

**UNIVERSIDADE BRASIL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**JULIA MARINZECK DE ALCANTARA ABDALA**

**APLICAÇÃO *IN VIVO* NÃO INVASIVA DA ESPECTROSCOPIA RAMAN  
CONFOCAL NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS  
RELACIONADAS À IDADE NO ESTRATO CÓRNEO E NA EPIDERME  
HUMANA**

São Paulo – SP

2024

## PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**JULIA MARINZECK DE ALCANTARA ABDALA**

### **APLICAÇÃO *IN VIVO* NÃO INVASIVA DA ESPECTROSCOPIA RAMAN CONFOCAL NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS RELACIONADAS À IDADE NO ESTRATO CÓRNEO E NA EPIDERME HUMANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

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

Prof(a). Dr(a). Priscila Pereira Fávero  
**Coorientadora**

São Paulo – SP  
2024

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

A116a ABDALA, Julia Marinzeck de Alcantara.

Aplicação *in vivo* não invasiva da espectroscopia Raman confocal na identificação de alterações relacionadas à idade no estrato córneo e epiderme humana / Julia Marinzeck de Alcantara Abdala. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2024.

131 f. il. color.

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

Orientação: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin.

Coorientação: Profa. Dra. Priscila Pereira Fávero.

1. Epiderme. 2. Estrato Córneo. 3. Espectroscopia Raman. 4. Análise Hierárquica de Cluster. 5. Análise de Componentes Principais. I. Martin, Airton Abrahão. II. Fávero, Priscila Pereira. III. Título.

CDD 620.82



## TERMO DE APROVAÇÃO

**JULIA MARINZECK DE ALCANTARA ABDALA**

**“APLICAÇÃO IN VIVO NÃO INVASIVA DA ESPECTROSCOPIA RAMAN  
CONFOCAL NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES RELACIONADAS À  
IDADE NO ESTRATO CÓRNEO E EPIDERMES HUMANA”**

”

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

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** AIRTON ABRAHAO MARTIN  
Data: 28/03/2024 09:26:03-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr.(a) Airton Abrahão Martin (Presidente-Orientador)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LAURITA DOS SANTOS  
Data: 28/03/2024 11:02:07-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.(a) Laurita dos Santos (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ANDERSON DE OLIVEIRA LOBO  
Data: 28/03/2024 11:09:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr.(a) Anderson de Oliveira Lobo (Membro Interno)

Prof(a). Dr.(a) Lázaro Pinto de Medeiros Neto (Membro Externo)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** GUSTAVO OLIVEIRA DE MEIRA GUSMAO  
Data: 28/03/2024 10:53:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr.(a) Gustavo Gusmão (Membro Externo)

São Paulo, 28 de março de 2024

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

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

---

---

---

[Digite aqui]

FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA  
UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA CAPES  
E REPRODUÇÃO DO TRABALHO

*DEDICATÓRIA:*

*À MINHA FAMÍLIA.*

*Aos meus pais, in memoriam, Ivo Bechara Abdala*

*e Susie Marinzeck de Alcantara Abdala.*

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

*À Deus, pela força maior que sempre me guia.*

*Ao meu orientador Dr. Airton Abrahão Martin pela oportunidade de cursar o doutorado, de trabalhar no seu laboratório e pelos ensinamentos.*

*À minha co-orientadora Dra. Priscila Pereira Fávero pela orientação na realização deste trabalho.*

*Ao colega Dr. Lázaro Pinto de Medeiros Neto, por todo auxílio e ensinamento sobre as análises e na pesquisa.*

*Aos membros da banca examinadora, Laurita dos Santos, Anderson de Oliveira Lobo, Lázaro Pinto de Medeiros Neto e Gustavo Gusmão, obrigada pela participação e pelas sugestões e considerações.*

*Ao colega Gustavo Carlos da Silva pelo convívio no laboratório da Dermo Probes, e por todo auxílio no uso dos softwares.*

*Às colegas Rítiane Modesto de Almeida e Fernanda Ricci Lemos pelas análises estatísticas realizadas.*

*Aos professores do programa de doutorado em Engenharia Biomédica e aos funcionários da Universidade Brasil por todo ensino e auxílio.*

*À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos.*

*Agradeço a todos que me ajudaram nesta conquista. Muito Obrigada!*

## RESUMO

A pele humana é composta por camadas, o estrato córneo e a epiderme, estas contêm biomoléculas, estrutura e funções próprias. A técnica de espectroscopia Raman, permite a pesquisa da composição bioquímica de amostras biológicas *in vivo*, como a pele, de suas biomoléculas e biomarcadores, de forma seletiva e não destrutiva, possibilitando examinar as camadas dos tecidos *in vivo*, e explicar os vínculos biofísicos entre as características vibracionais e as alterações das composições químicas específicas. O objetivo deste trabalho foi usar a espectroscopia Raman confocal para avaliar as alterações bioquímicas e espectrais relacionadas com a idade no estrato córneo e na epiderme humana, centrando-se especificamente nas modificações espectrais do fator natural de hidratação NMF, da queratina, dos lipídios e das proteínas.

Os dados relativos à pele, foram adquiridos utilizando um sistema Raman confocal com um laser de díodo de 785 nm, que consistiram em dois grupos etários definidos, grupo I, 27±3 anos, e grupo II, 55±4 anos, compreendendo 71 voluntários. Análises estatísticas multivariadas foram usadas para interpretar e classificar os dados espectrais médios de cada camada da pele. As análises demonstraram a medição de dois grupos diferentes de pele e revelaram os picos mais representativos para o estrato córneo e epiderme. A amida III e amida I ambas em conformação  $\alpha$  – hélice exibiram sinais aumentados nos espectros da epiderme e do estrato córneo do grupo I, e observou-se que o aumento da reticulação dos filamentos de queratina com a idade é um possível contribuinte para o aumento da rigidez, o que conseqüentemente levou a uma diminuição do sinal Raman no grupo II. O oposto ocorreu com sinal dos lipídeos, pois as alterações no empacotamento lateral dos lipídeos indicaram o envelhecimento da pele com aumento do sinal Raman no grupo II. A diferença entre as médias do NMF foi estatisticamente significativa entre as duas faixas etárias. Assim, a presente pesquisa coopera com a atual literatura contribuindo sobre a diferenciação das características da pele por faixa etária, e por camadas, utilizando a espectroscopia Raman confocal.

**Palavras-chave:** Epiderme. Estrato Córneo. Espectroscopia Raman. Análise Hierárquica de Cluster. Análise de Componentes Principais.

## ABSTRACT

Human skin comprises layers known as the stratum corneum and the epidermis, each possessing biomolecules, structure and functions. The Raman spectroscopy technique enables research on the biochemical composition of biological samples in vivo, such as skin, its biomolecules and biomarkers, in a selective and non-destructive way, allowing for in vivo examination of tissue layers. This elucidates the biophysical links between vibrational characteristics and changes in specific chemical compositions. This study aims to use confocal Raman spectroscopy to evaluate age-related biochemical and spectral changes in the stratum corneum and human epidermis, focusing specifically on spectral modifications in the natural moisturizing factor (NMF), keratin, lipids and proteins.

Skin-related data were acquired using a confocal Raman system with a 785 nm diode laser, which consisted of two defined age groups, group I,  $27\pm 3$  years, and group II,  $55\pm 4$  years, comprising 71 volunteers. Multivariate statistical analyses were used to interpret and classify the average spectral data from each skin layer. Analyses measured two different skin groups and revealed the most representative peaks for the stratum corneum and epidermis. Amide III and amide I, both in the  $\alpha$ -helical conformation, showed increased signals in the spectra of the epidermis and stratum corneum of group I. It was observed that increased keratin filament cross-linking with age is a possible contributor to the increase in stiffness, which consequently led to a decrease in the Raman signal in group II. The opposite occurred with the lipid signal, as changes in the lateral packaging of lipids indicated skin aging with an increase in the Raman signal in group II. The difference between the NMF means was statistically significant between the two age groups. Thus, the present research fills an important current research gap in differentiating skin characteristics across different age groups and their layers using confocal Raman spectroscopy.

Keywords: Epidermis. Stratum Corneum. Raman spectroscopy. Hierarchical Cluster Analysis. Principal component analysis

**Keywords:** Epidermis. Stratum Corneum . Raman spectroscopy. Hierarchical Cluster Analysis. Principal component analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organização dos lipídios no espaço intercelular do estrato córneo .....	26
Figura 2- Estrutura geral da pele.....	28
Figura 3- Espalhamento de luz: espalhamento inelástico (stokes e anti-stokes) e espalhamento elástico ou Rayleigh.....	29
Figura 4- Área demarcada analisada .....	38
Figura 5- (a) Equipamento Raman Confocal River Diagnostics. (b) Antebraço do participante posicionado na janela do espectrômetro Raman. ....	39
Figura 6- Amostra espectral das duas camadas estudadas seus picos estudados e suas diferenças. ....	42
Figura 7- Dendrograma da separação em dois grupos: epiderme (EP) (azul) e o estrato córneo (SC) (vermelho).....	43
Figura 8- Espectros Raman médios do SC. A linha azul corresponde ao grupo I (mais jovem) e a linha vermelha representa o grupo II (mais velho).....	45
Figura 9- Espectros Raman médios da EP. A linha azul corresponde ao grupo I (mais jovem) e a linha vermelha representa o grupo II (mais velho).....	46
Figura 10- Picos em $1343\text{ cm}^{-1}$ , $1450\text{ cm}^{-1}$ e $1650\text{ cm}^{-1}$ dos espectros Raman do SC para médias das 4 idades extremas, 24,30,52,59 divididas em grupo I (24 e 30) e o grupo II (52 e 59), figuras (10.A), (10.B) e (10.C) respectivamente.....	49
Figura 11- Espectros do SC com área sob a curva e largura meia altura do pico $1340\text{ cm}^{-1}$ para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura. ....	53
Figura 12- Espectros do SC com área sob a curva e largura meia altura do pico $1450\text{ cm}^{-1}$ para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura. ....	54
Figura 13- Espectros do SC com valores de area sob a curva e largura meia altura do pico $1650\text{ cm}^{-1}$ para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura.....	56
Figura 14- Espectros da EP com área sob a curva e largura meia altura do pico $1340\text{ cm}^{-1}$ para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura. ....	58

Figura 15- Espectros da EP com área sob a curva e largura meia altura do pico 1450 $\text{cm}^{-1}$ para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura. ....	59
Figura 16- Espectros da EP com área sob a curva e largura meia altura do pico 1650 $\text{cm}^{-1}$ para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura. ....	61
Figura 17- Dendrograma da epiderme (17.A) e do estrato córneo (17.B). Separação em dois grupos de seis segmentos, azul e vermelho conforme faixa etária.....	87
Figura 18- Gráficos de matriz de dispersão para SC e EP considerando os dois grupos etários.....	89
Figura 19- Gráfico de peso do CP_1, sendo este o CP mais representativo para o estrato córneo em (19.A) e para epiderme em (19.B). ....	91
Figura 20- Principais regiões dos picos de aminoácidos constituintes do NMF, ácido carboxílico (20.A), citrulina e ornitina (20.B), para ambos grupos etários I (24-30) e II (52-59).....	93
Figura 21-Área sob a curva dos constituintes do NMF, do grupo I (24-30) (21.A),do grupo II (52-59) (21.B), do ácido carboxílico de pirrolidona ( $852-887\text{cm}^{-1}$ ), região $800-1150\text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo do ácido carboxílico.....	95
Figura 22- Área sob a curva e FWHM dos constituintes do NMF, grupo I (24-30) (22.A), e do grupo II (52-59) (22.B), do ácido carboxílico de pirrolidona ( $852-887\text{ cm}^{-1}$ ), região $800-1150\text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo do ácido carboxílico.....	96
Figura 23- Área sob a curva e FWHM do grupo I (24-30) (23.A), e grupo II (52-59) em (23.B), do constituinte do NMF, a citrulina ( $1340\text{ cm}^{-1}$ ), na região de $1200-1375\text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva do pico da citrulina. ....	98
Figura 24- Área sob a curva do grupo I (24-30) (24.A), grupo II (52-59) (24.B), da ornitina ( $1414\text{ cm}^{-1}$ ), na região entre $1375\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva do pico da ornitina.....	99
Figura 25- Pico da queratina ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ), principal proteína do estrato córneo, para ambos grupos etários I (24-30) e II (52-59). Região de $1500-1800\text{ cm}^{-1}$ .....	102

Figura 26- Área sob a curva e FWHM, do grupo I (24-30) (26.A), e grupo II (52-59) (26.B), da queratina, ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) na região de $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva do pico da queratina. ....	102
Figura 27- Valores de área sob a curva de cada constituinte de NMF, ácido carboxílico, citrulina, ornitina, e a comparação destes entre os grupos I (24-30) e II (52-59).....	105
Figura 28- Valores de FWHM de cada constituinte de NMF, ácido carboxílico, citrulina, ornitina, e a comparação destes entre os grupos I (24-30) e II (52-59). ...	106
Figura 29- NMF total com média e desvio padrão, e box splot de comparação entre os grupos I e II, para os valores totais de NMF. ....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Representação molecular de grupos funcionais presentes na pele, detectáveis no espectro Raman na região de 800-1800 $\text{cm}^{-1}$ . .....	31
Tabela 2- Principais grupos funcionais, compostos formados por eles, suas regiões espectrais e alterações moleculares. ....	34
Tabela 3- Profundidades das regiões analisadas usando espectroscopia Raman confocal com laser 785 nm.....	38
Tabela 4 - Variações significativas no estrato córneo e na epiderme e seus picos correspondentes.....	49
Tabela 5- Identificação dos modos vibracionais e sua correlação com os sinais Raman no SC e EP.....	51
Tabela 6- Valores de área sob a curva e FWHM para estrato córneo e epiderme de ambos grupos.....	62
Tabela 7- Comparação da área sob a curva dos picos analisados entre grupos I e II em ambas as camadas. ....	62
Tabela 8- Comparação dos valores de FWHM entre grupos I e II dos picos analisados em ambas as camadas. ....	64
Tabela 9- Comparação dos valores de área sob a curva entre os grupos I e II para cada faixa de idade, para estrato córneo (SC) e epiderme (EP), conforme dados dos itens 5.6 e 5.7, figuras A até L .....	86
Tabela 10- Contribuição do presente trabalho para a literatura usando ERC. ....	110
Tabela 11- Resumo das principais moléculas funcionais e seus fatores de alteração estudados.....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATR: Refletância Total Atenuada

ERC: Espectroscopia Raman Confocal

FT: Transformada de Fourier

FWHM: Largura total a meia altura

GAG: Glicosaminoglicano

HCA: Análise Hierárquica de Cluster

IR: Infravermelho

NMF: Fator natural de hidratação

PCA: Ácido Carboxílico de Pirrolidona

PCA-LDA: Análise exploratória de componentes principais- Análise de discriminante linear.

TCLE: Termo de Conselho Livre e Esclarecido

UCA: Ácido Urocânico

UV: Ultravioleta

UVA: Ultravioleta A

UVB: Ultravioleta B

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  : Alfa

$\beta$  : Beta

C: Carbono

$^{\circ}\text{C}$ : Graus Celsius

cm: Centímetro

$\text{H}_2$ : Hidrogênio

%: Porcentagem

$\mu\text{m}$ : Micrômetro

mm: Milímetro

nm: Nanômetro

mW: Miliwatts

W: Watts

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo geral .....	23
2.2 Objetivos Específicos .....	23
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	24
3.1 Pele .....	24
3.1.2 Estrutura e Composição da Epiderme .....	24
3.1.3 Estrutura e Composição do Estrato Córneo .....	25
3.1.4 Estrutura geral da derme .....	27
3.2 Espectroscopia Raman .....	28
3.3 Grupo das amidas e sua presença nas biomoléculas funcionais .....	31
3.3.1 Amida I – Queratina $\alpha$ -hélice: ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) $\rightarrow$ principal vibração: C=O .....	32
3.3.2 Lipídeos (ácidos graxos) - ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ) $\rightarrow$ principal vibração: CH <sub>2</sub> tesoura ..	32
3.3.3 Amida III - Ceramida $\alpha$ - hélice: ( $1230\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ ) $\rightarrow$ principais vibrações CH <sub>2</sub> torção; C-N e N-H. ....	33
3.4 Fator Natural de Hidratação – NMF .....	34
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Participantes do Estudo .....	36
4.2 Local e Método da Coleta .....	37
4.3 Espectroscopia Raman Confocal .....	38
4.4 Análise e pré-processamento de dados .....	39
4.5 Análise de Constituintes do NMF .....	40
4.6 Análise Estatística.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Diferenças espectrais entre estrato córneo e epiderme e sua análise por HCA. .....	41

5.2 Análise dos dados espectrais Raman .....	44
5.3 Cálculo de área sob a curva e largura total a meia altura dos picos do estrato córneo para os grupo I (24-30) e II (52-59). .....	52
5.4 Cálculo de área sob a curva e largura meia altura dos picos da epiderme para os grupo I (24-30) e II (52-59). .....	58
5.5 Comparação entre as curvas gaussianas e seus coeficientes de correlação dos espectros do estrato córneo e epiderme para os grupos I (24-30) e grupo II (52-59). .....	66
5.8 Análise exploratória para agrupamento hierárquico (HCA) - Diferenças estatísticas entre diferentes idades. ....	87
5.9 Análise exploratória de componentes principais - análise de discriminante linear, PCA-LDA, na região de 400 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ , gráfico de matriz de dispersão e gráfico de peso. ....	88
5.9.1 Análise exploratória de Componentes Principais - Gráfico de peso para estrato córneo e epiderme .....	90
6 NMF – Variação entre duas faixas etárias .....	92
6.1 Cálculo de área sob a curva e largura meia altura dos picos de NMF para os grupos I (24-30) e II (52-59). .....	95
7 Contribuições do presente trabalho para literatura atual.....	109
8 CONCLUSÃO .....	111
7 REFERÊNCIAS .....	112

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços ocorridos nas ciências da saúde nas últimas décadas, conseguiram abrandar o processo de senilidade do organismo humano causado por fatores ambientais ou genéticos, possibilitando o aumento da expectativa de vida. Iminente a estes avanços, o estudo da pele humana, permitiu maior entendimento sobre suas características metabólicas.

A pele é um órgão ativo com características próprias e imunológicas, os estudos de caracterização cutânea tem sido cada vez mais objetos de grupos científicos para o entendimento da influencia de fatores como etnicidade, gênero, idade e fatores externos como poluição, exposição solar nas diferentes camadas cutâneas.

A pele possui três camadas principais, derme, epiderme, EP e estrato córneo, SC, sendo esta última considerada a porção mais externa da epiderme.

Diversas pesquisas já contribuíram com resultados atuais, porém há uma lacuna na literatura sobre estudos clínicos controlados, com métodos que permitam a avaliação da pele em suas condições *in vivo*, sem produtos tópicos, de suas camadas, e de sua homeostase para as diferentes faixas etárias.

Os primeiros métodos empregados nas pesquisas da pele *in vivo*, não foram capazes de caracterizar separadamente as diferentes camadas da pele (SHIM, et al., 2007). Dentre as técnicas utilizadas, a espectroscopia Raman confocal, ERC é uma técnica óptica, que mantém a integridade e a composição da pele durante sua análise (OLIVEIRA et al., 2012; CASPERS et al., 2003; ERMAKOV et al., 2010). Ela é utilizada na caracterização e no estudo da alteração de tecidos biológicos *in vivo*, (BINDER et al., 2017), e em investigações como a cinética de penetração de substâncias hidratantes ou fármacos, em diferentes camadas da pele (ZARMPI et al., 2023 GARVIE-COOK et al., 2022), além de ser uma técnica não destrutiva e não invasiva (FRANZEN et al., 2015; TOSATO et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2014; TELLEZ et al., 2015), apresentando como diferencial a não realização de biopsias.

Durante sua análise, utilizando como fonte de luz o laser no comprimento de onda infravermelho, 785 nm, este alcança as diferentes camadas cutâneas de modo não destrutivo, ocorre a formação de bandas espectrais das vibrações moleculares, essas bandas são específicas de cada ligação molecular, com informações diretas sobre as moléculas do tecido cutâneo, sendo sensíveis à

estrutura da conformação molecular e ao meio circundante (MOVASAGHI et al., 2007).

Para o estudo da pele, a definição da concentração de água nas camadas, é feita pelo estudo do fator natural de hidratação, NMF – *natural moisturizer factor*, que é formado principalmente por um conjunto de proteínas superficiais e higroscópicas de hidratação (OLIVEIRA et al., 2012).

Com a ERC, é possível medir as concentrações moleculares dos constituintes da pele, como a concentração de água no SC, avaliando os principais constituintes do NMF, além de ceramidas, lipídeos, monitorar núcleos de células epidérmicas e membrana basal normais ou alteradas, por meio da observação das diferentes contribuições de ácidos nucleicos, histonas e proteínas, com a possibilidade de realizar diagnósticos dermatológicos (CASPER et al., 2001; CHOI et al., SHORT et al., 2006; LIEBER et al., 2008). Além disso, informações estruturais, como a espessura do estrato córneo, podem ser obtidas (FRANZEN et al., 2015). Bohling et al., em 2014, validaram um sistema de ERC para determinação precisa da espessura do estrato córneo *in vivo*.

A termorregulação humana através da pele, ocorre em resposta a distúrbios metabólicos ou ambientais, e é diferente conforme a faixa etária (LEE; KWON, 2023; CHOI et al., 2010). Fatores atuais relacionados às mudanças climáticas, levam maior exposição da pele ao ultravioleta UV, e devido ao aumento do aquecimento global, que afeta sua capacidade em manter homeostase, e aumenta o seu fotoenvelhecimento (LEE; KWON, 2023; WILLITS-SMITH et al., 2023; BELZER; PARKER, 2023).

Três fatores principais regulam a evaporação e difusão da água no SC: o NMF, a proteína queratina, e a organização intercelular dos lipídios. O NMF contribui significativamente para a hidratação e função de barreira da pele (O'REGAN et al., 2010). A organização intercelular dos lipídios, ICL, bem como o arranjo ordenado de suas estruturas lamelares, possuem uma ordem de organização lateral (FRANZEN et al., 2015; BOHLING et al., 2014), que pode ser calculado com mais precisão, considerando a influência da queratina, principal proteína do estrato córneo, e terceiro fator importante de homeostase.

A amida I e a amida III são estruturas moleculares secundárias de proteínas e lipídios, que podem ser identificadas pela espectroscopia Raman. Elas são estruturas secundárias da queratina, e de lipídios presentes no SC, que tem função

proteica e hidratante, assim, as alterações nessas estruturas são responsáveis por alterações nas propriedades morfológicas e mecânicas, manifestadas como rugas, flacidez, perda de elasticidade ou ressecamento aparente (ENROTH et al., 2015).

Chrit, et al., em 2005, avaliaram a variabilidade dos espectros Raman adquiridos do estrato córneo, e as diferenças em regiões espectrais específicas foram associadas à alterações na distribuição de proteínas, aminoácidos e lipídeos.

Boncheva et al., em 2009, usaram medidas de condutância de alta frequência em comparação à técnica ERC, para determinar perfis de profundidade de hidratação do SC, durante uso de *tape-stripped*, eles demonstraram que a condutância se correlaciona com o conteúdo de água do SC, desde que a função de barreira do SC não seja prejudicada, estas medidas foram úteis para discriminar diferentes estágios de hidratação do SC.

Tfayli, et al., em 2012, relataram variabilidade dos lipídeos com o envelhecimento, eles observaram que, as características espectrais Raman da pele, mudaram com a organização lateral dos lipídios, e com o aumento da idade dos voluntários.

Mao et al., em 2012, usando a ERC, pesquisaram a seleção de substâncias quimicamente separadas dentro da pele, por perfil de profundidade, e o mapeamento por imagens microscópicas, obtendo perfis de concentração de substâncias exógenas na pele, obtendo informações sobre a interação de permeantes e a pele.

Bakker Schut et al., em 2002, desenvolveram um sistema de software, que permite discriminação automatizada em tempo real, entre diferentes tecidos humanos durante a análise Raman, levando à classificação dos espectros, para pele saudável e em estados fisiopatológicos.

Assim, conforme as pesquisas citadas, a ERC tem aplicações na área biomédica, pois propicia informações a nível molecular, estrutural *in vivo* (BINDER et al., 2017). Ela coleta dados, até vários micrômetros abaixo do superfície (CASPER et al., 2001; CHEN et al., 2010), principalmente na região que varia entre 400 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , conhecida como região de *finger print* ou impressão digital, devido às suas ressonâncias vibracionais, correspondentes aos grupos funcionais moleculares.

Pesquisas mais atuais, utilizam a ERC predominantemente para quantificar e avaliar a absorção transdérmica de fármacos e cosméticos de uso tópico, avaliando também sua absorção desde o estrato córneo, conforme as citadas a seguir.

Alvarez-Figueroa et al., em 2020, utilizaram a microscopia Raman para avaliar a penetração transdérmica de fármacos nas diferentes camadas da pele, avaliando sua absorção cutânea.

Zarmpi et al., em 2023, utilizaram a espectroscopia Raman confocal, como uma ferramenta para quantificar a taxa e a extensão da absorção de medicamento, e sua eliminação das regiões a serem tratadas, dentro da epiderme, abaixo da barreira do estrato córneo.

Zhang et al., em 2020, utilizaram microscopia Raman para validar se géis tópicos de diclofenaco, podem ficar retidos nas camadas epidérmicas e dérmicas, eles mostraram que os géis tópicos estudados liberam diclofenaco através da barreira cutânea do estrato córneo, e formaram um depósito de medicamento localizado na epiderme.

Garvie-Cook et al., em 2022, pesquisaram a aplicação de microespectroscopia Raman confocal e imagem, para analisar o desempenho de medicamentos tópicos e transdérmicos na interface formulação-pele, para elucidar as principais propriedades químicas de sua absorção através da pele, qual o impacto de sua interação, e a maneira pela qual ocorre a transferência do medicamento.

Wang et al., em 2023, utilizaram a ERC para monitorar a penetração dérmica de ativos cosméticos para aplicações tópicas, para avaliar a penetração epidérmica da glabridina e dos componentes lipossomais contendo glabridina. Os resultados indicaram que a glabridina transportada pelos lipossomas, penetrou no estrato córneo, e atingiu as camadas profundas da pele.

Liu e Lunter, em 2020, analisaram efeitos de dois tipos de emulsificantes nos lipídios intercelulares da pele, usando espectroscopia Raman confocal, eles analisaram os sinais lipídicos do SC quanto ao conteúdo, conformação e ordem de organização lateral, e observaram os efeitos moleculares dos emulsificantes nos lipídios da pele, ocorrendo aumento da penetração da substâncias, quando ocorrem propriedades reduzidas de barreira cutânea e aumento da fluidez lipídica.

Matsumoto et al., em 2023, utilizaram espectroscopia Raman para medir parâmetros de ceramidas, NMF e colesterol em pele de bebês com diferentes

meses de idade, e mostraram que o estrato córneo de recém nascidos é mais espesso, e diminui conforme o tempo de vida.

O diferencial da presente pesquisa ocorre pois, estudos majoritários atuais, conforme os indicados anteriormente, se concentram na avaliação da absorção de fármacos e cosméticos, com poucos resultados sobre a alteração dos constituintes da pele natural, nas diferentes camadas da pele de diferentes grupos etários, e sem produtos tópicos.

Muitos estudos usam a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, FTIR, porém esta contém limitações de resolução espacial, devido aos seus longos comprimentos de onda infravermelha, e sua baixa profundidade de penetração em tecidos biológicos, como resultado da forte absorção em água. O espalhamento Raman supera os problemas associados a longos comprimentos de onda do FTIR (FOSTER et al., 2011). Diferentemente da FTIR, a ERC é uma técnica atribuída ao estudo não invasivo de tecidos biológicos *in vivo*, ela pode ser usada para estudar a fisiologia da pele normal ou em condições patológicas, obtendo bases sobre sua composição molecular, como teor de água, hidratação e mudanças em sua função de barreira, absorção de lipídeos, determinação da espessura do estrato córneo, estruturas de proteínas e de amidas.

O objetivo desta tese foi caracterizar constituintes moleculares da pele *in vivo*, considerando as camadas, estrato córneo e epiderme, de voluntários divididos em duas diferentes faixas etárias, que serão analisadas utilizando a espectroscopia Raman confocal.

A fundamentação do presente trabalho está em compreender as alterações biológicas que levam a diferentes espectros, e quais as principais diferenças biofísicas que discriminam os diferentes tecidos cutâneos que resultam de proteínas e lipídeos. Devido a complexidade na determinação dessas contribuições obtidas pelos espectros Raman, métodos exploratórios estatísticos como análise exploratória de componentes principais, PCA e análise hierárquica de cluster, HCA são utilizados para redução dimensional dos dados espectrais permitindo também sua classificação.

Pudlas et al, em 2010, analisaram a distinção de tipos celulares identificados por espectroscopia Raman utilizando análise estatística multivariada, o que possibilitou as diferenciações bioquímicas celulares.

Zuhayri et al, em 2023, estudaram o efeito da terapia fotodinâmica em cicatrização de feridas de diabéticos utilizando a espectroscopia Raman para o diagnóstico, para avaliação da evolução da cicatrização eles utilizaram PCA.

Zhang et al, em 2020, usaram a espectroscopia Raman para diagnóstico não invasivo de melanomas cutâneos, a diferenciação entre melanomas e lesões pigmentadas foi feita utilizando PCA.

Assim, o uso da espectroscopia Raman permite monitorar o efeito das alterações em lipídios, queratina e NMF *in situ* e *in vivo* nas camadas superficiais da pele, e a separação dos diferentes sinais devido às diferenças biofísicas, podem ser obtidas por meio de métodos estatísticos, contribuindo para novos resultados e definições.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo desta tese é caracterizar constituintes funcionais primários da pele, considerando as camadas, estrato córneo e epiderme, de 71 voluntários caucasianos saudáveis, divididos em duas faixas etárias, grupo I de 24 à 30 anos, e grupo II de 52 à 59 anos, que serão analisadas utilizando a espectroscopia Raman confocal, com o laser de comprimento de onda de 785 nm.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obter espectros do estrato córneo e epiderme separadamente, e então caracterizar principais regiões de NMF, queratina, lipídeos e ceramidas e suas modificações espectrais nas diferentes faixas etárias.
- Analisar os agrupamentos por similaridade dos modos vibracionais moleculares, dos dados espectrais obtidos, considerando a diferença biofísica entre as camadas e entre as diferentes faixas etárias.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Pele

A pele é o órgão mais externo do corpo humano, responsável pela interface com o meio ambiente, não é vascularizada, sendo atravessada por folículos pilosebáceos, onde chegam nervos sensoriais. A epiderme é a camada mais externa, e o estrato córneo a delgada camada superficial, acima da epiderme (HENDRIKS, 2005). Ela possui glândulas que se originam na derme e chegam até a epiderme, essas glândulas são chamadas de apêndices da epiderme (DU VIVIER, 1997). Ela apresenta diversas funções, como a manutenção da integridade do organismo, proteção, absorção e secreção de líquidos, controle de temperatura, barreira à prova de água, absorção de luz ultravioleta, metabolismo de vitamina D, controle hormonal através de seus receptores hormonais, e funções estéticas e sensoriais, estas últimas ocorrem devido à presença de terminações de placas nervosas na epiderme (HARRIS, 2003; DUVIVIER, 1997).

As alterações cutâneas, são caracterizadas neurologicamente pela perda na regulação do eixo hipotálamo-pituitário-gonadal, HPG, que ocorre na menopausa e andropausa, ocorrendo alterações nas concentrações de hormônios HPG, com a diminuição de sinalizadores hormonais, andrógenos e estrógenos, sendo importantes na regulação da proliferação celular da pele, interferindo no ciclo celular normal, e refletindo em alterações cutâneas superficiais no estrato córneo e epiderme conforme a faixa etária (HARRIS, 2003).

##### 3.1.2 Estrutura e Composição da Epiderme

A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado sobre uma membrana basal. Ela constitui a fase mais externa da pele e sua espessura varia de acordo com a região do corpo. Apesar de estarem presentes várias terminações nervosas, a epiderme é avascularizada, e os nutrientes atingem este epitélio por difusão através de vasos sanguíneos presentes na derme (SOUSA, 2017), sua espessura varia entre 1,3 mm como na palma da mão, e 0,6 mm como na face.

Ela é constituída por quatro camadas distintas, o estrato córneo, o estrato granuloso, estrato espinhoso e camada basal (HARRIS, 2003; PULLAR et al., 2017). As células que a compõe, são os queratinócitos, que são células especializadas produtoras de queratina, estas se alteram conforme passam de uma camada a outra, durante seu processo de maturação e estratificação, ocorrendo renovação por meio de sua diferenciação terminal, até serem eliminados na camada mais externa, o estrato córneo, onde passam a ser chamados de corneócitos (HARRIS, 2003). Outros tipos celulares presentes em minoria são as células de Langerhans, células de Merkel e os melanócitos (SOUSA, 2017).

A diferenciação da epiderme é efetuada de acordo com a profundidade, maturação e morfologia de suas camadas, assim, a taxa de sua renovação, é determinada pela taxa de proliferação celular na camada basal da epiderme, e a perda do corneócito na superfície (HARRIS, 2003). O processo de descamação, ocorre com a constante liberação dos corneócitos, nas camadas mais superficiais do estrato córneo, que são continuamente liberadas, resultando na aparência suave da superfície da pele normal (HARRIS, 2003).

### 3.1.3 Estrutura e Composição do Estrato Córneo

O estrato córneo é formado por corneócitos e lipídeos. Sua formação implica em alguns eventos em série: com o aumento da permeabilidade da membrana celular do queratinócito, este torna-se mais permeável a íons, como o cálcio, que ativam peptidases que convertem a profilagrina em filagrina (SOUSA, 2017). Esta proteína, a filagrina, está presente nos grânulos de querato-hialina, e é responsável por agregar a queratina e outras proteínas nas camadas mais superficiais da pele, para a formação do estrato córneo. Com a degeneração do núcleo celular, estas células se achatam, e ocorre o alinhamento de moléculas de queratina, criando o envelope cornificado presente superficialmente na pele (SOUSA, 2017). Deste modo, o envelope cornificado, forma-se na fase final de diferenciação dos queratinócitos, passando a ser denominados corneócitos.

Durante a formação dos corneócitos, as células da camada granulosa soltam o conteúdo lipídico dos corpos lamelares, para o espaço extracelular, formando a matriz lamelar lipídica. Esta matriz é composta por ceramidas, ácidos graxos livres

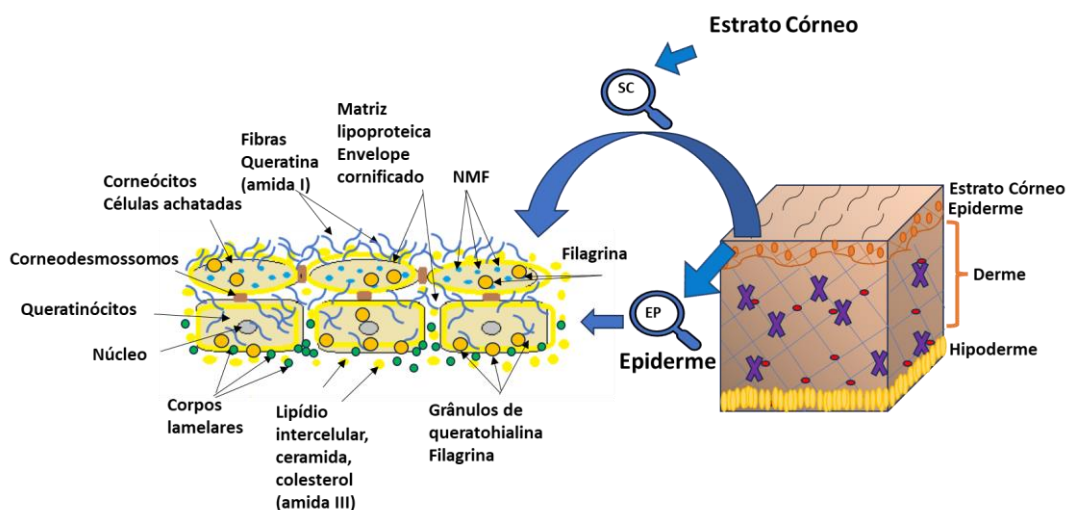
e colesterol, importantes para homeostasia celular e manutenção da permeabilidade cutânea (SOUSA, 2017).

Os aminoácidos resultantes da degradação da filagrina, são utilizados na formação do fator natural de hidratação, NMF, que são constituintes higroscópicos, responsáveis pela hidratação da camada córnea, e pela manutenção do pH ácido da pele (SOUSA, 2017).

Na pele saudável, os corneócitos possuem boas concentrações de NMF, composto por moléculas higroscópicas e que se ligam a água, prevenindo sua evaporação, além de absorver os raios ultravioleta (HARRIS, 2003). Assim, o NMF é um envelope proteico, e a conversão da filagrina em NMF ocorre no interior dos corneócitos, para que ocorra a queratinização completa do estrato córneo. Porém, nem toda filagrina é hidrolisada, algumas levam à formação de um complexo filagrina-queratina.

Os corneócitos, presentes no envelope cornificado, oferecem a coesão necessária à estrutura epidérmica, pois são ligados entre si pelos corneodesmossomos, evitando a perda de água transepidermica, e a entrada de alérgenos e agentes infecciosos (SOUSA, 2017).

Figura 1- Organização dos lipídios no espaço intercelular do estrato córneo



Fonte: (Autora).

Conforme visto na figura 2, o estrato córneo é a porção mais externa da epiderme, sua principal função é de atuação como uma barreira protetora, ao mesmo tempo em que retém água, eletrólitos e nutrientes (HARRIS, 2003), através de um mosaico de várias camadas, com estruturas hidrofílicas, os corneócitos, e hidrofóbicas, estruturas lipídicas lamelares intercelulares, e através dele, as substâncias químicas que não são água, só conseguem permear na pele, pelas camadas lipídicas intercelulares, e a água ao passar pelos corneócitos, é retida pelas fibras de queratina hidrofílicas superficiais e pelo NMF (HARRIS,2003).

Durante a maturação dos corneócitos, os lipídeos intercelulares são enzimaticamente modificados, em seguida as forças coesivas que mantem os corneócitos aderidos, são neutralizadas, rompendo a função adesiva dos corneodesmosomas, e ocorre a descamação da pele (HARRIS, 2003).

As ceramidas, assim como os lipídeos, participam de processos diversos, como proliferação, diferenciação ou apoptose, sendo responsáveis pela manutenção da integridade da barreira cutânea, e pela redução da perda de água transepidermica, e por regular as funções dos queratinócitos e de células do sistema imune da pele (SOUSA, 2017).

Nas camadas mais externas do estrato córneo encontram-se maior porcentagem de lipídeos do sebo desordenados, em associação com os lipídeos intracelulares sólidos, organizados. Esse nível de organização interfere na retenção de água no interior do sistema multilamelar sendo responsável pela manutenção do equilíbrio homeostático da pele (BERRY et al., 1999).

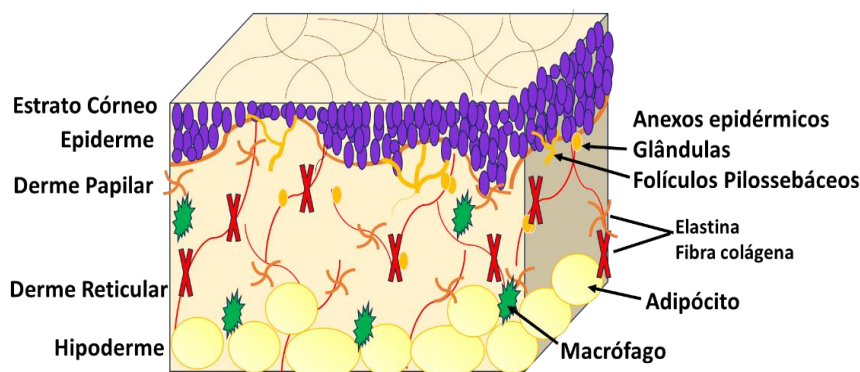
#### 3.1.4 Estrutura geral da derme

A figura 2 mostra a estrutura geral da pele.

A derme é constituída por uma camada de tecido conjuntivo de suporte à epiderme, e constituída por duas regiões principais, a derme papilar, mais externa, na qual estão presentes as papilas dérmicas na divisão com a epiderme, constituída por tecido conjuntivo frouxo, e a derme reticular, mais profunda, constituída de tecido conjuntivo denso. Suas principais células são os fibroblastos, que tem a função de formação do colágeno, e que estão permeados de substancias fundamentais (DUVIVIER, 1997), ela é vascularizada e assegura a nutrição sanguínea da epiderme (PULLAR et al., 2017), outras células presentes são os

macrófagos e adipócitos. O tecido conjuntivo contém componentes essenciais para a pele, como ácido hialurônico e proteínas tais como colágeno e elastina, que conferem resistência, firmeza e flexibilidade a pele (SOUSA, 2017).

Figura 2- Estrutura geral da pele.



Fonte: (Autora).

### 3.2 Espectroscopia Raman

Para análise dos tecidos e camadas da pele, muitos métodos requerem preparação inicial, porém as formas de preparação do tecido influenciam as propriedades físicas e mecânicas (GARO et al., 2007).

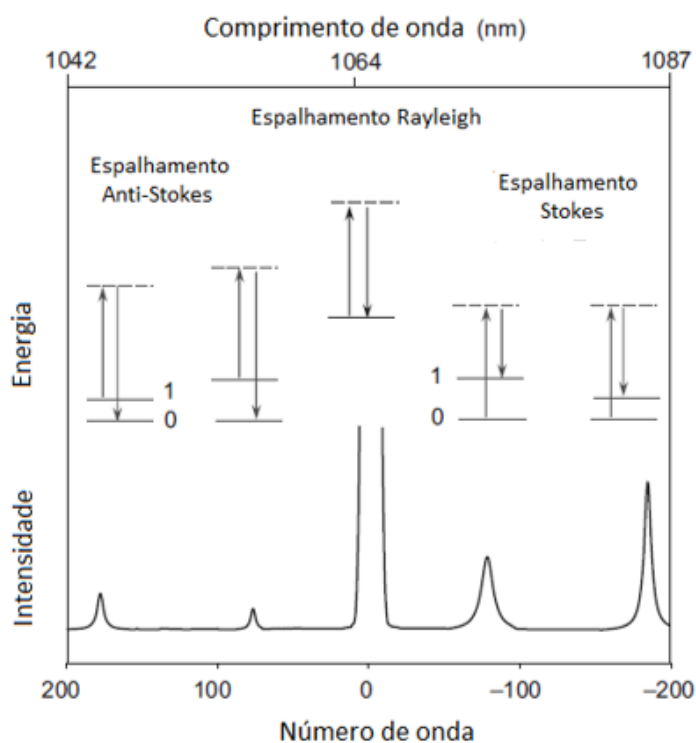
As camadas epidérmicas, são conhecidas por serem sensíveis às mudanças químicas e físicas, decorrentes de preparo e do meio ambiente para análise. Muitos resultados estão disponíveis a partir de técnicas de análise *in vitro*, no entanto a condição do tecido nestes casos é diferente, sem estarem preservados o estrato córneo e a epiderme (KEARNEY et al., 2005). Assim, pesquisas tem buscado o uso de técnicas ópticas e espectroscópicas para análise de pele *in vivo*.

Diversas informações estruturais e composicionais podem ser obtidas pela técnica de espectroscopia (AZEVEDO, 2016). A base da espectroscopia é a interação da radiação eletromagnética com a matéria, assim, quando a radiação monocromática é incidida em sistemas como gases, líquidos ou sólidos, ela pode resultar em fenômenos como luminescência, absorção, espalhamento elástico e inelástico (AZEVEDO, 2016).

O espalhamento inelástico, pode ocorrer em duas regiões, stokes e anti-stokes. No espectro Raman na região Stokes, o fóton espalhado tem a energia menor que a do fóton incidente, na região anti-stokes, o fóton espalhado tem energia maior que a energia incidente. Assim, no espalhamento inelástico, uma parte da luz desviada tem um frequência diferente da luz incidente, porque a energia é transferida durante o espalhamento, esta interação é a característica da espectroscopia Raman, onde os espectros resultantes são caracterizados por mudanças nos números de onda, e da frequência incidente (CAETANO et al., 2017).

No espalhamento Rayleigh ou elástico, o fóton espalhado tem a mesma frequência do fóton incidente.

Figura 3- Espalhamento de luz: espalhamento inelástico (stokes e anti-stokes) e espalhamento elástico ou Rayleigh



Fonte: (Adaptado de Larkin, 2011).

A figura 3, mostra ilustração esquemática do espalhamento Rayleigh, espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes. A frequência do fóton espalhado, setas para baixo, permanece inalterada no espalhamento Rayleigh, mas é de

frequência mais baixa ou mais alta no espalhamento Raman. As linhas tracejadas indicam o “estado virtual de energia”.

A espectroscopia Raman, possibilita examinar tecidos *in vivo*, quanto às alterações na composição bioquímica da pele, que ocorrem conforme diferença na faixa etária, ela permite explicar os vínculos biofísicos entre as características vibracionais, e as alterações das composições químicas específicas (PEZZOTTI, 2015).

Nas aplicações biomédicas, a luz laser incide sobre uma molécula, e a espectroscopia Raman mede o espalhamento inelástico da mesma, cada molécula que compõe a amostra biológica a ser analisada, origina um espectro diferente, dependendo de seu modo vibracional.

Este método utiliza fonte de laser na faixa do comprimento de onda infravermelho, em 785 nm, e vermelho 660 nm, sendo portanto, possíveis de interagir com o tecido cutâneo *in vivo*, de forma não invasiva, e sem causar danos.

As multicamadas lipídicas intercelulares que compõe o estrato córneo, contém ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, apresentando um polimorfismo de diferentes fases sólidas, no qual as cadeias são organizadas e imóveis, com frequência de estiramento simétricas do grupamento CH<sub>2</sub>, que ocorre devido o nível de ordenamento das cadeias (HARRIS, 2003).

Nas camadas superiores do estrato córneo, verifica-se alteração dos lipídeos, ocorrendo o acréscimo dos componentes do sebo, produzidos nas glândulas sebáceas, que são desordenadamente depositados no estrato córneo, e são combinados com os lipídeos intracelulares ordenados (HARRIS, 2003).

O teor de água no estrato córneo está entre 10 e 20%, a retenção de água neste tecido, é essencial para manter sua flexibilidade e prover a hidratação necessária às enzimas envolvidas em função e maturação do estrato córneo.

A quantidade adequada de lipídeos é fundamental para reter água livre e prover a hidratação necessária à pele (MILAN, 2006). A incapacidade de reter o conteúdo de água necessário, e fornecer o conteúdo adequado de lipídeos, leva ao desenvolvimento da xerose ou pele seca.

Na pele, a região do espectro Raman da banda de amida I, está compreendida entre 1600 cm<sup>-1</sup> e 1700 cm<sup>-1</sup>, sendo esta, a região espectral mais sensível aos componentes estruturais secundários dessas proteínas. Balaz et al., em 2014, estudaram o uso da espectroscopia Raman para geração de imagens no estudo de

psoríase, e verificaram que na pele com psoríase, ocorreu a alteração dos componentes da amida I, com a redução significativa da banda na região de 1630-1660  $\text{cm}^{-1}$ , em relação à pele normal, esta alteração pode ser devido a hiperproliferação dos queratinócitos, resultando em funções perturbadas do estrato córneo, infiltração de linfócitos e granulócitos da epiderme e derme, e vasodilatação dos vasos sanguíneos dérmicos, levando a alterações de suas bandas de proteínas (BALAZ et al., 2014).

Tabela 1- Representação molecular de grupos funcionais presentes na pele, detectáveis no espectro Raman na região de 800-1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Grupo Funcional	Fórmula
Carbonila	C=O
Ácido graxo (lipídeo)	$\text{RCO}_2\text{O}$
Éster	-O-C=O-R
Amida I	$(\text{RCO})\text{NH}_2$
Amida III	$(\text{RCO})_3\text{NH}_2$

Fonte: (Autora).

### 3.3 Grupo das amidas e sua presença nas biomoléculas funcionais

As amidas são compostos que possuem em sua estrutura um hidrogênio ligado diretamente a um grupo carbonila, o carbono que faz dupla ligação com oxigênio.

Sabe-se que o grupo funcional das amidas, está presente em biomoléculas presentes na pele, como proteínas e lipídeos.

Com a espectroscopia Raman, vários sinais vibracionais dos modos de amida, podem ser usados para a análise de estruturas peptídicas. A maioria das bandas características está associada ao grupo CONH, referido como amida I e III (I: 1600–1690  $\text{cm}^{-1}$ , III: 1230 -1300  $\text{cm}^{-1}$ ) (KONG & YU, 2007). Os dois sinais são de interesse principal para a identificação de diferentes conformações estruturais proteicas e lipídicas: amida I (vibração de alongamento de C=O), e amida III (ambos associados ao alongamento C–N, e vibrações N–H tipo flexão do grupo peptídico)

(SCHULZ & BARANSKA, 2007). O número de onda da amida reflete a estrutura da cadeia polipeptídica principal independentemente dos grupos laterais.

O princípio da análise direcionado as amidas, é que estas são estruturas secundárias em  $\alpha$ -hélice de proteína.

Assim, a correlação das posições das vibrações da amida I e amida III, com fração cristalográfica determinada como estruturas secundárias, estão presentes na proteína em conformação  $\alpha$ -hélice, com seus números de onda característicos (RYGULA et al. 2013).

A  $\alpha$ -hélice é estabilizada pelas ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila ( $-C = O$ ) e o grupo NH de cada ligação peptídica dos aminoácidos.

### 3.3.1 Amida I – Queratina $\alpha$ -hélice: ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) $\rightarrow$ principal vibração: C=O

Os modos de Amida I, são conhecidos por serem estruturas secundárias, assim ao usar como medição a técnica espectroscópica, ocorre sensibilidade derivada de seu deslocamento, dentro da molécula de proteína (GANIM et al., 2008), sendo esta a mais intensa banda de absorção das proteínas.

Ela é expressa principalmente pelas vibrações do alongamento C=O e C-N, e sua frequência ocorre nas faixas entre  $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.3.2 Lipídeos (ácidos graxos) - ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ) $\rightarrow$ principal vibração: CH<sub>2</sub> tesoura

Os lipídios intercelulares no SC consistem em ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol em uma razão equimolar (CAUSSIN et al., 2008).

Eles desempenham função na manutenção da função de barreira da pele e em seu estado de hidratação adequado (LIU;LUNTER, 2020).

A alteração da organização lipídica intercelular perturba a função de barreira levando a algumas doenças crônicas da pele (CHERMPRAPAI et al., 2018).

Devido a importância de manter as propriedades de ordenação lipídica da pele, as interações do lipídio molecular com substâncias ao redor, mantém sua barreira protetora para a otimização da homeostase da pele.

A banda de tesoura CH<sub>2</sub> em  $1450\text{ cm}^{-1}$ , reflete a característica da ordenação lateral entre as moléculas de lipídios. A mudança desse pico para um número de

onda mais alto no espectro Raman significa um estado mais hexagonal de organização lipídica.

3.3.3 Amida III - Ceramida  $\alpha$ - hélice: (1230-1340  $\text{cm}^{-1}$ )  $\rightarrow$  principais vibrações  $\text{CH}_2$  torção; C-N e N-H.

A ligação de amida, pode ser facilmente clivada levando a formação da amida III (JAMIN et al., 2018).

A clivagem da ligação de amida, pode ocorrer por uma desprotonação no carbono do grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) que carrega prótons móveis. Assim, a transferência de prótons, pode gerar um complexo íon-dipolo do  $\text{CH}_2$ , responsável pela vibração molecular tipo tesoura em lipídeos, ou tipo torção em ceramidas (DAMIEN et al., 2010; MASUKAWA et al., 2008).

A banda amida III, também resultante da vibração C–N e flexão N–H, dá origem as bandas Raman nas regiões de 1230–1340  $\text{cm}^{-1}$ (DUKOR, 2006).

O pico localizado em torno de 1300  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao modo de torção  $\text{CH}_2$ , podendo ocorrer alteração do modo vibracional em sua molécula (TFAYLI et al., 2010).

Sendo a ceramida um tipo específico de lipídio intercelular, a variação deste pico pode indicar a ordem ou desordem das conformações lipídicas (TFAYLI et al, 2010). A mudança para um número de onda mais alto deste pico indica uma tendência dos lipídios intercelulares se tornarem mais desordenados em seu estado de conformação.

Além da detecção da ordem conformacional nos espectros Raman, as características vibracionais também são importantes para determinar o estado de organização lateral (ordem ortorrômbica, ordem hexagonal e ordenação de cadeia) influenciado pelas interações intramoleculares (TFAYLI et al, 2010)..

Chan et al., em 2006, identificaram as vibrações de amida, como a banda I de amida (devido ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$ ) e a banda amida III (devido ao estiramento CN e flexão NH) obtendo fácil identificação em proteínas e lipídeos.

Assim, pode-se afirmar que a espectroscopia Raman, permite identificar mudanças moleculares na pele humana, como a amida I, comprimentos de onda próximos de 1600 e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , a amida III, comprimentos de onda próximos de

1271 e 1255  $\text{cm}^{-1}$ , lipídeos e proteínas, próximos de 1448 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  (GASIOR-GLOGOWSKA et al., 2013). Abaixo a tabela comparativa dos principais grupos funcionais e suas alterações analisados pela espectroscopia Raman.

Tabela 2- Principais grupos funcionais, compostos formados por eles, suas regiões espectrais e alterações moleculares.

Estrutura Secundária (grupo funcional)	Composto	Região espectral de identificação ( $\text{cm}^{-1}$ )	Vibrações moleculares características e suas alterações.	Resultados de alterações ambientais, radiação ultravioleta, idade cronológica.
Amida I	Queratina $\alpha$ - hélice	1800 - 1700	Estiramento C=O Deslocamento anarmonico Dobramento de proteínas.	Alteração na proliferação e quantidade de queratinócitos.
Amida III	Ceramida $\alpha$ - hélice	1230-1349	CH <sub>2</sub> - Torção NH – Flexão CN-Vibração	Alterações nos constituintes $\alpha$ -hélice e diminuição da hidratação da pele.
Ácido graxo	Lipídios	1380-1450	CH <sub>2</sub> - Tesoura	Grau de organização lipídica, não prevenindo a perda de água trans-epidermal.

Lakshimi et al., em 2002, usaram espectroscopia Raman, e obtiveram uma banda de média intensidade em torno de 1300  $\text{cm}^{-1}$  de CH<sub>2</sub> em modo torção (amida III), ceramida  $\alpha$ -hélice, eles observaram que curva CH<sub>2</sub> chegou em faixas de intensidade moderada, e apareceram várias regiões de 1375–1100  $\text{cm}^{-1}$ , com alteração na conformação da ceramida.

### 3.4 Fator Natural de Hidratação – NMF

O fator Natural de Hidratação ou *Natural Moisturizing Factor* NMF, é uma mistura de aminoácidos presentes nos corneócitos, com propriedades higroscópicas como a treonina, citrulina, ornitina, fenilalanina e ácido carboxílico, além de conter lactato, ureia, açúcares, sódio e potássio (OLIVEIRA et al., 2012; CASPERS et al., 2003; SILVA, 2009), essas substâncias previnem a evaporação hídrica por meio da ligação molecular com a água (SILVA, 2009).

Caspers et al., em 2003, monitoraram espectros de pele *in vivo* através da profundidade do estrato córneo. Comparando os espectros com dados do modelo experimental, os autores determinaram as concentrações semiquantitativas dos constituintes do NMF na pele, estes aumentaram no estrato córneo até 20  $\mu\text{m}$ , eram constantes entre 20 e 50  $\mu\text{m}$  e, diminuíram drasticamente para perto de 70  $\mu\text{m}$  (CASPERs et al., 2003).

Teixeira em 2013, avaliou *in vivo* a pele humana por espectroscopia Raman confocal, e verificou que o NMF tem como composição aproximadamente 15 aminoácidos, e destacou o ácido urocânico, UCA, que tem a função de absorver radiação UV, e o ácido carboxílico de pirrolidona, que tem função umectante (TEIXEIRA, 2013).

Quando o teor de água está associado às moléculas do NMF e às proteínas da epiderme, a água tem função plastificante (MILAN, 2006). Esta ação plastificante é importante para manter as propriedades mecânicas do estrato córneo, e ocorre pela existência de membranas celulares e espaços intercelulares intactos, que mantem os lipídeos estruturados, e evitam a saída dos constituintes de NMF, permitindo a presença de água em quantidade suficiente no interior do estrato córneo, ocorrendo o equilíbrio da água fornecida a ele pela derme, e as perdas por evaporação (MILAN, 2006).

A quantidade de água na pele não é distribuída uniformemente dentre as camadas. A maior parte está fixada à derme pelos glicosaminoglicanos, GAGs, derme e epiderme são compostos por aproximadamente 70% de água, e no estrato córneo segue um gradiente que vai diminuindo conforme se aproxima da superfície (MILAN, 2006), sua água localiza-se principalmente no interior dos corneócitos com auxílio do NMF, e em regiões intercelulares.

Assim, a espectroscopia Raman traz melhorias como instrumento diagnóstico que possibilita análise da distribuição não uniforme da água e NMF. Esta metodologia foi inicialmente implementada por Caspers et al., em 2001 e 2003. Estes autores conseguiram utilizar a ERC como meio para aplicações e pesquisa do conteúdo de água, análise de NMF e espessura do SC.

A presente pesquisa traz como relevância, a análise de NMF, lipídeos e proteínas do SC e EP separadamente, e em diferentes grupos etários, sendo esta observação possível doravante a utilização das análises estatísticas multivariadas que permitiram seu discriminação.

O presente trabalho utilizou a região espectral de *finger print*, citado anteriormente, onde foi possível obter valores médios para cada camada e para cada faixa etária identificando os principais picos de lipídeos, proteínas e componentes de NMF, mostrando justificativas, embasadas na literatura, de sua alteração devido à idade ou camada.

A partir da obtenção dos espectros, as características de largura espectral e área sob a curva destes foram analisadas, mostrando suas alterações referentes às consequentes mudanças nas vibrações das ligações moleculares das estruturas celulares da pele, discerníveis pelos espectros Raman. Também, a partir das análises espectrais Raman, foi possível mostrar qual foi a biomolécula mais marcante na diferenciação para o grupo I e para o grupo II no SC e na EP.

O NMF juntamente com a queratina exercem principal função de barreira da pele e como fator hidratante. No presente trabalho foram estudados os constituintes do NMF, ácido carboxílico, citrulina e ornitina, obtendo também suas análises espectrais de largura de banda e área sob a curva, com a comparação entre grupos etários e camadas.

#### 4 METODOLOGIA

Este trabalho utilizou como banco de dados, quatro (4) estudos anteriores realizados pelo laboratório da empresa Dermo Probes.

Estes estudos foram aprovados pelos seguintes comitês de ética: CEP(1): 36818920.3.0000.5494; CEP(2): 39614820.0.0000.5494; CEP(3): 26075119.9.0000.5494; CEP(4): 39410020.8.0000.5599.

Este estudo também foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos da Universidade Brasil - CEP 90452318.2.0000.5494.

##### 4.1 Participantes do Estudo

Setenta e um (71) participantes caucasianos saudáveis integraram este estudo, foram divididos em dois grupos etários, sendo estes vinte e três (23) voluntários com idades entre 24 e 30 anos, com as seguintes seis idades: 24, 25, 26, 28, 29, 30 (Grupo I), quarenta e oito (48) voluntários com idades entre 52 e 59

anos, com as seguintes seis idades: 52, 53, 54, 55, 58, 59 (Grupo II), participaram deste estudo. O critério usado para escolher as idades foi dois grupos de idades discrepantes, com diferença significativa entre eles, independentemente dos limites de idade. Foram usadas as médias de cada grupo de idade, não sendo avaliado cada voluntário individualmente.

Os participantes foram recrutados de acordo com um formulário preenchido por eles, este formulário incluiu critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos, como idades e fototipos I ou II, usando a classificação da escala de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988). O gênero dos participantes não foi um critério avaliado no estudo, no entanto, 65 mulheres e 6 homens participaram, com uma proporção de 92% de mulheres para 8% de homens.

Após seleção dos participantes, e estes serem familiarizados com o estudo, eles assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, TCLE, assinado em papel. Não houve desistência de nenhum participante durante o estudo.

Os critérios de inclusão foram: ausência de dermatoses, faixa etária para o estudo, fototipos I ou II, sem história de doenças prévias de pele, autonomia para comparecer ao local de coleta e concordar em assinar o TCLE. Os participantes foram avisados a não usar cosméticos ou medicamentos por 7 dias antes da análise.

Os critérios de exclusão foram: Tabagismo, diabetes, doença do sistema circulatório, e paciente sob qualquer tipo de tratamento antienvhecimento.

#### 4.2 Local e Método da Coleta

Os estudos foram realizados no laboratório da Dermo Probes - Pesquisa Inovação e Desenvolvimento.

O antebraço volar dos participantes, área sem pêlos, foi demarcado com região de 4 cm<sup>2</sup> e posicionado sobre a janela do espectrômetro Raman. Essa região, o antebraço volar, foi escolhida por ser uma região menos exposta à radiação solar, não conter pêlos, assim com menos parâmetros externos que podem influenciar os resultados.

Os participantes permaneceram em condições ambientais padrão por 30 minutos. A umidade foi mantida em 40-50%, e a temperatura ambiente em 23 ±

2°C. Foi realizada uma (1) medição contínua, de 0 à 70  $\mu\text{m}$  de profundidade de análise, durante 40 minutos, na pele intacta do antebraço. Essa análise com o espectrômetro Raman, não exige nenhum tipo de preparação prévia, ocorrendo de forma não invasiva, e sem riscos ao participante.

Tabela 3- Profundidades das regiões analisadas usando espectroscopia Raman confocal com laser 785 nm.

Regiões analisadas e suas profundidades atingidas pelo laser 785 nm	
Estrato Córneo	0 à 20 $\mu\text{m}$
Epiderme	20 à 60 $\mu\text{m}$

Figura 4- Área demarcada analisada



#### 4.3 Espectroscopia Raman Confocal

Dificuldades de amostragem decorrentes de condições *in vivo* resultam de movimentos do corpo e pele, alterações de batimento cardíaco, que afetam o ponto focal do laser. Para essas interferências de desfocagem, o dispositivo de medição foi estabilizado usando uma configuração invertida.

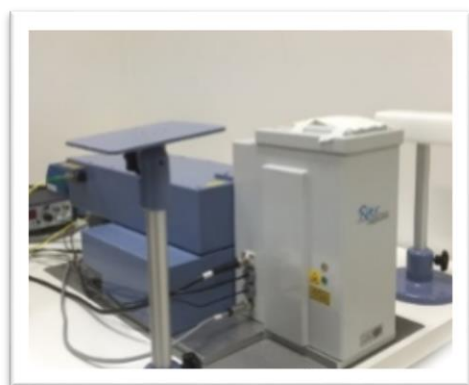
As avaliações *in vivo* da pele foram realizadas usando o aparelho analisador da composição da pele modelo 3510 (*RiverDiagnostics*, Rotterdam, Holanda) com espectrômetro confocal com microscópio invertido e com laser 785 nm polarizado verticalmente.

A dispersão Raman foi detectada usando um resfriamento Peltier (-70°C) com dispositivo detector acoplado a carga e potência na amostra de 20 mW.

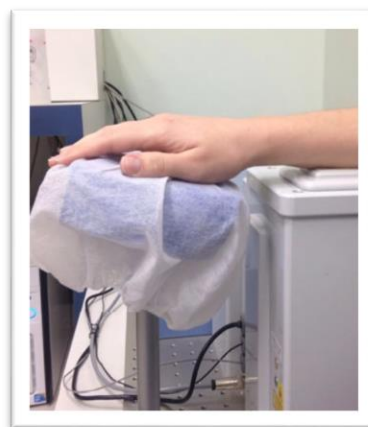
Para cada medida, os espectros foram coletados da superfície da pele, estrato córneo até a profundidade de 20  $\mu\text{m}$ , e a epiderme até a profundidade de 60  $\mu\text{m}$ , usando incremento de 2  $\mu\text{m}$ .

A figura 5 mostra o equipamento Raman Confocal para coleta e o antebraço posicionado na janela do espectrômetro Raman.

Figura 5- (a) Equipamento Raman Confocal River Diagnostics. (b) Antebraço do participante posicionado na janela do espectrômetro Raman.



(a)



(b)

Fonte: (Autora).

O intervalo espectral avaliado foi de 400 à 1800  $\text{cm}^{-1}$ , com tempo de 5 segundos de aquisição, o nível de potência foi mantido em  $20 \pm 2$  mW, valor considerado seguro sem nenhum efeito colateral associado. O sinal Raman foi detectado por meio de um detector CCD, *Charge Coupled Device*, dispositivo de carga acoplada.

#### 4.4 Análise e pré-processamento de dados

Durante as medições usando espectroscopia Raman, ocorre alto nível de fluorescência do tecido biológico, sobrepondo as bandas Raman. Para isso fazem-se necessários pré- processamentos e ajustes iniciais dos dados espectrais (WARTEWIG; NEUBERT, 2005).

O pré-processamento dos dados espectrais, é um procedimento realizado pelo grupo desta pesquisa, o qual estabeleceu esta metodologia como modelo.

Conforme metodologia padrão utilizada por este grupo, e publicada no artigo de Tippavhajhala et al. em 2017, o pré-processamento dos dados foi realizado no

software LabsSpec 5®. Para reduzir os efeitos do ruído, a suavização foi realizada usando um filtro Savitzky Golay. A correção da linha de base foi feita para remover a fluorescência usando uma função polinomial. Posteriormente, os espectros foram normalizados vetorialmente pelo mesmo programa.

#### 4.5 Análise de Constituintes do NMF

Os perfis espectrais dos derivados e componentes do estrato córneo, foram obtidos baseando-se na metodologia de Caspers et al., em 2001, as varreduras Raman *in vivo* do estrato córneo, foram analisadas em um intervalo espectral de 400-1800  $\text{cm}^{-1}$ , até 20  $\mu\text{m}$  abaixo da superfície, com posterior normalização da intensidade espectral, considerando como tempo de coleta de 30 segundos por espectro, utilizando o espectrômetro Raman confocal com microscópio invertido, usando incremento de 2  $\mu\text{m}$ .

Para testar as diferenças dos valores médios de NMF de dois grupos, foi aplicado o teste t de Student pareado, onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Após esta metodologia, os perfis de profundidade dos derivados e componentes principais, foram adquiridos e calculados usando o software SkinTools 2.0 (River Diagnostics, Rotterdam, Holanda).

#### 4.6 Análise Estatística

A árvore hierárquica de grupamentos binários pela análise de cluster, HCA, é um método exploratório, que permite o agrupamento dos dados espectrais médios segundo seu grau de semelhança, a cada conjunto de dados resultante, dá-se o nome de agrupamento ou *cluster* (CHRIT et al., 2005; TFAYLI et al., 2009). Este estudo associado à ERC, permite separar as contribuições dos sinais das diferentes camadas da pele e de seus conteúdos bioquímicos específicos.

O estudo por análise de componentes principais, PCA, é um método exploratório, que permite analisar a discriminação quantitativa entre os grupos, reduzindo dimensionalmente as variáveis dos dados, através de uma análise de covariância entre os diferentes fatores, gerando um novo conjunto de variáveis

chamado de componentes principais (FURUSE, 2006), o que facilita a interpretação no estudo da diferenciação das camadas, assim ele agrupa os dados mais parecidos, e mostra qual foi a fator dominante de agrupamento.

Neste trabalho, para diferenciar os espectros característicos do estrato córneo e da epiderme, a HCA foi realizada usando o software Minitab® para fazer a análise exploratória, e fazer a separação da amostra em diferentes clusters no dendrograma. A distância de Pearson foi usada para os dendrogramas.

A PCA foi realizada para fazer a análise exploratória dos dados, e depois reduzir os componentes de baixa variabilidade dos perfis espectrais Raman, e agrupar os dados em grupos menores com base na variabilidade da amostra. A análise estatística multivariada foi então realizada gerando gráficos de dispersão usando Minitab®, e gráficos de carga usando OriginPro® (OriginLab Corp., Northampton, MA, EUA) para classificar os principais constituintes funcionais.

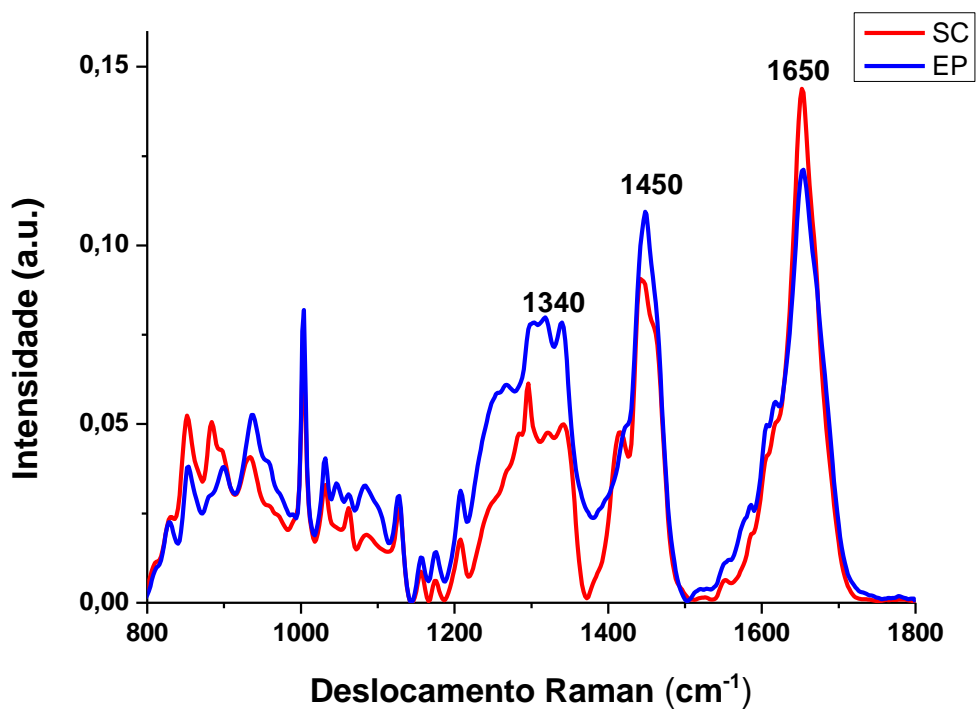
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diferenças espectrais entre estrato córneo e epiderme e sua análise por HCA.

Esta primeira análise, foi realizada considerando apenas as duas camadas estudadas, independentemente da idade do participante.

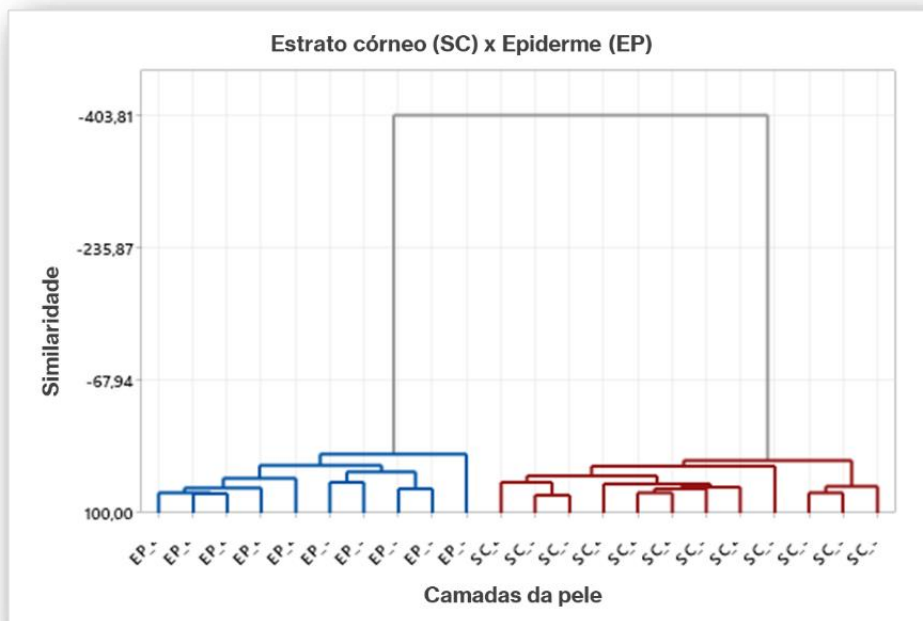
Foram obtidas amostras espectrais das duas camadas.

Figura 6- Amostra espectral das duas camadas estudadas seus picos estudados e suas diferenças.



A análise Raman, gera espectros e também dados numéricos, que podem ser agrupados por características comuns. Sua diferenciação pode ser vista pela separação em dois grupos distintos no dendrograma, devido à presença de moléculas características de cada camada, portanto, amostras semelhantes se agruparam. Nesta análise de dendrograma foram utilizados os mesmos dados do espectro para diferenciação entre SC e EP desconsiderando as idades.

Figura 7- Dendrograma da separação em dois grupos: epiderme (EP) (azul) e o estrato córneo (SC) (vermelho).



A Figura 7 mostra o dendrograma resultante, onde pode ser observada a separação em dois grupos, referentes ao estrato córneo, SC, (vermelho à direita) e epiderme, EP, (azul à esquerda).

Na figura 7, pode-se observar que houve pequena distância entre as amostras de mesma cor, o que nos leva a inferir que elas são semelhantes. No entanto, ao observar a distância entre os grupos SC e EP, houve maior distância, o que reflete a diferença entre eles. Isso ocorre devido ao tipo biofísico presente em cada camada.

O SC é a camada mais superficial da epiderme. Suas células não possuem mais núcleo ou organelas, os corneócitos (HARRIS, 2003). A membrana celular é espessa, e sua superfície externa é recoberta por glicolipídeos, o interior das células é preenchido com queratina (HARRIS, 2003).

Na EP, existem outros tipos de células, os queratinócitos, com núcleo central e citoplasma repleto de corpos lamelares, e grânulos de queratohialina, onde contém filagrina, para formação do NMF.

Os grânulos de queratohialina são responsáveis por agregar a queratina, e outras proteínas simples e reticuladas, nas camadas mais superficiais de pele. Os

corpos lamelares, presentes entre os queratinócitos, contém glicolípídeos, que são secretados na superfície das células, formando a matriz lamelar lipídica, e mantendo-as unidas (HARRIS, 2003), sendo importante para homeostasia e manutenção da permeabilidade cutânea (SOUSA, 2017).

As figuras 6 e 7 mostram essas distinções primárias pelas diferenças entre as intensidades espectrais e os agrupamentos por características semelhantes. Esses resultados podem também ser atribuídos às diferenças nos arranjos e funções celulares, enquanto que o SC e a EP tem células semelhantes, como a queratina e os glicolípídeos, mas que, dependendo da camada em que estão, apresentam diferença em sua conformação e arranjo.

## 5.2 Análise dos dados espectrais Raman

A análise espectral Raman pode compreender diversas frequências, abrangendo o total de 200 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

No presente trabalho, a região analisada foi a região de *finger print*, conhecida como região da impressão digital, que compreende 400–1800  $\text{cm}^{-1}$ , nesta região estão as principais biomoléculas funcionais da pele que podem ser caracterizadas e analisadas para ambas as camadas.

Os espectros médios do estrato córneo e da epiderme, considerando as faixas etárias dos grupos I e II, são apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Figura 8- Espectros Raman médios do SC. A linha azul corresponde ao grupo I (mais jovem) e a linha vermelha representa o grupo II (mais velho).

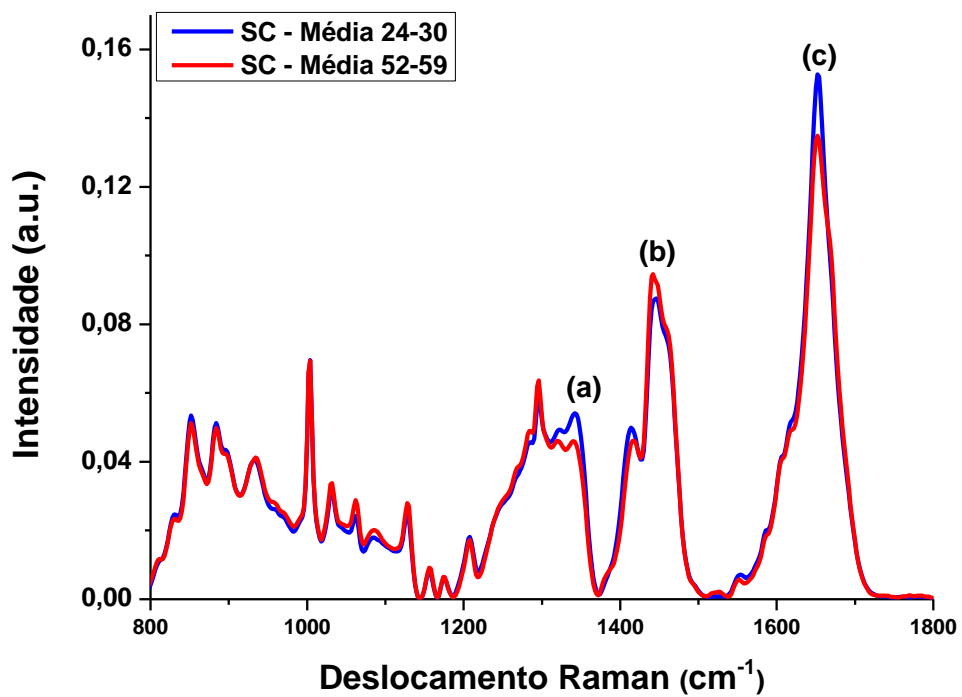
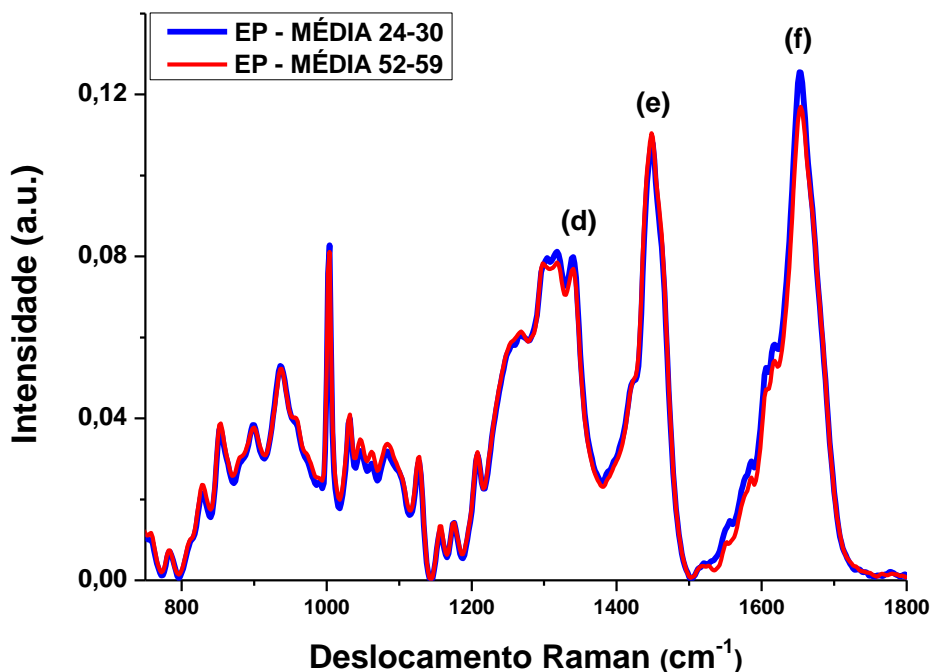


Figura 9- Espectros Raman médios da EP. A linha azul corresponde ao grupo I (mais jovem) e a linha vermelha representa o grupo II (mais velho).



As figuras 8 e 9 mostram que os espectros Raman apresentados compreendem valores médios obtidos para cada camada e faixa etária analisada.

Primeiro foram obtidos os espectros de cada camada, epiderme e estrato córneo, separadamente, após foram identificados os principais picos referentes as biomoléculas características de cada camada.

As principais diferenças no estrato córneo podem ser observadas no pico de intensidade das bandas em 1340 (amida III), 1438-1450 (lipídios), e 1650  $\text{cm}^{-1}$  (amida I), correspondendo a (a,b,c), respectivamente. Nos espectros da epiderme, as diferenças ocorrem em 1340 (amida III), 1450 (lipídios) e 1650  $\text{cm}^{-1}$ , (amida I) correspondendo a (d,e,f), respectivamente.

Na figura 8, o pico 1343  $\text{cm}^{-1}$  e o pico 1650  $\text{cm}^{-1}$  do SC se apresenta intensificado para o grupo I e diminuído no grupo II.

Na figura 10, o pico 1343  $\text{cm}^{-1}$  e o pico 1650  $\text{cm}^{-1}$  do SC se apresenta intensificado para o grupo I e diminuído no grupo II.

Nas figuras 8 e 9, em ambos espectros, os picos em  $1340\text{ cm}^{-1}$ , mostrado em (a) e (d), estão associados à ceramida hidratada em sua conformação  $\alpha$ -hélice (CORDECH et al., 2003; PEZZOTI et al., 2015; OHNARI et al., 2023). O pico em (a) apresentou maior intensidade do que (d), pois estes são referentes a presença de ceramidas, e estas são os principais lipídios do SC, assim o sinal foi maior para esta camada (FOSTER et al., 2011).

As ceramidas de peles mais jovens apresentaram o sinal aumentado para o grupo mais jovem, devido a menor degradação dos desmossomos com maior adesão dos corneócitos com as ceramidas, ocorrendo a diminuição do sinal Raman nas ceramidas livres para o grupo mais velho.

Em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , destacados em (c) e (f), estão ligados à queratina em sua conformação  $\alpha$ -hélice. A intensidade aumentada para o grupo I, pode indicar uma função de barreira da pele mais saudável. Uma das principais razões para isso, é que fatores ambientais, podem afetar os constituintes da conformação  $\alpha$ -hélice, relacionados à hidratação da pele, principalmente em regiões mais expostas à radiação UV (CORDECH et al., 2003; PEZZOTI et al., 2015).

Assim, como o grupo II foi mais exposto à radiação UV ao longo da vida, é plausível que sua função de barreira cutânea seja mais afetada, do que as do grupo I.

Conforme também observou Rygula et al., em 2013, e Cárcamo et al., em 2012, os dados mostram diferença de intensidade significativa entre as bandas de amida I ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) e III ( $1340\text{ cm}^{-1}$ ), sendo esta última menos intensa que a amida I.

Nas figuras 8 e 9, a banda em  $1438\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ , fornece informações sobre a quantidade de lipídios totais no estrato córneo e epiderme (TFAYLI et al., 2012; CHOE et al., 2019), conforme verificado na distinção entre as linhas azul e vermelha em (b) e (e).

Na pele jovem, os lipídeos presentes na composição do SC, formam estruturas lamelares intercelulares, ICL, capazes de reter água, mantendo a superfície da pele com aparência saudável e macia (LEONARDI, 2005). Porém sua organização lamelar se altera conforme faixa etária. Os resultados correspondentes, são evidentes neste estudo, conforme mostrado na figura 9, no ponto (b), que resultou em um sinal Raman elevado no SC para o grupo mais velho.

Apesar do estrato córneo ter menos conteúdo lipídico total do que a epiderme, a composição de ácidos graxos e colesterol permanece consistente com o envelhecimento (CORDECH et al., 2003), o que também é evidente nos presentes resultados, com a menor mudança observada para este pico em  $1450\text{ cm}^{-1}$ , em comparação aos demais picos, o que foi observado com a diferença entre as linhas azul e vermelha, visto em (b) na figura 8, em (e) na figura 9.

Outro estudo mostrou que, os raios UV, afetam negativamente os lipídeos intercelulares, e a adesão dos corneócitos, levando à diminuição da integridade da pele, diminuindo a função de barreira do SC (BINIEK et al., 2012), sendo a exposição à radiação UV, um contribuidor significativo para o envelhecimento, exarcebando seus efeitos intrínsecos.

Nas figuras 8 em (c) e 9 em (f), o pico em  $1655\text{ cm}^{-1}$  é caracterizado pela amida I, é a banda mais forte na região da impressão digital do estrato córneo (CHOE et al., 2019). Ela se origina principalmente da queratina, com uma contribuição muito pequena dos lipídios e água (CZAMARA et al., 2015). Sua intensidade está relacionada à conformação  $\alpha$ -hélice da queratina. Essa estrutura atua como um suporte protéico para a fixação de proteínas e lipídios do envelope cornificado que, juntos, formam o estrato córneo (SANDILANDS et al., 2009).

A adesão entre os queratinócitos e corneócitos na superfície ocorre pela presença de estruturas de ancoragem, os desmossomos. O modelo teórico, “tijolo e cimento”, normalmente é usado para ilustrar essa estrutura. Os tijolos representam os queratinócitos, envelopados e queratinizados. O cimento corresponde à membrana lipídica intercelular que mantém os queratinócitos unidos (MARKS & MILLER, 2017).

Binieck et al., em 2015, descobriram que o aumento da reticulação, ou ligação cruzada, dos filamentos de queratina dentro dos corneócitos com a idade, é um possível contribuinte para o aumento da rigidez da pele. O SC é regularmente exposto à agressões oxidativas, e há um aumento de gradiente na oxidação da queratina, com significativamente mais grupos carbonila presentes no estrato córneo do que na epiderme. Isso predispõe a queratina à reticulação, o que diminui o sinal Raman no grupo mais velho, conforme mostrado nas figuras 8 em (c), 9 em (f). Acredita-se que isso seja responsável pela perda de elasticidade da pele com a idade (BAILEY et al., 2001; JEANMAIRE et al., 2001).

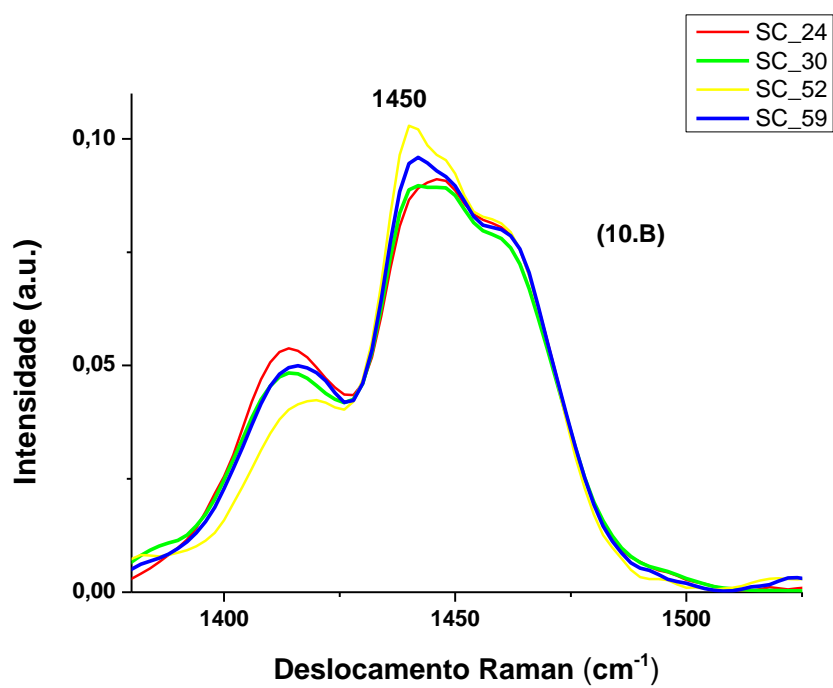
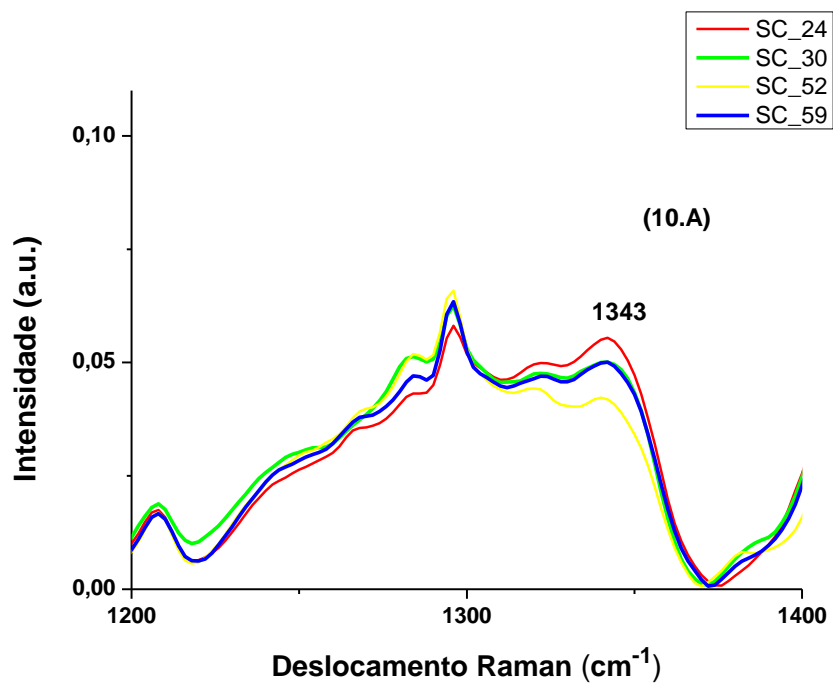
A indução dessas alterações, também ocorrem em dependência do tempo de exposição ao UV, afetando degradação de filagrina e a textura superficial dos corneócitos composta de filamentos de queratina (BINIEK et al. 2012). Regiões mais expostas à radiação UV, e a poluição ambiental são influentes sobre os constituintes em conformação  $\alpha$ -hélice, ceramida hidratada e queratina (CORDECH et al., 2003; CHEN et al., 2010).

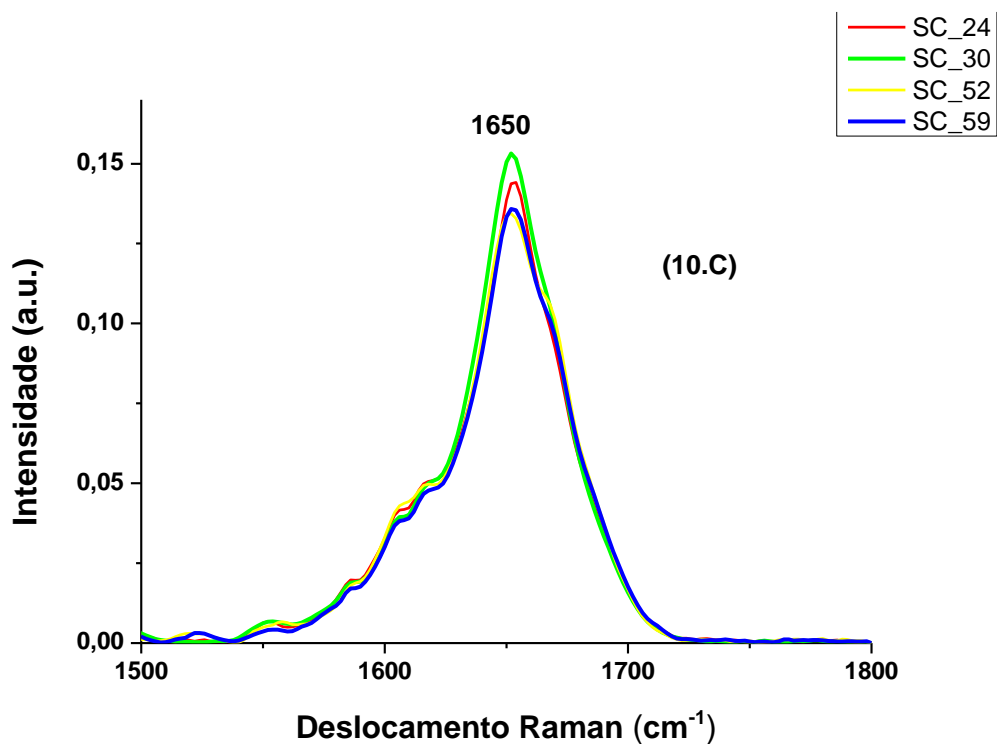
Essas diferenças espectrais são descritas na tabela abaixo.

Tabela 4 - Variações significativas no estrato córneo e na epiderme e seus picos correspondentes.

Estrato Córneo	Pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação Vibracional	Epiderme	Pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação Vibracional
(a)	1340	Amida III Ceramida hidratada $\alpha$ -hélice	(d)	1340	Amida III Ceramida hidratada $\alpha$ -hélice
(b)	1450	Lipídios	(e)	1450	Lipídios
(c)	1650	Amida I Queratina $\alpha$ - hélice	(f)	1650	Amida I Queratina $\alpha$ - hélice

Figura 10- Picos em  $1343 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1450 \text{ cm}^{-1}$  e  $1650 \text{ cm}^{-1}$  dos espectros Raman do SC para médias das 4 idades extremas, 24,30,52,59 divididas em grupo I (24 e 30) e o grupo II (52 e 59), figuras (10.A), (10.B) e (10.C) respectivamente.





Os espectros (10.A) e (10.C) em 1343 e 1650  $\text{cm}^{-1}$ , ceramida e queratina em  $\alpha$ -hélice, demonstram maior intensidade para idades 24 e 30, e intensidade diminuída para idades 52 e 59 no SC. O oposto foi observado para o espectro (10.B), em 1450  $\text{cm}^{-1}$ , lipídios, em que o sinal se apresentou intensificado para as idades 52 e 59.

Tabela 5- Identificação dos modos vibracionais e sua correlação com os sinais Raman no SC e EP.

Pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação Vibracional	Estrato Córneo e Epiderme	
		Idades 24-30 (Grupo I)	Idades 52-59 (Grupo II)
		Sinal Raman	
1349	Amida III Ceramida hidratada $\alpha$ -hélice	Aumentado	Diminuído
1438/1450	Lipídios	Diminuído	Aumentado
1650	Amida I Queratina hidratada $\alpha$ -hélice	Aumentado	Diminuído

A banda em  $1438\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ , fornece informações sobre a quantidade total de lipídios no estrato córneo e epiderme (TFAYLI et al., 2012; CHOE et al., 2019), conforme verificado na distinção entre as faixas etárias em (10.B). Embora esses resultados estejam de acordo com o envelhecimento, pesquisas conduzidas por outros autores também mostraram a diminuição do conteúdo lipídico em peles mais velhas, com arranjos alterados de organização lipídica (BOIREAU-ADAMEZYK et al., 2014a), bem como a regulação de água, outro importante fator ligado à função de barreira da pele (OHNARI et al., 2023; BOIREAU-ADAMEZYK et al., 2014a; LADEMANN et al., 2012).

A alteração da permeabilidade, é mais significativa nas fases lipídicas desordenadas, em comparação com as fases ordenadas (CORDECH et al., 2003; BOUWSTRA et al., 2006), o que foi demonstrado pelo sinal Raman na figura (10.B) com sua diminuição devido a desordenação lipídica, e a epiderme envelhecida é anormalmente permeável a uma variedade de drogas em sistemas *in vitro* (CORDECH et al., 2003).

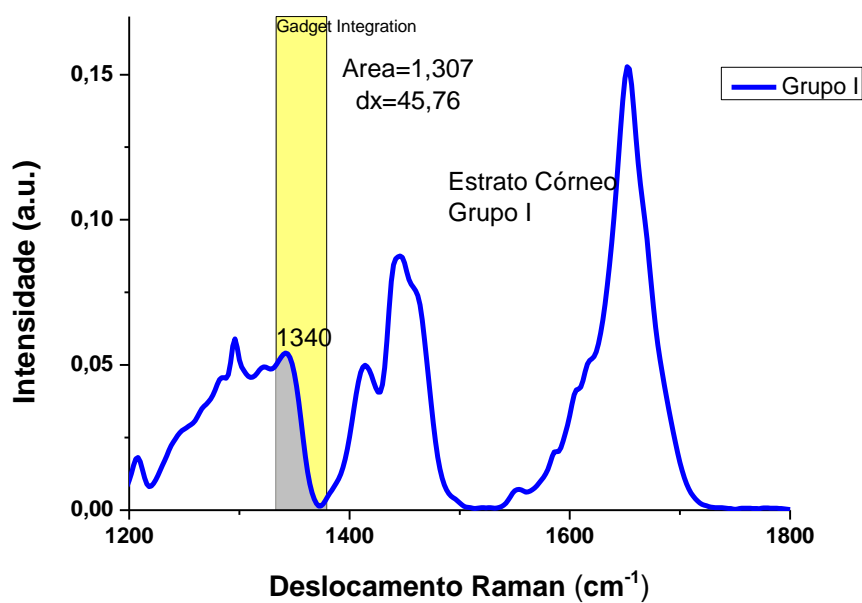
5.3 Cálculo de área sob a curva e largura total a meia altura dos picos do estrato córneo para os grupo I (24-30) e II (52-59).

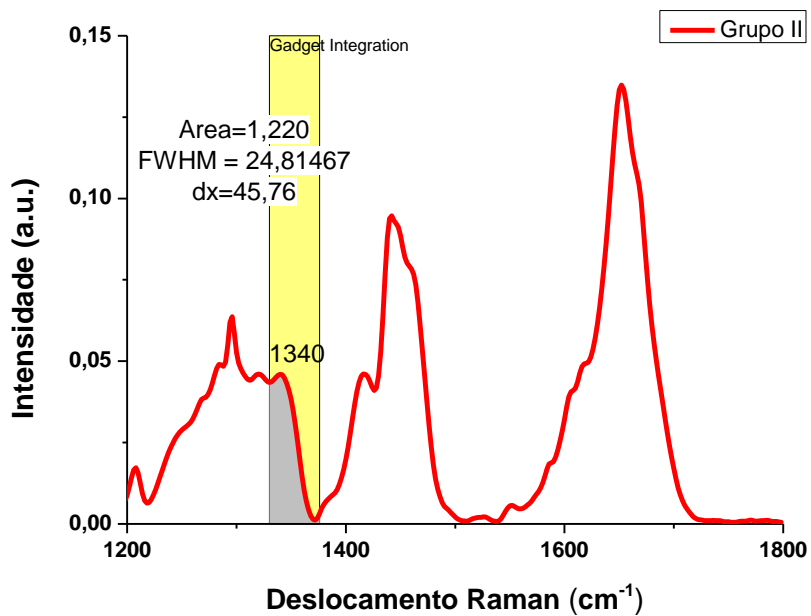
O valor da largura a meia altura, que é referida como FWHM, *full width at half maximum*, é um parâmetro da curva, onde a largura da curva é dada pela diferença entre dois valores extremos na qual a função atinge a metade de seu valor. Ela pode ser utilizada para medida da largura espectral.

O diâmetro mínimo do feixe de laser na superfície da amostra é dado como a largura a meia altura, FWHM.

O método baseado na função gaussiana é uma ferramenta que permite obter informações sobre FWHM dos picos, a posição e sua intensidade.

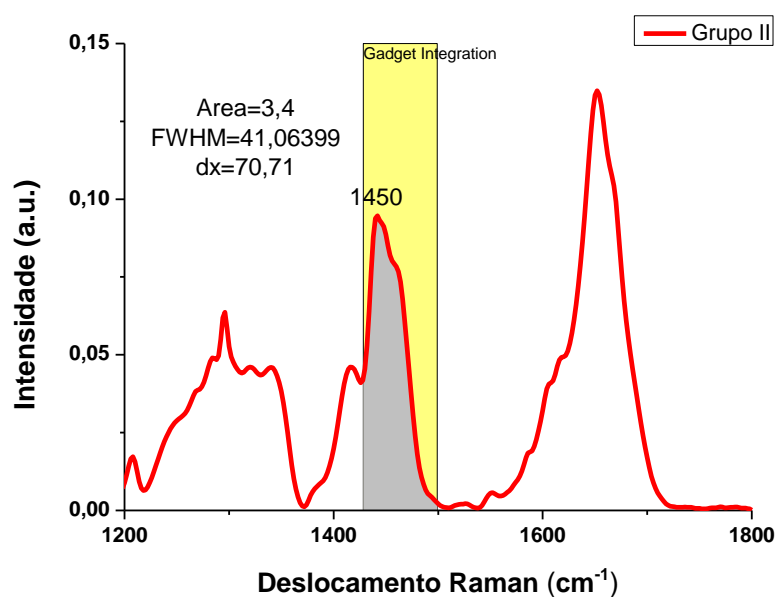
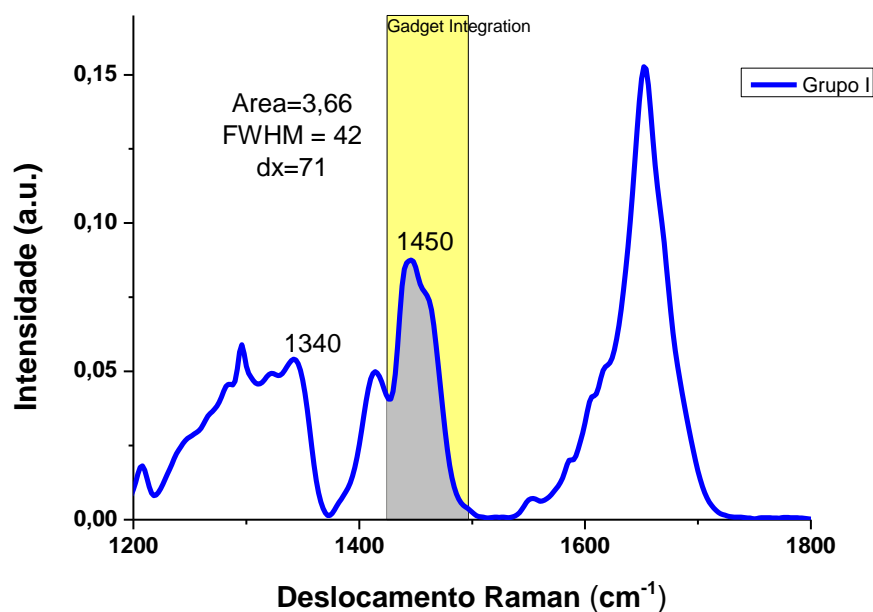
Figura 11- Espectros do SC com área sob a curva e largura meia altura do pico 1340  $\text{cm}^{-1}$  para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura.





A posição e largura do pico são dependentes das propriedades cristalográficas da ceramida no SC (CHOE et al., 2015).

Figura 12- Espectros do SC com área sob a curva e largura meia altura do pico 1450 cm<sup>-1</sup> para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura.

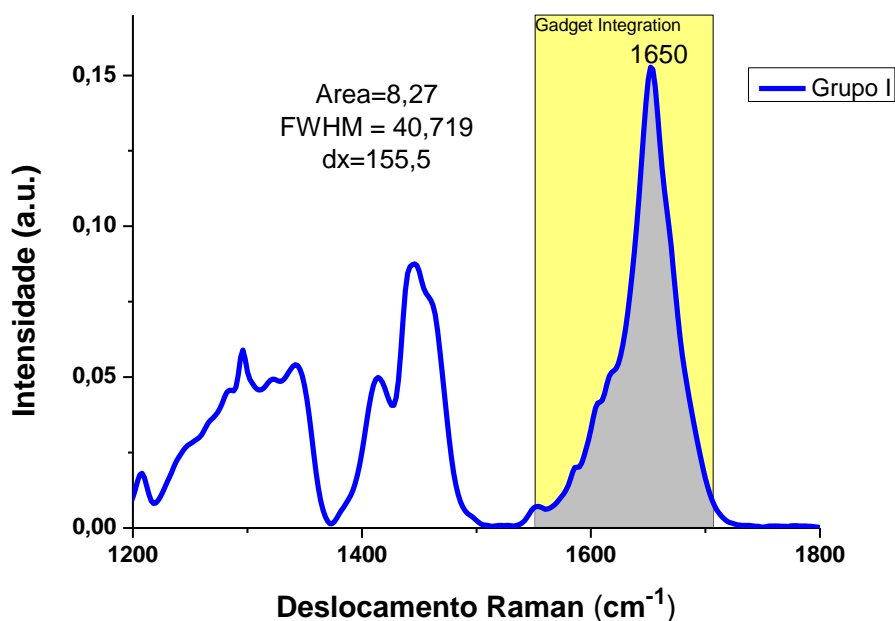


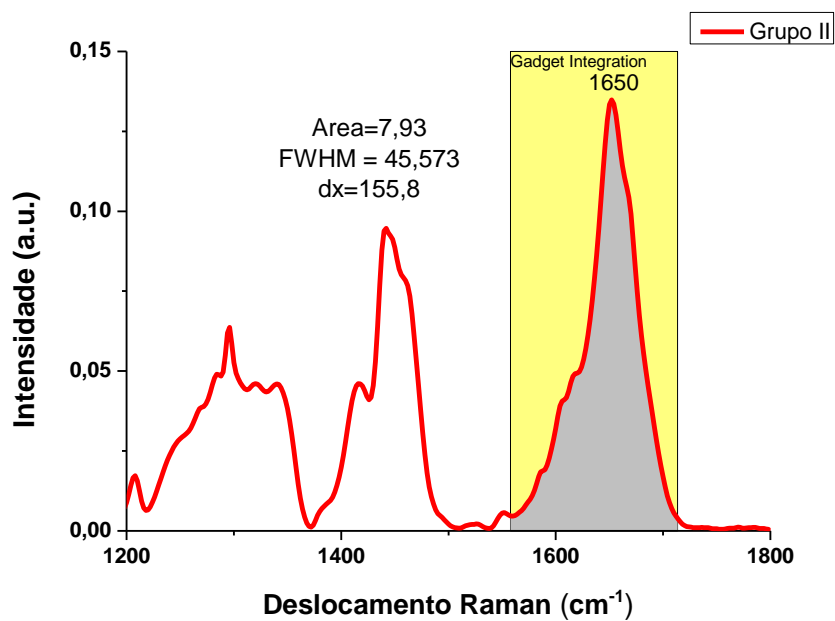
Qualquer alteração físico-química dos lipídios no SC causada por qualquer fator externo ou interno se refletirá na forma e intensidade do pico de lipídeo (CHOE et al., 2015). A posição e largura do pico são dependentes das propriedades cristalográficas dos lipídios do SC (CHOE et al., 2015).

O presente estudo apresentou FWHM de 40 cm<sup>-1</sup> para os lipídeos do estrato córneo. Liu e Lunter em 2020, obtiveram o mesmo resultado para o FWHM do pico

de lipídeos do estrato córneo, eles observaram que este em  $40\text{ cm}^{-1}$ , apresentou boa sensibilidade de caracterização (LIU;LUNTER, 2020). Assim as presentes análises realizadas neste trabalho, complementam esses resultados obtidos, de forma a discriminar o comportamento lipídico entre as camadas e entre os grupos etários.

Figura 13- Espectros do SC com valores de area sob a curva e largura meia altura do pico  $1650\text{ cm}^{-1}$  para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura.

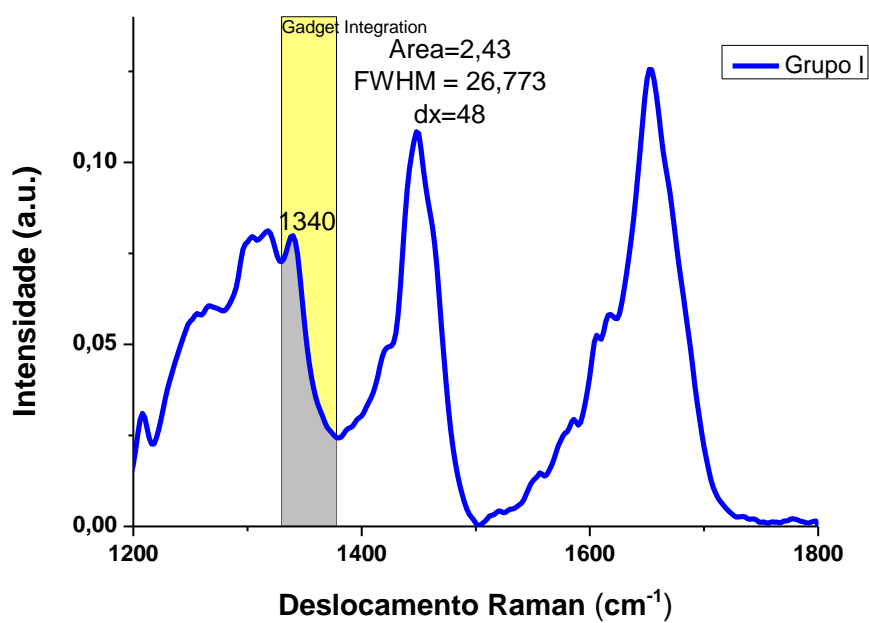




A posição e largura do pico são dependentes das propriedades cristalográficas da queratina do SC (CHOE et al., 2015).

5.4 Cálculo de área sob a curva e largura meia altura dos picos da epiderme para os grupo I (24-30) e II (52-59).

Figura 14- Espectros da EP com área sob a curva e largura meia altura do pico  $1340\text{ cm}^{-1}$  para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura.



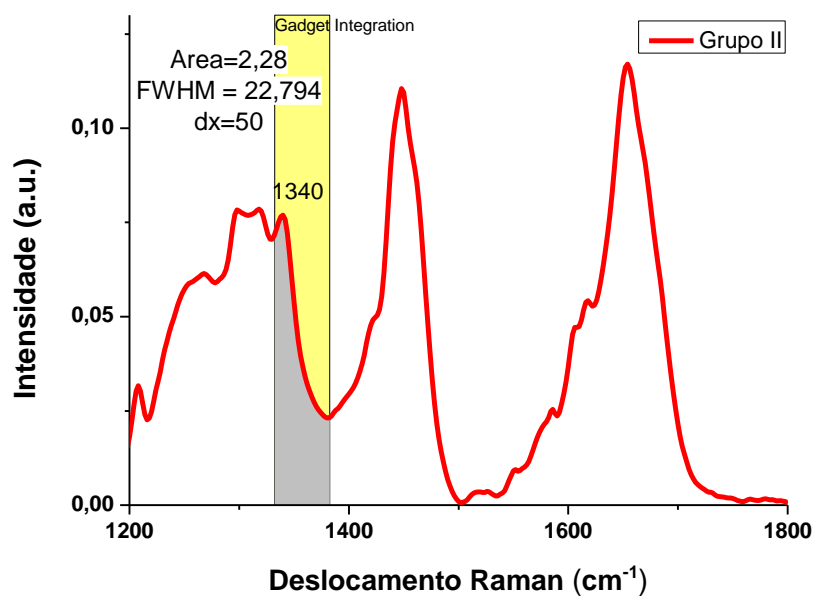


Figura 15- Espectros da EP com área sob a curva e largura meia altura do pico  $1450 \text{ cm}^{-1}$  para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura.

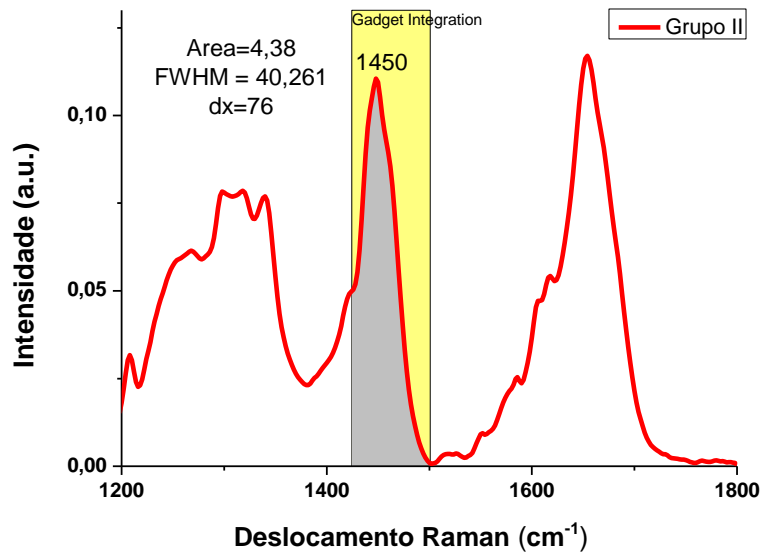
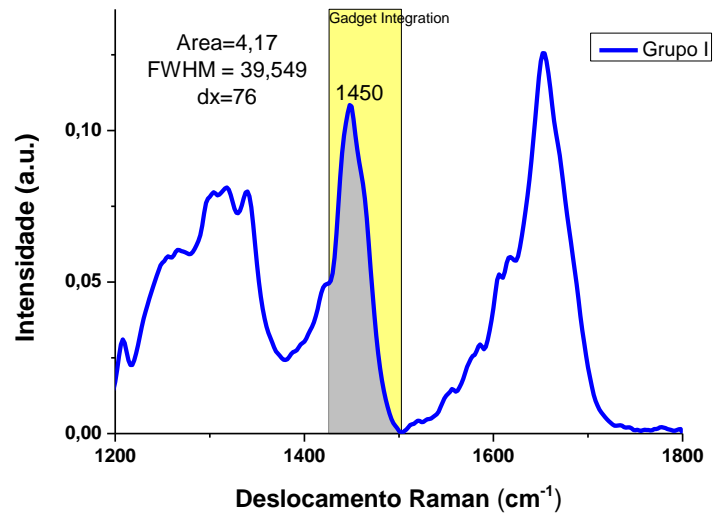
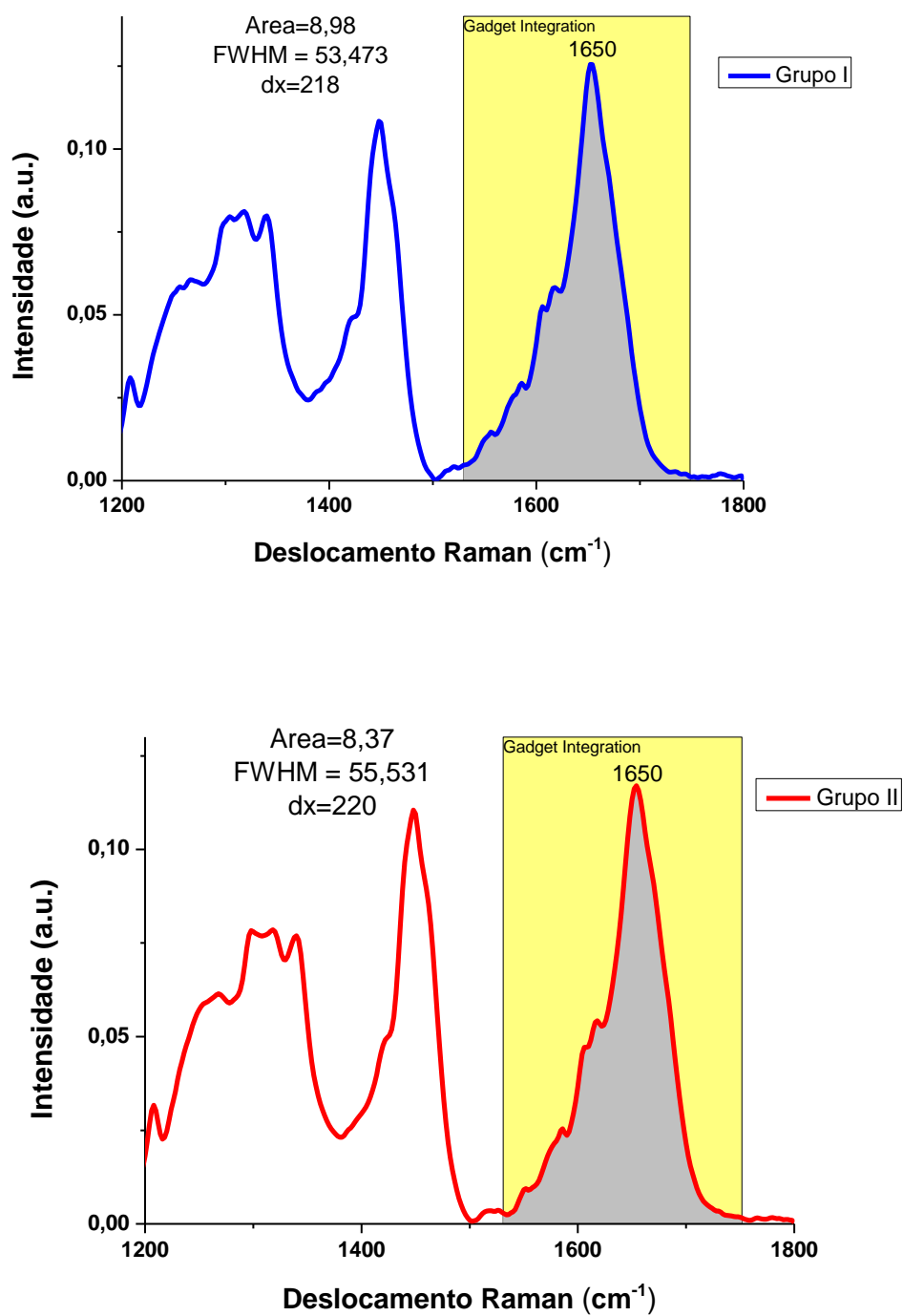


Figura 16- Espectros da EP com área sob a curva e largura meia altura do pico 1650  $\text{cm}^{-1}$  para grupo I e II. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva e largura a meia altura.



Abaixo a tabela com os valores de área sob a curva e largura meia altura para todos os picos das duas camadas e para as duas faixas etárias.

Tabela 6- Valores de área sob a curva e FWHM para estrato córneo e epiderme de ambos grupos.

Estrato Córneo						
Grupos	Grupo I (24-30)			Grupo II (52-59)		
Pico (cm <sup>-1</sup> )	1340	1450	1650	1340	1450	1650
Área	1,30	3,66	8,27	1,22	3,4	7,93
FWHM	23,21	42	40,71	24,81	41,06	45,57
Epiderme						
Área	2,43	4,77	8,98	2,28	4,38	8,37
FWHM	26,77	39,54	53,47	22,79	40,26	55,53

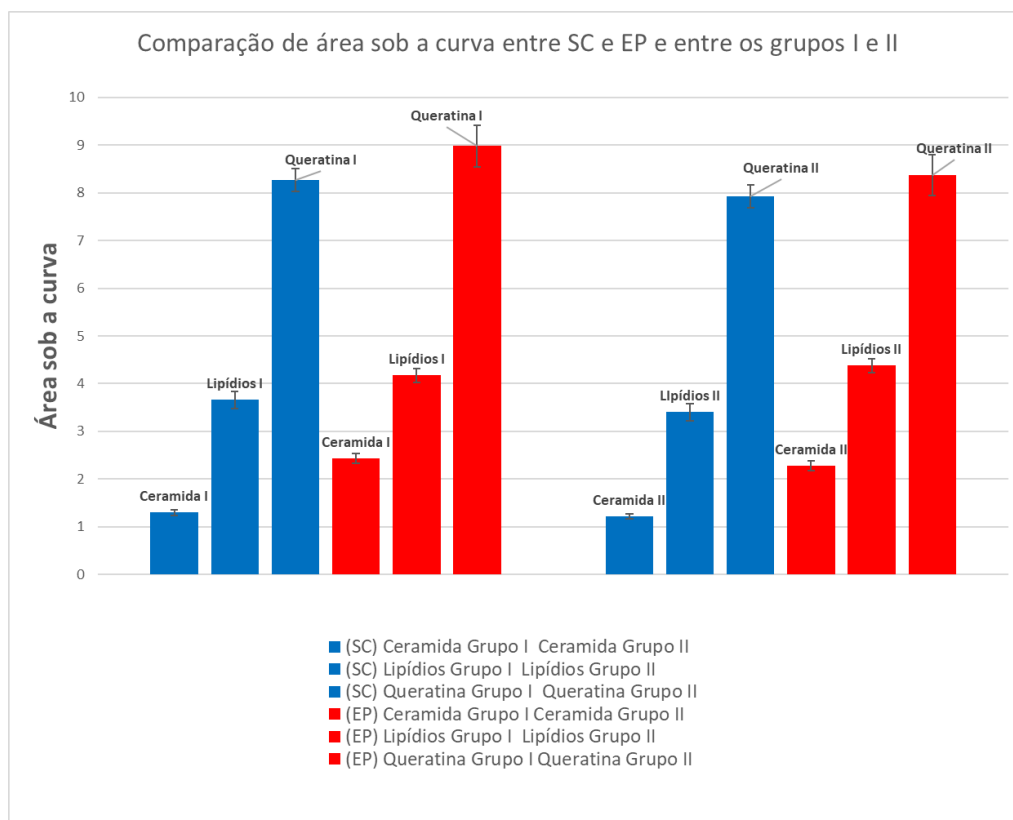
Nas figuras 11 a 16, pode-se observar que a área sob a curva, foi maior para o grupo I e menor para o grupo II de ambas camadas para os constituintes  $\alpha$ -hélice ceramida (1340 cm<sup>-1</sup>) e queratina (1650 cm<sup>-1</sup>) e para os lipídeos (1450 cm<sup>-1</sup>) do estrato córneo.

Resultado oposto foi observado apenas para o pico de lipídeos (1450 cm<sup>-1</sup>), da epiderme, onde o grupo I apresentou área menor que o grupo II.

Uma das razões para estes resultados de área, é que com a idade, os constituintes da conformação  $\alpha$ -hélice são afetados, relacionados à hidratação da pele diminuindo o sinal Raman e a conseqüente área para o grupo mais velho (CORDECH et al., 2003; PEZZOTI et al., 2015).

Tabela 7- Comparação da área sob a curva dos picos analisados entre grupos I e II em ambas as camadas.

Pico (cm <sup>-1</sup> )	Identificação Vibracional	Valor de área sob a curva			
		Idade 24 a 30 (Grupo I)	Idade 52 a 59 (Grupo II)	Idades 24 a 30 (Grupo I)	Idade 52 a 59 (Grupo II)
		Estrato Córneo	Estrato Córneo	Epiderme	Epiderme
1340	(Amida III) Ceramida hidratada $\alpha$ -hélice	Maior	Menor	Maior	Menor
1438/1450	Lipídios	Maior	Menor	Menor	Maior
1650	(Amida I) Queratina hidratada $\alpha$ -hélice	Maior	Menor	Maior	Menor



Esses resultados se mostram em concordância com os resultados anteriormente apresentados, pois o valor da área sob a curva, reflete o sinal de maior ou menor intensidade, considerando o mesmo eixo dx usado para cada pico.

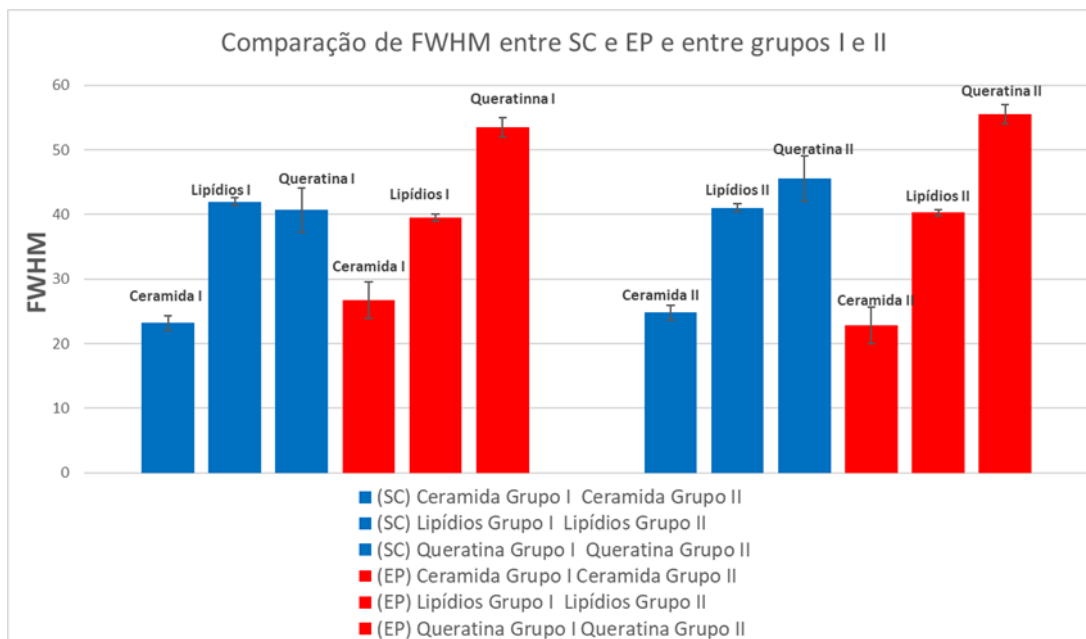
Em relação ao pico de lipídeos (1450 cm<sup>-1</sup>), ocorreu pouca variação no estrato córneo e epiderme, o que pode ter ocorrido devido a síntese e liberação de lipídeos na EP, e sua deposição no SC, ocorre de forma contínua (TFAYLI et al., 2012;

CHOE et al., 2019; LEONARDI, 2005), também a composição de ácidos graxos e colesterol exibe uma consistência com menor variação, o que influenciou na intensidade para o pico de lipídios, e como consequência sua área (CORDECH et al, 2003).

Para o pico de queratina, ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) há um aumento do gradiente de oxidação da queratina com o tempo, isso predispõe a queratina à reticulação, o que diminui o sinal Raman no grupo mais velho, grupo II, para ambas as camadas, e como consequência a sua área. Além disso, a queratina é a banda mais forte na região da impressão digital do estrato córneo e epiderme, o que aumentou seu valor de área em relação aos demais (CHOE et al., 2019).

Tabela 8- Comparação dos valores de FWHM entre grupos I e II dos picos analisados em ambas as camadas.

Pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação Vibracional	Valor de área sob a curva			
		Idade 24 a 30 (Grupo I)	Idade 52 a 59 (Grupo II)	Idades 24 a 30 (Grupo I)	Idade 52 a 59 (Grupo II)
		Estrato Córneo	Estrato Córneo	Epiderme	Epiderme
1340	(Amida III) Ceramida hidratada $\alpha$ -hélice	Menor	Maior	Maior	Menor
1438/1450	Lipídios	Maior	Menor	Menor	Maior
1650	(Amida I) Queratina hidratada $\alpha$ -hélice	Menor	Maior	Menor	Maior



Nos resultados de FWHM do SC, em 1650 queratina  $\alpha$ -hélice, foi maior no grupo II e menor no grupo I. Esses resultados são opostos aos resultados anteriores de intensidade e área sob a curva do SC.

Nos resultados de FWHM da EP, o valor em  $1450\text{ cm}^{-1}$ , lipídios, e  $1650\text{ cm}^{-1}$ , queratina foram menores para o grupo I e maiores para o grupo II, em oposição aos resultados anteriores de intensidade e área sob a curva. Para o pico de  $1340\text{ cm}^{-1}$  o resultado ocorreu oposto, sendo maior para o grupo I em concordância aos resultados anteriores de intensidade e área.

Conforme visto nas figuras 11 a 16 e nas tabelas 6 e 8, houve tendência de aumento dos valores de FWHM para o grupo II, com exceção da ceramida na epiderme e lipídeos no estrato córneo.

Quando a luz incide sobre o material a ser analisado, uma fração desta é refletida e a outra é transmitida. Parte desta radiação pode ser absorvida, espalhada e o restante passa através da amostra. Parte das ondas absorvidas podem ser dissipadas e re-emitidas com frequências diferentes, levando a diferentes larguras no espectro, dependendo da cadeia estrutural do meio que está sendo analisado (CARRASCO, 2005).

Segundo observou Hofelmann em 2013, considerando as propriedades físicas do Raman, o valor de largura a meia altura, FWHM, de suas bandas, é sensível à

desordem estrutural e arranjos moleculares e das cadeias, do meio que está sendo irradiado, provocando alteração em seu espalhamento.

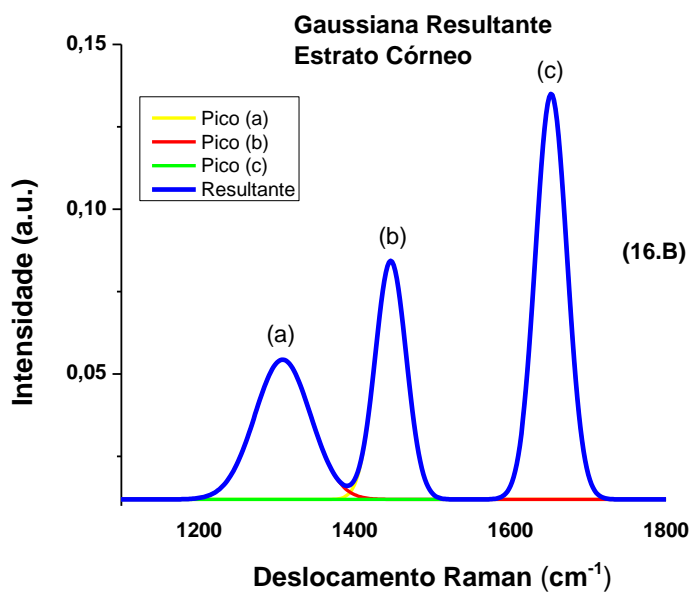
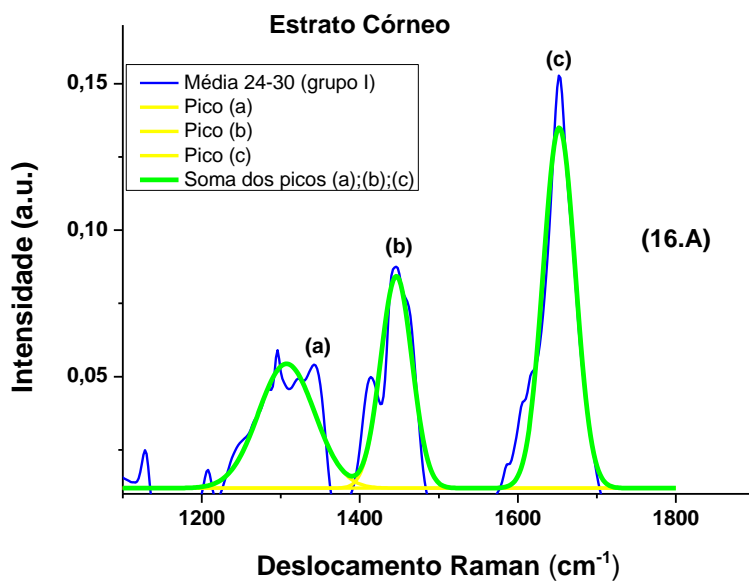
Segundo Machado em 2007, em sua propriedade física, o valor de FWHM, está diretamente relacionado pela perturbação, ou interferência nas frequências das ondas Raman, ao entrarem em contato com o meio analisado. As imperfeições do meio analisado, levam ao alargamento da banda, provocado pela alteração de seu espalhamento.

Ocaris em 2019, ao utilizar espectroscopia Raman na análise de compostos de silício em biomassa, observou que o estreitamento da largura das bandas sugere o arranjo estrutural ou ordenamento nas estruturas analisadas.

O modelo teórico tijolo-cimento, ilustra a estrutura da epiderme, já explicado anteriormente. Essa estrutura ao ser danificada, por fatores ambientais, a radiação UV, ou etários, gera defeitos e desordem em sua estrutura. Isso pode ter provocado maiores valores de FWHM para o grupo II.

5.5 Comparação entre as curvas gaussianas e seus coeficientes de correlação dos espectros do estrato córneo e epiderme para os grupos I (24-30) e grupo II (52-59).

Figura 16- Curva gaussiana do estrato córneo de cada pico (a) em  $1340\text{ cm}^{-1}$ ; (b)  $1450\text{ cm}^{-1}$ ; (c)  $1650\text{ cm}^{-1}$  do grupo I (16.A), gaussiana resultante do grupo I (16.B), e curva de ajuste do coeficiente de correlação de Pearson do grupo I (16.C).



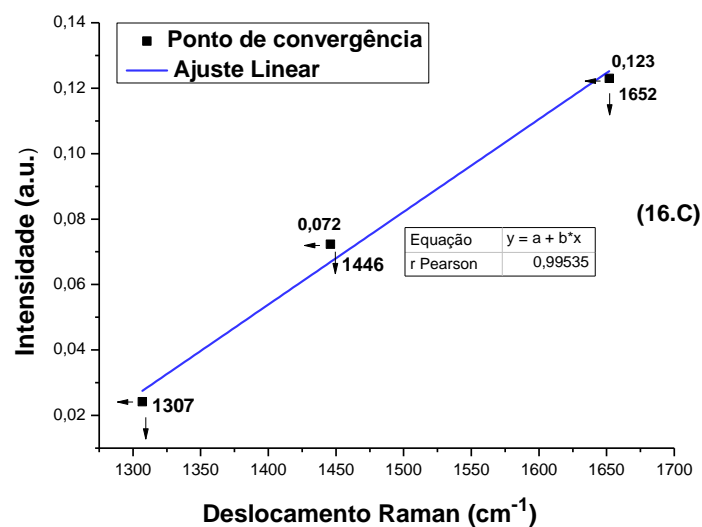
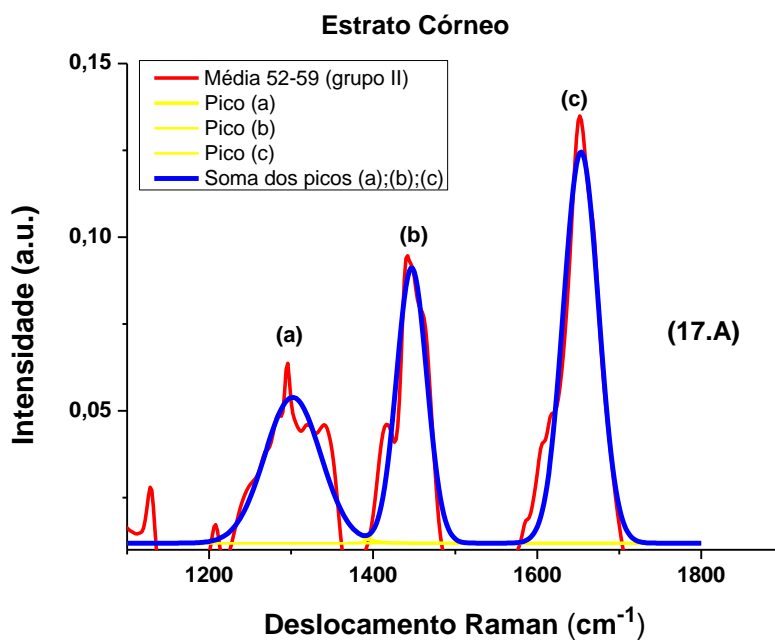


Figura 17- Curva gaussiana do estrato córneo de cada pico (a) em  $1340 \text{ cm}^{-1}$ ; (b)  $1450 \text{ cm}^{-1}$ ; (c)  $1650 \text{ cm}^{-1}$  do grupo II (17.A), e gaussiana resultante do grupo II (17.B), e curva de ajuste do coeficiente de correlação de Pearson do grupo II (17.C).



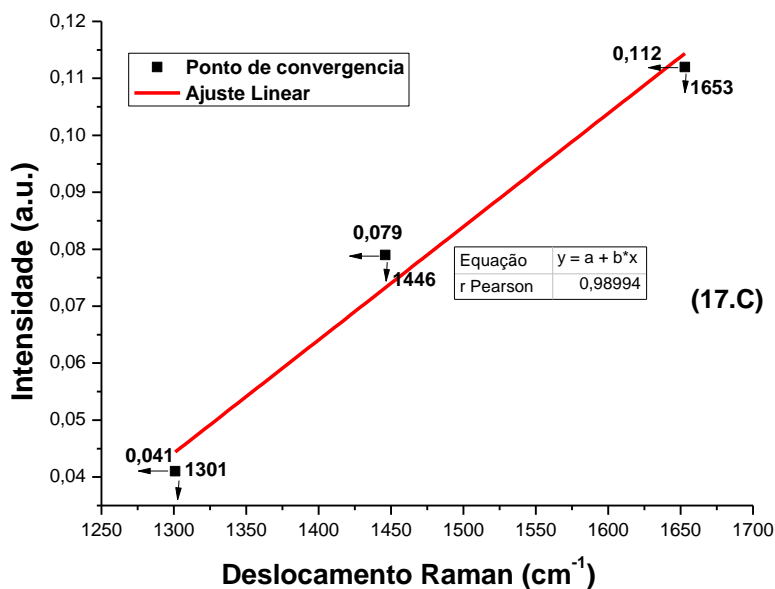
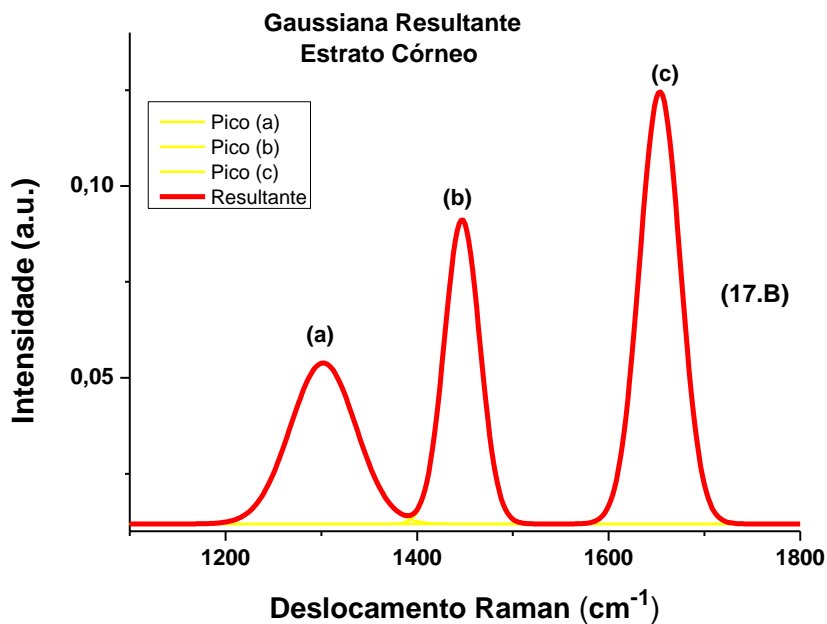
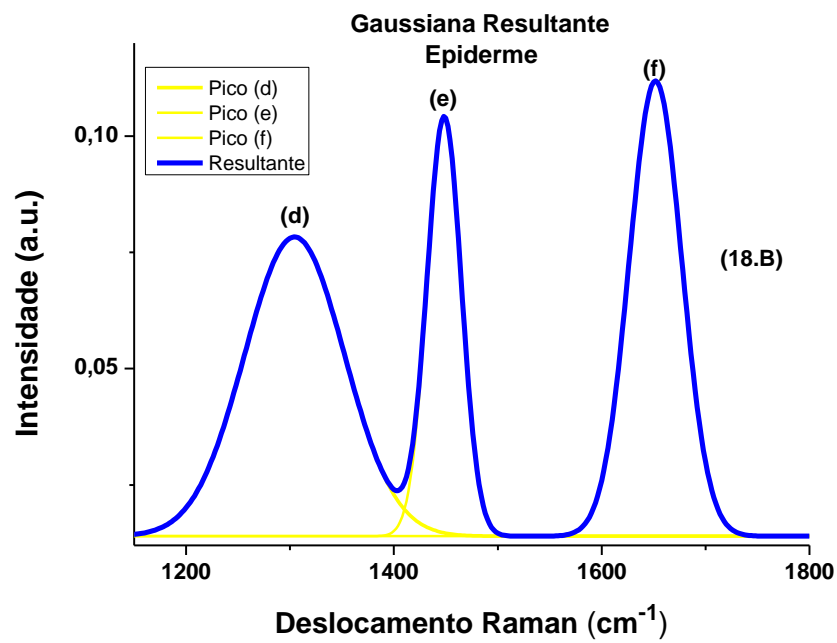
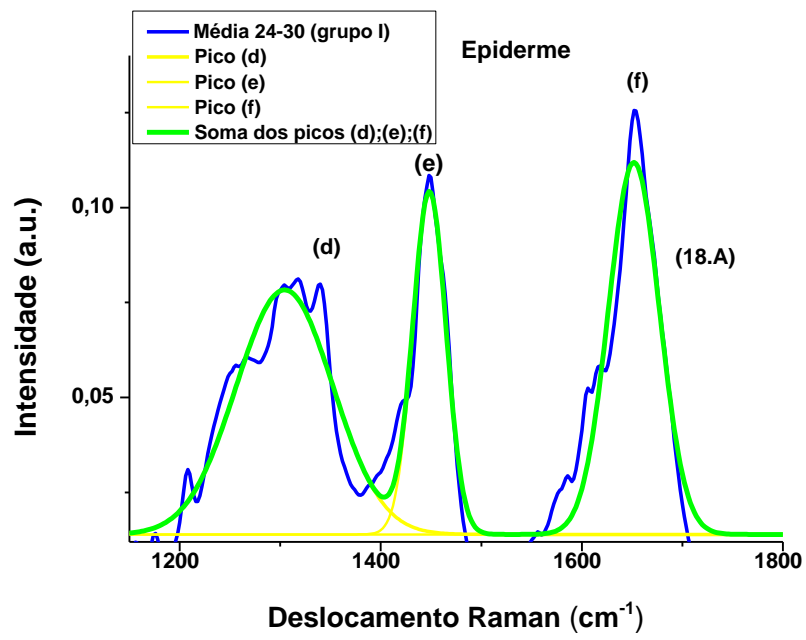


Figura 18- Curva gaussiana da epiderme de cada pico (d) em  $1340 \text{ cm}^{-1}$ ; (e)  $1450 \text{ cm}^{-1}$ ; (f)  $1650 \text{ cm}^{-1}$  do grupo I (18.A), e curva gaussiana resultante do grupo I (18.B), e curva de ajuste do coeficiente de correlação de Pearson do grupo I (18.C).



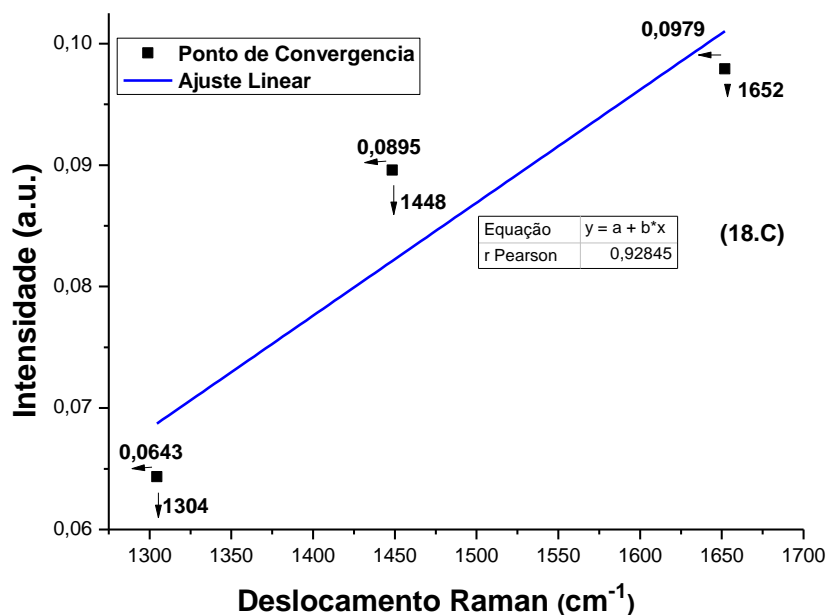
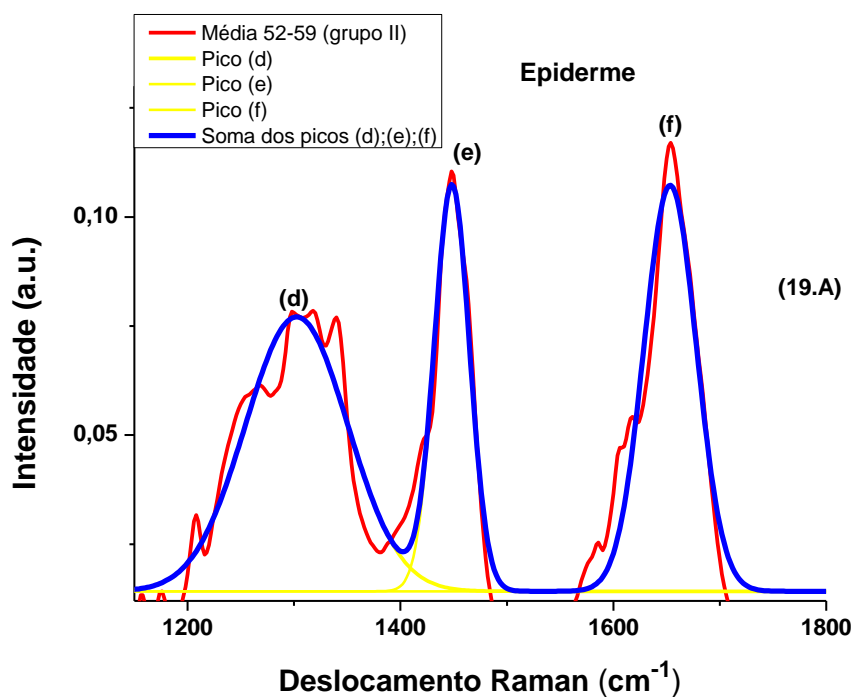
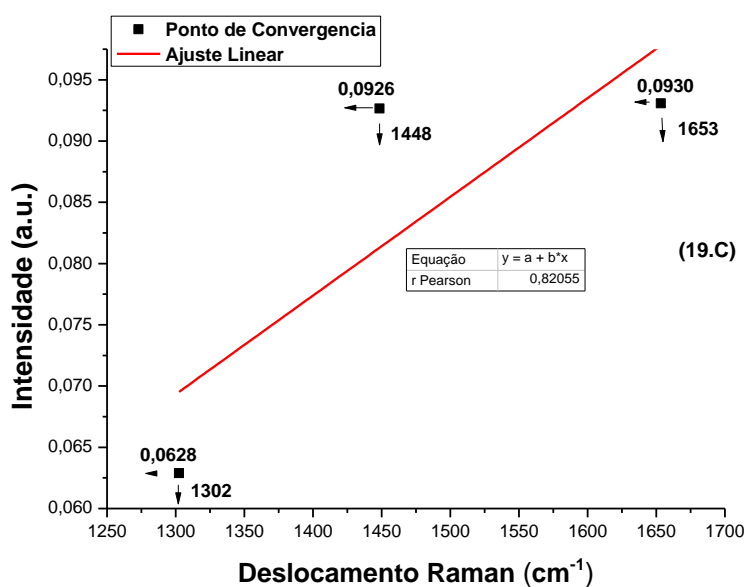
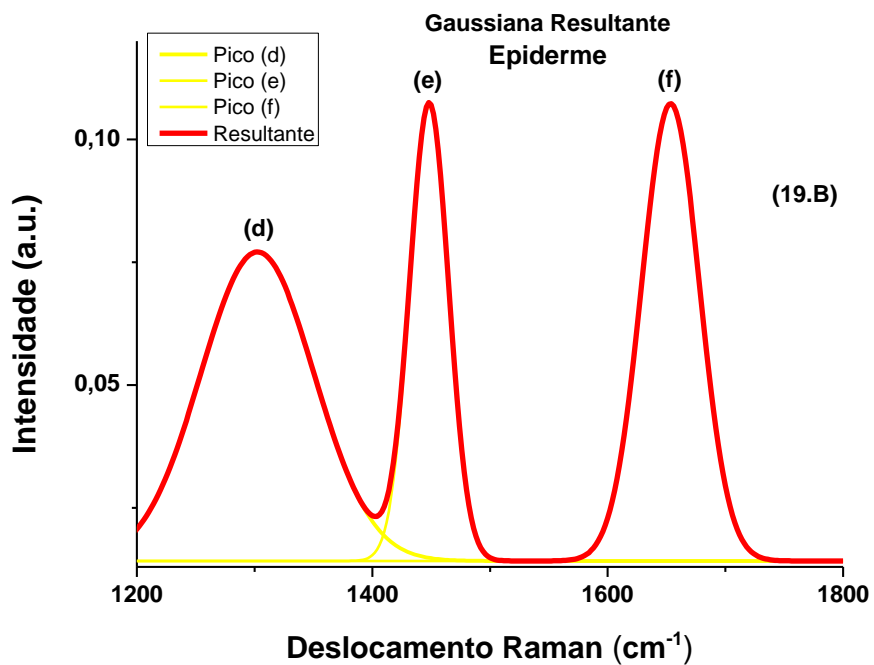


Figura 19- Curva gaussiana da epiderme de cada pico (d) em 1340  $\text{cm}^{-1}$ ; (e) 1450  $\text{cm}^{-1}$ ; (f) 1650  $\text{cm}^{-1}$  do grupo II (19.A), e curva gaussiana resultante do grupo II (19.B), e curva de ajuste do coeficiente de correlação de Pearson do grupo II (19.C).





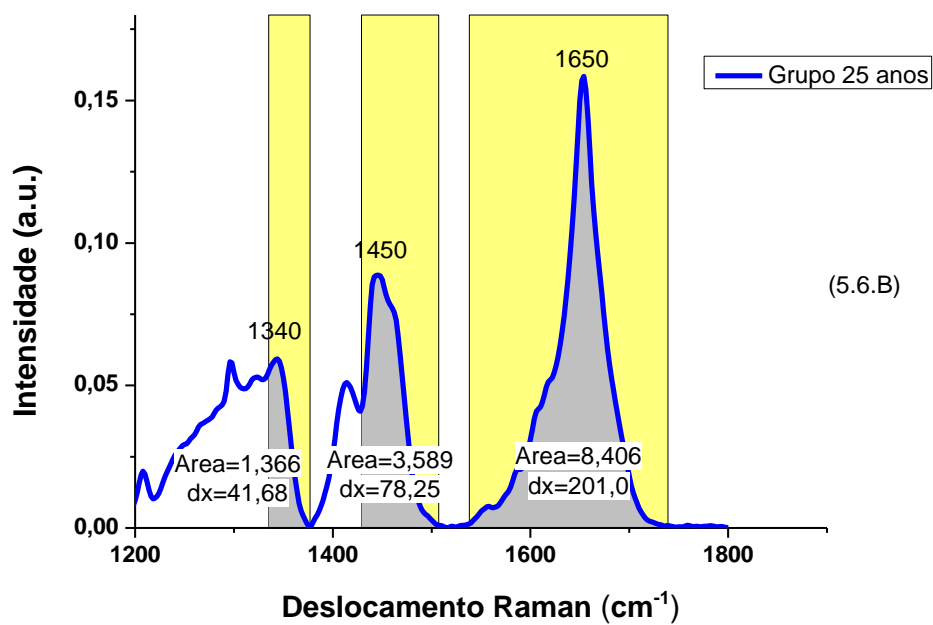
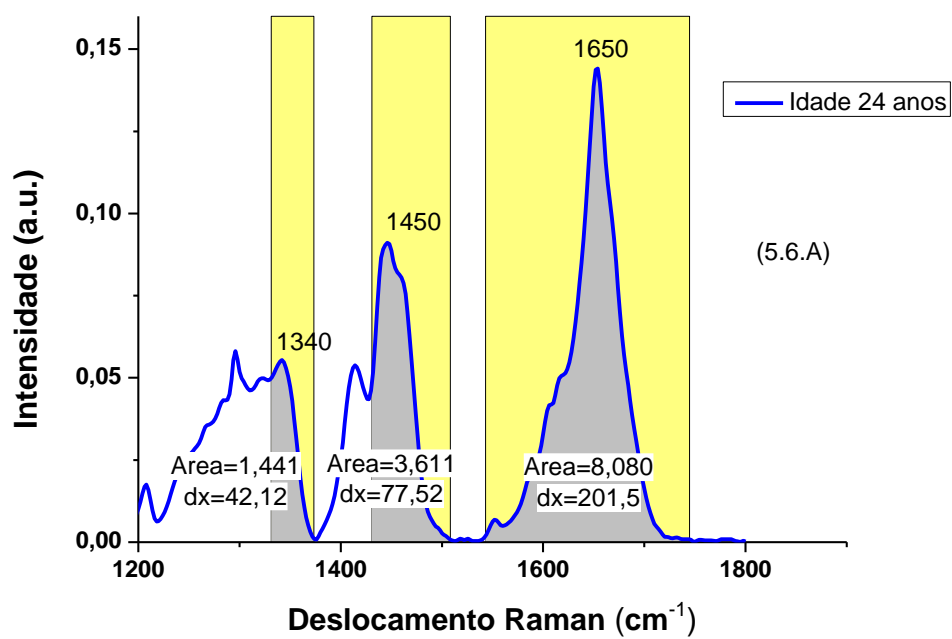
O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), mede o grau de relacionamento linear entre as duas variáveis estudadas, deslocamento Raman, medido pela

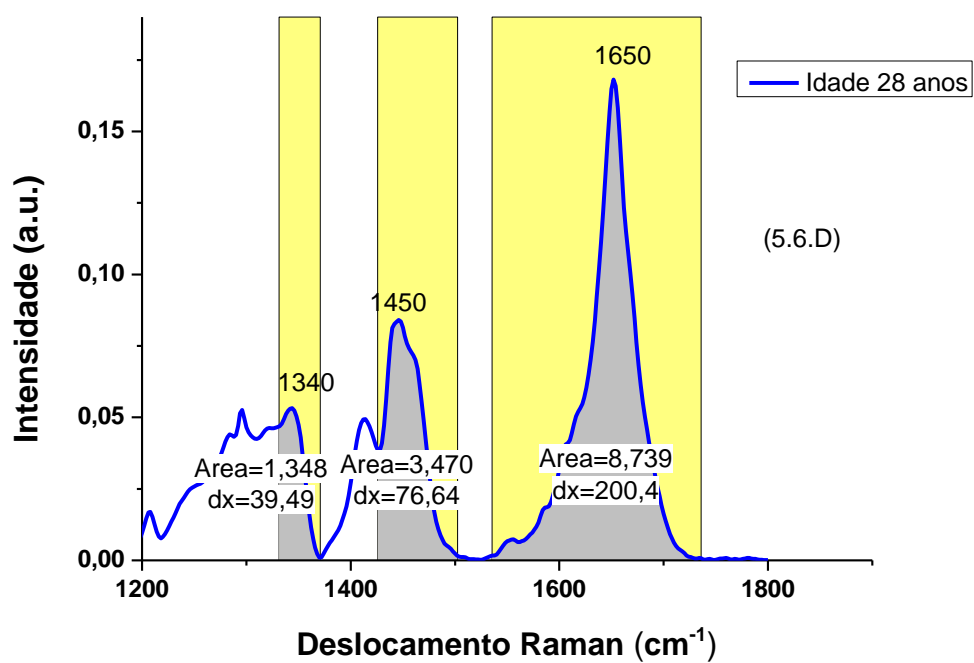
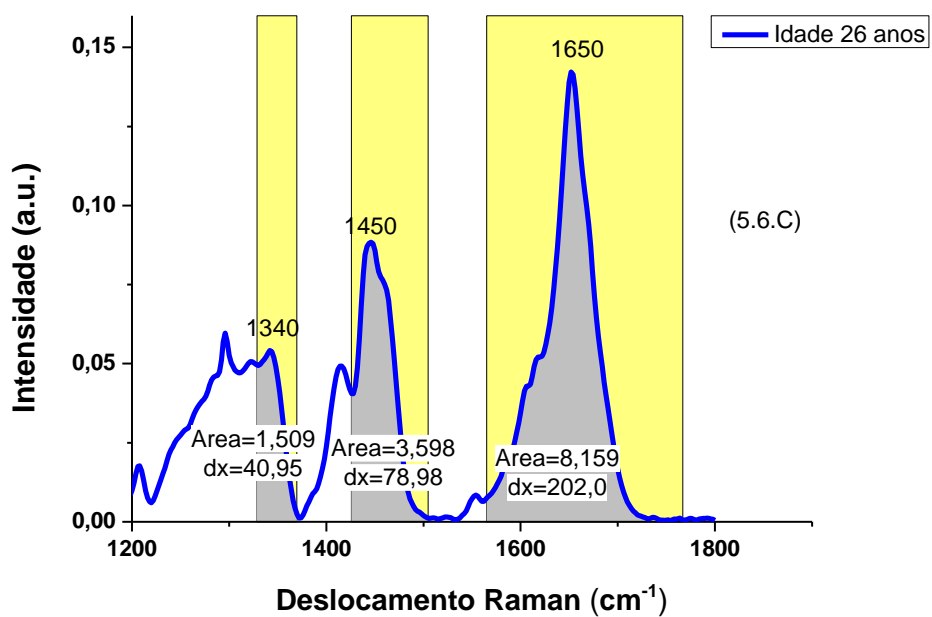
frequência em  $\text{cm}^{-1}$ , que se altera conforme alteração das bandas energéticas das diferentes ligações moleculares, e a intensidade do sinal Raman medido em unidades arbitrárias (a.u.). Nos presentes resultados as correlações obtidas foram diretas com  $r > 0$ , o que indicou que conforme o aumento da frequência Raman ocorreu também o aumento da intensidade do sinal. Os valores obtidos de  $r$  para o SC de 0,99 e 0,98 para grupos I e II, e para a EP  $r$  de 0,92 e 0,82, foram próximos de 1, indicando forte correlação direta entre as duas variáveis.

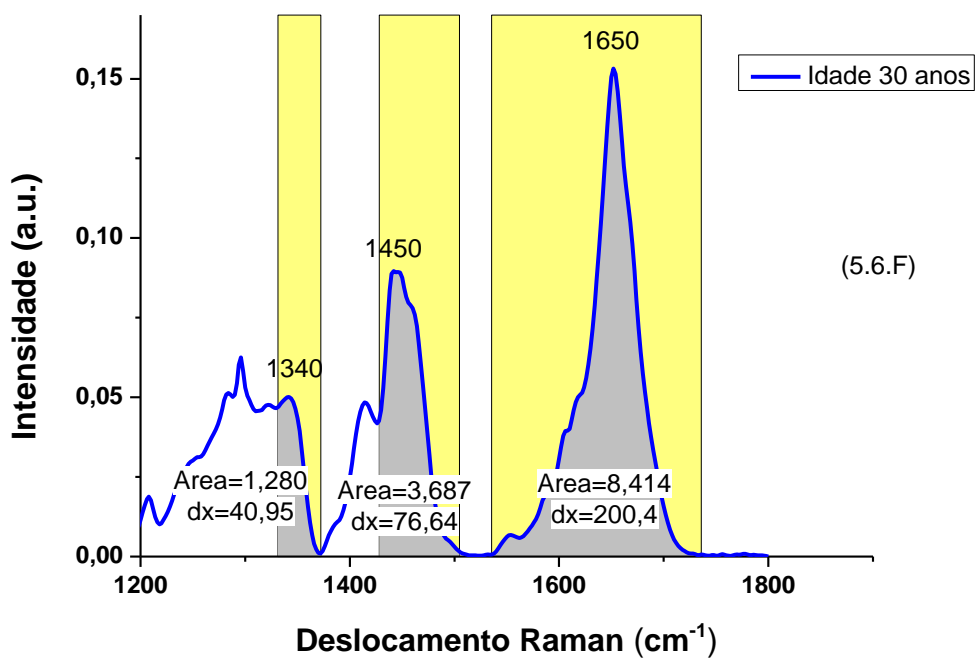
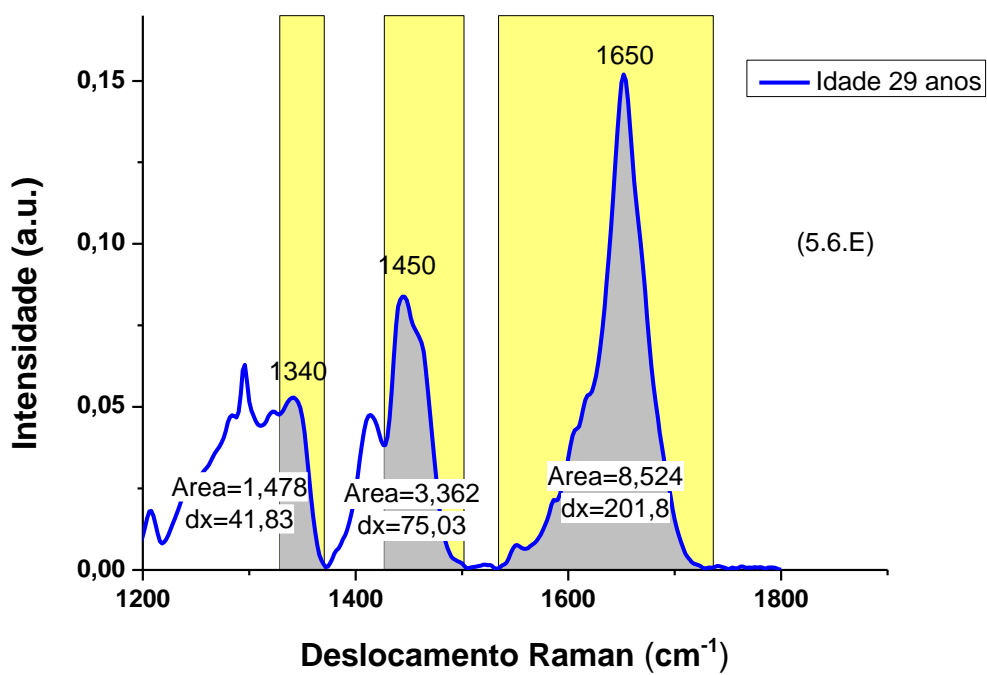
Esses resultados concordam com os obtidos anteriormente, ao observar o espectro da figura 6, o pico da queratina para a EP foi menor do que no SC, diminuindo a tendência direta de aumento da frequência com o aumento da intensidade, isso fez seu coeficiente de correlação menor do que o do SC.

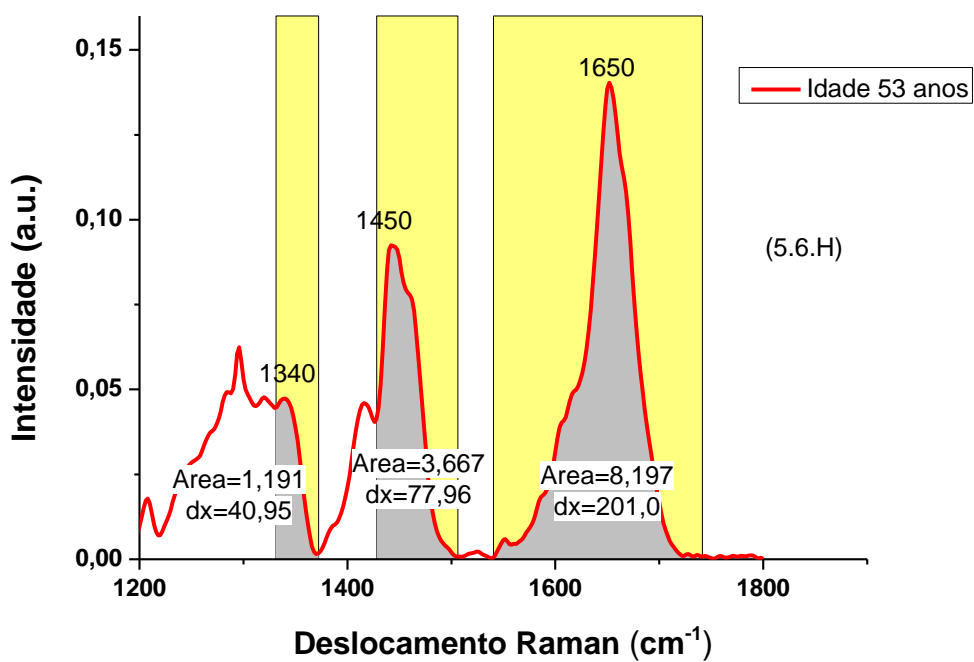
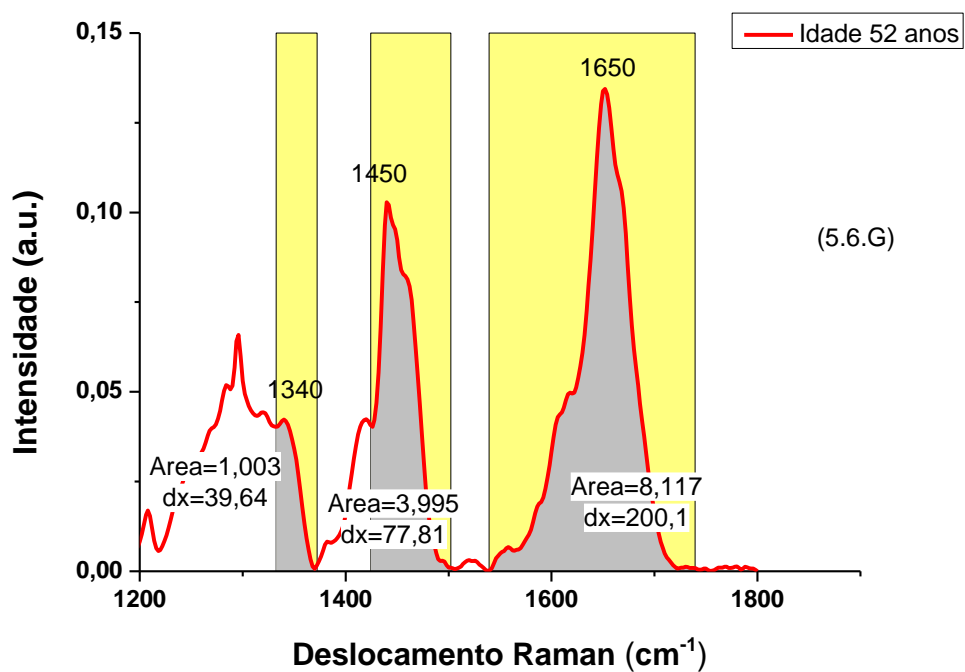
Sabendo que as curvas de todos os espectros são gaussianas conforme verificado nas figuras anteriores 16 à 19, portanto foi realizada a comparação entre as áreas de região de pico para cada grupo de idade, para estrato córneo e epiderme, com posterior análise do teste  $t$  de Student pareado, com  $p < 0,05$  considerado significativo.

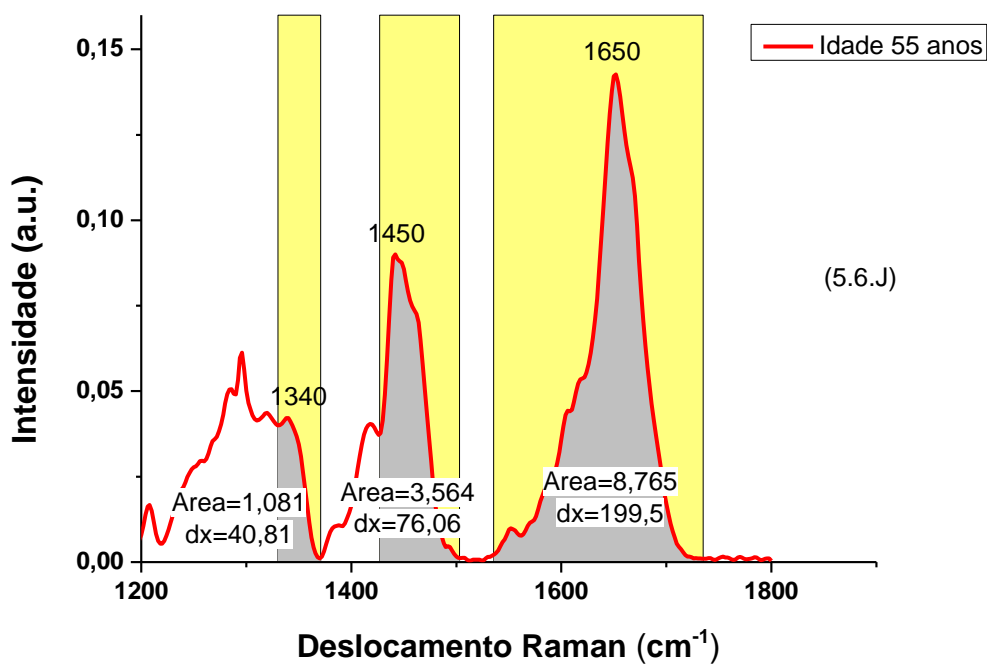
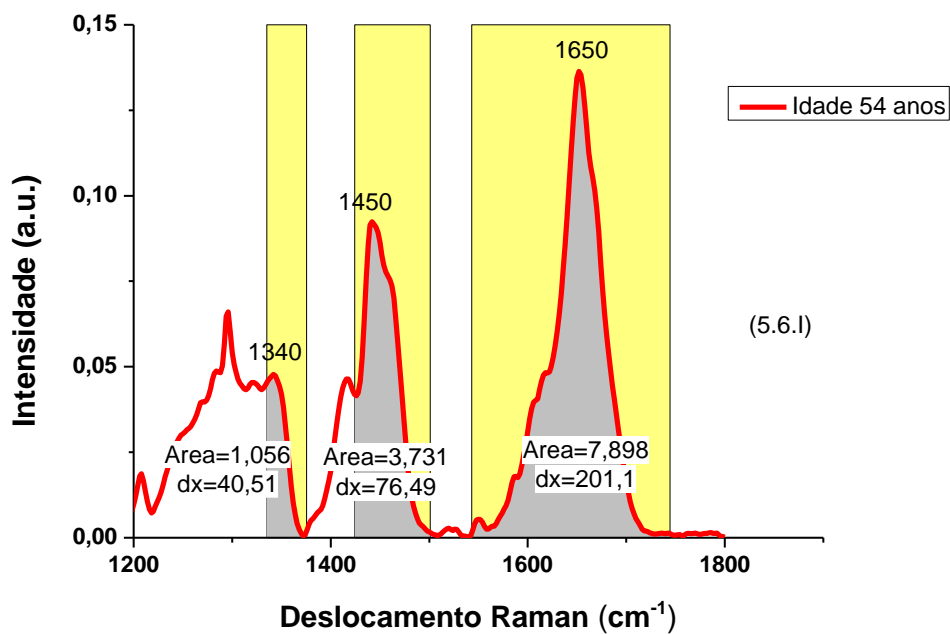
5.6 Comparação de área sob a curva dos picos do estrato córneo grupo I (espectros azuis), para cada faixa de idade, 24,25,26,28,29 e 30 anos, e grupo II, (espectros vermelhos), para cada faixa de idade, 52,53,54,55,58 e 59 anos. As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva.

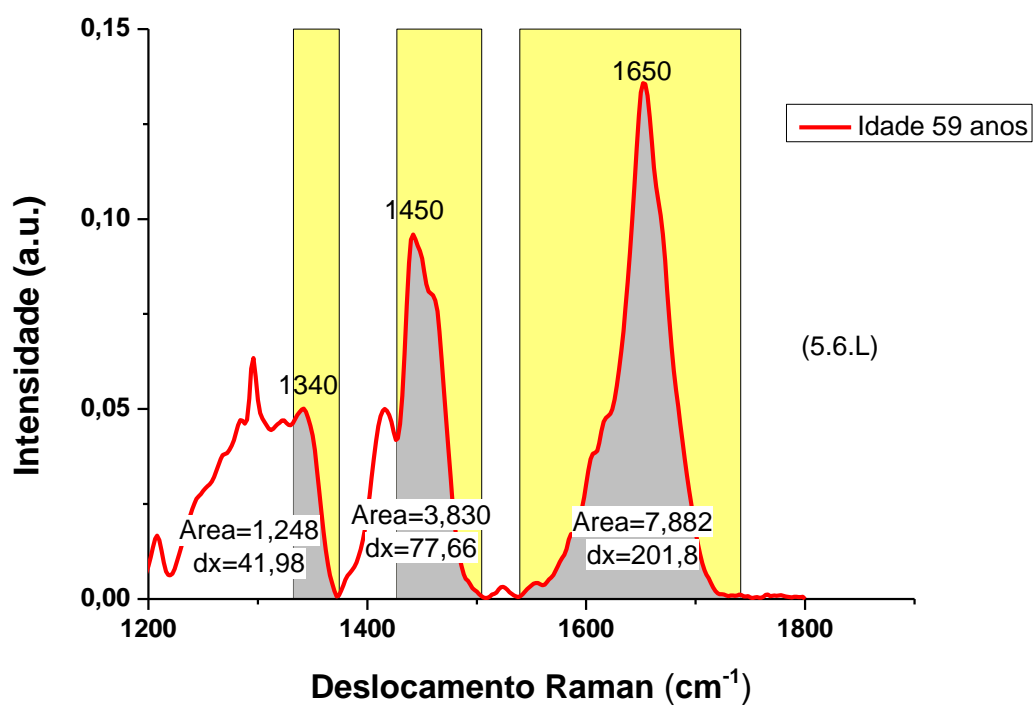
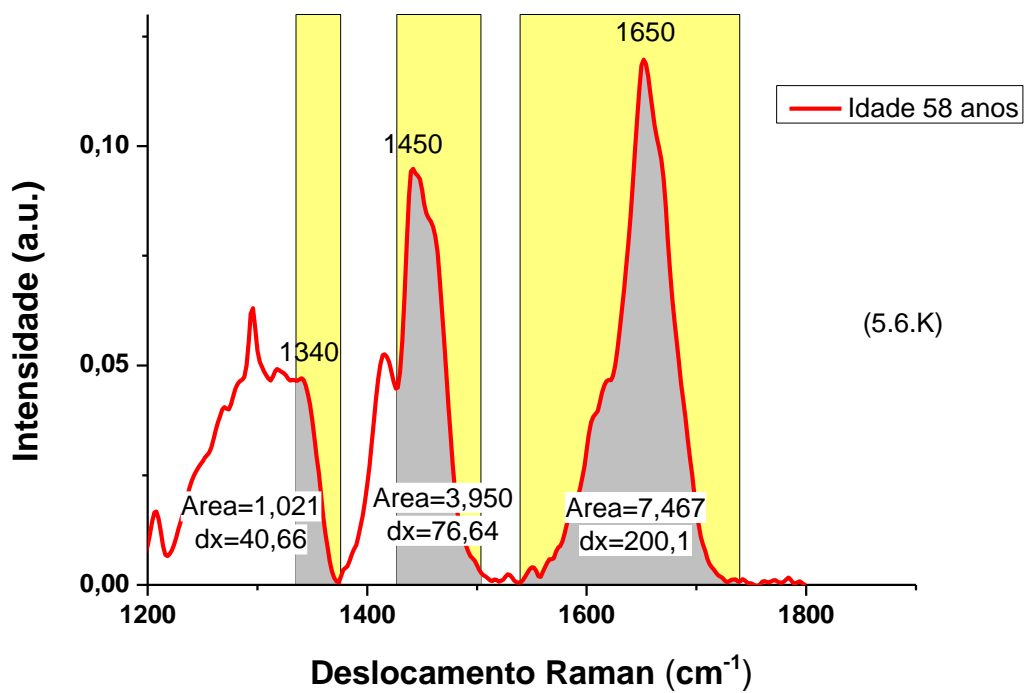




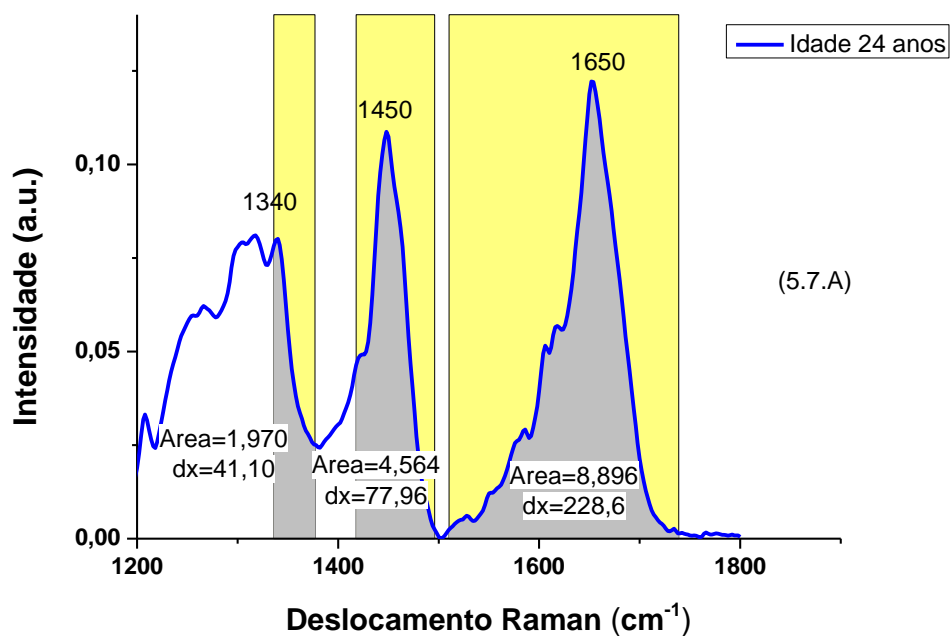


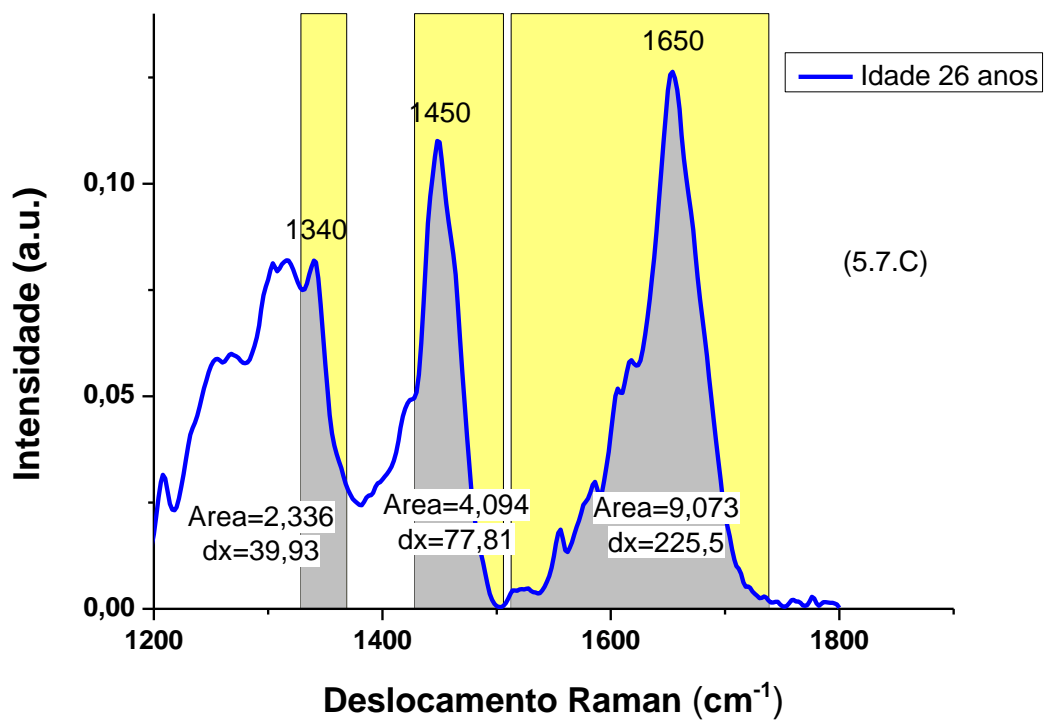
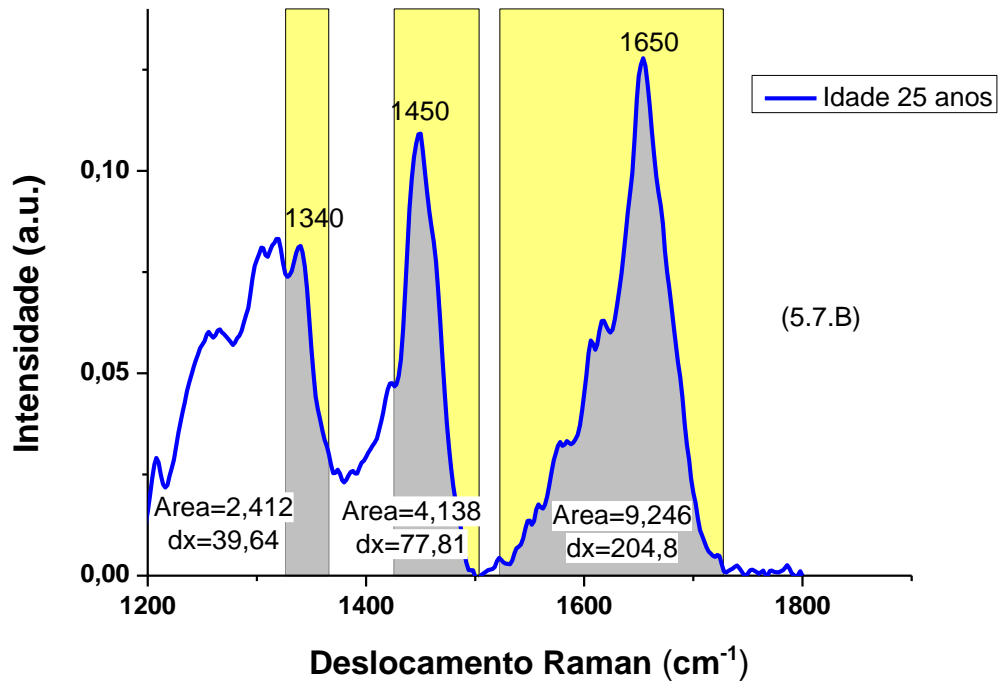


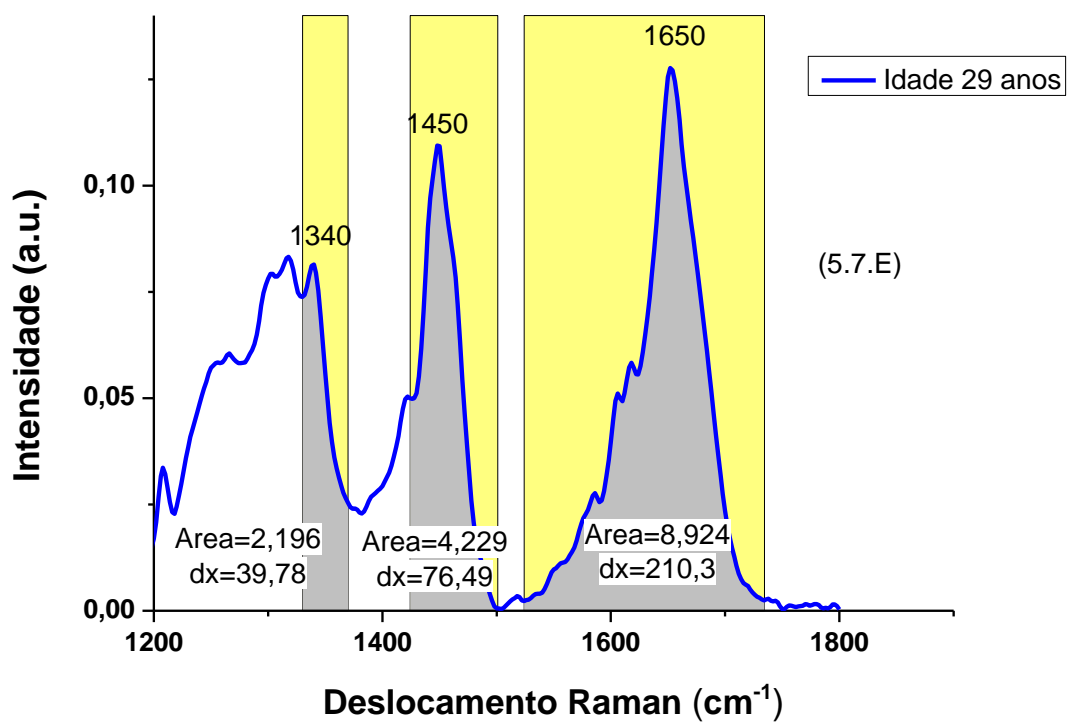
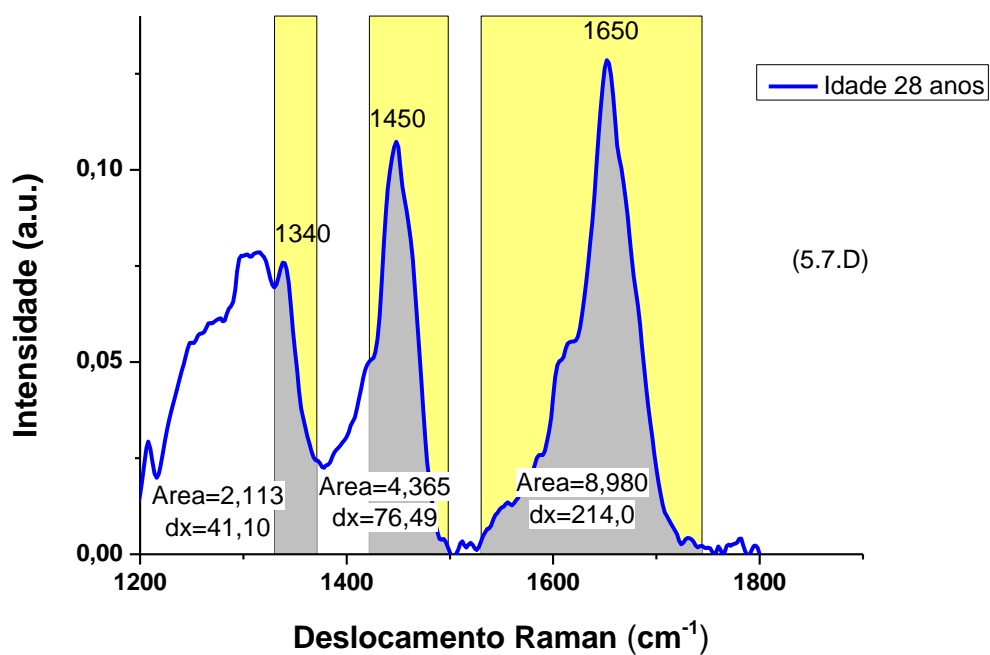


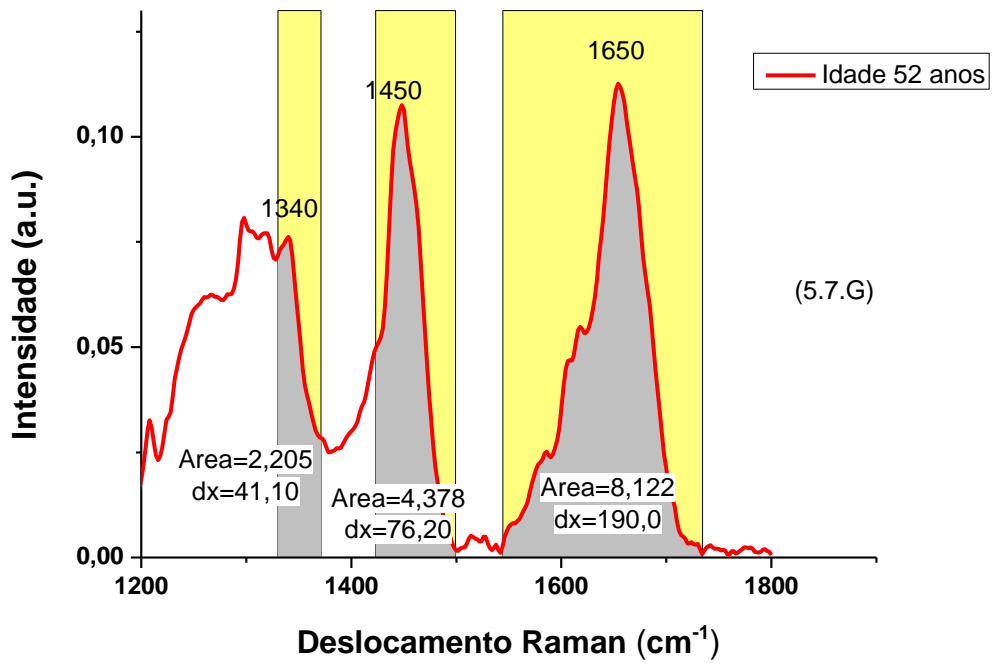
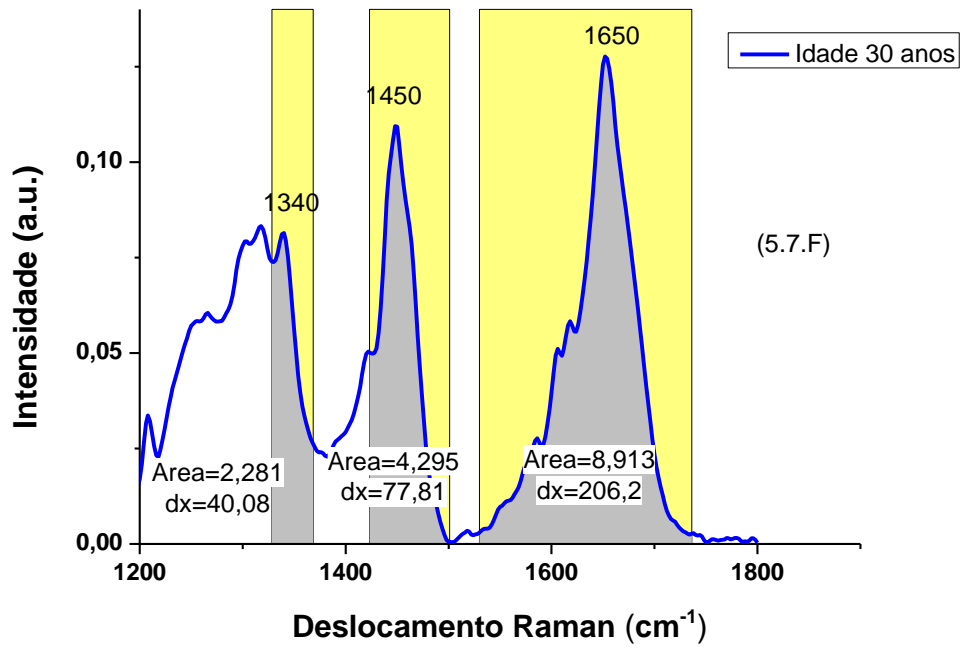


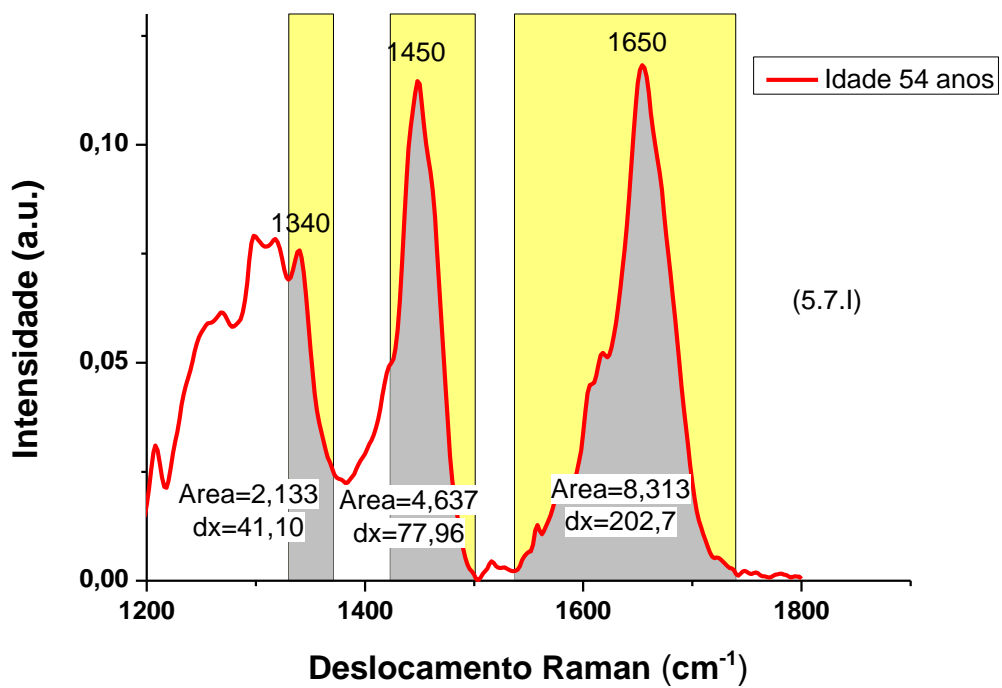
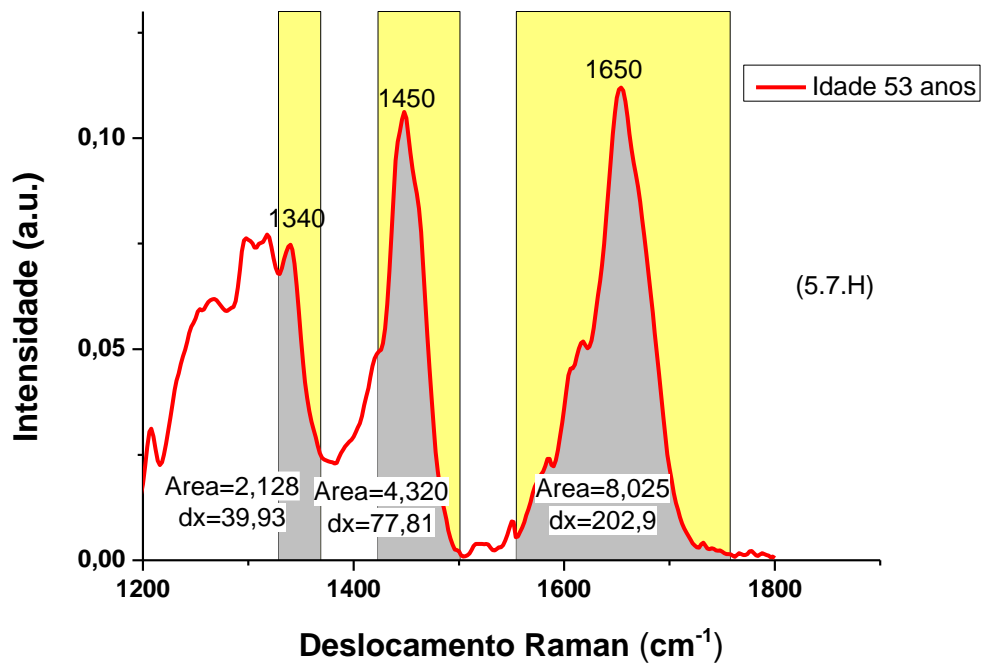
5.7 Comparação de área sob a curva dos picos da epiderme do grupo I (espectros em azul), 24,25,26,28,29 e 30 anos, e grupo II (espectros vermelhos) , 52,53,54,55,58 e 59 anos . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva.

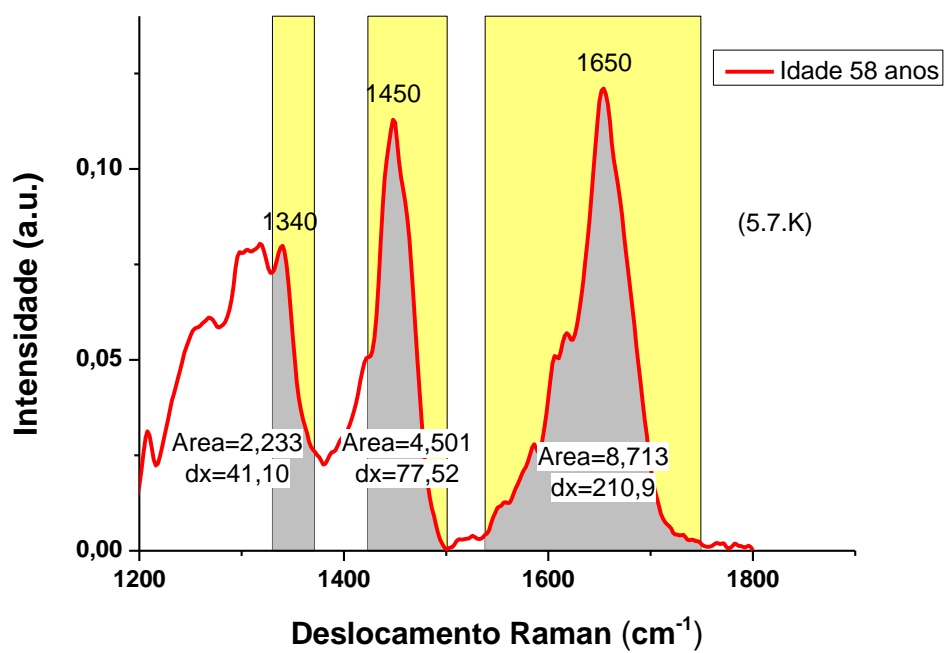
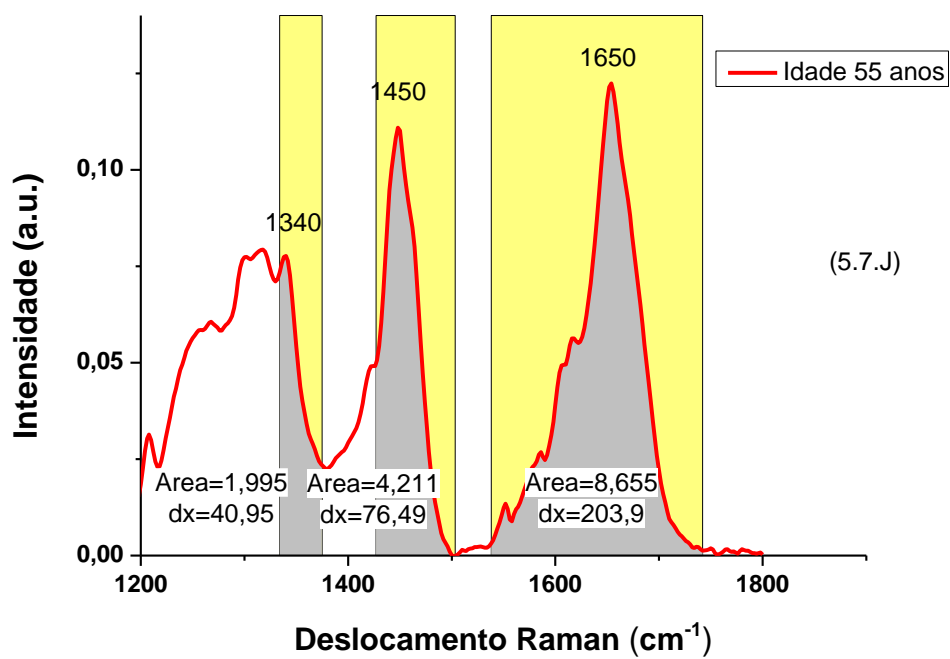












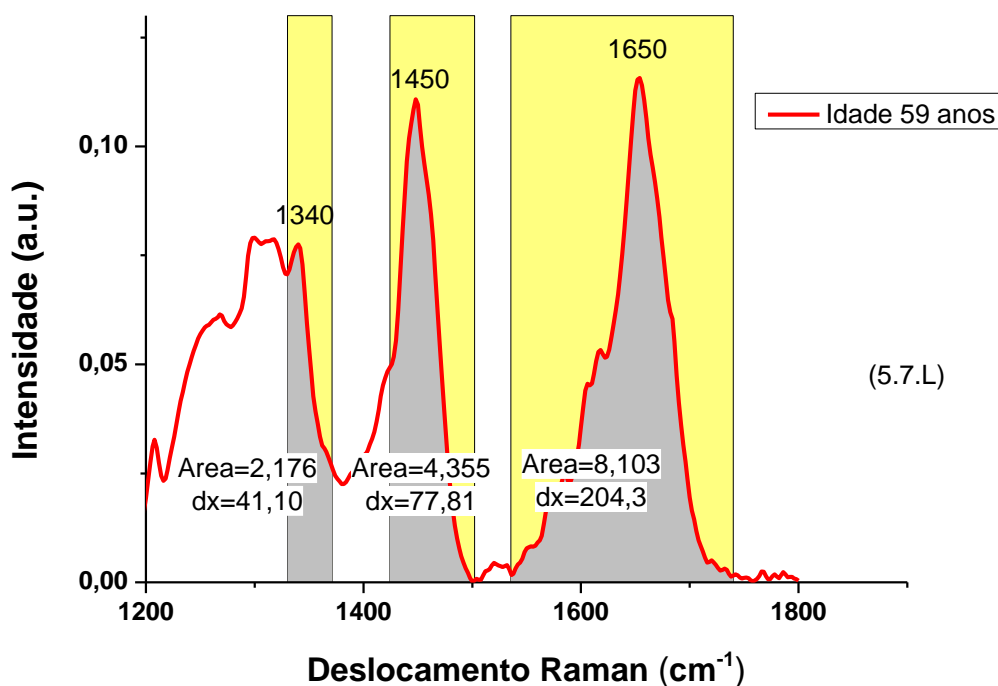


Tabela 9- Comparação dos valores de área sob a curva entre os grupos I e II para cada faixa de idade, para estrato córneo (SC) e epiderme (EP), conforme dados dos itens 5.6 e 5.7, figuras A até L .

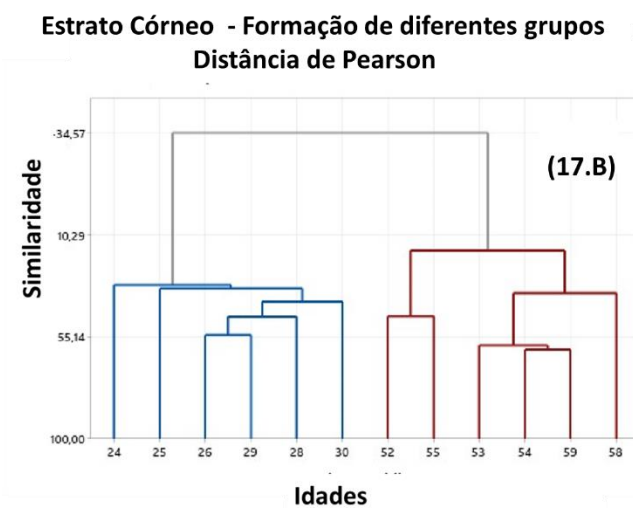
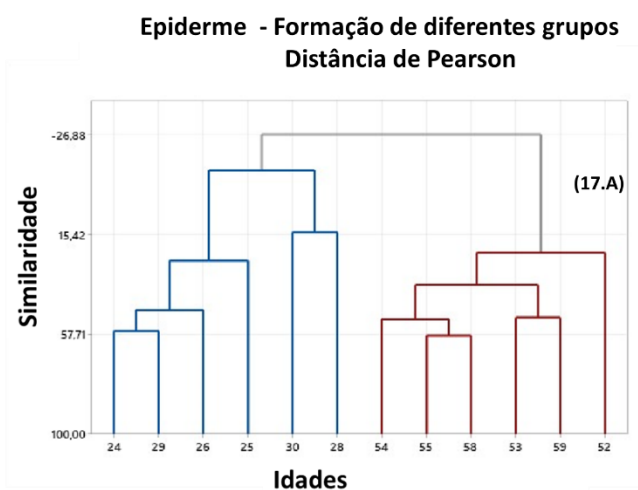
1340 cm <sup>-1</sup> (SC)				1450 cm <sup>-1</sup> (SC)				1650 cm <sup>-1</sup> (SC)			
Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas
24	1,441	52	1,003	24	3,611	52	3,995	24	8,08	52	8,117
25	1,366	53	1,911	25	3,589	53	3,667	25	8,406	53	8,197
26	1,509	54	1,056	26	3,598	54	3,731	26	8,159	54	7,898
28	1,348	55	1,081	28	3,47	55	3,564	28	8,739	55	8,765
29	1,478	58	1,021	29	3,363	58	3,95	29	8,524	58	7,467
30	1,28	59	1,248	30	3,687	59	3,83	30	8,414	59	7,882
Teste t Student	0,304			Teste t Student	0,0366			Teste t Student	0,105		

1340 cm <sup>-1</sup> (EP)				1450 cm <sup>-1</sup> (EP)				1650 cm <sup>-1</sup> (EP)			
Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas	Idades	Áreas
24	1,97	52	2,205	24	4,564	52	4,378	24	8,896	52	8,122
25	2,412	53	2,128	25	4,138	53	4,32	25	9,246	53	8,025
26	2,336	54	2,133	26	4,094	54	4,637	26	9,073	54	8,313
28	2,113	55	1,995	28	4,365	55	4,211	28	8,98	55	8,655
29	2,196	58	2,233	29	4,229	58	4,501	29	8,924	58	8,713
30	2,281	59	2,176	30	4,295	59	4,355	30	8,913	59	8,103
Teste t Student	0,378			Teste t Student	0,335			Teste t Student	0,0059		

Os resultados de área sob a curva mostraram que o pico em  $1450\text{ cm}^{-1}$  para o estrato córneo e o  $1650\text{ cm}^{-1}$  para epiderme, apresentaram diferenças significativas entre os grupos I e II, com  $p < 0,05$ . Estes resultados estão de acordo com os resultados já obtidos, e serão discutidos adiante com os resultados de gráfico de peso no item 5.9.1.

### 5.8 Análise exploratória para agrupamento hierárquico (HCA) - Diferenças estatísticas entre diferentes idades.

Figura 17- Dendrograma da epiderme (17.A) e do estrato córneo (17.B). Separação em dois grupos de seis segmentos, azul e vermelho conforme faixa etária.



Na figura 17, os dois braços indicam a medição de dois grupos diferentes de pele. As assinaturas espectrais foram discernidas dentro das bandas correspondentes à ceramida (amida III), lipídios, e queratina (amida I), dentro dessas regiões (1340,1450,1650  $\text{cm}^{-1}$ ). Isso facilitou a diferenciação entre o grupo I (azul) e o grupo II (vermelho).

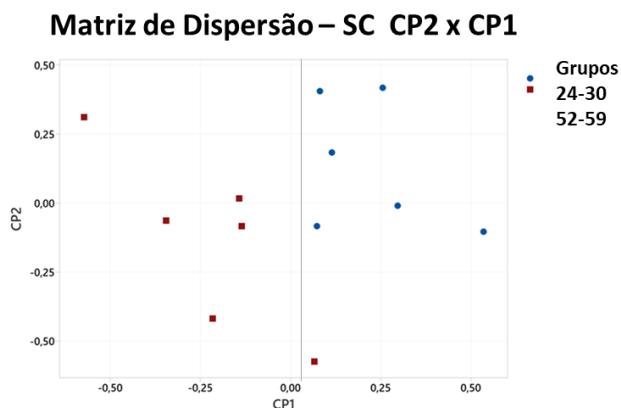
As alterações bioquímicas causadas pelo envelhecimento da pele são resultado de fatores endógenos, como processos genéticos, hormonais ou metabólicos, bem como de fatores exógenos, como poluição ou radiação ultravioleta (LEE, KWON, 2023; GANCEVICIENE et al., 2012). Os fatores endógenos estão relacionados ao envelhecimento intrínseco ou envelhecimento natural, onde as alterações da pele ocorrem de forma progressiva e são mais moderadas, afetando a morfologia do tecido que é protegido da radiação solar.

Os fatores exógenos estão relacionados ao envelhecimento extrínseco (LEE, KWON, 2023; GANCEVICIENE et al., 2012), onde as alterações são mais intensas e atingem áreas desprotegidas ou expostas à radiação solar com mais frequência (BELZER,PARKER,2023). O acúmulo dessas alterações atua de forma sinérgica, afetando as estruturas celulares do tecido cutâneo e resultando em alguns efeitos visíveis como as rugas.

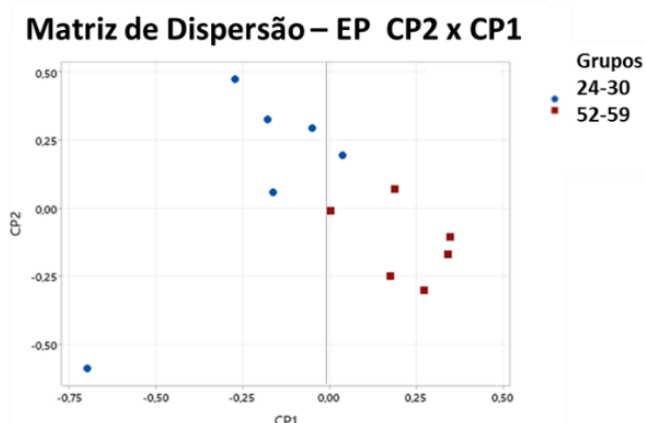
As alterações das estruturas celulares da pele, são discerníveis por meio das consequentes mudanças nas vibrações das ligações moleculares mostradas nos espectros Raman (MAKRANTONAKI, ZOUBOULIS, 2007), o que também foi verificado por outros autores (CHOE et al., 2017a.; O´REGAN et al., 2010.; CHOE et al., 2017b.; CASPERS et al., 2001 LADEMANN et al., 2012.; EGAWA et al., 2008). Essas diferenças discerníveis permitiram a separação os dois diferentes grupamentos etários para o SC e a EP vistos nas figuras 17.A e 17.B.

5.9 Análise exploratória de componentes principais - análise de discriminante linear, PCA-LDA, na região de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , gráfico de matriz de dispersão e gráfico de peso.

Figura 18- Gráficos de matriz de dispersão para SC e EP considerando os dois grupos etários.



**(18.A)**



**(18.B)**

Na figura 18, os pontos azuis mostram as seis idades mais jovens: 24, 25, 26, 28, 29, 30 e os pontos vermelhos as seis idades mais velhas: 52, 53, 54, 55, 58 e 59.

Utilizando os critérios estatísticos para agrupar os componentes principais os seis componentes principais foram criados a partir de cada medição Raman, CP\_1 a CP\_6, conforme também observou López-Alonso et al., em 2002.

Na figura 18, o gráfico de matriz da EP demonstrou que tanto o CP\_1 quanto o CP\_2 resultaram em uma separação aprimorada entre os grupos etários em

comparação com os componentes restantes, conforme visto nas figuras 18.A e 18.B. Isso mostrou que o CP\_1 separou os dados de forma mais significativa.

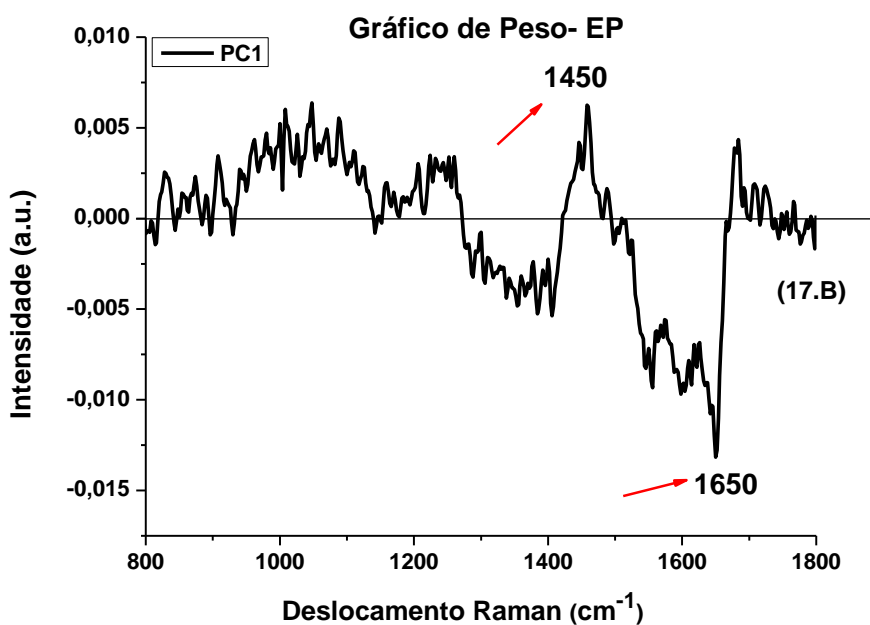
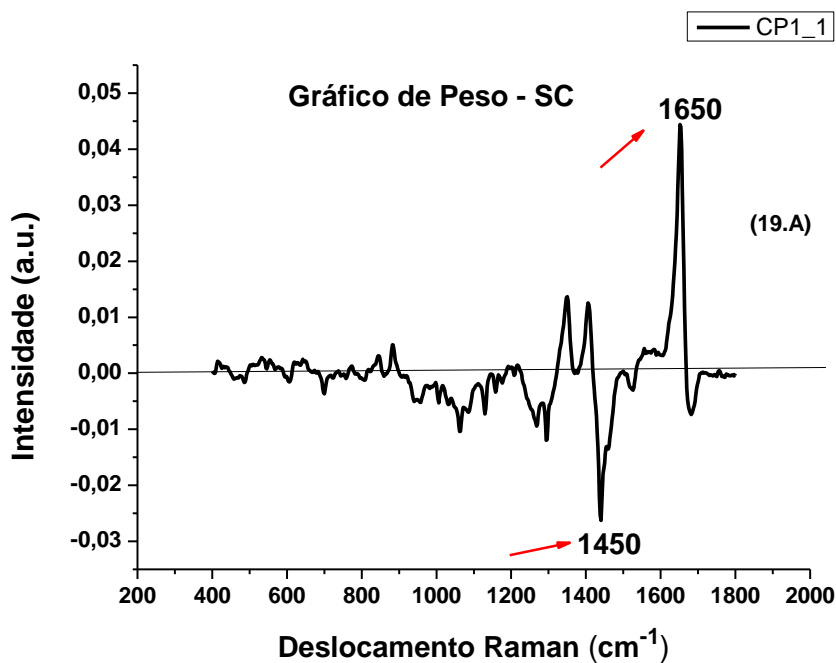
Para validar e comprovar a eficácia deste teste de diferenciação entre SC e EP, foi realizada análise de discriminante linear, LDA, com validação cruzada, resultando em uma especificidade geral de separação de 83% do conjunto de dados.

Semelhante ao presente trabalho, Gonzalez et al., em 2012, relacionaram o dano fotoinduzido, com as características cronológicas da pele, de forma não invasiva com base na espectroscopia Raman e na análise de componentes principais, PCA. Eles encontraram relação direta entre características cronológicas e as propriedades da pele fotoenvelhecida, usando medições não invasivas baseadas em Raman e análise de PCA (GONZALEZ et al., 2012).

Philipsen et al., em 2013, usaram ERC com uma análise de PCA, permitindo a discriminação de lesões cutâneas malignas e benignas, com boa especificidade e sensibilidade diagnóstica.

#### 5.9.1 Análise exploratória de Componentes Principais - Gráfico de peso para estrato córneo e epiderme

Figura 19- Gráfico de peso do CP\_1, sendo este o CP mais representativo para o estrato córneo em (19.A) e para epiderme em (19.B).



O gráfico de peso, mostrado na figura 19.A mostra que este é o CP mais representativo para o estrato córneo.

Os presentes resultados concordam com os resultados do teste t de Student dos itens 5.6 e 5.7, estes mostraram  $p < 0,05$  para  $1450\text{ cm}^{-1}$  no SC, e  $1650\text{ cm}^{-1}$  na EP, mostrando diferença significativa entre os grupos etários nesses picos. Assim, pode-se confirmar que o pico mais representativo para o SC é o  $1450\text{ cm}^{-1}$ , lipídeos, e o pico mais representativo para a EP é o  $1650\text{ cm}^{-1}$ , queratina.

Na figura 19.A, a representação em  $1450\text{ cm}^{-1}$ , ocorre porque a EP tem uma síntese muito ativa de colesterol, ácidos graxos e ceramidas (PAPPAS, 2009). Os lipídeos de origem epidérmica dos queratinócitos, preenchem os espaços entre as células, semelhantes à cimento (FEINGOLD, 2009), e desempenham papel essencial na função de barreira da pele (PEZZOTI et al., 2015; PAPPAS, 2009), contra o movimento de água e eletrólitos, bem como a invasão de microorganismos (FEINGOLD, 2009), portanto este melhor representa o SC.

Na figura 19.B, indica que a queratina é o principal fator de diferenciação entre os grupos I e II para a EP, sendo importante para regulação de água (CHOE et al., 2017a; CHOE et al., 2017b; CHOE et al., 2019), esta é a banda mais forte na região da impressão digital do espectro Raman (CHOE et al., 2019). Sua forma é sensível às estruturas secundárias e terciárias da queratina, como a  $\alpha$ -hélice da queratina (CHOE et al., 2017b).

## 6 NMF – Variação entre duas faixas etárias

O Fator Hidratante Natural (NMF) é um conjunto higroscópico de aminoácidos presentes no estrato córneo, essencial para a hidratação adequada, homeostase da barreira, descamação e plasticidade (O'REGAN et al., 2010), ele é composto dos seguintes constituintes, ácido pirrolidona carboxílico, ácido urocânico, arginina, ornitina, citrulina, treonina, alanina, histidina e fenilalanina que estão presentes predominantemente no estrato córneo (OLIVEIRA, 2011).

A espectroscopia Raman é capaz de medir informações *in vivo* sobre a composição destes aminoácidos na pele, incluindo teor de água. Também pode determinar assinaturas espectrais Raman específicas de NMF do estrato córneo.

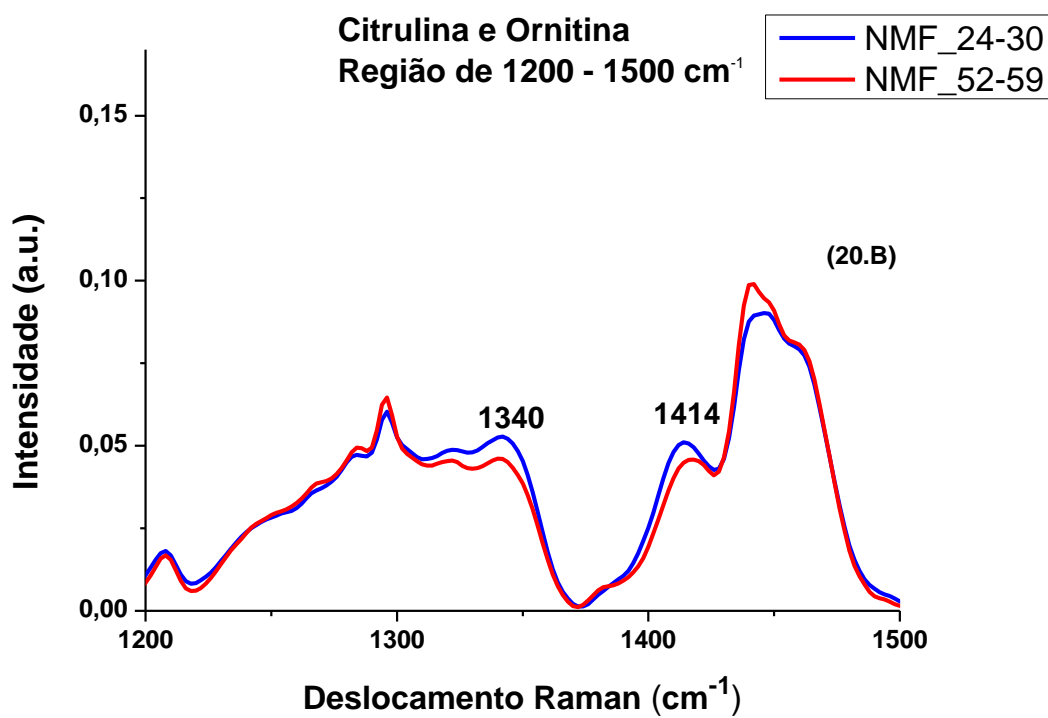
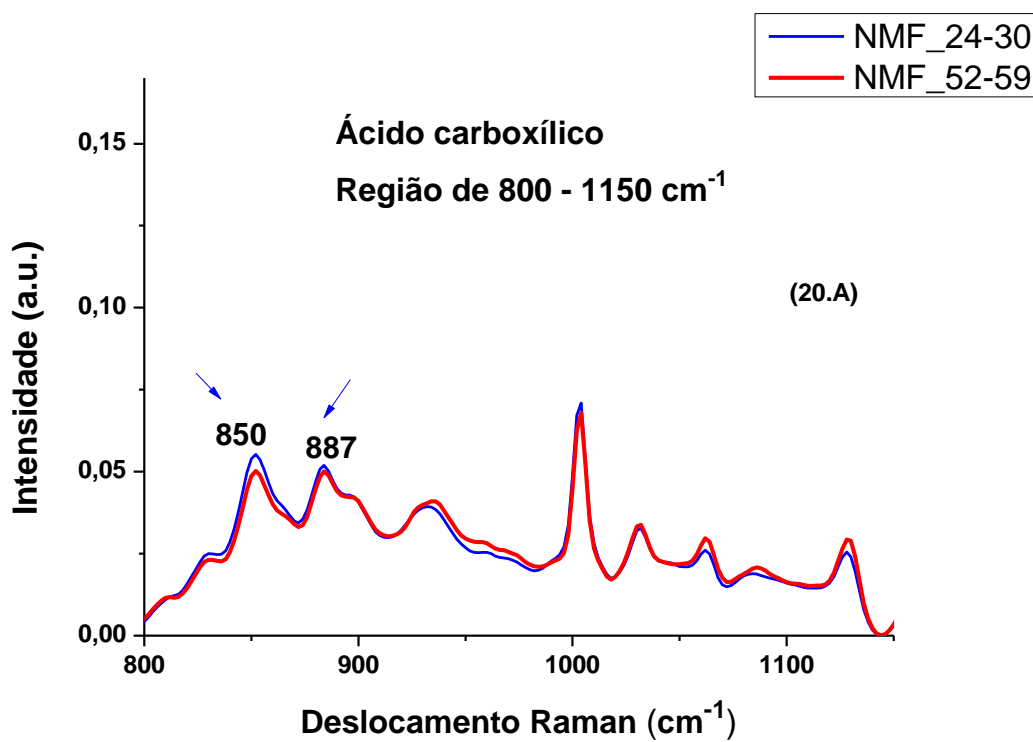
Na interface entre o estrato córneo e a epiderme, ocorre aumento da concentração de água, ocorrendo uma rápida diminuição do teor de NMF na região de  $1398\text{ cm}^{-1}$ , sendo esta região um marcador alternativo para identificar a interface entre o estrato córneo e a epiderme (CASPER et al, 2001).

A maioria dos componentes de NMF se concentram em 0 até  $70\text{ }\mu\text{m}$  abaixo da superfície da pele, a conversão da maior parte da filagrina em NMF, ocorre entre  $50\text{ e }70\text{ }\mu\text{m}$  abaixo da superfície da pele, e a pele envelhecida tem níveis menores de NMF, refletindo no aumento da conversão de filagrina em NMF (RAWLINGS;HARDING, 2004), como mecanismo compensatório.

Oliveira et al., em 2012, Pentead, et al., em 2008 estudaram constituintes do NMF da pele, utilizando análise de espectroscopia Raman com fonte laser de  $785\text{ nm}$ , obtendo modos vibracionais próximos de  $874\text{ cm}^{-1}$ , referentes à estruturas proteicas constituintes do NMF.

Segundo Oliveira em 2011, diversos picos de NMF podem ser identificados no estrato córneo. No presente trabalho foram identificados o ácido carboxílico de pirrolidona, a citrulina e a ornitina.

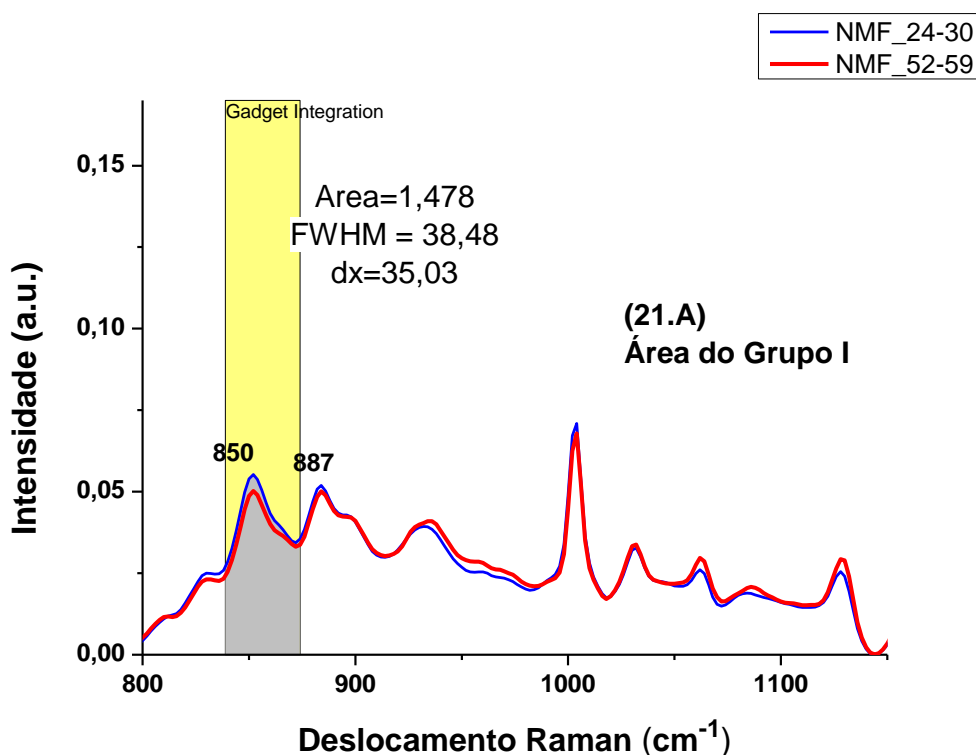
Figura 20- Principais regiões dos picos de aminoácidos constituintes do NMF, ácido carboxílico (20.A), citrulina e ornitina (20.B), para ambos grupos etários I (24-30) e II (52-59).



A figura 20 mostra alguns picos de aminoácidos identificados dos constituintes do NMF, ácido pirrolidona carboxílico, região entre 850 e 887  $\text{cm}^{-1}$ , citrulina em 1340  $\text{cm}^{-1}$ , e ornitina em 1414  $\text{cm}^{-1}$ , esses picos estão representados na figura 20 acima, em (20.A) 850-887  $\text{cm}^{-1}$ , ácido pirrolidona; (20.B) 1340  $\text{cm}^{-1}$ , citrulina, e 1414  $\text{cm}^{-1}$ , ornitina.

6.1 Cálculo de área sob a curva e largura meia altura dos picos de NMF para os grupos I (24-30) e II (52-59).

Figura 21-Área sob a curva dos constituintes do NMF, do grupo I (24-30) (21.A), do grupo II (52-59) (21.B), do ácido carboxílico de pirrolidona (852-887 $\text{cm}^{-1}$ ), região 800- 1150  $\text{cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo do ácido carboxílico.



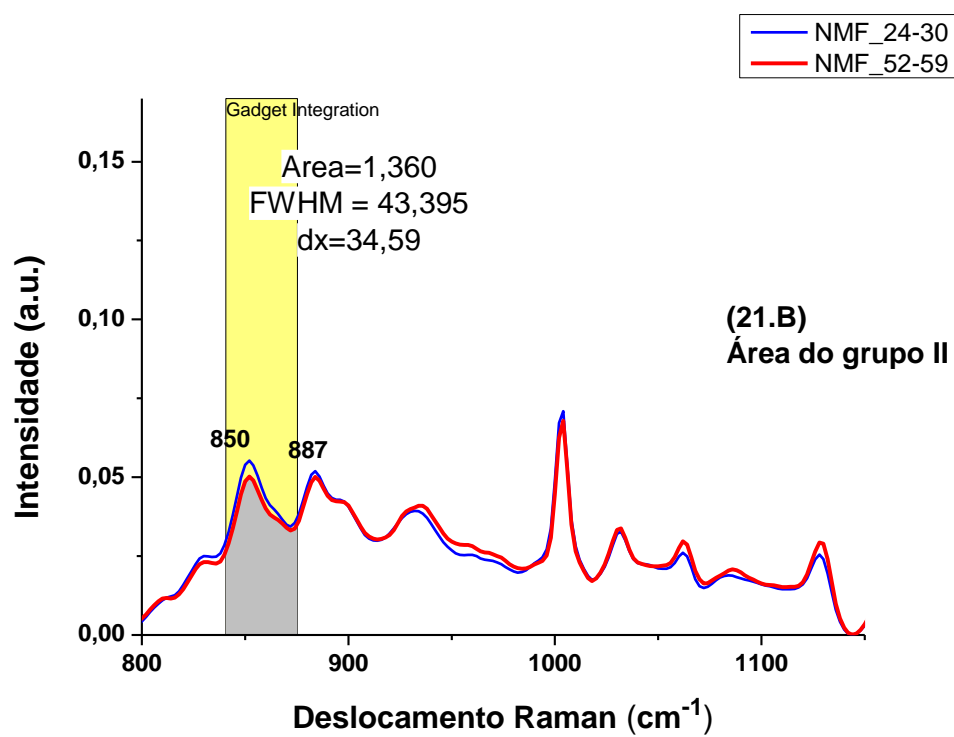
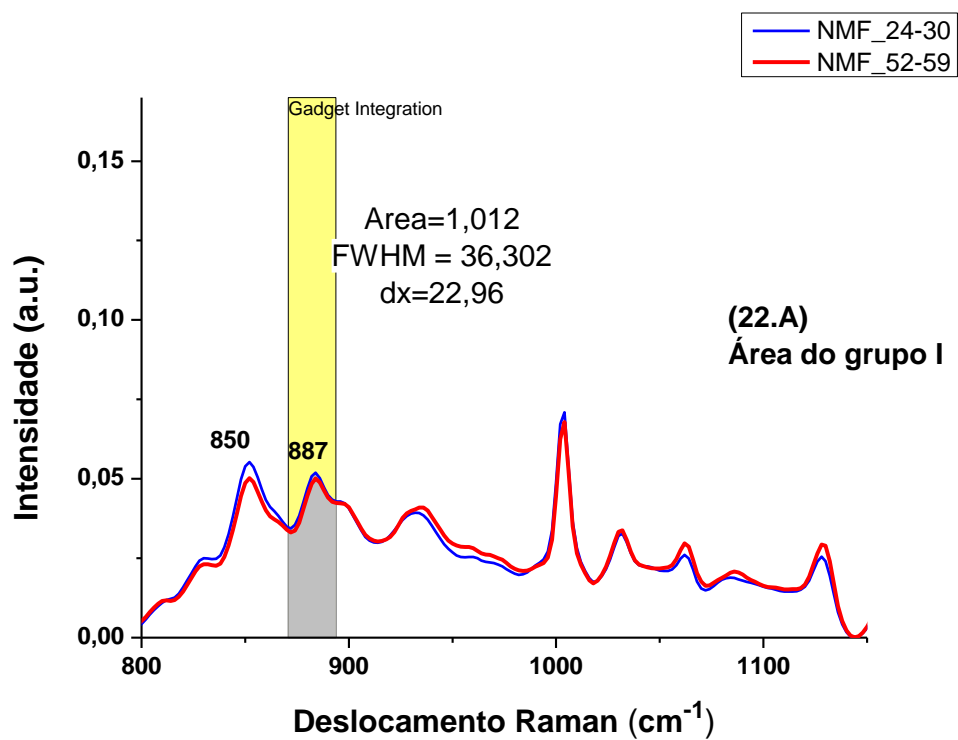


Figura 22- Área sob a curva e FWHM dos constituintes do NMF, grupo I (24-30) (22.A), e do grupo II (52-59) (22.B), do ácido carboxílico de pirrolidona (852-887

$\text{cm}^{-1}$ ), região  $800\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo do ácido carboxílico.



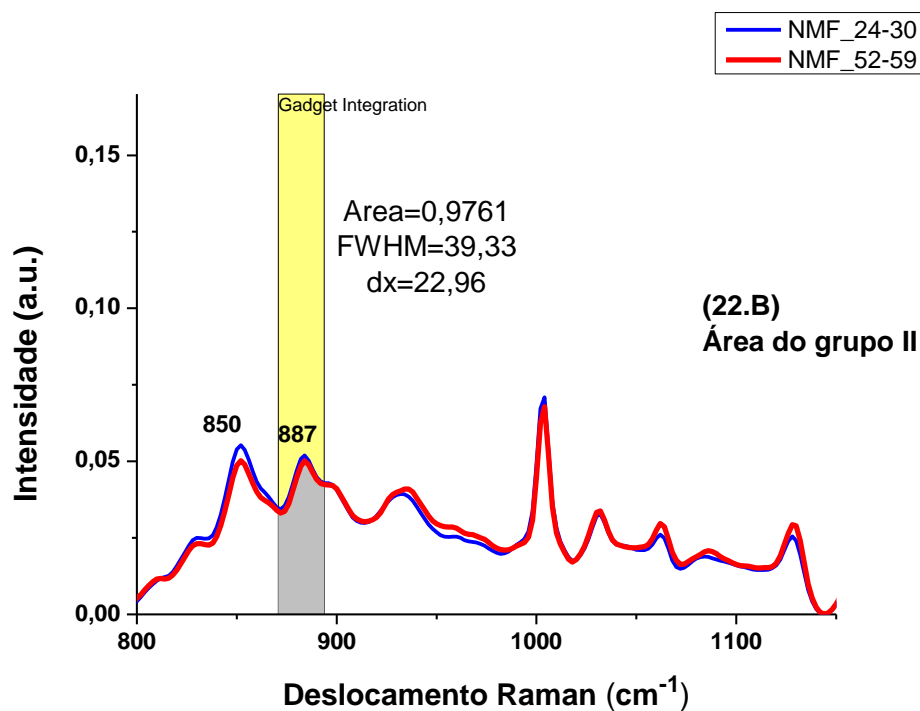
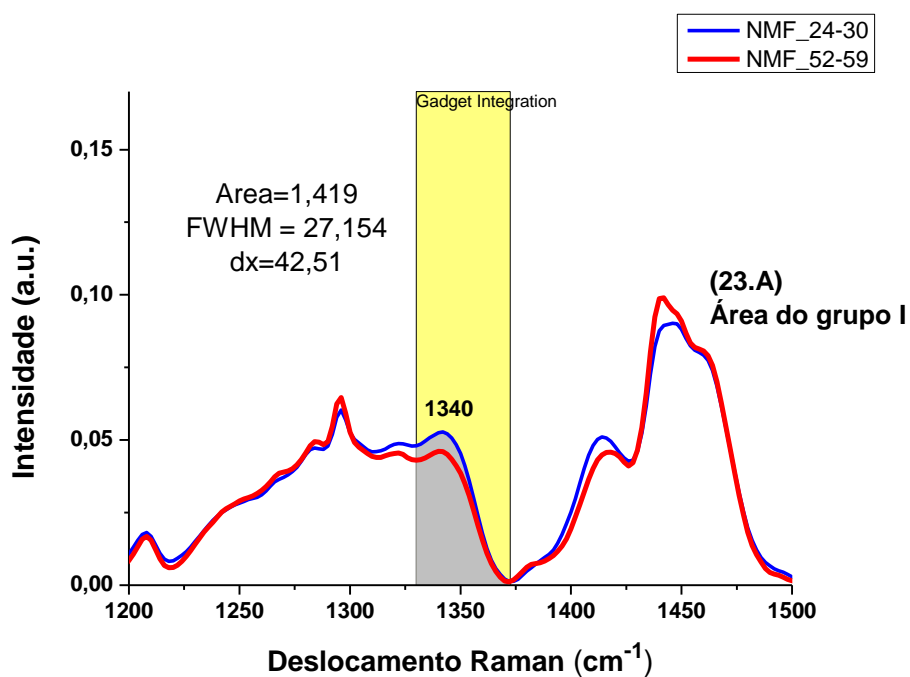


Figura 23- Área sob a curva e FWHM do grupo I (24-30) (23.A), e grupo II (52-59) em (23.B), do constituinte do NMF, a citrulina ( $1340 \text{ cm}^{-1}$ ), na região de  $1200\text{-}1375 \text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva do pico da citrulina.



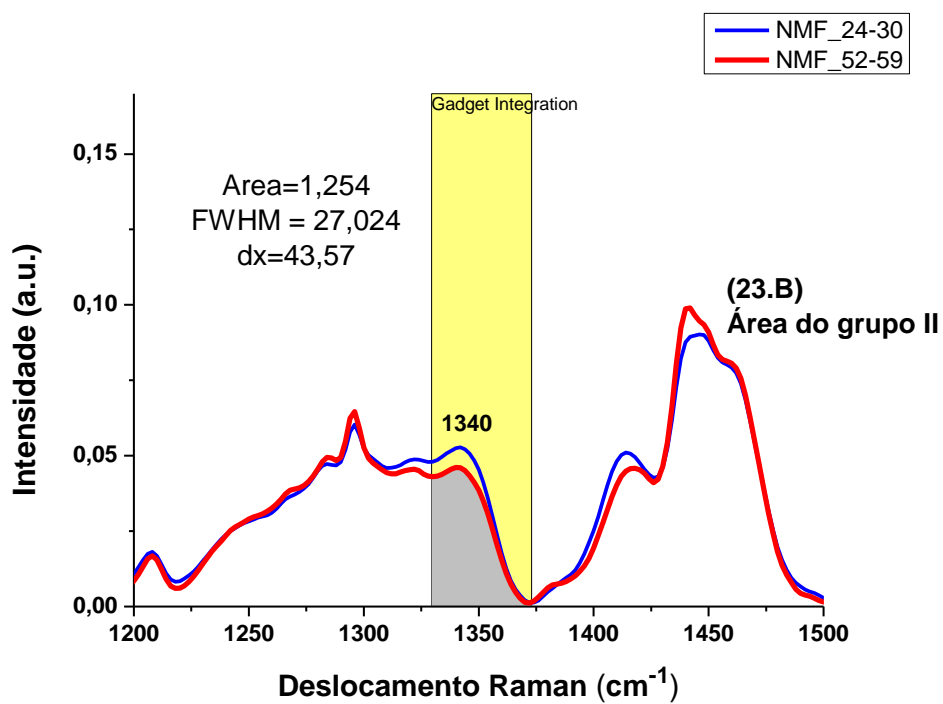
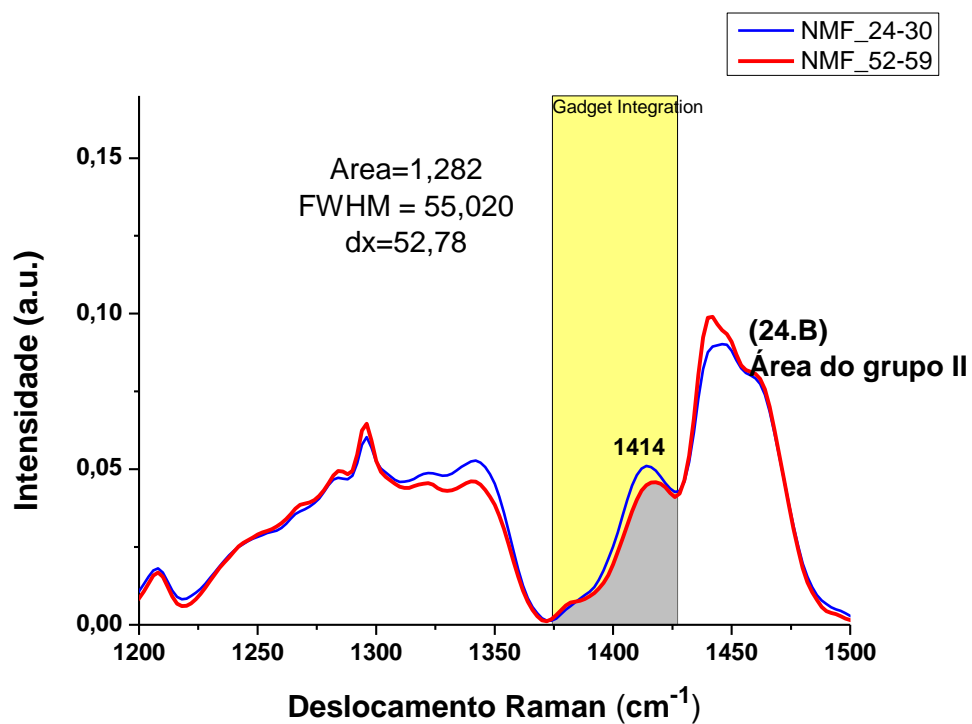
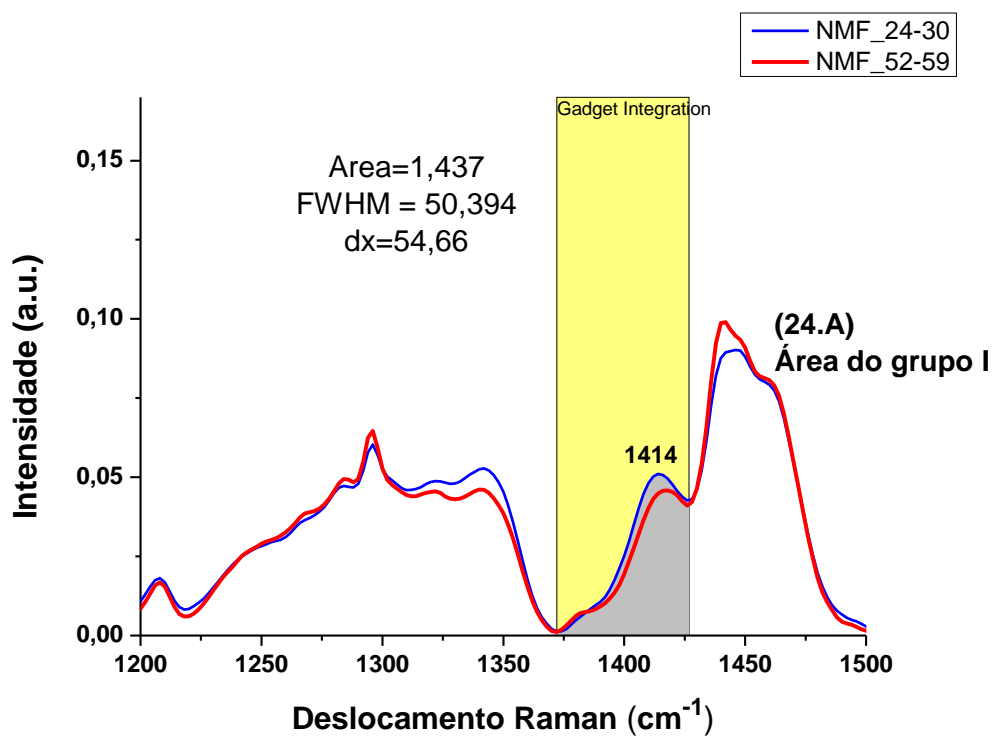


Figura 24- Área sob a curva do grupo I (24-30) (24.A), grupo II (52-59) (24.B), da ornitina ( $1414 \text{ cm}^{-1}$ ), na região entre  $1375$  a  $1500 \text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam

os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva do pico da ornitina.



Nos presentes resultados, a determinação dos aminoácidos do estrato córneo, foram obtidos em diferentes profundidades abaixo da superfície da pele, mostrando diferenças consistentes entre os grupos, dentro do intervalo analisado de 1200 á 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

Os compostos de NMF encontrados em concentrações no SC, dentro dos corneócitos, são higroscópicos e atuam como umectantes (RAWLINGS; HARDING, 2004).

Os compostos de NMF estudados neste trabalho, mostraram que SC de pele do grupo II contém quantidades menores de NMF do que do grupo I, a partir dos resultados de intensidade e área sob a curva.

Mas, maior quantidade de NMF, não explica exatamente a maior capacidade de absorção de água na pele pelo grupo I, podendo indicar que o grupo II tem mais NMF ligado a moléculas adjacentes, do que NMF livres, ocorrendo também maior lixiviação deste do que no grupo I.

A distribuição de água se apresenta de forma não homogênea dentro do SC hidratado de grupos etários mais velhos, como o grupo II, com a formação de defeitos ou rugas, e onde se concentram lacunas entre os corneócitos. A função de barreira cutânea e o transporte de água através da pele, envolvem a interação de diversos fatores como hidrofiliabilidade dos corneócitos, quantidade de lipídios e sua organização, microrrelevo de superfície, bem como comprimento do caminho de difusão, que podem desempenhar papel nas diferenças entre as propriedades da pele do grupo I e do grupo II.

Figura 25- Pico da queratina ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ), principal proteína do estrato córneo, para ambos grupos etários I (24-30) e II (52-59). Região de  $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ .

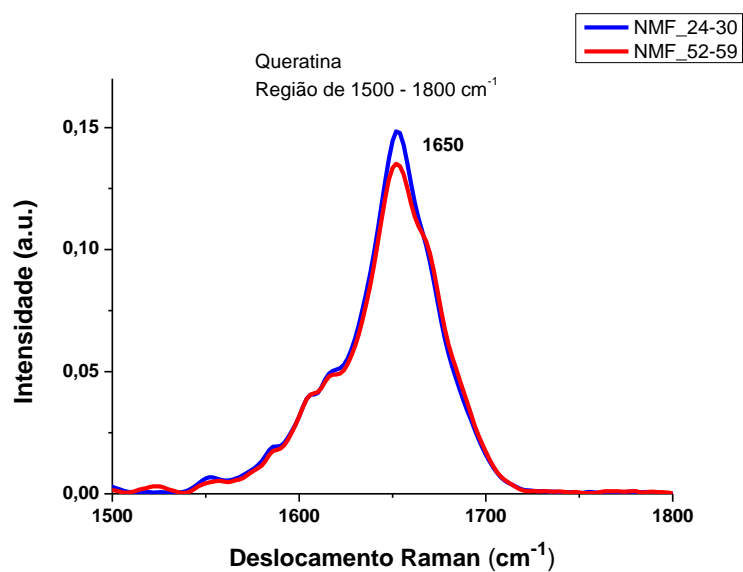
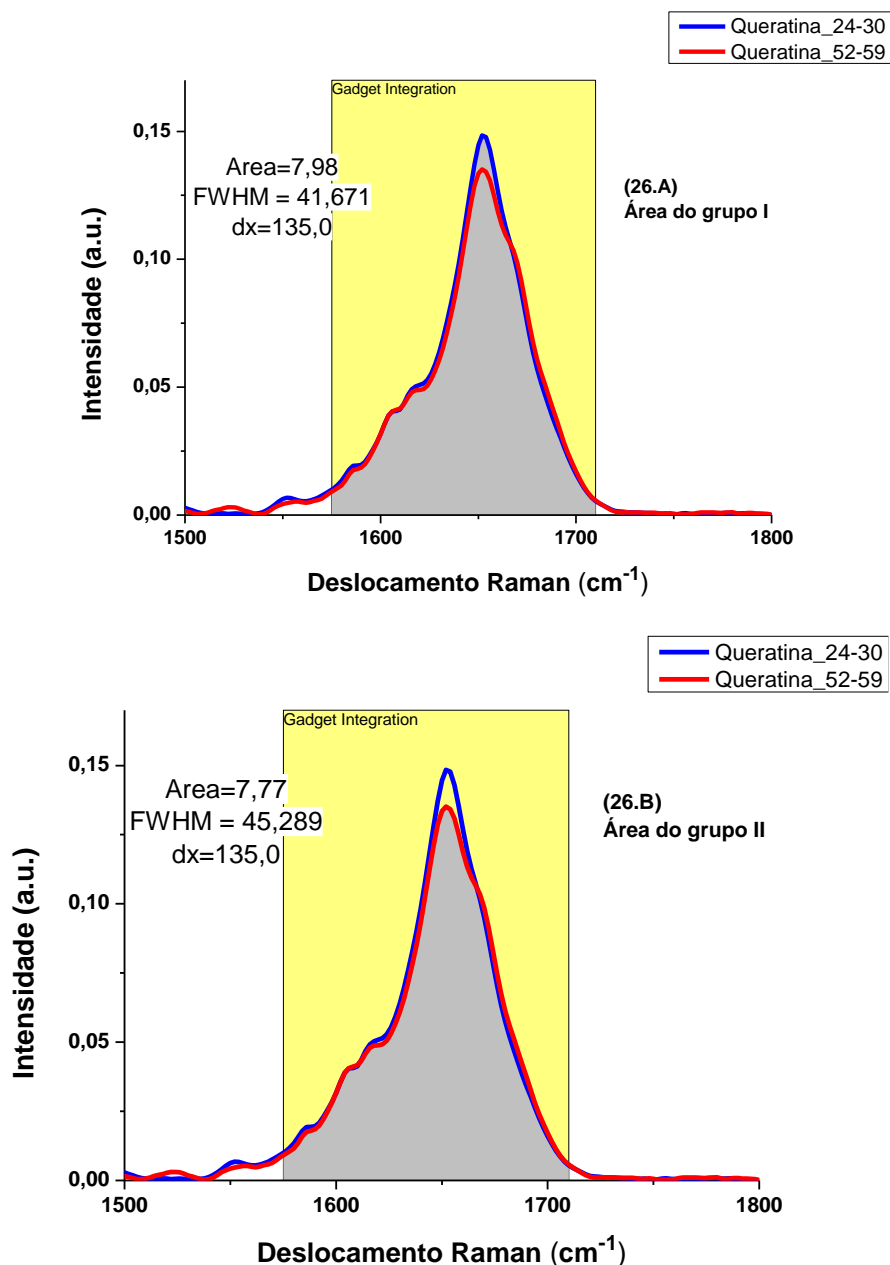


Figura 26- Área sob a curva e FWHM, do grupo I (24-30) (26.A), e grupo II (52-59) (26.B), da queratina, ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) na região de  $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ . As áreas cinzas destacam os intervalos espectrais que são usados no cálculo de área sob a curva do pico da queratina.



A queratina, proteína mais abundante no estrato córneo, juntamente com o NMF, exerce a principal função de barreira da pele, sendo este pico também importante durante análises de função de barreira e fator hidratante (CHOE et al, 2017a).

As regiões das figuras 21 à 24 e 26, mostraram aumento da área sob a curva da região do NMF e queratina para o grupo I (24-30) e sua diminuição para o grupo II (52-59). Esses resultados estão de acordo com os resultados de intensidade apresentados anteriormente, mostrando a redução do NMF e redução da queratina para o grupo II.

Para os valores de FWHM os resultados tenderam ao oposto, com aumento da largura meia altura para o grupo II e diminuição para o grupo I.

A estrutura da queratina e o NMF são importantes nas funções reguladoras da água no estrato córneo SC. Nas camadas mais superiores do SC os filamentos de queratina são dobrados limitando sua capacidade de ligação com a água, então o NMF sendo o responsável pela ligação com a água está mais livre. Nas camadas intermediárias mais próximas da EP, os filamentos de queratina são desdobrados, tem mais ligação com a água e são mais propensos a inchar. A ligação com as moléculas de água pode ser explicada considerando a estrutura molecular da queratina e a contribuição do NMF como um sistema abrangente (CHOE et al., 2017).

O processo semelhante ocorre quando os filamentos de queratina ao se tornarem mais rígidos com a idade (BINIEK et al, 2015), não se ligam a água, resultando em maior NMF livre, alterando a estrutura superficial da pele, e alterando o espalhamento Raman, e conseqüentemente levando ao maior valor de FWHM dos espectros do grupo II.

Para comparar os mesmos constituintes entre os grupos I e II foi feita a comparação de área sob a curva para cada constituinte do NMF.

Figura 27- Valores de área sob a curva de cada constituinte de NMF, ácido carboxílico, citrulina, ornitina, e a comparação destes entre os grupos I (24-30) e II (52-59).

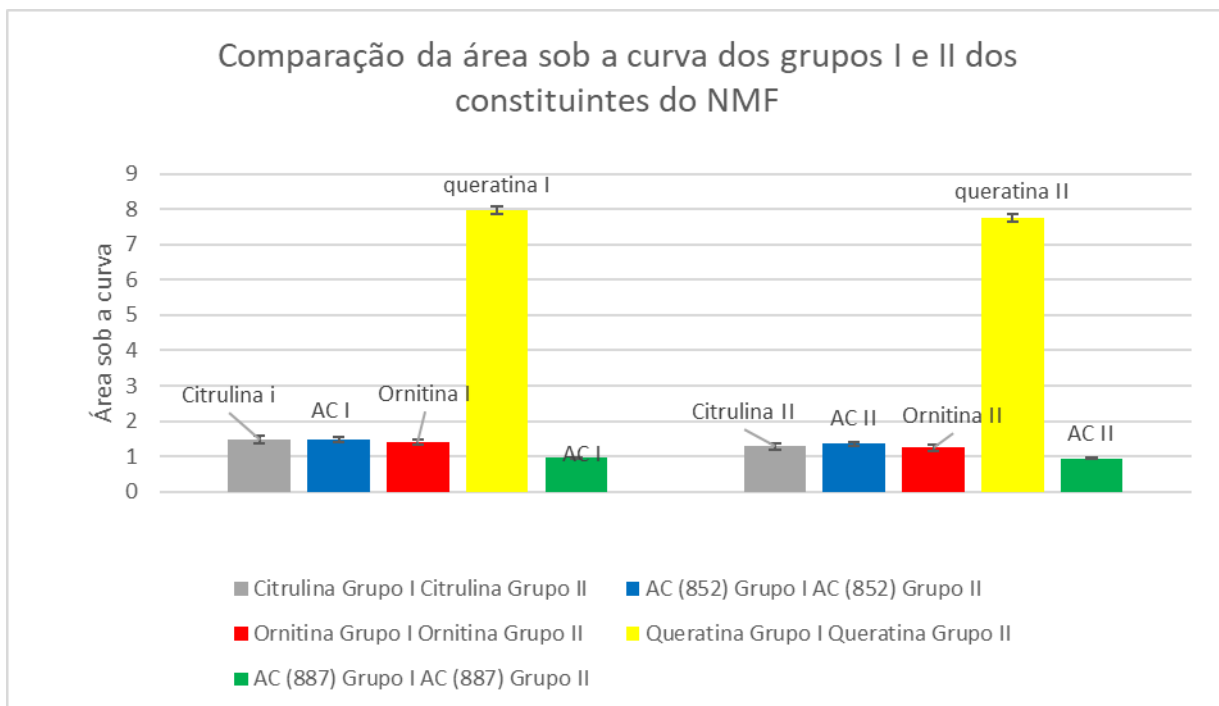
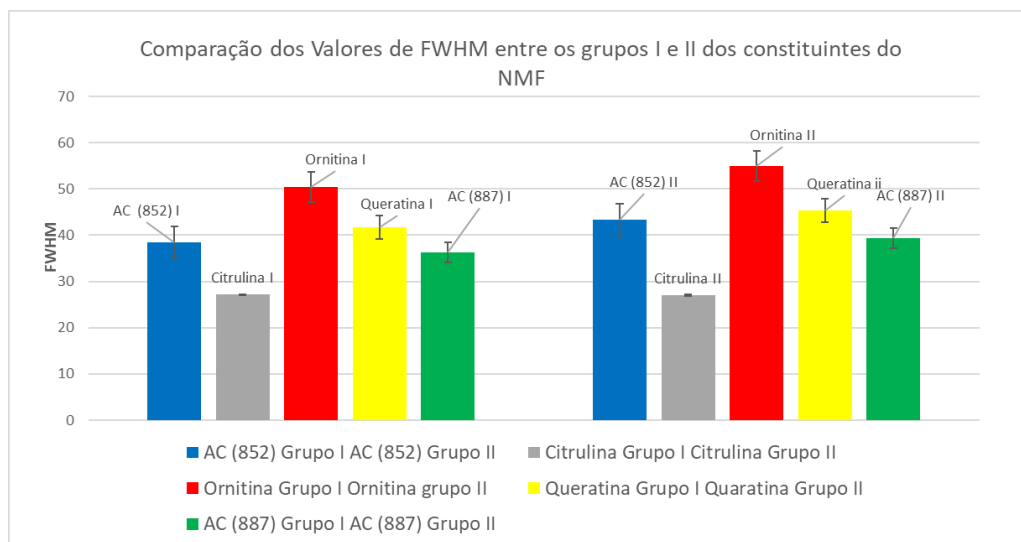
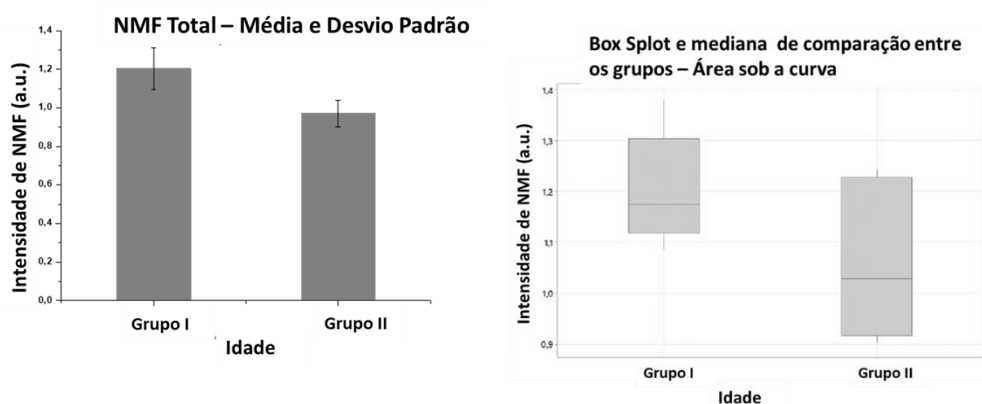


Figura 28- Valores de FWHM de cada constituinte de NMF, ácido carboxílico, citrulina, ornitina, e a comparação destes entre os grupos I (24-30) e II (52-59).



A figura 27 e 28 comparam os valores totais de área sob a curva e FWHM de cada constituinte encontrado, para cada grupo, mostrando valores similares de área sob a curva para ambos grupos com tendência de aumento para o grupo I, e valores maiores para o grupo II de FWHM, com exceção da citrulina.

Figura 29- NMF total com média e desvio padrão, e box splot de comparação entre os grupos I e II, para os valores totais de NMF.



- Teste t student:  $p < 0,05$ .

As figuras 28 e 29 mostra que tanto os valores de constituintes individuais de NMF, quanto o NMF total foram maiores para o grupo I e menores para o grupo II.

Nas figuras 28 e 29, a expressão de NMF diminui com a idade, e observa-se uma disparidade entre os grupos, alinhando-se com os achados de outros pesquisadores (BINIEK et al. 2012; BINIEK et al., 2015).

Na ausência de NMF, a capacidade de retenção de água do SC diminui na pele envelhecida, e as forças intermoleculares entre as cadeias de queratina se intensificam, resultando na redução da mobilidade desta cadeia, e, conseqüentemente, no aumento da rigidez no grupo mais velho (NAKAGAWA et al., 2004), além dos fatores extrínsecos mencionados anteriormente, como a radiação UV (BINIEK et al., 2015), que também leva ao aumento da rigidez da queratina com o passar do tempo.

Na figura 29, em concordância ao box plot apresentado, outro estudo mostrou que os níveis de NMF diminuem na pele bem hidratada, como ocorre na pele jovem (ENGEBRETSEN et al., 2018).

Quando o nível de hidratação da pele é baixo, a síntese de NMF é aumentada para ampliar a capacidade de retenção de água da pele, elevando a hidratação a níveis adequados (MUKHERJEE et al., 2015), mostrando que a produção de NMF ocorre de forma a corrigir o nível de hidratação.

Em concordância a isso, em outro estudo, demonstrado por análises imuno-histoquímicas, os níveis de filagrina foram reduzidos e a quantidade de aminoácidos do estrato córneo foi aumentada na faixa etária mais velha, sugerindo maior degradação da filagrina e conseqüente nova síntese de NMF (MUKHERJEE et al., 2015). Uma maior variação de NMF na pele mais velha, foi também observado em outros estudos feitos na bochecha e antebraço volar (EGAWA & TAGAMI, 2008), o que foi visto no box plot da figura 29.

O aumento observado na variação de NMF na pele mais velha, pode ser explicado pelo maior tempo de análise e por áreas superficiais maiores, conforme observou Gorzelanny et al., em 2006, utilizando a microscopia de força atômica, eles observaram que o SC da pele envelhecida, é caracterizado por um aumento de área de superfície unicelular, lacunas intercelulares proeminentes, e maior rugosidade superficial (GORZELANNY et al., 2006), o que sugere diminuição da renovação epidérmica e a presença de células mais maduras (MOHAMMED et al.,

2012). Isso resultaria em maior necessidade de expressão da filagrina, para aumentar os níveis de NMF em números absolutos, como mecanismo compensatório.

Na figura 29, esses resultados podem ser observados, maior variação de NMF é observada no grupo II (mais velho), devido sua maior síntese, mas com menor intensidade, em comparação com o grupo mais jovem.

Para testar diferenças entre os valores médios de NMF de dois grupos, foi aplicado o teste t de Student pareado, onde  $p < 0,05$ , foi considerado significativo, como visto nos resultados da figura 29.

Nouwen et al., em 2020, avaliaram o NMF, como um novo biomarcador clínico na dermatite atópica, examinando a associação de valores de NMF medidos clinicamente, com gravidade da dermatite atópica. O método fez medições não invasivas de NMF por espectroscopia Raman como uma abordagem para melhorar a análise clínica da dermatite atópica. Eles encontraram que a percentagem de pacientes com dermatite atópica grave, é significativamente maior no grupo com NMF diminuído, do que no grupo com NMF normal ( $P < 0,05$ ) (NOUWEN et al., 2020).

Em 2017, Choe et al., investigaram a relação entre os estados de ligação de hidrogênio da água com moléculas de NMF, dentro do SC usando microscopia confocal Raman *in vivo*. Seu estudo revelou que as moléculas de água no grupo mais velho, exibem hidrogênio em estados mais fortes de ligação com moléculas circundantes, incluindo moléculas de NMF adjacentes, em contraste com o grupo mais jovem, assim, o grupo mais jovem, apresentou maior concentração de moléculas de NMF livres, em uma profundidade variando de 60% a 90% da espessura do SC, quando comparado ao grupo mais velho (CHOE et al., 2017a).

Células do SC, os corneócitos, protegem a pele contra ressecamento e efeitos de agressões ambientais, regulando o fluxo e retenção de água, e corneócitos de indivíduos idosos liberam seu NMF mais facilmente (RAWLINGS et al., 2004), e há menor nível de lipídios intercelulares em SC de peles envelhecidas, com maiores lacunas, fornecendo uma barreira de água menos eficaz, e teoricamente, levando a uma maior lixiviação de NMF (CHOE et al., 2017a). Isso poderia piorar os níveis já baixos de NMF, em SC de peles envelhecidas.

A figura 29 explica os fatores mencionados acima também com a diminuição do NMF total para o grupo II.

A manutenção do nível ideal de hidratação do SC, depende de alguns fatores. Primeiro, os lipídios lamelares intercelulares, organizados predominantemente em uma fase de gel ortorrômbico, fornecem uma barreira eficaz para a passagem de água pelo tecido. O segundo fator é o NMF, e o terceiro a queratina.

Cada passo da maturação dos corneócitos, leva à formação de uma barreira de umidade eficaz, que inclui fortalecimento de corneócitos, processamento lipídico e geração de mais NMF, formando a matriz lipoproteica superficial com as fibras de queratina.

O avanço desses fatores mencionados, é influenciado pelo nível de hidratação anterior, se este já for alto, então esses fatores são atenuados. Esses processos, bem como a corneodesmólise final, passo em que ocorre a esfoliação, devido a quebra das ligações dos corneodesmosomas, que são estruturas que ligam um corneócito a outro, são frequentemente perturbados por agressões ambientais, resultando em condições de pele seca e escamosa, e estes efeitos se tornam mais proeminentes com a idade (FLUHR & ELIAS, 2002).

Outras técnicas analíticas para NMF, têm limitações devido ao processo de isolamento do SC, e do estresse induzido pela preparação da amostra, envolvendo imersão em água, o que pode levar à lixiviação dos componentes hidrofílicos do NMF (CHOE et al. 2017a).

## 7 Contribuições do presente trabalho para literatura atual

O conhecimento das estruturas proteicas e de hidratação utilizando a ERC, contribui com a literatura atual, pois elucida questões para estudos futuros sobre pele e as diferenças da pele jovem e envelhecida, bem como a sua homeostase, e sua função como órgão de proteção e termorregulação.

Conforme observou Lee e Kwon em 2023, questões atuais que impactam o meio ambiente, causam o aumento da exposição da pele ao ultravioleta, UV, e à poluição do ar, elevando os riscos de problemas dermatológicos como dermatites e fotoenvelhecimento, principalmente para a população que tem se tornado cada vez mais longeva. O presente trabalho apresenta novos resultados para a literatura, sobre as diferenças de pele entre faixas etárias, bem como entre as camadas, considerando o que ocorre em sua estrutura a nível molecular, com um diagnóstico

mais simples mantendo as condições do tecido natural, sem a necessidade de biópsias.

Tabela 10- Contribuição do presente trabalho para a literatura usando ERC.

CONTRIBUIÇÕES DO PRESENTE TRABALHO PARA ATUAL LITERATURA USANDO ERC	
Resultados de pesquisas anteriores	Contribuições desta pesquisa
<b>Caspers et al, 2001 e 2003</b> Obtiveram perfis de profundidade dos componentes do SC, do NMF, começaram a desenvolver instrumento Raman de varredura de profundidade automatizada, e mostraram que variações na concentração de NMF contribuem para as diferenças nos espectros Raman obtidos em diferentes profundidades.	Perfil de profundidades e componentes do NMF, lipídios e proteínas usando o software SkinTools para diferentes grupos etários e para o SC e EP.
<b>Bakker Schut et al, 2002</b> Desenvolveram um sistema de software para discriminação, entre diferentes tecidos humanos durante a análise Raman para pele saudável e patológica.	Raman atual usa medição contínua até 70 µm na pele <i>in vivo</i> , utilizando espectrômetro com microscopia confocal obtendo espectros em tempo real das biomoléculas de SC e EP.
<b>Chrit, et al., em 2005</b> Obtiveram variabilidade dos espectros Raman do SC, e as diferenças espectrais associadas à alterações na distribuição de proteínas, aminoácidos e lipídeos.	Variabilidades dos espectros Raman do SC e EP associadas à alterações na distribuição e arranjo de proteínas e lipídeos, para diferentes grupos etários e camadas da pele.
<b>Short et al., 2006; Lieber et al., 2008; CHOI et al., 2010</b> Observaram as diferentes contribuições de ácidos nucleicos, histonas e proteínas para análise do NMF ceramidas e lipídeos.	Variabilidades dos espectros Raman do SC e EP, associadas à alterações na distribuição e arranjo de proteínas e lipídeos, para diferentes grupos etários.
<b>Boncheva et al., 2009</b> Usaram medidas de condutância de alta frequência em comparação à técnica ERC, para determinar perfis de profundidade de hidratação do SC, discriminação de diferentes estágios de hidratação do SC.	Comparação do fator de hidratação NMF, em diferentes grupos etários e diferentes camadas usando software Skintools e discriminação entre faixas etárias e entre camadas.
<b>Ermakov et al, 2010; Oliveira et al, 2012</b> Utilizaram ERC na caracterização e no estudo da alteração de tecidos biológicos <i>in vivo</i> . Definição da concentração de água feita pelo estudo do NMF.	Perfis de profundidade dos componentes do NMF em diferentes grupos etários e em diferentes camadas.
<b>Tfayli, et al. 2012,</b> relataram variabilidade dos lipídeos com o envelhecimento, organização lateral dos lipídios com o aumento da idade dos voluntários usando ERC.	Análise das estruturas secundárias de lipídeos e proteínas, as amidas I e III, e sua alteração em diferentes faixas etárias e camadas.
<b>Bohling et al, 2014; Franzen et al, 2015; Binder et al., 2017.</b> Validaram um sistema de ERC para determinação da espessura do estrato córneo <i>in vivo</i> . Obtiveram informações a nível estrutural e molecular <i>in vivo</i> .	Atualmente as profundidades das camadas são conhecidas podendo ser analisadas até 70 µm com ERC. Análise molecular de lipídeos e proteínas e sua comparação em diferentes camadas e grupos etários.
<b>Zarmpi et al, 2023; Zhang et al, 2020; Liu e Lunter, 2020;Garvie-Cook et al., 2022; Wang et al., 2023; Alvarez-Figueroa et al, 2020.</b> Estes autores avaliaram absorção de fármacos e cosméticos na pele utilizando ERC.	Análise de alteração dos constituintes da pele natural, nas diferentes camadas da pele de diferentes grupos etários, e sem produtos tópicos, utilizando ERC com microscopia confocal e discriminação dos resultados por métodos estatísticos.

Tabela 11- Resumo das principais moléculas funcionais e seus fatores de alteração estudados.

FATORES IMPORTANTES DE ALTERAÇÃO	
ORGANIZAÇÃO E NÍVEL DE LIPÍDEOS INTERCELULARES	Barreiras lamelares para a passagem de água pelo tecido – lixiviação de NMF.
NMF	Inclui passo da maturação dos corneócitos, processamento lipídico e geração de novo NMF. O avanço desses dois fatores é influenciado pelo nível de hidratação anterior.
CORNEÓCITOS E CORNEODESMÓLISE FINAL	Protegem contra efeitos de agressões ambientais, regulando o fluxo e retenção de água, liberam NMF, esfoliação por agressões ambientais, resultando em condições de xerose, proeminentes com a idade → degradação de desmossomos
QUERATINA	Constituinte dos queratinócitos na EP, complexo filagrina-queratina no SC, atua como suporte proteico e regulação de água.
CERAMIDA	Constituinte da estrutura lipídica lamelar na EP, auxilia manutenção do nível de hidratação.

## 8 CONCLUSÃO

A microscopia confocal Raman foi utilizada para determinar os perfis de profundidade de principais parâmetros biofísicos do estrato córneo e da epiderme, incluindo a concentração de NMF, queratina e ceramida. Determinadas bandas Raman, como  $1340\text{ cm}^{-1}$ ,  $1450\text{ cm}^{-1}$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ , foram analisadas para obter as intensidades desses parâmetros.

O aumento da rigidez relacionado com a idade, dentro da matriz de queratina do estrato córneo, pode ser atribuído a fenômenos análogos à reticulação.

Assinaturas espectrais dentro da banda amida III de ceramida, bem como a banda amida I de proteínas (queratina), foram evidentes tanto no estrato córneo quanto na epiderme, portanto, essas moléculas neste estudo, funcionaram como biomarcadoras.

Este estudo ressaltou o potencial da ERC para monitorar o envelhecimento, e efeitos sobre lipídios e NMF *in situ* e *in vivo*, na superfície das camadas da pele. Observou-se que apesar da diminuição do NMF com a idade, existe um mecanismo de compensação para que ele retorne ao nível de equilíbrio ideal, o que aumentou sua variação no grupo mais velho, assim, o NMF pode ser um bom biomarcador analisado pela ERC.

As variações em intensidades entre faixas etárias, facilitaram a diferenciação entre os grupos de voluntários, através dos dendrogramas, para ambas as regiões da pele: SC e EP. Além disso, o acúmulo de alterações associadas à idade, impactou as estruturas celulares dentro do tecido da pele, em nas distinções vibracionais de moléculas através de espectros Raman.

Perspectivas futuras para este trabalho de pesquisa em pele, podem se concentrar a partir na análise da distribuição dos componentes fisiológicos, no diagnóstico de estados patológicos de doenças de pele, e implementação de perfis de profundidade do conteúdo de água da pele.

A ERC também pode ser usada, para avaliar testes cutâneos *in vitro*, e para estudos sobre engenharia de tecidos, com modelos baseados em perfis lipídicos.

Dispositivos microscópicos Raman podem melhorar detecção de câncer de pele, também poderão identificar áreas malignas *in vivo* de forma segura e não invasiva, avaliando a evolução de proteínas, lipídeos e NMF.

## 7 REFERÊNCIAS

ABAGARO, B.T.O. Espalhamento Raman em policristais de L-prolina sob altas pressões hidrostáticas. **Dissertação. 2009**. Mestrado em Física – Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ALVAREZ-FIGUEROA, M.J.; NARVÁEZ-ARAYA, D.; ARMIJO-ESCALONA, N.; CARRASCO-FLORES, E.A.; GONZÁLEZ-ARAMUNDIZ J.V. Design of Chitosan Nanocapsules with Compritol 888 ATO® for Imiquimod Transdermal Administration. Evaluation of Their Skin Absorption by Raman Microscopy. **Pharm Res.**v. 37 pp. 195, **2020**. Disponível em: doi:10.1007/s11095-020-02925-6. Acesso em 13 de mar. 2024.

BAILEY, A. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues, **Mech. Ageing Dev.**, v. 122, pp. 735–755, **2001**. Disponível em: doi: 10.1016/s00476374(01)00225-1. Acesso em 10 de mar. 2023.

BALAZ, B.; FARKAS, G.; BERKESI, O.; et al. Protein structure is changed in psoriatic skin on the unaffected region — Imaging possibility with ATR-FTIR spectroscopy. **Microchemical Journal** v.117, pp.183–186, **2014**. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.07.003>. Acesso em 10 de jun de 2021.

BELZER, A.; PARKER, E.R. Climate change, skin health, and dermatologic disease: A guide for the dermatologist. **Am. J. Clin.Dermatol.** v. 24, pp. 577–593, **2023**. Disponível em doi: 10.1007/s40257-023-00770-y. Acesso em 20 de mar 2024.

BERNARD, G.; AUGER, M.; SOUCY, J.; POULIOT, R. Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1770, pp. 1317–1323, **2007**. Disponível em: doi: 10.1016/j.bbagen.2007.06.014. Acesso em 15 de jun. 2021.

BERRY, N.; CHARMELL, C.; GOUJON, C.; et al. A clinical, biometrological and ultrastructural study of xerotic skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 21, pp.241-252, **1999**. Disponível em: doi: 10.1046/j.1467-2494.1999.196570.x. Acesso em 28 set. 2021.

BINDER, L.; SAFOURA, S.; BAIERL, A.; GRUBER, L.; WOLZT, M.; VALENTA, C. Confocal Raman spectroscopy: In vivo measurement of physiological skin parameters - A pilot study, **J. Dermatol. Sci.** v. 3, pp. 280–288, **2017**. Disponível em doi:10.1016/j.jdermsci.2017.08.002. Acesso em 23 de set. 2020.

BINIEK,K.; LEVI, K.; R.H. DAUSKARDT, R.H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin, **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 109, pp. 17111–17116, **2012**. Disponível em doi:10.1073/pnas.1206851109. Acesso em 10 de mar. 2023.

BINIEK, K.; KACZVINSKY, J.; MATTS, P.; DAUSKARDT, R.H. Understanding age-induced alterations to the biomechanical barrier function of human stratum corneum. **J. Dermatol. Sci.**, v. 80 pp. 94–101, **2015**. Disponível em doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.07.016. Acesso em 10 de mar. 2023.

BOIREAU-ADAMEZYK, E.; BAILLET-GUFFROY, A.; STAMATAS, G.N. Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. **Skin Res. Technology**, v. 20, pp. 409–415, **2014a**. Disponível em doi: 10.1111/srt.12132. Acesso em 15 de ago. de 2022.

BOIREAU-ADAMEZYK, E.; et al. Mobility of Water Molecules in the Stratum Corneum: Effects of Age and Chronic Exposure to the Environment. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, pp. 2046–2049, **2014b**. Disponível em: doi:10.1038/jid.2014.96. Acesso em 15 de ago. de 2022.

BOHLING, A.; BIELFELDT, S.; HIMMELMANN, A.; KESKIN, M.; WILHELM, K.P. Comparison of the stratum corneum thickness measured in vivo with confocal Raman spectroscopy and confocal reflectance microscopy, **Ski. Res. Technol.** v. 20, pp.50-57, **2014**. Disponível em doi: 10.1111/srt.12082. Acesso em 23 de set. 2023.

BONCHEVA, M.; STERKE, J.; CASPERS, P.J.; PUPPELS, G.J. Depth profiling of stratum corneum hydration in vivo: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements, **Exp. Dermatol.** v.18, pp.870-876, **2009**. Disponível em doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00868.x. Acesso em 23 de set. 2023.

BOUWSTRA, J.A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochim Biophys Acta**, v. 758, pp. 2080-95, **2006**. Disponível em doi: 10.1016/j.bbamem.2006.06.021. Acesso em 15 de ago. 2022.

CAETANO, L.V.N.; MENDES, T.O.; BAGATIN, E. In vivo confocal Raman spectroscopy for intrinsic aging and photoaging assessment. **Journal of Dermatological Science**, v.18, pp.199-206, **2017**. Disponível em: doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.07.011. Acesso em 04 de out 2019.

CÁRCAMO, J.J.; ALIAGA, A.E.; CLAVIJO, R.E.; BRAÑES, M.R.; CAMPOS-VALLETTE, M.M. Raman study of the shockwave effect on collagens.

**Spectrochim. Acta A**, v. 86, pp. 360-5, **2012**. Disponível em doi: 10.1016/j.saa.2011.10.049. Acesso em 17 de fev 2024.

CASPERS, P.J.; LUCASSEN, G.W.; CARTER, E.A.; BRUINING, H.A.; PUPPELS, G.J. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: Noninvasive determination of molecular concentration profiles. **Journal of Investigative Dermatology**, v.116, pp. 434-42, **2001**. Disponível em: doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01258.x. Acesso em 01 de dez de 2021.

CASPERS, P.J.; LUCASSEN, G.W.; PUPPELS, G.J.; Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. **Biophysical Journal**, v.85, pp.572-580, **2003**. Disponível em: doi: 10.1016/S0006-3495(03)74501-9. Acesso em 04 de out. 2019.

CAUSSIN J.; et al. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. **Biochim Biophys Acta** v. 1778, pp. 1472–1482, **2008**. Disponível em doi: 10.1016/j.bbamem.2008.03.003. Acesso em 16 de fev. 2024.

CHAN, J.W.; TAYLOR, D.S.; ZWERDLING, T.; LANE, S.M.; IHORA, K., HUSER, T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. **Biophys J**. v. 15, pp. 648-56, **2006**. Disponível em doi: 10.1529/biophysj.105.066761. Acesso em 17 de fev 2024.

CHEN, B.-C.; SUNG, J.; LIM, S.-H. Chemical Imaging with Frequency Modulation Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy at the Vibrational Fingerprint Region, **J. Phys. Chem.** v. 114, pp. 16871–16880, **2010**. Disponível em doi: 10.1021/jp104553s. Acesso em 23 de set. 2023.

CHENG, W.T.; et al. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. **Microsc Res Tech**, v. 68, pp.75–79, **2005**. Disponível em: doi: 10.1002/jemt.20229. Acesso em 29 de set. 2021.

CHERMPRAPAI, S.; BROERE, F.; GOORIS, G.; SCHLOTTER, Y.M.; RUTTEN, V.P.M.G.; BOUWSTRA, J.A. Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. **Bba - Biomembr.**, v. 1860, pp. 526–533, **2018**. Disponível em: doi: 10.1016/j.bbamem.2017.11.013. Acesso em 20 de mar 2024.

CHRIT, L.; HADJUR, C.; MOREL, S.; SOCKALINGUM, G.; LEBOURDON, G.; LEROY, F.; MANFAIT, M. In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. **J Biomed Opt.** v.10, pp.44-7, **2005**. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16178641/>. Acesso em: 18 de fev. 2022.

CHOI J.; CHOO J.; CHUNG H.; GWEON D.G.; PARK, J.; KIM, H.J.; et al. Direct observation of spectral differences between normal and basal cell carcinoma (BCC) tissues using confocal Raman microscopy. **Biopolymers**, v. 77, pp. 264-72, **2005**. Disponível em DOI: 10.1002/bip.20236. Acesso em 01 de dez de 2021.

CHOI, B.; SCHNALL, P.L.; YANG, H.; DOBSON, M.; LANDSBERGIS, P.; ISRAEL, L.; KARASEK, R.; BAKER, D. Sedentary work, low physical jobdemand, and obesity in US workers. **Am. J. Ind. Med.**, v. 53, pp. 1088–1101, **2010**. Disponível em: doi: 10.1002/ajim.20886. Acesso em 20 de mar. 2024.

CHOE, C.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E. Confocal Raman microscopy for investigating the penetration of various oils into the human skin in vivo. **Dermatol Sci.** v. 79, pp. 176-178. **2015**. Disponível em doi:10.1016/j.jdermsci.2015.05.004. Acesso em 25 de mar. 2024.

CHOE, C.; SCHLEUSENERA, J.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E. Age related depth profiles of human Stratum Corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo. **Mech. of Ageing and Development**, v. 172, pp. 6-12, **2017b**. Disponível em doi:10.1016/j.mad.2017.08.011.

CHOE, C.; SCHLEUSENER, J.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E. Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using in vivo confocal Raman microscopy. **Scientific Reports**, v. 7, pp. 1-13, **2017a**. Disponível em doi:10.1038/s41598-017-16202-x. Acesso em: 24 de fev. de 2023.

CHOE, C.; CHOE, S.; SCHLEUSENER, J.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E. Modified normalization method in in vivo stratum corneum analysis using confocal Raman microscopy to compensate nonhomogeneous distribution of keratin. **J. Raman Spectroscopy**, v. 50, pp. 945-957, **2019**. Disponível em: doi.org/10.1002/jrs.5596.

CODERCH, L.; LÓPEZ, O.; MAZA, A.; JOSÉ, L.; PARRA, J.L. Ceramides and Skin Function. **Am J Clin Dermatology**, v. 4, pp. 107-129, **2003**. Disponível em: doi: 10.2165/00128071-200304020-00004. Acesso em 18 de dez de 2019.

CZAMARA, K.; MAJZNER, K.; PACIA, M.Z.; KOCHAN, K.; KACZOR, A.; BARANSKA, M. Raman spectroscopy of lipids : a review. **J. Raman Spectroscopy**, v. 46, pp. 4-20, **2015**. Disponível em: doi.org/10.1002/jrs.4607. Acesso em 04 de dez 2019.

DAMIEN, F.; BONCHEVA, M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. **J Invest Dermatol** v. 130, pp. 611–614, **2010**. Disponível em doi: 10.1038/jid.2009.272. Acesso em 17 de fev 2024.

DUKOR, R.K. Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer. **Biomedical Applications**, pp. 3335-3361, **2006**. Disponível em doi: 10.1002/9780470027325.s8107. Acesso em 17 de fev 2024.

DU VIVIER, A. **Atlas de dermatologia clínica**. 2ª ed. São Paulo:Manole, **1997**. 776 p.

EICHHORN, S.J; et al. Deformation mechanisms in cellulose fibres, paper and wood. **Materials Science**, v. 6, pp. 3129–3135, **2001**. Disponível em: DOI: 10.1023/A:1017969916020. Acesso em 20 de nov 2022.

EGAWA, M.; TAGAMI, H. Comparison of the depth profiles of water and waterbinding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes and artificial forced hydration. **Br. J. Dermatology**, v. 158, pp. 251–260, **2008**. Disponível em doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08311.x. Acesso em 24 de fev de 2023.

ENGEBRETSEN, K.A.; KEZIC, S.; RIETHMULLER, C.; FRANZ, J., et al., Changes in filaggrin degradation products and corneocyte surface texture by season, **Br. J. Dermatol.** v.178, pp. 1143–1150, **2018**. Disponível em doi: 10.1111/bjd.16150. Acesso em 18 de set. 2023.

FEINGOLD, K.R. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin, **J. Lipid Res** v. 50, pp. S417–S422, **2009**. Disponível em doi: 10.1194/jlr.R800039-JLR200. Acesso em 20 de set. 2023.

FITZPATRICK, T.B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. **Arch Dermatol.**, 124, pp. 869-871, **1988**. Disponível em: doi:10.1001/archderm.1988.01670060015008. Acesso em 20 de mar. 2024.

FOSTER, M.; BOLZINGER, M-A.; MONTAGNAC, G.; BRIAÇON, S. Confocal Raman microspectroscopy of the skin. **Eur J Dermatol.**, v. 2, pp. 851-63, **2011**. Disponível em: doi: 10.1684/ejd.2011.1494. Acesso em 26 de maç. 2024.

FRANZEN, L. Towards drug quantification in human skin with confocal Raman microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, pp. 437-444, **2013**. Disponível em doi 10.1016/j.ejpb.2012.11.017. Acesso em 04 de out. 2019.

FRANZEN, L.; WINDBERGS, M.; Applications of Raman spectroscopy in skin research – From skin physiology and diagnosis up to risk assessment and dermal drug delivery, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 89, pp. 91-104, **2015**. Disponível em doi: 10.1016/j. addr.2015.04.002. Acesso em 23 de set. 2023.

GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A.; THEODORIDIS, A.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. Skin anti-aging strategies. **Dermatoendocrinol.**, v. 4, pp. 308-319, **2012**. Disponível em doi:10.4161/derm.22804. Acesso em 23 de mar. 2023.

GANIM, Z.; CHUNG, H.S.; SMITH, A.W.; DEFLORES, L.P.; JONES, K.C.; TOKMAKOFF, A. Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins. **Acc Chem Res**, v.41, pp. 432-441, **2008**. Disponível em doi:10.1021/ar700188n. Acesso em 13 de fev de 2024.

GARIDEL P. Structural organisation and phase behaviour of a stratum corneum lipid analogue: ceramide 3A. **Chem Phys Chem** v. 8, pp. 2265–2275, **2005**. Disponível em3 doi: 10.1039/b517540b. Acesso em 16 de fev 2024.

GARO, A.; HRAPKO, M.; VAN DOMMELEN, J. A.; PETERS, G. W. Towards a reliable characterisation of the mechanical behaviour of brain tissue: The effects of post-mortem time and sample preparation. **Biorheology**, v.44, pp. 51-58, **2007**. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17502689/>. Acesso em 28 de jun. 2021.

GARVIE-COOK, H.; HOPPEL, M.; GUY, R.H. Raman Spectroscopic Tools to Probe the Skin-(Trans)dermal Formulation Interface. **Mol Pharm**, v. 19, pp. 4010-4016, **2022**. Disponível em: doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00480. Acesso em 14 de mar. 2024.

GASIOR-GŁOGOWSKA M.; KOMOROWSKA, M.; HANUZA, J.; MACZKA, M.;ZAJAC, A.; PTAK, M.; BEDZINSKI, R.; KOBIELARZ, M.; MAKSYMOWICZ, K.; KUROPKAF, P.; SZOTEK, S. FT-Raman spectroscopic study of human skin subjected to uniaxial stress. **Journal of the Mechanical behavior of biomedical**

**materials**, v.18, pp. 240-252, **2013**. Disponível em: [https://doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.11.023](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.11.023). Acesso em 20 de out. de 2019.

GLENN, J.V.; BEATTIE, J.R.; BARRETT, L.; et al. Confocal Raman microscopy can quantify advanced glycation end product (AGE) modifications in Bruch's membrane leading to accurate, nondestructive prediction of ocular aging. **FASEB Journal**, v. 21, pp. 3542-52, **2007**. Disponível em: doi: 10.1096/fj.06-7896com. Acesso em: 04 de mar. 2021.

GONZALEZ, F.J.; CASTILLO-MARTÍNEZ, C.; MARTÍNEZ-ESCANAM, M.; RAMÍREZ-ELÍAS, M.G.; et al. Noninvasive estimation of chronological and photoinduced skin damage using Raman spectroscopy and principal component analysis. **Skin Research and Technology**, v. 18, pp. 442-446, **2012**. Disponível em doi: 10.1111/j.1600-0846.2011.00591.x. Acesso em 23 de mar. 2023.

GORZELANNY, C.; GOERGE, T.; E.M. SCHNAEKER, E.M.; et al. Atomic force microscopy as an innovative tool for nanoanalysis of native stratum corneum, **Exp. Dermatol.** v.15, pp. 387–391, **2006**. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2006.00424.x>. Acesso em 22 de set. 2023.

HENDRIKS, F. M.; OOMENS, C. W. J.; BAAIJENS, F. P. T.; BROKKEN, D. Influence of hydration and experimental length scale on the mechanical response of human skin in vivo, using optical coherence tomography. **Skin Research and Technology**, v. 10, pp. 231-241, **2004**. Disponível em: doi: 10.1111/j.1600-0846.2004.00077.x. Acesso em 28 de jun. 2021.

HANUZA, J; et al. FT-Raman spectroscopic study of thoracic aortic wall subjected to uniaxial stress. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 41, pp.1163–1169, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jrs.2554>. Acesso em 20 de nov 2022.

HARRIS, M.I.N.C. **Pele Estrutura Propriedades e Envelhecimento**. 3. ed. São Paulo: SENAC, 2009.352 p.

HOFELMANN, K.C.G. **Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier e análise de molhabilidade nos filmes finos de carbono amorfo hidrogenado (a-C:H)**. 2013. **Dissertação**. 67f. Mestrado em Física. Centro de Ciências Tecnológicas. Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, Santa Catarina, **2013**.

JEANMAIRE, C.; DANOUX, L.; PAULY, G. Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an in vivo and in vitro model study, **Br. J. Dermatology**, v. 145, pp. 10–18, **2001**. Disponível em doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04275.x. Acesso em 21 de mar. 2023.

KEARNEY, J. N. Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. **Clinical Dermatology**. v. 23, pp. 357-364, **2005**. Disponível em DOI: 10.1016/j.clindermatol.2004.07.018. Acesso 28 de jun 2021.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures **Acta Biochim. Biophys. SIN.**, V. 39, PP. 549-559, **2007**. Disponível em: doi: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x. Acesso em 17 de fv 2024.

LARKIN, P.J. **IR and Raman Spectroscopy – Principles and Spectral Interpretation**. San Diego – CA, USA. Elsevier, **2011**, 239 p.

LAUGEL, C.; YAGOUBI, N.; BAILLET, A. ATR-FTIR spectroscopy: a chemometric approach for studying the lipid organisation of the stratum corneum. **Chem Phys Lipids** v. 135, 55–68, **2005**. Disponível em: doi: 10.1016/j.chemphyslip.2005.02.001. Acesso em: 16 de fev. 2024.

LEE, J.; KWON, K.H. Sustainable Countermeasures for Skin Health Improvement for Green Consumers: The Utilization of Hsian-Tsao during Global Warming. **Sustainability** v. 15, pp.1-18, **2023**. Disponível em: doi.org/10.3390/su151914619. Acesso em 20 de mar. 2024.

LEONARDI, G.R.; *Cosmetologia aplicada*, v. 51, Medfarma, São Paulo, **2005**.

LIEBER, C.A.; MAJUMDER, S.K.; BILLHEIMER, D.; ELLIS, D.L.; MAHADEVAN-JANSEN, A. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. **Journal of Biomedical Optics**, v.13, pp.024013, **2008**. Disponível em doi: 10.1117/1.2899155. Acesso em 01 de dez de 2021.

LIU, Y.; LUNTER, D.J. Systematic Investigation of the Effect of Non-Ionic Emulsifiers on Skin by Confocal Raman Spectroscopy—A Comprehensive Lipid Analysis. **Pharmaceutics**, v.12, pp. 1-16, **2020**. Disponível em doi:10.3390/pharmaceutics12030223. Acesso em 20 de mar 2024.

LÓPEZ-ALONSO, J.M.; ALDA J.; BERNABEU E. Principal component characterization of noise for infrared images. **Appl Opt.** v. 41: pp. 320–331, **2002**. Disponível em <https://doi.org/10.1364/AO.41.000320>. Acesso em: 23 de mar de 2023.

LUNG, P.W.; *et al.* In vivo study of dermal collagen of striae distensae by confocal Raman spectroscopy, **Lasers Med Sci**, v. 33, pp. 609-617, **2017**. Disponível em: doi: 10.1007/s10103-017-2431-3. Epub 2018 Jan 7.. Acesso em 29 de set. 2021.

MACHADO, M.A.C. **Estudo do espalhamento Raman de efeitos anarmonicos e transição de fase do PbTiO<sub>3</sub>:Sm<sup>3+</sup> induzidos por pressão hidrostática e variação de temperatura**. 2007. Tese. 150f. Doutorado em Física. Centro de Ciencias Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, **2007**.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. Molecular mechanisms of skin aging: State of the art. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1119, pp. 40–50, **2007**. Disponível em: doi: 10.1196/annals.1404.027.

MAO, G.; FLACH, C.R.; MENDELSON, R.; WALTERS, R.M. Imaging the distribution of sodium dodecyl sulfate in skin by confocal Raman and infrared microspectroscopy, **Pharm. Res.** v. 29, pp. 2189–2201, **2012**. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0748-y>. Acesso em: 02 de out. 2023.

MARTIN, A.A.; SOTO, C.A.T.; ALI, S.M.; NETO, L.P.M.; CANEVARI, R.A.; PEREIRA, L.; FÁVERO, P.P. Applications of Raman Spectroscopy in Life Science. **SPIE**, v. 9531, pp. 1-7, **2015**. Disponível em: doi:10.1117/12.2180653. Acesso em 05 de ago. 2020.

MARKS, J.G.; MILLER, J.J. Structure and function of the skin, 6<sup>a</sup> ed., Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology, Pennsylvania, **2017**.

MATSUMOTO, Y.; MOCHIMARU, N.; YASUDA, H.; et al. In vivo analysis stratum corneum of Japanese neonates and infants using confocal Raman spectroscopy: a pilot study. **Skin Research and Technology**, v. 29, **2023**. Disponível em doi:10.1111/srt.13276. Acesso em 13 de mar. 2024.

MASUKAWA, Y.; NARITA, H.; SHIMIZU, E.; et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. **J Lipid Res**, v. 49: 1466–1476, **2008**. Disponível em: doi: 10.1194/jlr.M800014-JLR200. Acesso em 17 de fev. 2024.

MEERWALDT, R.; GRAAFF, R.; OOMEN, P.H.N. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. **Diabetologia**, v. 47, pp.1324-1330, **2004**. Disponível em: doi: 10.1007/s00125-004-1451-2. Acesso em 04 de mar. 2022.

MILAN, A.L.K. **Espectroscopia de Infravermelho na avaliação da hidratação cutânea de idosas pelo uso tópico de nicotinamida**. Dissertação. **2006**. 83f. Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MOHAMMED, D.; MATTS, P.J.; HADGRAFT, J.; et al. Variation of stratum corneum biophysical and molecular properties with anatomic site, **AAPS J**. v. 14, pp. 806–812, **2012**. Disponível em doi.org/10.1208/s12248-012-9400-3. Acesso em 18 de set. 2023.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Appl. Spectroscopy Rev.** v. 42, pp. 493–541, **2007**. Disponível em [doi.org/10.1080/05704920701551530](https://doi.org/10.1080/05704920701551530). Acesso em: 05 de ago. de 2020.

MUKHERJEE, S., CHANDRASHEKAR, B.; GAIKWAD, R.; Cleansers: To use or not to use, Indian **J. Pediatr. Dermatol.** v. 16, pp. 193–197, **2015**. Disponível em [doi.org/10.4103/2319-7250.165611](https://doi.org/10.4103/2319-7250.165611). Acesso em 19 de set. 2023

NAKAGAWA, N.; SAKAI, S.; MATSUMOTO, M.; YAMADA, K.; NAGANO, M.; YUKI, T., et al. Relationship between NMF (lactate and potassium) content and the physical properties of the stratum corneum in healthy subjects, **J. Invest. Dermatology**, v. 122, pp. 755–763, **2004**. Disponível em: [doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22317.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22317.x). Acesso em 23 de mar. de 2023.

OHNARI, H.; NARU, E.; SAKATA, O.; OBATA, O.; Distribution of Domains Formed by Lateral Packing of Intercellular Lipid in the Stratum Corneum. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 71, pp. 31-40, **2023**. Disponível em: [doi: 10.1248/cpb.c22-00533](https://doi.org/10.1248/cpb.c22-00533). Acesso em: 18 de dez. 2019.

OCARIS, E.R.Y. **Identificação, evolução e transformação de compostos de silício em uma biomassa tratada termicamente até altas temperaturas**. 2019. **Tese**.120f. Doutorado em Física. Centro de Ciências Exatas. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, **2019**.

OLIVEIRA, P.K. Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. 2011. **Dissertação**. 65f. Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, **2011**.

OLIVEIRA, P.K.; TOSATO, M.G.; ALVES, R.S.; MARTIN, A.A.; FAVERO, P.P.; RANIERO, L.J. Análise da Composição bioquímica da pele por Espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 28, pp. 278-287, **2012**. Disponível em: [doi.org/10.4322/rbeb.2012.032](https://doi.org/10.4322/rbeb.2012.032) Acesso em: 04 de out. 2019.

O'REGAN, G.M.; KEMPERMAN, P.M.J.H.; SANDILANDS, A.; CHEN, H.; CAMPBELL, L.E.; KROBOTH, K.; WATSON, R.; ROWLAND, M.; PUPPELS, G.J.; MCLEAN, W.H.I.; CASPERS, P.J.; IRVINE, A.D. Raman profiles of the stratum corneum define 3 filaggrin genotype-determined atopic dermatitis endophenotypes. **J. Allergy Clin. Immunology**, v. 126, pp. 574-U270, **2010**. Disponível em doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.038. Acesso em 11 de mar. 2023.

PAPPAS, A. Epidermal surface lipids, **Dermatoendocrinol**, v. 2, pp. 72–76, **2009**. Disponível em <https://doi.org/10.4161/derm.1.2.7811>. Acesso em 20 de set. 2023.

PENTEADO, S.C, et al. Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier Transform-Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v.13, pp. 14-18, **2008**. Disponível em: doi: 10.1117/1.2841017. Acesso em 04 de out. 2019.

PEREIRA, A.F.M. **Efeitos da radiação solar no envelhecimento da pele humana avaliados pela Espectroscopia Raman**. Tese. **2019**. 73f. Doutorado em Engenharia Biomédica. Departamento de Engenharia Biomédica. Universidade Brasil, São Paulo, 2019.

PEZZOTTI, G.; BOFFELLI, M.; MIYAMORI, D.; et al. Raman spectroscopy of human skin: looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age. **J Biomed Optics**, v. 20, pp. 1-19, **2015**. Disponível em: doi: 10.1117/1.JBO.20.6.065008. Acesso em: 18 de dez. 2019.

PUDLAS, M.; KOCH, S.; BOLWIEN, C.; WALLEES, H. Characterization of human skin cells for tissue engineering applications by Raman spectroscopy. **Optics in Tissue Engineering and Regenerative Medicine IV, Proc. of SPIE** v. 7566, 5p, **2010**. Disponível em: doi.org/10.1117/12.840636. Acesso em> 20 de jun. 2024.

PULLAR, J.M.; CARR, A.C.; VISSERS, M.C.M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. **Nutrients**, v. 9, pp. 1-27, **2017**. Disponível em: doi:10.3390/nu9080866. Acesso em: 06 de mai. 2019.

RAWLINGS, A.V.; HARDING, C.R. Moisturization and skin barrier function. **Dermatol Ther.**, v. 17, pp. 43-8, **2004**. Disponível em doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04s1005.x. Acesso em 15 de mar. 2024.

REREK M.E.; et al. FTIR spectroscopic studies of lipid dynamics in phytosphingosine ceramide models of the stratum corneum lipid matrix. **Chem Phys Lipids** v. 134, pp; 51–58, **2005**. Disponível em: doi:10.1016/j.chemphyslip.2004.12.002. Acesso em 16 de fev. 2024.

RYGULA, A.; MAJZNER, K.; MARZEC, K.M.; KACZOR, A. Raman spectroscopy of proteins: a review. **J Raman Spectroscopy**, v. 44, pp. 1061–1076, **2013**. Disponível em: doi 10.1002/jrs.4335. Acesso em 12 de abr. 2021.

SANDILANDS, A.; SUTHERLAND, C.; IRVINE, A.D.; MCLEAN, W.H.I. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. **Journal of Cell Science**, v. 122, pp. 1285-1294, **2009**. Disponível em doi:10.1242/jcs.033969. Acesso em 13 de mar. 2023.

SASSON, C.S. **Influencia de veículos cosméticos na permeação cutânea** Dissertação. **2006**.111f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vib. Spectr**, v. 43, pp. 13-25, **2007**. Disponível em: doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001. Acesso em 17 de fev 2024.

SOUSA, S.M.C. **Papel das ceramidas na fisiopatologia da pele**. Monografia. **2017**. 53f. Monografia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto - Portugal, 2017.

SHORT, M.A.; LUI, H.; MCLEAN, D.; ZENG, H.S.; ALAJLAN, A.; CHEN, X.K.; et al. Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell

carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 11, p. 9, **2006**. Disponível em: doi: 10.1117/1.2209549. Acesso em 01 de dez de 2021.

SILVA, V.R.L. **Desenvolvimento de formulações cosméticas hidratantes e avaliação da eficácia por métodos biofísicos**. Tese. **2009**. 182f. Doutorado em Fármaco e Medicamentos – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2009.

TEIXEIRA, A.P. **Avaliação *in vivo* da pele humana facial por espectroscopia Raman confocal: ação de cosmético**. Dissertação. **2013**. Mestrado em Engenharia Biomédica. Universidade do Vale do Paraíba. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2013.

TEIXEIRA, A.P.; RANGEL, J.L.; RANIERO, L.J.; TOSATO, M.G.; FÁVERO, P.P.; MARTIN, A.A. Confocal Raman spectroscopy: determination of natural moisturizing factor profile related to skin hydration. **Rev. Bras. Eng. Bioméd.**, v. 30, p. 11-16, **2014**. Disponível em: dx.doi.org/10.4322/rbeb.2014.002 Acesso em 06 de set. 2022.

TÉLLEZ S, C.A.; PEREIRA, L.; SANTOS, L.; FÁVERO, P.P.; MARTIN, A.A. RM1 semi empirical and DFT: B3LYP/3-21G theoretical insights on the confocal Raman experimental observations in qualitative water content of the skin dermis of healthy young, healthy elderly and diabetic elderly women's. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.x, pp. 1-11, **2015**. Disponível em doi: 10.1016/j.saa.2015.06.110. Acesso em 06 de set. 2022.

TFAYLI, A; GUILLARD,E; MANFAIT, M; BAILLET-GUFFROY, A. Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains. **Anal Bioanal Chem** v. 397, pp; 1281–1296, **2010**. Disponível em: doi:10.1007/s00216-010-3614-y. Acesso em 16 de fev 2024.

TFAYLI, A; GUILLARD,E; MANFAIT, M; BAILLET-GUFFROY, A. Raman spectroscopy: feasibility of *in vivo* survey of stratum corneum lipids, effect of natural

aging, **Eur. J. Dermatology** v. 22, pp. 36-41, **2012**. Disponível em [doi.org/10.1684/ejd.2011.1507](https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1507). Acesso em 28 de set 2023.

TOSATO, M.G.; SANTOS, E.P.; ALVES, R.S.; RANIERO, L.; PRISCILA, F.C.M.; KRUGER, O.; PAES, C.E.; MARTIN, A.A. In Vivo Raman Spectroscopy of Biochemical Changes in Human Skin by Cosmetic Application. **Biomedical Vibrational Spectroscopy IV: Advances in Research and Industry**, v. 7560, pp.1-7, **2010**. Disponível em: [doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.030](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.030). Acesso em: 06 de set. 2022.

TIPPAVAJHALA, V.K.; MENDES, T.O.; MARTIN, A.A. In Vivo Human Skin Penetration Study of Sunscreens by Confocal Raman Spectroscopy. **AAPS PharmSciTech**, pp.1-8, **2017**. Disponível em [doi:10.1208/s12249-017-0852-8](https://doi.org/10.1208/s12249-017-0852-8). Acesso em: 20 de mar. 2024.

VARDAKI, M.Z.; SERETIS, K.; GAITANIS, G.; BASSUKAS, I.D.; KOURKOUHELIS, N. Assessment of Skin Deep Layer Biochemical Profile Using Spatially Offset Raman Spectroscopy. **Appl. Sci.** v. 11, pp. 1-14, **2021**. Disponível em: [doi.org/10.3390/app11209498](https://doi.org/10.3390/app11209498). Acesso em 13 de mar. 2024.

WARTEWIG, S.; NEUBERT R.H. Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure: a review Part 1: ceramides. **Skin Pharmacol Physiol** v. 20, pp. 220–229, **2007**. Disponível em: [doi: 10.1159/000104420](https://doi.org/10.1159/000104420). Acesso em 16 de fev 2024.

WARTEWIG, S, NEUBERT, R.H.H. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. **Adv Drug Deliver Rev**, v.57, pp.1144-70, **2005**. Disponível em: [doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.022](https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.022). Acesso em 26 de mar. 2024.

WILLITS-SMITH, A.; ODINGA, H.; O'MALLEY, K.; ROSE, D. Demographic and socioeconomic correlates of disproportionate beef consumption among US adults in an age of global warming. **Nutrients**, v. 15, pp. 3795, **2023**. Disponível em: [doi.org/10.3390/nu15173795](https://doi.org/10.3390/nu15173795). Acesso em 20 de mar. 2024.

ZARMP, P.; TABOSA, A.M, PAULINE VITRY,P.; ANNETTE L. BUNGE, A.L.; et al. Confocal Raman Spectroscopic Characterization of Dermatopharmacokinetics Ex Vivo. **Mol. Pharmaceutics**, v. 20, pp. 5910–5920, **2023**. Disponível em doi/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00755?ref=PDF. Acesso em: 13 de mar. 2024.

ZHANG, Q.; FLACH, C.R.; MENDELSON, R.; PAGE, L.; WHITSON, S.; BETTEX, M.B. Visualization of Epidermal Reservoir Formation from Topical Diclofenac Gels by Raman Spectroscopy. **J Pain Res.** v.13: 1621–1627, **2020**. Disponível em: doi: 10.2147/JPR.S253069. Acesso em: 13 de mar. 2024.

ZHANG, Y.; AUSTIN, J.M.; FENG, X. et al. Assessment of Raman Spectroscopy for Reducing Unnecessary Biopsies for Melanoma Screening. **Molecules**, v. 25, pp.1-9, **2020**. Disponível em: doi:10.3390/molecules25122852. Acesso em 20 de jun. 2024.

ZUHAYRI, H.; SAMARINOVA, A.A.; BORISOV, A.V, et al. Quantitative Assessment of Low-Dose Photodynamic Therapy Effects on DiabeticWound Healing Using Raman Spectroscopy. **Pharmaceutics** v.15, 22p, **2023** Disponível em: doi:10.3390/pharmaceutics15020595. Acesso em: 20 de jun. 2024.

APÊNDICE A – Título do apêndice A

ANEXO A – Título do anexo A



UNIVERSIDADE BRASIL

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: [REDACTED]

Pesquisador: [REDACTED]

Área Temática: [REDACTED]

Versão: 1

CAAE: [REDACTED]

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE BRASIL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

Número do Parecer: [REDACTED]

Apresentação do Projeto:

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Geral

Objetivos Específicos

- Testar a funcionalidade do software tipo aplicativo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos

Riscos decorrentes do estudo como: não conseguir desempenho no aplicativo devido ao usuário

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 235

Bairro: ITAQUERA

CEP: 08.230-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2070-0167

E-mail: comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br