos, com tempo de prurido de 3 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

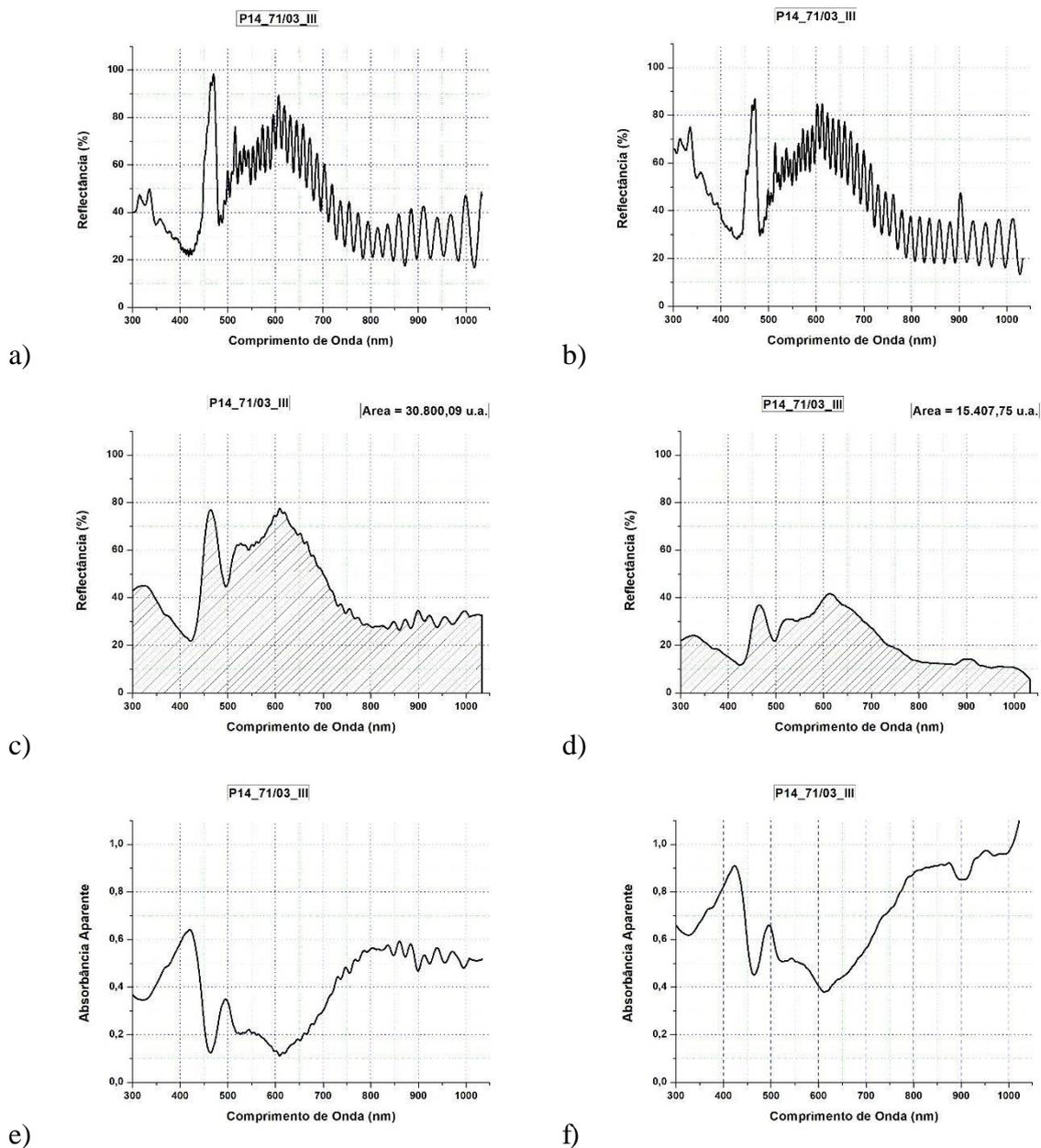


Figura 57 – Grupo PDT, paciente P14 de 71 anos, com tempo de prurido de 3 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

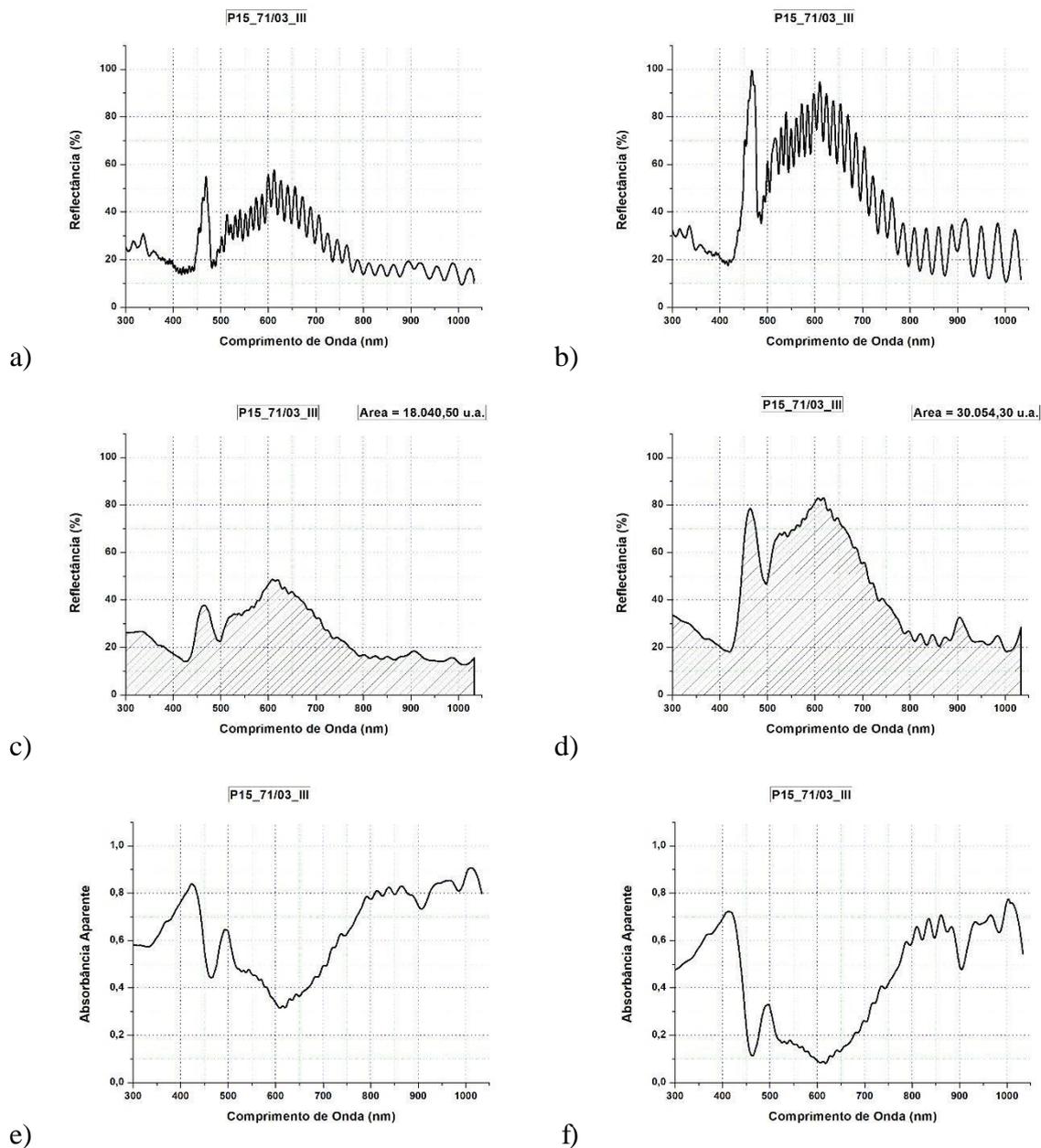


Figura 58 – Grupo PDT, paciente P15 de 60 anos, com tempo de prurido de 5 anos e FPS=III, região sem LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

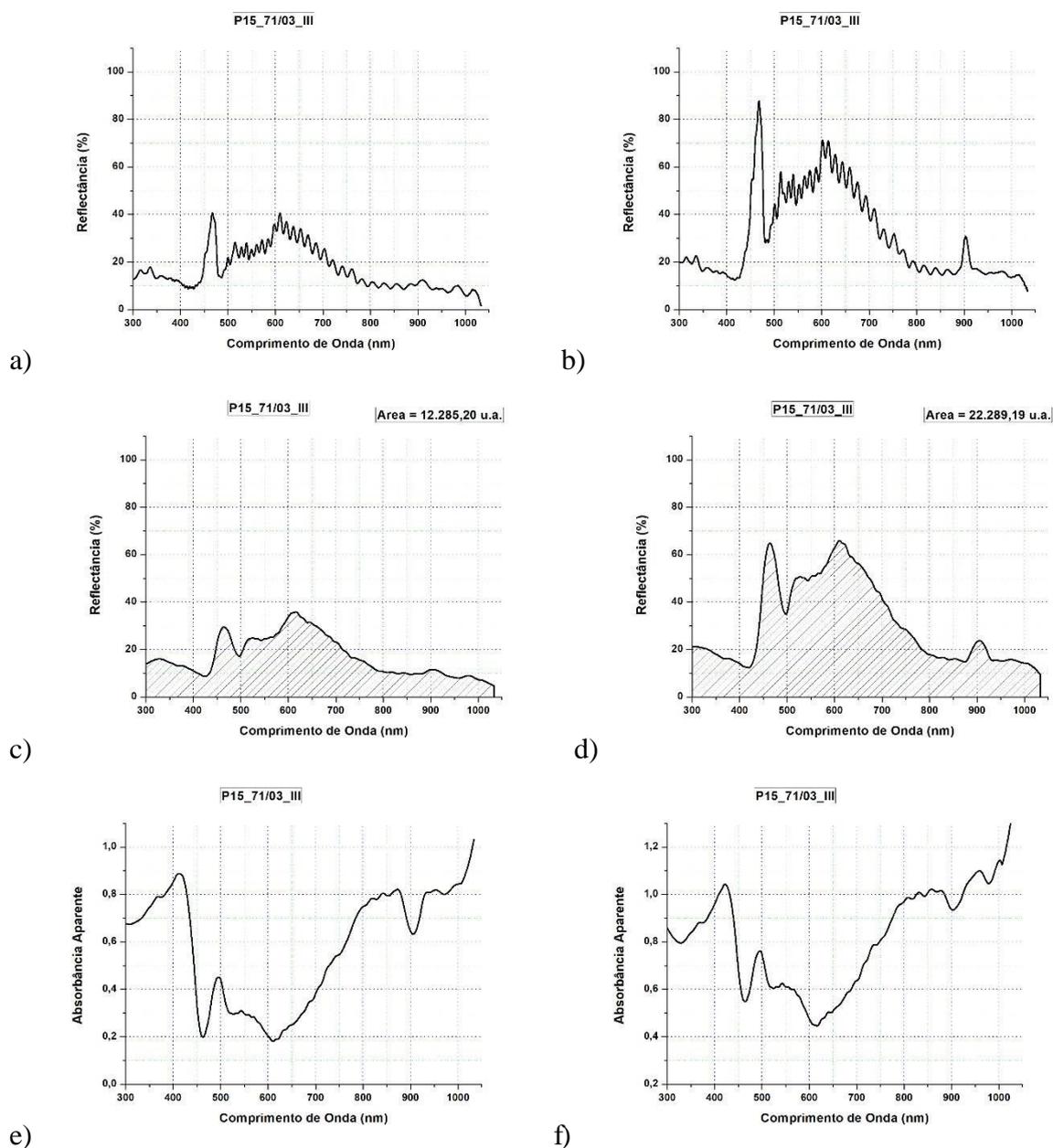


Figura 59 – Grupo PDT paciente P15 de 71 anos, com tempo de prurido de 3 anos e FPS=III, região com LEV, no início do tratamento, à esquerda, e um mês após, à direita. Espectros: (a) Reflectância difusa no início; (b) Reflectância após um mês; (c) Reflectância suavizada no início; (d) Reflectância suavizada após um mês; (e) Absorbância aparente no início; (f) Absorbância após um mês de tratamento.

APÊNDICE 2 – TESTES DE NORMALIDADE E DE HOMOGENEIDADE

Resultados dos testes das significâncias de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) para as idades das pacientes e o tempo de prurido e de homogeneidade de variâncias de Levene.

Tabela 12 - Valores da significância, p, para o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para os fatores idade e tempo de prurido das pacientes deste estudo, divididos por grupo de tratamento.

Fator	COR	FBM	PDT	Total
Idade	0,3415	0,8996	0,3557	0,9772
Tempo de Prurido	0,4379	1,0000	0,9591	0,1857

A Tabela 13 apresenta os resultados do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para os valores de todas as áreas sob as curvas dos espectros de reflectância difusa para as regiões sem e com líquen escleroso vulvar (LEV) antes e após um mês de tratamento.

Tabela 13 - Valores de significância, p, para o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ao analisar as áreas sob as curvas dos espectros de reflectância difusa após suavização com a técnica de SGS.

Fator	COR	FBM	PDT	Total
Área de região sem LEV	Início	1,0000	1,0000	1,0000
	Final	0,9384	0,9669	1,0000
Área de região com LEV	Início	0,9449	1,0000	0,9705
	Final	1,0000	1,0000	1,0000

Os valores das significâncias para o teste de homogeneidade de variâncias de Levene em relação às áreas sob as curvas dos espectros de reflectância são indicados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de significância de homogeneidade de variâncias, p, para o teste de Levene.

	COR	FBM	PDT
p	0,1933	0,6502	0,3326

Como $p > 0,05$ em todos os testes logo todos os dados são normais e serão indicados por média e desvio padrão (DP), e homogêneos.