

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

**Quantificação de substâncias do fator de hidratação natural (NMF)  
do estrato córneo *ex vivo* em função do fototipo e idade**

Amanda Beatriz de Barros

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

SÃO PAULO

2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

**Quantificação de substâncias do fator de hidratação natural (NMF)  
do estrato córneo *ex vivo* em função do fototipo e idade**

Amanda Beatriz de Barros

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

SÃO PAULO

2022

Amanda Beatriz de Barros

Quantificação de substâncias do fator de hidratação natural (NMF) do estrato córneo  
*ex vivo* em função do fototipo e idade

Comissão julgadora da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. André Rolim Baby

Orientador/ Presidente

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

São Paulo, 01 de julho 2022.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Barros, Amanda Beatriz de

B277q      Quantificação de substâncias do fator de hidratação natural (NMF) do estrato córneo ex vivo em função do fototipo e idade / Amanda Beatriz de Barros. - São Paulo, 2022.

66 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Departamento de Farmácia.

Orientador: Baby, André Rolim

1. Cosmetologia. 2. Pele. I. T. II. Baby, André Rolim, orientador.

## AGRADECIMENTOS

A presente investigação foi financiada, em parte, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001; pela FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo n. 2019/16169-0; e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), bolsa n. 133314/2019-7.

Agradeço primeiramente a Deus, pois até aqui ele tem me ajudado, concedido bênçãos e dado forças para que eu possa continuar. Aos meus pais Marlene e João Fernandes que sempre acreditaram nos meus sonhos, me apoiaram em todos os momentos, e sempre fizeram o possível para que fossem concretizados, e aos meus irmãos Heloisa, Fernanda e Fausto, e meu sobrinho Théo por caminharem sempre ao meu lado.

Obrigado aos meus amigos Mariana, Amanda Caroline e Alexandre que sempre me deram apoio e suporte em muitos momentos durante essa trajetória. Agradeço pelas amizades que cultivei ao longo dessa jornada, Maira, Bruna, Fernanda e Michelly por todo auxílio, companhia e por compartilharem além de conhecimento, bons momentos comigo.

Minha gratidão a professora Dra. Fabiana Vieira Lima, por toda a disposição e auxílio nesse trabalho, e por ter me ensinado o valor e a importância do trabalho em equipe. E por fim agradeço ao professor Dr. André Rolim Baby que me acolheu em seu grupo de pesquisa, acreditou em meu potencial como pesquisadora, me orientou e guiou meus passos fazendo com que esse trabalho fosse possível, afinal ensinar não é apenas transferir conhecimento, mas criar possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção. Posso afirmar que a educação transformou minha vida, mérito de professores como você, hoje sou uma pessoa e uma profissional melhor, minha eterna gratidão.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.  
O saber se aprende com mestres e livros.  
A Sabedoria, com o corriqueiro, com a vida e com os humildes.  
O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada.  
Caminhando e semeando, sempre se terá o que colher.”*

Cora Coralina

## RESUMO

**BARROS, A.B. Quantificação de substâncias do fator de hidratação natural (NMF) do estrato córneo *ex vivo* em função do fototipo e idade.** 66 p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A hidratação cutânea ocorre, em parte, pelos componentes do Fator de Hidratação Natural (NMF), originados da degradação da filagrina, sendo alguns exemplos o ácido pirrolidona-carboxílico (PCA), o ácido urocânico (UCA) e a histidina (His). Estes estão presentes no estrato córneo (EC). O objetivo deste projeto de pesquisa foi determinar, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o PCA, o UCA e a His no estrato córneo de participantes obtido por *tape stripping* em função do fototipo e idade do participante da pesquisa. Participantes foram selecionados em função da idade acima de 18 anos, ambos os gêneros e fototipo da pele entre I a VI, de acordo com a classificação de Fitzpatrick. As amostras do EC foram obtidas do antebraço volar por *tape stripping* e irradiadas artificialmente. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi eficaz para separação e quantificação adequada das substâncias químicas His, PCA e os isômeros de UCA (*trans*-UCA e *cis*-UCA) no estrato córneo dos participantes. O método apresentou-se seletivo e ausente de interferentes, ademais, possuiu linearidade e limites de detecção e quantificação compatíveis com os objetivos dessa investigação. No fototipo I, os níveis de His foram menores em comparação aos demais grupos. Ademais, os níveis dessa mesma substância não apresentaram diferença entre as faixas etárias. Em função da irradiação das amostras, o montante de His aumentou em todos os fototipos. Os níveis de PCA apresentaram-se menores após a irradiação em todos os fototipos de pele. Ainda, as concentrações do PCA foram mais elevadas na faixa etária de 46 a 55 anos de idade. Os níveis de concentração do isômero *cis*-UCA foram maiores nos participantes com fototipo III, após a irradiação UV. Os níveis de concentração do isômero *trans*-UCA diminuíram após a irradiação, de forma proporcional à formação de *cis*-UCA em todos os fototipos. A faixa etária de 46-55 anos de idade obteve níveis significativamente menores de *trans*-UCA e *cis*-UCA.

**Palavras-chave:** fator de hidratação natural, estrato córneo, CLAE.

## ABSTRACT

**BARROS, A.B. Ex vivo quantification of natural hydration factor (NMF) substances in the stratum corneum as a function of phototype and age.** 66 p. (Masters dissertation). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Cutaneous hydration occurs, in part, by the components of the Natural Hydration Factor (NMF), originating from the degradation of filaggrin, some examples being pyrrolidone-carboxylic acid (PCA), urocanic acid (UCA) and histidine (His). These are present in the stratum corneum (SC). The objective of this research project was to determine, by high efficiency liquid chromatography (HPLC), the PCA, UCA and His in the stratum corneum of participants obtained by tape stripping due to the phototype and age of the research participant. Participants were selected according to age above 18 years, both genders and skin phototype between I and VI, according to Fitzpatrick's classification. The SC samples were obtained from the volar forearm by tape stripping and artificially irradiated. High efficiency liquid chromatography (HPLC) was effective for the separation and proper quantification of the chemicals His, PCA and UCA isomers (*trans*-UCA and *cis*-UCA) in the stratum corneum of the participants. The method was selective and absent from interfering, in addition, it had linearity and limits of detection and quantification compatible with the objectives of this investigation. In phototype I, His levels were lower compared to the other groups. Moreover, the levels of this same substance showed no difference between age groups. Due to the irradiation of the samples, the amount of His increased in all phototypes. PCA levels were lower after irradiation in all skin phototypes. Furthermore, PCA concentrations were higher in the age group from 46 to 55 years of age. The concentration levels of the *cis*-UCA isomer were higher in participants with phototype III after UV irradiation. The concentration levels of the *trans*-UCA isomer decreased after irradiation, proportionally to the formation of *cis*-UCA in all phototypes. The age group 46-55 years of age obtained significantly lower levels of *trans*-UCA and *cis*-UCA.

Keywords: natural hydration factor, stratum corneum, HPLC.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da estrutura da pele
- Figura 2:** Representação esquemática do estrato córneo (EC)
- Figura 3:** Estrutura química do ácido pirrolidona-carboxílico (PCA)
- Figura 4:** Estrutura química do ácido urocânico (UCA)
- Figura 5:** Estrutura química da histidina (His)
- Figura 6:** Mecanismo de produção e efeitos dos componentes do NMF
- Figura 7:** Barra de cores para autoidentificação do tipo de pele
- Figura 8:** Gabarito utilizado para demarcação dos sítios no antebraço dos participantes
- Figura 9:** Codificação atribuída aos sítios nos antebraços dos participantes
- Figura 10:** Cromatograma dos padrões (1) His, (2) PCA e (3) UCA
- Figura 11:** Curva analítica da histidina (His) com modelo ajustado
- Figura 12:** Curva analítica do ácido pirrolidona-carboxílico (PCA) com modelo ajustado
- Figura 13:** Curva analítica do ácido urocânico (UCA) com modelo ajustado
- Figura 14:** Concentração do composto His no EC irradiado ou não em fototipos de I a III
- Figura 15:** Concentração do composto PCA no EC irradiado ou não em fototipos de I a III
- Figura 16:** Concentração do composto *trans*-UCA no EC irradiado ou não em fototipos de I a III
- Figura 17:** Concentração do composto *cis*-UCA no EC irradiado ou não em fototipos de I a III
- Figura 18:** Concentração do composto His e idade dos participantes no EC irradiado ou não em fototipos de I a III
- Figura 19:** Concentração do composto PCA e idade dos participantes no EC irradiado ou não em fototipos de I a III
- Figura 20:** Concentração do composto *trans*-UCA e idade dos participantes no EC irradiado ou não em fototipos de I a III
- Figura 21:** Concentração do composto *cis*-UCA e idade dos participantes no EC irradiado ou não em fototipos de I a III

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Composição química do NMF

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Classificação dos fototipos de pele por FTS

**Tabelas 2:** Equação da reta e concentração dos compostos His, PCA e UCA, calculada a partir da equação da reta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. Pele	16
2.1.1. Estrato córneo (EC)	17
2.2. Hidratação da Pele	19
2.2.1 Fator de hidratação natural (NMF, <i>Natural Moisturizing Factor</i> )	20
2.3. Colorimetria da Pele	23
2.3.1. Fototipo de Pele	25
2.3.2. Variações da pele pela idade	28
2.4. Métodos Analíticos de Quantificação do NMF	30
2.5. Técnica <i>tape-stripping</i>	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivos Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Material	35
4.1.1. Substâncias químicas de referência, fita adesiva e água	35
4.1.2. Solventes e reagentes	35
4.1.3. Equipamentos, aparatos e acessórios	35
4.2. Métodos	36
4.2.1. Quantificação de His, PCA e UCA por CLAE	36
4.2.1.1. Condições cromatográficas	36
4.2.1.2. Solução padrão	36
4.2.1.3. Curva analítica e linearidade	37
4.2.1.4. Avaliação do Limite de Quantificação	38
4.2.1.5. Avaliação do Limite de Detecção	38
4.2.1.6. Pesquisa de Interferentes	38
4.3. Ensaio <i>ex vivo</i>	39
4.3.1. Critérios de inclusão e exclusão	39
4.3.2. Aspectos legais e éticos	39
4.3.3. <i>Tape stripping</i> e extração do estrato córneo (EC)	40
4.3.3.1. Preparação das amostras	40

4.3.4. Análise estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Curva Analítica	42
5.2. Limite de Detecção	45
5.3. Limite de quantificação	46
5.4. Pesquisa de Interferentes	46
5.5. Ensaio <i>ex vivo</i>	46
5.5.1. Fototipo	47
5.5.2. Idade	53
6. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

## 1. INTRODUÇÃO

A pele tem como principal função a de proteger os órgãos internos do ambiente externo, porém, com o decorrer do tempo, o tecido da pele se altera de forma cronológica e crônica, onde o processo de envelhecimento altera não só a aparência da pele, mas também sua rigidez e enrugamento, além de sofrer modificações bioquímicas e físicas. Grande maioria dos resultados das alterações da pele são influência de fatores ambientais com potencial oxidativo, como a radiação solar, poluição, sendo os principais promotores do estresse oxidativo (KAMMEYER, 2015). Com o aumento da idade, e a exposição solar a pele sofre diminuição da função fisiológica, como ressecamento ou perda de hidratação, sensibilidade a danos na pele e diminuição da cicatrização (BOIREAU-ADAMEZYK et al., 2014; GHADIALLY et al., 1995; LIBERTINI, 2014).

A hidratação da pele nada mais é que o equilíbrio entre a água endógena, própria do organismo presente entre a derme e epiderme, e a água exógena proveniente a partir da aplicação de cosmético hidratante e água do ambiente. Naturalmente a pele é hidratada pelo Fator de Hidratação Natural (NMF) que se liga a água do estrato córneo (EC), mantendo então a hidratação da pele (HARDING, 2005). Os componentes do NMF são produtos de degradação da filagrina, a partir de aminoácidos metabolizados, sendo eles o ácido pirrolidona-carboxílico (PCA), o ácido urocânico (UCA) e histidina (His). O processamento de filagrina para NMFs é importante para o fornecimento de compostos higroscópicos, desempenhando um importante papel na hidratação da pele e na função de barreira protetora (MCLEAN, 2006; O'REGAN et al., 2009).

Para a determinação desses compostos, atualmente, é utilizada técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, infravermelho e espectroscopia Raman, os métodos mais frequentemente aplicados, sendo indicadores indiretos de teor de água do estrato córneo, baseadas na técnica de remoção a partir de fitas adesivas, pela qual as camadas do estrato córneo são coletadas de forma minimamente invasiva (CHOE, 2018). A determinação também pode ser realizada por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiências (KEZIC et al. 2009). Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar os compostos do NMF do estrato córneo de participantes, por CLAE, a partir da extração por *tape stripping* e

irradiação artificial. Ademais, as referidas substâncias obtidas *ex vivo* foram avaliadas em função do fototipo e idade dos participantes.

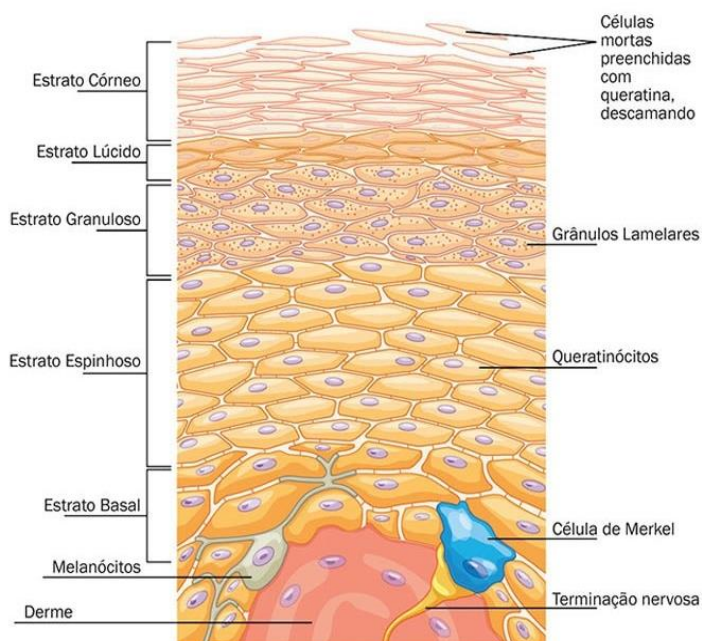
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Pele

Dentre os órgãos que constituem o corpo humano, a pele é considerada o maior órgão correspondendo ao equivalente de 10% do peso corporal tendo como principal função proteger e envolver os demais órgãos e estruturas internas do ambiente externo. Além desta, a pele possui outras funções como a regulação da temperatura, o sensorial, absorção da radiação ultravioleta (UV), síntese da vitamina D, absorção e eliminação de substâncias químicas, além da função estética (JUNQUEIRA, 2008).

No geral, a pele divide-se a em duas camadas, a epiderme e a derme. Entretanto, alguns autores consideram que a pele pode ser dividida em três camadas, sendo epiderme, derme e hipoderme. Há autores, ainda, que consideram quatro camadas (Figura 1), sendo o estrato córneo (EC), a camada mais superficial e externa, correspondente à epiderme (WALTERS, ROBERTS, 2002).

**Figura 1:** Representação esquemática da estrutura da pele.



Fonte: Adaptado de Junqueira, 2008.

A membrana basal é composta principalmente por proteínas, como colágeno tipo IV, laminina e fibronectina, responsáveis pela estabilidade mecânica e ligação entre a membrana basal e os queratinócitos basais. As células do estrato basal são



ligadas à membrana basal por hemidesmossomas (BORRADORI, SONNENBERG, 1999). A camada de células espinhosas do estrato espinhoso vem seguido da camada basal, conectadas entre si por meio de desmossomas, contendo várias camadas de filamentos de queratina. As células do estrato espinhoso originam-se a partir do cessamento da mitose e início da diferenciação, no qual as células mantêm a capacidade de alterar a expressão transcricional dos genes. A transição entre o estrato espinhoso e o estrato granuloso é caracterizado pela presença de grânulos intracelulares no citosol das camadas celulares superiores do estrato espinhoso (WALTERS; ROBERTS, 2002).

O estrato granuloso apresenta grânulos intracelulares de querato-hialina, nas regiões periféricas da camada do estrato. Os grânulos lamelares migram do plasma apical para a membrana, fundem-se e expõem todo seu conteúdo para o espaço intercelular (LANDMANN, 1988). Durante esta etapa, os queratinócitos perdem seus núcleos, assim como outras organelas, através da liberação de enzimas seletivas por lise celular, tornando-se achatados e compactados, formando os corneócitos do EC (WALTERS; ROBERTS, 2002).

A principal função da pele é de proteção do corpo, proteção química e imunológica, proteção contra patógenos, contra a radiação ultravioleta (UV) e radicais livres. É o principal órgão termorregulador, e desempenha funções sensoriais e endócrinas, abrangendo a síntese de vitamina D (MENON, 2002). A pele necessita de cuidados, pois quando há falhas na retenção de água resulta no desenvolvimento do ressecamento da pele, e uma pele seca torna-se escamosa, por vezes acompanhada de sintomas subjetivos de tensão, coceiras e até mesmo dor (PROKSCH; LACHAPELLE, 2005).

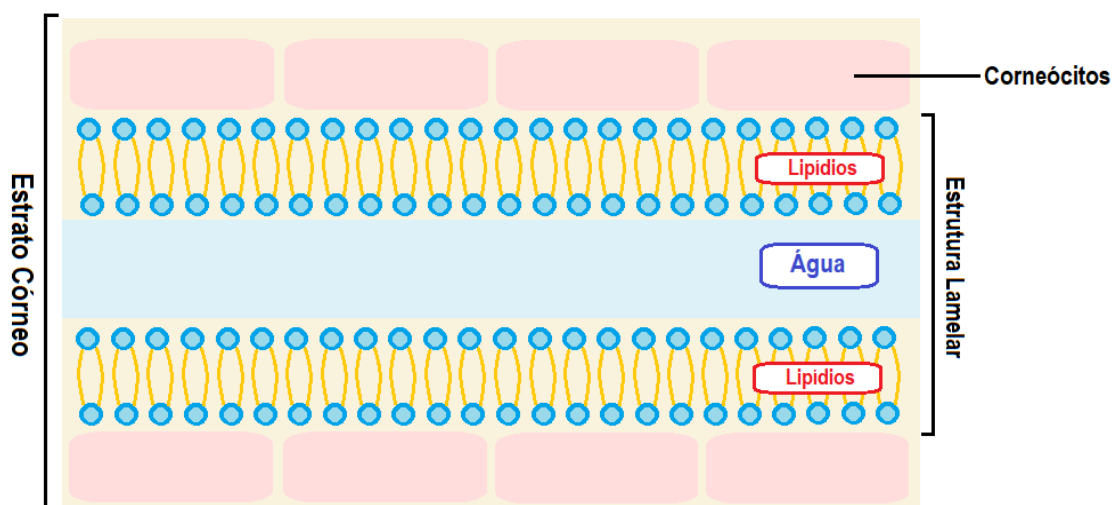
### **2.1.1. Estrato córneo (EC)**

Uma das propriedades da pele é evitar que ocorra a perda de fluidos e eletrólitos para o ambiente, sendo assim, a pele possui uma barreira de proteção mais superficial, denominada estrato córneo (EC), que ao decorrer do tempo pode ser comprometida por meio de fatores exógenos, acrescidos de fatores intrínsecos. O comprometimento da função do estrato córneo aumenta os níveis de perda de água da pele, que conseqüentemente, resulta em ressecamento, podendo causar inúmeros

distúrbios de pele, conhecidos como dermatite atópica, eczema, xerodermia, entre outros (PERTICAROLI, 2019).

O EC é a camada mais superficial da pele, composto por corneócitos, células mortas achatadas ricas em proteína queratina, envoltas por lamelas lipídicas hidrofóbicas, que doam a característica de barreira protetora contra a perda de água, assim como para agentes tóxicos e microrganismos. Essas lamelas estão dispostas em paralelo à superfície dos corneócitos, sendo compostas de ceramidas, ácidos graxos livres de cadeia longa e colesterol, como ilustra a Figura 2 (SCHÜRER, 1991). Outro componente importante é o Fator de Hidratação Natural (NMF), altamente higroscópico e solúvel em água, composto por aminoácidos livres e sais inorgânicos (PERTICAROLI, 2019). O NMF mantém a hidratação da pele, estando presente no EC e obtido por meio da degradação enzimática da proteína filagrina (SCOTT, 1982).

**Figura 2:** Representação esquemática do estrato córneo (EC).



Fonte: Adaptado de Scott, 1982.

A função e a saúde da pele, assim como de toda a barreira cutânea, dependem da presença e organização de todos esses componentes, principalmente a organização lipídica considerada de suma importância para a função de proteção da pele saudável, pois em casos de doenças de pele, o nível de NMF encontra-se baixo (WATANABE, 1991) e a composição lipídica alterada, como em casos de dermatite atópica, psoríase, xerodermia, ictiose lamelar e síndrome Nethert (JANSSENS, 2012).

A composição dos lipídios intercelulares no EC é complexa e única. Esses lipídios ocorrem como uma fase contínua, ocupando cerca de 20% do volume,

dispostos em múltiplas estruturas lamelares (WALTERS; ROBERTS, 2002). A principal via de penetração de substâncias é através do EC, por meio das regiões lipídicas intercelulares e entre os corneócitos (SIMONETTI, 1995).

## **2.2. Hidratação da Pele**

Desde os anos 1950, autores demonstraram a importância do teor de água da camada córnea da pele para manutenção da hidratação (EPSTEIN, 2004), sendo reconhecida como uma das principais necessidades dos produtos de cuidados da pele. Embora o termo hidratação não possua uma definição concreta, autores consideram a hidratação da pele como um indicador do seu estado de saúde, da mesma forma que o ressecamento indica sua disfunção (RAHIMPOUR; HAMISHEHKAR, 2012). A pele hidratada de maneira adequada tende a envelhecer lentamente e estará mais protegida contra fatores externos, em relação à pele seca (LOO et al., 2013).

A hidratação da pele nada mais é que o equilíbrio entre a água endógena e a exógena. A água endógena provém da circulação sanguínea, difundindo-se por meio da derme à epiderme, enquanto a água exógena provém da aplicação de cosmético e água do ambiente. Naturalmente, a camada intercelular de lipídios do EC fornece uma barreira de proteção à perda de água e o Fator de Hidratação Natural (NMF) se liga à água, mantendo, então, a hidratação da pele (HARDING, 2005). Portanto, o teor de água pode ser regulado pela presença de substâncias do NMF e lipídios intercelulares. No entanto, no cotidiano a pele é exposta a vários fatores externos, como o sol e os raios ultravioletas (UV), ar seco e substâncias químicas que contribuem para a desidratação (STICK; PROKSCH, 2012). Ademais, o envelhecimento e algumas doenças de pele também contribuem para a desidratação (FLUHR et al., 2001; WOHLRAB, 2012; SIMPSON, 2012).

Quando a pele se encontra desidratada, suas células tornam-se mais rígidas e com pouca flexibilidade, levando a fissuras e a escamação devido ao aumento da perda transepidérmica de água (TEWL, sigla em inglês para *transepidermal water loss*) (ROBERTS et al., 2008). A pele se mantém saudável, macia, com flexibilidade e elasticidade devido ao equilíbrio que existe no mecanismo de sua hidratação, na capacidade que o organismo tem de promover a renovação celular e nas substâncias

que compõem a epiderme (WISSING; MÜLLER, 2002). O mecanismo de hidratação, consiste na capacidade do EC em reter água, de modo que a sua taxa de evaporação sempre se mantenha num nível normal (LIBARDI, 1999). Na pele normal, a quantidade de água do estrato córneo reduz gradativamente em direção à superfície.

Uma pele saudável contém cerca de 15 a 25% de água na sua superfície, e cerca de 40% entre o EC e o estrato granuloso (EG) (CASPER et al., 2001). Quando o teor de água no EC está abaixo de 10%, a descamação da superfície da pele torna-se visível, e a pele perde a elasticidade tornando-se rígida, áspera e escamosa (ESTANQUEIRO, 2016). Quando se trata de hidratação da pele, a água desempenha um papel fundamental na elasticidade, na resistência à tração mecânica, nas características de barreira protetora e na aparência geral da pele.

### **2.2.1 Fator de hidratação natural (NMF, *Natural Moisturizing Factor*)**

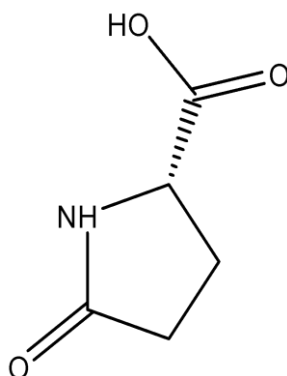
A hidratação da epiderme é mantida por fatores naturais de hidratação (NMFs) e lipídios intercelulares. A água presente no EC está diretamente relacionada à hidratação cutânea e isso pode ser associado à presença de substâncias higroscópicas intracelulares compondo o NMF (SUGAWARA et al., 2012). Na pele saudável, os corneócitos ou queratinócitos possuem altas concentrações de NMF, cerca de 10% de seu peso (O'REGAN et al., 2008). O NMF está localizado intracelularmente, sendo constituído por moléculas higroscópicas de baixo peso molecular e que se ligam à água, prevenindo que ocorra sua evaporação (DANTAS, 2016).

Essas moléculas são principalmente metabólitos de aminoácidos, como os ácidos pirrolidona-carboxílico (PCA) e ácido urocânico (UCA) e a histidina (His), em conjunto com o lactato de sódio, ácido láctico, ureia, citrato, açúcares e lipídios liberados pelos grânulos lamelares, garantindo ao estrato córneo a função protetora de prevenir a perda de água transepidermica (SUGAWARA et al., 2012).

Os NMFs são produtos de degradação da filagrina (FLG) e consistem em aminoácidos metabolizados em derivados higroscópicos, como o ácido pirrolidona-carboxílico (PCA), a partir da glutamina (Figura 3), e o ácido urocânico (UCA) (Figura 4), a partir da histidina (His) (Figura 5). O processamento de filagrina para NMFs é

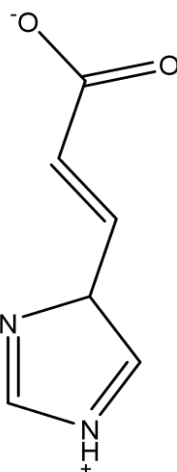
regulado por várias proteases, incluindo calpaína I e bleomicina hidrolase (BH) (SANT'; ADDOR; AOKI, 2010).

**Figura 3:** Estrutura química do ácido pirrolidona-carboxílico (PCA).



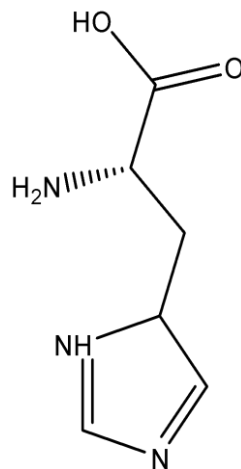
Fonte: ChemDraw 18.2. Próprio autor, 2020.

**Figura 4:** Estrutura química do ácido urocânico (UCA).



Fonte: ChemDraw 18.2. Próprio autor, 2020.

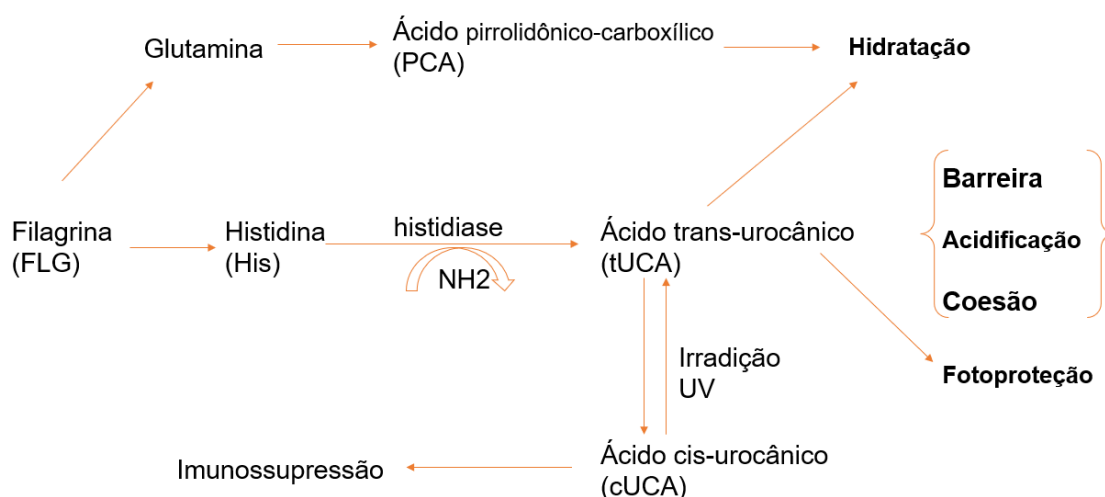
**Figura 5:** Estrutura química da histidina (His).



Fonte: ChemDraw 18.2. Próprio autor, 2020.

A FLG é uma proteína estrutural que se liga aos filamentos de queratinócitos que aumenta a densidade dos filamentos dos feixes, tornando os queratinócitos achatados em sua forma final, de suma importância para a integridade e força da pele. A profilagrina produzida a partir da FLG é dividida em filagrina monomérica, e com a ação de enzimas, geram os aminoácidos do NMF, que retem a água, mantêm o pH da pele, e fortalecem o estrato córneo atuam como função de barreira (AGRAWAL; WOODFOLK, 2014).

**Figura 6:** Mecanismo de produção e efeitos dos componentes do NMF.



Fonte: Adaptado de Sant', 2010.

Assim, a degradação da filagrina é considerada uma fonte importante de compostos higroscópicos que compõem e denominam o NMF, desempenhando um

papel relevante na hidratação da pele e na função de barreira protetora (IRVINE; MCLEAN 2006; O'REGAN et al. 2008). O Quadro 1 apresenta, em porcentagem, os principais componentes químicos do NMF (RAWLINGS E HARDING, 2004).

**Quadro 1:** Composição química do NMF

<b>Composto químico</b>	<b>% p/p</b>
Aminoácidos livres	40
Ácido pirrolidona-carboxílico (PCA)	12
Lactato	12
Açúcares	8,5
Ureia	7
Cloreto	6
Sódio	5
Potássio	4
Amoníaco, ácido úrico, glucosamina e creatina	1,5
Cálcio	1,5
Magnésio	1,5
Fosfato	0,5
Citrato e formiato	0,5

Fonte: Adaptado de Rawlings e Harding, 2004.

### 2.3. Colorimetria da Pele

A cor da pele é determinada por seu conteúdo e o tipo de melanina presente na epiderme, em que é classificada em dois tipos: eumelanina, mais escura, e feomelanina, mais clara. A eumelanina possui função fotoprotetora contra a luz UV e combate radicais livres, sendo mais abundante em indivíduos com pigmentação escura (GUPTA; SHARMA, 2019). A feomelanina é um fotoprotetor UV menos eficaz, atuando como um fotossensibilizador endógeno, pois gera ânions superóxido. Além da própria melanina, existem produtos na via da melanogênese que têm efeito protetor. O 5,6-di-hidroxiindol, por exemplo, é um intermediário na via de síntese da

melanina, com efeito inibitório na peroxidação lipídica, protegendo, assim, os queratinócitos contra a apoptose induzida por UV (KOVACS et al., 2012).

A coloração da pele é uma característica resultante da pigmentação, ou seja, atribuída pela quantidade e distribuição de melanina, que apresenta uma variação notável entre as populações e suas regiões geográficas. Os melanócitos são as células responsáveis pela produção da melanina e pela pigmentação da pele (VASHI, 2016).

O conjunto da colorimetria da pele e suas características fenotípicas, tais como pele, olhos e cor do cabelo, influenciam o fototipo da pele de Fitzpatrick. Utilizando técnicas de espectrofotometria de refletância foram avaliados os fototipos da pele, diferenciando cada um dos seis tipos de pele de Fitzpatrick que apresentaram concordância com os fototipos de pele avaliados pelo clínico. Dentre estes, somente o índice de melanina apresentou correlação com os fototipos de Fitzpatrick, apontando que a classificação de Fitzpatrick para colorimetria da pele é a mais indicada (GUPTA; SHARMA, 2019).

A pele negra é caracterizada pela presença de melanócitos maiores e mais dispersos, contendo quantidade maior de melanina com atividade da tirosinase e menor taxa de degradação do melanosomo na epiderme. Enquanto a pele pouco pigmentada apresenta melanosomos agregados e menores, com menor quantidade de melanina devido à taxa de síntese e degradação aumentada (BRENNER, 2008; VASHI, 2016). Na pele mais escura, a capacidade de melanogênese é maior quando não é exposta à UV, contribuindo para melhor fotoproteção contra os raios UV por meio da pigmentação. Outra característica favorável é a epiderme contendo estrato córneo mais espesso, com mais camadas de células cornificadas e conteúdo lipídico, fibroblastos maiores, frequentes e ativos em paralelos, bem como mais macrófagos, quando comparada com a pele caucasiana (MONTAGNA, 1991; BRISSET, 2010). Sendo assim, sugere-se que a pele negra tenha defesas antimicrobianas mais fortes, ligadas a epiderme externa mais acidificada e recuperação rápida da barreira após dano (ELIAS, 2009; GUNATHILAKE, 2009). Consistente com o grau de pigmentação, a pele africana e a pele asiática têm derme mais espessa e mais compacta em comparação com a pele caucasiana (GUIMARÃES, 2013).

A pele caucasiana é caracterizada por melanosomas menores, menor quantidade de melanina, EC e derme mais finos e aumento da TEWL, que acarreta na diminuição da hidratação. Esses fatores contribuem para o aumento do foto dano,



perda de colágeno e diminuição da elasticidade da derme, resultando, principalmente, no envelhecimento extrínseco (MONTAGNA, 1991). Tanto a pele africana como a asiática são mais resistentes ao foto dano e demonstram elasticidade preservada que retarda o aparecimento de rugas durante o envelhecimento. No entanto, a pele com pigmentação escura é mais propensa a mudanças relacionadas à pigmentação, que são particularmente evidentes na pele oriental e asiática. Além disso, diferenças étnicas no tipo de pele também podem se manifestar em relação à hidratação relativa da pele, com pele seca e xerose, frequentes na pele negra (BRISSETT, 2010). As diferenças entre os fenótipos da pele são evidentes nos principais grupos étnicos, que determinam características genéticas individuais, como grau de pigmentação e elasticidade dérmica.

A diversidade étnica pode ser responsável por diferentes reações do tecido a fatores químicos, por exemplo, a taxa e a eficácia da penetração, absorção e sensibilização. A pele caucasiana demonstra uma resistência maior aos danos causados pela barreira da água, a pele negra é mais resistente à penetração transcutânea (WESLEY, 2013). Em relação a TEWL basal, a pele caucasiana é semelhante, porém a pele oriental é mais sensível ao estresse mecânico e químico, devido sua barreira mais fraca e EC mais fino na epiderme. Em comparação com outros tipos de pele étnica, a pele oriental demonstra maior densidade de glândulas écrinas e poros menores, que refletem na atividade das glândulas sebáceas (RAWLINGS, 2006; ROH, 2006). No entanto, a pele negra demonstra dano mais grave nos poros faciais. No geral, a pele caucasiana é mais propensa a lesões inflamatórias, enquanto a pele negra apresenta-se mais suscetível a cicatrizes hipertróficas e queloides (MA, 2011; VASHI, 2016).

### **2.3.1. Fototipo de Pele**

A pele é classificada em fototipos com base em sua resposta a um evento incitante, como procedimento cosmético, lesão na pele e principalmente por luz e raios UV. A fototipagem da pele refere-se especificamente à classificação da pele de acordo com sua sensibilidade aos raios UV (GUPTA, 2019). Até a década de 1960, uma simples avaliação clínica da cor da pele era utilizada para determinar o fototipo da pele, e em 1975, Fitzpatrick propôs um sistema de classificação baseado na

suscetibilidade do indivíduo a queimaduras solares e a capacidade de bronzear na população branca não-hispânica, na aplicação da terapia PUVA, com base na exposição a raios ultravioletas A. Desde então, surgiram várias modificações na classificação de Fitzpatrick (FST), bem como novas formas de digitação da pele, como o conceito de tipagem da pele reativa ao sol (FITZPATRICK, 1975).

Primeiramente, foram determinados os tipos de pele I a IV, conforme a resposta da pele branca à exposição solar, em seguida, os tipos de pele V e VI foram incluídos referentes a pele marrom e negra (FITZPATRICK, 1988). Porém, este conceito foi inicialmente determinado pela resposta da pele em caucasianos suscetíveis, e poucos dados foram obtidos sobre a resposta da pele com tonalidades de cor escura.

A legitimidade do fototipo da pele é discutida sob dois pontos de vista, devido a limitação da precisão, além da diferença racial na resposta da pele à exposição solar. Rampen et al. (RAMPEN, 1988) classificaram 325 sujeitos de acordo com o esquema de Fitzpatrick e mediram a Dose Mínima de Eritema (MED) em 197 indivíduos. Eles não indicaram correlação significativa do MED com a tendência de bronzeamento referido e uma melhor correlação com características da pele. Outro estudo também sugere que a cor da pele natural é um parâmetro melhor para mensuração de respostas aos raios UV da pele (WESTERHOF, 1990).

No ano de 1976, Fitzpatrick fez uma nova classificação de 6 fototipos, desde o tipo I, sendo pele mais branca ao tipo VI, pele negra. Em 1983 classificou a cor natural da pele como própria da constituição natural, fornecida através de fatores genéticos fornecendo características específicas por meio dos genes de pigmentação; e em facultativa, aquela cor adquirida pela exposição ao sol, pela produção de hormônios, pelo envelhecimento e pelo ambiente externo (FITZPATRICK, 1988). A tabela 2 a seguir, apresenta a classificação proposta por Fitzpatrick (FST).

**Tabela 1.** Classificação dos fototipos de pele por FTS.

<b>Tipo</b>	<b>Fototipo</b>	<b>Características</b>
I	Branca	Sensível ao sol, queima com facilidade adquirindo coloração vermelha e nunca bronzeia.
II	Branca	Sensível ao sol, queima com facilidade e bronzeia pouco.
III	Morena Clara	Sensibilidade normal ao sol, pele bronzeia gradativamente podendo ficar vermelha.
IV	Morena Moderada	Sensibilidade normal, queima pouco e bronzeia facilmente.
V	Morena Escura	Pouca sensibilidade, queima raramente, e bronzeia bastante.
VI	Negra	Não há sensibilidade, nunca queima, e há muita pigmentação.

Fonte: Adaptado de Fitzpatrick, 1988.

A finalidade desse sistema é definir a resposta de tipos diferentes de pele à luz UV por meio de bronzeado e queimadura solar, e não para definir a etnicidade. Portanto, sendo um sistema de classificação baseado na propensão da pele a se tornar hiperpigmentada por estímulo inflamatório e manter essa hiperpigmentação por período prolongado (ALCHORNE; ABREU; 2008).

A classificação do fototipo de pele por Fitzpatrick (FST) tem relevância e confiabilidade limitadas entre pessoas com pele de cor, pois ao longo dos anos indivíduos de um grupo étnico/racial específico se agrupavam em 1 na categoria FST. Assim, Ho e Robinson (2015) desenvolveram uma ferramenta de cores simples e econômica para avaliar o tipo de pele. A ferramenta barra de cores (Figura 2) foi

validada com 2 coortes, consistindo de brancos não hispânicos (NHWs), hispânicos, negros não hispânicos (NHBs) e asiáticos com pele de FST I a VI determinada usando a pesquisa padrão de questionamentos (HO; ROBINSON, 2015).

Na barra de cores, a cor que melhor se aproxima do tom de pele do indivíduo é mensurada na região volar do braço. A barra de cores apresentou correlação linear com o índice de melanina em um grupo etnicamente diverso, e as escalas visuais de cores foram superiores à autoavaliação do fototipo baseado em perguntas (cor da pele, resposta à exposição ao sol), usando a análise espectrofotométrica como referência (GUPTA; SHARMA, 2019).

**Figura 7:** Barra de cores para autoidentificação do tipo de pele



Fonte: Adaptado de Ho e Robinson, 2015.

### 2.3.2. Variações da pele pela idade

As principais variações da pele, são o envelhecimento e o ressecamento da pele, que acontecem de forma natural ao longo da vida afetando tanto o sexo masculino quanto o feminino. No sexo feminino o hormônio estrógeno causa na pele aumento de ácido mucopolissacarídeo e do ácido hialurônico, substâncias importantes para a hidratação da pele. Conforme a idade avança e o período da menopausa aproxima-se, as mulheres perdem gradativamente a quantidade de hormônios no organismo, principalmente o estrógeno, promovendo o ressecamento da pele (PAGANI, 1999).

A pele por ser o órgão mais exposto e superficial, está sujeita a danos causados por fatores externos tais como poluentes, tabagismo, entre outros, que são os principais responsáveis pelo envelhecimento extrínseco. Enquanto, o envelhecimento

intrínseco ocorre principalmente pelo achatamento da junção dermoepidérmica, diminuindo o contato entre a epiderme e a derme. No entanto, a espessura da epiderme permanece a mesma ao longo dos anos, enquanto a da derme, diminui de maneira gradativa após os oitenta anos de idade (ORTOLAN et al., 2013). Outro fator contribuinte é a perda gradual de colágeno com o avanço da idade, que afeta a redução de fibroblastos, a redução de mastócitos, dos vasos sanguíneos e terminações nervosas anormais, resultantes da diminuição da síntese de colágenos I e III, o que ocasiona a redução da adesão das células dérmicas (ORTOLAN et al., 2013).

De acordo com estudos realizados por Varani et al. (2006), a redução na síntese de colágeno ocorre tanto pelo envelhecimento cronológico quanto pelo fotoenvelhecimento. Os autores também relatam que a degradação do colágeno pelas metaloproteinases são reguladas pela radiação UV. A indução repetida destas enzimas por exposição à radiação solar ao longo de anos é responsável pela produção de fragmentação de colágeno na pele mais velha ou danificada pelo sol.

Assim como a idade é um fator interferente na integridade física da pele, o fototipo também está relacionado ao envelhecimento e perda de hidratação da pele. A pele caucasiana envelhecida possui características como profunda desorganização das fibras elásticas e diminuição da expressão de colágeno na derme. As manifestações atróficas na derme estão ligadas ao tipo de pele na população caucasiana, com múltiplas telangiectasias (capilares sanguíneos dilatados abaixo da superfície da pele) na pele levemente pigmentada e elastose solar (atrofia por destruição das fibras colágenas e fibras elásticas) em pele mais escura (RAWLINGS, 2006; LOBER, 2010).

Além da perda de elasticidade e volume, os sinais mais comuns de envelhecimento da pele e o fotoenvelhecimento, são diminuição do número de melanócitos, despigmentação e alterações na distribuição de pigmentos em todos os tipos de pele. O processo de envelhecimento e os danos causados pelo sol são determinados pelas diferenças estruturais e funcionais observadas entre a luz (tipos I a II) e a pele escura (tipos III a VI). A pele mais escura, apesar de ser mais resistente a rugas, é caracterizada pela despigmentação mais pronunciada, abrangendo a hipopigmentação e hiperpigmentação (VASHI, 2016).

Na pele oriental e asiática a principal manifestação do fotoenvelhecimento é a alteração na distribuição de pigmentos, caracterizada por hiperpigmentação e

aumento do índice de melanina com a idade (GALZOTE, 2013). Além disso, estudos populacionais de mudanças relacionadas à idade apontam que, embora a distribuição irregular do pigmento seja mais prevalente na pele oriental e asiática, o dano solar e o início do aparecimento de rugas são significativamente retardados em comparação à pele caucasiana, que poderia estar correlacionada com os níveis de antioxidantes no sangue (NOUVEAU-RICHARD, 2005; PERNER, 2011).

## **2.4. Métodos Analíticos de Quantificação do NMF**

Embora muitos métodos bioanalíticos *in vivo* para a avaliação da hidratação do EC tenham sido descritos, incluindo Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, Infravermelho e Espectroscopias Raman, os métodos mais frequentemente aplicados são baseados na medição de condutância elétrica, impedância ou capacitância. Estes são indicadores indiretos de teor de água no EC (EDWARDS, MARKS, 2005; RAWLINGS, HARDING, 2004; DARLENSKI et al., 2009).

A base teórica dos dispositivos que usam medições de capacitância é a diferença entre a constante dielétrica da água e de outras substâncias levados para o campo de medição elétrica. A baixa frequência de operação (40-75 Hz) da sonda a torna sensível a mudanças constantes dielétricas de material colocado em contato com a superfície do eletrodo e, portanto, alterando a intensidade de campo. A constante dielétrica do EC é dependente do seu teor de água, permitindo assim que diferentes valores de capacitância sejam detectados dependendo do estado de hidratação da pele (DARLENSKI et al., 2009).

As sondas medem a hidratação da pele através de evaporimetria por meio de diferentes técnicas como: método de câmara não ventilada (fechada), método de câmara ventilada e um método usando uma câmara aberta. As sondas de câmara aberta baseiam-se na lei de difusão de Fick, indicando a quantidade de água transportada por uma área definida por um determinado período (FLUHR et al., 2016; DARLENSKI et al., 2009). Em geral, existe uma correlação entre a hidratação EC e os valores de TEWL, em que TEWL inferior (função de barreira epidérmica intacta) se correlaciona com estado de hidratação do EC (FLUHR et al., 2001).

A técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para a análise de proteínas e aminoácidos passou a ser empregada há mais de 40 anos e propiciou

aplicações rápidas, reprodutíveis e, em alguns casos, mais sensíveis do que as técnicas já acima citadas (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008). Um dos equilíbrios mais utilizados na CLAE é a troca iônica, para análise de aminoácidos, onde o processo de separação ocorre por troca de íons de mesmo sinal entre uma fase móvel e uma fase estacionária (ARAÚJO, 2007; BURTIS, BRUNS, 2015). Este método fornece excelente separação e reprodutibilidade, com preparação mínima da amostra.

Uma grande vantagem do sistema de CLAE para análise de proteínas e aminoácidos é o seu custo operacional, no qual uma coluna de fase reversa e um detector de fluorescência são suficientes. No entanto, uma desvantagem seria que a maioria dos derivados utilizados na preparação das amostras não reage quantitativamente da mesma forma com todos os aminoácidos (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008). No entanto, a técnica de CLAE não apresenta metodologias na literatura para quantificação dos principais componentes do NMF tais como PCA e UCA, e nem mesmo nas monografias farmacopeicas.

Métodos bioanalíticos para se aplicar a matrizes biológicas, muitas vezes requerem cuidados especiais como a utilização de pré-coluna, além disso, alguns solventes são instáveis e inaplicáveis ao PCA, uma vez que não reagem com aminas terciárias. Reagentes voláteis na fase móvel, melhoram a separação de aminoácidos em colunas C18 a base de sílica de fase reversa, além de aumentarem o sinal no detector de aminoácidos e melhoram a forma do pico. Muitos estudos descrevem inúmeras tentativas realizadas para desenvolver um método analítico para determinar PCA (MARSTEIN; JELLUM; ELDJARN, 1973) e UCA (HERMANN; ABECK, 2001) em EC. No entanto, o método bioanalítico para PCA não foi totalmente validado para nosso melhor conhecimento. Para a análise de UCA, foram utilizados reagentes de pares de íons como heptassulfonato de sódio ou derivatização com cloreto de dansilo, mas observaram dificuldades na estabilização da coluna e preparação da amostra. Além disso, o reagente de derivatização pode reagir com outros aminoácidos e aminas nas amostras biológicas, exigindo longos tempos de execução cromatográficos para a separação adequada dos analitos. Mais importante ainda, esses métodos têm baixa especificidade e baixa sensibilidade.

Em um estudo de desenvolvimento analítico utilizando o método LC-MS/MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas), demonstrou-se altamente sensível e seletivo para a análise de PCA e *cis/trans*-UCA nas amostras de EC obtidas através da técnica de *tape stripping* com fita adesiva, usando

Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC). O HILIC é empregado para a análise de analitos altamente polares que são difíceis de reter e separar com HPLC de fase reversa (DEJAEGHER; MANGELINGS; VANDER HEYDEN, 2008). O HILIC tem apresentado aumento na eficiência da ionização através de uma alta proporção de solventes orgânicos na fase móvel, como a acetonitrila. A extração utilizando tampão PBS demonstra-se eficaz e suficiente para a extração e preparação da amostra de EC (JOO et al., 2012).

## **2.5. Técnica *tape-stripping***

Nos últimos anos pesquisadores iniciaram estudos da pele através de uma técnica minimamente invasiva utilizando fita adesiva em tiras, *tape stripping* (STS), para determinar o perfil epidérmico, proteico e lipídico da pele. Anteriormente esses estudos eram realizados através da biópsia da pele, e atualmente com a técnica de STS é possível avaliar a penetração epidérmica, assim como a expressão de genes específicos da pele, lipídios e proteínas do EC (BERDYSHEV et al., 2018; DI NARDO et al., 2016; DYJACK et al., 2018; KEZIC et al., 2011; LI et al., 2017; MCALEER et al., 2018).

O *tape stripping* é uma técnica comum empregada em estudos clínicos e *in vitro* da pele. É um procedimento simples que utiliza uma tira adesiva para remover as camadas do EC, que compreende a camada mais superficial da pele, em uma área predeterminada da pele. A remoção consecutiva do EC, camada por camada permite que esse método avalie e examine diferentes camadas da pele (KLANG et al., 2012; LADEMANN et al., 2009). Portanto, possuem aplicações importantes na pesquisa científica, como o estudo das propriedades do EC, para determinação do perfil de penetração de ativos, em estudos de permeação de aplicações tópicas e transdérmicas, entre outros (ALSHEDDI; ANANTHAPADMANABHAN; LI, 2019).

Muitos fatores podem afetar a remoção do EC, como a hidratação, a colorimetria da pele e a técnica do pesquisador em extrair a fita (ZHU et al., 2016). Um fator intrínseco que afeta a retirada da fita é a presença de sulcos na superfície da pele, pois a superfície do EC contém sulcos e depressões de diferentes profundidades, que quando não são expostos a fita, causam remoção desigual e afetam a quantificação. Embora estudos anteriores tenham conhecimento dos sulcos



da pele, a extensão dos materiais que podem ficar presos nos sulcos da pele e seu impacto nos estudos de permeação da pele não foram identificados e quantificados (ALSHEDDI; ANANTHAPADMANABHAN; LI, 2019).

O método de STS tem várias vantagens sobre a pele, não é um procedimento invasivo, não causa cicatrização, não é doloroso e apenas uma pequena irritação da pele é observada durante a coleta de amostra da pele. É um método confiável para examinar a expressão dos marcadores de diferenciação e podem ser utilizados para análises de diferenciação em vários distúrbios da pele. O procedimento STS pode ser útil para ensaios clínicos que examinam a função de barreira em resposta à terapia. Além do baixo custo, que permite a coleta de amostras em várias coortes, em vários grupos etários, incluindo bebês, sendo um bom procedimento padrão para avaliar marcadores de diferenciação epidérmica do EC e do estrato granular superior da epiderme (KIM et al., 2016, MCALEER et al., 2018).

### **3. OBJETIVOS**

A proposta do projeto de pesquisa compreendeu a determinação das substâncias do NMF (Fator de Hidratação Natural) do estrato córneo (EC) humano, obtido por meio da técnica de *tape stripping* de participantes da pesquisa.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

- Aplicação da técnica de *tape stripping* para extração do estrato córneo (EC) dos participantes.
- Quantificação das substâncias químicas que compõem o NMF, tais como: Histidina (His), ácido pirrolidona-carboxílico (PCA), os isômeros do ácido urôcanico (UCA), sendo *trans*-UCA e *cis*-UCA, por meio da técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).
- Avaliar os níveis dos compostos do NMF em função do fototipo e idade, antes e após a irradiação UV.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Substâncias químicas de referência, fita adesiva e água

- Ácido pirrolidona carboxílico (PCA) grau de pureza de 99% - Sigma Aldrich®.
- 4-*Imidazoleacrylic acid* (*trans*-ácido urôcanico (UCA)) grau de pureza 99% - Sigma Aldrich®.
- Histidina (L-histidina, His) grau de pureza 99% - Sigma Aldrich®.
- Fita adesiva Mágica 810 3M™ Scotch®.
- Água Milli-Q Millipore Merck®.

#### 4.1.2. Solventes e reagentes

##### Reagentes grau de pureza cromatográfico

- Acetonitrila - Honeywell®.
- Metanol - Merck®.
- Trietilfosfato de amônio (TEAP) - Sigma Aldrich®.
- Ácido Clorídrico (HCl) - Sigma Aldrich®.

##### Reagentes grau de pureza analítica (P.A)

- Ácido acético glacial - Synth®.
- Fosfato de potássio monobásico - Synth®.
- Hidróxido de sódio - Synth®.

#### 4.1.3. Equipamentos, aparatos e acessórios

- Agitador de tubos modelo Vortex Genius 3 IKA®.
- Agitador magnético com chapa de aquecimento modelo C-MAGHS7 IKA®.
- Balança analítica modelo AUX220 Shimadzu®.
- Banho Ultrassônico com Aquecimento SSBu SolidSteel®.
- Bomba de vácuo modelo Maximadry Fischer Scientific®.
- Câmara de fostoestabilidade Suntest Atlas® CPS+.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência modelo LC20AD/T Shimadzu<sup>®</sup>; bomba modelo LC20AD/T Shimadzu<sup>®</sup>; amostrador modelo SIL-20AHT Shimadzu<sup>®</sup>; detector de arranjo de diodos (DAD) modelo JPD-M20A Shimadzu<sup>®</sup>; forno de coluna modelo CTO-20 Shimadzu<sup>®</sup>; coluna C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) Shimadzu<sup>®</sup>.
- Filtro de celulose MF 0.45 µm Millipore Merck<sup>®</sup>.
- Filtros de seringa Millex-GV PVDF 0.22 µm Merck<sup>®</sup>.
- Filtros de seringa Captiva Nylon 0.22 µm Agilent<sup>®</sup>.
- pHmetro modelo Q400AS Quimis<sup>®</sup>.
- Sistema de purificação de água modelo OS10LX Gehaka<sup>®</sup>.
- Sistema de purificação de água Milli-Q Simplicity modelo Ultrapure Water Type 1 Millipore Merck<sup>®</sup>.
- Programas computacionais: ChemDraw<sup>®</sup>; LabSolution Shimadzu<sup>®</sup>; Minitab 18<sup>®</sup>. Excel<sup>®</sup>.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Quantificação de His, PCA e UCA por CLAE

#### 4.2.1.1. Condições cromatográficas

A quantificação (µg/mL) dos componentes do NMF, histidina (His), ácido pirrolidona-carboxílico (PCA), *trans*-ácido urocânico (*t*UCA) e *cis*-ácido urocânico (*c*UCA), foi realizada por meio do sistema de CLAE Shimadzu<sup>®</sup> Prominence. Os dados obtidos foram analisados pelo programa LC-Solution<sup>®</sup> Multi-PDA.

A fase móvel foi constituída por trietilfosfato de amônio (TEAP) 0,01M (com valor de pH 3,0± 0,05 corrigido com ortofosfórico concentrado) e acetonitrila na proporção 98:2 (v/v), e fluxo de 1,0 mL/min (HERMANN, 2001). A coluna utilizada foi de fase reversa C18 (4,6 mm x 25,0 cm). A detecção foi obtida no comprimento de onda de 210 nm para PCA e His, e a 268 nm para UCA, à temperatura de 30,0 ± 1,0°C em detector do tipo DAD (KEZIC et al., 2009; KOPPEs et al., 2017). As amostras foram injetadas no volume de 20,0 µL.

#### 4.2.1.2. Solução padrão

Para o preparo da solução padrão foram pesados 25,0 mg de His, PCA e tUCA (substâncias químicas de referência), dissolvidos em água ultrapurificada (USP, 2019) em balão volumétrico de 25 mL. Dessa solução mãe, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com água ultra purificada e a partir dessa solução foram transferidas alíquotas de 0,2 a 1,0 mL para balões de 10 mL, obtendo-se concentrações de 1,0 a 100 µg/mL de His, PCA e UCA, respectivamente.

#### **4.2.1.3. Curva analítica e linearidade**

A curva analítica foi construída a partir das substâncias químicas de referência em solução em água ultrapurificada, como descrito no item 6.3.3. As concentrações de His, PCA e UCA utilizadas para a obtenção da curva foram: 1,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/mL.

No equipamento de CLAE foram injetados 20,0 µL de cada solução, obtendo-se as respectivas áreas do pico e a partir dessas foram construídas as curvas de calibração e os resultados foram utilizados para avaliação da regressão linear.

A partir das curvas de calibração foram calculados o erro padrão da estimativa e o coeficiente de correlação de Pearson. Os cálculos das retas foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados. Para avaliar a distribuição da variância foi aplicado um teste para avaliar a homocedasticidade do método, com teste F (distribuição de Snedecor) dentro de um intervalo de confiança de 95%.

A linearidade foi construída a partir dos 07 níveis da curva de calibração em triplicata, a fim de obter as respectivas concentrações (BRASIL, 2012). As mesmas condições foram utilizadas para determinação da precisão, sendo expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 5% (VOEGELI et al., 2007).

Os limites de detecção e quantificação foram construídos a partir dos 07 níveis de diluição em concentrações decrescentes. No caso do método instrumental de CLAE, a estimativa do limite de detecção será feita com base na relação de 10 vezes o sinal ruído da linha de base (BRASIL, 2012; USP, 2019).

A linearidade foi avaliada a partir da construção da curva de calibração, em representação gráfica das respostas em função da concentração através da equação

da reta de regressão linear de  $y$  em  $x$ , estimada pelo MMQ (Método dos Mínimos Quadrados) (USP, 2019). Por se tratar de um método bioanalítico, foram utilizados vários pontos para construção da curva de calibração: amostra (solução teste), o ponto mais baixo da curva (matrizado), o ponto central da curva (matrizado) e o ponto mais alto da curva (matrizado) (BRASIL, 2012).

#### 4.2.1.4. Avaliação do Limite de Quantificação

O limite de quantificação estimado foi determinado de acordo com os critérios da RDC N°166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017), como mostra a Equação 1:

$$LQ = 10 \frac{\delta}{S}$$

Onde:

$\delta$  = desvio padrão das respostas;

$S$  = coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2017).

#### 4.2.1.5. Avaliação do Limite de Detecção

O limite de detecção foi calculado a partir dos parâmetros da curva analítica, de acordo com a Equação 2:

$$LD = \frac{3,3s_*}{\hat{\beta}_1}$$

Em que:

$\hat{\beta}_1$  = inclinação da curva de calibração.

$s_*$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da triplicata das curvas analíticas construídas a partir das concentrações do analito próximas ao limite de quantificação.

#### 4.2.1.6. Pesquisa de Interferentes

A pesquisa de interferentes no método analítico é dado pelo parâmetro de seletividade, demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na

amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz, sendo estes os interferentes.

O método deve se mostrar apto para distinguir com precisão o analito de interesse dos outros possíveis interferentes presentes na amostra. Assim, para determinar a seletividade, a RDC N<sup>o</sup>166 de 24 de julho de 2017 recomenda injetar uma amostra branco e um solução padrão a fim de comprovar se a amostra não possui interferentes com o mesmo tempo de retenção das substâncias em estudo. Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a ausência de interferência é comprovada por meio da pureza de pico (BRASIL, 2017).

### **4.3. Ensaio *ex vivo***

#### **4.3.1. Critérios de inclusão e exclusão**

Os critérios de inclusão dos participantes foram idade acima de 18 anos, ambos os gêneros e fototipo da pele entre I a VI, de acordo com a classificação de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988). Os voluntários foram entrevistados e a exclusão para o estudo foi automática nas condições de gravidez ou lactação, administração de medicamentos anti-inflamatórios, patologias dermatológicas em geral, irregularidades superficiais da pele e participação prévia em estudos *ex vivo* ocorrido no intervalo inferior a três meses (KOPPES et al., 2017).

#### **4.3.2. Aspectos legais e éticos**

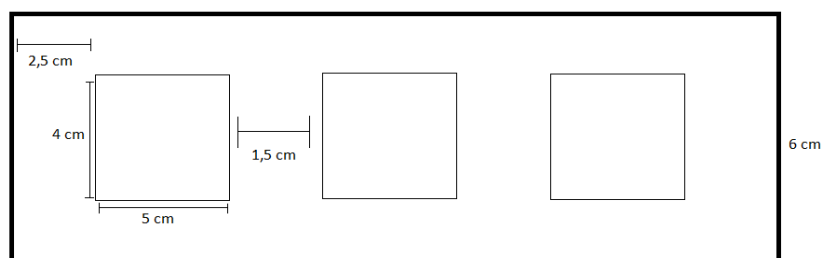
O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O estudo foi realizado de acordo com a Legislação Brasileira vigente, baseada na Resolução Normativa 196/96, CNS/MS, normas da *International Conference Harmonization* (ICH), *Good Clinical Practice* (GCP) e a Declaração de Helsinque. Aos participantes da pesquisa foram fornecidas todas as informações, instruções e esclarecimentos necessários referentes ao ensaio, tais como etapas do estudo, objetivos, possíveis riscos ou desconforto. O consentimento ocorreu por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), mantendo-se o anonimato do participante

e garantindo a sua saída voluntária da investigação a qualquer momento (BRASIL, 2012).

#### 4.3.3. *Tape stripping* e extração do estrato córneo (EC)

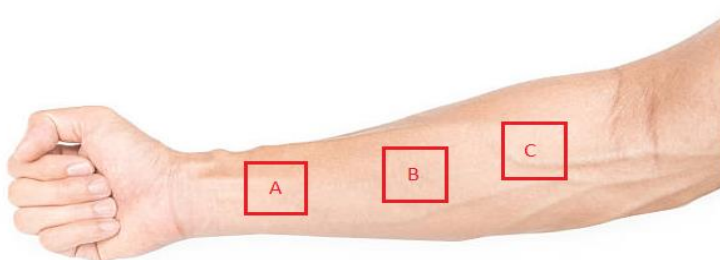
O *tape stripping* é uma técnica *ex vivo* utilizada para análise e avaliações das propriedades do EC (MCALEER et al., 2018). Os antebraços direito e esquerdo dos participantes foram previamente higienizados antes do início da extração. Foram demarcados sítios de 4x5 cm com auxílio do gabarito ilustrado na Figura 3, e os sítios demarcados foram devidamente codificados de acordo com a Figura 4.

**Figura 8:** Gabarito para demarcação dos sítios no antebraço dos participantes.



Fonte: próprio autor, 2019.

**Figura 9:** Codificação atribuída aos sítios nos antebraços dos participantes.



Fonte: próprio autor, 2019.

##### 4.3.3.1. Preparação das amostras

As amostras foram extraídas a partir das fitas adesivas do *tape stripping*. Em tubos do tipo Falcon as fitas foram acidificadas em ácido clorídrico 0,001N (HCl) , em seguida adicionados 5,0 mL da solução de HCl 0,001N. Promoveu-se agitação por 60



segundos em agitador de tubos para a extração dos componentes do NMF (His, PCA e *trans*-UCA) do EC coletados dos voluntários, seguido de agitação em banho ultrassônico por 20 minutos. Dessa solução, foi transferida uma alíquota de 1,5 mL para *vials*, previamente filtrados em filtros de seringa 0,22 µm, para análise cromatográfica. As fitas, na presente investigação, foram irradiadas em simulador Atlas Suntest® CPS+ com lâmpada de xenônio (1500 W) e filtro responsável por simular a radiação solar, permitindo a passagem de comprimentos de onda acima de 290 nm; com a dose de 2753 KJ/m<sup>2</sup> (HERMANN; ABECK, 2001; KOPPES et al., 2017).

#### **4.3.4. Análise estatística**

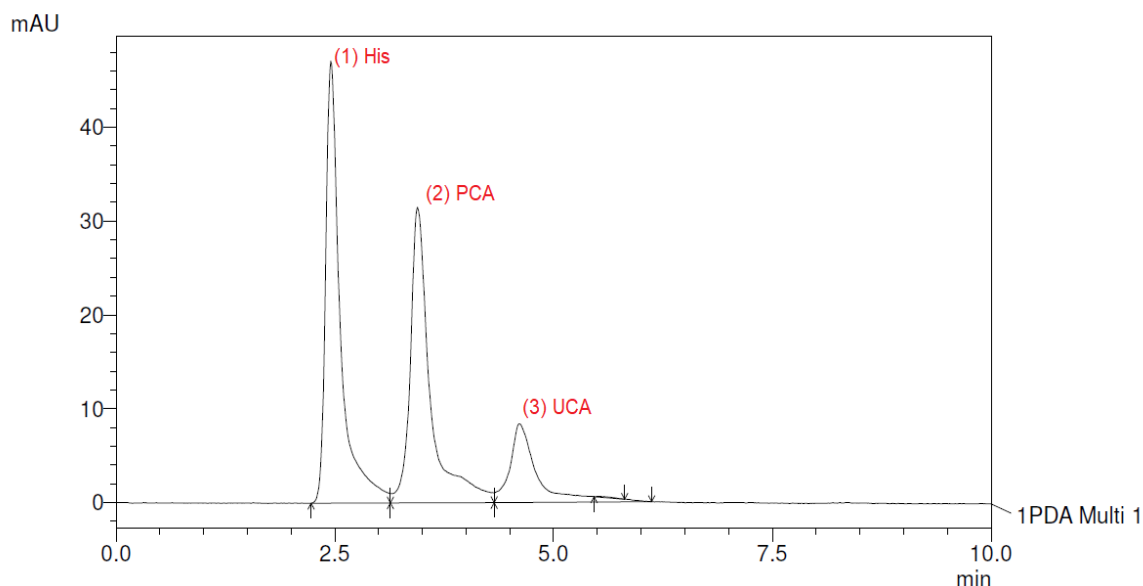
Tratamentos estatísticos foram realizados utilizando-se os programas Minitab 1.8® e Excel®.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Curva Analítica

A Figura 10 ilustra o cromatograma dos padrões da histidina (His), ácido pirrolidona-carboxílico (PCA) e *trans*-ácido urocânico (*t*UCA). Os tempos de retenção citados na literatura, nas mesmas condições cromatográficas foram obtidos nesse experimento e são de aproximadamente  $2,68 \pm 0,2$  min para His com leitura em 210 nm;  $4,87 \pm 0,3$  min para *t*UCA, com leitura em 268 nm (HERMANN, 2001); e  $3,76 \pm 0,2$  min para PCA, com leitura em 210 nm (KOPPES, 2017; KEZIC 2009).

**Figura 10:** Cromatograma dos padrões (1) His, (2) PCA e (3) *t*UCA.



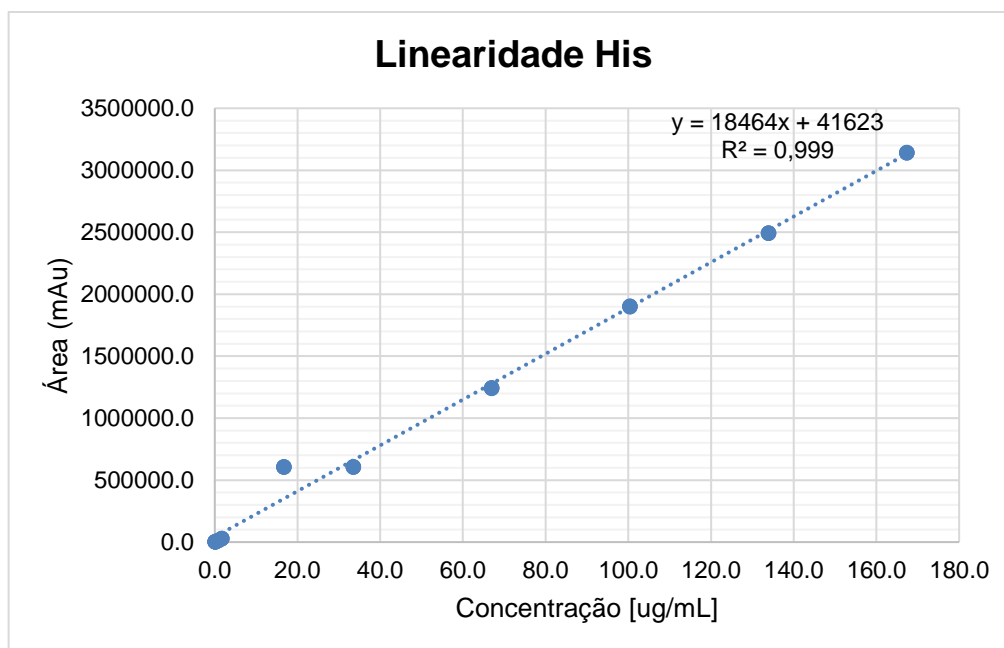
Legenda: Coluna cromatográfica C18 (150 nm X 4,6 nm X 3  $\mu$ m) Shimadzu®. Fase móvel – perclorato de tetraetilamônio 0,01 M (TEAP): acetonitrila (ACN) (98:02 v/v). Fluxo 1,0mL/min. Detecção 210-268 nm.

Fonte: LabSolution Shimadzu®, 2019.

As curvas analíticas para His, PCA e *trans*-UCA estão ilustradas nas Figuras 11, 12 e 13. Os coeficientes de correlação ( $p$  de Pearson) para His, PCA e *trans*-UCA foram, respectivamente,  $p=0,999$ ;  $p=0,998$ ;  $p=0,999$ . Em porcentagem, após o modelo de reajuste, o  $R^2$  ajustado obtido para His foi de 99,35%, para PCA foi de 99,50% e, para *trans*-UCA, foi 99,45%, indicando que o modelo ajusta bem os dados.  $R^2$  é uma medida estatística, que aponta o quão próximos os dados estão da linha de regressão. O  $R^2$  ajustado é uma versão transformada do  $R^2$ , tratada para o número de preditores

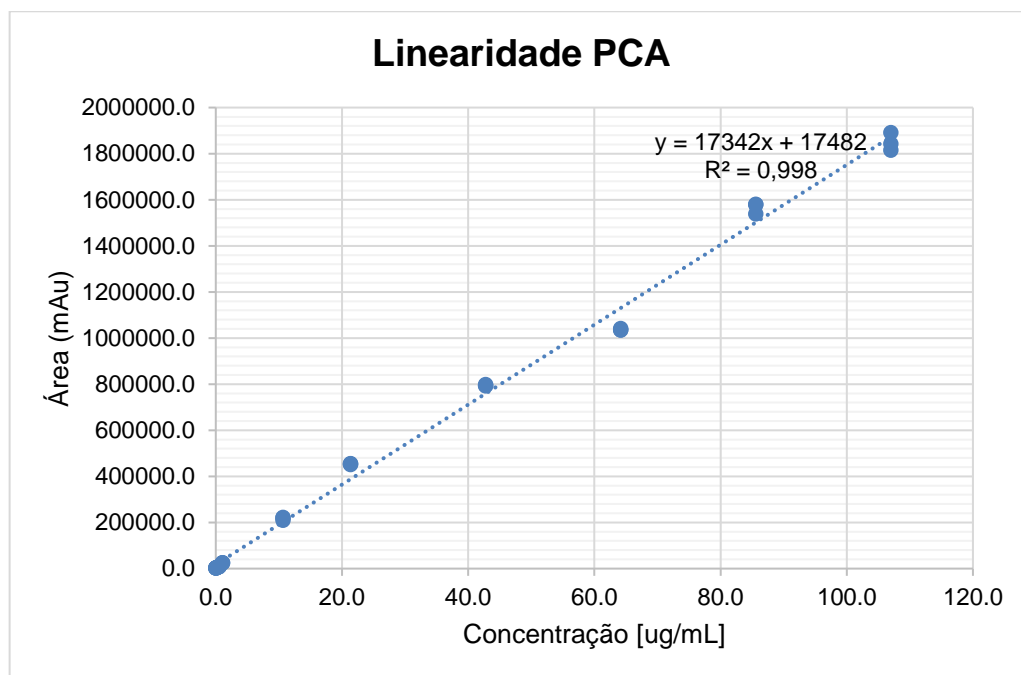
no modelo de forma a aproximar os pontos da linha de regressão e diminuir os *outliers*. O  $R^2$  ajustado melhora o modelo mais do que seria esperado pelo acaso (MORETTIN, 2010).

**Figura 11:** Curva analítica da histidina (His) com modelo ajustado.



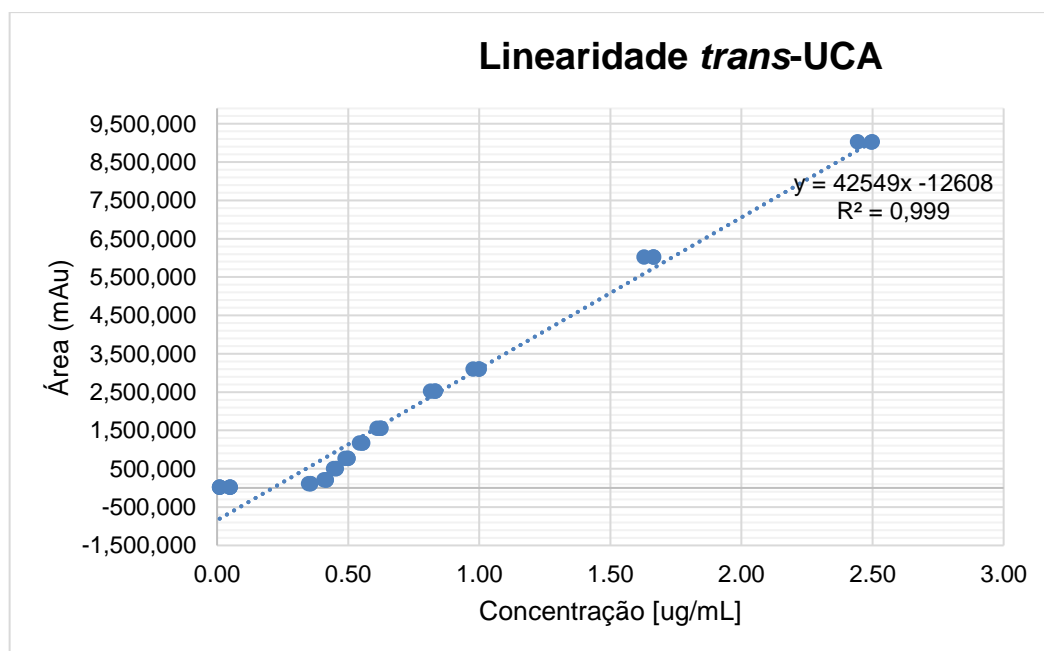
Legenda: Equação da reta:  $Y = \alpha X + \beta$ . Y= variável que o modelo tentará prever (concentração mg/mL).  $\alpha$ = interceptação da reta com o eixo vertical. X= área do pico do cromatograma.  $\beta$ = coeficiente angular.  $R^2$ = coeficiente de determinação.

**Figura 12:** Curva analítica do ácido pirrolidona-carboxílico (PCA) com modelo ajustado.



Legenda: Equação da reta:  $Y = \alpha X + \beta$ . Y= variável que o modelo tentará prever (concentração mg/mL).  $\alpha$ = interceptação da reta com o eixo vertical. X= área do pico do cromatograma.  $\beta$ = coeficiente angular.  $R^2$ = coeficiente de determinação.

**Figura 13:** Curva analítica do *trans*-ácido urocânico (tUCA) com modelo ajustado.



Legenda: Equação da reta:  $Y = \alpha X + \beta$ . Y= variável que o modelo tentará prever (concentração mg/mL).  $\alpha$ = interceptação da reta com o eixo vertical. X= área do pico do cromatograma.  $\beta$ = coeficiente angular.  $R^2$ = coeficiente de determinação.

Para obter linearidade, há a medida para o grau de correlação linear entre duas variáveis numéricas. Essa medida é o coeficiente de correlação de Pearson, que se representa por  $r$  e varia entre -1 e + 1. De acordo com os coeficientes de relação ( $\rho$  de Pearson) obtidos das curvas analíticas, que se apresentaram  $p > 0,99$ , verificou-se que a linearidade se apresentou em correlação positiva ( $r \approx 1$ ). A correlação positiva entre duas variáveis demonstra que essas crescem no mesmo sentido, no entanto, não indica que aumentos sucessivos em uma das variáveis promovem aumentos sucessivos na outra. Nas ciências biológicas e da saúde, os coeficientes de correlação tendem a ser menores que a unidade, devido à variabilidade dos fenômenos biológicos (VIEIRA, 2011). A equação da reta é dada por  $Y = a + bX$  e equações para His, PCA e UCA estão descritas na Tabela 2 (MORETTIN, 2010; VIEIRA, 2011).

**Tabela 2:** Equação da reta e Coeficiente de Correlação de Pearson ( $r$ ) dos compostos His, PCA e tUCA, calculada a partir da equação da reta

Compostos	Equação da reta	Coeficiente de Correlação de Pearson ( $r$ )
His	$Y = 18464x + 41623$	0,999
PCA	$Y = 17342x + 17482$	0,998
tUCA	$Y = 42549x + -12608$	0,999

Legenda: Equação da reta:  $Y = \alpha X + \beta$ .  $Y$  = variável que o modelo tentará prever (concentração mg/mL).  $\alpha$  = interceptação da reta com o eixo vertical.  $X$  = área do pico do cromatograma.  $\beta$  = coeficiente angular.

Fonte: próprio autor, 2020.

## 5.2. Limite de Detecção

O limite de detecção é determinado como a menor quantidade do analito presente em uma amostra, no qual pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado. É a concentração de analito mais baixa que pode ser detectada de forma confiável em nível do ruído do sistema, porém, não necessariamente quantificado na concentração em que um valor medido for maior que a incerteza (BRASIL, 2017). Os limites de detecção para PCA, tUCA e His foram, respectivamente, 0,0015  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,0018  $\mu\text{g/mL}$ ; e 0,0015  $\mu\text{g/mL}$ .

### **5.3. Limite de quantificação**

Limite de quantificação (LQ) é o parâmetro analítico que é definido como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. González (2010) define o LQ como a mais baixa concentração de analito, determinada quantitativamente (GONZÁLEZ et al., 2010). A partir da Equação 1, os LQs para His, PCA e UCA foram, respectivamente, 0,017 µg/mL; 0,011 µg/mL; e 0,010 µg/mL. Tais concentrações foram consideradas adequadas para o método, pois são os pontos inferiores das curvas analíticas.

### **5.4. Pesquisa de Interferentes**

A pesquisa de interferentes é dada por meio do parâmetro de seletividade. A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas e componentes da matriz (BRASIL, 2017). As amostras não apresentaram interferentes da fita adesiva no tempo de retenção dos analitos, demonstrando que o método foi seletivo.

### **5.5. Ensaio *ex vivo***

Para que pesquisa seja realizada, seja *in vivo* ou *ex vivo*, é necessário que os participantes sejam esclarecidos em relação ao objetivo e ao método do estudo. Após, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP. O TCLE foi lido em voz alta antes de sua assinatura. Foram selecionados somente participantes hábeis a desempenharem cada protocolo da pesquisa e a compreender todas as etapas envolvidas no processo. Vinte participantes foram incluídos nessa investigação. Os mesmos não estavam em uso de medicação sistêmica e local, e não haviam exposto a pele à radiação UV solar ou artificial por três meses antes do estudo. Os participantes tinham faixa etária de 18 a

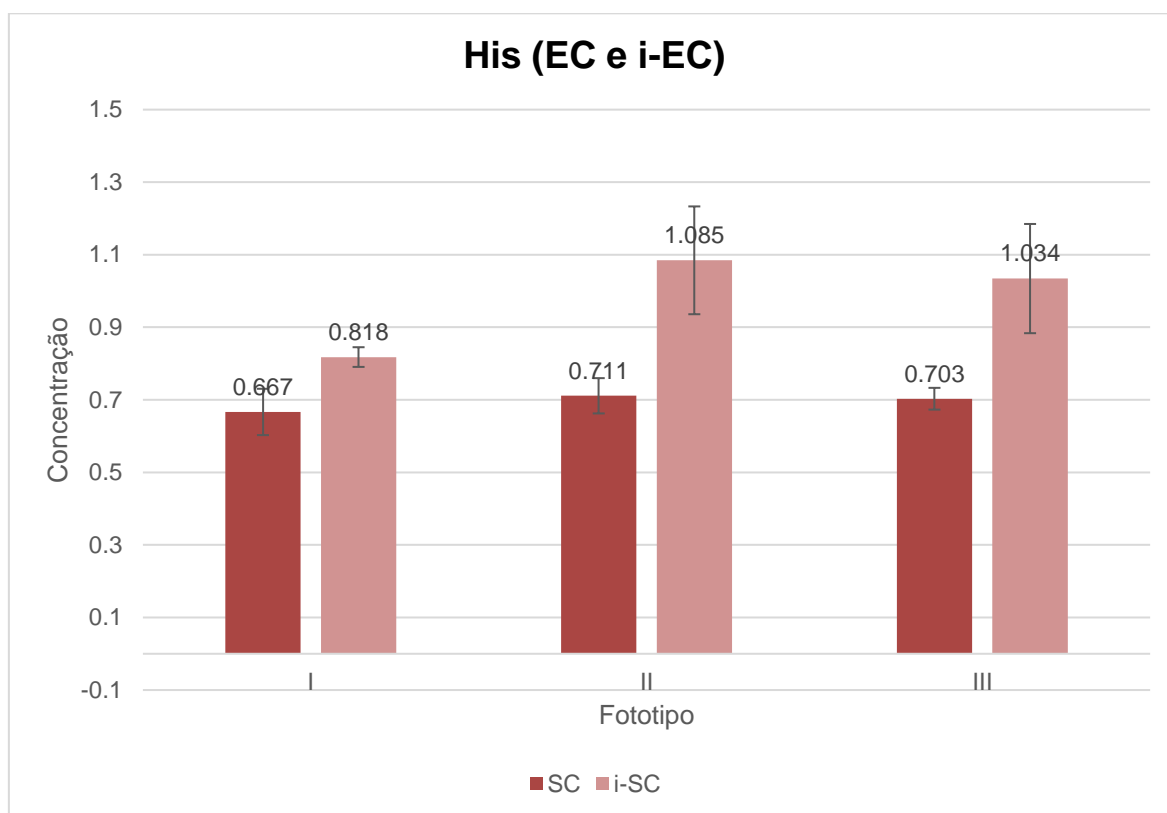
55 anos, sendo dezesseis do sexo feminino e quatro do sexo masculino. O fototipo de pele foi de I ao V, de acordo com a classificação de FTS.

A coleta do EC foi realizada por meio da técnica de *tape stripping*, com obtenção de 10 fitas da região volar do antebraço, conforme gabarito ilustrado nas Figuras 7 e 8. O procedimento de extração dos compostos de interesse foi direto e não invasivo. A fita adesiva foi composta por acetato de celulose e adesivo acrílico, de acordo com informações da rotulagem das mesmas, e permitiu a obtenção do EC e a remoção compostos do mesmo. Posteriormente, estes foram analisados em CLAE e as amostras apresentaram cromatogramas com picos no tempo de retenção de  $\approx 4,5$  min, indicando a presença do *tUCA* e no tempo de retenção de  $\approx 5,5$  min, o *cUCA* (HERMANN, 2001). O composto His apresentou picos no cromatograma no tempo de retenção de  $\approx 2,6$  min, e o composto PCA apresentou tempo de retenção de  $\approx 3,5$  minutos (HERMANN, 2001; KOPPES, 2017). Por meio dos resultados acima descritos, os compostos de interesse dessa pesquisa foram positivamente correlacionados com as substâncias de referência utilizadas para a realização do método e curvas analíticas.

### **5.5.1. Fototipo**

A Figura 14 ilustra a concentração do composto His presente nas amostras do EC antes e após a irradiação, nos fototipos de pele I, II e III.

**Figura 14:** Concentração do composto His no EC irradiado ou não em fototipos de I a III.



Legenda: SC (Estrato Córneo). i-SC (Estrato Córneo Irradiado).

Fonte: Próprio autor, 2022.

O estrato córneo não irradiado apresentou níveis menores de His em relação ao irradiado. Este comportamento ocorre, pois, a His desempenha importante função para a síntese dos NMF  $\alpha$ UCA e  $\gamma$ UCA, no qual são produzidos a partir da quebra de His pela His amônia-liase (HAL). Quando há estímulos da radiação, ocorre acúmulo de His no EC e, conseqüentemente, há aumento nos níveis de His. A quebra de His é importante para a proteção da pele da irradiação UV, pois mantém os níveis de  $\alpha$ UCA e  $\gamma$ UCA (TOSATO et al., 2015).

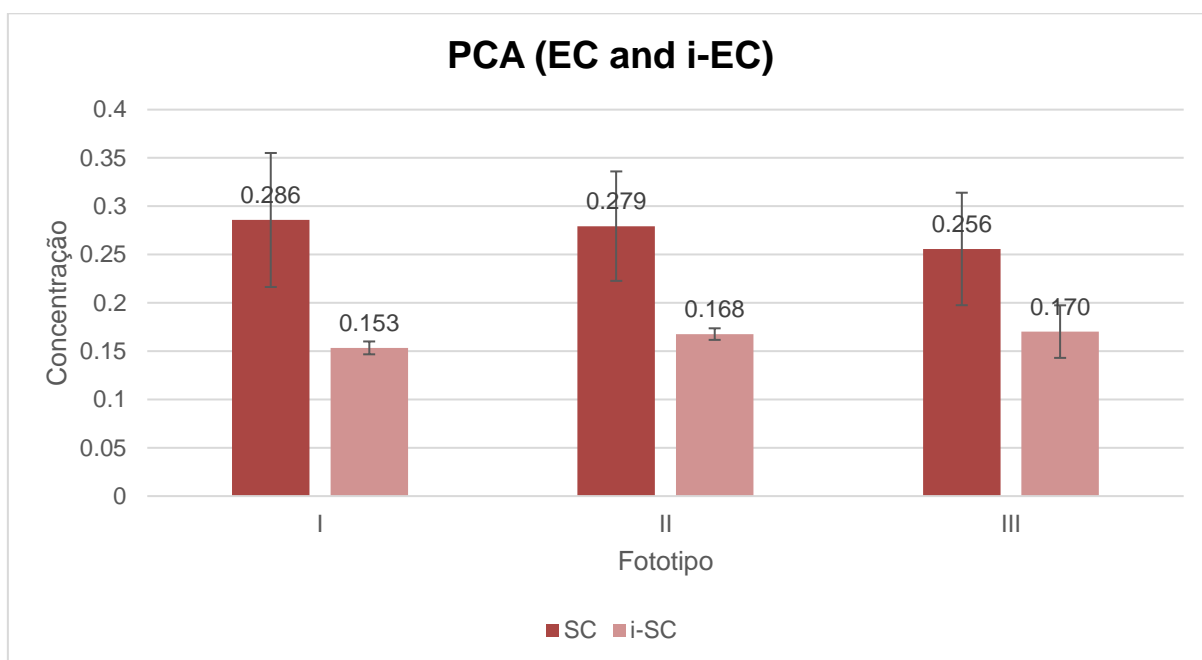
No fototipo I, os níveis de His foram inferiores quando comparados com os demais fototipos, no entanto quando comparados os valores de EC não irradiado e irradiado no fototipo I, houve aumento de 9,0% ( $\delta < 0,4$ ;  $p > 0,05$ ) nos valores de não irradiado. Quando comparado os valores de EC irradiado do fototipo I para o fototipo II houve aumento de 3,2% ( $\delta < 1,9$ ;  $p > 0,05$ ). Entre os fototipos II e III a diferença foi de 6,5% ( $\delta < 0,3$ ) no não irradiado e de 1,4% ( $\delta < 0,7$ ). A pele com baixo valor do fototipo, sendo sensível à radiação UV, é composta por quantidade menor de melanina, o que



aumenta o risco da inflamação causada por raios UV. Há, também, diminuição da razão eumelanina-feomelanina (EPR), responsável pela sensibilidade da pele. Tais propriedades explicariam por que as peles de fototipo I são menos resistentes a queimaduras solares (DIAS-FERREIRA et al., 2020). Na pele caucasiana, a hidratação do EC pode ser menor, pois os níveis de NMF podem ser mais reduzidos, como encontrados nessa investigação, porém, quando foto expostos, alguns dos componentes tendem a aumentar, como a His, que é sintetizada pela FLG degradada, e contribuem para a hidratação epidérmica. Com a exposição aos raios UV, principalmente UVB, a sensibilidade aumenta, pois, há deficiência na produção de proteínas que mantêm a função de barreira epidérmica do EC (HOSTE et al., 2011).

A Figura 15 ilustra a concentração do PCA presente nas amostras de EC, antes e após a irradiação. O PCA é um dos principais componentes utilizado como indicador para determinar os níveis de NMF presente no EC. Os níveis de PCA estão relacionados com o nível de água no interior do EC, pois a água é que induz a atividade enzimática na produção dos componentes do NMF, principalmente o PCA. Portanto, quanto maior a quantidade de água, maior será a produção de PCA, e por conta desse processo, é considerado o principal marcador para indicar o nível de hidratação da pele (GUNNARSSON et al., 2021).

**Figura 15:** Concentração do composto PCA no EC irradiado ou não em fototipos de I a III.



Legenda: SC (Estrato Córneo). i-SC (Estrato Córneo Irradiado).

Fonte: Próprio autor, 2022.

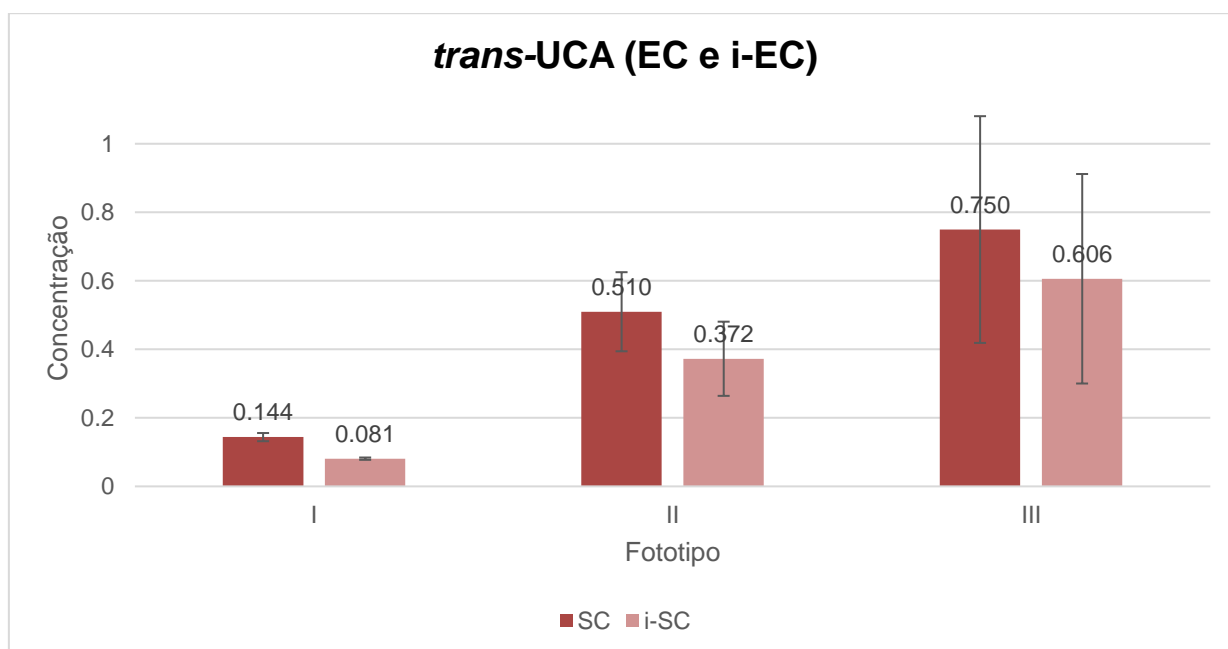
Nas amostras, os níveis de PCA diminuiram 66,9% ( $\delta < 0,2$ ) após a irradiação artificial (BOUWSTRA et al., 2008). A irradiação da pele provoca redução da sua quantidade de água, que pode ocasionar alterações nos lipídios superficiais e, conseqüentemente, na hidratação do tecido (TOSATO et al., 2015). A redução dos níveis de PCA após a irradiação, também, pode estar correlacionado com processo inflamatório da própria pele, com aumento de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-13, que impedem a atividade enzimática que atua na degradação da filagrina. Em um estudo realizado com dois grupos de participantes, observou-se que um grupo com estímulo para o processo inflamatório, a expressão da enzima caspase-14 diminuiu, assim, os níveis de PCA foram reduzidos, enquanto que no grupo controle não houve redução significativa (HOSTE et al., 2011; JUNG et al., 2014).

Os níveis de NMF, principalmente de PCA, dependem da quantidade e da degradação da proteína filagrina, presente na epiderme. Estímulos inflamatórios, assim como a exposição à irradiação UV, possuem impacto na síntese de pró-filagrina, na atividade enzimática que atua diretamente na degradação e expressão da filagrina, resultando em alteração dos níveis de TEWL (sigla em inglês para *transepidermal water loss*) basal e hidratação da pele. Portanto, quanto maior a

exposição aos raios UV, menor a degradação de filagrina, menor os níveis de PCA e menor a hidratação. Em relação aos fototipos, nesse estudo, não se apresentaram distintos quanto à presença do PCA (SIMONSEN et al., 2017).

A medição do PCA torna-se mais simplificada em relação aos demais componentes do NMF originados da degradação da filagrina, como o UCA, pois o UCA é dependente da quebra de His pela histidase e His amônia-liase (HAL) (BARRESI et al., 2011). As Figuras 16 e 17 ilustram a concentração dos compostos *trans*-UCA e *cis*-UCA presentes nas amostras de EC, antes e após a irradiação.

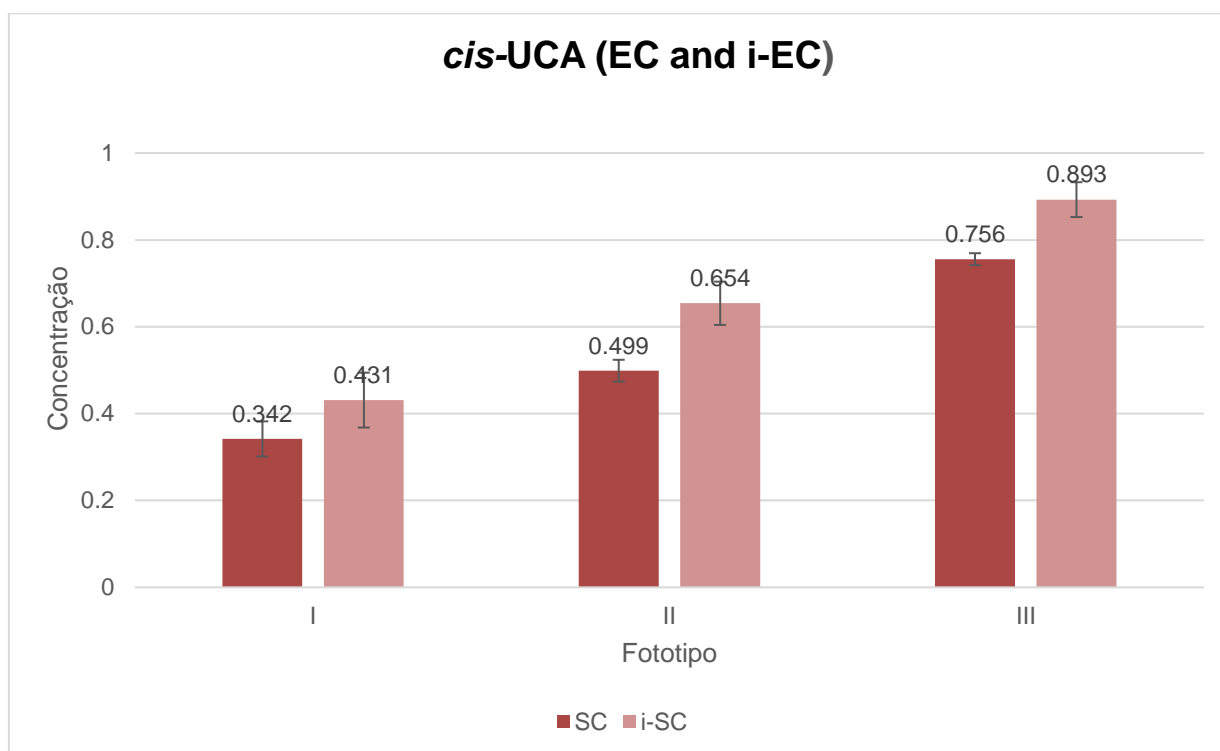
**Figura 16:** Concentração do composto *trans*-UCA no EC irradiado ou não em fototipos de I a III.



Legenda: SC (Estrato Córneo). i-SC (Estrato Córneo Irradiado).

Fonte: Próprio autor, 2022.

**Figura 17:** Concentração do composto *cis*-UCA no EC irradiado ou não em fototipos de I a III.



Legenda: SC (Estrato Córneo). i-SC (Estrato Córneo Irradiado).

Fonte: Próprio autor, 2022.

Cada isômero do UCA possui atividades biológica distinta, ressaltando a necessidade de um método analítico sensível para a quantificação dos respectivos isômeros. Por meio da técnica de CLAE, utilizada nesse estudo, foi possível separar, identificar e quantificar os respectivos isômeros em todas as amostras (JOO et al., 2012).

Os níveis de *cis*-UCA elevaram-se ainda mais no fototipo III após a irradiação. Fajuyigbe e Young (2016) relataram que a proporção de *cis*-UCA na pele, naturalmente exposta à luz solar, é maior em relação às regiões com pouca exposição. Outro fator que explicaria a maior quantidade de *cis*-UCA é o fototipo de pele, pois, entre pele negra e caucasiana, constatou-se que a concentração de UCA total foi superior na pele negra e asiática, em relação à caucasiana (FAJUYIGBE; YOUNG, 2016).

Após a exposição à irradiação UV, o *trans*-UCA isomeriza-se em *cis*-UCA, de forma dependente, onde há aumento e redução nos níveis, até ambos atingirem o estado foto estacionário. De acordo com De Fine Olivarius e colaboradores (1999), as

doses mais baixas de produção de *cis*-UCA é maior em indivíduos com baixa pigmentação em relação ao *trans*-UCA, e com níveis maiores na pele tipo III-V em comparação com indivíduos com pele tipo I-II (DE FINE OLIVARIUS et al., 1999).

Cada fototipo de pele se comporta de forma particular em relação à exposição aos raios UV. O *trans*-UCA é sintetizado *in vivo* a partir do aminoácido His catalisado, e acumulado o EC, pois não há atividade de urocanase na epiderme. A atividade da urocanase ocorre durante a isomerização, quando exposta a irradiação UV. A His desempenha uma importante função para a síntese de *trans*-UCA e eliminação de *cis*-UCA, em que a ingestão da His indica proteção para a pele da irradiação UV (TOSATO et al., 2015).

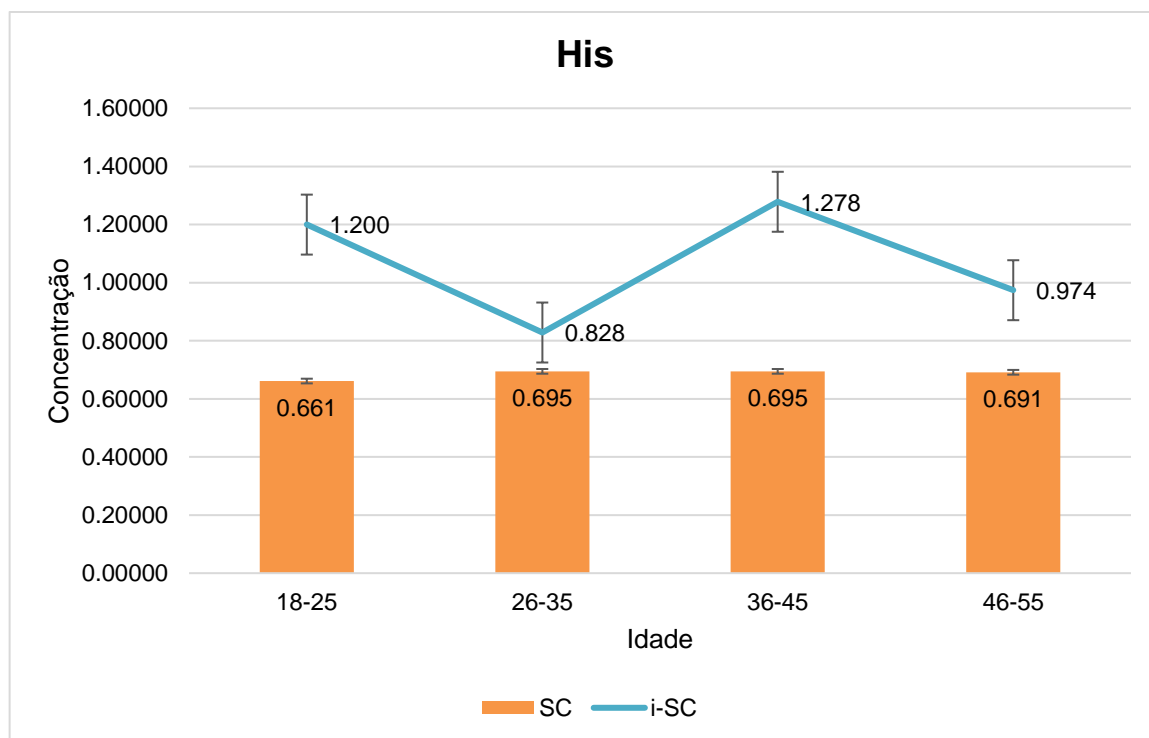
Kezic e colaboradores (2009) sugeriram que o nível de *cis*-UCA aumenta durante a irradiação aos raios UV e que estabilizam após 10 horas da exposição. Porém, a eliminação de *cis*-UCA da pele ocorre mais rápido que a substituição de *trans*-UCA (KEZIC et al., 2009). De acordo com Egawa (2008), a diminuição do *trans*-UCA é prevenida pelo uso de protetor solar, e o *trans*-UCA é o principal indicador de fotoproteção (EGAWA; IWAKI, 2008). O *cis*-UCA é o biomarcador de escolha para avaliação de medidas de proteção, como, por exemplo, de protetores solares, pois a quantidade relativa do isômero aumenta após a irradiação de raios UV no EC, mesmo quando a exposição é baixa, sendo altamente sensível (KEURENTJES et al., 2020).

### **5.5.2. Idade**

Com o avançar da idade, os níveis dos componentes do NMF se modificam. No estudo de Egawa e colaboradores (2007) foi avaliado os perfis de concentração de água do estrato córneo em regiões do antebraço, e o teor de água nessas áreas foi de 30 a 40%, com tendência a diminuir conforme a idade dos participantes (EGAWA; HIRAO; TAKAHASHI, 2007). Nikolovski e colaboradores (2008) compararam os resultados da concentração de água e componentes do NMF do EC em crianças e adultos e constataram que os níveis de água são maiores em crianças, no entanto, o conteúdo do NMF é maior em adultos e menor em crianças (NIKOLOVSKI et al., 2008). Nas Figuras 22, 23, 24 e 25 é possível visualizar os diferentes níveis dos componentes do NMF, antes e após a irradiação, dos participantes do presente estudo, na qual os participantes mais jovens, de 18 a 25

anos de idade, apresentam concentrações maiores em relação às demais faixas etárias.

**Figura 18:** Concentração do composto His e idade dos participantes, antes e após a irradiação.



Legenda: SC (Estrato Córneo). i-SC (Estrato Córneo Irradiado).

Fonte: Próprio autor, 2022.

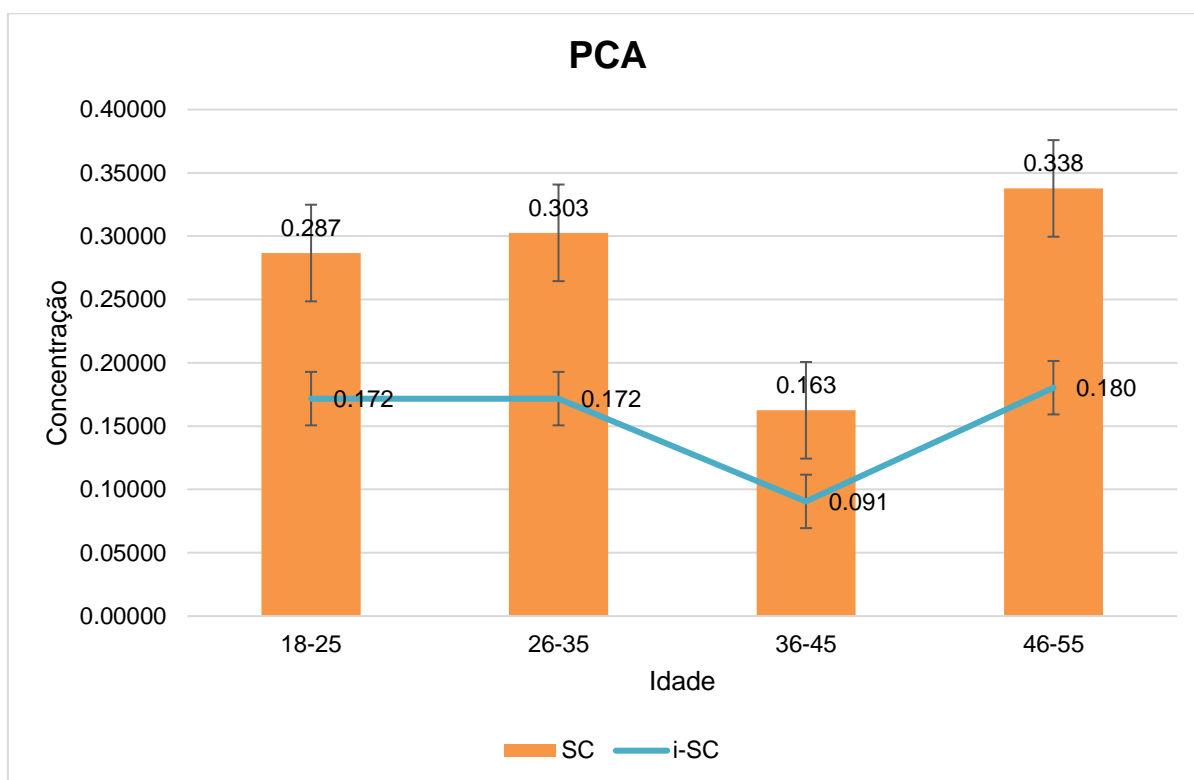
Da faixa etária de 18-25 anos de idade para a de 46-55, houve variação de 3,1% ( $\delta >0,01$ ) no EC não irradiado, e de 22,5% ( $\delta <0,18$ ) no EC irradiado. Os valores médios do nível de His diminuí em 37,2% no EC irradiado em relação à faixa etária de 26-35 anos de idade. Entre as faixas etárias de 36-45 e 46-55 anos de idade, verificou-se diminuição de 30,4%.

Os níveis de His não apresentaram diferença entre as faixas etárias, pois a His não está diretamente relacionada aos níveis de água no EC, porém, na expressão de UCA e na função de barreira. A His se mantém em homeostase no EC ao longo da vida e compreende, aproximadamente, 10% dos aminoácidos da filagrina, que gera o *trans*-UCA, um dos principais cromóforos epidérmicos que absorvem os raios UVB, e contribui para o equilíbrio do valor de pH da pele. Os fatores que contribuem para a redução e variação dos níveis de His na pele são genéticos, que interferem na

expressão da filagrina, e processos inflamatórios, que impactam na proteção da pele contra raios UVB, na hidratação do EC e na acidificação da pele, que diminui sua função de barreira e aumenta a reação a alérgenos e a reatividade imunológica (THYSSEN; KEZIC, 2014).

O PCA é o principal componente do NMF responsável pela hidratação e retenção da umidade no EC. Sendo um agente higroscópico no interior dos corneócitos e juntamente com os lipídios intercelulares do EC formam uma barreira à TEWL. O teor de água no EC de participantes de diferentes faixas etárias foi avaliado em um estudo realizado por Mukai e colaboradores (2021) encontraram-se diferenças entre eles, no qual os participantes idosos apresentaram teor de água significativamente maior na derme em comparação ao grupo jovem (JUNG et al., 2014; MUKAI et al., 2021; THYSSEN; KEZIC, 2014). Na Figura 24, ilustra-se a concentração dos níveis de PCA (a maior concentração está na faixa etária de 46 a 55 anos de idade).

**Figura 19:** Concentração do composto PCA e idade dos participantes, antes e após a irradiação



Legenda: SC (Estrato Córneo). i-SC (Estrato Córneo Irradiado).

Fonte: Próprio autor, 2022.

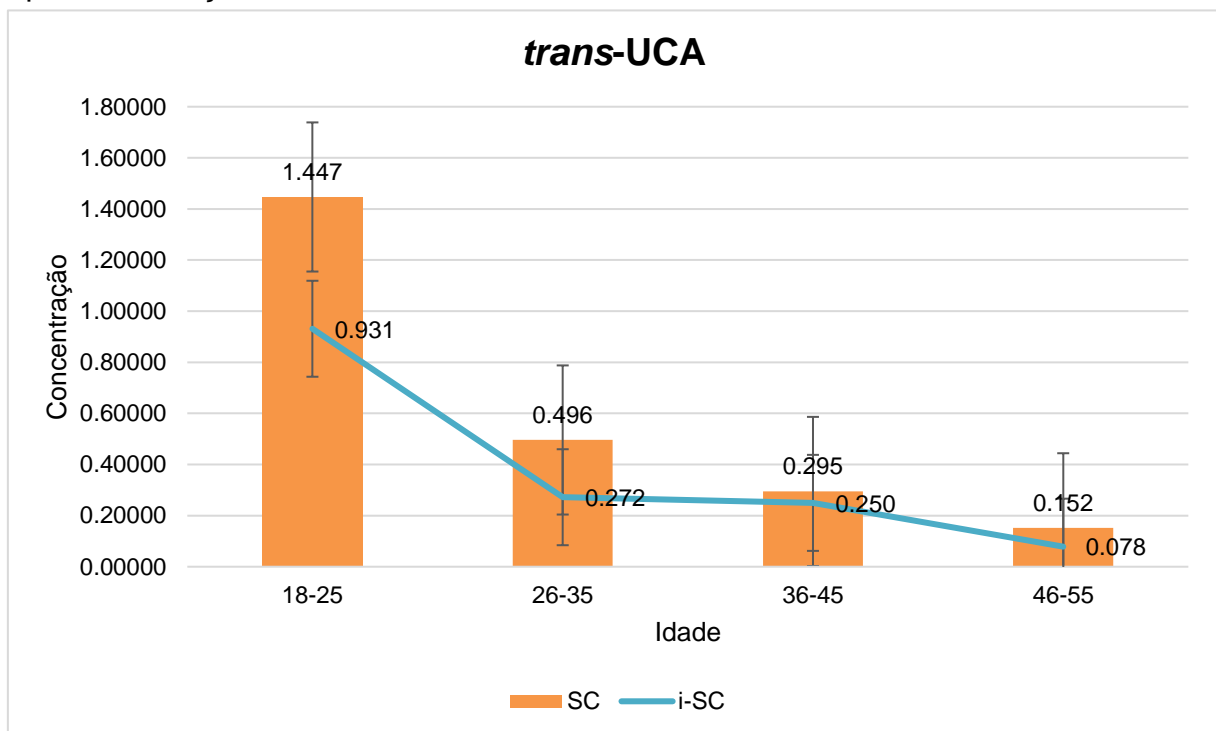
Da faixa etária de 18-25 para a de 46-55 anos de idade houve variabilidade de redução de 5,1% ( $\delta >0,06$ ;  $p >0,05$ ) no EC não irradiado, e de 0,9% ( $\delta <0,04$ ;  $p >0,05$ ) de aumento no EC irradiado, e nas demais faixas etárias, entre 26-35 e 36-45 anos de idade, a variabilidade de aumento foi de 14,0% ( $\delta >0,06$ ;  $p >0,05$ ) no EC não irradiado e diminuição de 8,1% ( $\delta >0,03$ ;  $p >0,05$ ) no EC irradiado. Verificou-se que os valores médios do nível de PCA aumentaram cerca de 11,0% no EC não irradiado entre as faixas etárias, e 10,9% no EC irradiado. Porém, quando comparado o EC não irradiado com o irradiado, no geral houve diminuição à medida que as mensurações foram realizadas, no entanto permaneceu constante para participantes mais jovens.

No estudo realizado por Téllez-Soto e colaboradores (2021) foi avaliado o teor de água e comprovou diferença no teor de água entre os jovens e os idosos foi, aproximadamente, 15% (TÉLLEZ-SOTO et al., 2021). Por meio dos resultados de *trans*-UCA e *cis*-UCA, foi observada variabilidade significativa nos níveis, que impactam na TEWL, hidratação do EC, valor de pH da superfície da pele e teor de lipídios (DIAS-FERREIRA et al., 2020). Entre todas as faixas etárias, apenas a de 46-

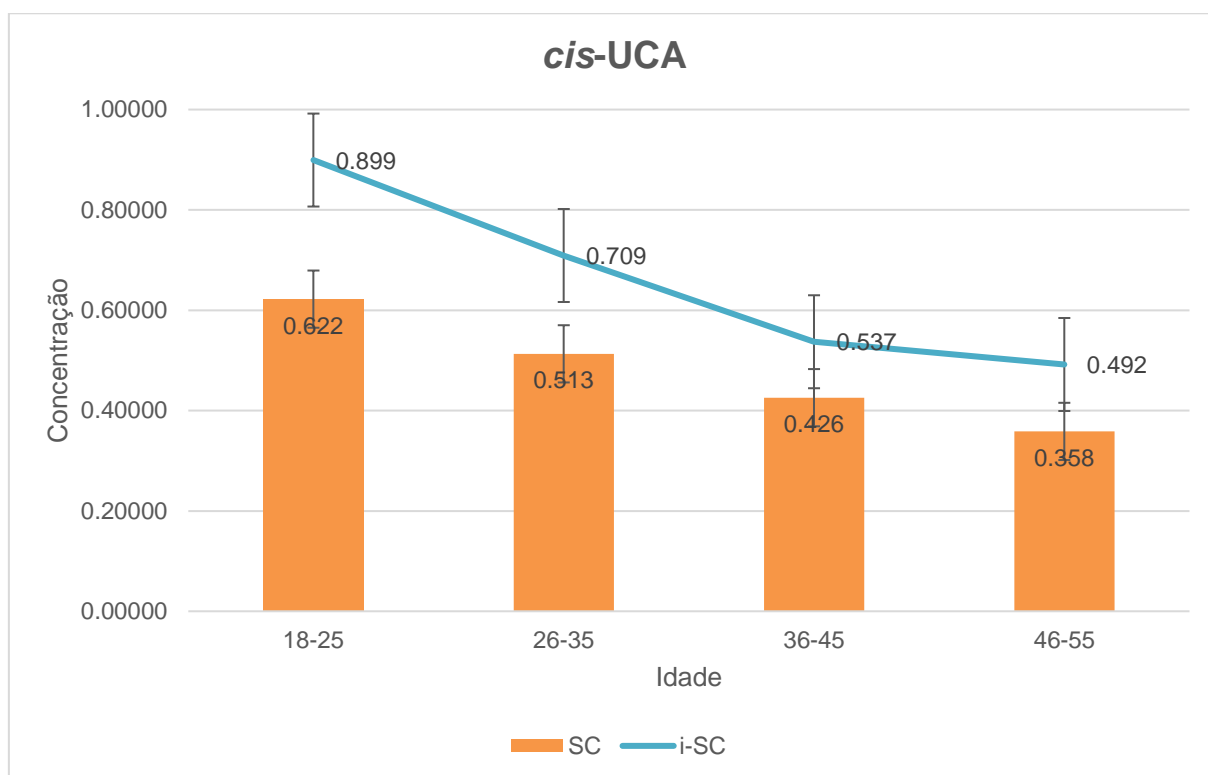


55 anos de idade foi menor no EC irradiado, em comparação com os demais fototipos. Comparando os resultados das demais faixas etárias, houve queda de 43,1% ( $\delta > 0,5$ ) de *trans*-UCA no EC normal (não irradiado) e de 21,0% ( $\delta < 0,3$ ) no EC irradiado, nos níveis de *cis*-UCA houve queda de 8,8% ( $\delta < 0,1$ ) no EC normal (não irradiado) e de 13,5% ( $\delta > 0,1$ ;  $p > 0,05$ ) no EC irradiado, em relação a faixa etária de 18-25 para 46-55 anos de idade (Figuras 20 e 21).

**Figura 20:** Concentração do composto *trans*-UCA e idade dos participantes, antes e após a irradiação



**Figura 21:** Concentração do composto *cis*-UCA e idade dos participantes, antes e após a irradiação



Legenda: SC (Estrato Córneo). i-SC (Estrato Córneo Irradiado).

Fonte: Próprio autor, 2022.

Os níveis de *trans*-UCA e *cis*-UCA, após a irradiação, necessitam de tempo para atingirem novamente os níveis normais e, na pele mais envelhecida, o tempo necessário para reconstituir esses componentes no EC é superior ao dobro, em relação a uma pele mais jovem. Os efeitos dos raios UV prejudicam tanto a função de barreira quanto no envelhecimento, promovendo aumento da TEWL, prejudicando a retenção de água, a síntese de DNA, e aumentando a quantidade de corneócitos (CHOI, 2019; WU; SIVAMANI, 2023).

Choi (2019) avaliou participantes adultos, jovens e idosos e constatou que a função de barreira e taxas de TEWL tendem a ser normais sob condição basal na pele envelhecida, e a restituição dos componentes do NMF é mais lenta em comparação com a pele jovem. Considerando que essas alterações são detectáveis cronologicamente na pele, eles são ainda mais agravados na pele com o fotoenvelhecimento, indicados pelos níveis de *trans*-UCA e *cis*-UCA. Na pele envelhecida, o conteúdo lipídico no EC é reduzido e há declínio significativo

relacionado à idade no nível do NMF, pois há a redução da síntese de pró-filagrina e, conseqüentemente, menor conteúdo de NMF (CHOI, 2019).

## 6. CONCLUSÕES

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi eficaz para separação e quantificação adequada das substâncias químicas His, PCA e os isômeros de UCA (*trans*-UCA e *cis*-UCA) no estrato córneo dos participantes. O método apresentou-se seletivo e ausente de interferentes, ademais, possuiu linearidade e limites de detecção e quantificação compatíveis com os objetivos dessa investigação.

No fototipo I, os níveis de His foram menores em comparação aos demais grupos. Ademais, os níveis dessa mesma substância não apresentaram diferença entre as faixas etárias. Em função da irradiação das amostras, o montante de His aumentou em todos os fototipos.

Os níveis de PCA apresentaram-se menores após a irradiação em todos os fototipos de pele. Ainda, as concentrações do PCA foram mais elevadas na faixa etária de 46 a 55 anos de idade.

Os níveis de concentração do isômero *cis*-UCA foram maiores nos participantes com fototipo III, após a irradiação UV.

Os níveis de concentração do isômero *trans*-UCA apresentaram-se maiores no EC não irradiado em todos os fototipos, e diminuíram após a irradiação, de forma proporcional à formação de *cis*-UCA em todos os fototipos ( $p > 0,05$ ). A faixa etária de 46-55 anos de idade obteve níveis significativamente menores de *trans*-UCA e *cis*-UCA.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Rachana; WOODFOLK, Judith A. Skin barrier defects in atopic dermatitis topical collection on allergic skin diseases. **Current Allergy and Asthma Reports**, [S. l.], v. 14, n. 5, 2014. DOI: 10.1007/s11882-014-0433-9.

ALSHEDDI, Lama; ANANTHAPADMANABHAN, Kavssery; LI, S. Kevin. Influence of Skin Furrows on Tape Stripping in Characterizing the Depth of Skin Penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], p. 118903, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118903. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118903>.

BARRESI, Caterina et al. Increased sensitivity of histidinemic mice to UVB radiation suggests a crucial role of endogenous urocanic acid in photoprotection. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 131, n. 1, p. 188–194, 2011. DOI: 10.1038/jid.2010.231.

BOUWSTRA, Joke A.; GROENINK, H. Wouter W.; KEMPENAAR, Joop A.; ROMEIJN, Stefan G.; PONEC, Maria. Water Distribution and Natural Moisturizer Factor Content in Human Skin Equivalents Are Regulated by Environmental Relative Humidity. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 128, n. 2, p. 378–388, 2008. DOI: 10.1038/SJ.JID.5700994.

CHOI, Eung Ho. Aging of the skin barrier. **Clinics in Dermatology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 336–345, 2019. DOI: 10.1016/J.CLINDERMATOL.2019.04.009.

DE FINE OLIVARIUS, F.; WULF, H. C.; CROSBY, J.; NORVAL, M. Isomerization of urocanic acid after ultraviolet radiation is influenced by skin pigmentation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 42–47, 1999. DOI: 10.1016/S1011-1344(99)00007-X.

DEJAEGHER, Bieke; MANGELINGS, Debby; VANDER HEYDEN, Yvan. Method development for HILIC assays. **Journal of Separation Science**, [S. l.], v. 31, n. 9, p. 1438–1448, 2008. DOI: 10.1002/jssc.200700680.

DIAS-FERREIRA, João; FERNANDES, Ana R.; SORIANO, José L.; NAVEROS, Beatriz C.; SEVERINO, Patricia; DA SILVA, Classius Ferreira; SOUTO, Eliana B. Skin rejuvenation: Biopolymers applied to UV sunscreens and sheet masks. **Biopolymer Membranes and Films**, [S. l.], p. 309–330, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-818134-8.00013-4.

EGAWA, Mariko; HIRAO, Tetsuji; TAKAHASHI, Motoji. In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with raman spectroscopy. **Acta Dermato-Venereologica**, [S. l.], v. 87, n. 1, p. 4–8, 2007. DOI: 10.2340/00015555-0183.

EGAWA, Mariko; IWAKI, Haruhi. In vivo evaluation of the protective capacity of sunscreen by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy. **Skin Research and Technology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 410–417, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2008.00318.x.

FAJUYIGBE, Damilola; YOUNG, Antony R. The impact of skin colour on human photobiological responses. **Pigment Cell Melanoma**, [S. l.], v. 207, p. 607–618, 2016. DOI: 0.1111/pcmr.12511. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/pcmr.12511>.

GIACOMONI, Paolo U.; MAMMONE, Thomas; TERI, Matthew. Gender-linked differences in human skin. **Journal of Dermatological Science**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 144–149, 2009. DOI: 10.1016/J.JDERMSCI.2009.06.001.

GONZÁLEZ, F. J.; MARTÍNEZ-ESCANAMÉ, M.; MUÑOZ, R. I.; TORRES-ÁLVAREZ, B.; MONCADA, B. Diffuse reflectance spectrophotometry for skin phototype determination. **Skin Research and Technology**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 397–400, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2010.00450.x.

GUNNARSSON, Maria; MOJUMDAR, Enamul Haque; TOPGAARD, Daniel; SPARR, Emma. Extraction of natural moisturizing factor from the stratum corneum and its implication on skin molecular mobility. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], p. 1–10, 2019. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.04.011.

*I.*, v. 604, p. 480–491, 2021. DOI: 10.1016/J.JCIS.2021.07.012.

GUPTA, Vishal; SHARMA, Vinod Kumar. Skin typing: Fitzpatrick grading and others. **Clinics in Dermatology**, [*S. I.*], v. 0738, n. 081X, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2019.07.010.

HERMANN, Klaus; ABECK, Dietrich. Analysis of histidine and urocanic acid isomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [*S. I.*], v. 750, n. 1, p. 71–80, 2001. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00416-3.

HO, Byron K.; ROBINSON, June K. Color bar tool for skin type self-identification: A cross-sectional study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [*S. I.*], v. 73, p. 312–313, 2015. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.05.024.

HOSTE, Esther et al. Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, [*S. I.*], v. 131, n. 11, p. 2233–2241, 2011. DOI: 10.1038/jid.2011.153. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.153>.

JOO, Kyung Mi; HAN, Ji Yeon; SON, Eui Dong; NAM, Gae Won; CHUNG, Han Young; JEONG, Hye Jin; CHO, Jun Cheol; LIM, Kyung Min. Rapid, simultaneous and nanomolar determination of pyroglutamic acid and cis-/trans-urocanic acid in human stratum corneum by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [*S. I.*], v. 897, p. 55–63, 2012. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.04.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.008>.

JUNG, Minyoung; CHOI, Jaewoong; LEE, Seon Ah; KIM, Hyunjung; HWANG, Joonsung; CHOI, Eung Ho. Pyrrolidone carboxylic acid levels or caspase-14 expression in the corneocytes of lesional skin correlates with clinical severity, skin barrier function and lesional inflammation in atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, [*S. I.*], v. 76, n. 3, p. 231–239, 2014. DOI:

10.1016/J.JDERMSCI.2014.09.004.

KEURENTJES, Anne J.; JAKASA, Ivone; JOHN, Swen M.; ULRICH, Claas; BEKKENK, Marcel W.; RUSTEMEYER, Thomas; KEZIC, Sanja. Tape stripping the stratum corneum for biomarkers of ultraviolet radiation exposure at sub-erythral dosages: a study in human volunteers. **Biomarkers**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 490–497, 2020. DOI: 10.1080/1354750X.2020.1792551. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1354750X.2020.1792551>.

KEZIC, S.; KAMMEYER, A.; CALKOEN, F.; FLUHR, J. W.; BOS, J. D. Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: Evaluation of minimally invasive methods. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 161, n. 5, p. 1098–1104, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2009.09342.x.

KLANG, Victoria; SCHWARZ, Julia C.; LENOBEL, Barbara; NADJ, Martina; AUBÖCK, Josef; WOLZT, Michael; VALENTA, Claudia. In vitro vs. in vivo tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 80, n. 3, p. 604–614, 2012. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.11.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.11.009>.

KOPPEL, S. A.; KEMPERMAN, P.; VAN TILBURG, I.; CALKOEN-KWA, F.; ENGBRETSSEN, K. A.; PUPPELS, G. J.; CASPERS, P. J.; KEZIC, S. Determination of natural moisturizing factors in the skin: Raman microspectroscopy versus HPLC. **Biomarkers**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 502–507, 2017. DOI: 10.1080/1354750X.2016.1256428.

KOVACS, Daniela et al. The eumelanin intermediate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid is a messenger in the cross-talk among epidermal cells. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 132, p. 1196–1205, 2012. DOI: 10.1038/jid.2011.457.

LADEMANN, J.; JACOBI, U.; SURBER, C.; WEIGMANN, H. J.; FLUHR, J. W. The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 317–323, 2009. DOI:



10.1016/j.ejpb.2008.08.008.

Disponível

em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.008>.

MARSTEIN, Sverre; JELLUM, Egil; ELDJARN, Lorentz. THE CONCENTRATION OF PYROGLUTAMIC ACID (z-PYRROLIDOKE- 5-CARBOXYLIC ACID) IN NORMAL AND PSORIATIC EPIDERMIS, DETERMINED ON A MICROGRAM SCALE BY GAS CHROMATOGRAPHY. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 49, p. 389–395, 1973.

MORETTIN, Pedro A. **Morettin & Bussab - Estatística Básica, 6ª edição (2010)**. 6ª edição ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2010.

MUKAI, Kanae et al. Effects of skin moisturizer on the skin barrier dysfunction model: An evaluation of the heel via tape-stripping in healthy, young adults. **Journal of Tissue Viability**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 439–445, 2021. DOI: 10.1016/J.JTV.2021.02.002.

NIKOLOVSKI, Janeta; STAMATAS, Georgios N.; KOLLIAS, Nikiforos; WIEGAND, Benjamin C. Barrier Function and Water-Holding and Transport Properties of Infant Stratum Corneum Are Different from Adult and Continue to Develop through the First Year of Life. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 128, n. 7, p. 1728–1736, 2008. DOI: 10.1038/SJ.JID.5701239.

SANT', Flavia Alvim; ADDOR, Anna; AOKI, Valeria. Barreira cutânea na dermatite atópica Skin barrier in atopic dermatitis. **An Bras Dermatol**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 184–94, 2010.

SIMONSEN, Stine; THYSSEN, Jacob P.; HEEGAARD, Steffen; KEZIC, Sanja; SKOV, Lone. Expression of filaggrin and its degradation products in human skin following erythral doses of ultraviolet B irradiation. **Acta Dermato-Venereologica**, [S. l.], v. 97, n. 7, p. 797–801, 2017. DOI: 10.2340/00015555-2662.

SONIA VIEIRA. **LIVRO: Introdução à Bioestatística**. 1ª edição ed. Rio de Janeiro.

TÉLLEZ-SOTO, Claudio A.; PEREIRA SILVA, Michely G.; DOS SANTOS, Laurita; DE O. MENDES, Thiago; SINGH, Priyanka; FORTES, Sabrina A.; FAVERO, Priscila;

MARTIN, Airton A. In vivo determination of dermal water content in chronological skin aging by confocal Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, [S. l.], v. 112, p. 103196, 2021. DOI: 10.1016/J.VIBSPEC.2020.103196.

THYSSEN, Jacob P.; KEZIC, Sanja. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 134, n. 4, p. 792–799, 2014. DOI: 10.1016/J.JACI.2014.06.014.

TOSATO, M. G.; ORALLO, D. E.; ALI, S. M.; CHURIO, M. S.; MARTIN, A. A.; DICELIO, L. Confocal Raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 153, p. 51–58, 2015. DOI: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2015.08.030.

VOEGELI, Rainer; HEILAND, J.; DOPPLER, S.; RAWLINGS, A. V.; SCHREIER, T. Efficient and simple quantification of stratum corneum proteins on tape strippings by infrared densitometry. **Skin Research and Technology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 242–251, 2007. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2007.00214.x.

WU, Hera; SIVAMANI, Raja K. Skin Barrier. **Atopic Dermatitis : Inside Out Or Outside in**, [S. l.], p. 34–43, 2023. DOI: 10.1016/B978-0-323-84744-5.00005-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032384744500005X>. Acesso em: 27 fev. 2022.

ZHU, Hua Yue; JIANG, Ru; FU, Yong Qian; LI, Rong Rong; YAO, Jun; JIANG, Sheng Tao. Novel multifunctional NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/ZnO hybrids for dye removal by adsorption, photocatalysis and magnetic separation. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 369, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.02.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.02.025>.