

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

MAIRA GASPAR TOSATO

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA PELE HUMANA SOB EFEITOS DE
COSMECÊUTICOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

São José dos Campos, SP

2010

MAIRA GASPAR TOSATO

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA PELE HUMANA SOB EFEITOS DE
COSMECÊUTICOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof^o. Dr. Airton A. Martin

São José dos Campos, SP

2010

T654a

Tosato , Maira Gaspar

Análise dos constituintes da pele humana sob efeitos de cosmecêuticos por espectroscopia Raman / Maira Gaspar Tosato. Orientadores: Prof. Dr. Airton A. Martin.-- São José dos Campos, 2010.

1 Disc laser.: color

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2010.

1. Pele 2. Envelhecimento da pele 3. Cosméticos 4. Análise espectral Raman I Martin, Airton Abrahão, Orient. III. Título

CDU: 611.7

Autorizo a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica, desde que citada à fonte e somente para fins acadêmicos e científicos.

Assinatura do aluna:



Data da defesa:

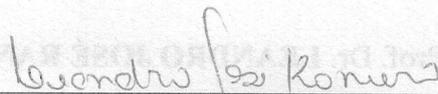
19/4/2010

MAIRA GASPAR TOSATO

**“ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA PELE HUMANA SOB EFEITOS DE
COSMECÊUTICOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

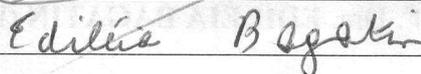
Prof. Dr. **LEANDRO JOSÉ RANIERO** (UNIVAP)



Prof. Dr. **AIRTON A. MARTIN** (UNIVAP)



Profª. Dra. **EDILÉIA BAGATIN** (UNIFESP)



Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 19 de abril de 2010.

Dedico especialmente ao meu Senhor e pai, presente em todos os segundos de minha existência, através do seu amor verdadeiro e incondicional.

A minha eternamente amada avó Cacilda (*in memoriam*) que me deixou lições de sabedoria para toda a vida.

Aos meus pais, mais que essenciais, Roberto e Vera por suas orações, amor e apoio.

As minhas irmãs maravilhosas, Natalia, Livia, Poliana, Larissa e Tamara pelo companheirismo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as voluntárias que, gentilmente, colaboraram e se dispuseram em participar deste estudo, pois foram parte fundamental na realização desta pesquisa.

Ao meu orientador, prof. Dr. Airton A. Martin, pelas oportunidades e conselhos durante todo meu mestrado. Obrigada pela confiança depositada em mim e a liberdade para realizar meu trabalho. Desta forma eu pude compreender a extensão de meus limites.

Muito obrigada ao prof Dr Leandro Raniero por estar sempre pacientemente presente e disposto a ensinar. As dicas de Excel e programação foram excelentes!

Meu agradecimento especial a minha amiga Ingrid (Maria) que me permitiu compreender algumas das fragilidades humanas proporcionando o desenvolvimento de minha fé.

A minha esperta “pupila” Rani por sua solicitude e delicadeza em ajudar e atender minhas orientações. Igualmente meu agradecimento a querida Juliana Chaves sempre disposta a ajudar e ouvir.

A todos do LEVB, Patricia Karen, João Lucas, Carol, Magno, Rodrigo, Maiara, Jéssica, Sabrina, profa. Dra. Ana Maria e prof. Dr. Luís Eduardo que contribuíram direta ou indiretamente para a realização de meu trabalho.

“Quando você vê tudo o que acontece no mundo da ciência e no funcionamento do universo, você não pode negar que existe um comandante na ponte.”

Thomas Edson

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA PELE HUMANA SOB EFEITOS DE COSMECÊUTICOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Resumo

O envelhecimento cutâneo é a soma de uma série de mudanças influenciadas por fatores intrínsecos e extrínsecos. O conhecimento das modificações estruturais e funcionais são fatores determinantes para compreender o processo de envelhecimento e avaliar a eficácia de produtos de uso tópico. Neste contexto, é importante encontrar técnicas analíticas que investiguem as alterações por métodos não invasivos e não destrutivos, uma vez que, os métodos invasivos possuem a desvantagem da retirada do tecido cutâneo para análises *ex vivo* (escamometria e biópsias). Dentre as técnicas não invasivas que permitem realizar estudos *in vivo*, a que mais tem se destacado recentemente, é a de espectroscopia Raman, pois não afeta a integridade do tecido além de proporcionar análises em tempo real. Assim, neste estudo foram utilizadas as técnicas de espectroscopia Raman *in vivo* dispersivo e com transformada de Fourier (FT-Raman) visando identificar alterações bioquímicas na pele humana tratada com cosmético antienvelhecimento. Durante 60 dias, a população compreendeu 43 voluntárias compondo três grupos: controle (CTR) sem uso de nenhum produto, placebo (RT2) uso de produto placebo e ativo (AF2) que fez uso de cosmecêutico com proposta antienvelhecimento. Os espectros foram analisados separadamente em baixa frequência (800 a 1800 cm^{-1}) conhecida como região de “impressão digital” e em alta frequência (2800 a 3500 cm^{-1}) relacionado com a hidratação da pele. Pela análise de componentes principais foi possível identificar o comportamento dos grupos para diferentes tratamentos. Para o sistema FT-Raman, percentual discriminante para o grupo controle apresentou, após 60 dias, valor igual a 90,9% contra 11,8% para o grupo ativo e 64,3% para o grupo placebo. Para o sistema Raman dispersivo, estes valores mostraram melhor discriminação, sendo; grupo controle igual a 81,8%, ativo igual a 76,5% e placebo igual a 90%. A diferença entre o percentual discriminante entre os dois sistemas, provavelmente esta relacionado a diferença de penetração do laser podendo, no caso do Raman dispersivo, concentra-se nas camadas onde o produto agiu. O cálculo de área integrada dos modos vibracionais na região do DNA e melanina mostrou menor valor para o grupo que fez uso de cosmético com ativos antienvelhecimento, comparado com o grupo que não utilizou nenhum cosmético. Estes resultados foram relacionados com a ação preventiva do cosmético na formação dos radicais livres que levam à degradação de algumas moléculas. Para a região de alta frequência foi possível relacionar as alterações climáticas com a hidratação da pele mostrando que o grupo ativo manteve a pele hidratada mesmo sobre baixa umidade do ar.

Palavras Chave: pele, cosmético, envelhecimento, espectroscopia Raman, hidratação.

ANALYSIS OF CONSTITUENTS OF HUMAN SKIN IN THE EFFECTS OF COSMECEUTICS BY RAMAN SPECTROSCOPY

Abstract

Skin aging is the combination of a series of changes influenced by intrinsic and extrinsic factors. The knowledge of structural and functional modifications are keys factors to understand the aging process and evaluate the effectiveness of topical products. In this context, it is important to find noninvasive and nondestructive analytical techniques to investigate the changes, because the invasive methods have the disadvantage of removing the skin tissue for *ex vivo* analysis such as tape-stripping, biopsies and histological examination. Raman spectroscopy has recently emerged as noninvasive techniques that allow *in vivo* studies, does not affect the integrity of the tissue and provides real-time analysis. This study used Raman spectroscopy *in vivo* dispersive and Fourier transform (FT-Raman) to identify biochemical changes in human skin treated with anti-aging cosmetic. During 60 days, the population comprised with 43 volunteers composing three groups: control (CTR) without use of any product, placebo (RT2) use of placebo, and active product (AF2) that made use of cosmeceuticals with proposed anti-aging properties. The spectra were analyzed separately in the low frequency ($800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) region known as the "fingerprint" and in high frequency ($2800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) related to skin hydration. The principal component analysis identified the performance of the different treatment groups. For the FT-Raman system, a discriminating percentual after 60 days the control group was 90.9%, versus 11.8% for the active group and 64.3% for the placebo group. The values for the dispersive Raman showed better discrimination with the control group 81.8%, the active group 76.5% and the placebo 90%. The difference between the discriminating percentual between the two systems was probably related to this difference in the penetration of the laser, where the dispersive Raman concentrated in the layers where the product acted. The calculation of the integrated area of vibrational modes in the region of DNA and melanin showed a lower value for the group that used the cosmetics with an anti-aging additive compared with the group that did not use any cosmetics. These results were related to the preventive action of the cosmetic in the formation of free radicals that lead to degradation of some molecules. The high frequency region showed the relationship of climate change and hydration of skin with that the group maintaining the active moisturizes of the skin even on low humidity.

Keywords: skin, cosmetics, aging, Raman spectroscopy and hydration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema das estruturas das proteínas	24
Figura 2 - Esquema simplificado de uma seção transversal da pele contendo epiderme, derme e hipoderme e os principais tipos celulares	26
Figura 3 - Esquema da epiderme estratificada	27
Figura 4 - Queratinócitos e filamento microscópico de queratina	28
Figura 5 - Diagrama da molécula de queratina	28
Figura 6 - Esquema dos melanócitos e a disposição da melanina no tecido basal	29
Figura 7 - Estrutura molecular da tirosina	29
Figura 8 - Célula de Langerhans	30
Figura 9 - Células de Merckel	31
Figura 10 - Estruturas moleculares dos principais aminoácidos constituintes da pele.....	33
Figura 11 - Fibras elastinas coloridas na derme papilar e derme reticular	35
Figura 12 - Estrutura molecular da hidroxiprolina e hidroxilisina	36
Figura 13 - Esquema dos estados de energia vibracionais e energia da luz nas espectroscopias Raman e IR	38
Figura 14 - Espectro Raman ilustrativo	39
Figura 15 - Ilustração da energia de um oscilar harmônico e anarmônico	40
Figura 16 - Modos de vibração entre átomos.....	44
Figura 17 - Espectro Raman de pele normal para diferentes voluntários no mesmo lugar anatômico	45
Figura 18 - Principais ruídos na espectroscopia Raman	46
Figura 19 - Esquema do interferômetro de Michelson	48
Figura 20 - Instrumentação para medidas Raman <i>in vivo</i>	50
Figura 21 - Espectrômetro conforme configuração Czerny-Turner	50
Figura 22 - Equipamento FT-Raman; disposição da Ram Probe na amostra para emissão da luz laser e coleta do sinal espalhado	58
Figura 23 - Equipamento Raman; Disposição da fibra óptica na amostra	

para emissão da luz laser e coleta do sinal espalhado	58
Figura 24 - Espectro Raman típico da pele normal	62
Figura 25 - Representação esquemática de ligação peptídica de proteínas, principalmente o grupo amida I e III	64
Figura 26 - Representação esquemática da cadeia principal acil em conformação trans e gauche	65
Figura 27- Espectros FT-Raman médios obtidos para cada grupo estudado	67
Figura 28 - Variância espectral em torno da média no tempo T0 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	72
Figura 29 - Variância espectral em torno da média no tempo T30 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	72
Figura 30 - Variância espectral no tempo T60 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	73
Figura 31 - Matriz das componentes principais para o espectro total dos grupos AF2, RT2 e CTR	75
Figura 32 - Área relativa entre os picos do deslocamento Raman 1445 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} e curva de umidade relativa do ar	78
Figura 33 - Espectros Raman Dispersivo médio obtido para cada grupo estudado	79
Figura 34 - Variância espectral em torno da média no tempo T0 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	82
Figura 35 - Variância espectral em torno da média no tempo T30 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	83
Figura 36 - Variância espectral em torno da média no tempo T60 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	84

Figura 37 - Matriz das componentes principais para o espectro total dos grupos: AF2, RT2 e CTR	85
Figura 38 - Região espectral de 1280 a 1325 cm^{-1} para a primeira derivada	88
Figura 39 - Região espectral de 1621 a 1725 cm^{-1} para a primeira derivada	89
Figura 40 - Espectro Raman <i>in vivo</i> no intervalo espectral 2800 a 3500 cm^{-1}	90
Figura 41 - Variância espectral em torno da média no tempo T0 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	92
Figura 42 - Variância espectral em torno da média no tempo T30 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	92
Figura 43 - Variância espectral em torno da média no tempo T60 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR	93
Figura 44 - Espectro médio do grupo AF2 para os tempos T0, T30 e T60 e espectro obtido para a região de alta frequência e os espectros de subtração entre os tempos T30 e T60	94
Figura 45 - Espectro médio do grupo RT2 para os tempos T0, T30 e T60 e espectro obtido para a região de alta frequência e os espectros de subtração entre os tempos T30 e T60	96
Figura 46 - Espectro médio do grupo CTR para os tempos T0, T30 e T60 e espectro obtido para a região de alta frequência e os espectros de subtração entre os tempos T30 e T60	97
Figura 47 - Intensidade relativa entre os picos do deslocamento Raman 3220 cm^{-1} e 2936 cm^{-1} e curva de umidade relativa do ar	98

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Atribuição das bandas	45
Tabela 2 – População do estudo	56
Tabela 3 – Distribuição dos fototipos das voluntárias segundo Fitzpatrick	56
Tabela 4 - Atribuição Raman para os principais modos vibracionais da pele humana. δ = deformação, ν = estiramento, s= simétrico, a=assimétrico	63
Tabela 5 - Valores das áreas integradas em unidades arbitrárias calculadas para a região 1505-1574 cm^{-1}	74
Tabela 6 - Resultados da análise discriminante linear em função do tempo (T0, T30 e T60) e grupos (AF2, RT2 e CTR)	77
Tabela 7 - Resultados da análise discriminante linear em função do tempo (T0, T30 e T60) e grupos (AF2, RT2 e CTR)	87
Tabela 8 - Atribuição vibracional para o espectro da pele na região de alta frequência	91
Tabela 9 - Valores das áreas integradas sob as curvas subtraídas obtidas na figura 35 (b)	95
Tabela 10 - Valores das áreas integradas sob as curvas subtraídas obtidas na figura 36 (b)	97
Tabela 11 - Valores das áreas integradas sob as curvas subtraídas obtidas na figura 37 (b)	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD - charge coupled device (dispositivo de carga acoplada)

CEP - comitê de ética em pesquisa

DNA - Acid Desoxyribonucleic (ácido desoxirribonucléico)

FTIR - Infrared with Fourier Transform (infravermelho com Transformada de Fourier)

FT-Raman - Raman with Fourier Transform (Raman com transformada de Fourier)

JDE - Junção Dermoepidérmica

MMP - Matrix Metalloproteinase (metaloproteinase)

Nd-YAG - neodymium doped yttrium aluminium garnet (neodímio dopado com ítrio, alumínio garnet)

NMF - natural moisturizing factor (fator natural de hidratação)

OCT - Optical Coherence Tomography (tomografia por coerência óptica)

PC - Principal Components (componentes principais)

PCA - Principal Components Analysis (análise de componentes principais)

PIB - Produto Interno Bruto

RNA - Acid Ribonucleic (ácido ribonucléico)

ROS - Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigênio)

T0 - Tempo 0 (primeira medida)

T30 - Tempo 30 (medida após 30 dias)

T60 - Tempo 60 (medida após 60 dias)

TEWL - Transepidermal Water Loss (perda de água transepidermal)

UV - ultravioleta

UVA - ultravioleta A

UVB - ultravioleta B

LISTA DE SÍMBOLOS

μ -massa reduzida

α -conformação molecular tipo “hélice”

β -conformação molecular tipo “folha”

ω -freqüência de vibração

κ -constante da mola

δ -modo de deformação angular

ν -modo de estiramento

ψ -função de onda

∂ -derivada parcial

h -constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34}$) J.s

Q -coordenada interna do sistema

\vec{E} -campo elétrico

π - constante (3,14159)

ν_0 - freqüência da radiação incidente

t - tempo

Q_0 -coordenada na origem

\vec{P} -momento de dipolo

α -polarizabilidade eletrônica

τ -tempo infinitesimal

u.a.- unidade arbitrária

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Histologia da pele.....	25
3.1.1 Epiderme.....	26
3.1.1.1 Camadas da Epiderme.....	31
3.1.2 Derme.....	34
3.1.2.1 Fibras de colágeno.....	35
3.1.2.2 Fibras elásticas.....	36
3.1.2.3 Matriz Extracelular.....	36
3.1.3 Hipoderme.....	37
3.2 Espectroscopia Raman	37
3.2.1 Espectroscopia FT-Raman X Raman Dispersivo.....	47
3.3 Análise Estatística.....	51
3.4 Utilização da Espectroscopia Raman no Estudo de Pele.....	52
4 METODOLOGIA.....	54
4.1 Comitê de ética.....	54
4.2 Delineamento do estudo.....	54
4.3 População do estudo.....	55
4.4 Intervenção.....	57
4.5 Parâmetros para análise FT-Raman.....	59
4.6 Parâmetros para análise Raman Dispersivo.....	59
4.7 Pré-processamento dos espectros.....	59

4.8 Análise Qualitativa.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1 Análises Intragrupo – FT-Raman	66
5.2 Análises Intragrupo- Raman Dispersivo	79
5.3 Alta Frequencia	90
6 CONCLUSÃO.....	99
7 REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	110
ANEXO B: Questionário de avaliação de perfil	111
ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido	113

1 INTRODUÇÃO

A necessidade das pessoas de aproximar-se ao máximo possível do padrão de beleza e da jovialidade tem levado ao crescimento da indústria de cosméticos e cosmecêuticos. O setor mundial de cosméticos, fragrâncias e produtos de higiene pessoal cresceu em média 5,4% ao ano no período entre 2004 e 2008, com vendas totais chegando a aproximadamente US\$333,5 bilhões em 2008, de acordo com a Euromonitor International [1].

A indústria brasileira de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos apresentou crescimento médio de 10,6% nos últimos 13 anos passando de R\$ 5,9 bilhões em 1998 para R\$ 24,54 bilhões em 2008 contra 3% do PIB total e 2,9% da indústria geral [2]. O Brasil é o segundo maior mercado consumidor no ranking mundial de cosméticos. Muitos fatores têm contribuído para este crescimento destacando-se: utilização de tecnologia de ponta e conseqüente aumento da produtividade, lançamentos constantes de novos produtos visando atender as necessidades do mercado e aumento da expectativa de vida levando à necessidade de conservar a impressão de juventude.

De acordo com os órgãos regulamentadores, produtos cosméticos são definidos como substâncias de origem animal, vegetal ou mineral com funções que não causem alterações fisiológicas oriundas da permeação cutânea. A maioria destes produtos apresenta penetração no camada córnea, epiderme e até mesmo na derme, dependendo das características físico-químicas da molécula como também da utilização de promotores de permeação ou veículos (delivery systems) [3]. As tecnologias na fabricação dos cosméticos foram alterando-se conforme as necessidades. No início da década de 70 os produtos continham ativos que não ultrapassavam a primeira camada da pele protegendo apenas contra a desidratação. Hoje o avanço na fabricação de produtos cosméticos levou à incorporação de ativos com proposta de ação antienvhecimento na maioria das vezes sem comprovação da eficácia por estudos clínicos controlados e randomizados. Atualmente o desenvolvimento de produtos nanoestruturados é focado na aplicação na pele do rosto e corpo com prosposta de ação antienvhecimento e para fotoproteção. As

nanoestruturas proporcionam enormes benefícios à cosmetologia uma vez que controlam a penetração na pele e a velocidade com que o ativo é liberado gerando maximização dos efeitos cosméticos. Para um produto cosmético ser classificado como nanocosmético é necessário que contenha estruturas organizadas e menores que 999 nanômetros, porém maiores que 100 nm de forma que não penetrem na corrente sanguínea [4].

A pele é uma interface biológica com o meio ambiente, sendo um tecido altamente metabólico com a maior área de superfície no corpo humano [5]. Este órgão é constituído por camadas que diferem na composição molecular e funções. Dentre suas principais funções destacam-se a importante barreira de proteção contra agressões e agentes externos, além de absorção e secreção de fluidos, termorregulação, metabolismo de vitaminas, absorção de luz ultravioleta evitando efeitos nocivos ao organismo e tem papel fundamental nas funções sensoriais, ação de hormônios e estéticas.

Segundo estudo do Ministério da Saúde, o grupo de idosos com mais de 60 anos é o que mais cresce quando comparado com diferentes faixas etárias. De 1980 a 2000, o grupo de idosos aumentou 107% contra 14% de 0 a 14 anos [6]. A vida de qualquer organismo celular apresenta tempo limite de existência sofrendo alterações fisiológicas com o tempo. O processo de envelhecimento cutâneo é a soma de uma série de mudanças tempo-dependentes influenciadas por fatores intrínsecos ou cronológicos e extrínsecos. O envelhecimento intrínseco relaciona-se à genética do indivíduo, surgimento de doenças e expressões de genes [7] enquanto o processo extrínseco está ligado aos fatores ambientais e estilo de vida tais como, poluição, tabagismo, alcoolismo e principalmente exposição à radiação ultravioleta resultando no fotoenvelhecimento. Durante o processo natural de envelhecimento da pele ocorrem alterações bioquímicas, celulares e teciduais resultando principalmente em uma diminuição da interface derme-epiderme. Esta característica compromete o transporte de nutrientes entre as camadas da pele acarretando diminuição da matriz extracelular e fragmentação das fibras elásticas [8], além de promover redução da síntese de colágeno devido ao comprometimento da atividade dos fibroblastos [9]. Evidentemente neste processo ocorre a diminuição da hidratação e do desempenho da barreira de proteção [10]. O conhecimento das modificações estruturais e funcionais são fatores determinantes para compreender o processo de

envelhecimento e avaliar a eficácia de produtos de uso tópico visando melhora na qualidade de vida.

Várias teorias foram propostas para explicar o processo do envelhecimento. Atualmente a teoria mais aceita cientificamente é a dos radicais livres desenvolvida em 1956 por Denham Harman. Ocorrem danos oxidativos pela geração das espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres (ânions superóxidos) através do metabolismo mitocondrial normal e pela radiação UV; as lesões oxidativas incluem quebras da cadeia do DNA, fragmentação e degradação de proteínas e peroxidação dos ácidos graxos (lipídeos) [11]. Outras novas teorias como o encurtamento das extremidades dos cromossomos (telômeros) durante a mitose que leva à apoptose celular [12] e o envelhecimento mitocondrial explicado através das lesões oxidativas no DNA [13]. Outro fator é o fotodano, causado pela exposição crônica e descontrolada ao UVA e UVB que ativa receptores da superfície celular dos queratinócitos e fibroblastos disparando vias de transcrição nuclear que estimulam a produção de peróxido de hidrogênio; diminuem a biossíntese do colágeno e aumentam a produção das matrizes metaloproteinases (MMP's) contribuindo para a desorganização final do tecido. O aumento no uso de cosméticos visa melhorar a função de proteção contra as radiações UV e retardam o envelhecimento extrínseco além de atuar de forma preventiva no intrínseco e manter o perfil de concentração de água na pele. A maioria destes produtos apresenta penetração apenas na camada córnea e epiderme e alguns componentes promovem atingir a derme superior.

Grande parte dos conhecimentos sobre as propriedades biomecânicas da pele e a influência de ativos se deve ao uso de técnicas experimentais em sua maioria invasivas que requerem retiradas do tecido cutâneo para análises *ex vivo*. Entretanto, durante o processo de extração ou armazenagem do material obtido por estes métodos podem ocorrer danos ou alterações moleculares no tecido levando à dificuldade de se observar o efeito induzido ou natural desejado. Atualmente o método *in vivo* comum para se estudar as primeiras camadas da pele é o da escamometria baseado em aplicações sucessivas de fita adesiva especial ou filmes [14]. Porém, a principal limitação deste método é padronizar a força aplicada. A avaliação do material pode ser direta em microscópio ou após colorações [15],

gravimétrica, baseada na diferença de peso do adesivo com ou sem as camadas de pele, cromatografia [14,16] e difração de elétrons [17].

Alguns métodos não invasivos, como por exemplo, medições de propriedades elétricas atualmente são empregados na avaliação da hidratação e determinação das características superficiais da pele. Alguns estudos tem realizado estas avaliações através de medidas da capacitância com o equipamento Corneometer®, condutância elétrica usando o Skicon®, perda de água transepidermica (TEWL) com o equipamento Tewameter® (Courage & Khazaka, Alemanha) e eletrodo de pH [18,19]. As medições elétricas fornecem informações qualitativas das alterações nas características gerais da pele sem mostrar a sua composição molecular. Além disso, outros fatores podem influenciar nas propriedades elétricas da pele, afetando os resultados.

Tendo em vista que a integridade, bioquímica e morfologia do tecido não podem ser afetadas, alguns métodos ópticos têm sido empregados para análise [20-22]. A técnica de tomografia por coerência óptica (OCT) tem sido utilizada para estudar os efeitos de cremes hidratantes e protetores solares na manutenção da elasticidade e água na pele [23], assim como, no estudo das diferenças estruturais da pele para as diversas origens étnicas [24]. Entretanto, a técnica de OCT, apesar de não invasiva, não fornece informações moleculares dos constituintes da amostra. Alguns estudos mostram o uso da espectroscopia de fluorescência para detectar mudanças teciduais relacionadas com o envelhecimento intrínseco ou o fotoenvelhecimento. A principal desvantagem desta técnica é a limitação em relação à especificidade molecular [25,26].

Considerando que o processo de envelhecimento extrínseco e intrínseco são causados por mudanças na bioquímica celular e nos tecidos, o desafio é encontrar uma técnica analítica que investigue as alterações por métodos minimamente invasivos e não destrutivos. A técnica de espectroscopia Raman *in vivo* permite identificar e caracterizar, em tempo real, as alterações bioquímicas decorrentes dos processos degenerativos de tecidos vivos. Além de alta sensibilidade e especificidade, não é invasiva e pode ser utilizada no estudo dos principais constituintes da pele, como lipídeos, proteínas e água, [27,28]. O efeito Raman constitui-se no espalhamento da luz após interação com vibrações moleculares do

material. O espectro vibracional fornece a impressão digital da amostra, ou seja, a composição química e bioquímica da pele analisada.

Neste estudo, visando identificar alterações bioquímicas na pele humana com o uso de produto cosmético antienvhecimento, foi utilizada a técnica de espectroscopia Raman *in vivo*.

A seção 3.1 deste trabalho descreve brevemente a histologia da pele com a intenção do melhor compreensão do objeto de estudo por parte do leitor. A seção 3.2 mostra os princípios físicos e algumas aplicações da espectroscopia Raman. Para o entendimento das medidas é necessário o uso de análise estatística apropriada às características da amostra conforme abordado na seção 3.3. Posteriormente, descrevem-se a metodologia, resultados, discussão e conclusão.

2 OBJETIVOS

Face a importância do processo de envelhecimento cutâneo e sua complexidade, os objetivos deste estudo foram:

- Identificar os componentes bioquímicos da pele de mulheres entre 60 e 65 anos através das análises dos modos vibracionais dos espectros Raman adquiridos *in vivo*.
- Identificar as regiões espectrais onde ocorrem as principais alterações em relação aos diferentes tratamentos.
- Analisar as alterações das estruturas protéicas, lipídicas e quantidade de água presentes na pele envelhecida com ou sem o uso de formulações cosméticas através das técnicas de espectroscopia Raman *in vivo*: dispersiva e com transformada de Fourier.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Todos os tecidos e células são compostos por moléculas que possuem como base o carbono. O carbono possui uma grande capacidade de formar moléculas grandes, compostas por mais de 50 átomos de carbono. O átomo de carbono possui 4 elétrons na última camada que podem formar 4 ligações covalentes com outros átomos (oxigênio, hidrogênio, nitrogênio) inclusive átomos de carbono (C-C) no qual a ligação é altamente estável e formam cadeias de moléculas complexas.

Algumas moléculas orgânicas são pequenas unidades denominadas monômeros que podem se ligar a outros monômeros formando macromoléculas denominadas polímeros. As macromoléculas e suas subunidades monoméricas diferem bastante em tamanho. Proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos são produtos da polimerização de dois ou mais monômeros [29]

a) *Proteínas*: compostos orgânicos formados por aminoácidos dispostos numa cadeia linear. Uma cadeia de aminoácidos denomina-se peptídeo. O termo proteína é dado quando na composição do polipeptídeo entram centenas ou milhares de aminoácidos. Estes polímeros são compostos por α -aminoácidos que realizam distintas funções. Para a composição das proteínas de mamíferos, 20 tipos de α -aminoácidos são relevantes podendo combinar-se entre si ou não. Os α -aminoácidos são constituídos por um ácido carboxílico (-COOH) e um grupo funcional amina (NH_3) ligados no mesmo átomo de carbono. As ligações entre aminoácidos denominam-se ligações peptídicas e estabelecem-se entre o grupo amina de um aminoácido e o grupo carboxi de outro aminoácido, com a perda de uma molécula de água. Muitos aminoácidos são obtidos a partir da alimentação uma vez que o organismo não pode sintetizá-los [30]. A maioria das proteínas encontra-se sob a forma de estruturas tridimensionais. Entretanto, existem 4 tipos de estruturas de proteínas (Figura 1). A estrutura primária é dada pela sequência de aminoácidos unidos por meio de ligações peptídicas; a estrutura secundária consiste no arranjo espacial estável sendo 2 tipos principais: alfa-hélice (cilíndricas) e folha-beta (achatadas e rígidas).

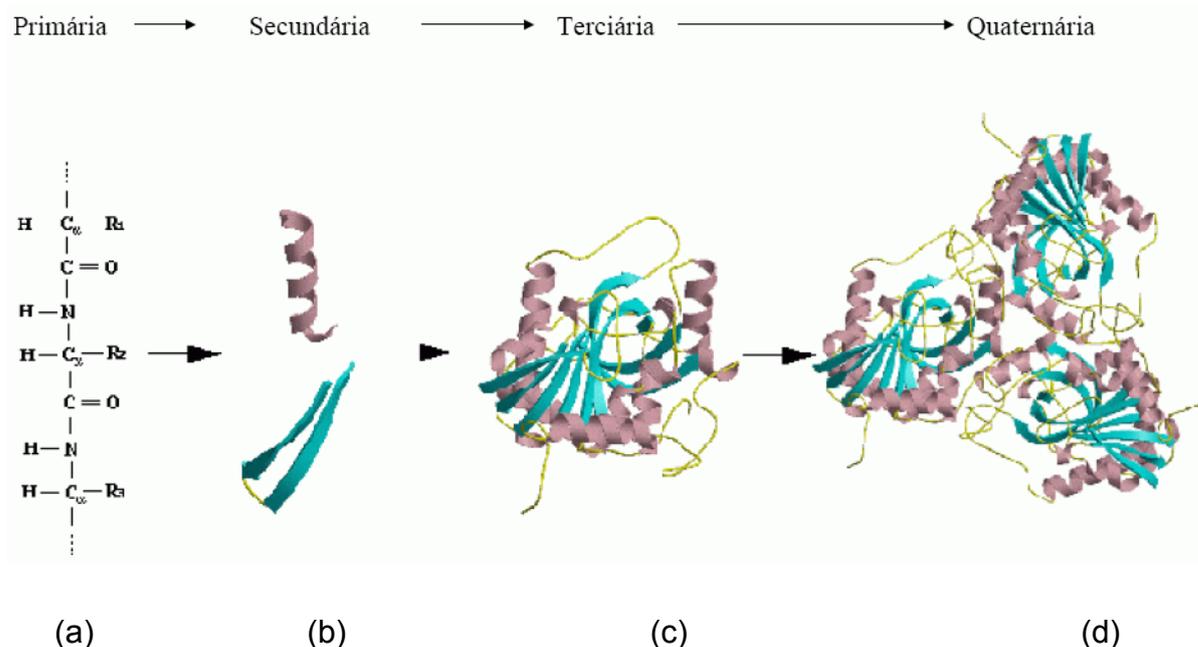


Figura 1- Esquema das estruturas das proteínas, (a) estrutura primária mostrando a sequência de aminoácidos, (b) estrutura secundária com configuração alfa hélice (acima) e folha beta (abaixo), (c) estrutura terciária e (d) estrutura quaternária [31]

A estrutura terciária é resultado do enrolamento da hélice ou da folha estabilizada por ligações de hidrogênio e dissulfeto. Por fim a estrutura quaternária é formada por duas ou mais cadeias polipeptídicas. As proteínas formam diversos arranjos com distintas funções sendo que as estruturas terciária e quaternária são referidas como “conformações”.

b) Ácidos nucleicos: são macromoléculas de nucleotídeos que são formados por um anel com um nitrogênio ligado a um açúcar de cinco carbonos (bases) e um radical fosfato. Existem dois tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucléico (DNA) com função de armazenar informação e ácido ribonucléico (RNA) com etapas envolvendo a biossíntese proteica e a expressão gênica. Há 5 bases divididas em dois grupos: purínicas com anel duplo- adenina e guanina- e pirimídicas com anel simples – timina, citosina e uracila.

c) Polissacarídeos: polímeros formados por unidades menores denominadas monossacarídeos. Os polissacarídeos são classificados segundo suas funções que podem ser de sustentação, manutenção da hidratação das células e tecidos além de reserva de energia. Os açúcares podem existir na forma de cadeia

aberta ou formar um anel e apresentam em sua estrutura grupos hidroxila (OH) e grupo aldeído (HC=O) ou cetona (C=O) [30].

d) *Lipídeos*: englobam um conjunto de tipos de moléculas que possuem como principal característica a insolubilidade em água e solubilidade em solventes de gorduras. As moléculas de ácidos graxos são exemplos de lipídeos e possuem longas cadeias de hidrocarbonetos compostas por um grupo carboxila (-COOH) que se comporta como um ácido e está ligada covalentemente a outras moléculas. A principal função dos ácidos graxos consiste na estruturação das membranas celulares compostas principalmente por fosfolipídios. Cada molécula de fosfolipídio possui uma cauda hidrofóbica (cadeia de ácidos graxos) e uma cabeça hidrofílica (fosfato) [29].

3.1 Histologia da pele

A pele, cerca de 16% do peso corporal em um adulto, é um sistema dinâmico, complexo, integrado por um arranjo de células, tecidos e elementos de matriz que mediam uma série de funções. Existem dois tipos diferentes de pele no organismo que podem variar de 1 mm a 4 mm: pele glabra, caracterizada por espessa camada de queratina (palmas e plantas) e a pele pilificada de menor espessura que recobre o restante do corpo. A pele é composta por três diferentes camadas: epiderme, formada por tecido epitelial; derme composta por tecido conjuntivo e hipoderme, camada inferior contendo gordura [32,33]. A epiderme, com várias camadas (córnea, granulosa, espinhosa e basal), e a derme unem-se pela membrana basal e tem funções específicas (Figura 2).

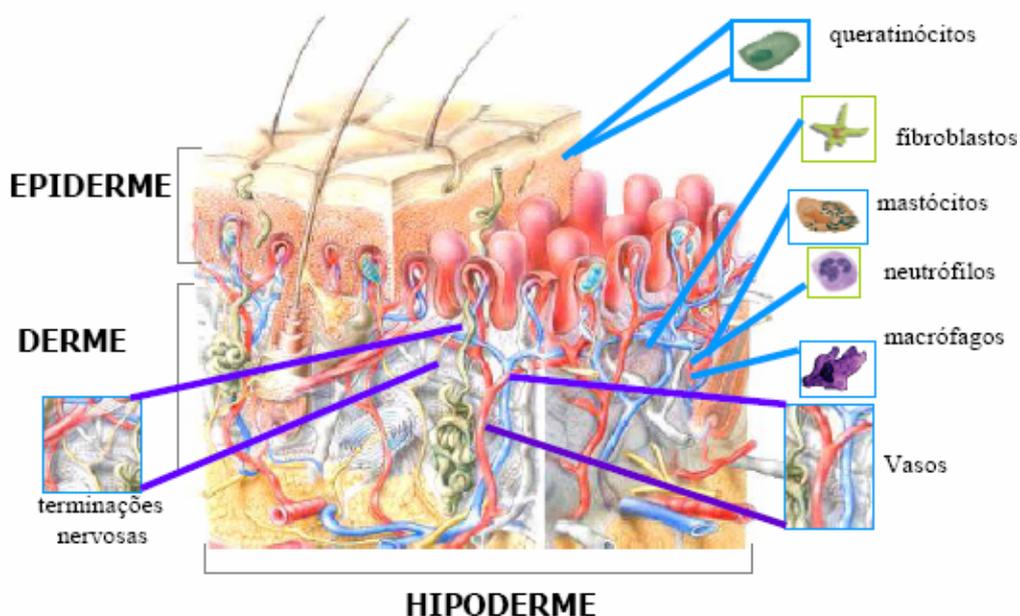


Figura 2 – Esquema simplificado de uma seção transversal da pele contendo epiderme, derme e hipoderme e os principais tipos celulares [34]

A superfície da pele apresenta-se, em todas as áreas, de forma irregular com presença de sulcos. As membranas mucosas diferem da pele pela ausência das camadas granulosa e córnea. Com o decorrer dos anos, a pele apresenta um declínio de todas as suas funções. As alterações bioquímicas e histológicas revelam-se por sinais clínicos tais como rugas, , perda de elasticidade, elastose, diminuição da hidratação, fotodano e queratoses actínicas [35].

3.1.1 Epiderme

Composta por tecido epitelial, sem rede vascular, é a camada mais externa da pele com espessura variável entre 1,3 mm (palmas) até 0,6 mm (face). Sua principal função é atuar como uma barreira física contra agentes externos como a radiação UV e microorganismos além de manter o conteúdo hídrico, de eletrólitos e nutrientes. A epiderme é uma camada em contínua renovação e proporciona o desenvolvimento de outras estruturas conhecidas como anexos (unha, folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas). Sua principal característica é a estratificação, constituída por quatro camadas distintas: córnea (CC), granulosa

(CG), espinhosa (CE) e basal (CB) sendo esta a camada mais interna (Figura 3). Entre a derme e a epiderme encontra-se uma fina membrana denominada junção dermoepidérmica (JDE).

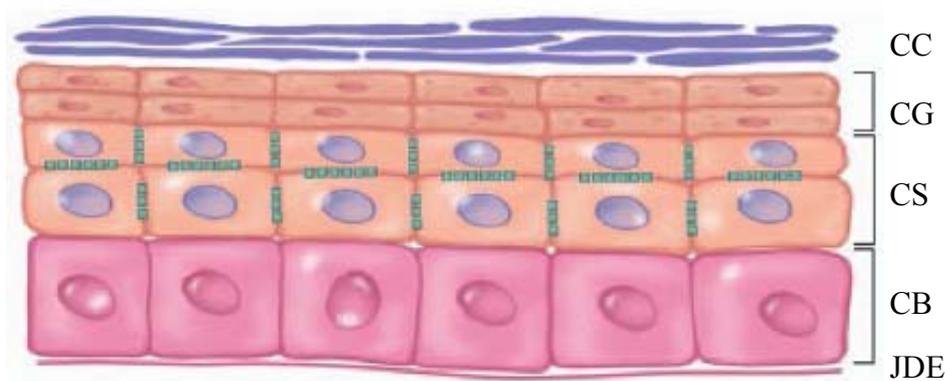


Figura 3 – Esquema da epiderme estratificada [32].

Grande parte das células que compõe estas camadas são os queratinócitos, produtores de queratina, que se diferenciam bioquimicamente durante seu processo de maturação da camada mais interna migrando para a superfície [32,36]. Em menor quantidade, existem outros tipos de células - os melanócitos, células de Merkel e as células de Langerhans. A seguir estão descritas as principais características destas células.

1) *Queratinócitos*: representa mais de 95% da epiderme e sua morfologia varia conforme a camada. As bordas de suas membranas estão unidas por pontes intercelulares conhecidas por desmossomas principalmente na camada espinhosa (Figura 4A). Formam-se na camada basal a partir de células em divisão. À medida que os queratinócitos se aproximam da superfície da pele, transformam-se em células achatadas e anucleadas com grande quantidade de filamentos queratinizados, denominados corneócitos. O tempo total de renovação epidérmica, através da eliminação destas células, ocorre entre 59 a 75 dias. Durante o processo de maturação ou queratinização, observam-se algumas alterações: na camada basal ocorre perda da atividade mitótica, a partir da camada espinhosa as células iniciam a síntese de novas organelas, modificações na membrana e remodelagem de sua

estrutura, além de síntese de lipídeos e proteínas em distintas quantidades e composições [36,37].

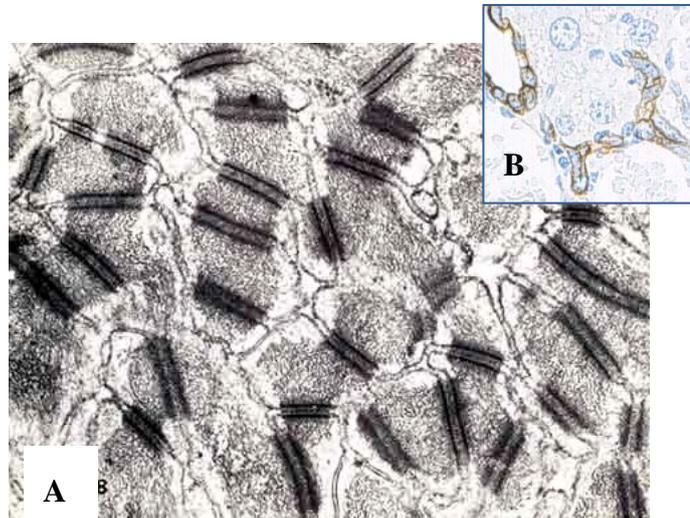


Figura 4 – A) Queratinócitos (escala de cinza) sendo ligados pelas desmossomas (filamentos escuros); B) Filamento microscópico de queratina.[38,39]

A principal função dos queratinócitos é produzir a queratina (Figura 4B), proteína secundária com conformação α -hélice (α -queratina) ou de folhas- β (β -queratina), constituídas por cerca de 15 aminoácidos, dentre eles a cisteína (Figura 5).

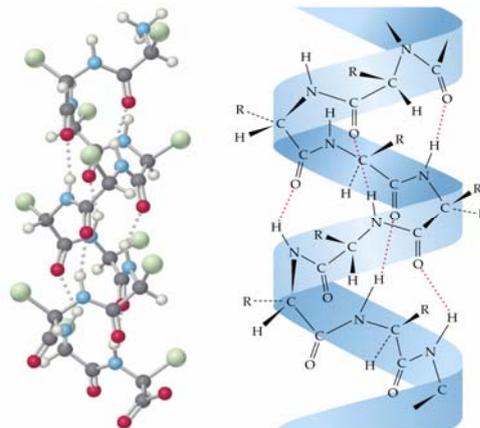


Figura 5 – Diagrama da molécula de queratina. [40]

2) *Melanócitos*: representam aproximadamente 2% das células epidérmicas e encontram-se na camada basal protegendo as células dos efeitos nocivos da radiação UV. Sua principal função é a produção de melanina, um pigmento que pode variar do amarelo ao marrom ou preto. Sua forma dendrítica,

como a dos neurônios, permite o contato com muitos queratinócitos facilitando a distribuição dos melanossomas ou grânulos de melanina (Figura 6). Há dois tipos de melanossomas que produzem distintas melaninas: a eumelanina (coloração escura) e a feomelanina (coloração avermelhada). A eumelanina é a união de numerosas ligações dos polímeros. O número de melanócitos é igual em todas as pessoas de diferentes etnias, porém a coloração da pele é determinada pela quantidade, tamanho e distribuição da melanina, fatores determinados geneticamente [33,41].

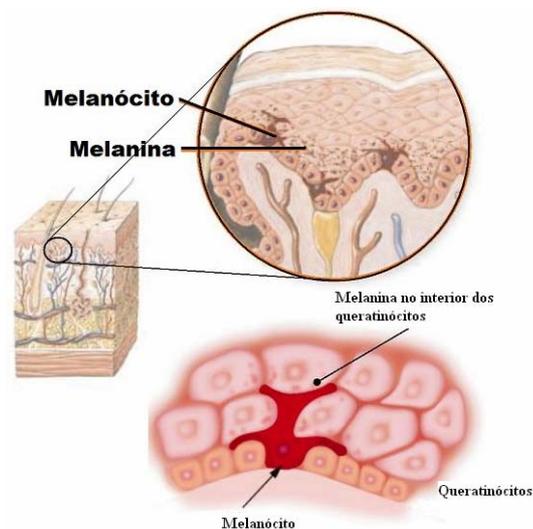


Figura 6- Esquema dos melanócitos e a disposição da melanina na camada basal. [42]

A síntese da melanina é explicada pela presença da enzima tirosinase no complexo de Golgi dos melanócitos e ocorre a partir da polimerização do aminoácido tirosina (Figura 7).

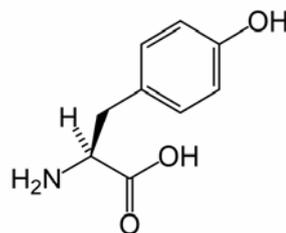


Figura 7 – Estrutura molecular da tirosina [43]

3) *Células de Langerhans*: são células dendríticas com núcleo escuro e irregular que apresentam antígenos, responsáveis ao sistema de imunovigilância cutâneo (Figura 8). Constituem de 2 a 8% do total de células epidérmicas. Seus processos dendríticos se estendem até a camada granulosa através dos

queratinócitos e até a junção dermoepidérmica. São diferenciadas dos queratinócitos pela ausência de desmossomas [32,33].

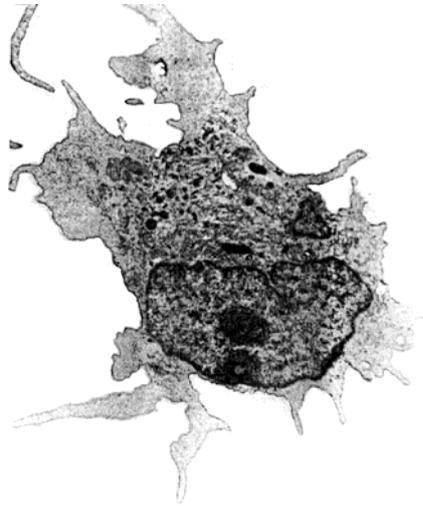


Figura 8 – Célula de Langerhans. [44]

4) *Células de Merckel*: atuam como receptores mecânicos a função tátil. Encontram-se dispersas pela epiderme, porém com maior concentração na camada basal. Também podem ser encontradas na derme associadas às terminações nervosas (Figura 9). Estão unidas aos queratinócitos através dos desmossomas em regiões particulares do corpo como lábios, mãos e dedos apresentando tonofilamentos de queratina. [33]

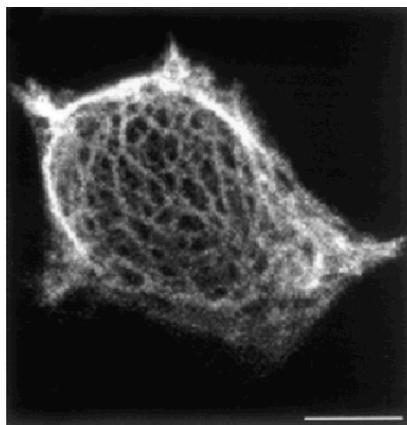


Figura 9- Células de Merckel [45]

3.1.1.1 Camadas da Epiderme

A seguir estão descritas as quatro camadas da epiderme da mais interna à superfície destacando suas principais características, além da junção entre a derme e epiderme.

1) *Junção dermoepidérmica (JDE)*: estrutura que promove resistência mecânica ao atrito. Além disso, serve como suporte para a epiderme, determina a polaridade do seu crescimento e atua como barreira semipermeável. Sua espessura varia de 60 nm a 140 nm de estrutura emaranhada de colágenos tipos IV e VII com fibras longitudinais [46].

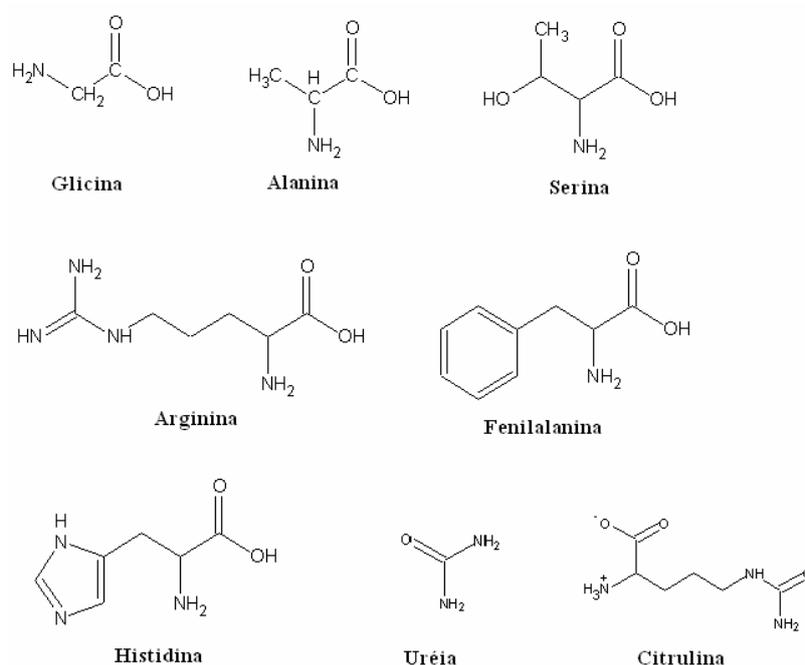
2) *Camada Basal*: constituída por células em intenso processo mitótico. A cada mitose 50% das células filhas permitem a renovação do epitélio tanto sob condições homeostáticas como nocivas [47].

3) *Camada Espinhosa*: composta por células poligonais e achatadas. Caracteriza-se pelo início da queratinização e presença de numerosos desmossomas (filamentos de queratina) unindo as células. Nesta camada também ocorre o início do desenvolvimento dos corpos lamelares, que serão responsáveis pela formação do manto hidrolipídico, e dos grânulos de querato-hialina [47].

4) *Camada Granulosa*: células com citoplasma repleto de grânulos de queratina. Como a camada espinhosa, existem corpos lamelares que contém lipídeos, tais como fosfolipídios e colesterol. Estas estruturas são depositadas no camada córnea formando barreira contra a perda de água, ou seja, o manto hidrolipídico. As células granulosas sintetizam novas proteínas responsáveis pela estrutura do camada córnea: a profilagrina, posteriormente transformada em filagrina e a involucrina.

5) *Camada Córnea*: possui estrutura simples de células achatadas e anucleadas, hidrofílicas dispostas em camadas intercaladas com matriz de estruturas lipídicas intercelulares, hidrofóbicas, principalmente ceramidas, colesterol e ácidos graxos. O grau de organização dos lipídeos é de extrema importância para prevenir a perda de água transepidérmica (TEWL) [48]. A espessura desta camada varia de 10 a 15 µm, exceto nas palmas e plantas, onde pode ser até 10 vezes mais

espessa. O camada córnea funciona como uma barreira contra a desidratação, invasão de microorganismos e agressões do meio ambiente e seu maior constituinte é a queratina (α e β -queratina), correspondendo a cerca de 80% de sua massa seca [49]. A função de barreira depende da presença de umidificantes constituintes do NMF, composto por moléculas higroscópicas, que se ligam à água além de vários aminoácidos. Dentre estes aminoácidos encontram-se o ácido pirrolidona-carboxílico (PCA), ácido urocânico, lactato, uréia, serina, glicina, arginina, ornitina, citrulina, alanina, histidina, fenilalanina (Figura 10). Quando as células epidérmicas morrem as proteínas presentes no seu interior são degradadas em aminoácidos e transportadas para o camada córnea. Os corneócitos, revestidos pela involucrina – proteína responsável pelas ligações ésteres com as hidroxiceramidas- processam a filagrina que após ser hidrolizada fornece elementos para a composição do NMF. A água também é importante componente da pele, pois mantém a flexibilidade e é responsável pela manutenção do equilíbrio homeostático necessário às enzimas envolvidas em vários aspectos da função e maturação do camada córnea [50].



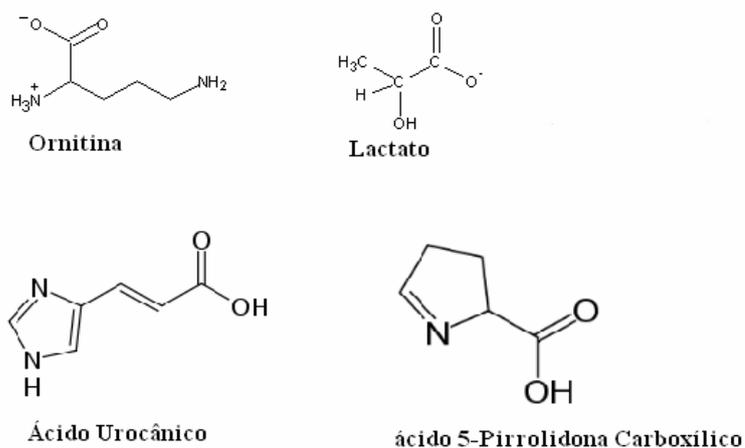


Figura 10 – Estruturas moleculares dos principais aminoácidos constituintes da pele.

3.1.2 Derme

Esta camada é formada por tecido conjuntivo com espessura que varia de 0,5 mm a 3,0 mm de acordo com a região do corpo, além de ser, mais espessa nos homens do que nas mulheres. Sua superfície é irregular, observando-se saliências, as papilas dérmicas, que aumentam a área de contato da derme com a epiderme, reforçando a união entre elas. A derme é dividida em duas regiões que conferem elasticidade à pele, a papilar (superficial) e a reticular (profunda) que constitui a maior parte da derme. A derme papilar é delgada e possui fina rede de fibras elásticas perpendiculares à camada basal (Figura 11a) compostas por elastina e duas glicoproteínas, a fibrilina e outra associada à microfibrila. A derme reticular apresenta tecido denso constituído pelos colágenos tipos I e III além de fibras elásticas dispostas paralelamente à superfície (Figura 11b). As macromoléculas são encontradas entre as fibras e células dérmicas e mais abundantemente na papila dérmica e ao redor dos anexos cutâneos. Bioquimicamente a constituição da derme envolve polissacarídeos tais como hialuronidatos (derivados do ácido hialurônico) e condroitinsulfatos. A substância fundamental também contém glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas, além de material fibrilar composto por fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares. Os anexos cutâneos encontram-se na derme, mas se originam de estruturas epidérmicas (foliculos e glândulas). Estão

presentes ainda as principais células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos. Os fibroblastos sintetizam diferentes macromoléculas que constituem a matriz extracelular como colágeno e a elastina [51-53].

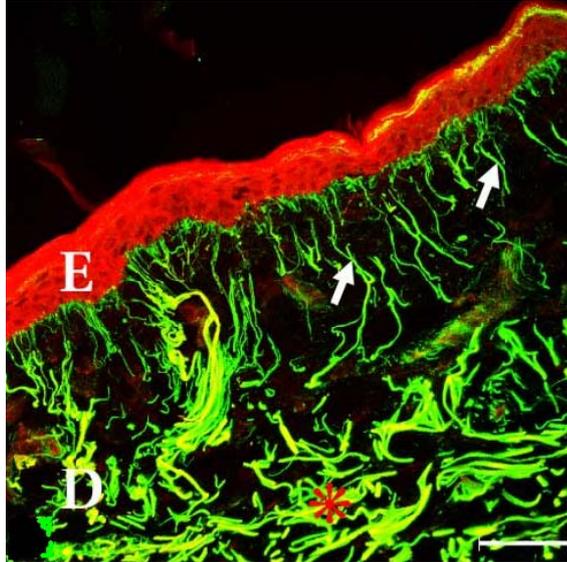


Figura 11 – Fibras elastinas coloridas por imunofluorescência: a) na derme papilar (setas) as fibras são finas; (b) derme reticular (asterisco) encontram-se espessas. Epiderme (E) e derme (D); escala da barra igual a 50 μ m. Fonte: reproduzida de J.L.Contet- Audonneau [54]

3.1.2.1 Fibras de colágeno

O colágeno é uma proteína complexa e representa 75% do peso seco da derme. O tropocolágeno é o monômero da molécula de colágeno, o qual constitui-se de fibra composta por três cadeias de aminoácidos unidos. A formação das fibras de colágeno depende de uma sequência de etapas bioquímicas: polimerização da molécula de tropocolágeno, hidroxilação dos resíduos de lisina e prolina que ficam livres na forma de hidroxiprolina e hidrolisina (Figura 12). Os resíduos de hidroxiprolina formam pontes de hidrogênio entre as três cadeias alfa, contribuindo para a estabilidade da hélice tripla do tropocolágeno. O colágeno é uma família de proteínas que se relacionam formando o principal componente da matriz extracelular. Na pele, os colágenos tipos I e III compreendem 85 a 90% e 8 a 11% do total de colágeno sintetizado, respectivamente. Entretanto, os colágenos tipos IV, V, VI e VII também estão presentes na derme [32,55].

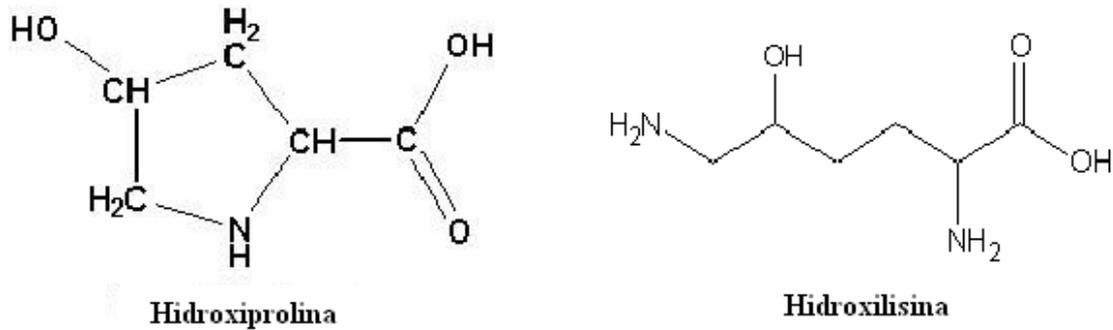


Figura 12- Estrutura molecular da hidroxiprolina e hidroxilisina [56]

3.1.2.2 Fibras elásticas

As fibras elásticas são associadas ao colágeno e encontram-se em pequenas quantidades na derme. São formadas por dois tipos de estruturas, a elastina e as microfibrilas sendo a primeira mais abundante. As fibras elásticas são sintetizadas pelos fibroblastos e contém os aminoácidos desmosina e isodesmosina [36].

3.1.2.3 Matriz Extracelular

É representado pela substância que forma o meio no qual células e fibras se sedimentam. Constitui-se de fibronectina e glicosaminoglicanas (ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana). Estes componentes são sintetizados pelos fibroblastos e mastócitos.

3.1.3 Hipoderme

É formada por tecido conjuntivo frouxo, que se une de maneira pouco firme à derme. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia. Dependendo da região e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo que quando desenvolvida constitui o panículo adiposo. O panículo adiposo modela o corpo. É

uma reserva de energia, participa proporcionando proteção na termo-regulação contra o frio.

3.2 Espectroscopia Raman

O fenômeno de espalhamento inelástico da luz foi primeiramente postulado por Smekal em 1923 [57] e descrito pela primeira vez em 1928 por Raman e Krishnan após uma série de experimentos que consistiam na iluminação de diferentes meios (sólidos, líquidos e gasosos) utilizando uma lâmpada de mercúrio. A luz espalhada pela amostra era analisada por um espectrógrafo e apresentava algumas linhas e bandas diferentes do espectro da luz da lâmpada de mercúrio. Estas diferenças apresentavam deslocamentos simétricos de frequência em relação às linhas da radiação incidente, polarização independente da frequência de excitação e o número de linhas que apareciam no lado de maior comprimento de onda eram mais intensas e numerosas do que as linhas que apareciam no lado oposto à linha da radiação incidente [58]. Desta forma Raman concluiu que as frequências deslocadas representavam as frequências de oscilação das moléculas da amostra dependentes de suas ligações químicas e geometria. Este novo fenômeno de espalhamento foi chamado efeito Raman. A espectroscopia Raman mede o espalhamento inelástico de uma radiação monocromática que incide sobre uma molécula. O uso do laser como radiação incidente é baseado no fato de ter pouca divergência e polarização linear. O efeito Raman é um mecanismo que segue o princípio de conservação de energia. Se o fóton da radiação incidente possui mesma energia que o fóton espalhado pela amostra, após sofrer interação com a mesma, a radiação espalhada apresenta frequência igual à da radiação incidente (espalhamento Rayleigh); se o fóton incidente perde energia ao interagir com as moléculas da amostra então a radiação espalhada aparecerá no espectro com menor frequência (espalhamento Stokes) onde a diferença entre a energia incidente e a espalhada é absorvida pela amostra que sofre uma transição para níveis vibracionais mais altos; se o fóton incidente interage com as moléculas da amostra já no estado excitado pode receber energia deixando as moléculas em níveis de energia mais baixos (espalhamento anti-Stokes) [59]. Frequentemente a região Stokes do espectro Raman é mais

intensa do que a região Anti-Stokes uma vez que a maioria dos elétrons encontra-se no estado vibracional em temperatura ambiente. A Figura 13 mostra o diagrama de níveis de energia para o espalhamento Raman.

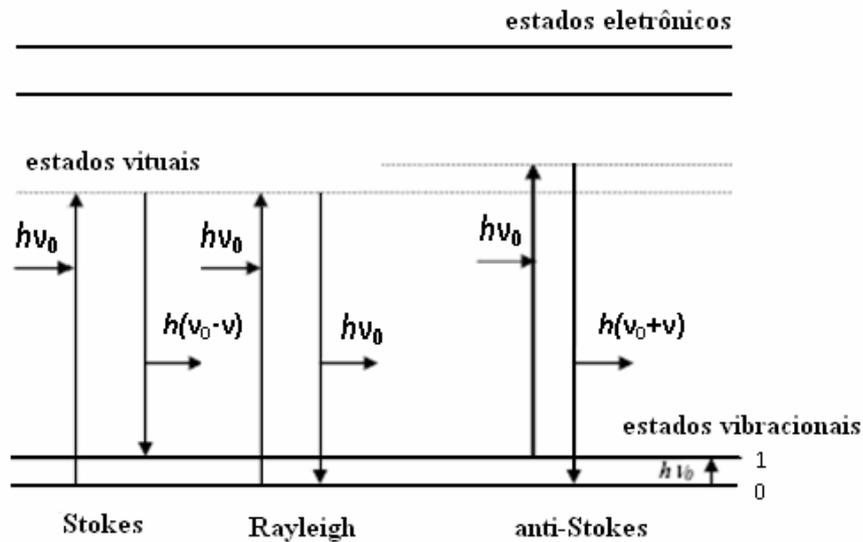


Figura 13- Esquema dos estados de energia vibracionais e energia da luz nas espectroscopias Raman (ν_0 = frequência da radiação incidente, ν = frequência vibracional, h = constante de Planck).

A representação espectral do diagrama da Figura 13 pode ser observada na Figura 14

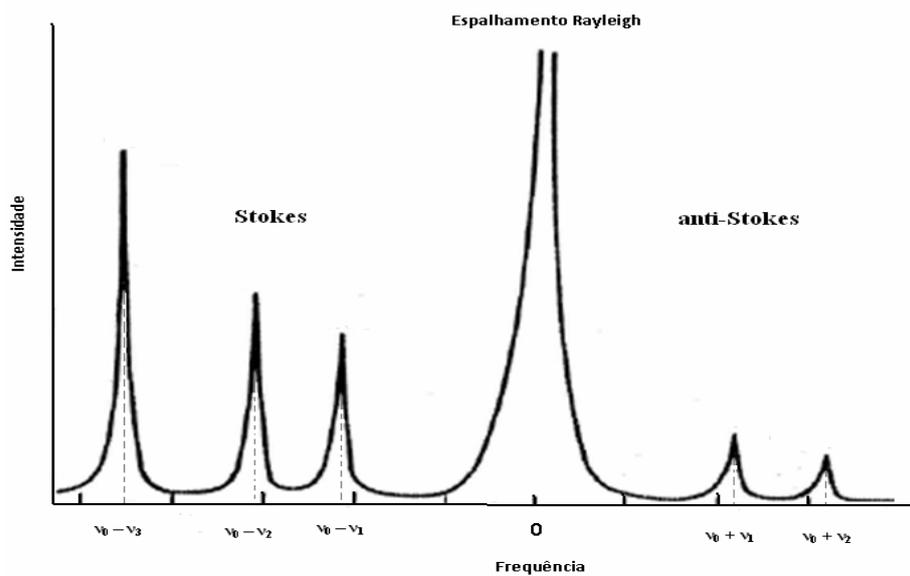


Figura 14- Espectro Raman ilustrativo

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

Através da mecânica quântica, o nível de energia, E_v de uma molécula diatômica é tratado aproximadamente como um oscilador harmônico, dado por:

$$E_n = h\nu \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (1)$$

onde $n = 0, 1, 2, \dots$ é o número vibracional quântico (autovalores). As transições vibracionais possíveis para o oscilador harmônico são as que $\Delta n = \pm 1$ onde as bandas fundamentais obedecem a esta regra de seleção. Entretanto, nenhuma molécula real apresenta comportamento perfeitamente harmônico, mas sim com padrão diferente denominado oscilador anarmônico. Além disso, o modelo harmônico não explica a existência da energia de dissociação e algumas frequências no espectro são maiores do que ω_e ferindo a condição $\Delta n = \pm 1$. A Figura 15 mostra a curva de energia de potencial para oscilador harmônico (A) e para oscilador anarmônico (B). No oscilador harmônico os níveis apresentam espaços iguais onde ω_e é a frequência de vibração em cm^{-1} e D_e é a energia de dissociação, ou seja, a energia necessária para se romper uma ligação química.

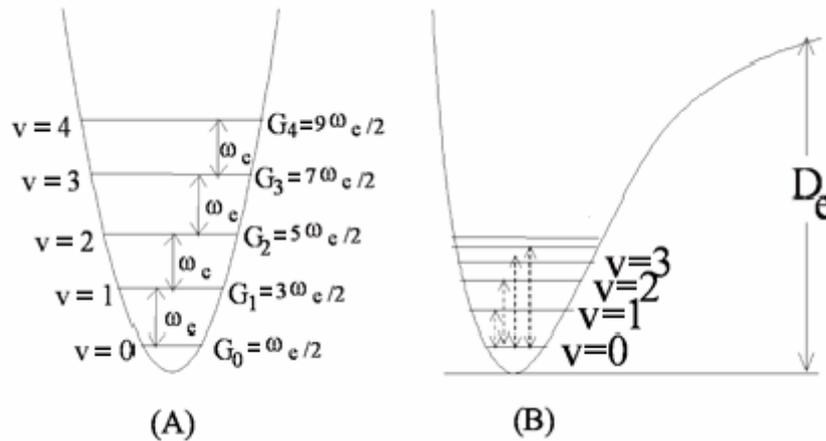


Figura 15- Ilustração da energia de um oscilar harmônico (A) e anarmônico (B) onde as linhas horizontais representam os níveis de energia vibracionais, as setas indicam as transições e a curva representa a energia potencial [60]

De acordo com a teoria clássica, o efeito Raman relaciona-se com a indução de um momento de dipolo \mathbf{P} no meio pela ação do campo elétrico da radiação \mathbf{E} , ou seja, há um deslocamento do centro de carga positiva em relação ao centro de carga negativa. O momento de dipolo é dado por $\mathbf{P}=\alpha\mathbf{E}$ onde α é a polarizabilidade eletrônica que depende da facilidade com que ocorre a redistribuição eletrônica da molécula que oscila com frequência normal ν_k . A mudança da polarizabilidade da molécula, regra de seleção da espectroscopia Raman, pode ser expressa por uma série de Taylor no qual Q é a coordenada interna do sistema:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 Q + \frac{1}{2!} \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial Q_k^2} \right) Q^2 + \dots \quad (2)$$

O vetor campo elétrico oscilante com frequência ν_0 e o modo normal de vibração são escritos da seguinte maneira:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad Q = Q_0 \cos(2\pi\nu_k t) \quad (3)$$

onde ν_k e ν_0 são, respectivamente, a frequência vibracional e a da radiação incidente. Os termos de maior ordem da expansão (2) podem ser desconsiderados

mediante a pequena variação de Q. Substituindo as equações (2) e (3) na equação da polarizabilidade, tem-se:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E} \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 Q_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_k t) \quad (4)$$

Considerando que $\cos(a)\cos(b) = \frac{1}{2}[\cos(a+b) + \cos(a-b)]$ a equação (4) pode ser reescrita como:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 Q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_k)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_k)t] \} \quad (5)$$

A soma acima mostra os três termos correspondentes à polarizabilidade que depende das diferentes frequências. O primeiro termo contém a frequência da radiação incidente ν_0 e relaciona-se ao espalhamento Rayleigh (elástico); o segundo termo e o terceiro termo correspondem aos espalhamentos anti-Stokes ($\nu_0 + \nu_k$) e Stokes ($\nu_0 - \nu_k$), respectivamente. Entretanto, estes dois espalhamentos só podem ser visualizados se $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 \neq 0$ para haver variação da polarizabilidade do material devido a um pequeno deslocamento da coordenada generalizada Q [61,62].

Conforme visualizado na Figura 13 os espalhamentos Stokes e anti-Stokes apresentam intensidades distintas o que não pode ser explicado pela teoria clássica visto que deveria haver simetria espectral. Assim é necessário considerarmos o modelo quântico, pois os movimentos vibracionais são quantizados.

Os coeficientes de Einstein estão relacionados com funções de onda ψ_m e ψ_n de estados combinados através do momento de transição de dipolo. Assim a polarizabilidade pode ser escrita segundo a equação (6):

$$\alpha_{mn} = \int \psi_m \alpha \psi_n d\tau \quad (6)$$

A relação entre as componentes do momento de dipolo induzido e as componentes do campo elétrico é dada pelas equações:

$$\begin{aligned} P_x &= \alpha_{xx} E_x + \alpha_{xy} E_y + \alpha_{xz} E_z \\ P_y &= \alpha_{yx} E_x + \alpha_{yy} E_y + \alpha_{yz} E_z \\ P_z &= \alpha_{zx} E_x + \alpha_{zy} E_y + \alpha_{zz} E_z \end{aligned} \quad (7)$$

As componentes α_{ij} , pertencem ao tensor simétrico de polarizabilidade ($\alpha_{xy} = \alpha_{yx}$, $\alpha_{xz} = \alpha_{zx}$, $\alpha_{yz} = \alpha_{zy}$). Para cada transição entre os estados vibracionais m e n devem ser consideradas as componentes $(\alpha_{ij})_{mn}$ sendo i e j como x , y ou z . Para haver atividade no espectro Raman, o momento de dipolo de transição também deve ser diferente de zero, contudo o operador que comparece na integral não é o do dipolo intrínseco, mas o do momento de dipolo induzido. Assim a equação (6) é reescrita como:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \quad (8)$$

Substituindo a equação (2) na equação (8) tem-se:

$$\alpha_{mn} = \alpha_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 \int \psi_m Q \psi_n d\tau \quad (9)$$

A primeira integral do segundo membro é sempre igual a zero uma vez que ψ_m e ψ_n são autofunções da mesma Hamiltoniana sendo ortogonais entre si o qual significa que os estados vibracionais no espalhamento Raman (Stokes ou anti-Stokes) são $m \neq n$ [63]

$$\int \psi_m^* \psi_n d\tau = 0 \quad (10)$$

Para sistemas com moléculas poliatômicas o modelo clássico também limita-se em explicar o movimentos destas. Cada átomo possui 3 graus de liberdade correspondentes aos movimentos nas direções x, y e z. Uma molécula poliatômica consiste de N átomos resultando em 3N graus de liberdade. Como a espectroscopia Raman refere-se a movimentos vibracionais, 3 graus de liberdade translacional e outros 3 graus para o movimento rotacional em moléculas lineares podem ser descartados resultando em 3N-6 graus de liberdade relacionados aos modos vibracionais fundamentais. Em moléculas lineares o resultado corresponde a 3N-5 [64].

Em geral é necessário o uso da Teoria de Grupos para saber se um modo vibracional é ativo ou não. Estas vibrações dependem das mudanças angulares entre os átomos e da direção das ligações tirando-os da posição de equilíbrio. As simetrias definidas pelas características espaciais das moléculas definirão como a molécula poderá vibrar, com isso, uma molécula pode ter diversas frequências de vibração (Figura 16).

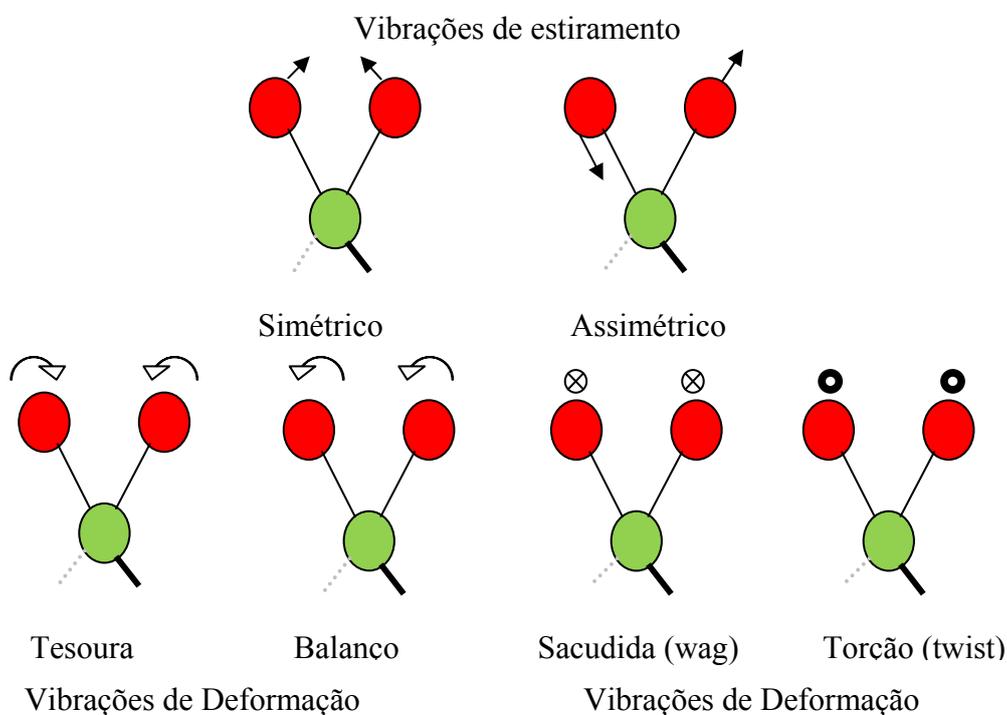


Figura 16- Modos de vibração entre átomos. O símbolo ● indica vibração perpendicular fora do plano; o símbolo ⊗ indica vibração perpendicular entrando no plano).

As diversas biomoléculas de uma amostra originam um complexo espectro de diferentes vibrações. Como exemplo, a Figura 17 apresenta um espectro de um tecido biológico e a Tabela 1 mostra as identificações bioquímicas atribuídas a cada banda vibracional. As alterações bioquímicas que ocorrem em uma amostra refletem-se nas variações espectrais.

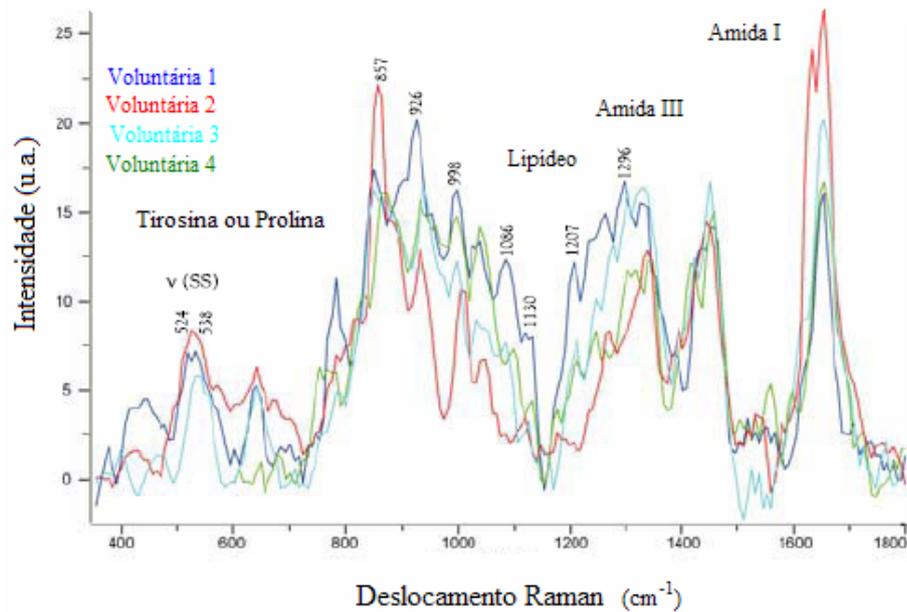


Figura 17- Espectro Raman da camada córnea para pele normal de diferentes voluntários no mesmo lugar anatômico [65]

Tabela 1: Atribuição das bandas conforme o espectro da Figura 17.

Posição (+/- 4 cm ⁻¹)	Estrutura	Atribuição
813	v (OPO)	DNA e RNA
860	(C ₁ -H)	Polissacarídeos
939	v (C-C)	Prolina e Valina
1004	δ anel aromático	Fenilalanina
1030	v (CH ₂)	Fosfolipídeos
1100	v (PO ₂ ⁻)	Ácidos Nucleicos
1244	v (=C-H)	Fosfolipídeos
1272	v (C-N) e δ(NH)	Amida III
1321	v CH ₂	Lipídeos
1452	δ (CH ₂) e δ (CH ₃)	Lipídeos e Proteínas
1556		DNA
1660	v C=O	Amida I

A espectroscopia Raman oferece contribuições notáveis para o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia proporcionando informações da estrutura molecular de modo minimamente invasivo, com alta resolução espectral e em tempo real. Apesar destas características, unido ao efeito Raman se produz também a fluorescência (fenômeno de absorção da luz). A fluorescência ocorre quando a radiação incidente é absorvida pelo material e os elétrons passam para estados eletrônicos excitados onde permanecem algumas dezenas de nanosegundos até saltarem para outro estado excitado de menor energia liberando um fóton de frequência mais baixa que o incidente. Nos espectros Raman a fluorescência apresenta-se como uma suave curva na linha de base do espectro e a intensidade pode ser alta a ponto de mascarar as bandas Raman. Outros fatores, caracterizados como ruídos, podem interferir no espectro Raman tais como: fluxo de fótons incidentes no detector gerando corrente elétrica com flutuação (ruído shot), detecção de raios cósmicos por parte do detector, outras fontes de luz externas, montagem e materiais do equipamento. A Figura 18 mostra o aparecimento dos principais ruídos em um espectro Raman [66].

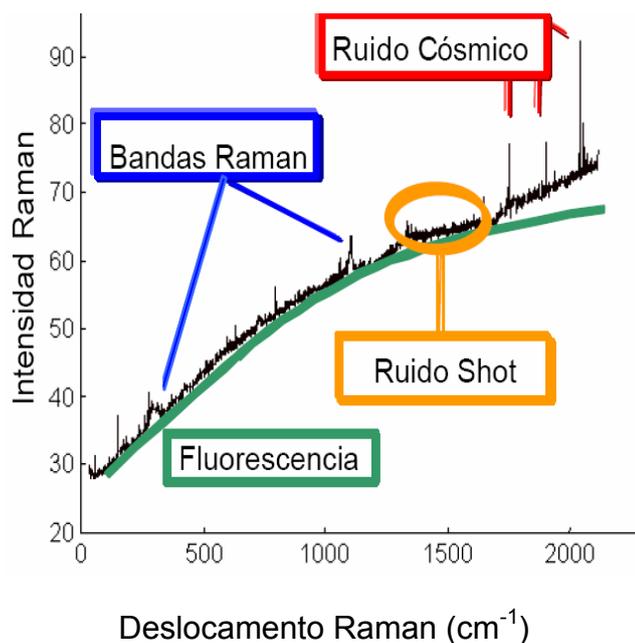


Figura 18- Principais ruídos na espectroscopia Raman [66]

3.2.1 Espectroscopia FT-Raman X Raman Dispersivo

A espectroscopia Raman faz uso de duas tecnologias: Raman Dispersivo e FT-Raman. Cada uma das técnicas apresenta suas vantagens e desvantagens onde o comprimento de onda da fonte de excitação precisa ser apropriado a cada uma. Em estudos de sistemas biológicos o uso de radiação na região visível do espectro (400 a 750 nm) induz fluorescência, devido à presença dos fluoróforos, mascarando as bandas e diminuindo a relação sinal/ruído. O uso de radiação infravermelha (IR), $\lambda \geq 1000$ nm, poderia minimizar o efeito da fluorescência. A técnica Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) equipado com laser Nd-YAG com $\lambda = 1064$ nm proporciona espectro praticamente livre de fluorescência quando comparada à espectroscopia Raman Dispersiva. Entretanto, demanda longo tempo de aquisição e baixa sensibilidade [67]. No Raman Dispersivo a radiação usada encontra-se na região do infravermelho próximo (700 a 1000 nm) que promove o aumento da fluorescência no espectro, porém intensifica as bandas Raman ($\sim 1/\lambda^4$), além de usar

menor potência do laser quando comparada com a técnica FT-Raman e o uso de cateteres de fibra óptica possibilitam medidas *in vivo*.

O sistema FT-Raman utiliza o método com transformada de Fourier baseado em um interferômetro de Michelson com um espelho móvel (Figura 19). O feixe de radiação proveniente da fonte (**F**) é separado por um divisor de feixes semitransparente (**DF**), colocado a 45° em relação aos espelhos, **E_M** e **E_F**. Os dois feixes, **F_F** e **F_M**, apresentam praticamente a mesma intensidade e são refletidos pelos espelhos fixo e móvel, respectivamente. Um dispositivo permite reconhecer a distância **X/2** relativamente ao plano **O**. Os feixes refletidos se recombinam no divisor dando origem ao interferograma. A cada instante o espelho móvel encontra-se em uma dada posição diferenciando os caminhos ópticos da radiação entre os espelhos fixo e móvel. Esta diferença gera distintas fases dos feixes resultando em variações na amplitude da interferência, ou seja, quando os caminhos dos feixes **F_F** e **F_M** são idênticos (mesma fase) a interferência é construtiva; a interferência destrutiva ocorre quando os feixes estão fora de fase.

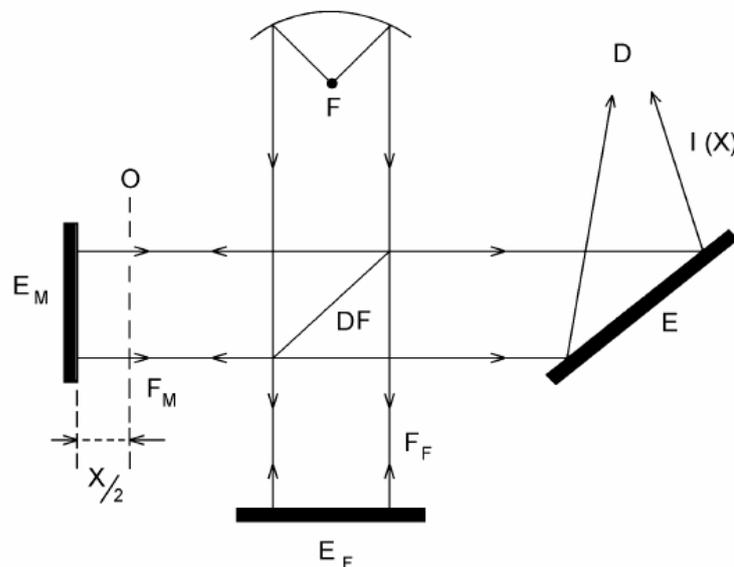


Figura 19- Esquema do interferômetro de Michelson usando um espelho móvel sendo **F** a fonte, **E_M** espelho móvel, **E_F** espelho fixo, **DF** divisor de feixes e **D** detector [68]

O sinal Raman é coletado utilizando-se filtros que eliminam o espalhamento Rayleigh (filtro Notch) e transmitem o sinal inelástico para o espectrômetro que contém um detector de Germânio refrigerado por nitrogênio líquido. As variações na

intensidade, $I(\mathbf{x})$, do sinal dependem da diferença (\mathbf{x}) entre \mathbf{F}_F e \mathbf{F}_M gerando o interferograma. Considerando as vibrações luminosas com número de onda $\bar{\nu}$, a diferença óptica é dada por $2\pi\bar{\nu}x$. Considerando $I(\bar{\nu})d\bar{\nu}$ como a intensidade da fonte no intervalo $d\bar{\nu}$ tem-se a intensidade do feixe após as combinações luminosas:

$$dI(x) = AI(\bar{\nu})d\bar{\nu}(1 + \cos 2\pi\bar{\nu}x) \quad (11)$$

O termo “A” relaciona-se à eficiência do divisor de feixes e às perdas que ocorrem nos espelhos. Entretanto, para o espectro todo, a intensidade do feixe resultante é:

$$I(x) = \int_0^{\infty} AI(\bar{\nu})d\bar{\nu}(1 + \cos 2\pi\bar{\nu}x)d\bar{\nu} \quad (12)$$

Considerando que na expressão (12) há termos constantes, experimentalmente pode-se limitar à equação:

$$F(x) = \int_0^{\infty} I(\bar{\nu}) \cos 2\pi\bar{\nu}x d\bar{\nu} \quad (13)$$

A expressão (13) é a transformada de Fourier onde:

$$I(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(x) \cos 2\pi\bar{\nu}x dx \quad (14)$$

Assim, o espectro obtido é a transformada de Fourier do interferograma [68]. As medidas *in vivo* são realizadas utilizando uma sonda com a fibra de excitação que

direciona o laser na amostra e a fibra de coleta que captura o sinal espalhado (Raman).

Na espectroscopia Raman Dispersivo, o uso de laser com $\lambda = 785 \text{ nm}$ reduz consideravelmente a fluorescência. A Figura 20 mostra uma possível configuração para realização das medidas *in vivo* neste sistema. Uma fibra óptica é usada para guiar o laser de excitação (porção de excitação) até a amostra, coletar o sinal espalhado (porção distal) e guiar este sinal (porção proximal) até o espectrômetro equipado com uma câmera CCD. O espectrômetro é um instrumento óptico que possui uma grade de difração, responsável por separar a luz incidente em feixes com comprimentos de onda (λ) praticamente monocromáticos.

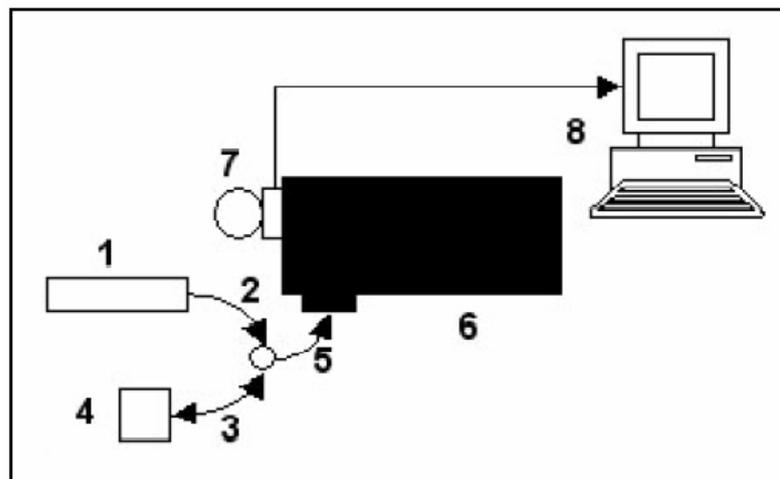


Figura 20- Instrumentação para medidas Raman *in vivo*: 1- laser, 2- fibra óptica (porção de excitação), 3- fibra óptica (porção distal), 4- amostra, 5- fibra óptica (porção proximal), 6- espectrômetro, 7- CCD, 8-computador [69]

Os espectrômetros podem seguir diferentes configurações. A mais comum é a configuração de Czerny-Turner onde o sinal, após entrar no espectrômetro, é direcionado até um espelho colimador que guia o sinal, agora paralelo, até a grade de difração. A grade de difração é composta por diversas ranhuras/mm que difratam o comprimento de onda incidente em seus componentes. O sinal decomposto é guiado até um espelho focalizador que o emitirá até a saída do espectrômetro onde será lido pelo detector CCD (Figura 21).

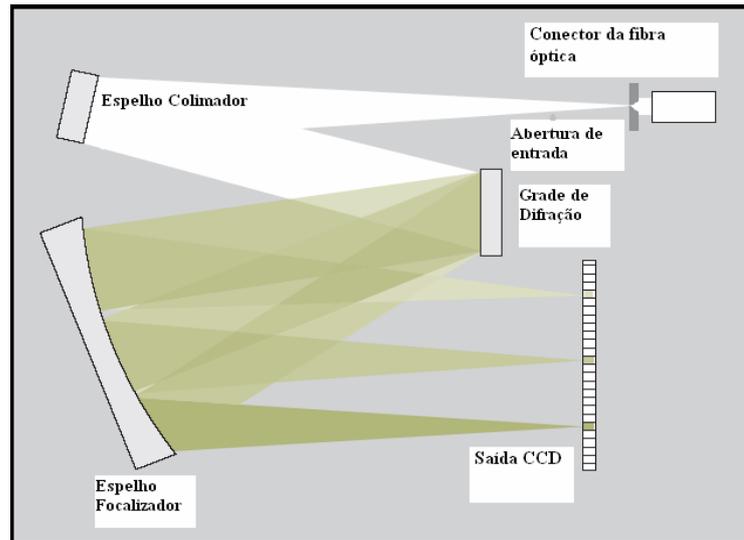


Figura 21- Espectrômetro conforme configuração Czerny-Turner [70]

O detector CCD (dispositivo de carga acoplada) é um sensor ou detector, para captação de imagens composto por uma matriz de células foto-receptora que transformam sinal luminoso em sinal elétrico (corrente elétrica) enviado ao computador para ser interpretado e transformado em espectro.

3.3 Análise Estatística

A estatística é, essencialmente, o estudo das propriedades de números aleatórios proporcionando o entendimento das medidas de forma a minimizar os efeitos indesejados. A idéia da estatística é baseada em extrair informações de pontos individuais em um grande conjunto de dados. Os espectros de um conjunto de amostras são organizados em uma matriz com variáveis independentes:

$$A = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{2n} \\ a_{31} & a_{33} & a_{3n} \end{bmatrix}$$

A técnica de Análise de Componentes Principais vem sendo largamente utilizada para classificar tecidos com distintas características bioquímicas [71, 72]. A

PCA (principal components analysis) é uma poderosa ferramenta estatística multivariada que tenta explicar a covariância da estrutura de dados, ou seja, identifica padrões nos dados e os expressa de maneira a evidenciar semelhanças e diferenças. Além de encontrar padrões nos dados, PCA pode ser usada para comprimir ou reduzir a dimensionalidade dos dados [73]. Através da transformação linear dos dados para um novo sistema de coordenadas, onde a maior variância de todas as projeções será posicionada como a primeira coordenada (PC1), a segunda maior variância (ortogonal à primeira) será a segunda coordenada (PC2) e assim por diante [74]. Cada componente possui um peso, ou seja, a contribuição de cada variável antiga. Os coeficientes da combinação linear são denominados de "loadings" originando uma nova matriz de dados. O método PCA está baseado na correlação entre variáveis agrupando aquelas que estão altamente correlacionadas. Como a matriz de covariância é quadrada, os autovalores e autovetores desta matriz podem ser calculados fornecendo informações sobre os dados. As colunas da matriz de "loadings" correspondem aos componentes principais da matriz de variância - covariância, $\mathbf{A}^t\mathbf{A}$, no qual \mathbf{A}^t é a matriz transposta, enquanto que os elementos da matriz \mathbf{X} (elementos contêm informação sobre a quantidade de variância que cada componente principal apresenta) são as raízes quadradas dos autovalores da mesma, ordenados em ordem decrescente. Os dados experimentais originais podem não ter uma distribuição adequada para a análise, dificultando a extração de informações úteis e interpretação dos mesmos. Desta forma é necessário um pré-processamento dos dados como centrá-los na média que significa calcular a média total das intensidades para cada número de onda (deslocamento Raman) e subtrai cada intensidade do respectivo valor médio. Isto produz um conjunto de dados onde a média é zero [75].

3.4 Utilização da Espectroscopia Raman no Estudo da Pele

A espectroscopia vibracional, especificamente a técnica Raman, tem se desenvolvido ao longo dos últimos anos e atraído a atenção na Medicina, uma vez que pode ser empregada como método auxiliar minimamente invasivo no

diagnóstico de doenças, caracterização e alterações bioquímicas de células e tecidos, sob a ação ou não, de medicamentos ou cosméticos [14, 20, 21, 22, 65, 67].

Caspers e colaboradores afirmaram que as técnicas não invasivas, fornecem informações detalhadas sobre a composição molecular e estrutural e são importantes para compreender as alterações bioquímicas da pele, assim como a penetração de produtos aplicados na transepidérmica. As evidências foram alterações lipídicas e informações sobre o fator natural de hidratação (NMF- natural moisturizing factor) [24].

Lieber e Jansen desenvolveram um sistema portátil e compacto Micro-Raman para futuras análises clínicas dermatológicas. Foram apresentados neste estudo os principais componentes deste sistema tais como detector CCD, laser e fibra óptica. O sistema fornece espectros Raman *in vivo*, com qualidade e em tempo real clinicamente viável [76].

Knudsen e colaboradores verificaram as variações dos espectros FT-Raman *in vivo* na pele humana normal. Primeiramente 13 voluntários compuseram o estudo e verificaram-se as variações espectrais entre pessoas para diferentes pontos na mesma região. O segundo experimento contou com a presença de 140 voluntários verificando as diferenças espectrais entre distintas pigmentações da pele. As análises espectrais foram concentradas no número de onda e intensidades relativas da banda da água em 3250 cm^{-1} , bandas de amida I e amida III nas regiões entre $1645\text{-}1680$ e $1230\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, além de número de onda das bandas em 1450 e 2940 cm^{-1} que são usadas como referências. Os resultados mostraram que houve variação interpessoal na intensidade da água, amida I, amida III. Não houve variações espectrais consideráveis na intensidade quanto à pigmentação [77].

Recentemente Lademan e colaboradores verificaram a distribuição dos carotenóides como poderosos agentes antioxidantes na pele humana. A pele de 4 voluntários foi investigada através da espectroscopia Raman *in vivo* antes e depois de aplicação tópica de carotenóides. Detectou-se a presença de carotenóides naturais em diferentes camadas do camada córnea. Entretanto, depois da aplicação tópica houve aumento do potencial antioxidante, pois os carotenóides penetraram na epiderme aproximadamente $24\text{ }\mu\text{m}$ [78].

4 METODOLOGIA

4.1 Comitê de ética

A execução deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba seguindo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sob o protocolo nº H48/CEP/2008 (ANEXO A).

4.2 Delineamento do estudo

Este estudo apresentou as características: 1) intervenção terapêutica; 2) controlado pois os grupos foram separados de acordo com o uso de cosméticos ou não por parte das voluntárias e 3) duplo cego com a revelação das características dos produtos somente no término do estudo.

4.3 População do estudo

As voluntárias foram selecionadas na Faculdade da Terceira Idade da UNIVAP. Para a seleção, elaborou-se um questionário (ANEXO B) a fim de analisar se as mesmas encontravam-se aptas a participar do estudo. Nesta avaliação foram considerados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de Exclusão

1. Menores de 60 anos e maiores de 75 anos;
2. Histórico de dermatoses;
3. Histórico de irritação ou sensibilidade a produtos cosméticos;

4. Qualquer tipo de tratamento cutâneo;
5. Necessidade de alteração medicamentosa durante o período do estudo
6. Grávidas e/ou lactantes.

Crítérios de Inclusão

1. Faixa etária entre 60 a 75 anos;
2. Sexo feminino;
3. Ausência de dermatoses;
4. Autonomia para comparecer ao local de análise;
5. Não alterar o consumo de medicamentos durante o estudo;
6. Não utilizar nenhum produto cosmético com exceção daqueles fornecidos pelos pesquisadores;
7. Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C).

È importante ressaltar que o tipo de pele não foi critério de exclusão, pois não há restrição para o uso do produto. Com o preenchimento do questionário, seguido de sua análise, deu-se início à convocação das voluntárias selecionadas.

Os produtos utilizados pelas voluntárias foram fornecidos pelos pesquisadores. Estes produtos comerciais consistiam de dois cremes: 1) placebo com ativos hidratantes e 2) ativos antienvhecimento, antioxidante e hidratante, além de um sabonete líquido somente com ação de limpeza.

As voluntárias foram divididas aleatoriamente em três grupos. Na primeira fase houve desistência por parte de algumas participantes principalmente devido à dificuldade de comparecerem ao agendamento das análises (Tabela 2).

- Grupo controle (codificado por CTR): nenhum produto cosmético foi aplicado no rosto durante o estudo, com exceção de um sabonete líquido.
- Grupo Placebo (codificado por RT2): uso de creme facial com ativos hidratantes e sabonete líquido.
- Grupo Creme (codificado por AF2): uso de creme facial contendo ativos hidratantes, antioxidantes, filtros solares e molécula antienvhecimento, além do sabonete líquido.

O período de 60 dias foi dividido em três avaliações a cada 30 dias, resultando em três tempos: T0, T30 e T60. A Tabela 2 apresenta o número de voluntárias, para cada grupo, nos três tempos:

Tabela 2: População do estudo

Grupos	T0	T30	T60
Controle	15	14	12
Creme (AF2)	17	17	17
Placebo (RT2)	19	15	14

A Tabela 3 mostra a classificação dos fototipos segundo a classificação de Fitzpatrick. As células da Tabela preenchidas em vermelho indicam o maior número de voluntárias para cada fototipo.

Tabela 3: Distribuição dos fototipos das voluntárias segundo Fitzpatrick

Grupo	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V	Tipo VI
CTR	0	2	1	3	5	1
RT2	1	6	4	2	1	0
AF2	3	6	6	2	0	0

4.4 Intervenção

Durante o contato e confirmação da participação das voluntárias, foi esclarecido que a mesma deveria ficar sete dias sem a aplicação de qualquer produto cosmético na face antes da primeira avaliação.

Antes de iniciar a primeira avaliação, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a voluntária recebeu os esclarecimentos a respeito dos cuidados com a pele durante a fase de estudo, quanto a suspensão da pesquisa seguindo os critérios de exclusão e sobre a não divulgação de sua identidade.

Antes de iniciar as medidas da pele, a voluntária ficou em ambiente climatizado a 20° C durante 10 minutos. Logo após fez-se a limpeza do local com algodão embebido em 1,5 ml de álcool etílico 70%. As medidas da pele foram realizadas utilizando fibra óptica em ambos os equipamentos: Espectrômetro FT-Raman modelo RFS 100/S, Bruker® (Alemanha), acoplado à fibra óptica (Figura 22 a) com voluntárias em posição horizontal (Figura 22 b) e Espectrômetro Raman Dispersivo modelo SpectraPro-2500i, PI Acton ® (Estados Unidos) acoplado à fibra optica EMVISION LLC (Figura 23 a) no qual as voluntárias permaneceram sentadas (Figura 23b). Todas as medidas, em ambas as técnicas, foram realizadas na área periorbicular na lateral ocular direita e a fibra foi posicionada na pele com angulação próxima de 90°.

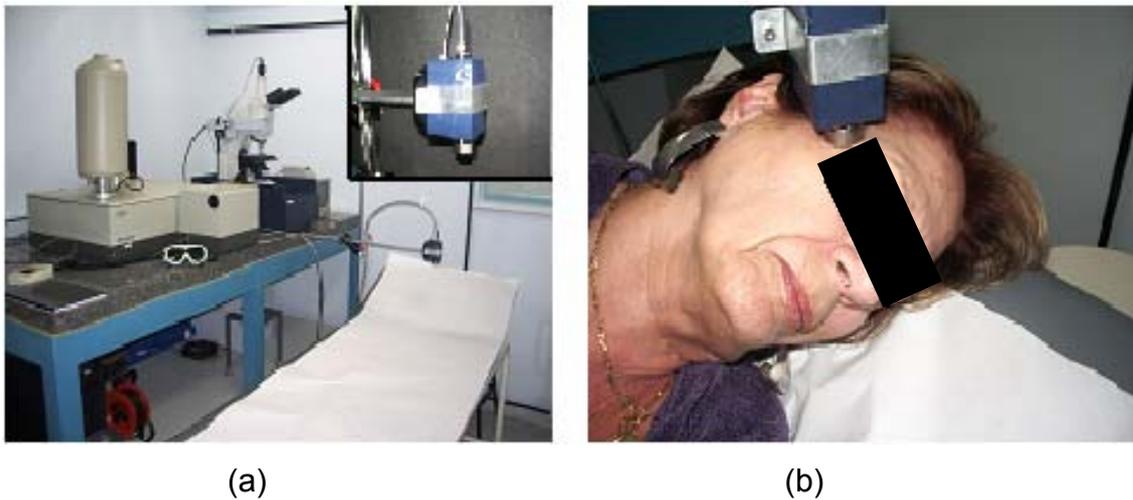


Figura 22: (a) Equipamento FT-Raman; (b) Disposição da Ram Probe para emissão da luz laser e coleta do sinal espalhado.

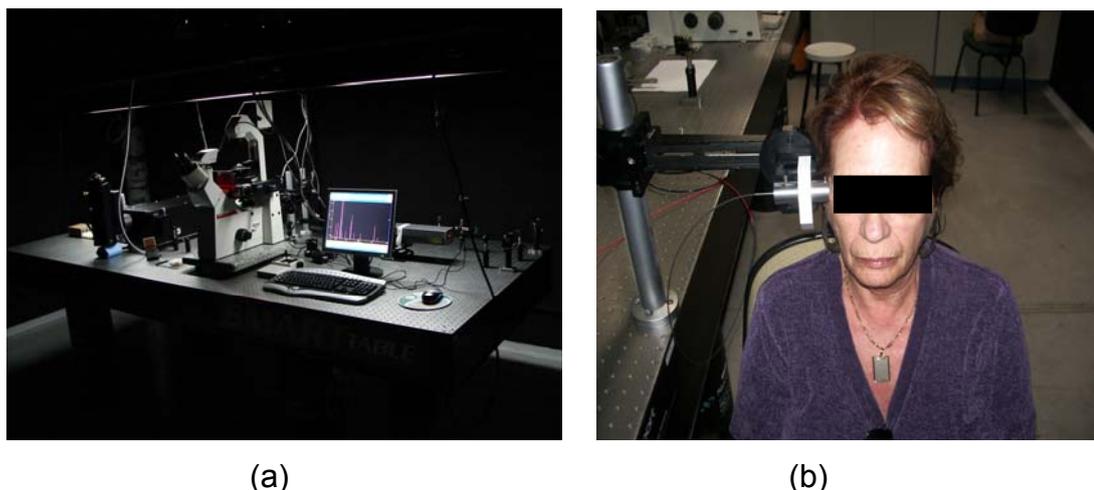


Figura 23: (a) Equipamento Raman; (b) Disposição da fibra óptica para emissão da luz laser e coleta do sinal espalhado.

A potência do laser foi ajustada de forma que o sinal fosse extraído com melhor razão sinal/ruído sem que houvesse aquecimento ou quaisquer danos à pele da voluntária.

4.5 Parâmetros para análise FT-Raman

A técnica FT-Raman possui um laser Nd:YAG com comprimento de onda igual a 1064 nm. Os espectros foram coletados por um detector de germânio e os parâmetros das medidas foram: resolução espectral de 4 cm^{-1} , potência do laser na pele igual a 190 mW (calibração do equipamento), varredura de 600 scans equivalente ao tempo de exposição de aproximadamente 18 minutos para cada medida. A leitura foi realizada em dois pontos próximos na mesma região.

4.6 Parâmetros para análise Raman Dispersivo

O laser de excitação, com comprimento de onda igual a 785 nm, foi guiado por uma fibra óptica (EMVISION LLC) acoplada a filtro passa-banda (785 nm) na porção

proximal e filtro Notch na porção distal. Os parâmetros das medidas foram: potência do laser na pele igual a 78 mW (potenciômetro Coherent® modelo FM-GS), tempo de exposição igual a 10 s com 7 acumulações para cada ponto. A leitura foi realizada em três pontos próximos na mesma região.

4.7 Pré-processamento dos espectros

O pré-processamento dos espectros é uma etapa de adequação, para que venham compor um conjunto de sinais com influências mínimas de ruídos e fluorescência. No FT-Raman os dados foram adquiridos pelo programa OPUS (Copyright © Bruker Optik GmbH 1997-2002) e no Raman Dispersivo os dados foram adquiridos pelo software WIN SPEC. Após a aquisição, os dados foram processados em uma rotina do software Matlab® 6.0 (Vanderbilt University, Tennessee EUA) [62]. Neste programa escolhe-se a faixa de frequências a ser analisada e ajusta-se um polinômio de grau adequado ao espectro original. A linha de base escolhida para subtrair o sinal de fluorescência dos espectros foi diferente para as duas regiões espectrais estudadas. Para a região espectral de 900 a 1800 cm^{-1} foi escolhido um polinômio de grau 4 e para a região de 2800 a 3500 cm^{-1} foi escolhida reta (grau 1). Nestas regiões encontram-se os principais modos vibracionais dos tecidos biológicos conhecida como região de “impressão digital”.

Utilizando-se o software ORIGIN 7.5, fez-se separadamente a média entre os pontos para os espectros dos sistemas FT-Raman e Raman Dispersivo. Para a região de baixa frequência, os dados foram normalizados em relação ao modo vibracional 1445 cm^{-1} (referente à deformação angular, δCH_2 , de lipídios e fosfolipídios) ao passo que, para a região de alta frequência, normalizaram-se os espectros em relação à intensidade do pico 2936 cm^{-1} (correspondente ao estiramento νCH_3 de lipídeos) [79, 80]. Esta normalização baseia-se na distribuição normal (média zero e desvio padrão igual a 1) e os picos utilizados como referência apresentam variação mínima na intensidade e largura de banda entre os espectros. Desta forma os dados foram analisados estatisticamente através do Minitab®15.

4.8 Análise Qualitativa

Foi definido um nível de significância de 0,05 %. Os resultados estatísticos foram desenvolvidos utilizando uma análise multivariada conhecida como Análise de Componentes Principais (PCA) que corresponde ao cálculo dos autovalores e correspondentes autovetores de uma matriz de covariância (matriz de coeficientes de correlação entre variáveis). O objetivo da utilização da PCA é obter um número reduzido de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis que armazenem o máximo de informação [81, 82]. Primeiramente aplicou-se a estatística para as variações temporais dentro do mesmo grupo (intragrupo) e posteriormente realizaram-se as análises entre grupos distintos (intergrupos). Para a visualização dos aspectos qualitativos dos grupos espectrais foram construídos gráficos de Boxplot através do software Minitab ®15, para a região de baixa frequência (900 a 1800 cm^{-1}) e para a região de alta frequência (2800 a 3500 cm^{-1}) para os três grupos a fim de identificar as variações de intensidade relativa, deslocamento e aparecimento de modos vibracionais durante o período de estudo. Uma planilha foi montada com todos os dados normalizados através do pico de maior intensidade para processamento da análise de PCA e estes dados foram centrados na média. Foram obtidos dois resultados: (a) Os componentes principais (PC) de 1 a 4, para realização da análise discriminante que consiste em classificar as características dos grupos em uma amostragem de grupos conhecidos e (b) os valores individuais dos componentes principais (PC1-PC4) que originaram a Matriz Plot.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor análise dos resultados, os espectros do FT-Raman foram divididos em baixa frequência e alta frequência visto que cada região espectral fornece distintas informações. Para o Raman Dispersivo, o deslocamento espectral concentra-se propriamente na região de baixa frequência (fingerprint). Baseando-se nestas informações os resultados foram inicialmente organizados pelas análises intragrupo, em baixa frequência, onde o fator tempo (T0, T30 e T60) foi considerado para diferenciação espectral. Com esta divisão espectral os resultados obtidos foram analisados em FT-Raman e Raman Dispersivo, considerando as variações bioquímicas referentes a lipídeos, proteínas, DNA e água. A região de alta frequência foi analisada posteriormente. Paralelamente comparou-se os diferentes tratamentos analisando as diferenças bioquímicas relativas às alterações na pele. A primeira medida de todos os grupos foi nomeada como T0, sem nenhuma distinção. Este procedimento foi adotado para observar o espalhamento dos resultados no início dos experimentos, pois antes das medidas as voluntárias ficaram sete dias sem utilizar creme no rosto.

Um espectro Raman típico das peles estudadas neste trabalho, na região de impressão digital, sem nenhuma aplicação cosmética, é apresentado na Figura 24, como exemplo. Os espectros são apresentados em função da intensidade e números de onda entre 900 a 1800 cm^{-1} .

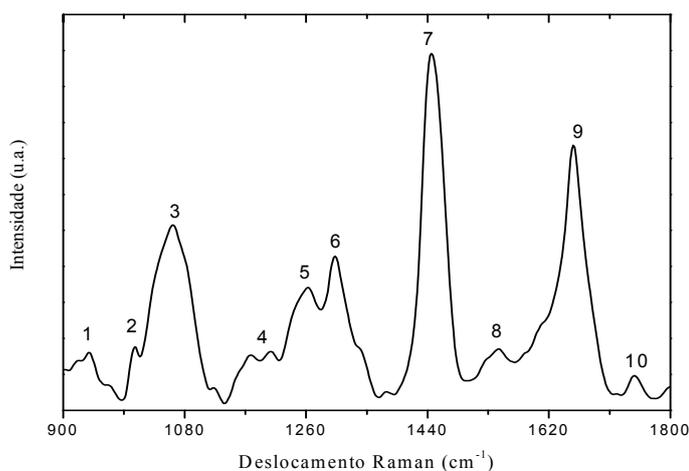


Figura 24- Espectro Raman típico da pele normal sem nenhum tratamento. A divisão espectral apresentada tem por objetivo facilitar a identificação das principais bandas.

A posição dos picos, com suas respectivas estruturas químicas e atribuições, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Atribuição Raman para os principais modos vibracionais da pele humana. δ = deformação, ν = estiramento, s= simétrico, a=assimétrico [24, 83,84].

Número da banda	Posição do pico (cm^{-1})	Estrutura	Atribuição
1	937	$\nu\text{C-C}$	α hélice-colágeno (prolina e hidroxiprolina)
2	1005	νCC (Anel aromático) _s	Fenilalanina
3	1063	C-C=O trans(acyl)	Lipídeos (ácidos graxos)
4	1174	$\nu\text{C-C}$	Tirosina
5	1262	$\nu\text{C=O}$, $\nu\text{C-N}$	α hélice-Amida III

6	1302	$\nu\text{C}=\text{O}$, angular CNH	Amida III
7	1445	$\delta(\text{CH}_3)_a$	Lipídeos e proteínas
8	1344/ 1544	NH, $\nu\text{C}-\text{C}$	Triptofano, DNA, melanina
9	1654	$\nu\text{C}=\text{O}$	α hélice - Amida I
10	1747	$\nu\text{C}=\text{O}$	Triglicérides/ sebo (éster)

As bandas 1, 5, 6 e 9 centradas em aproximadamente 937, 1262, 1302 e 1654 cm^{-1} , respectivamente, estão relacionadas à presença das proteínas de colágeno e queratina na pele. Tu e colaboradores descreveram sete vibrações relacionadas com o grupo amida dentre as quais, quatro são observadas nos espectros obtidos [85]. Segundo Gniadecka e colaboradores a amida I envolve principalmente estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ enquanto a amida III é um sistema complexo que envolve estiramento das ligações $\text{C}-\text{R}$ e $\text{C}-\text{N}$ juntamente com a deformação angular CNH conforme Figura 25 [86]. A banda associada à amida I, em 937 cm^{-1} , está intimamente relacionada à estrutura α -hélice das proteínas; desta forma, esta banda pode ser utilizada para indicar a conformação das proteínas.

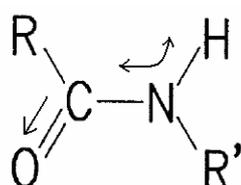


Figura 25- Representação esquemática de ligação peptídica de proteínas, principalmente o grupo amida I e III, onde R e R' indicam radicais [86].

As bandas de amida I e III originam-se das vibrações das cadeias laterais de prolina e hidroxiprolina, além da vibração do esqueleto (cadeia central) de colágeno, $\nu\text{C}-\text{C}$. As moléculas de prolina e hidroxiprolina formam $\frac{1}{4}$ dos aminoácidos do colágeno [24].

A banda 2, próxima de 1005 cm^{-1} , relaciona-se às vibrações do anel aromático da fenilalanina, um dos aminoácidos codificados pelo código genético. Esta conformação não apresenta instabilidade em tecidos normais. Contudo, em alguns processos celulares e teciduais degenerativos este aminoácido pode apresentar alterações visto que relaciona-se aos ácidos nucleicos [87]. Esta região espectral em geral é livre de sobreposições de outros modos vibracionais.

Próxima de 1063 cm^{-1} , a banda 3 é atribuída à conformação *trans* de C-C=O da cadeia acil de lipídeos que indica o estado cristal para toda a cadeia. Os lipídeos apresentam diversas conformações correspondendo a diferentes níveis de organização. A instabilidade do lipídeo aumenta com a transição de cristal para solução e o número de ligações laterais da cadeia acil diminui a estrutura do lipídeo que se torna mais caótica. Caspers e colaboradores compararam o espectro Raman da pele com o espectro puro da ceramida e verificaram que os picos do lipídeo na pele coincidiam exatamente com os picos da ceramida que é a classe de lipídeos mais abundante na epiderme. O desaparecimento do pico 1063 cm^{-1} caracteriza transição da conformação *trans* (cristal) para a *gauche* (solução) representando a desorganização desta cadeia (Figura 26).



Figura 26- Representação esquemática da cadeia principal acil em conformação *trans* e *gauche* [87].

Em 1174 cm^{-1} relacionado aos modos da tirosina (Figura 7) encontra-se a banda de número 4. A presença deste aminoácido revela um ambiente hidrofílico. Tfayli e colaboradores encontraram outras 2 bandas da tirosina em regiões espectrais não consideradas neste estudo, e associaram as variações de intensidade destas bandas com o estiramento de polissacarídeos [84].

A banda 4 localizada em aproximadamente 1445 cm^{-1} é relacionada às vibrações assimétricas do grupo CH_3 tipo tesoura (Figura 16). A pele é composta em grande parte por lipídeos e proteínas com este tipo de configuração molecular levando a

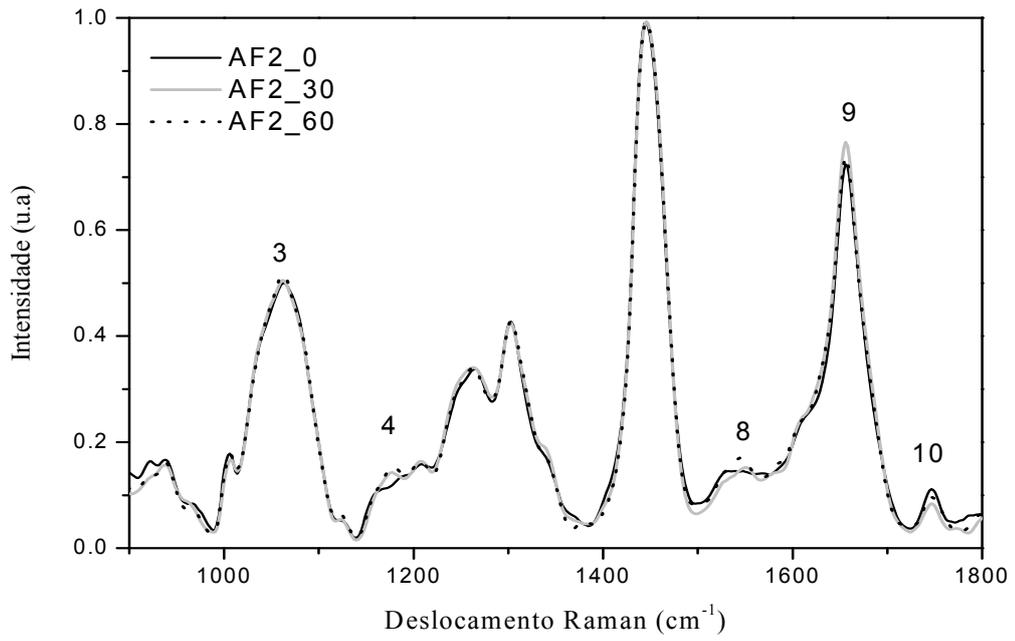
mínima alteração na intensidade deste pico. Outro fator ainda é que as bandas C-H sobressaem fora da cadeia protéica e não participam de fortes interações intermoleculares visto que não sofrem alterações em sua estrutura secundária. Por este motivo os espectros foram normalizados com relação a banda de número 7. Contudo, qualquer deslocamento positivo na frequência desta banda poderia refletir uma dobra ou um desdobramento das proteínas e da exposição da cadeia de aminoácidos a moléculas de água localizadas ao redor [86].

O triptofano, banda 8, é um dos aminoácidos codificados pelo código genético e apresenta duas bandas respectivamente em 1344 cm^{-1} e 1544 cm^{-1} . O desaparecimento do primeiro indica que o anel de triptofano está exposto na cadeia e, portanto acessível às moléculas de água.

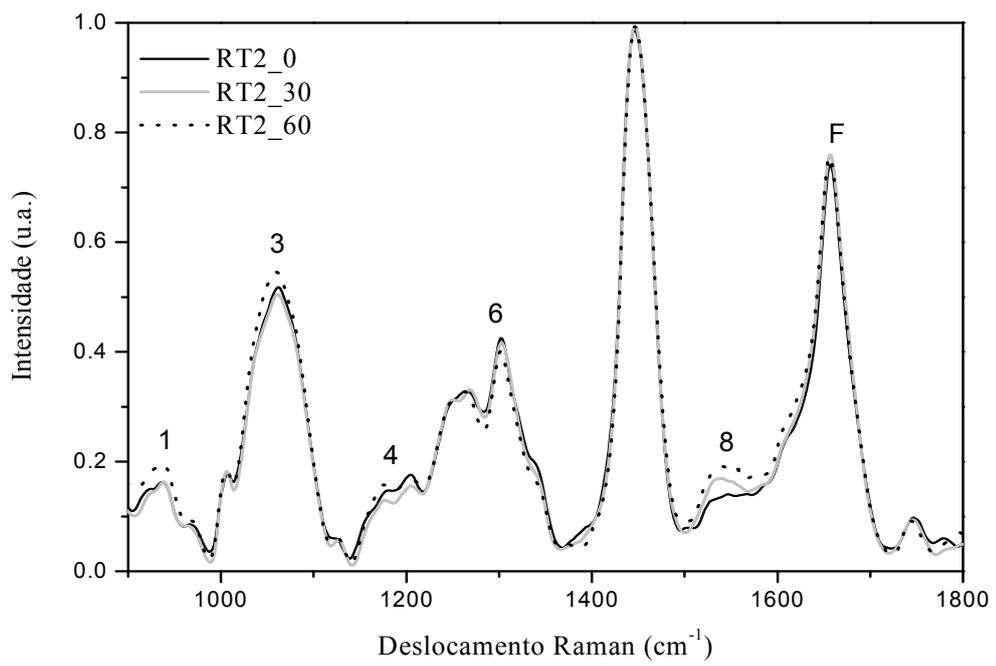
Um pequeno pico localizado em 1747 cm^{-1} , banda 10, foi atribuído às vibrações $\nu_{\text{C=O}}$ de éster presentes abundantemente nos triglicérides. A presença das triglicérides é evidenciada na gordura, ou seja, no tecido subcutâneo. As gorduras são sintetizadas pela união de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol, formando um triéster. O triglicerídeo refere-se ao estado sólido desta gordura. A presença deste composto na epiderme e derme está ligada à secreção sebácea [24].

5.1 Análises Intragrupo – FT-Raman

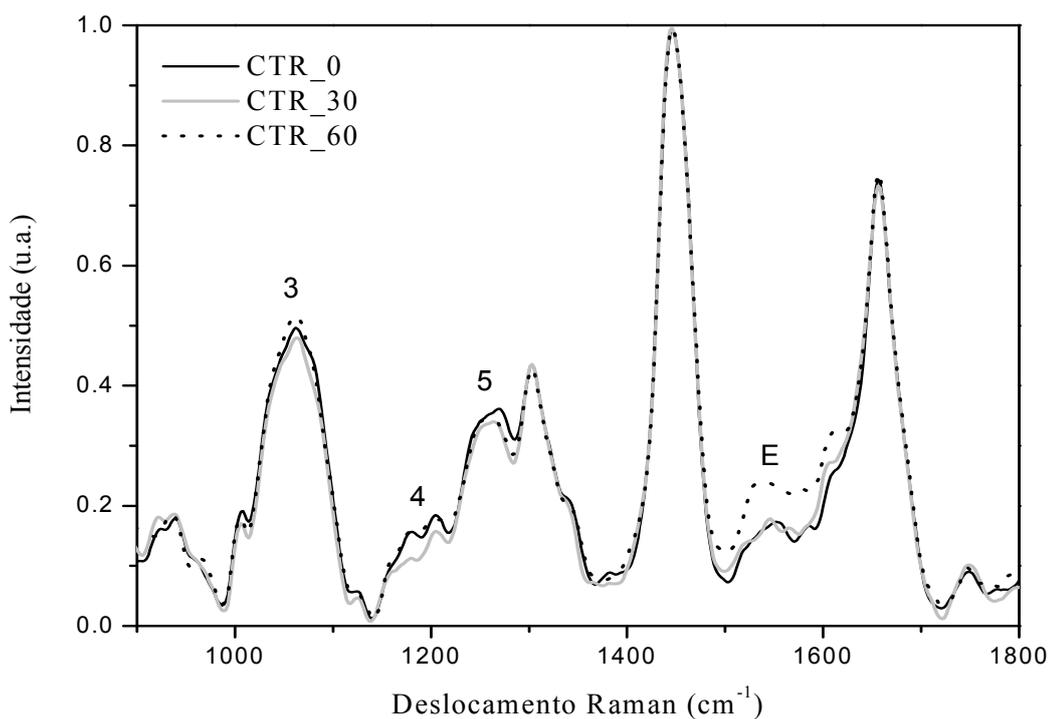
A Figura 27 (a, b, c) apresenta os espectros médios Raman obtidos para cada grupo estudado. Estes espectros foram normalizados em relação ao pico mais intenso, centrado em aproximadamente 1445 cm^{-1} atribuído aos modos vibracionais de deformação angular (δ), do grupo CH_2 de lipídios e fosfolipídios [88, 89, 90]. As regiões apontadas por números, seguindo a mesma sequência da Figura 24, indicam as regiões que apresentaram as principais variações visíveis.



(a)



(b)



(c)

Figura 27- Espectros FT-Raman médios obtidos para cada grupo estudado. Todos os espectros são apresentados normalizados pela banda centrada em 1445 cm^{-1} , sendo esta associada à deformação, δCH_2 ; (a) espectros médio grupo AF2, (b) espectros médio grupo RT2 e (c) espectros médio grupo CTR.

Todos os grupos mostraram variações praticamente nas mesmas bandas características. Entretanto, em alguns aspectos podemos diferenciar os grupos por meio das alterações de intensidade (aumento ou diminuição) relativas de algumas destas bandas.

Na Figura 27 (a) o pico 10 do grupo AF2, relacionado aos modos de triglicérides, apresenta pequena diminuição na intensidade para T30 e para T60 possui intensidade com perfil intermediário. O pico 3, ácidos graxos, não mostrou alterações consideráveis durante o período de estudo. Em 4, onde se encontra presente o modo vibracional da tirosina, ocorreu formação de dublete após 30 dias de uso do produto e manteve esta característica para a medida em T60. Além disso, ocorreu aumento na intensidade em T30 mantendo-se em T60. A região 8 relacionada à presença de triptofano, DNA e melanina no tecido, apresentou pequena variação na intensidade em T30 e em T60. Para 9, ocorreu nítido aumento

de intensidade em T30 e declínio em T60, porém permanecendo mais intenso quando comparado com T0. Em 10, houve diminuição na intensidade de T0 para T30 e posterior sensível aumento para T60. Também pode-se verificar aumento visível na intensidade da banda centrada em 1654 cm^{-1} relacionada aos modos vibracionais de amida I em T30. Em menor escala, o grupo RT2 também mostrou pequeno aumento na intensidade enquanto o grupo CTR não mostrou nenhuma variação de intensidade nesta região, porém apresentou alargamento de banda. A amida I com conformação α -hélice revela a presença de moléculas de colágeno e queratina indicando que os grupos AF2 e RT2 tiveram alterações nas ligações relacionadas a estas moléculas.

O grupo RT2 apresentou variações espectrais em algumas regiões. As regiões 1 e 3, relacionadas aos modos vibracionais da cadeia protéica de colágeno e lipídeos (ácidos graxos), respectivamente, mostrou aumento na intensidade em T60 mantendo-se constante em T0 e T30. Na região 4 (tirosina), houve diminuição na intensidade em T30, e em T0 e T60 a intensidade permaneceu inalterada. Para a região 6, relacionada aos modos $\nu\text{C=O}$, CNH de amida III mostrou que as intensidades em T0 e T30 mantiveram-se iguais, diminuindo para T60. Para a região 8, a intensidade aumentou em T30 e mais ainda em T60. A variação na intensidade em 9 sofreu sensível aumento em T30 permanecendo igual em T60.

Para o grupo CTR, a região 3 mostrou diminuição na intensidade do pico de ácidos graxos em T30. Entretanto, em T60 ocorreu aumento na intensidade ficando acima da medida em T0. Para a tirosina, região 4, ocorreu diminuição na intensidade em T30 e posterior aumento em T60 igualando-se à intensidade de T0. Para a região 5, houve pequeno deslocamento do pico em T30 mantendo-se em T60, além de ocorrer diminuição na intensidade para ambos os tempos. Finalmente a região 8 mostrou visível aumento na intensidade em T60 e evidência do “ombro” próximo à 1600 cm^{-1} .

A fim de entender melhor os resultados descritos acima, especificamente as variações ocorridas na região do DNA, melanina e lipídeos, descreve-se a seguir a relação destas alterações com a formação de radicais livres. Os radicais livres são moléculas produzidas pelas células durante o processo de oxidação do oxigênio, possuem um elétron desemparelhado e por isto são altamente reativos. De acordo

com a teoria do radical livre, as espécies de oxigênio reativas (ROS) aumentam com a idade devido à redução na atividade das enzimas de defesa antioxidantes [91]. Processos metabólicos naturais e também fatores externos, como por exemplo, a radiação UV, contribuem para a produção dos ROS. Os radicais livres, por apresentarem atividade oxidativa, reagem com o meio e oxidam DNA, lipídeos e proteínas das células conduzindo a uma série de reações denominada estresse oxidativo. Em relação às moléculas de lipídeos, um dos principais danos do estresse é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica das células [91]. Esta reação ocorre com a interação do ácido graxo com um radical hidroxila ou oxigênio singleto (agente oxidante). Desta forma ocorre perda de um átomo de hidrogênio e liberação de um radical lipídico que incorpora rapidamente um átomo de oxigênio transformando-se num radical peróxido. Este efeito se mantém em cadeia com mais um novo radical lipídico livre [92]. O aumento na intensidade da região de lipídeos, especificamente concentrando os modos vibracionais de ácidos graxos, tanto para o grupo placebo quanto para o grupo controle pode ser explicado pela não utilização de cosmético com ativos antioxidante levando à maior liberação de radicais lipídicos livres ao passo que o grupo AF2 não mostrou alteração nesta banda desde a primeira medida. Esta ausência de variação na intensidade em T0 pode estar relacionada ao hábito do uso de cosméticos, por grande parte das voluntárias, antes do estudo. Desta forma, o mesmo raciocínio leva ao entendimento do aumento da banda relacionada ao DNA e melanina para o grupo RT2 e principalmente para o grupo CTR. Este efeito torna-se mais evidente com a presença de um “ombro” na curva uma vez que as lesões oxidativas levam à fragmentação e oxidação das bases nitrogenadas. Conforme descrito no item 3.1.1 a melanina é um pigmento com coloração parda a escura e está intimamente ligada à ação da radiação UV. Huang e colaboradores caracterizaram as distintas bandas Raman da melanina em diferentes condições da pele e tecidos altamente pigmentados. A fotopigmentação da pele pode ser acelerada pela exposição excessiva à radiação solar [93]. Os cosméticos com ativos fotoprotetores têm a função de prevenir os efeitos que levam à degradação da pele e, portanto, podem apresentar princípios ativos que retardam a pigmentação da pele.

As mudanças relacionadas ao envelhecimento englobam desorganizações na estrutura da matriz extracelular devido a ruptura de proteínas, além da diminuição na

síntese do colágeno pelos fibroblastos que permanecem em estado estacionário. Muitas enzimas, conhecidas como metaloproteinases da matriz, são ativadas pela radiação UV e possuem a ação de degradar fibras de colágeno [94]. Chong e colaboradores verificaram que a derme fotoenvelhecida de pessoas idosas expressa intensamente a atividade das proteínas MMP-1 e MMP-2 quando comparada com a pele protegida do sol. A presença destas enzimas na derme degrada o procolágeno recém sintetizado pelos fibroblastos levando à redução dos colágenos tipos I e III. Assim, foi demonstrado que a diminuição da síntese de procolágeno e o aumento na sua degradação na pele fotoenvelhecida, podem causar deficiência acentuada dos procolágenos [9]. Muitos produtos cosméticos propõem-se a aumentar a síntese e reduzir a degradação do colágeno e elastina e atuar na neutralização dos radicais livres [95, 96].

É possível obter informação sobre a composição de algumas estruturas da pele que sofreram maior variância em relação à curva média durante todo o período de tratamento dentro do mesmo grupo. Todas as bandas vibracionais de interesse, indicadas nas Figuras 28, 29 e 30 apresentam significativa variância. Este fato pode ser explicado pelo número de voluntárias com tipos de pele diferentes quanto a pigmentação, hidratação, oleosidade e outros visto que as linhas pretas representam todo o conjunto de espectros para os períodos T0, T30 e T60. As variações espectrais encontradas entre os grupos estão relacionadas tanto a utilização de um produto cosmético quanto aos fatores internos e externos. Dentre os diversos fatores que alteram a composição da pele e suas características bioquímicas os mais conhecidos são: a alimentação, a genética, a exposição solar, o tabagismo, os níveis hormonais e o uso de medicamentos [97, 98]. Hirata e colaboradores afirmaram que o uso de ABPM (antioxidantes de baixo peso molecular) pode prevenir o envelhecimento cutâneo. Estes compostos exógenos podem ser fornecidos à pele através da ingestão de frutas e vegetais ou ainda pelos cosméticos [91].

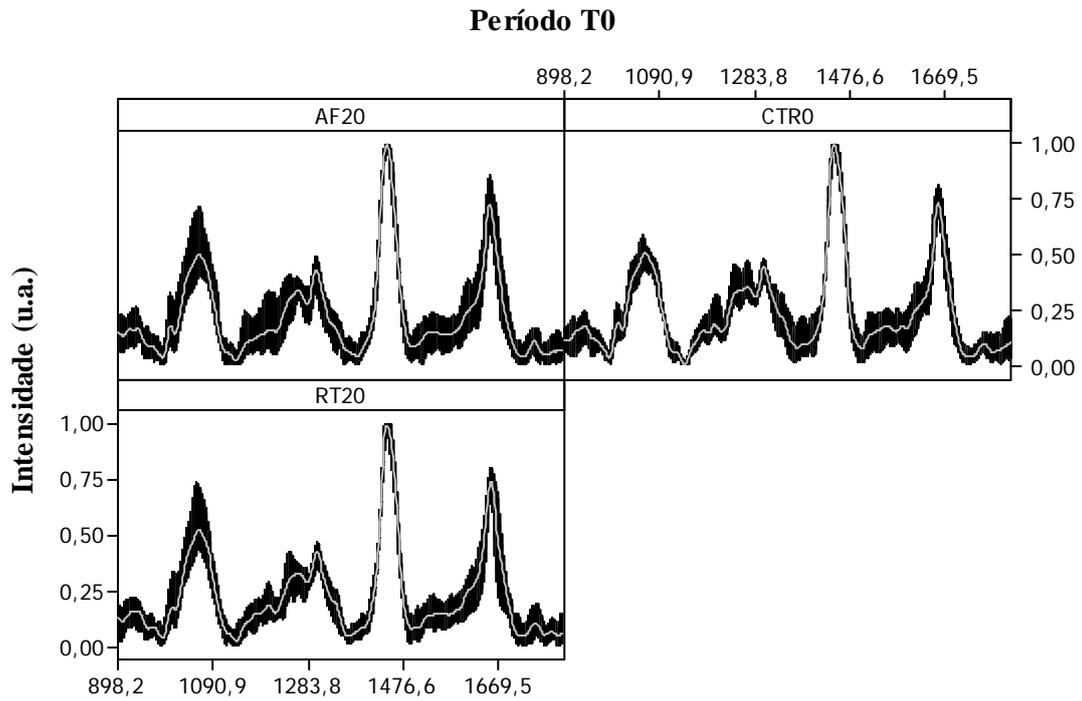


Figura 28- Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T0 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

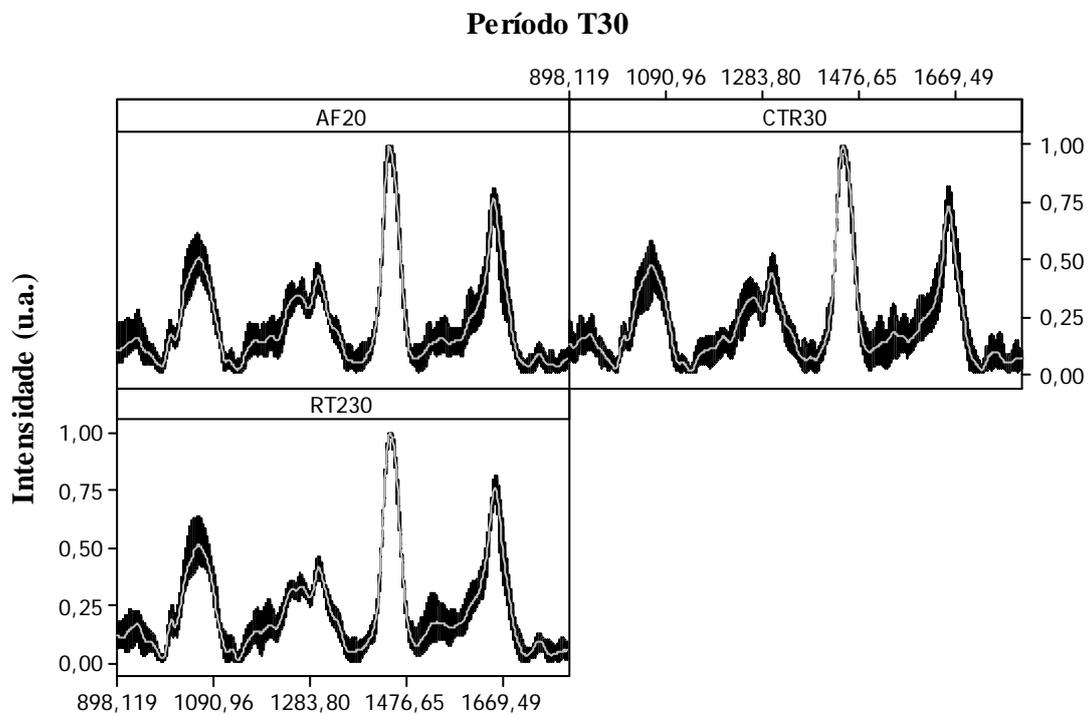


Figura 29- Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T30 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

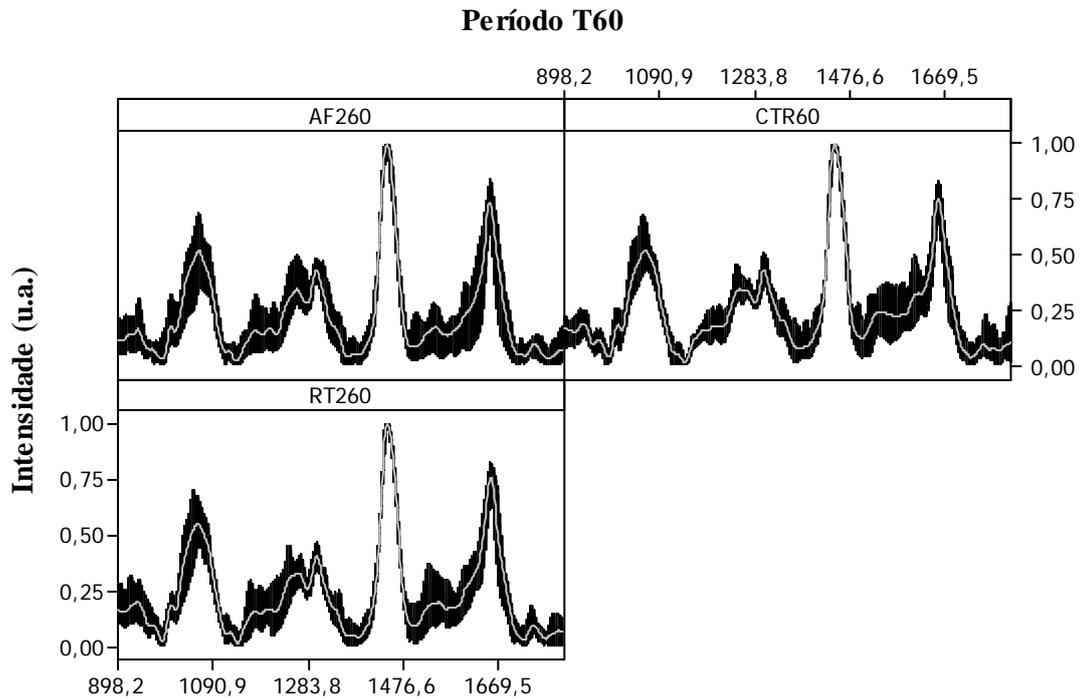


Figura 30- Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T60 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

Comparando-se o Boxplot das Figuras 28, 29 e 30 o grupo AF2 apresenta menor variância em T30 nas seguintes regiões espectrais segundo a Tabela 4: 3 (ácidos graxos), 4 (tirosina), 5 (amida III), 8 (triptofano, DNA), 9 (amida I) e 10 (triglicérides). Entretanto, para os espectros na terceira medida (T60) a variância aumenta para as mesmas bandas incluindo a região 6 (amida III, deformação angular) e excluindo a banda 8 (triptofano, DNA). No geral, todos os espectros em T30 mostraram diminuição na variância espectral. O grupo RT2 apresentou diminuição da variância nos picos relacionados a 3 (ácidos graxos), 5 (amida III- α hélice), 9 (amida I- α hélice) e 10 (triglicérides). Em T60 houve, no geral, aumento da variância em 1 (colágeno), 3, 4 (tirosina), 5, 8 (triptofano) e 9. O grupo CTR apresentou em T30, aumento da variância nos picos 3 (ácidos graxos) e 8 (triptofano, DNA) e alterações no contorno da região onde concentram-se as bandas 4, 5 e 6. Para os espectros em T60 ocorreram maiores variâncias em 8 e 10.

Para a região 8, os grupos CTR e RT2 que ficaram durante 60 dias sem o uso de cosméticos e utilizando produto placebo, respectivamente, apresentaram aumento

na intensidade tanto em T30 quanto em T60 ao passo que o grupo AF2 mostrou comportamento praticamente constante na intensidade para os tempos T0, T30 e T60 confirmando a observação da Figura 27 (a). As áreas integradas foram calculadas para esta região e encontram-se na Tabela 5.

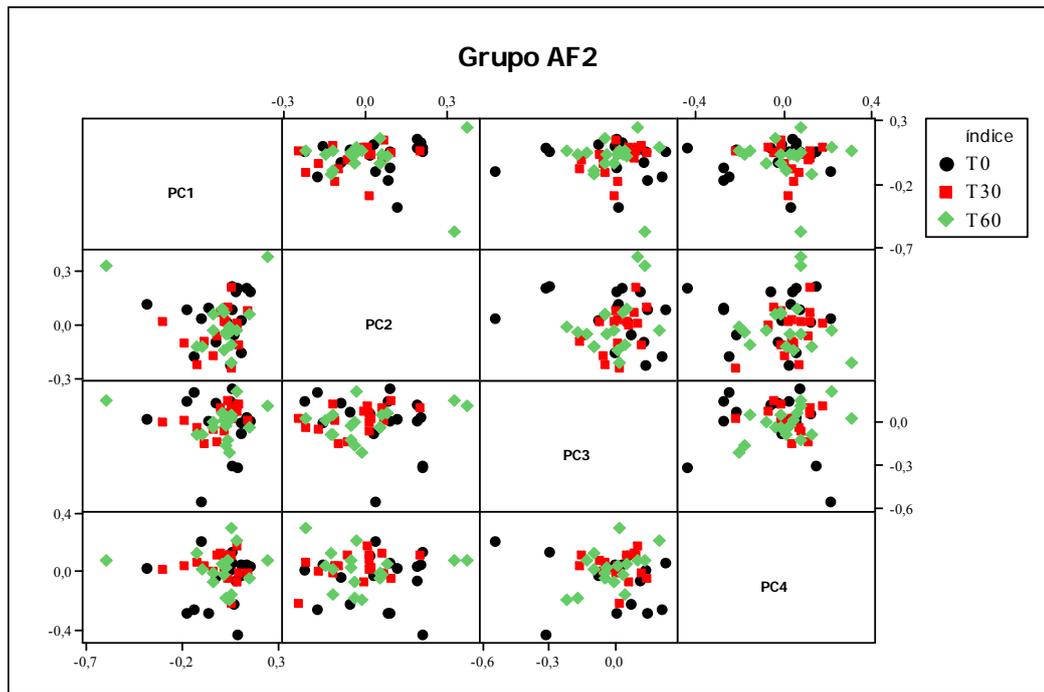
Tabela 5: Valores das áreas integradas em unidades arbitrárias calculadas para a região 1505-1574 cm^{-1}

GRUPO / PERÍODO	T0	T30	T60
AF2	3,36	4,20	3,92
RT2	3,41	5,26	5,37
CTR	4,81	4,44	6,83

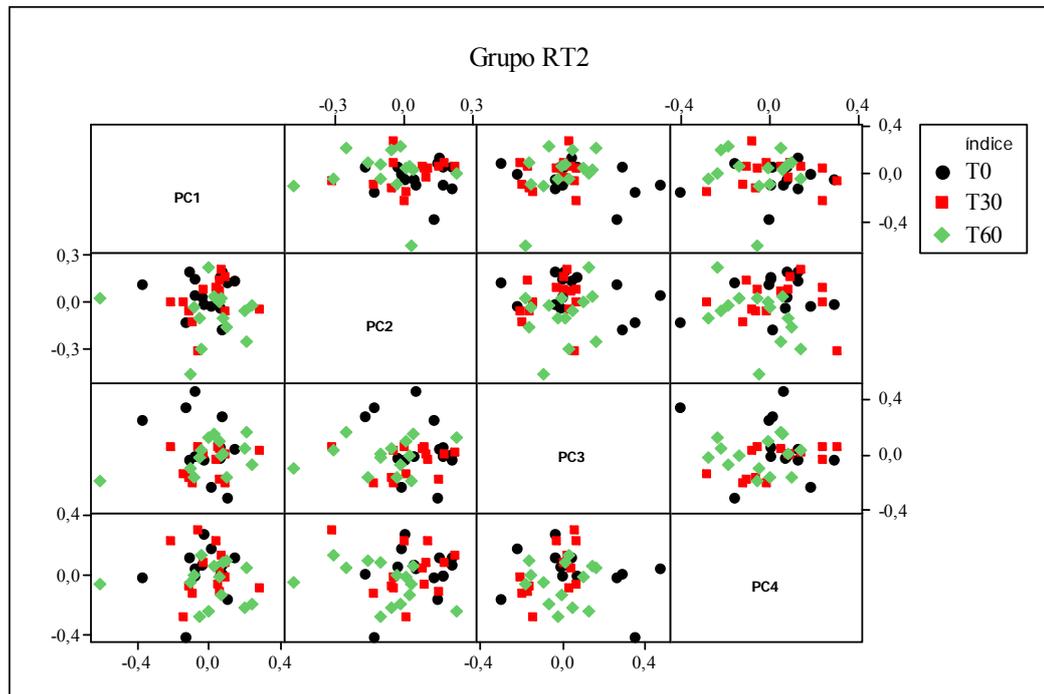
O grupo RT2 em comparação aos outros grupos apresentou maior aumento de área durante os 60 dias, ou seja, 57%, enquanto o grupo AF2 apresentou aumento de 16% e 42% do grupo CTR.

Supõe-se que estas variações bioquímicas podem estar relacionadas com o uso de produtos que contém ativos antienvhecimento uma vez que eles proporcionam a redução da síntese de radicais livres. Para efeito de proteção contra estas espécies reativas de oxigênio, a pele humana sintetiza um sistema de defesa com substâncias antioxidantes como vitaminas (A, C, D e E), carotenóides, enzimas e outras [99, 100, 101].

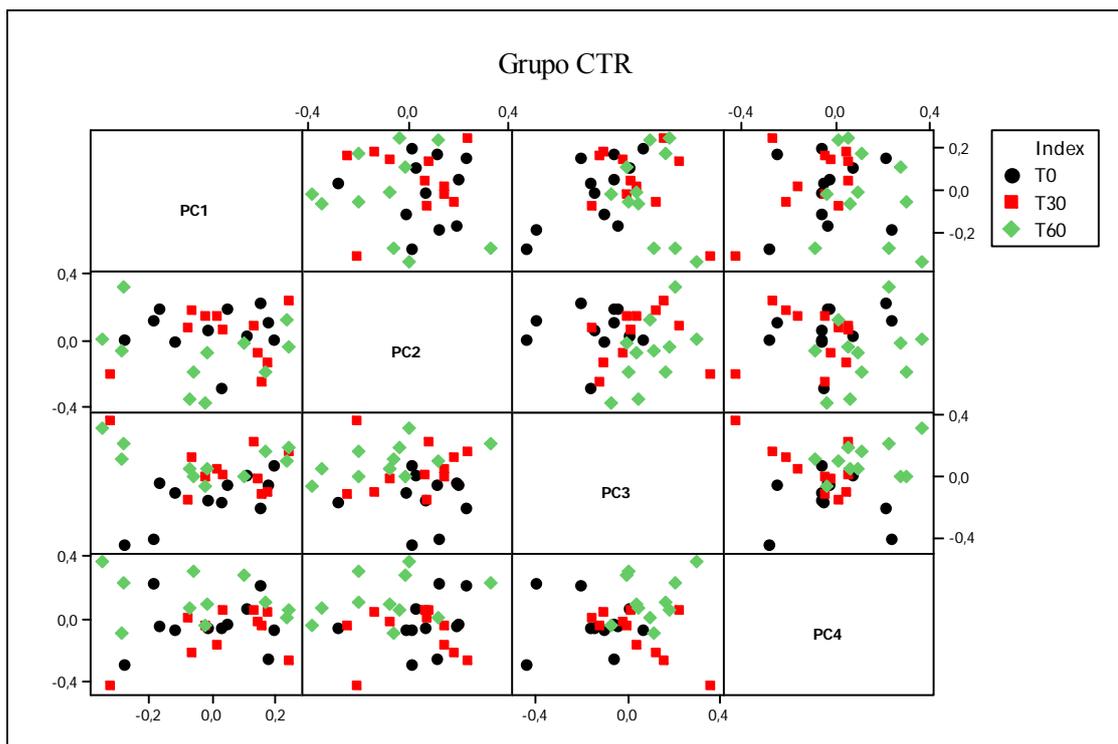
Com o objetivo de buscar um entendimento mais compacto e qualitativo do grupo de dados, fez-se análise de PCA sobre todo o intervalo espectral para o total de espectros Raman em cada grupo. Os resultados apresentaram-se mais definidos utilizando-se 4 componentes principais. A Figura 31 mostra a matriz de distribuição destes quatro componentes principais para cada grupo.



(a)



(b)



(c)

Figura 31 - Matriz das componentes principais para o espectro total dos grupos: (a) AF2, (b) RT2 e (c) CTR

Para o grupo AF2 os espectros em T30 e T60 encontram-se mais aglomerados que os T0 nas composições das PC1 com PC3 e PC3 com PC4. O grupo RT2 mostrou praticamente o mesmo comportamento que o grupo AF2 indicando que alguns espectros de T0 mostraram maiores diferenças na classificação para as combinações PC2 com PC3 e PC3 com PC4 uma vez que se encontram mais espalhados. O grupo CTR por sua vez apresentou maior dispersão dos grupos para todas as composições das componentes permitindo melhor diferenciação entre eles. No geral, esta homogeneização dos espectros, principalmente para os grupos AF2 e RT2, dificultou qualquer análise em termos de classificação dos grupos nos diferentes períodos de estudo. As variações espectrais, na Figura 27 (a, b, c) foram analisadas com muito rigor uma vez que as mesmas são bastante sutis.

Utilizando as quatro primeiras componentes principais (PC1, PC2, PC3 e PC4) fez-se a análise discriminante linear para identificar o percentual de probabilidade dos espectros pertencerem ou não ao seu grupo. A Tabela 6 mostra o percentual de

discriminação entre cada um dos períodos e o percentual total, ou seja, o percentual de espectros que foram classificados corretamente em seu grupo. A análise de discriminante para T0 mostra que o grupo RT2 obteve a menor separação, atingindo apenas 50,0%. O grupo controle teve um percentual de 81,8% de discriminação ao passo que o grupo AF2 mostrou 52,9% sendo este valor esperado pela maior variância do espectro mostrado na Figura 28(a). Estes valores foram utilizados como uma referência relativa para os demais tempos. Para o grupo CTR observa-se que os valores dos percentuais mantiveram-se, em média, praticamente constantes revelando que os espectros foram classificados corretamente em seus respectivos tempos. Esta característica pode indicar que as diferenças espectrais foram marcantes e distintas em cada um dos períodos enquanto os espectros de cada um dos grupos RT2 e AF2 mostraram-se mais homogêneos entre si, ou seja, as variações espectrais foram sutis corroborando com os resultados observados nas matrizes (Figura 31).

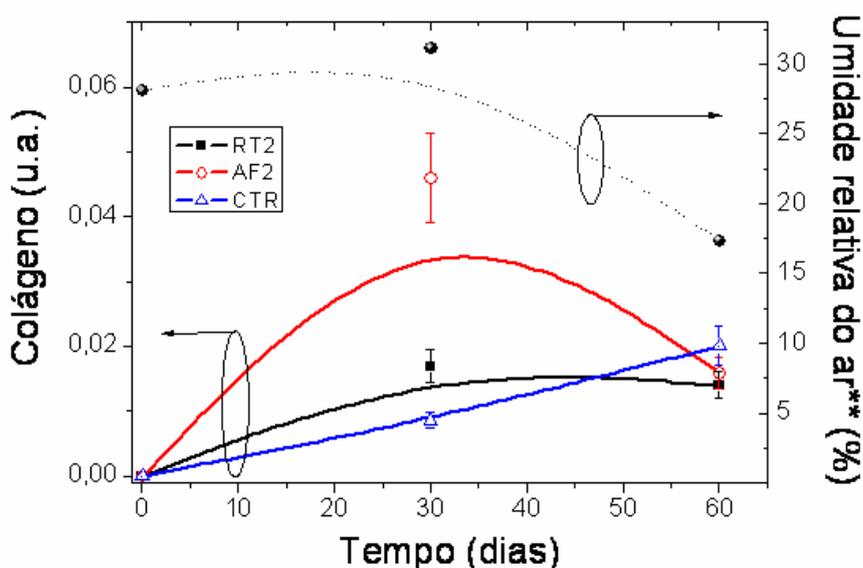
Tabela 6 - Resultados da análise discriminante linear em função dos tempos (T0, T30 e T60) e grupos (AF2, RT2 e CTR)

Grupo	Resultados da Análise Discriminante (%)		
	T0	T30	T60
AF2	52,9	47,1	11,8
RT2	50,0	21,4	64,3
CTR	81,8	81,8	90,9

Ressalta-se que a análise discriminante foi realizada através de uma matriz contendo todos os períodos para cada grupo, separadamente.

Um fator a ser levado em consideração foi que entre os períodos T30 e T60, o ambiente sofreu bruscas modificações climáticas e a média de umidade relativa do ar apresentou um valor de 24,3 %, segundo estimativa feita pela Estação meteorológica da UNIVAP-Urbanova. A transformação climática do meio pode gerar efeitos diretos na pele. A baixa umidade provoca o aumento da evaporação de água da pele, uma vez que o manto hidrolipídico (camada de água e lipídeos) contém falhas. Esta alteração é agravada por diversos fatores inclusive o envelhecimento.

A Figura 32 apresenta a variação da área relativa das bandas da região do colágeno e lipídeos/proteínas para os três grupos (CTR, AF2 e RT2) assim como a curva de umidade relativa do ar. A banda de amida I com conformação de colágeno encontrada em 1654 cm^{-1} varia em intensidade para cada uma das voluntárias e também na largura de linha e simetria já citada anteriormente. Essa região de deslocamento Raman 1654 cm^{-1} , relacionado aos modos de amida I conforme já descrito, apresenta o grupo $\nu\text{C=O}$ fracamente acoplado ao estiramento da ligação C–N e deformação no plano da ligação N–H. Deste modo apresenta alta sensibilidade à alteração da geometria molecular e à formação da ponte de hidrogênio do grupo peptídico. A Figura 32 (lado esquerdo) representa a área relativa entre os picos 1445 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} . Os valores foram graficados em função do tempo de uso do cosmético. A curva que representa o grupo AF2 (cor vermelha) apresentou maior variação de intensidade relativa da banda do colágeno entre os tempos T0 e T30, quando comparado com os demais. No entanto, entre os períodos T30 e T60 a curva apresentou um declínio. Este resultado pode ser entendido através da variação da umidade do período, uma vez que os grupos RT2 e AF2 apresentam o mesmo comportamento. O grupo CTR apresentou comportamento anômalo visto que durante o estudo não fez, teoricamente, uso de nenhum tipo de cosmético.



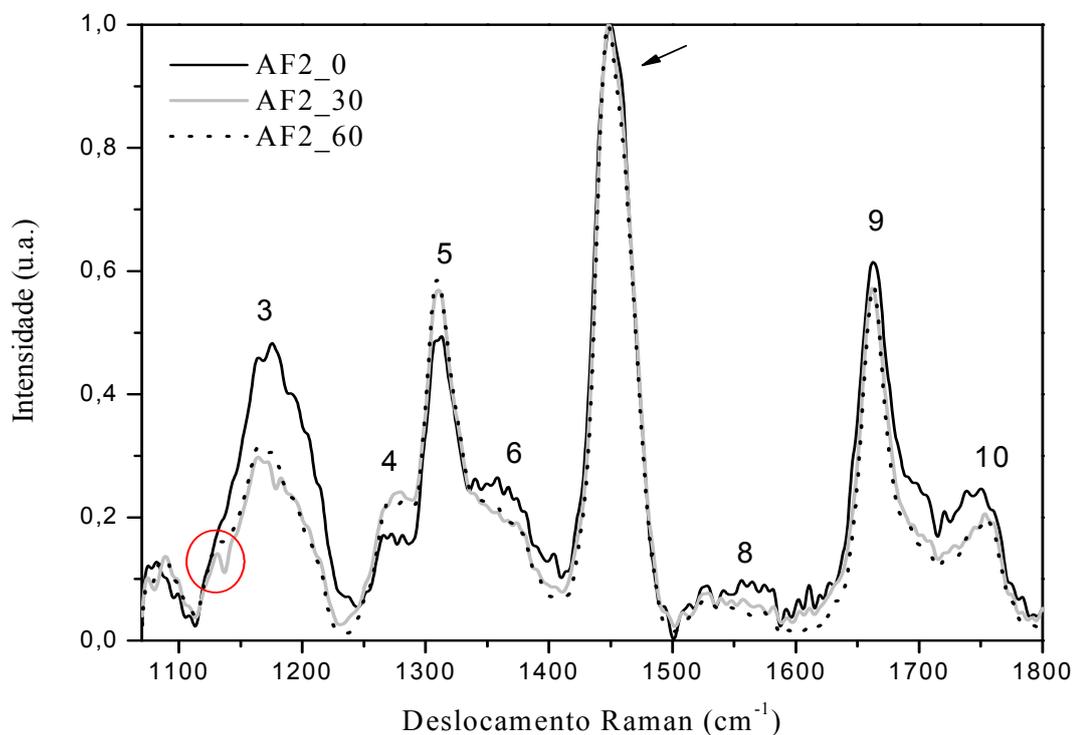
**Estação meteorológica da UNIVAP (Urbanova)

Figura 32 - Área relativa entre os picos do deslocamento Raman 1445 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} e curva de umidade relativa do ar.

5.2 Análises Intragrupo- Raman Dispersivo

Embora a fluorescência do tecido seja minimizada pela utilização de um laser de menor energia (785 nm), os espectros ainda são influenciados, sendo necessária correção da linha de base que praticamente elimina este efeito conforme já relatado. O pré-processamento dos dados é finalizado pela normalização dos espectros, dividindo cada espectro pelo seu pico de maior intensidade. A padronização dos dados possibilita aplicar testes estatísticos para encontrar as diferenças oriundas da utilização dos produtos estudados.

A Figura 33 mostra os espectros médios de cada grupo com o intuito de verificar variações espectrais visíveis. Os espectros do Raman dispersivo apresentam pequenos deslocamentos nos valores das frequências em relação aos espectros FT-Raman devido às próprias diferenças entre os sistemas.



(a)

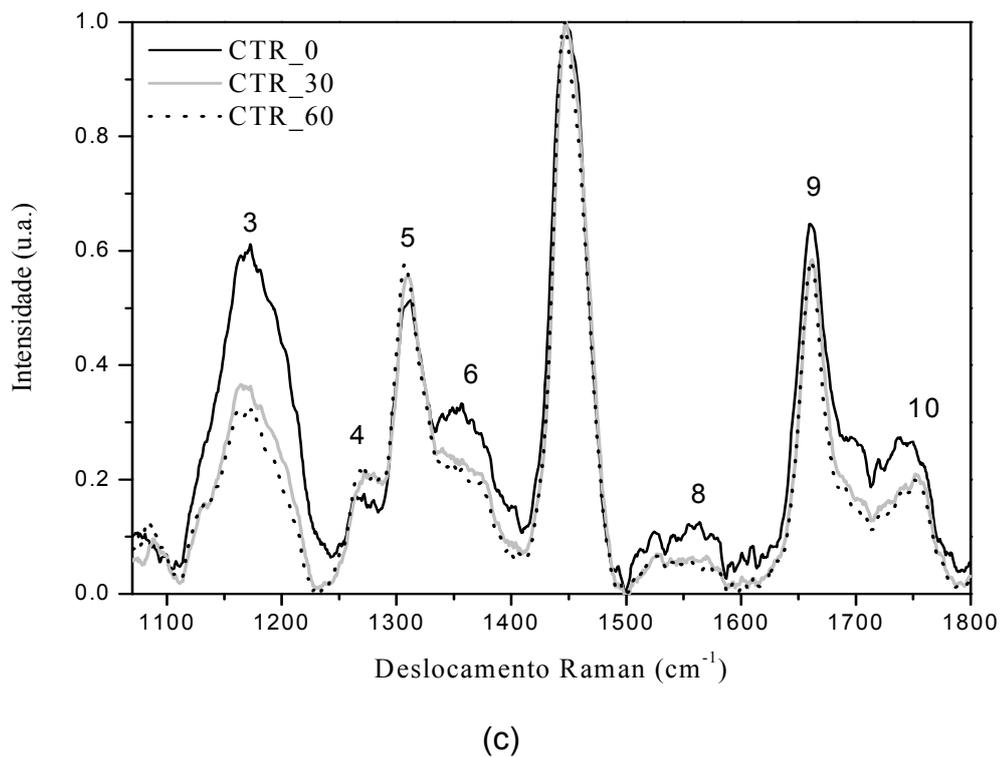
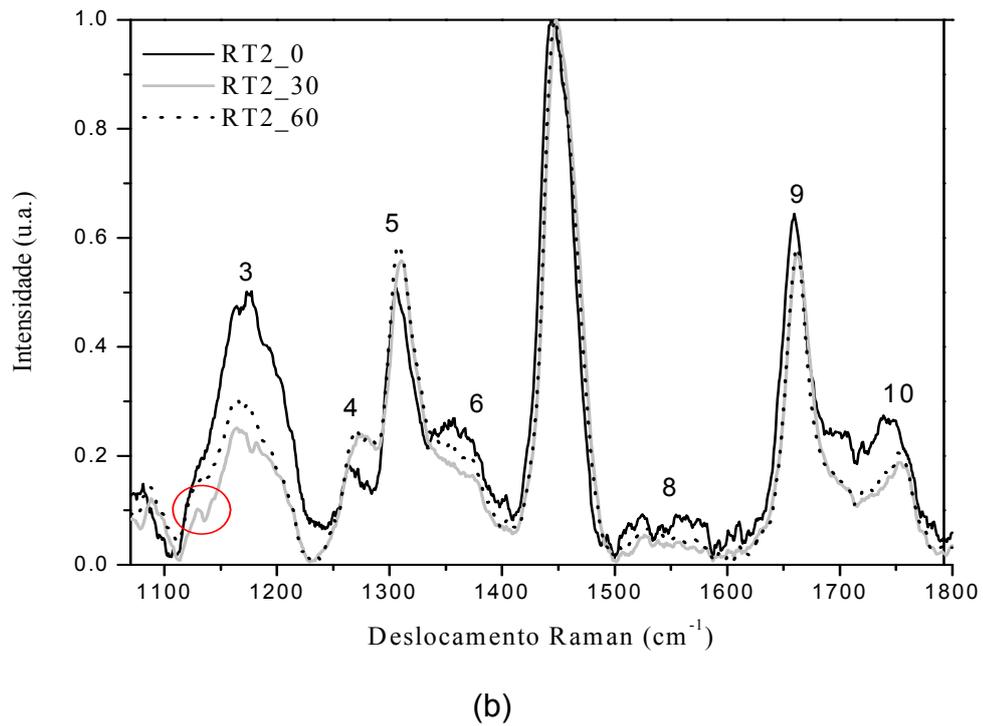


Figura 33 - Espectros Raman Dispersivo médio obtido para cada grupo estudado. Todos os espectros são apresentados normalizados pela banda centrada em 1447 cm^{-1} , sendo esta associada à deformação, δCH_2 ; (a) espectros médio grupo AF2, (b) espectros médio grupo RT2 e (c) espectros médio grupo CTR.

Os números nos espectros estão em concordância com os da Figura 24 e indicam as bandas que apresentaram maiores mudanças na intensidade e também em seu contorno.

Todos os grupos apresentaram, na média, variações muito semelhantes inclusive nas mesmas regiões. Todos os grupos mostraram para a banda 3, relacionada aos modos vibracionais de ácidos graxos, diminuição na intensidade para T30. Entretanto, a intensidade variou para o grupo placebo mostrando aumento posterior em T60. Outro ponto a ser destacado é o aparecimento em T30 de uma saliência, circulada em vermelho, centrada em 1131 cm^{-1} tanto para o grupo placebo quanto para o ativo. A região 4, relacionada com a tirosina, centrada em aproximadamente 1278 cm^{-1} mostrou aumento para T30 mantendo-se igual para T60 em todos os grupos. O aumento da intensidade referente ao modo α -hélice da Amida III (1308 cm^{-1}) foi unânime, porém visivelmente pode-se perceber maior escala para o grupo AF2. Outros dois aspectos interessantes foram: o contorno desta banda que o espectro médio em T0 do grupo RT2 apresentou dando um aspecto mais fino na extremidade e o desaparecimento em T30 e T60, do dublete que havia em T0 para o grupo AF2. A região 6 localizada de 1336 a 1404 cm^{-1} , onde estão atribuídos os modos de amida III, mostraram diminuição na intensidade após 30 dias em relação à primeira medida mantendo esta intensidade para os grupos CTR e AF2 já que o grupo RT2 mostrou diminuição na intensidade em T30 e posterior aumento para T60. Para a região de DNA, triptofano e melanina, o grupo CTR mostrou comportamento semelhante ao grupo RT2. Os grupos AF2 e CTR, na região 9 (1662 cm^{-1}), amida I, mostraram diminuição na intensidade em T30 permanecendo igual em T60. Além disso, ocorreu a diminuição na largura de linha desta banda já 30 dias pós a primeira medida. A desidratação do colágeno prejudica fortemente a estrutura do grupo amida I, perturbando a regularidade do empacotamento da cadeia molecular do colágeno nativo da pele, resultando num alargamento de sua largura de linha [96]. O grupo RT2 apresentou diminuição na intensidade a partir de T30, porém a largura de linha a meia altura da banda permaneceu constante. Os três grupos apresentaram comportamento médio semelhante na região 10, aproximadamente em 1751 cm^{-1} relacionada aos triglicérides (sebo) onde ocorreu diminuição na intensidade em T30.

As variações visualizadas nos espectros médios revelaram comportamento anômalo do grupo CTR tanto para os resultados do Raman Dispersivo quanto os do FT-Raman.

As Figuras 34, 35 e 36 mostram a variância espectral de cada um dos grupos tendo como fator de separação o tempo.

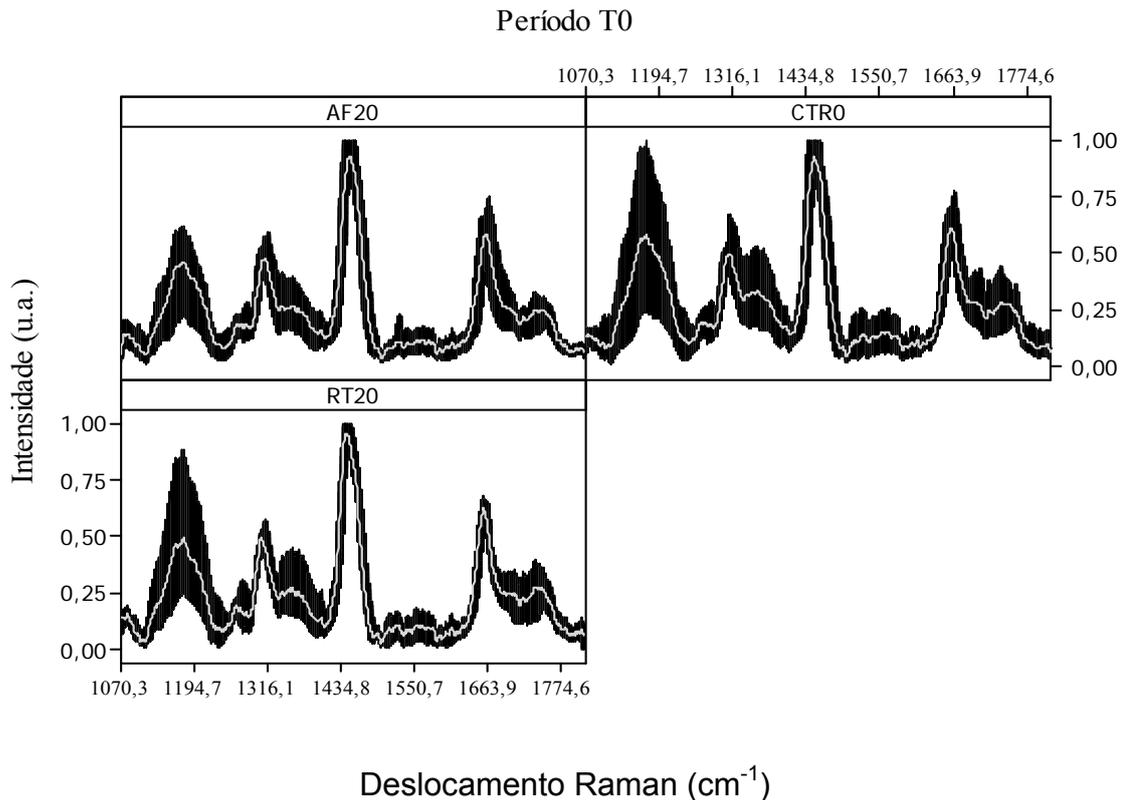


Figura 34 - Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T0 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

Pode-se observar que a variabilidade espectral na primeira medida era intensa. Isto se deve às diferenças genéticas quanto ao tipo de pele e estilo de vida entre os grupos, proporcionando essa heterogeneidade. Durante o período de estudo, constatou-se que a maioria das voluntárias começaram a preocupar-se mais com a alimentação e exposição ao sol visto que estes fatores refletem na aparência da pele. É possível verificar a diminuição da variância espectral em torno da média para T30 nos principais modos assinalados na Figura 33 enfatizando o grupo RT2. Esta

diminuição da variância pode ser explicada pela padronização na utilização do produto e mudanças no comportamento relacionado aos cuidados com a pele.

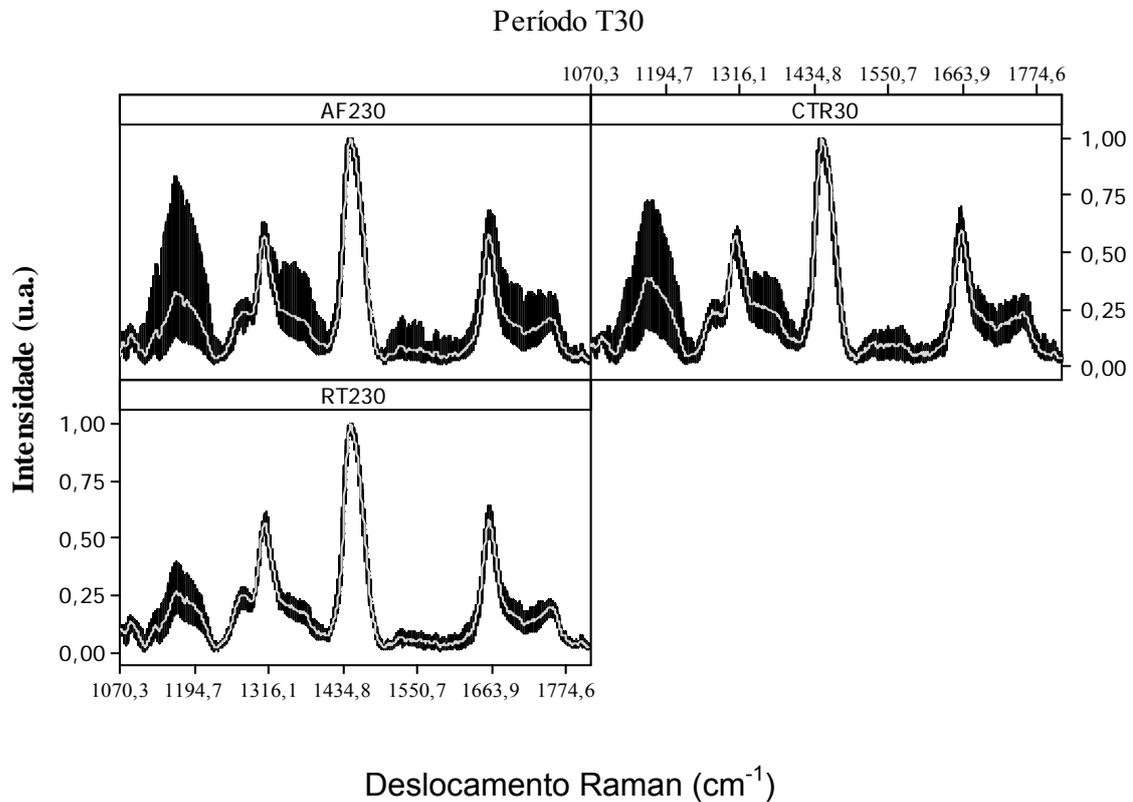


Figura 35 - Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T30 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

Observa-se que, mesmo com as influências climáticas, após a segunda medida, a variância espectral do grupo diminuiu mais ainda conforme observado na Figura 35. Entretanto, a banda correspondente aos lipídeos (ácidos graxos) mostrou maior variância para o grupo AF2 do que para os outros grupos. Este resultado mostra que algumas voluntárias apresentavam maior quantidade de lipídeos na pele após 60 dias de utilização do produto que pode ajudar na hidratação da pele, pois a baixa umidade provoca o aumento da evaporação de água da pele.

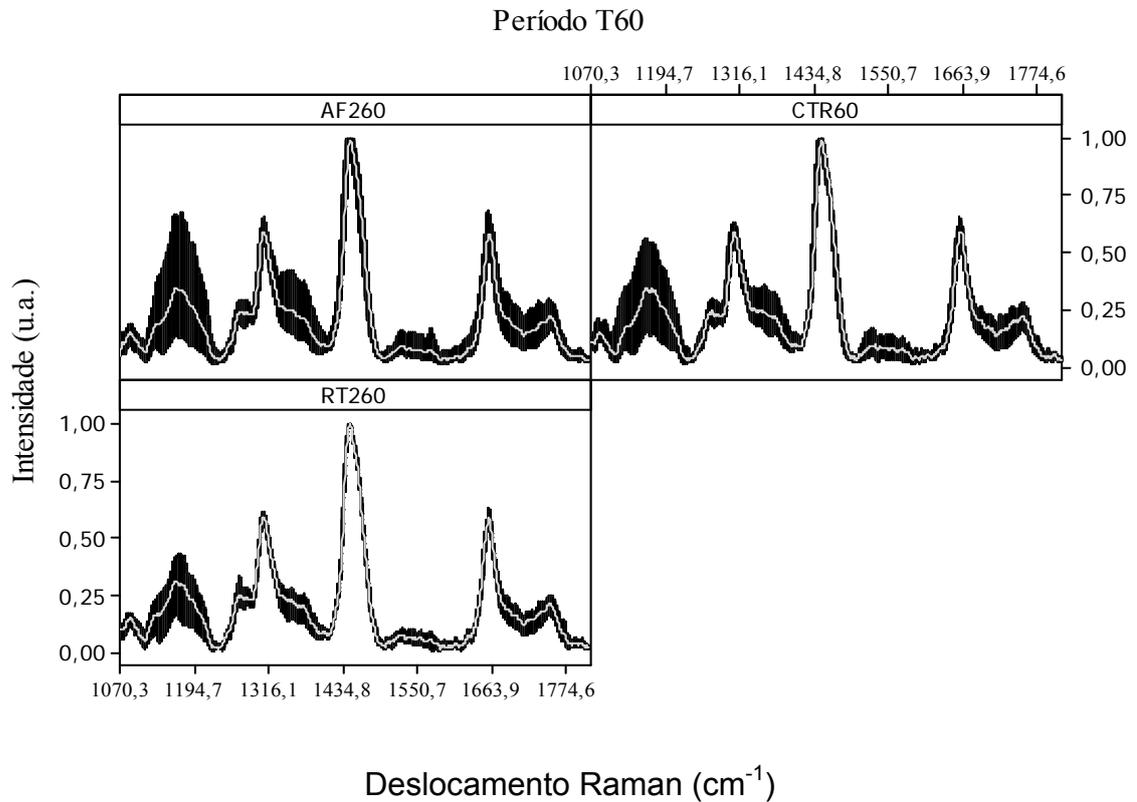
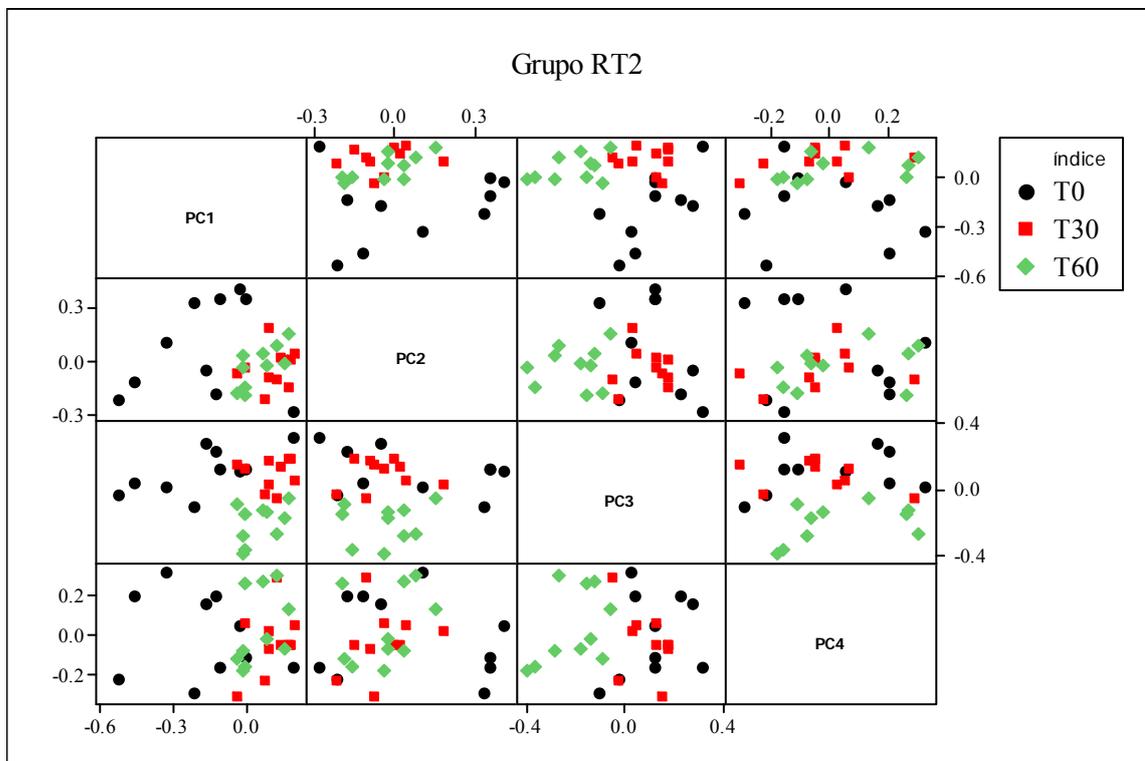
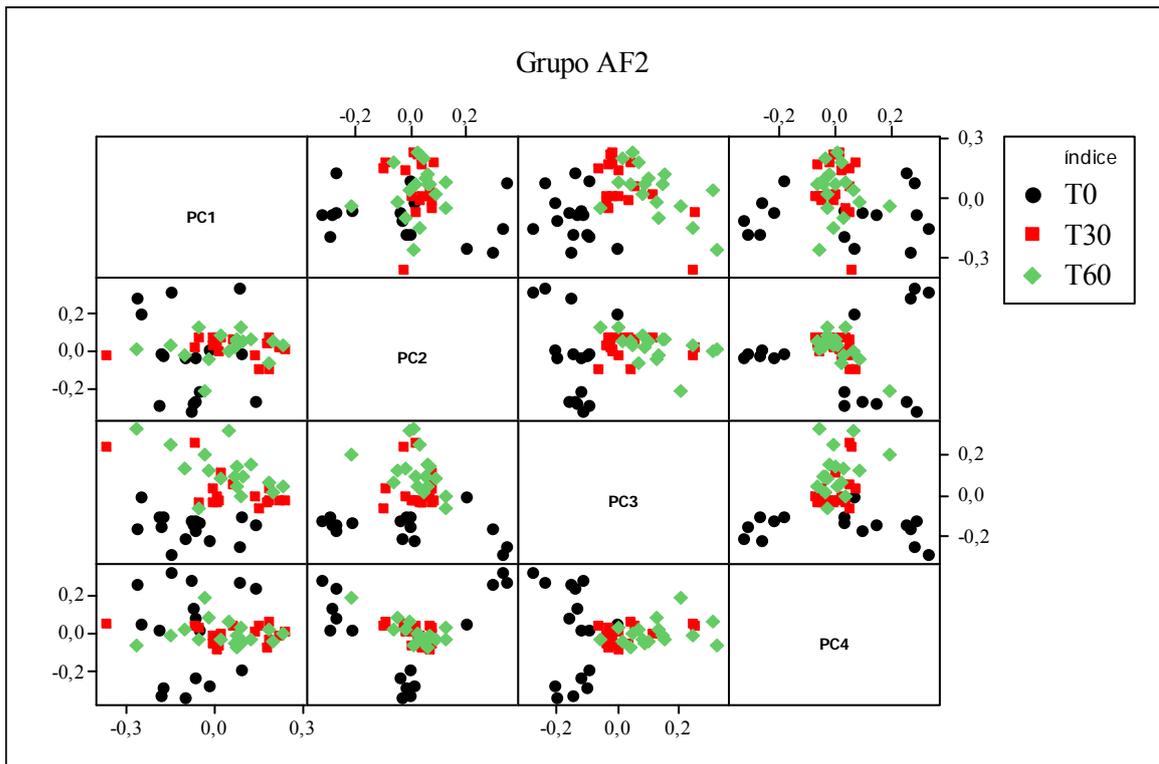
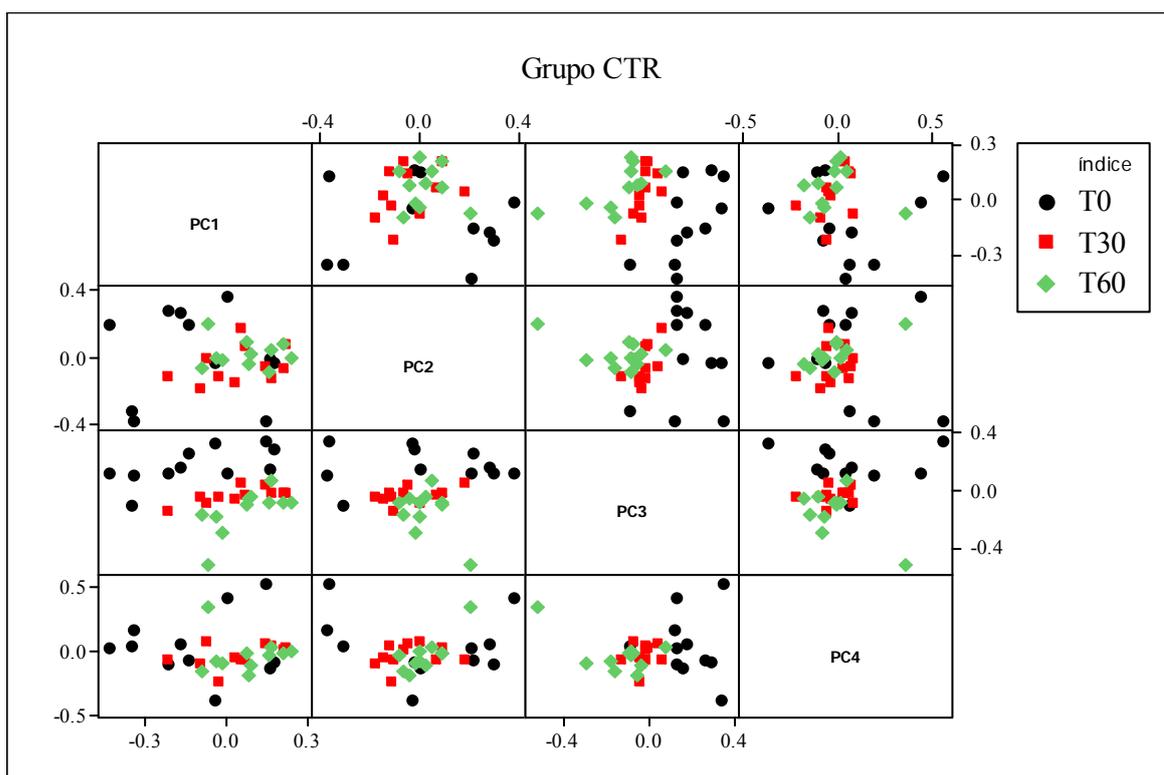


Figura 36 - Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T60 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

Com o objetivo de obter resultados mais qualitativos e comparar com os resultados do FT-Raman, realizou-se a análise de componentes principais utilizando-se quatro componentes (PC1, PC2, PC3 e PC4). A partir da aplicação desta ferramenta estatística multivariada é possível perceber a separação dos espectros, segundo suas principais características e analisar a dispersão dos dados. A matriz plot (Figura 37) mostra a combinação entre as PC's.





(c)

Figura 37 - Matriz das componentes principais para o espectro total dos grupos: (a) AF2, (b) RT2 e (c) CTR

Diferentemente do que ocorreu com os resultados das PC's para o sistema FT-Raman, a Figura 37 mostra que, no geral, os espectros parecem mais agrupados segundo suas semelhanças. A matriz do grupo AF2 mostra, para quase todas as combinações das componentes, os espectros de T30 e T60 mais aglomerados enquanto os espectros em T0 encontram-se com maior aleatoriedade em sua distribuição. A matriz do grupo RT2 mostrou melhor resultado para PC1 versus PC2 onde os espectros do T30 e T60 apresentam-se menos distribuídos do que os do T0. Novamente o grupo CTR apresentou resultado não esperado, pois os espectros em T30 e T60 encontram-se aglomerados, quando comparados com T0, para quase todas as combinações das PC's.

A análise discriminante realizada com os valores das componentes principais foi calculada verificando-se os índices de classificação correta do espectro conforme indicado na Tabela 7. É importante salientar que nenhum dos espectros T30 e T60

foram classificados como T0, indicando que houve variação espectral nos modos assinalados anteriormente.

Tabela 7 - Resultados da análise discriminante linear em função do tempo (T0, T30 e T60) e grupos (AF2, RT2 e CTR)

Grupo	Resultados da Análise Discriminante (%)		
	T0	T30	T60
AF2	93,8	82,4	76,5
RT2	90,0	80,0	90,0
CTR	90,9	81,8	81,8

Pode-se notar que os valores da análise discriminante para os espectros do sistema Raman Dispersivo foram mais bem classificados em cada período quando comparado com os resultados do FT-Raman principalmente quando os grupos AF2 e RT2 são observados. Este resultado pode ser explicado devido à penetração da radiação na pele uma vez que o laser 785 nm apresenta profundidade de penetração até a derme superficial enquanto o laser de 1064 nm penetra até a derme profunda [102]. A maioria dos cosméticos penetra até, no máximo, a epiderme indicando que a técnica Raman Dispersiva deteve-se na camada de interesse onde houve ação dos ativos originando as variações bioquímicas. Desta forma os resultados discriminantes para os grupos que utilizaram os produtos e foram medidos com o Raman Dispersivo, mostraram melhor discriminação enquanto o grupo controle (CTR) apresentou valores semelhantes.

Neste trabalho, o principal grupo de interesse foi o AF2. Por esta razão, foi feito particularmente uma análise das alterações em regiões de interesse que ocorreram no mesmo em função do período de estudo. Para T30 e T60 verifica-se que houve aumento na intensidade do modo amida III enquanto para amida I houve diminuição de intensidade depois de 30 dias de utilização do produto. A amida III está relacionada ao precursor do colágeno (procolágeno) e, portanto, na presença do produto cosmético, apresentou-se maior, podendo corroborar a favor do tratamento.

Para visualizar as principais mudanças em torno dos picos Raman de interesse, calculou-se a primeira derivada dos espectros médios para cada um dos tempos T0, T30 e T60. A Figura 38 mostra as mudanças ocorridas para o grupo $-CH_2$ de amida III identificada na região assinalada que mostra dublete para T0. Esta característica diminui para T30 e praticamente desaparece em T60. Esta região é composta por vibrações da amida III de regiões polares e não-polares de prolina na molécula de procolágeno [103].

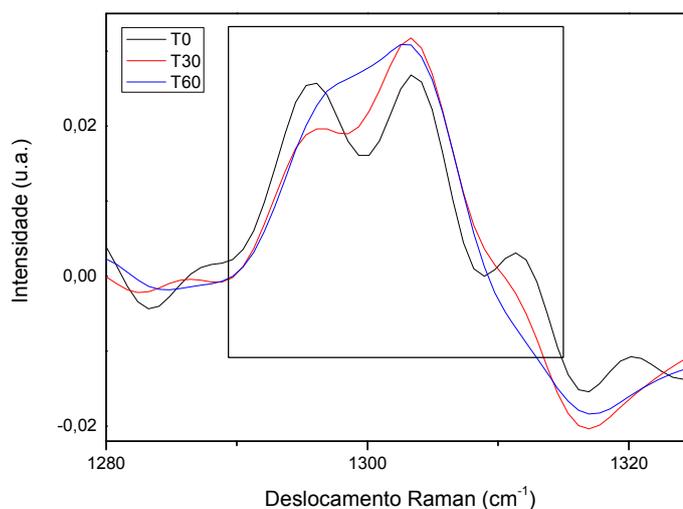


Figura 38 - Região espectral de 1280 a 1325 cm^{-1} para a primeira derivada. Os principais picos relacionados à amida III.

A Figura 39 mostra a região de 1621 a 1725 cm^{-1} referente às modificações que ocorreram no grupo amida I e triglicérides. Nesta Figura estão destacadas duas regiões, onde é possível notar uma variação diferenciada de T0 em relação aos outros tempos. Esta alteração pode ser explicada pela modificação estrutural do grupo amida após a utilização do cosmético uma vez que a região ao redor de 1659 cm^{-1} pode ser associada à estrutura do colágeno com cadeia tripla hélice estabilizada por grande número de ligações intercadeia de hidrogênio [86]. Assim a sensibilidade à alteração da geometria molecular e à formação da ponte de hidrogênio aceitadora (C=O) ou doadora (N-H) do grupo peptídico é grande [85]. De fato, estas alterações são verificadas nas regiões 1 e 2 da Figura 39 pela presença de dublete em T0, posterior diminuição em T30 e T60 (região 1), aumento de intensidade para T0 e conseqüente diminuição para T30 e T60 (região 2). Então,

pode-se sugerir que a degradação da cadeia do colágeno tripla hélice resulta na sua dissociação em outros dois componentes sendo o primeiro um cordão simples e o segundo um cordão duplo [104], ou seja, alterações nas ligações peptídicas da estrutura secundária destas proteínas.

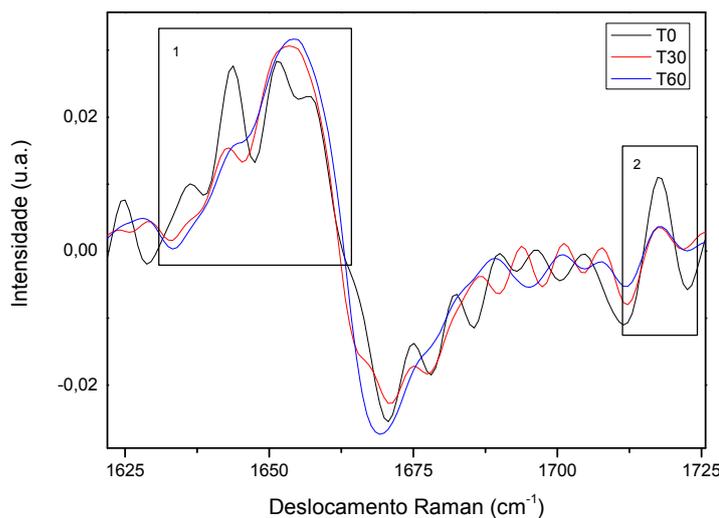


Figura 39 - Região espectral de 1621 a 1725 cm^{-1} para a primeira derivada. As regiões selecionadas relacionam-se à amida I e triglicérides.

A alteração estrutural da molécula de colágeno pode ocorrer devido à ação das matrizes metaloproteinases (MMPs) consideradas as principais enzimas que degradam a matriz extracelular constituída por moléculas de colágeno e elastina. Fedeman e colaboradores analisaram a ação enzimática de dois tipos de MMPs sobre matriz de matrigel composta por colágeno tipo IV através de espectroscopia no infravermelho (FTIR). Comparou-se a matrigel degradada e a não degradada observando um deslocamento na frequência para a banda de amida I. Provavelmente o deslocamento na frequência pode ser consequência da quebra de proteínas que compõe a matrigel ou ainda a degradação por MMP [105]. A ausência de dublete e deslocamento na frequência mostrado na Figura 38 podem estar relacionados às modificações estruturais na matriz de colágeno após o uso do cosmético levando à reestruturação protéica.

5.3 Alta Frequência

O espectro Raman típico para alta frequência das peles estudadas pode ser visualizado na Figura 40. Os espectros são apresentados em função da intensidade e números de onda entre 2800 a 3500 cm^{-1} .

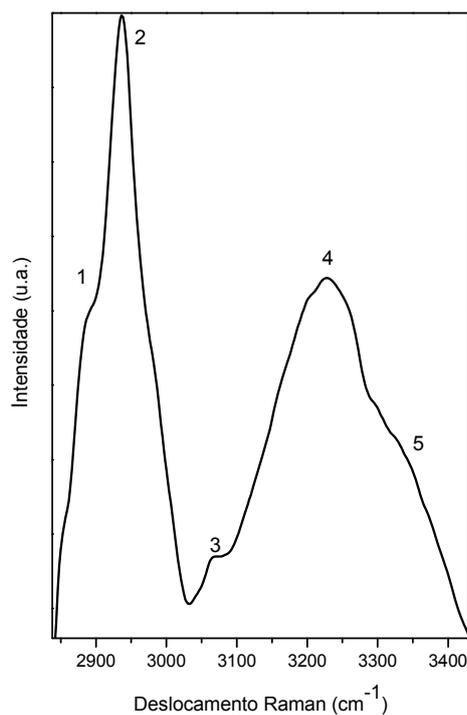


Figura 40 - Espectro Raman *in vivo* no intervalo espectral 2800 a 3500 cm^{-1} .

A região de deslocamento Raman de alta frequência possibilitou de maneira direta a verificação da hidratação na pele. A posição dos picos, com suas respectivas estruturas químicas e atribuições, encontram-se na Tabela 8 [65, 84, 88].

Tabela 8 - Atribuição vibracional para o espectro da pele na região de alta frequência [65,84,88].

Número da banda	Posição do pico (cm ⁻¹)	Estrutura	Atribuição
1	2890	v (CH ₂) _s	Fosfolipídeos
2	2937	v (CH ₃) _a	Lipídeos e Proteína
3	3066	v (CH)	Oleofinas
4	3230	v (OH) _s	Água
5	3336	v (OH) _a	Água

v: estiramento; s: simétrico; a: anti-simétrico

A avaliação da concentração de água proveniente do camada córnea proporciona informação importante sobre a capacidade de reter água e a propriedade de barreira da pele. A evolução da concentração de água no camada córnea pode ser determinada através do cálculo da intensidade relativa entre as bandas 3220 cm⁻¹ e 2936 cm⁻¹ [65]. Para cada grupo estudado foi construído um gráfico de variância da concentração de água (Figuras 41, 42 e 43) apresentando a distribuição dos dados em torno da curva média, durante os períodos T0, T30 e T60. As bandas que apresentaram maior variância em cada um dos grupos foram: 2890 cm⁻¹, 3060 cm⁻¹ e 3220 cm⁻¹. Em alta frequência, a banda 2936 cm⁻¹, foi considerada como banda de referência, normalizando todos os espectros em relação a ela, pois apresenta insensíveis alterações na altura e largura [65].

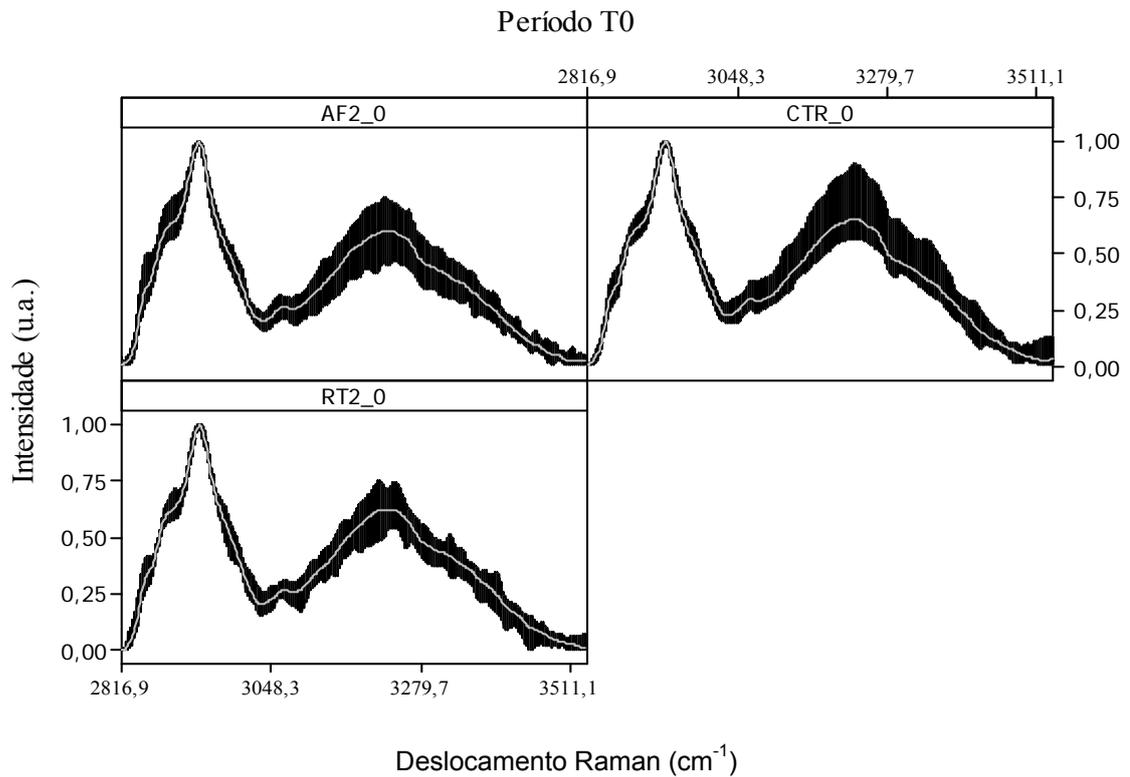


Figura 41 - Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T0 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

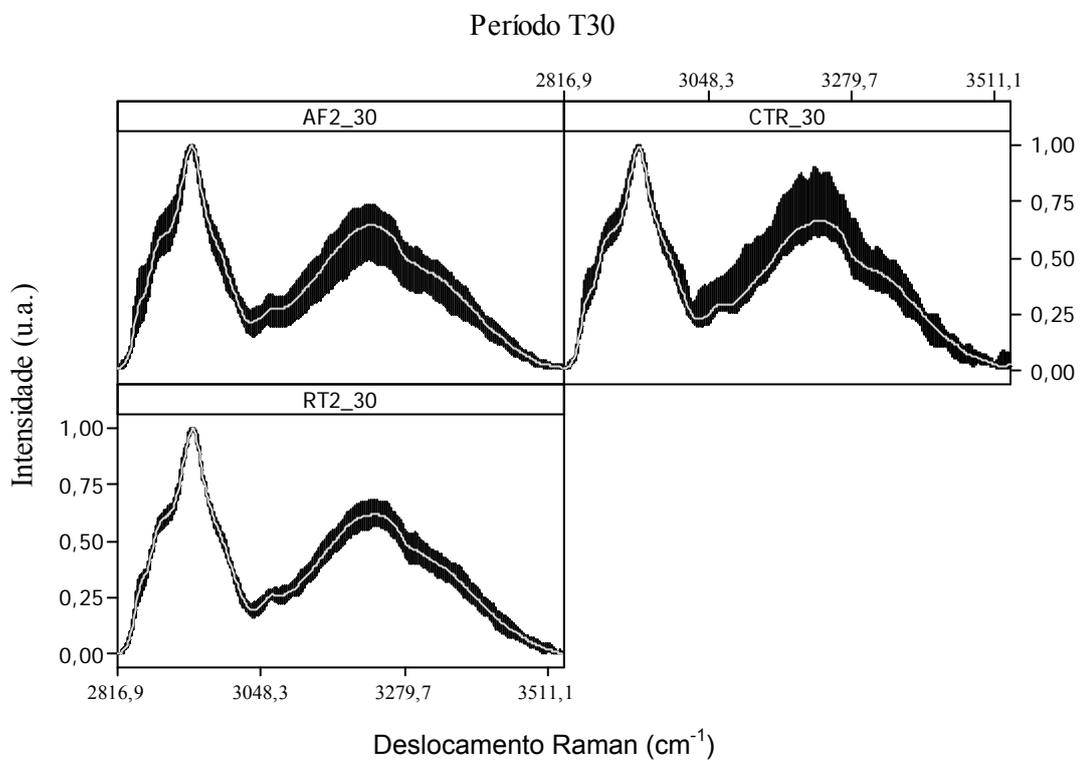


Figura 42 - Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T30 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

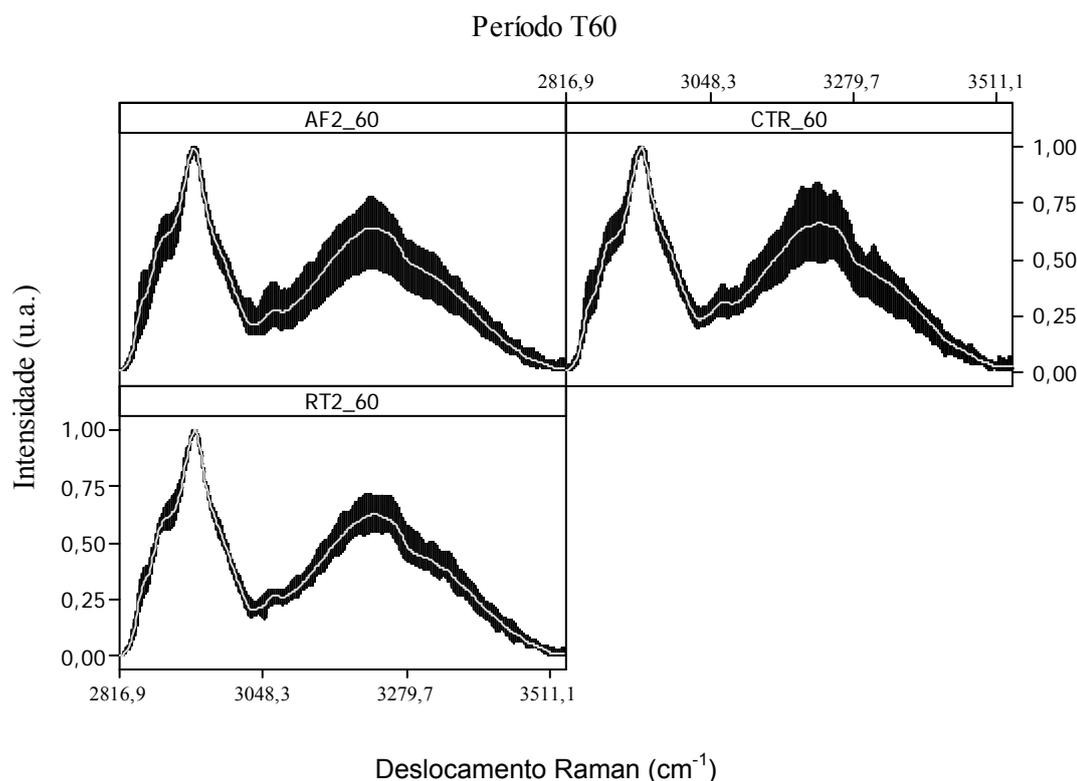


Figura 43 - Variância espectral (linhas pretas) em torno da média (linha cinza) no tempo T60 para cada um dos grupos: AF2, RT2 e CTR.

Para T60, os grupos apresentaram a maior discrepância de intensidade na banda referente ao grupo OH, que esta correlacionada à presença de água na pele. Esta banda apresenta-se alargada, provavelmente devido à formação de ponte de hidrogênio intermolecular [106]. As maiores diferenças encontram-se entre os períodos de T30 e T60. A região em análise do deslocamento Raman mostra claramente como a umidade relativa do ar influenciou na hidratação da pele. A relação existente entre o grupo CH_2 de fosfolípido em 2890 cm^{-1} e o grupo OH em 3220 cm^{-1} apresentou-se diretamente proporcional. Em todos os grupos esta relação pode ser observada. Quando há aumento na concentração de água na pele também ocorre aumento na concentração de fosfolípido. As Figuras 44 a 46 mostram as subtrações espectrais entre os tempos com a finalidade de melhor visualizar as regiões onde ocorreu aumento ou diminuição da intensidade e conseqüentemente, determinar quantitativamente esta diferença, através do cálculo da área integrada sob as curvas.

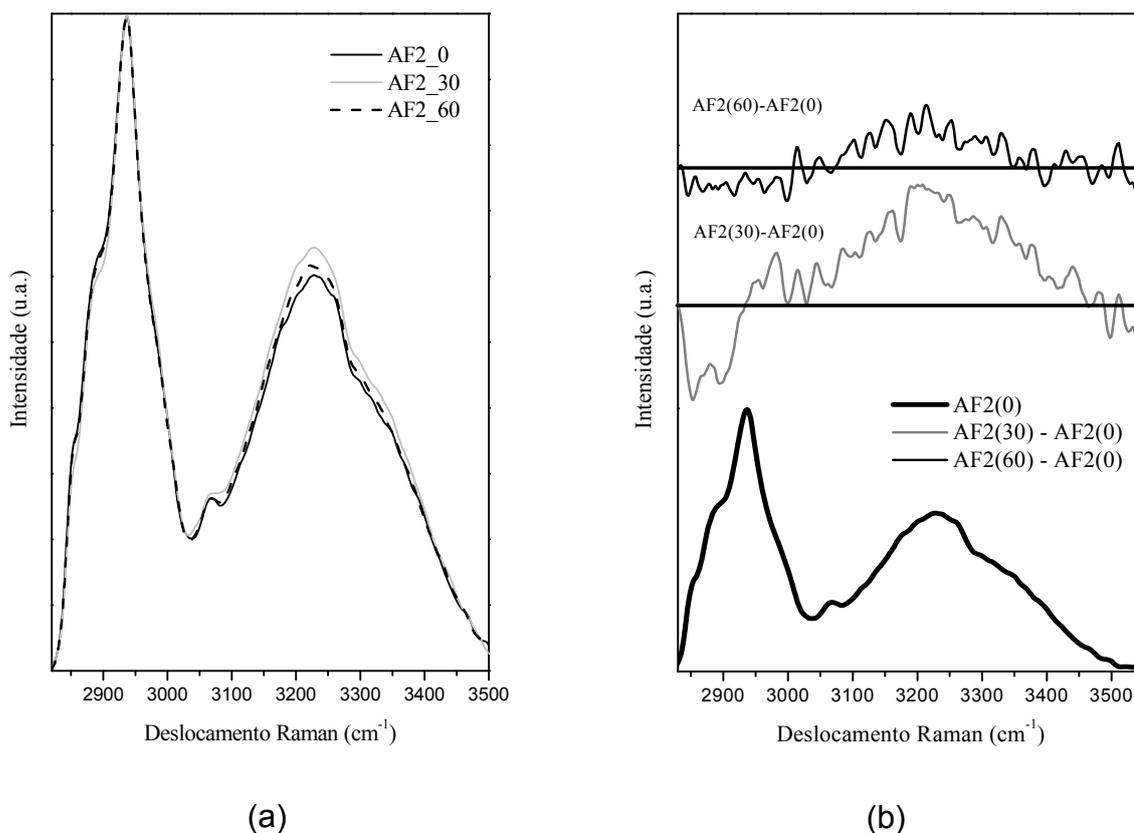


Figura 44 - (a) Espectro médio do grupo AF2 para os tempos T0, T30 e T60; (b) Espectro obtido para a região de alta frequência e os espectros de subtração entre os tempos T30 (30 dias) e T60 (60 dias). Os espectros subtraídos foram deslocados na vertical para melhor visualização. A linha contínua representa o zero de cada espectro.

A área integrada dos espectros subtraídos também foi calculada para a região de alta frequência entre 3100 a 3490 cm^{-1} (região da vibração de νOH) para não sobrepor a região de vibração do N-H. Na Figura 44 (a) pode-se claramente observar que houve alteração no modo vibracional referente a estiramento OH da molécula de água. Desta forma foram realizadas as subtrações entre a média espectral do tempo AF2(30) – AF2(0) e AF2(60) – AF2(0) conforme mostra Figura 44 (b). As áreas integradas destes espectros para a região de OH, apresentaram valor positivo. Assim, 30 dias após o uso do produto a área apresentou maior valor (10,55 u.a.) quando comparada com o período posterior (4,57 u.a.). Isto indica que a quantidade de moléculas de OH aumentou, o que nos leva a concluir que o perfil de hidratação da pele teve melhora significativa com a utilização do produto. Além disso, a largura desta banda apresentou aumento indicando alteração na ligação de ponte de hidrogênio. Entretanto, para este mesmo espectro pode-se observar que a

intensidade relacionada ao modo vibracional lipídeos e proteínas (estiramento CH_3) mostra diminuição na intensidade. O valor da área em 60 dias, ainda que positiva, apresentou menor variação que em 30 dias. Isto está provavelmente relacionado aos argumentos descritos para a região de baixa frequência, ou seja, às alterações climáticas que ocorreram durante o período de estudo na cidade onde o experimento foi realizado.

As alterações climáticas, com diferenças muito elevadas em curto período de tempo, afetam consideravelmente a barreira de proteção da pele gerando perda de água, alterações morfológicas e funcionais.

Tabela 9 - Valores das áreas integradas sob as curvas subtraídas obtidas na Figura 44 (b)

Área Integrada sob a curva	
AF2(30) – AF2(0)	10,55
AF2(60) – AF2 (0)	4,57

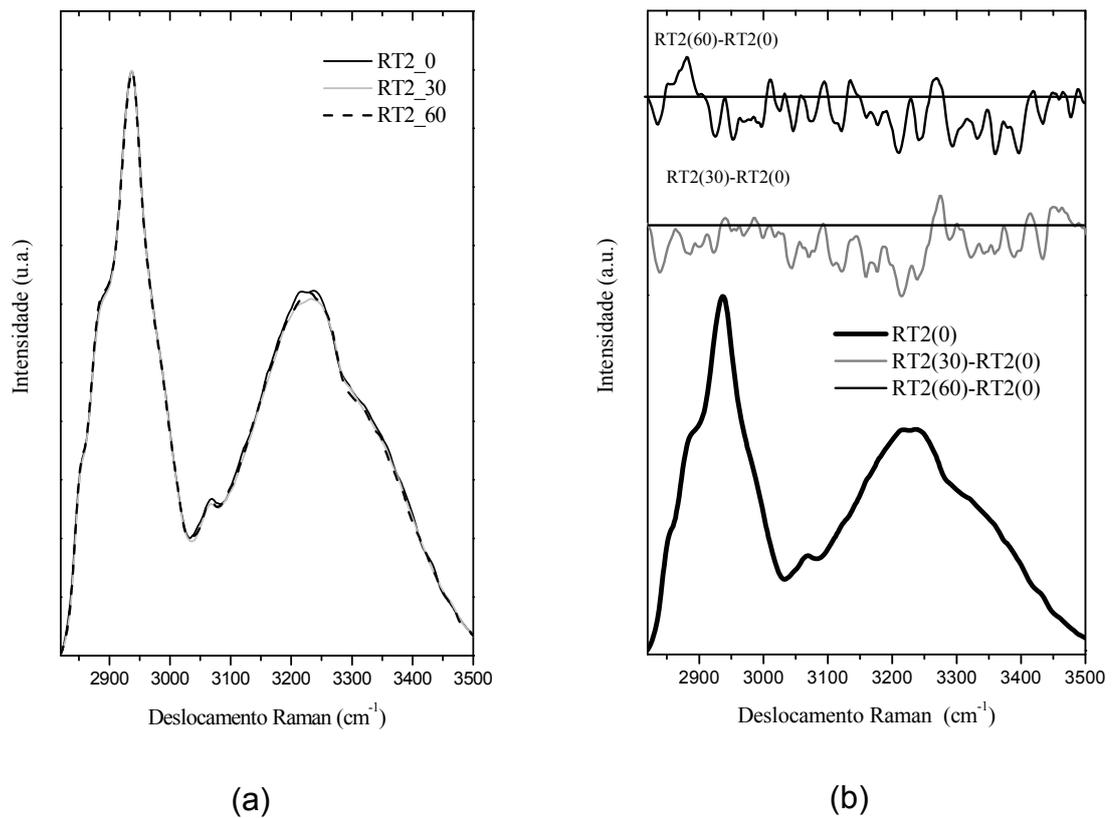


Figura 45 - (a) Espectro médio do grupo RT2 para os tempos T0, T30 e T60; (b) Espectro obtido para a região de alta frequência e os espectros de subtração entre os tempos T30 (30 dias) e T60 (60 dias). Os espectros subtraídos foram deslocados na vertical para melhor visualização. A linha contínua representa o zero de cada espectro

As Figuras 45 (a) e (b) mostram a média espectral do grupo para cada um dos tempos e a subtração entre os tempos T30 e T60. Para a região relacionada a hidratação da pele, as áreas dos espectros de subtração apresentaram valores negativos, ou seja, tanto para 30 dias como para 60 dias a região do modo vibracional OH (3100 a 3490 cm⁻¹) mostrou diminuição na intensidade. Da mesma maneira o pico relacionado aos lipídeos e proteínas (2945 cm⁻¹) teve intensidade diminuída. A perda da hidratação da pele durante toda a fase de estudo foi contínua, visto que as voluntárias se encontravam todas na mesma cidade do estudo, as consequências da baixa umidade relativa do ar as afetaram e, na média, o produto não foi capaz de manter a barreira de proteção da pele contra a perda de água.

Tabela 10 - Valores das áreas integradas sob as curvas subtraídas obtidas na Figura 45 (b)

Área Integrada sob a curva	
RT2(30) – RT2(0)	-0,61
RT2(60) – RT2 (0)	-1,25

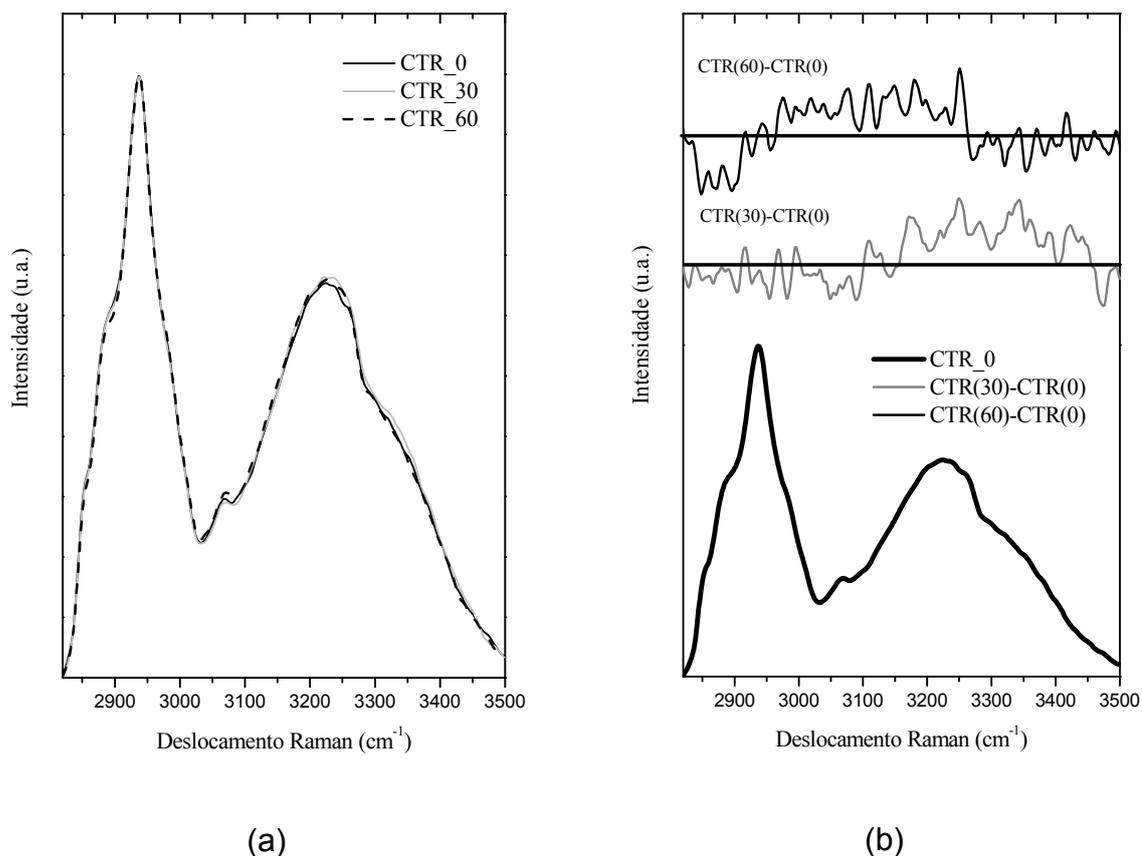


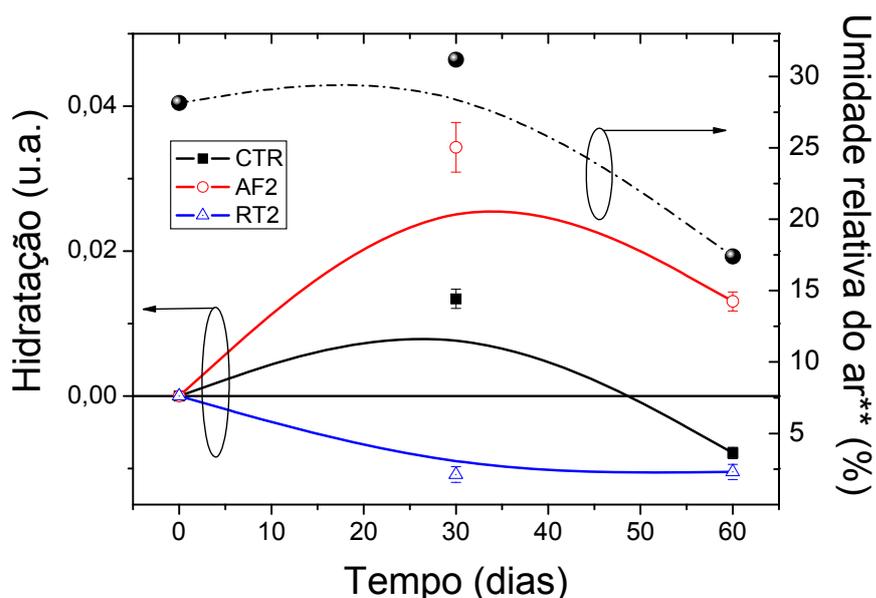
Figura 46 - (a) Espectro médio do grupo CTR para os tempos T0, T30 e T60; (b) Espectro obtido para a região de alta frequência e os espectros de subtração entre os tempos T30 (30 dias) e T60 (60 dias)

Analisando a Figura 46 (a) é possível observar, para a região de hidratação, que a faixa relacionada ao estiramento OH (3100 a 3490 cm⁻¹) em T30 apresentou pequeno aumento na intensidade. No entanto, quando o efeito é observado para os 60 dias, esta intensidade apresenta diminuição em relação ao tempo de controle (T0). Outra observação no espectro subtraído CTR(60)–CTR(0) é um aumento na região das oleofinas (3050 cm⁻¹) e diminuição na região de modos vibracionais de lipídeos (2800 a 2900 cm⁻¹).

Tabela 11 - Valores das áreas integradas sob as curvas subtraídas obtidas na Figura 46 (b)

Área Integrada sob a curva	
CTR(30) – CTR(0)	3,97
CTR(60) – CTR(0)	-0,80

A Figura 47 apresenta a intensidade relativa entre os picos 3220 cm^{-1} e 2936 cm^{-1} para o espectro normalizado em relação à banda 2936 cm^{-1} . O grupo AF2 apresentou grande modificação na quantidade de água na camada córnea e mesmo com a diminuição da hidratação após T30 permaneceu mais elevado que os outros. O RT2 não manteve a hidratação da pele uma vez que sofreu declínio contínuo durante todo período de tempo.



**Estação meteorológica da UNIVAP (Urbanova)

Figura 47 - Intensidade relativa entre os picos do deslocamento Raman 3220 cm^{-1} e 2936 cm^{-1} e curva de umidade relativa do ar.

Egawa e colaboradores realizaram medidas da capacitância da pele do rosto e antebraço e observaram uma relação linear entre o nível de hidratação da pele, medidas de capacitância e umidade relativa do ar [20]. O uso contínuo de produtos hidratantes pode proteger a pele e manter um equilíbrio hídrico mesmo sob mudanças rigorosas do ambiente [107].

6 CONCLUSÃO

Para a região de baixa frequência pode-se concluir que a espectroscopia Raman é uma técnica bastante sensível para detectar pequenas variações bioquímicas em tecidos vivos mesmo com inúmeras variáveis. Além disso, o produto proporcionou variações na pele relacionadas ao aumento do colágeno, alterações nos lipídeos. A região atribuída às bases nitrogenadas mostrou que o produto com princípios ativos antienvhecimento agiu de forma positiva diminuindo os radicais livres. Apesar do grupo controle não fazer uso de nenhum produto durante o período de estudo, houve comportamento anômalo mediante análise de algumas variações bioquímicas como, por exemplo, aumento na região do colágeno.

Para a região de alta frequência, destinada aos modos vibracionais relacionados à hidratação da pele, o grupo controle e o grupo placebo não mantiveram a hidratação da pele sob bruscas alterações climáticas. Entretanto, o grupo AF2 permaneceu com hidratação positiva quando comparado à sua fase inicial.

REFERÊNCIAS

- [1] EUROMONITOR International. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com>>. Acesso em: 18 fev 2010.
- [2] ABHIPEC. **Panorama do setor higiene pessoal: perfumaria e cosméticos**. [s.l.: s.n], 2009.
- [3] ZATZ, J.L. **Skin Permeation Fundamentals and Applications**. 1st ed. United States: Allured Publishing Corp, 1993.
- [4] ERENO, D. Beleza Fundamentada. **Revista Fapesp**, n. 146, p. 80-85, 2008.
- [5] FUCHS, J.; PACKER, L. Oxidative stress. In: SIES H, (ed.). **Antioxidants and Oxidants**. London: Academic Press, 1991. p.559-583.
- [6] SILVESTRE, J. A. **Diagnóstico sobre o processo de envelhecimento populacional e a situação do idoso**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- [7] RATTAN, S. I. S. The Nature of Gerontogenes and Vitagenes: Antiaging Effects of Repeated Heat Shock on Human Fibroblasts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.854, p.54-60, Nov.1998.
- [8] QUIROGA, R. M. Cosmetic Dermatology: Anti-Aging Medicine as It Relates to Dermatology (1st ed). In: BURGESS, C. M. **Cosmetic Dermatology**. Berlin Heidelberg: Springer,2005. p. 1-16.
- [9] CHUNG, J. H et al, Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin *In Vivo*. **Journal Investigative Dermatology**. v.117, n.5, p.1218-1224, 2001.
- [10] LLORENÇ, P. Estrato córneo: Aspectos relacionados con su hidratación y permeabilidad. **Offarm**, v. 23, p.166-168, 2004.
- [11] WIDMER, R.; ZIAJA, I.; GRUNE, T. Protein oxidation and degradation during aging: Role in skin aging and neurodegeneration. **Free Radicals Research**, v.40, p.1259-1268, 2006.
- [12] YAAR, M.; ELLER, M. S.; GILCHREST, B. A., Fifty years of skin aging, **Journal Investigative Dermatology**, v.7, p.51-58, 2002.
- [13] SOHAL, R. S.; SOHAL, B.H. Hydrogen Peroxide Production by mitochondria increases during aging, **Mechanisms of ageing and Development**, v.57, p.187-202, 1991.
- [14] ALBERTI, I., KALIA, Y. N. et al; *In vivo* assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum, **Journal of Controlled Release**, v.71, p.319-327, 2001.
- [15] QUATRESOOZ, P. et al, Immunohistochemical clues at aging of the skin microvascular unit, **Journal of Cutaneous Pathology**, v.36, p.39-43, 2009.

- [16] PIROLA, R.; BAREGGI, S. R.; and BENEDITTIS. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatografy B**, v.705, p.309-315, 1998.
- [17] PILGRAM, G.S.K. et al, Electron Diffraction Provides New Information on Human Stratum Corneum Lipid Organization Studied in Relation to Depth and Temperature. **Journal of Investigative Dermatology**, v.113, n.3, p.403-409, 1999.
- [18] KAJS, T. M; GARSTEIN, V. Review of the instrumental assessment of skin: Effects of cleansing product. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.42, p. 249-271, 1991.
- [19] CHENG, Y. Protection effect of cosmetics on human skin under simulated rigorous environment. **Skin Research and Technology**, v.14, p.45-52, 2008.
- [20] EGAWA, M.; TAGAMI, H. Comparison of the depth profiles of water and water-binding 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, **British Journal of Dermatology**, v.158, n.2, p.251-260, 2007.
- [21] LADEMANN, J.; CASPERS, P. J. *In vivo* Raman spectroscopy detects increased epidermal antioxidative potential with topically applied carotenoids. **Laser Physics Letter**, v.6, n.1, p.76–79, 2009.
- [22] MÉLOT, M.; PUDNEY, P. D. A. Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by *in vivo* confocal Raman spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v.138, p.32–39, 2009.
- [23] QUERLEUX, B. Skin from various ethnic origins and aging: an *in vivo* cross-sectional multimodality imaging study. **Skin Research and Technology**, v.15, p. 306–313, 2009.
- [24] CASPERS, P. J. et al. *In vitro* and *in vivo* Raman spectroscopy of human skin. **Biospectroscopy**, v.4, p.31-39, 1999.
- [25] WEIGMANN, H. Ex-vivo spectroscopic quantification of sunscreen efficacy: proposal of a universal sun protection factor. **Journal Biomedical Optics**, v.12, n.4, 044013, 2007.
- [26] KOLLIAS, N.; MORAN, M., Endogenous skin fluorescence Includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging, **The Journal of Investigative Dermatology**, v.111, n.5, p.776-780, 1998.
- [27] MARROT, L.; MEUNIER, JR. Skin DNA photodamage and its biological consequences, **Journal of the American Academy of Dermatology**., v. 58, p.139-148, 2008.
- [28] SCHROEDER, P.; HAENDELER J.; KRUTMANN, J. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin, **Exp Gerontology**, v.43, p.629-632, 2008.

- [29] NELSON, David L; COX, Michael M.; LEHNINGER, Albert Lester. **Lehninger, principles of biochemistry**. 4th ed. New York, NY: W. H. Freeman, 2005. p. 1-38.
- [30] KOOLMAN, J. **Color Atlas of Biochemistry**. 2.ed. Stuttgart-New York: Thieme; 2005. p.6-86.
- [31] AZEVEDO Jr.Walter F. de. ESTRUTURA DE PROTEÍNAS. Disponível em: http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/cursos/intro_bioquimica/aula4.pdf, acesso em: 25 fev 2010
- [32] WOLFF, K. et al. Fitzpatrick's Dermatology In: **General Medicine** . 7.ed. New York: Mc Graw Hill, 2008. v.1 -2.
- [33] DuVIVIER, A. **Atlas de Dermatologia Clínica** (2nd ed), São Paulo: Manole LTDA, 1997.
- [34] RAUH, L.K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**, Dissertação (Mestrado) - Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2008.
- [35] BAGATIN, E. Envelhecimento Cutâneo e o Papel dos Cosmecêuticos. **Revista Brasileira de Medicina**, v.66, p.5-11, 2009.
- [36] HARRIS, M.I.N.C. **Pele, estrutura, propriedades e envelhecimento** 2.ed. São Paulo: Senac, 2005
- [37] LEVER, W. F. Histopatologia da pele. 7.ed. São Paulo: Manole , 1991. v.1.
- [38] QUERATINÓCITOS. Disponível em: [http://www.infopedia.pt/\\$queratinocitos](http://www.infopedia.pt/$queratinocitos), acesso em: 26 fev 2010, às 15h40.
- [39] PELE. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/07/23>, acesso 26 fev 2010 às 15h53
- [40] QUERATINA. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Queratina>, acesso em: 26 fev 2010.
- [41] YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.26, 583-591, 2001.
- [42] MELANINA e Melanócitos. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/melan>, acesso em 27 fev 2010.
- [43] TYROSINE. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine>, acesso 27 fev 2010.
- [44] Langerhans cells. Disponível em: <http://cmmg.biosci.wayne.edu/asg/dendritic.gif>, acesso em: 26 fev 2010

- [45] GOLDSMITH, L.A, Clinical Snippets. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, n.1, 2003.
- [46] SHERIDAN, R.L. ;TOMPKINS, R.G. Skin substitutes in burns. **Burns**. v.25, p.97-103, 1999
- [47] HIB, J. **Di Fiore Histologia Texto e Atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2003.
- [48] DRAELOS, Z. D., **Cosmeceuticos: Função e a barreira cutânea**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.p.11-14.
- [49] GRAYSON, S.; ELIAS, P.M. Isolation and lipid biochemical characterization of *stratum corneum* membrane complexes: implications for the cutaneous permeability barrier. **Journal Investigative Dermatology**, v 78, n2, p.128– 135, 1982.
- [50] HARDING, C. R. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p.1-21, 2000.
- [51] JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9.ed. Guanabara Koogan, 1999. p 81.
- [52] ROSS, M.H; REITH, E.J; ROMRELL, L.J., **Histologia: Texto e Atlas**.2.ed. São Paulo: Médica Panamericana, 1993.p. 347.
- [53] SAMPAIO, S. A. P; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica**, 3.ed. São Paulo: Artes médicas, p. 1-37, 2007.
- [54] Cognis Deutschland GmbH & Co. KG. Disponível em: www.scf-online.com. **Skin Care Forum**, n.24.
- [55] PHILLIPS, C. L et al. Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblasts. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.103, n.2, p.228- 232, 1994.
- [56]PROTEÍNAS. Disponível em: www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/aminoacido... acesso em 29 fev 2010
- [57] SMEKAL, A. Zur Quantentheorie der Dispersion. **Die Naturwissenschaften**, v.43, p.873-875, 1923.
- [58] RAMAN, C. V; KRISHNAN, K. S. A new type of Secondary Radiation, **Nature**, v.121, p.501, 1928.
- [59] LINDON, J.C., TRANTER, J.E. ;HOLMES, J.L. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. Amsterdã: Elsevier, 2000. p 1993.
- [60] SALA, O. I₂ Uma molécula Didática. **Quimica nova**, v.31, n.8, p 914-920, São Paulo, 2008.

[61] SALA, O, **Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo:UNESP,1996. p. 33-34.

[62] SIEBERT, F. ;HILDEBRANDT, P. **Vibrational Spectroscopy in Life Science**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. p. 28-29.

[63] HOLLAS, M.J. **Modern Spectroscopy**. 4th ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 138-141.

[64] NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**, 4th ed., Nova Jersey: John Wiley & Sons,1986. p. 14.

[65] HADJUR C. Confocal Raman Microscopy for Cosmetic Applications. **Raman Update**, 2005

[66]FUNDAMENTOS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN. Disponível em: <http://www.tesisenxarxa.net/TESISUPC/AVAILABLE/TDX-0207105-105056//03Rpp03de11.pdf>. Acesso em: 1 mar 2010.

[67] ANDRADE, P.O et al. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.387, p.1643-1648, 2007.

[68] ALVES, O.L, **Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier: Feliz Combinação de Velhos Conhecimentos de Óptica, Matemática e Informática**. Campinas: UniCamp-Laboratório de química do estado sólido, 2009. p 3-6.

[69] MARTINS, M.A.S. **Espectroscopia Raman Diferencial**. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São Jose dos Campos, SP.2008.

[70] GRIOT, M. Fundamentals of Spectral Analysis. Disponível em http://www.cvimellesgriot.com/products/Documents/TechnicalGuide/Spectral_Analysis.pdf>, acesso em: 3 mar 2010

[71] JANSEN, A.M et al. Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers. **Journal of Biomedical Optics**, v1, n.1,p. 31-70, 1996.

[72] BAHERI, N. et al. Applying Principle Component Analysis for Detecting Skin Damage Caused by Using Detergents: A Raman Spectroscopy Study. **International Conference on Information Management and Engineering**, p.267-270, 2009

[73] MARK, H.; WORKMAN, J. **Statistics in Spectroscopy**, 2nd ed, Amsterdã: Academic Press, p. 1-342, 1991

[74] A TUTORIAL ON PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS. Disponível em: http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf, acesso: 3 mar 2010,

- [75] FERREIRA, M. M. C. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, n.5, 1999.
- [76] LIEBER, C.; JANSEN, A. M. Development of a handheld Raman microspectrometer for clinical dermatologic applications. **Optics Express**, v.15, n.19, p 11874-11882, 2007.
- [77] KNUDSEN, L. et al. Natural variations and reproducibility of *in vivo* near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of normal human skin. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.33, n.7, p 574-579, 2002.
- [78] LADEMANN, J. et al. *In vivo* Raman spectroscopy detects increased epidermal antioxidative potential with topically applied carotenoids. **Laser Physics Letter**, v.6, n.1, p 76-79, 2009.
- [79] ORTH, D.S.; APPA, Y. Glycerine: A natural ingredient for moisturizing skin. In: LODEN, M.; MAIBACH, H.I (eds). **Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function**. Dermatology: Clinical and Basic Science Series. Nova York: CRC Press, 2000. p. 213–228.
- [80] CHRIT, L. et al. *In vivo* chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. **Journal of Biomedical Optics**, v.10, n.4, p.044007-1 - 04400711, 2005.
- [81] EATON, M.L. **Multivariate Statistics: a vector space approach**. Ohio: John Wiley & Sons, v.53, 2007
- [82] JOLLIFFE, L. T. Principal Component Analysis , 2nd ed, New York: Springer-Verlag, 2002.
- [83] PENTEADO, S. C. G. Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier Transform- Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v.13, n.1, p. 014018-1 – 014018-10, 2008.
- [84] TFAYLI, A. et al. Molecular Characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin. **Biopolymers**, v.87, n.4, 261-274
- [85] CHOI, J.H. Calculations of intermode coupling constants and simulations of amide I, II, and III vibrational spectra dipeptides. **Chemical Physics**, v.361, p. 168-175, 2009.
- [86] GNIADACKA, M. et al. Structure of Water, Proteins and Lipids in Intact Human Skin, Hair, and Nail. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.110, n.4, p 393-398, 1998.
- [87] DARWIN, M. Antioxidants in the skin: Dermatological and cosmeceuticals aspects. In: **Dermatologic Cosmeceutic, and Cosmetic Development**. New York: Informa Healthcare, 2008.

[88] CHRIT L. et al. *In Vivo* Chemical Investigation of Human Skin Using a Confocal Raman Fiber Optic Microprobe. **Journal of Biomedical Optics**, v.10, n.4, p.044007-1 – 044007-11, 2005.

[89] TFAYLI, A. et al. Follow-up of Drug Permeation through Excised Human Skin With Confocal Raman Microspectroscopy. **European Biophysics Journal**, v.36, p.1049-1058, 2007.

[90] CHRIT, L. et al. In Vitro and *In Vivo* Confocal Raman Study of Human Skin Hydration: Assessment of a New Moisturing Agent, pMPC. **Biopolymers**, v.85, n.4, p.359-369, 2006.

[91] HIRATA, L. L. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, n.3, p.418-424, 2004.

[92]VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.31, p.31-44, 1998.

[93]HUANG, Z. Raman spectroscopy of *in vivo* cutaneous melanin. **Journal of Biomedical Optics**, v.9, n.6, 1198-1205, 2004.

[94] JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, p.801-810, 2002.

[95] AZULAY, M. M. et al. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.3, p.265-274, 2003

[96] SINGH, R. P.;AGARWAL, R. Cosmeceuticals and silibinin. **Clinics in Dermatology**, v.27, p. 479-484, 2009.

[97]SUEHARA, L.Y. e col. Avaliação do envelhecimento facial relacionado ao tabagismo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n. 1, p. 34-39, 2006.

[98] MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases Biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.263-269, 2009.

[99] DARVIN, M. E. **Kinetics of Carotenoid Antioxidant Substances in the Human Skin**. Dissertation, Universitätsmedizin Berlin 2007.

[100] RHIE, G. et al. Aging and photoaging- Dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.117, n.5, p. 1212-1217, 2001

[101] BAUMANN L. Skin Ageing and its Treatment. **Journal of Pathology**, v.211, p.241-251, 2007.

[102] CARNIOL, P.J.; SADICK N. S. **Clinical Procedures in Laser Skin Rejuvenation**. London: Informa Healthcare, 2007.

- [103] PETRUSKA, J.A. et al. A Subunit model for the tropocollagen macromolecule. **Biochemistry**, v.51, p.871- 876, 1964.
- [104] LY, E., et al. Polarized Raman Microspectroscopy Can Reveal Structural Changes of Peritumoral Dermis in Basal Cell Carcinoma. **Applied Spectroscopy**, v.62, n.10, p.1088-1094, 2008.
- [105] FEDERMAN, S. et al. Following matrix metalloproteinases activity near the cell boundary by infrared micro-spectroscopy. **Matrix Biology**, v.21, p.567-577, 2002.
- [106] OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U. Relação entre transferência de carga e as interações intermoleculares em complexos de hidrogênio heterocíclicos. **Química Nova**, v.30, n.4, p.791-796, 2007.
- [107] YAN, C. et al. Protection effect of cosmetics on human skin under simulated rigorous environment. **Skin Research and Technology**, v.14, p.45-52, 2008.