

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia  
clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e  
análise de imagem**

**Daiane Garcia Mercurio**

Ribeirão Preto  
2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia  
clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e  
análise de imagem**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas para obtenção do Título de  
**Doutora em Ciências**

Área de Concentração: Medicamentos e  
Cosméticos.

**Orientada:** Daiane Garcia Mercurio

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria  
Berardo Gonçalves Maia Campos

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 01/12/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2015

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.

Mercurio, Daiane Garcia

Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e análise de imagem. Ribeirão Preto, 2015

209 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves

1. Fotoenvelhecimento
2. Eficácia Clínica
3. Tocoretinate
4. Dermocosméticos
5. Microscopia confocal de reflectância a laser
6. Biofísica da pele

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Daiane Garcia Mercurio

**Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e análise de imagem**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador(a): Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## *Dedicatória*

---

*Aos meus pais, Pedro e Roseli,  
pelo apoio e amor incondicional e  
por estarem sempre presentes  
em minha vida, me incentivando e  
me orientando no aprendizado constante e  
na realização de todos meus sonhos.  
Vocês me inspiram a cada passo que sigo!*

*À minha família, que me envolve  
com amor, apoio e carinho.*

*Ao Murilo, meu amor e companheiro,  
exemplo de doação e dedicação.  
Obrigada por me acompanhar nesta jornada  
e pelo apoio sempre por me proporcionar  
“objetivo, direção e felicidade”.*

***Agradecimento Especial***

*À minha orientadora,  
**Patrícia M. B. G. Maia Campos,**  
Pela amizade, carinho, atenção  
e zelo tão especiais nesses anos.  
O seu dinamismo, alegria e energia nos inspira!  
Agradeço pelas grandes oportunidades,  
conselhos e motivações,  
que me proporcionaram grande  
crescimento pessoal e profissional.*

# *Agradecimentos*

---

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos: Ana flora, Ana Paula, Andréia, Ariadni, Carla, Fernanda, Flávia, Francine, Gabriela, Jirrah, Josiane, Lidiane, Lívia, Maísa, Marcella, Marina, Raissa, Stefania, Thaís, Victor e Wanessa agradeço pela amizade, apoio e companheirismo.

À Tais Aleriana. W. Lucon e pela grande amizade e pela colaboração que foi essencial para o presente trabalho.

Ao João Carlos Simão, agradeço pela colaboração prestada.

A todas voluntárias que participaram desse estudo, pela valiosíssima colaboração que possibilitou a realização desse trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização deste doutorado.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram para minha formação.

Às empresas do segmento cosmético, que gentilmente forneceram matérias-primas empregadas nessa pesquisa.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão USP que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado e apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

À FAPESP pela concessão da Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior

Ao Professor Philippe Masson, pela confiança, apoio e oportunidade. Agradeço pelo grande empenho de tornar realidade a minha viagem à França. Obrigada pelo acolhimento na EVIC – Idec, em Bordeaux, e pelos esforços para a conclusão do meu trabalho.

À Frédérique Morizot, Randa Jadid e sua equipe na Chanel, pelo acolhimento e cooperação para a realização do estudo na França.

À Ariane e Lecoq e toda equipe da EVIC Idec – Bordeaux pelo acolhimento, gentileza e cooperação na realização do estudo.

À minha família, Maria, Rosa, Alice, Ana Laura, Daniela, Giovanna Maria Eduarda, Joseane, Rodrigo, Jean, Rosa Helena, Tiago, Maria Fernanda, Carmen e Emílio que me envolvem de amor, apoio e carinho.

Às minhas amigas de república Simone, Mariana, Madeleine e Ana Carolina pela amizade e convivência.

A todos os amigos que me acompanharam nessa jornada.



*Façamos da interrupção um caminho novo.  
Da queda um passo de dança,  
Do medo uma escada,  
Do sonho uma ponte, da procura um encontro!*

*Fernando Sabino*

## RESUMO

MERCURIO, D. G. **Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e análise de imagem.** 2015. 209f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O fotoenvelhecimento tem sido um assunto de grande interesse na área cosmética e dermatológica. Portanto, é relevante a caracterização da pele fotoenvelhecida, bem como o desenvolvimento de formulações dermocosméticas adequadas e direcionadas à finalidade de uso proposta. As vitaminas A e E e seus derivados tem se destacado como substâncias ativas para tal finalidade, e, baseado nesse conceito, foi proposto um composto inovador, o *Tocoretinate* (éster de all-trans-ácido retinoico e D- $\delta$ -tocoferol), uma potencial substância ativa alternativa ao ácido retinoico para atuar na melhoria das condições da pele fotoenvelhecida. Nesse contexto, o objetivo do presente projeto foi caracterizar as alterações cutâneas decorrentes do fotoenvelhecimento, desenvolver e avaliar a estabilidade e a eficácia clínica de formulações cosméticas antienvhecimento contendo *Tocoretinate* (TR), palmitato de retinila ou acetato de tocoferila. Para tal, inicialmente foi feito o planejamento experimental Box-Behnken com metodologia de superfície de resposta (MSR) foi executado para avaliar os principais efeitos e interações das matérias-primas da formulação. Foram selecionadas três formulações contendo, ou não, 0,5% de palmitato de retinila, 5% do acetato de tocoferila e 0,1% de *Tocoretinate*, as quais foram avaliadas quanto a sua estabilidade. A caracterização da pele fotoenvelhecida brasileira na face, nos antebraços e no dorso das mãos foi realizada em 80 voluntárias em dois grupos de idade por meio de questionários de autoavaliação e por técnicas de biofísica e imagem da pele. A mesma avaliação foi realizada no antebraço volar e face de 41 voluntárias francesas de 40 a 65 anos. As formulações desenvolvidas foram avaliadas por técnicas de biofísica e análise de imagem antes e após 84 dias de uso pelas voluntárias brasileiras acima de 40 anos. A MSR permitiu a avaliação dos efeitos isolados bem como da interação de matérias primas em respostas como: parâmetros reológicos, sensorial e hidratação. As formulações desenvolvidas foram consideradas estáveis pelos testes de estabilidade realizados. Os principais efeitos relacionados ao fotoenvelhecimento foram: perda da qualidade elástica, maior número e largura de rugas, menor ecogenicidade, maior ângulo tipológico individual e maior tamanho de corneócitos. Na análise morfológica, foi observado um padrão de pigmentação irregular, queratinócitos distribuídos irregularmente, achatamento da junção dermoepidérmica e a presença de fibras de colágeno deterioradas. Diferentes características morfológicas, estruturais e biofísicas foram encontradas na pele brasileira e francesa, que são submetidas a diferentes fatores ambientais e apresentam hábitos distintos. A formulação contendo *Tocoretinate* atuou na hidratação, na elasticidade líquida, no aumento do componente viscoso da pele, na redução da espessura do estrato córneo, aumento da espessura da epiderme, melhoria da homogeneidade e redução da pigmentação da epiderme e aumento da profundidade das papilas dérmicas. As formulações contendo derivados de vitaminas A e E apresentaram efeito na hidratação cutânea e função barreira da pele, no aumento da porção viscoelástica da curva, aumento da reflectância entre os queratinócitos após 84 dias de estudo. A caracterização da pele por técnicas de biofísica e análise de imagem foi fundamental para a definição do protocolo de estudo clínico de eficácia aplicando as referidas técnicas. O estudo clínico mostrou a eficácia da formulação desenvolvida contendo *Tocoretinate* na melhoria das condições da pele fotoenvelhecida, e fornece embasamento científico relevante para o uso deste ingrediente ativo inovador tanto em produtos cosméticos como na clínica dermatológica.

Palavras-chave:

Fotoenvelhecimento; Eficácia Clínica; *Tocoretinate*; Dermocosméticos; Microscopia confocal de reflectância a laser; Biofísica da pele.

## ABSTRACT

MERCURIO, D. G. **Characterization of photodamaged skin, development and clinical efficacy of dermocosmetic formulations by biophysical and skin imaging techniques.** 2015 209f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Photoaging is a subject of great interest in cosmetics and dermatology. Thus, it is important to characterize photodamaged skin and the development of appropriate dermocosmetic formulations for this purpose. Vitamins A and E and their derivatives have emerged as active substances for this purpose, and, based on this concept, an innovative compound was proposed, the Tocoretinate (ester of all-trans retinoic acid and D- $\delta$ -tocopherol), which is a potential active ingredient to replace retinoic acid, acting on the improvement of photodamaged skin conditions. The objective of this project is to characterize the skin changes due to photoaging and to develop, evaluate the stability and clinical efficacy of anti-aging cosmetic formulations containing Tocoretinate, retinyl palmitate and tocopheryl acetate. An experimental design of three factors in three levels of experience (Box-Behnken) with response surface methodology (RSM) was performed to evaluate the main effects and interactions of raw materials of the formulations. Three formulations were selected containing, or not, 0.5% retinyl palmitate, 5% tocopheryl acetate and 0.1% Tocoretinate, which were submitted to stability tests. The characterization of the Brazilian photodamaged skin on the face, forearms and back of the hands was carried out on 80 volunteers in two age groups through self-assessment questionnaires and biophysical and skin imaging techniques. The same evaluation was performed on the volar forearm and face of 41 French volunteers aged between 40-65 years old. The developed formulations were evaluated by biophysical and skin imaging techniques before, and after 84 days of application of the formulations. RSM allowed the evaluation of the effects of the raw materials on the responses: rheological behavior, sensory properties and hydration. The formulations were considered stable in stability tests. The clinical and morphological features related to photoaging were: loss of the elastic quality, more wrinkles, less echogenicity, higher individual typological angle and larger size of corneocytes and a thicker stratum corneum. For the morphological analysis, an irregular pigmentation pattern was observed, keratinocytes irregularly distributed, flattening of the dermal-epidermal junction and the presence of damaged collagen fibers. Different morphological, structural and biophysical characteristics were found in Brazilian and French skin, that are exposed to different environmental factors and has distinct habits. The formulation containing Tocoretinate acted on skin hydration, elasticity, reduced stratum corneum thickness, increased epidermal thickness, improved uniformity, reduced skin pigmentation, and also increased depth of dermal papillae. Formulations containing derivatives of vitamins A and E acted on skin barrier function and hydration, increasing the portion of the viscoelastic curve and improved the interkeratinocyte reflectance after 84 days of the study. The characterization of the skin by biophysical techniques and skin imaging analysis was fundamental in effectively defining the clinical study protocol applying these techniques. The clinical study showed the efficacy of the formulations developed containing Tocoretinate in improving photodamaged skin conditions, and provides relevant scientific basis for the use of this innovative active ingredient both in dermocosmetics and in dermatology.

Keywords: Photoaging, Clinical Efficacy; Dermocosmetics, Reflectance Confocal Microscopy, Skin biophysics

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Representação esquemática dos pontos do planejamento Box-Benhken no cubo multidimensional. .... 7
- Figura 2-** Parâmetros avaliados pelo equipamento Cutometer..... 54
- Figura 3 -** Superfícies de resposta para Índice de Consistência (IC) em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de Tocoretinate (D). .... 65
- Figura 4-** Superfícies de resposta para Índice de Fluxo (IF) em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de Tocoretinate (D). .... 66
- Figura 5-** Superfícies de resposta para Área de Histerese (AH) em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de Tocoretinate (D). .... 68
- Figura 6-** Superfícies de resposta para Viscosidade Aparente Mínima (VAM) em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de Tocoretinate (D). .... 69
- Figura 7-** Superfície de resposta para Tamanho de partícula em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para a formulação contendo 0,1% de Tocoretinate . .... 70
- Figura 8-** Superfícies de resposta para Índice de Consistência (IC) em função dos fatores: % phytantriol e % de lecitina de soja. .... 72
- Figura 9 -** Superfícies de resposta para o *Score* Sensorial de Pegajosidade (P) em função dos fatores % phytantriol , % de lecitina de soja e % de triglicérides de ácido cáprico e caprílico. .... 73
- Figura 10-** Superfícies de resposta para o *Score* Sensorial de Oleosidade (O) em função dos fatores % phytantriol , % de lecitina de soja e % de triglicérides de ácido cáprico e caprílico. .... 74
- Figura 11-** Superfícies de resposta para a hidratação (H) em função dos fatores: % phytantriol e % de lecitina de soja. .... 75
- Figura 12 -** Índice de consistência das formulações V1 (A), V2 (B) e V3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias. .... 78

- Figura 13-** Índice de consistência das formulações A1 (A), A2 (B) e A3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **78**
- Figura 14-** Índice de consistência das formulações E1 (A), E2 (B) e E3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **78**
- Figura 15-** Índice de consistência das formulações T1 (A), T2 (B) e T3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **78**
- Figura 16-** Índice de fluxo das formulações V1 (A), V2 (B) e V3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **79**
- Figura 17-** Índice de fluxo das formulações A1 (A), A2 (B) e A3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **79**
- Figura 18-** Índice de fluxo das formulações E1 (A), E2 (B) e E3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **79**
- Figura 19-** Índice de fluxo das formulações T1 (A), T2 (B) e T3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **79**
- Figura 20-** Viscosidade aparente mínima das formulações V1 (A), V2 (B) e V3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **80**
- Figura 21-** Viscosidade aparente mínima das formulações A1 (A), A2 (B) e A3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **80**
- Figura 22-** Viscosidade aparente mínima das formulações E1 (A), E2 (B) e E3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **80**
- Figura 23-** Viscosidade aparente mínima das formulações T1 (A), T2 (B) e T3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **80**
- Figura 24-** Índice de consistência das formulações PV – contendo 1% de phytantriol (A), LV – contendo 1% de lecitina (B), PLV - contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **81**
- Figura 25-** Índice de consistência das formulações PA – contendo 1% de phytantriol e 0,5% de palmitato de retinila (A), LA – contendo 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila (B), PLA - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **81**
- Figura 26-** Índice de consistência das formulações PE – contendo 1% de phytantriol e 5% de acetato de tocoferila (A), LE – contendo 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila (B), PLE% - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **82**
- Figura 27 -** Índice de consistência das formulações PT – contendo 1% de phytantriol e 0,1% *Tocoretinate* (A), LT – contendo 1% de lecitina e e 0,1% *Tocoretinate* (B), PLT - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e e 0,1% *Tocoretinate* nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias. .... **82**

**Figura 28-** Índice de fluxo das formulações PV – contendo 1% de phytantriol (A), LV – contendo 1% de lecitina (B), PLV - contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **82**

**Figura 29-** Índice de fluxo das formulações PA – contendo 1% de phytantriol e 0,5% de palmitato de retinila (A), LA – contendo 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila (B), PLA - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **82**

**Figura 30-** Índice de fluxo das formulações PE – contendo 1% de phytantriol e 5% de acetato de tocoferila (A), LE – contendo 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila (B), PLE% - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **83**

**Figura 31-** Índice de fluxo das formulações PT – contendo 1% de phytantriol e 0,1% *Tocoretinate* (A), LT – contendo 1% de lecitina e e 0,1% *Tocoretinate* (B), PLT - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e e 0,1% *Tocoretinate* nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **83**

**Figura 32-** Viscosidade aparente mínima das formulações PV – contendo 1% de phytantriol (A), LV – contendo 1% de lecitina (B), PLV - contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **83**

**Figura 33-** Viscosidade aparente mínima das formulações PA – contendo 1% de phytantriol e 0,5% de palmitato de retinila (A), LA – contendo 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila (B), PLA - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **84**

**Figura 34-** Viscosidade aparente mínima PE das formulações – contendo 1% de phytantriol e 5% de acetato de tocoferila (A), LE – contendo 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila (B), PLE% - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **84**

**Figura 35-** Viscosidade aparente mínima das formulações PT – contendo 1% de phytantriol e 0,1% *Tocoretinate* (A), LT – contendo 1% de lecitina e e 0,1% *Tocoretinate* (B), PLT - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e e 0,1% *Tocoretinate* nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias..... **84**

**Figura 36-** Fotomicrografias da formulação F2 (sem adição de phytantriol e lectina) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X)..... **85**

**Figura 37-** Fotomicrografias da formulação F2 (sem adição de phytantriol e lectina de soja) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X)..... **85**

**Figura 38-** Fotomicrografias da formulação PLV (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X). ..... **85**

- Figura 39-** Fotomicrografias da formulação PLV (contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X)..... **86**
- Figura 40-** Fotomicrografias da formulação PLA (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X)... **86**
- Figura 41-** Fotomicrografias da formulação PLA (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X). ..... **86**
- Figura 42-** Fotomicrografias da formulação PLE (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (a) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X)... **87**
- Figura 43-** Fotomicrografias da formulação PLE (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X). ..... **87**
- Figura 44-** Fotomicrografias da formulação PLT (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,1% de *Tocoretinate*) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X). ..... **87**
- Figura 45-** Fotomicrografias da formulação PLT (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,1% de *Tocoretinate*) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X)..... **88**
- Figura 46-** Tamanho médio de partícula das formulações estudadas..... **88**
- Figura 47-** Evolução do *Score* obtido da frequência de exposição solar (barras), frequência de bronzeamento (●) e de fotoproteção (■) ao longo dos anos na população do grupo 1 (A) e do grupo 2 (B)..... **89**
- Figura 48–** Características cutâneas do rosto que incomodam as voluntárias participantes do estudo..... **90**
- Figura 49-** Conteúdo aquoso do estrato córneo do Grupo 1 (18- 35 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP) (n=20). ..... **90**
- Figura 50–** Perda transepidérmica de água do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP)..... **91**
- Figura 51–** Elasticidade bruta ( $U_a/U_f$ ) e Elasticidade ( $U_r/U_f$ ) do Grupo 1 (18- 35 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP)..... **92**
- Figura 52–** Componente viscoso da curva ( $U_v/U_e$ ) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP). ..... **92**
- Figura 53 –** Resíduo de deformação da pele do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP)..... **93**
- Figura 54–** Número e largura das rugas do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP)..... **94**

<b>Figura 55</b> – Profundidade máxima da ruga (RT) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).....	<b>94</b>
<b>Figura 56</b> – Rugosidade da pele (Ser) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).....	<b>95</b>
<b>Figura 57</b> - Maciez da pele (Sesm) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP). ....	<b>95</b>
<b>Figura 58</b> – Relação Pixels de baixa ecogenicidade (PBE) e Pixels totais (PT) (A) e Espessura da derme do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).....	<b>96</b>
<b>Figura 59</b> – Imagens representativas obtidas do ultrassom de 20 MHz do antebraço volar (A) de uma participante de 20 anos e dos antebraços volar (B) e dorsal (C), dorso das mãos (D) e rosto (E) de uma mulher de 60 anos. A escala de ecogenicidade é dada por: branco>vermelho>amarelo>verde> azul>preto. Para as regiões fotoenvelhecidas, uma área de baixa ecogenicidade abaixo da epiderme pode ser observada.....	<b>97</b>
<b>Figura 60</b> –Ângulo Tipológico Individual do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).....	<b>98</b>
<b>Figura 61</b> – Espessura do estrato córneo do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).....	<b>99</b>
<b>Figura 62</b> – Diâmetro de corneócitos do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).....	<b>99</b>
<b>Figura 63</b> – Espessura da epiderme do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP). ....	<b>100</b>
<b>Figura 64</b> – Padrão de distribuição dos queratinócitos no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Observa-se desordem do padrão de “favo de mel” com pleomorfismo de tamanho e forma de queratinócitos e também pigmentação irregular.....	<b>100</b>
<b>Figura 65</b> – Padrão de pigmentação no queratinócitos no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Em B, queratinócitos pigmentados são representados por pontos claros, de alta refringência. ....	<b>101</b>
<b>Figura 66</b> – Padrão da junção dermoepidérmica no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Observa-se em (A) que a região fotoenvelhecida há um achatamento da epiderme e, portanto, perda das papilas dérmicas. ....	<b>101</b>
<b>Figura 67</b> – Características da derme papilar no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Observa-se que na pele jovem, as fibras de colágeno são finas e altamente refringentes, e na pele envelhecida, as fibras são pouco visíveis e apresentam a aparência encolhida. ....	<b>102</b>
<b>Figura 68</b> - “Loading plot”: Gráfico de PCA com primeiro e segundo componente principal dos resultados da face obtidos pelas técnicas de biofísica e análise de imagem dos dois grupos de idade. ....	<b>103</b>
<b>Figura 69</b> - Porcentagem de voluntárias francesas e brasileiras que estão, ou não, satisfeitas com a pele do rosto. ....	<b>104</b>



<b>Figura 70-</b> Principais características do rosto que incomodam as voluntárias.....	<b>105</b>
<b>Figura 71-</b> Regiões de aplicação de cosméticos.....	<b>105</b>
<b>Figura 72-</b> FPS dos protetores solares utilizados no rosto (A) e no corpo (B) pelas voluntárias do painel francês .....	<b>106</b>
<b>Figura 73-</b> Representação em box-plot do tempo de exposição ao sol diariamente em diferentes períodos da vida. Pontuação: (1) Menos de uma hora, (2) entre 1 e 3 horas, (3) entre 3 e 6 horas e (4) mais de 6 horas. ....	<b>107</b>
<b>Figura 74-</b> Representação box-plot da frequência de banhos de sol em diferentes períodos da vida. Pontuação: (1) Nunca, (2) Raramente (0-1 vez em um mês); (3) Esporadicamente (1-3 vezes em um mês) e (4) com frequência (mais de 3 vezes em um mês). ....	<b>107</b>
<b>Figura 75-</b> Representação box-plot do uso de protetores solares em diferentes períodos da vida. Pontuação: (1) Nunca; (2) Raramente; (3) frequentemente; (4) Sempre. ....	<b>108</b>
<b>Figura 76 -</b> Análise do software VISIA para os parâmetros: rugas (A), pontos (B) e textura (C). ....	<b>109</b>
<b>Figura 77 -</b> Avaliação da rugosidade por AEVA - HE: SR: comprimento e área de sulcos; ST: amplitude máxima do relevo (mm). Stm: diferença entre os picos e vales média (mm) .SQ: rugosidade no que diz respeito à variação média quadrática (mm) .SA: rugosidade média (mm).(* Diferença significativa em relação ao grupo 1 , ** Diferença significante em relação aos grupos 1 e 2). ....	<b>109</b>
<b>Figura 78-</b> Avaliação das rugas periorbitais AEVA - HE (A) soma do volume, profundidade máxima e profundidade média (B) soma da circunferência e soma área média. ....	<b>110</b>
<b>Figura 79-</b> Reconstrução 3D do rosto de uma voluntários por tecnologia de fringe protection. A coloração rosa significa detecção dos sulcos pelo software. ....	<b>110</b>
<b>Figura 80-</b> Área de sulcos (A) e densidade (B) (Área de sulcos / área total). ....	<b>111</b>
<b>Figura 81 -</b> Perda transepidérmica de água do antebraço volar e do rosto de voluntárias francesas e brasileiras. * Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa (p <0,05). ....	<b>112</b>
<b>Figura 82-</b> Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço volar e do rosto de voluntárias francesas e brasileiras. * Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa (p <0,05). ....	<b>112</b>
<b>Figura 83-</b> Aspreza da pele (Ser) (A), a suavidade da pele (SESM) (B) e número e a largura das sulcos (costurar) (C) do antebraço e da face dos voluntários. * Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa (p <0,05). ....	<b>113</b>
<b>Figura 84-</b> (A) $R5 = Ur / Ue =$ elasticidade líquida e (B) $R6 = Uv/Ue =$ porção da viscoelasticidade da parte elástica da curva. * Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa (p <0,05). ....	<b>114</b>

**Figura 85-** Espessura da derme do antebraço e no rosto dos voluntários franceses e brasileiros. .... **114**

**Figura 86 -** Proporção de pixels de baixa ecogenicidade na derme do antebraço volar e do rosto das voluntárias francesas e brasileiras. \* Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa ( $p < 0,05$ ). .... **115**

**Figura 87-** Proporção de pixels de baixa ecogenicidade na derme do antebraço volar e do rosto das voluntárias francesas e brasileiras \* Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa ( $p < 0,05$ ). .... **115**

**Figura 88 -** Exemplos de características celulares da epiderme, da junção dermoepidermica e morfologia das fibras colágenas utilizadas na análise: (A) Padrão regular de favo de mel com queratinócitos poligonais bem demarcados, com tamanho e formato regular; (B) Padrão irregular de favo de mel mostrando queratinócitos com formatos e tamanhos irregulares e com contorno pouco definido; (C) Pigmentação mosqueada; (D) Baixa refletância entre os queratinócitos (contornos não estão bem definidos); (E) queratinócitos com pontos brancos circundados por uma periferia escura, o que pode representar cromatina condensada (setas); (F) Células dendríticas (seta); (E) anéis policíclicos hiperrefrativos na JDE (lentigo solar); (F) Colágeno grosso, com fibras com menor brilho, formando uma rede desorganizada (G) Colágeno encolhido, amorfo ; (H) Elastose solar; (I) infiltrado inflamatório na derme superficial. (Escala = 50  $\mu$ m). .... **117**

**Figura 89-** Conteúdo aquoso do estrato córneo antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face das voluntárias (média, IC 95%). .... **118**

**Figura 90-** Conteúdo aquoso do estrato córneo antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC). .... **119**

**Figura 91-** Perda de água transepidermica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). .... **120**

**Figura 92-** Perda de água transepidermica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC). .... **120**

**Figura 93-**  $R2 = Ua / Uf$  elasticidade bruta (A) ;  $R5 = Ur / Ue$  = elasticidade líquida (B),  $R6 = Uv/Ue$  = porção viscoelástica da curva (C) e  $R7 Ur/Uf$  ( Elasticidade biológica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). .... **121**

**Figura 94-**  $R2 = Ua / Uf$  elasticidade bruta antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC). .... **122**

**Figura 95-**  $R5 = U_r / U_e =$  elasticidade líquida (B) antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC).  
..... 122

**Figura 96-**  $R6 = U_v / U_e =$  porção viscoelástica da curva antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC). ..... 123

**Figura 97-**  $R7 U_r / U_f$  ( Elasticidade biológica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC).  
..... 123

**Figura 98-** Rugosidade da pele (A), número de rugas (B) e profundidade máxima da ruga (C) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). ..... 124

**Figura 99-** Espessura da derme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%).  
..... 124

**Figura 100 -** Relação de pixels de baixa ecogenicidade (PBE) em relação ao número total de pixels (PT) na derme inferior (A), na derme superior (B) e na derme total, antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). ..... 125

**Figura 101-** Espessura do estrato córneo (A) e espessura da camada granulosa (B) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). ..... 127

**Figura 102 -** Espessura do estrato córneo antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço braço dorsal (B) (média, 95% IC). ..... 127

**Figura 103-** Espessura da camada granulosa antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço braço dorsal (B) (média, 95% IC). ..... 128

**Figura 104-** Espessura da epiderme viável (A) e espessura total da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). ..... 128

**Figura 105-** Espessura da epiderme viável antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). ..... 128

**Figura 106-** Espessura total da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço braço dorsal (B) (média, 95% IC). ..... **129**

**Figura 107-** Profundidade das papilas dérmicas antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). ..... **129**

**Figura 108 -** Profundidade das papilas dérmicas antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). ..... **130**

**Figura 109-** Espessura mínima da epiderme (A) e Máxima espessura da epiderme (B) antes (T0) , e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). ..... **130**

**Figura 110-** Espessura mínima da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). ..... **131**

**Figura 111-** Máxima espessura da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). ..... **131**

**Figura 112-** Homogeneidade da epiderme superior (A) e inferior (B) antes (T0) , e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face. Score: 1 = epiderme homogênea até 4 = desarranjo total do padrão da epiderme(média, IC95%). ..... **131**

**Figura 113-** Homogeneidade da epiderme superior antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC).Score: 1 = epiderme homogênea até 4 = desarranjo total do padrão da epiderme(média, IC95%). ..... **132**

**Figura 114-** Homogeneidade da epiderme inferior antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC).Score: 1 = epiderme homogênea até 4 = desarranjo total do padrão da epiderme(média, IC95%). ..... **132**

**Figura 115-** Demarcação dos queratinócitos antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face. Score: 1 = Muito bem demarcado até 4= perda total da demarcação (média, IC95%). ..... **133**

**Figura 116-** Demarcação dos queratinócitos antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e

no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score: 1 = Muito bem demarcado até 4= perda total da demarcação (média, IC95%). ..... 133

**Figura 117-** Pigmentação da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face. Score: 1 = baixa pigmentação até 4= alta pigmentação (média, IC95%). ..... 134

**Figura 118-** Pigmentação da epiderme antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score: 1 = baixa pigmentação até 4= alta pigmentação (média, IC95%)...... 134

**Figura 119** – Padrão morfológico da junção dermoepidérmica (JDE) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). Score= 1 Anéis regulares, com contorno bem definidos até 4 = perda total da JDE. .... 134

**Figura 120-** Padrão morfológico da junção dermoepidérmica (JDE) antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score= 1 Anéis regulares, com contorno bem definidos até 4 = perda total da JDE..... 135

**Figura 121-** Brilho na camada basal antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). Score= 1 Baixo brilho até 4 = alto brilho..... 135

**Figura 122-** Brilho na camada basal antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score= 1 Baixo brilho até 4 = alto brilho..... 136

**Figura 123-** Imagens de microscopia confocal de reflectância a laser antes (A) e após 84 dias (B) de aplicação da formulação FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*). Observa-se maior homogeneidade da superfície cutânea, com melhoria da topografia em padrão romboidal, bem como a melhoria da homogeneidade da epiderme, com queratinócitos com tamanho e formato mais uniformes (Escala = 300µm). ..... 136

**Figura 124** - Imagens de microscopia confocal de reflectância a laser antes (A) e após 84 dias (B) de aplicação da formulação FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*). Observa-se maior homogeneidade, com redução da hiperpigmentação da epiderme (Escala: 200µm). ..... 137

**Figura 125-** Avaliação sensorial das formulações FV e FT ..... 137

**Figura 126-** Percepção de eficácia das formulações FV e FT ..... 138

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Fatores estudados no planejamento Box-Behnken e seus níveis +1, 0 , -1.....	<b>41</b>
<b>Tabela 2-</b> Planejamento Box-Behnken com fatores codificados. X1= % de Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO X2 = Proporção Steareth-21/Steareth-2 e X3= % Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30.....	<b>41</b>
<b>Tabela 3-</b> Formulações elaboradas para a etapa do planejamento experimental.....	<b>42</b>
<b>Tabela 4 -</b> Formulações selecionadas na primeira etapa do estudo.....	<b>43</b>
<b>Tabela 5–</b> Fatores estudados no planejamento Box-Behnken e seus níveis -1, 0 , +1.....	<b>44</b>
<b>Tabela 6-</b> Planejamento Box-Behnken com fatores codificados. X1=% de phytantriol.....	<b>44</b>
<b>Tabela 7 –</b> Formulações elaboradas para a etapa do planejamento experimental.....	<b>45</b>
<b>Tabela 8 –</b> Formulações selecionadas na segunda etapa.....	<b>46</b>
<b>Tabela 9-</b> Parâmetros da microscopia confocal de reflectância analisados no estrato córneo.....	<b>57</b>
<b>Tabela 10–</b> Parâmetros da microscopia confocal de reflectância analisados na epiderme viável.....	<b>57</b>
<b>Tabela 11–</b> Parâmetros da microscopia confocal de reflectância analisados na junção dermoepidérmica.....	<b>57</b>
<b>Tabela 12 –</b> Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) e VAM (Viscosidade aparente mínima) estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações sem adição do ativo.....	<b>62</b>
<b>Tabela 13 –</b> Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) e VAM (Viscosidade aparente mínima) estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 0,5% de Palmitato de retinila.....	<b>63</b>
<b>Tabela 14–</b> Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) e VAM (Viscosidade aparente mínima) estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 5% de Acetato de tocoferila.....	<b>63</b>
<b>Tabela 15 –</b> Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) , VAM (Viscosidade aparente mínima) e Tamanho de partícula (TP)	

estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 0,1% de *Tocoretinate* .....64

**Tabela 16** – Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) , VAM (Viscosidade aparente mínima), Oleosidade, Pegajosidade e Hidratação estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 0,1% de *Tocoretinate* .71

**Tabela 17** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 24 horas de preparo.....76

**Tabela 18** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 28 dias de armazenamento em temperatura ambiente , a 37°C e 45°C.....76

**Tabela 19** – Valores de pH das formulações da segunda etapa após 24 horas de preparo.....76

**Tabela 20** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente , a 37°C e 45°C.....76

**Tabela 21** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 28 dias de armazenamento em temperatura ambiente, a 37°C e 45°C.....77

**Tabela 22** - Espessura das diferentes camadas cutâneas na pele brasileira e francesa.....116

**Tabela 23** – Frequências absolutas e relativas de características observadas nas imagens da microscopia confocal de reflectância a laser. (NS: não significante).....116

**Tabela 24-** Número de voluntárias que completaram os estudos para cada tratamento.....118

**Tabela 25** - Média, desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV) coeficientes de correlação intraclasse (CCI com intervalo de confiança de 95%) para a reprodutibilidade intra-observador dos parâmetros obtidos in vivo em triplicata por microscopia confocal de reflectância no tempo inicial (T0) e após 84 dias (T84).....126

**Tabela 26-** Coeficientes de correlação intraclasse (CCI com intervalo de confiança de 95%) para a reprodutibilidade de tempo dos parâmetros obtidos por análise de imagem in vivo de microscopia confocal de reflectância no tempo inicial (T0) e depois de 84 dias (T84),.....126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína-1
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCI	Coeficiente de Correlação Intraclasse
CV	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
IL-4	Interleucina -4
ITA	Individual Topological Angle (ângulo tipológico individual)
IV	Infravermelho
JDE	Junção dermoepidérmica
LV	Luz Visível
Mbar	Milibar
MCR	Microscopia confocal de reflectância
mg	miligrama
MMP	Metaloproteinase
MSR	Metodologia de superfície de resposta
mW	miliwatt
PCA	Ácido pirrolidona carboxílico
pH	Potencial hidrogeniônico
RAR	Receptor de ácido retinoico
RXR	Receptor de retinoide X
TEWL	Transepidermal Water Loss (perda transepidérmica de água)
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TR	<i>Tocoretinate</i>
UV	Ultravioleta



## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	XIII
Lista de abreviaturas e siglas .....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS .....	5
2.1.1. Planejamento de Experimentos .....	5
2.1.2. Estabilidade Física de Formulações Cosméticas - Reologia .....	7
2.2. BIOLOGIA DA PELE E ENVELHECIMENTO CUTÂNEO .....	9
2.3. FOTOENVELHECIMENTO .....	13
2.3.1. Efeitos da radiação solar.....	14
2.3.1.1. Efeitos da radiação ultravioleta (UV) na pele .....	14
2.3.1.2. Efeitos da luz visível e radiação infravermelha na pele .....	17
2.4. TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO .....	19
2.4.1. Acetato de Tocoferila .....	20
2.4.2. Retinoides .....	20
2.4.2.1. Éster de all-trans-ácido retinoico e D- $\delta$ -tocoferol .....	22
2.5. TÉCNICAS DE BIOFÍSICA E ANÁLISE DE IMAGEM NA CARACTERIZAÇÃO DA PELE E NA AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE PRODUTOS COSMÉTICOS.....	23
2.5.1. Ultrassom de alta frequência .....	28
2.5.2. Microscopia confocal de reflectância a laser (MCR) .....	29
2.6. ANÁLISE SENSORIAL E PERCEPÇÃO DE EFICÁCIA.....	33
3. OBJETIVO.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. MATÉRIAS PRIMAS .....	38
4.2. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS .....	39
4.3. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	40
4.3.1. Etapa 1: Estudo dos efeitos da concentração da cera auto emulsionante, polímero hidrofílico e proporção de tensoativos não iônicos. ....	40
4.3.1.1. Determinação do Comportamento Reológico .....	42
4.3.1.2. Análise da distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz .....	42
4.3.1.3. Formulações selecionadas .....	43

4.3.2. Etapa 2 – Estudo dos efeitos da concentração de lecitina de soja, phytantriol e triglicérides do ácido cáprico e caprílico.....	43
4.3.2.1. Determinação do Comportamento Reológico.....	45
4.3.2.2. Avaliação dos Efeitos Imediatos – Hidratação.....	45
4.3.2.3. Avaliação sensorial.....	45
4.3.2.4. Formulações selecionadas.....	46
4.4. TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE.....	46
4.4.1. Centrifugação.....	47
4.4.2. Determinação do pH.....	47
4.4.3. Avaliação das características organolépticas.....	47
4.5. ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA.....	47
4.6. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES.....	47
4.6.1. Análise por Microscopia de luz polarizada.....	47
4.6.2. Análise da distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz.....	48
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	49
5.1. TRIAGEM DE VOLUNTÁRIAS.....	50
5.1.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	50
5.1.2. Protocolos de estudos clínicos.....	51
5.1.2.1. Caracterização da pele fotoenvelhecida em dois grupos de idade.....	51
5.1.2.2. Caracterização da pele fotoenvelhecida no Brasil e na França.....	51
5.1.2.3. Avaliação de eficácia clínica de formulações dermocosméticas.....	52
5.1.3. Questionário de avaliação de hábitos de proteção e exposição solar.....	52
5.1.4. Avaliação da percepção dos sinais do fotoenvelhecimento.....	53
5.1.5. Avaliação por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele.....	53
5.1.5.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo.....	53
5.1.5.2. Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL).....	53
5.1.5.3. Determinação das propriedades viscoelásticas da pele.....	53
5.1.5.4. Determinação do microrrelevo cutâneo.....	55
5.1.5.5. Avaliação das características da derme.....	55
5.1.5.6. Determinação da coloração da pele.....	55
5.1.5.7. Avaliação das características morfológicas e estruturais da epiderme e derme papilar.....	56
5.1.5.8. Avaliação fotográfica de alta resolução.....	58
5.1.5.9. Imagem 3D.....	58
5.1.6. Avaliação Sensorial.....	59
5.1.7. Percepção de eficácia.....	59
5.1.8. Delineamento Estatístico.....	59
5.1.8.1. Caracterização da pele fotoenvelhecida em dois grupos de idade.....	59
5.1.8.2. Caracterização da pele fotoenvelhecida no Brasil e na França.....	60
5.1.8.3. Avaliação de eficácia clínica de formulações dermocosméticas.....	60
6. RESULTADOS.....	61
6.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	62
6.1.1. Etapa 1: Estudo dos efeitos da concentração da cera autoemulsionante, polímero hidrofílico e proporção de tensoativos não iônicos.....	62
6.1.1.1. Análise Estatística para Índice de Consistência (IC):.....	64

6.1.1.2.	Análise Estatística para Índice de Fluxo (IF): .....	65
6.1.1.3.	Análise Estatística para Área de Histerese (AH).....	67
6.1.1.4.	Análise Estatística para Viscosidade Aparente Mínima (VAM).....	68
6.1.1.5.	Análise estatística para tamanho de partícula.....	69
6.1.2.	Etapa 2 – Estudo dos efeitos da concentração de lecitina de soja, phytantriol e triglicérides do ácido cáprico e caprílico.....	70
6.1.2.1.	Análise Estatística - Parâmetros Reológicos .....	71
6.1.2.2.	Análise Estatística – Avaliação Sensorial .....	72
6.1.2.3.	Análise Estatística – Hidratação .....	74
6.1.3.	Testes preliminares de estabilidade .....	75
6.1.3.1.	Centrifugação.....	75
6.1.3.2.	Avaliação Visual.....	75
6.1.3.3.	Determinação do pH das formulações.....	75
6.1.4.	Estudo da estabilidade física por determinação do comportamento reológico ....	77
6.1.5.1.	Análise por Microscopia de luz polarizada .....	84
6.1.5.2.	Análise do tamanho médio de partícula .....	88
6.2.	ESTUDO CLÍNICO .....	89
6.2.1.	Caracterização da pele fotoenvelhecida em dois grupos de idade.....	89
6.2.1.1.	Questionário de avaliação de hábitos de proteção e exposição solar .....	89
6.2.1.2.	Avaliação da Percepção dos sinais do fotoenvelhecimento .....	89
6.2.1.3.	Avaliação por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele .....	90
6.2.1.3.1.	Conteúdo aquoso do estrato córneo.....	90
6.2.1.3.2.	Perda transepidérmica de água (TEWL) .....	91
6.2.1.3.3.	Propriedades viscoelásticas da pele.....	91
6.2.1.3.4.	Microrrelevo cutâneo.....	93
6.2.1.3.5.	Avaliação das características da derme .....	95
6.2.1.3.6.	Coloração da pele .....	97
6.2.1.3.7.	Avaliação das camadas da pele em nível celular.....	98
6.2.1.3.8.	Índice de Fotoenvelhecimento.....	102
6.2.2.	Caracterização da pele fotoenvelhecida no Brasil e na França .....	104
6.2.2.1.	Questionários .....	104
6.2.2.1.1.	Características da pele e uso de cosméticos .....	104
6.2.2.1.2.	Hábitos de proteção e exposição solar.....	106
6.2.2.2.	Caracterização da pele por técnicas de biofísica e análise de imagem.....	108
6.2.2.2.1.	Fotografias de alta resolução .....	108
6.2.2.2.2.	Análise 3D .....	109
6.2.2.2.3.	Coloração da pele .....	111
6.2.2.2.4.	Perda de água transepidérmica .....	111
6.2.2.2.5.	Conteúdo aquoso do estrato córneo.....	112
6.2.2.2.6.	Microrrelevo cutâneo.....	113
6.2.2.2.7.	Viscoelasticidade da pele.....	113
6.2.2.2.8.	Espessura e Ecogenicidade da derme .....	114
6.2.2.2.9.	Características morfológicas e estruturais da epiderme .....	115
6.2.3.	Avaliação de eficácia clínica de formulações dermocosméticas.....	118
6.2.3.1.	Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo .....	118
6.2.3.2.	Perda de água transepidérmica .....	119
6.2.3.3.	Viscoelasticidade da pele.....	121
6.2.3.5.	Espessura e ecogenicidade da derme.....	124
6.2.3.6.	Características estruturais e morfológicas da epiderme .....	125
6.2.3.6.1.	Estudo de reprodutibilidade.....	125

6.2.3.6.2. Eficácia Clínica.....	127
6.2.3.7. Análise sensorial e percepção de eficácia.....	137
7. DISCUSSÃO.....	139
8. CONCLUSÕES.....	156
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159
ANEXOS.....	174
APÊNDICE.....	178

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

Com o aumento da expectativa de vida, a busca por produtos cosméticos eficazes para a prevenção e tratamento de diferentes alterações cutâneas decorrentes do envelhecimento tem sido uma constante por parte do consumidor e um grande desafio para os profissionais que atuam na área de Pesquisa & Desenvolvimento de dermocosméticos, o que demanda o conhecimento da biologia da pele para o desenvolvimento de produtos dermocosméticos específicos, compatíveis com a pele e eficazes.

A evolução do estudo da biologia da pele nos últimos anos trouxe um novo patamar no entendimento dos efeitos de produtos dermocosméticos. Atualmente a pele é considerada como um órgão ativo, com características metabólicas e imunológicas relevantes e os estudos de caracterização cutânea tem sido um assunto de destaque por grandes grupos científicos internacionais para o melhor entendimento da influência de fatores como etnicidade, genética, gênero, idade, e fatores externos como, poluição, estilo de vida, exposição solar nas diferentes características cutâneas.

Em regiões onde os hábitos de exposição solar são contínuos e o índice de radiação UV é alto, os sinais precoces do fotoenvelhecimento são características comuns de grande preocupação na população devido ao seu caráter inestético. Assim, a proposta deste estudo inclui a caracterização a nível celular e avaliação das alterações cutâneas decorrentes do fotoenvelhecimento em diferentes grupos de idade, e também a comparação da pele brasileira e francesa. Os estudos de caracterização fundamentam o desenvolvimento de formulações dermocosméticas direcionadas para a prevenção das alterações cutâneas e melhoria das condições gerais da pele fotoenvelhecida.

Dentre as opções de tratamentos tópicos para a pele fotoenvelhecida, o ácido retinoico tem sido muito utilizado para tal finalidade, sendo considerado, como “padrão ouro” para a melhoria das condições da pele fotoenvelhecida. No entanto, devido aos seus efeitos adversos, há uma intensa busca de substâncias ativas que sejam eficazes e que não apresentem tais efeitos. Nesse contexto, faltam estudos clínicos controlados, randomizados, avaliados por métodos objetivos, que permitam a comprovação de eficácia clínica de substâncias ativas alternativas ao ácido retinoico.

O presente estudo apresentou o desenvolvimento, e avaliação de estabilidade e eficácia de formulações dermocosméticas contendo um composto inovador, alternativo ao ácido retinoico, o *Tocoretinate*, bem como do palmitato de retinila e do acetato de tocoferila, os quais, embora de uso consagrado, não foram estudados pelos métodos propostos. Tal contribuição, inédita na área cosmética, permitiu não apenas a elucidação dos efeitos clínicos em tempo real dos ésteres de vitaminas A e E, mas também a avaliação de eficácia e

mecanismo de ação de uma substância ativa inovadora, o *Tocoretinate*, avaliando de forma detalhada a relação custo benefício de cada tratamento em diferentes alterações cutâneas, tais como manchas, rugas, e perda de firmeza, as quais são características marcantes da pele fotoenvelhecida.

Dentre as técnicas utilizadas no presente estudo, destaca-se a microscopia confocal de reflectância a laser. Além da riqueza de resultados explorados pela presente técnica, a mesma apresenta como diferencial a não necessidade da realização de biopsias, uma vez que se trata de um método não invasivo, não há perda de tecido e descarta a presença de artefatos. O presente estudo contribui para a padronização da técnica e definição de parâmetros para aplicação na pesquisa clínica de cosméticos, permitindo a definição de protocolos adequados e uma nova era em treinamento de recursos humanos para avaliar as características da pele. Além disso, a presente técnica segue a tendência em pesquisa clínica na área de produtos dermocosméticos, que envolve a “medicina baseada em evidências clínicas” e o não uso de animais para realização de experimentos.

Em síntese, o trabalho é relevante para as áreas cosmética e dermatológica tanto em termos de novas opções de formulações eficazes e seguras para os cuidados e proteção da pele, como na indicação de uso direcionado de acordo com a biologia da pele

## ***2. REVISÃO DA LITERATURA***

---



## **2.1. Desenvolvimento de formulações cosméticas**

A área de Pesquisa & Desenvolvimento de Cosméticos é uma área dinâmica, em que os ciclos de vida dos produtos são geralmente curtos, o que requer a constante inovação de formulações cosméticas e a proposta de conceitos inovadores. Considerando as diversificadas matérias primas que compõem um produto cosmético e as interações entre elas, o desenvolvimento de um produto cosmético é uma etapa que requer um vasto conhecimento das matérias primas que compõem os produtos bem como da forma que elas interagem.

No desenvolvimento de dermocosméticos, não é apenas a escolha das substâncias ativas adequadas e sua concentração de uso que são determinantes para a eficácia do produto final. O desenvolvimento do veículo adequado é imprescindível para a obtenção de um produto com as qualidades requeridas, uma vez que o veículo influencia significativamente na estabilidade, eficácia, segurança e aceitabilidade do dermocosmético.

Assim, durante o processo de desenvolvimento de uma formulação, após a seleção das matérias primas, a escolha das concentrações destas é um grande desafio para o formulador. A proporção de matérias primas em uma formulação influencia diretamente em parâmetros como estabilidade, consistência, espalhabilidade, aparência, e características sensoriais das formulações. Portanto, muitas vezes é necessário que o formulador realize múltiplos experimentos com a finalidade de encontrar o balanço das concentrações de matérias primas, e obter a formulação ideal desejada. Essa investigação pode tornar o processo de desenvolvimento cosmético dispendioso e muitas vezes empírico, e podendo não chegar à formulação ideal desejada.

Diante dos desafios enfrentados pelo formulador cosmético, estudos estatísticos podem ser utilizados como ferramenta para auxiliar nestas etapas. Nesse contexto, técnicas estatísticas de planejamento experimental vêm sendo utilizadas em diversas áreas do conhecimento para a otimização de processos e produtos com a finalidade de encontrar as condições ótimas e obtenção de um produto com as características desejadas (COSTA-MACHADO; BASTOS; DE FREITAS, 2013; TACON; FREITAS, 2013).

### **2.1.1. Planejamento de Experimentos**

Considerando a importância da composição adequada da formulação no desenvolvimento de produtos cosméticos estáveis, seguros e eficazes, o planejamento experimental é uma ferramenta de grande valia uma vez que possibilita a análise de muitas variáveis (fatores) de um processo produtivo, e permite obter um número maior de

informações utilizando um menor número de experimentos (COSTA-MACHADO; BASTOS; DE FREITAS, 2013; FERREIRA et al., 2007; TACON; FREITAS, 2013).

Dentre os métodos de planejamento experimental usualmente utilizados, o planejamento fatorial é o mais indicado para o estudo dos efeitos de duas ou mais variáveis de influência. Exemplos de planejamentos experimentais são os planejamentos fatoriais completo e fracionado. Planejamento fatorial é definido como aquele em que todos os fatores estudados variam de forma constante e planejada (EDWARDS; MEE, 2010; PEREIRA, 2015).

Este tipo de planejamento normalmente é representado por  $(X_n)$ , sendo que “n” representa o número de fatores e “X” o número de níveis escolhidos. Assim, são determinados valores para os fatores em estudo, chamados de níveis codificados como -1, 0 e 1, que correspondem aos níveis baixo, intermediário e alto, respectivamente (DE BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003; PEREIRA, 2015).

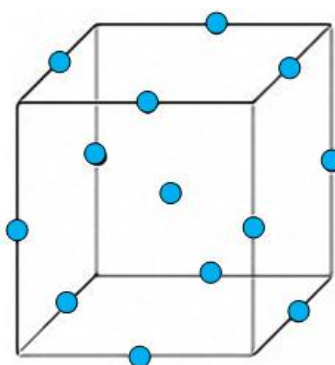
No planejamento fatorial completo são realizadas todas as combinações possíveis entre os diferentes fatores. O planejamento fatorial fracionado otimiza a quantidade de experimentos sem prejudicar a quantidade e qualidade de informações fundamentais para a análise, sendo, portanto, mais rápido e econômico. Os planejamentos fatoriais fracionados são usados quando não se conhece ainda a relação completa destes fatores nas respostas obtidas e o número de fatores estudados é grande (DE BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003; PEREIRA, 2015).

A escolha do planejamento que melhor se ajusta às condições experimentais do estudo é uma etapa fundamental no desenvolvimento do método. Métodos de superfície de resposta são usados para examinar a relação entre uma resposta e um conjunto de variáveis experimentais quantitativas ou fatores. Estes métodos são frequentemente utilizados depois de ter identificado fatores controláveis e possibilita encontrar as configurações de fator que otimizam a resposta (DE BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Esse método pode ser utilizado para: encontrar as condições operacionais que produzem a melhor resposta; encontrar as configurações que satisfaçam as especificações de um processo; identificar novas condições no processo que acarretam em melhorias na qualidade do produto ou para identificar a composição de produtos que vão gerar a resposta desejada. Além disso, com esta técnica, é possível criar modelos que estabelecem uma relação entre os fatores quantitativos e a resposta (DE BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003; PEREIRA, 2015).

O planejamento fatorial do tipo Box-Behnken é indicado quando se quer utilizar uma metodologia de superfície de resposta num estudo de três fatores em três níveis (EDWARDS; MEE, 2010; FERREIRA et al., 2007).

O planejamento Box-Behnken é um modelo quadrático independente, em que todos os pontos do projeto são ou no centro do desenho ou centrada sobre as extremidades do cubo, equidistantes do centro. O diagrama abaixo (Figura 1) representa um desenho experimental de três fatores. Os pontos representam os ensaios experimentais que são realizados, sendo que o ponto central é realizado em triplicata (BOX; BEHNKEN, 1960; EDWARDS; MEE, 2010; FERREIRA et al., 2007).



**Figura 1-** Representação esquemática dos pontos do planejamento Box-Behnken no cubo multidimensional.

O planejamento Box-Behnken não contém todas as combinações possíveis entre os diferentes fatores, o que contribui na realização de um menor número de ensaios experimentais e evita a realização de experimentos desnecessários em condições extremas, o que poderia fornecer resultados insatisfatórios (PEREIRA, 2015). O Box-Behnken permite a elaboração de um modelo polinomial de segunda ordem para caracterizar e/ou otimizar um processo com um número de experimentos reduzidos (DE BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

### **2.1.2. Estabilidade Física de Formulações Cosméticas - Reologia**

O objetivo da avaliação de estabilidade de produtos cosméticos é garantir que um produto atenda às características físicas, químicas e microbiológicas, bem como a manutenção da funcionalidade e das características estéticas quando armazenada em condições apropriadas (MARX, 2004).

Os testes acelerados de estabilidade são amplamente utilizados na área de produtos cosméticos devido ao ciclo de vida curto dos produtos. Para realizar este teste, as amostras são

mantidas em temperaturas mais altas que a temperatura ambiente, e observações e análises são realizadas após determinados períodos de tempo (MAIA CAMPOS; MARA SILVA, 2000; MARX, 2004).

Considerando a estabilidade física, esta é a propriedade que produtos cosméticos apresentam de manter suas características físicas como cor, odor, textura, consistência, sensação ao tato e comportamento reológico de forma inalterada após o processo de fabricação (D'LEON, 2001).

Nesse sentido, destaca-se a determinação do comportamento reológico da formulação, que auxilia na avaliação do desempenho do produto final durante a aplicação, bem como a avaliação da natureza física do veículo, de tal forma possibilita detectar sinais precoces de instabilidade física, facilitando o controle de qualidade dos constituintes da formulação e dos produtos finais (GUARATINI; GIANETI; CAMPOS, 2006; MANÇO et al., 2015).

Os materiais geralmente podem apresentar dois comportamentos de acordo com as características de fluxo: Newtonianos e não-Newtonianos. Os fluidos Newtonianos apresentam valores constantes de viscosidade independentemente da força que for aplicada, ou seja, a tensão de cisalhamento. Por outro lado, o fluido não Newtoniano apresenta alteração nos valores de viscosidade em relação à força aplicada. Os fluidos Não Newtonianos podem ser classificados como dilatantes, quando apresentam aumentam da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento, ou plásticos ou pseudoplásticos quando apresentam diminuição nos valores de viscosidade nessas condições (CORRÊA et al., 2005; JIAO; BURGESS, 2003; MASON, 1999).

O fluido pseudoplástico é o mais interessante e também o mais comum em formulações cosméticas para os cuidados com a pele. Os produtos precisam de viscosidade e consistência iniciais adequadas, e um “afinamento”, redução da viscosidade, é interessante para a boa espalhabilidade do produto e melhor cobertura da pele (MASON, 1999).

Dentre os principais parâmetros avaliados por meio do estudo reológico podemos destacar a viscosidade aparente mínima, os índices de fluxo e consistência e a tixotropia. O acompanhamento dessas características ao longo do tempo permite controlar a qualidade do produto acabado e também avaliar os efeitos do produto durante o período de estocagem (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003b; MANÇO et al., 2015).

## 2.2. Biologia da pele e envelhecimento cutâneo

Entre todos os nossos órgãos, a pele ocupa uma posição única, e está em contato ao mesmo tempo com os meios externo e interno. A pele exerce várias funções como: proteção contra micro-organismos, substâncias e radiações lesivas; sensibilidade, manutenção da temperatura corporal; prevenção da excessiva perda de água, e produção de vitamina D (CAMPOS; MERCÚRIO, 2009).

A pele é constituída por camadas: a epiderme, derme e o tecido subcutâneo. A epiderme é a camada mais externa, representando a barreira fisiológica de proteção (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A epiderme é dividida em diferentes camadas: a camada basal, a mais profunda da epiderme, formada preferencialmente por células com intensa atividade mitótica que darão origem aos queratinócitos. As células da camada basal são responsáveis pela renovação celular contínua, sendo que 15% destas células são responsáveis pelo processo constante de renovação celular e as células restantes se mantêm em um estado quiescente (BLANPAIN; FUCHS, 2006).

A camada espinhosa, que ainda possui células com atividade mitótica, contém queratinócitos que podem ser identificados por expansões citoplasmáticas com tonofilamentos de queratina. Nas camadas inferiores da epiderme, a membrana celular do queratinócitos é composta pela dupla camada fosfolipídica, a qual é muito permeável à água, o que prejudica a sobrevivência em ambientes de baixa umidade. Portanto, na camada superior, a camada granulosa, as membranas celulares dos queratinócitos são transformadas em um envelope composto por queratina, onde há achatamento dos queratinócitos (WICKETT; VISSCHER, 2015). A camada lúcida, presente em peles espessas, encontra-se entre a camada granulosa e a camada córnea.

O estrato córneo é constituído por células achatadas, mortas, sem núcleos e citoplasma abundante em queratina, que apresentam resistência ao impacto, além de impedir a perda transepidérmica de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Uma função adequada da barreira de permeabilidade da epiderme de um mamífero é garantida pela arquitetura característica do estrato córneo.

Assim, a função primária da epiderme é a produção de um estrato córneo protetor, semipermeável que permite o contato com o ambiente externo. Esta camada superior é constituída por um compartimento lipídico extracelular altamente organizado, que está firmemente unida a corneócitos. A geração do compartimento lipídico extracelular e a

transformação dos queratinócitos em corneócitos são as principais características da diferenciação epidérmica (MADISON, 2003).

Além da diferenciação, igualmente importante é a renovação contínua do estrato córneo, que é garantido por um cuidadoso equilíbrio entre a reconstituição dos novos queratinócitos a partir da camada basal em proliferação, e a perda bem orquestrada das células mais superficiais após a morte celular programada na epiderme (HOUBEN; DE PAEPE; ROGIERS, 2007). Em uma epiderme saudável, há um equilíbrio entre os processos de proliferação e descamação o que resulta em um ciclo completo de renovação em um período de 28 dias (BARONI et al., 2012; WEBB; LI; KAUR, 2004).

Os hidratantes naturais da pele são importantes para a manutenção de uma hidratação adequada no estrato córneo, permitindo que ele descame apropriadamente. O fator de umectação natural é composto por lactato, aminoácidos formados a partir da quebra de filagrina, por PCA (ácido carboxílico da pirrolidona), ácido urocânico, sais inorgânicos, açúcares e ureia (WICKETT; VISSCHER, 2015). A superfície cutânea tem um pH de superficial de 4 a 5,5, o qual é chamado de manto ácido da pele, que apresenta função protetora (LAMBERS et al., 2006).

A epiderme é constituída preferencialmente por queratinócitos, mas também possui outras células como melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel, e linfócitos. As células de Langerhans possuem papel importante para a barreira imunológica da pele, as células de Merkel participam da percepção sensorial e os melanócitos situam na camada basal da epiderme, e possuem a função de proteger a pele da radiação UV e dar a coloração ao tecido cutâneo. Uma vez que há a transferência de melanossomos, contendo melanina para os queratinócitos, há uma proteção do núcleo celular dos queratinócitos pelos chapéis de melanina. Os linfócitos são encontrados na epiderme em caso de inflamação (WICKETT; VISSCHER, 2015).

A junção dermoepidérmica (JDE) na pele humana é caracterizada pela presença de uma rede complexa de papilas dérmicas, as quais são invaginações da derme que se projetam na epiderme. Estas protusões aumentam a superfície de contato entre as camadas, proporcionam adesão e representa uma interface dinâmica entre a epiderme e derme, favorecendo a troca de oxigênio e nutrientes. A JDE restringe o trânsito de moléculas, de acordo com tamanho e carga, permite a passagem seletiva de algumas células e serve como suporte para a epiderme e influencia o comportamento dos queratinócitos pela mudança da polaridade das células e a proliferação, migração e diferenciação dos mesmos (BURGESON; CHRISTIANO, 1997; CIARLETTA; BEN AMAR, 2012). Este complexo de ancoragem é

composto por hemidesmossomos, filamentos e fibrilas de ancoragem (BURGESON; CHRISTIANO, 1997; TIMPL, 1996).

A membrana basal ou lâmina basal é o nome da estrutura de 0,5-1µm de espessura que une as células da camada basal ao tecido frouxo da epiderme (CIARLETTA; BEN AMAR, 2012).

A derme é a camada abaixo da epiderme, vascularizada constituída por tecido conjuntivo denso fibroelástico, que acomoda e nutre a epiderme. Nessa camada estão presentes as raízes dos pelos, as glândulas, terminações nervosas, arteríolas e vênulas, alguns tipos de células, sendo a maioria fibroblastos, e fibras de colágeno e elastina (EDWARDS; MARKS, 1995). O colágeno fornece a sustentação e previne o estiramento excessivo. A elastina permite a volta da pele após a distensão (MENON; KLIGMAN, 2009; PEDERSEN; JEMEC, 2006).

A derme humana é dividida em duas camadas que possuem características histológicas distintas: a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar é uma camada delgada que contorna e suporta a epiderme, constituída por tecido conjuntivo frouxo, onde existem fibrilas especiais de colágeno se inserem na membrana basal e penetram na derme mais profunda. Estas fibrilas tem a função de unir a derme à epiderme (PROST-SQUARCIONI et al., 2008; SORRELL; CAPLAN, 2004). A derme reticular é a camada abaixo, caracterizada por fibras de colágeno e elastina que atuam na força e resiliência da pele (MONTES, 1996; USHIKI, 2002).

Na pele humana, tem sido relatado que os fibroblastos cultivados que foram isolados a partir da derme superior e da camada mais profunda apresentam propriedades distintas quanto à morfologia celular, ao potencial proliferativo, à elaboração da matriz extracelular e à produção e resposta para fatores de crescimento e citocinas (MINE et al., 2008; SORRELL; BABER; CAPLAN, 2004).

A integridade estrutural da pele é formada principalmente por colágeno. O colágeno é a principal proteína fibrosa insolúvel encontrada no tecido conjuntivo e na matriz extracelular dérmica, onde fornece a pele força e resistência. O colágeno é produzido a partir de precursores (pró-colágeno), que são expressos por meio da codificação de genes a partir de fibroblastos dérmicos. Existem numerosos tipos de pró-colagenona pele humana e opró-colágeno dos tipos I e III são sintetizados em maior abundância em relação a outros tipos (POON; KANG; CHIEN, 2015).

As fibras elásticas são compostas por microfibrilas e componentes de elastina, composta por fibrilas por volta de 0,1-0,2 µm de espessura. As fibras elásticas são contínuas

com redes ou aglomerados de microfibrilas e forma, portanto uma rede elástica (USHIKI, 2002).

O tecido subcutâneo é constituído principalmente por células de gordura denominadas adipócitos, que servem como depósito nutritivo de reserva, e participa do isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos (BECHELLI; CURBAN, 1988).

A pele também possui na sua constituição apêndices cutâneos essenciais para a proteção e a manutenção da homeostasia. Dentre eles temos a glândula sebácea e a glândula sudorípara, responsáveis pela produção de sebo e sudorese, respectivamente, e os pelos e unhas, para proteção (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

De acordo com a variedade de estruturas, funções e tecidos da pele, podemos destacar a importância da manutenção de uma pele saudável, com características que permitam exercer sua função de proteção adequada. Além disso, considerando que a pele é a interface com meio externo, essa também apresenta influência em fatores psicossociais, sendo alvo de tratamentos cosméticos e dermatológicos por alterações de caráter inestético que apresentam impacto na qualidade de vida. Neste contexto, o estudo do envelhecimento cutâneo tem ganhado cada vez mais destaque, devido ao aumento da expectativa de vida da população e a preocupação constante de manter a aparência de uma pele jovem e saudável (FARAGE et al., 2013).

O envelhecimento cutâneo é um processo complexo que envolve alterações estruturais, celulares e da matriz extracelular devido a fatores intrínsecos e extrínsecos. As alterações características do envelhecimento intrínseco envolvem alterações relacionadas a modificações do material genético, a alterações proteicas e à diminuição da proliferação celular, que podem se manifestar tanto na epiderme quanto na derme, sendo que uma das principais alterações é a atrofia cutânea causada pela redução da atividade metabólica (ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011).

A hidratação da pele diminui com o envelhecimento e isso acarreta redução da flexibilidade da pele, descamação da mesma e a formação de rugas, visto que há o ressecamento do estrato córneo. Além disso, ocorre diminuição do conteúdo lipídico na pele, que auxilia na formação de barreira semipermeável para a passagem de água. A perda de compostos higroscópicos, entre eles o ácido hialurônico, juntamente com a depleção de lipídeos, reduz a retenção e difusão da água na pele (WARREN et al., 1991; ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011).

Com o envelhecimento intrínseco, ocorre uma menor atividade metabólica de queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e fibroblastos, além da redução da



biossíntese de colágeno, e a redução das microfibrilas de elastina, as quais se apresentam com uma aparência fragmentada (RABE et al., 2006).

### **2.3. Fotoenvelhecimento**

Além das modificações metabólicas e estruturais decorrentes do tempo, o que caracteriza o envelhecimento intrínseco ou cronológico, a pele, órgão que protege e reveste nosso corpo, está em contato direto com o meio ambiente e, portanto, está suscetível ao envelhecimento como consequência de danos ambientais (GJ et al., 2002; GRIFFITHS, 1992; TSOURELI-NIKITA; WATSON; GRIFFITHS, 2006)

Ao contrário do envelhecimento cronológico, o fotoenvelhecimento depende principalmente do grau de exposição ao sol e pigmentação da pele. Os indivíduos que têm estilos de vida ao ar livre, vivem em climas ensolarados, e apresentam pele levemente pigmentada e não apresentam hábitos de fotoproteção, podem apresentar maior grau de fotoenvelhecimento, sendo uma característica comum em regiões em que o índice de radiação ultravioleta (UV) é alto (KLIGMAN; KLIGMAN, 1986; RABE et al., 2006; WARREN et al., 1991).

O fotoenvelhecimento consiste nos efeitos da radiação solar somados ao envelhecimento cronológico da pele. Muitas das funções que já estão reduzidas com o envelhecimento, podem ser ainda mais prejudicadas na pele fotoenvelhecida (RABE et al., 2006).

Assim, as alterações bioquímicas decorrentes da exposição à radiação ultravioleta resultam em sinais clínicos característicos do fotoenvelhecimento: presença de rugas finas e profundas, flacidez, rugosidade, alterações no padrão de pigmentação, fragilidade, cicatrização prejudicada, e telangiectasia (TSOURELI-NIKITA; WATSON; GRIFFITHS, 2006).

Outra consequência a longo prazo da exposição excessiva à radiação ultravioleta são neoplasias malignas da pele, que podem variar de danos pré cancerígenos como queratose solar actínica até cânceres invasivos como o melanoma (GODAR, 2011; KIM; ARMSTRONG, 2012).

O principal fator ambiental que influencia no envelhecimento cutâneo é a radiação ultravioleta (UV), sendo que a exposição crônica à radiação leva ao fotoenvelhecimento. Além disso, recentemente tem sido estudado os efeitos deletérios de outros componentes do espectro solar: a luz visível (LV) e do infravermelho (IV). Essas fontes de radiação

influenciam o metabolismo cutâneo por diferentes mecanismos (POON; KANG; CHIEN, 2015).

### **2.3.1. Efeitos da radiação solar**

O espectro solar é composto majoritariamente pela radiação ótica, que consiste na radiação ultravioleta, radiação visível e radiação infravermelha.

A radiação ultravioleta é caracterizada pelos comprimentos de onda de 100 a 400 nm, e representa em torno de 10% da radiação solar que atinge a atmosfera. O espectro da luz visível contempla os comprimentos de onda de 400- a 780 nm, e representa 40% da radiação solar. A radiação infravermelha, com comprimentos de onda acima de 780nm, representa os 50% restantes da radiação solar (SCHALKA et al., 2014).

#### **2.3.1.1. Efeitos da radiação ultravioleta (UV) na pele**

Dentre as radiações solares, os efeitos deletérios da radiação ultravioleta na pele tem sido amplamente descritos na literatura.

A radiação ultravioleta é classificada em UVA, UVB e UVC, sendo a radiação UVC filtrada pela camada de ozônio. A radiação ultravioleta A (320-400 nm) possui grande capacidade de penetração na pele e está envolvida na maioria das reações fotoalérgicas, algumas reações fototóxicas, carcinogênese, fotoenvelhecimento cutâneo e reações de fotossensibilização (MAHMOUD et al., 2010; SCHALKA et al., 2014). A radiação UVA tem sido relacionada com a geração indireta de radicais livres levando a quebras na estrutura do DNA (POON; KANG; CHIEN, 2015).

Recentemente a radiação UVA foi classificada na literatura em dois comprimentos de onda: UVA-I (315-340 nm) e UV-AII (340-400nm), baseada em pesquisas recentes que mostram diferentes tipos de interação fotobiológica destas duas bandas com o DNA (SCHALKA et al., 2014; WANG et al., 2014).

O comprimento de onda da radiação UVB (290–320 nm) é bem menor e possui mais energia, penetra principalmente até a epiderme. A radiação UVB induz danos no DNA por interações indiretas com citocinas epidermais, que resulta na mutagênese do DNA e formação dímeros de ciclobutanos e outros fotoprodutos. A radiação UVB está envolvida nas reações fotocarcinogênicas e causa uma redução nas funções imunológicas da pele, esta ainda é responsável pelo eritema solar, estimula a pigmentação tardia, levando a morte de células

epidérmicas e liberação de mediadores inflamatórios próprios da queimadura solar (BURNETT; WANG, 2011).

A radiação UV possui diversos efeitos diretos e indiretos na pele, que envolvem alterações na maquinaria celular, danos no DNA e stress oxidativo. É estimado que em torno de 50% do dano induzido pela radiação UV seja devido á formação de radicais livres (BERNSTEIN et al., 2004; RABE et al., 2006).

A radiação UV pode reagir diretamente com as macromoléculas da pele, como o DNA. A partir da absorção da luz UV pelos nucleotídeos, há formação de fotoprodutos do DNA, sobretudo as bases pirimidínicas, prejudicando a replicação de queratinócitos durante a divisão celular ou introduzindo mutações que antecipam o processo de envelhecimento (WLASCHEK et al., 2001). Essas mutações no DNA podem estar relacionadas com sinais clínicos do fotoenvelhecimento, como rugas, aumento da elastina e degradação do colágeno e com a carcinogênese (POON; KANG; CHIEN, 2015; RABE et al., 2006; SHAH; RAWAL MAHAJAN, 2013). Também tem sido descrito o envolvimento da radiação UV na redução dos telômeros, favorecendo o processo de senescência celular (POON; KANG; CHIEN, 2015).

Além do dano direto nas macromoléculas, a radiação UVA, e em um menor grau, a UVB, podem danificar o DNA e outras macromoléculas indiretamente por meio da geração de radicais livres de oxigênio (SHAH; RAWAL MAHAJAN, 2013).

O dano oxidativo prejudica várias estruturas celulares como ácidos nucléicos, proteínas celulares, e lipídeos e também desencadeia diversas cascatas relacionadas a reações inflamatórias responsáveis pelo fotoenvelhecimento, induz a síntese de metaloproteinases que causam degradação de colágeno resultando em rugas, e causam disfunção de melanócitos originando alterações no padrão de pigmentação da pele (PINNELL, 2003).

Desta forma, a radiação ultravioleta leva a danos cutâneos por meio de mecanismos relacionados ao *stress oxidativo*, gerando espécies reativas de oxigênio, que incluem ânion superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlete, e peróxido de hidrogênio, que podem propagar a formação de radicais livres (POON; KANG; CHIEN, 2015; RABE et al., 2006; SHAH; RAWAL MAHAJAN, 2013).

A radiação UV também possui um papel importante na pigmentação da pele. A melanina é um biopolímero complexo sintetizado nos melanócitos e armazenada em organelas citoplasmáticas chamadas de melanosomos, promovendo a proteção contra o dano causado pela radiação ultravioleta por meio da absorção e espalhamento da radiação UV (VANDERSEE et al., 2015).

A melanogênese envolve vários passos: a transcrição de proteínas necessárias para a melanogênese, biogênese dos melanossomos, a passagem de proteínas melanogênicas, o transporte dos melanossomos para a extremidade dos dendritos dos melanócitos, e a transferência dos melanossomos aos queratinócitos. O mau funcionamento de algum desses passos, pode levar à hiperpigmentação ou hipopigmentação. A síntese de melanina é muito influenciada pela radiação UV, bem como por sinais positivos e negativos gerados de queratinócitos vizinhos e em menor grau a partir de fibroblastos dérmicos (ELBASHIR; HARBORTH; LENDECKEL, 2001).

A radiação UV atua na pigmentação cutânea, a qual ocorre em duas etapas: a pigmentação imediata e a tardia. A pigmentação imediata atinge seu estado máximo alguns segundos após a exposição à radiação UV, e é resultante da redistribuição de melanina. A pigmentação tardia está relacionada com o aumento da atividade e número de melanócitos, cuja função é fotoproteção (RABE et al., 2006).

Dentre as alterações no padrão de pigmentação da pele fotoenvelhecida, os lentigos e a hipomelanose são frequentemente encontrados, no entanto, os mecanismos de indução pela radiação UV não são totalmente esclarecidos. Os lentigos apresentam histologicamente um aumento do conteúdo de melanossomas nos queratinócitos da camada basal, e os melanócitos possuem uma capacidade aumentada para a produção de melanina. Na hipomelanose, observa-se a redução do conteúdo de melanina e no número de melanócitos, além dos melanócitos remanescentes apresentarem uma morfologia anormal (RABE et al., 2006).

A exposição à radiação UV apresenta efeitos distintos na angiogênese quando considerados os efeitos crônicos e agudos. Em danos agudos, a radiação UV induz a angiogênese por meio da ativação do fator de crescimento endotelial e por supressão de inibidores da angiogênese. Esses novos vasos são muito permeáveis e resulta em processo inflamatório devido à liberação de mediadores inflamatórios como o IL-8, o que acelera a degradação da matriz extracelular e redução da vascularização da derme em um estado crônico (POON; KANG; CHIEN, 2015).

A radiação UV tem sido relacionada com imunossupressão local e sistêmica. A radiação UV causa alterações morfológicas e funcionais e depleção das células de Langerhans, resultando em sua depleção. Inibe a apresentação de antígenos, estimula a liberação de citocinas imunossupressoras como IL-4 e induz a apoptose de leucócitos. Considera-se que a imunossupressão induzida por UV pode prevenir uma resposta autoimune, em relação aos produtos inflamatórios que resultam do dano mediado pela radiação UV, como por exemplo, os danos no DNA (POON; KANG; CHIEN, 2015; RABE et al., 2006).

As alterações causadas na matriz extracelular pela radiação UV envolvem a redução da matriz de colágeno, elastose solar, alterações na estrutura e composição de fibrilas de ancoragem, proteoglicanos e glicosamicoglicanos (GJ et al., 2002).

Enquanto a quantidade de elastina diminui com a idade, na pele exposta ao sol, ocorre um aumento da elastina, devido aos danos acumulados à radiação UV. A elastina acumulada na pele fotoenvelhecida tem aspecto irregular e parece ocupar as áreas previamente ocupadas pelo colágeno. Algumas evidências sugerem que a irregularidade da elastina seja decorrente dos efeitos inflamatórios crônicos (CHRISTIAN et al., 1997; RABE et al., 2006).

O dano nas fibras elásticas resulta na elastose solar, uma característica histológica marcante na pele fotoenvelhecida. Na elastose solar, a elastina funcional é substituída por material elástico espesso, emaranhado, com deformação e funcionalidade prejudicada (KAWABATA et al., 2014).

A radiação UV impacta a matriz de colágeno tanto com a degradação do colágeno existente, quanto com mecanismos que inibem a síntese de colágeno. A radiação reduz a expressão do gene de síntese de pró-colágeno por meio da indução do fator de transcrição AP-1, o qual possui a capacidade de se ligar e sequestrar complexos de transcrição que são necessários para a produção de pró-colágeno. Além disso, a radiação UV diminui a expressão de AP-1 (proteína 1), bloqueia os efeitos do TGF- $\beta$  (fator de crescimento de transformação), uma citocina importante na síntese de fibras na matriz extracelular (QUAN et al., 2009).

Os mecanismos de degradação da radiação UV envolvem o aumento da expressão de metaloproteinases (MMPs). A MMP-1 inicia a quebra das fibras de colágeno do tipo I e III em um local específico na sua tripla hélice. Após a clivagem pela MMP-1, o colágeno pode ser degradado pelas metaloproteinases MMP-3 e MMP-9, as quais tem sua expressão aumentada após a radiação UV. Assim, as MMPs atuam na degradação de colágeno, e sem uma reparação perfeita, este dano pode ser acumulado pela exposição crônica à radiação UV, sendo um dos principais contribuintes para o fenótipo da pele humana fotoenvelhecida (GJ et al., 2002).

#### **2.3.1.2. Efeitos da luz visível e radiação infravermelha na pele**

As frações do espectro solar da Luz visível (LV) (400-700 nm) e a parte mais energética do espectro do infravermelho (IV) (700-3000) foram consideradas inócuas por muitos anos. No entanto, com os recentes progressos no campo da fototerapia, as evidências

científicas atuais demonstram que estes comprimentos de onda também podem impactar as características cutâneas (POLEFKA et al., 2012).

A luz visível (LV) caracteriza-se por comprimentos de onda que vão de 400 a 700 nm, embora em alguns documentos da Comissão Europeia, a faixa de 380-780 nm é adotada. Os efeitos da LV na pele ainda não foram tão bem estudados quanto os efeitos da radiação UV, no entanto, alguns estudos tem demonstrado o seu papel na pigmentação e em danos cutâneos. Os efeitos da LV na pigmentação imediata e tardia foram descritos e foi mostrado que pigmentação induzida por LV pode persistir até oito semanas e a quantidade de pigmento produzida é dependente da dose total de luz (RANDHAWA et al., 2015).

A LV pode ter um impacto significativo na produção de pigmentação irregular na pele que é um fator principal no fotoenvelhecimento. Na presença de melanina, a luz visível gera oxigênio singlete e provoca danos diretos no DNA (CHIARELLI-NETO et al., 2014; RANDHAWA et al., 2015).

Um estudo recente sobre os efeitos de LV na pele humana, especialmente em pessoas com pele mais escura, mostrou que a indução de pigmentação não foi acompanhada por efeitos deletérios como os induzidos por radiação ultravioleta (UV) (MAHMOUD et al., 2010). Em contraste com estas observações, Liebel e colaboradores (2012) mostraram que a LV pode induzir a produção de radicais livres, resultando no aumento de citocinas pró-inflamatórias e na expressão de matriz metaloproteinases (MMPs) (RANDHAWA et al., 2015).

Além da LV, a radiação do infravermelho próximo (IVA) é responsável por mais de um terço da energia solar que atinge a pele humana. Enquanto a radiação infravermelha com comprimentos de onda mais longos (IVB e IVC) não interfere profundamente na pele, 65% do comprimento de onda mais curto (IVA) (radiação, 760-1440 nm) atinge a derme. A radiação IVA pode alterar o equilíbrio de colágeno da matriz extracelular dérmica em, pelo menos, duas maneiras: conduzindo a um aumento da expressão de MMP-1 e diminuindo a síntese de colágeno (AKHALAYA et al., 2014; SCHROEDER et al., 2010).

Portanto, a exposição à radiação IVA induz efeitos biológicos semelhantes à radiação UV, mas os mecanismos subjacentes são substancialmente diferentes, uma vez que a resposta celular a irradiação IVA envolve a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (AKHALAYA et al., 2014; SCHROEDER et al., 2010).

A formação de radicais livres pela LV e IVA é menor que a gerada pela radiação UV, mas esta exposição é responsável por 50% dos radicais livres em relação ao espectro solar total (WÖLFLE et al., 2014; ZASTROW et al., 2009).

Assim, o fotodano não deve ser considerado estritamente como um resultado da exposição à radiação UV, uma vez que a pele é exposta a todo o espectro de comprimentos de onda incluindo IV e VL que podem induzir a danos de um modo semelhante aos raios UV. Essas descobertas recentes exigem estratégias específicas para evitar danos à pele induzida pela LV e radiação IVA (RANDHAWA et al., 2015).

#### **2.4. Tratamento do fotoenvelhecimento**

Os sinais decorrentes do fotoenvelhecimento originam uma intensa busca pela prevenção e tratamento desses sinais, o que repercute no lançamento de um grande número de produtos cosméticos direcionados a esta aplicação e tem motivado o desenvolvimento de formulações cosméticas e substâncias ativas cada vez mais inovadoras (BRADLEY et al., 2015; WURM et al., 2012).

Considerando a fisiopatologia do fotoenvelhecimento, vários tratamentos existentes tem sido considerados como abordagens efetivas para prevenção, proteção e melhoria das condições da pele fotoenvelhecida. De acordo com alguns autores, a classificação dos tratamentos do fotoenvelhecimento pode ser dividida em três linhas (MCGRATH; ROBINSON; BINDER, 2012; RABE et al., 2006):

A linha primária consiste em medidas preventivas que envolvem a aplicação de protetores solares e outras medidas de proteção à exposição solar. Os tratamentos secundários envolvem medidas precoces para e proporcionar pequenas melhorias na pele fotoenvelhecida. Essas medidas envolvem o uso de retinoides, antioxidantes, vitaminas, extratos vegetais, entre outros. A abordagem terciária envolve os *peelings* químicos, *lasers*, radiofrequência, toxina botulínica, preenchimentos faciais, dentre outros (RABE et al., 2006).

Considerando a abordagem secundária, diversas substâncias ativas vem sendo utilizadas em formulações dermocosméticas com finalidades protetoras da pele, preventivas e até mesmo reparadoras dos efeitos indesejáveis do fotoenvelhecimento uma vez que apresentam propriedades farmacodinâmicas na pele (LUPO, 2001; MATSUI et al., 2009).

Dentre as substâncias ativas utilizadas em produtos dermocosméticos, as vitaminas estão entre as mais utilizadas, pois, além de contribuírem para a manutenção de uma pele jovem e saudável, previnem dermatites relacionadas às condições de baixa hidratação e danos na função barreira da pele, uma vez que algumas delas atuam na epitelização, controle da queratinização e na umectação cutânea. Na área cosmética, os profissionais têm demonstrado grande interesse pelas vitaminas A e E e seus derivados, pois essas têm apresentado bons

resultados no tratamento da pele envelhecida (DARR et al., 1996; GASPAR; CAMPOS, 2007).

#### **2.4.1. Acetato de Tocoferila**

O termo vitamina E é utilizado para oito moléculas que existem na natureza (quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis). Em humanos, o  $\alpha$ -tocoferol é o homólogo de maior abundância. A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) tem sido descrita como o mais importante antioxidante lipossolúvel ligado à membrana celular (THIELE; HSIEH; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, 2005).

O  $\alpha$ -tocoferol é amplamente encontrado em produtos cosméticos, devido aos efeitos foto protetores, excelente capacidade de hidratação, e funções para estabilizar formulações cosméticas. Devido às suas propriedades antioxidantes, também possui efeitos anti-inflamatórios (CHIU; KIMBALL, 2003; KELLER; FENSKE, 2015).

Entretanto, o  $\alpha$ -tocoferol apresenta baixíssima estabilidade em uma formulação dermocosmética, e pode sofrer reações de oxidação se não for adequadamente estabilizado. Esta instabilidade tem levado à sua substituição por derivados mais estáveis, como os ésteres de vitamina E, dentre eles, o acetato de  $\alpha$ -tocoferila.

O acetato de  $\alpha$ -tocoferila apresenta evidências científicas na redução do dano induzido pela radiação UV, por possuir propriedade antioxidante, e conseqüente redução dos danos causados ao DNA e morte de queratinócitos, apresenta ainda propriedades hidratantes e atua na redução de rugas (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003a; GEHRING; FLUHR; GLOOR, 1998). Alguns estudos descrevem que a atividade antioxidante da vitamina E, é devido ao radical hidroxila aromático livre, portanto, após a hidrólise do derivado na forma éster na epiderme, este exerce a sua ação antioxidante (CHIU; KIMBALL, 2003).

#### **2.4.2. Retinoides**

Os retinoides fazem parte da classe de compostos que envolvem a vitamina A e seus derivados como o retinaldeído, ácido retinoico e ésteres de retinila (MUKHERJEE et al., 2006).

Os retinoides exercem os seus efeitos por meio de duas famílias de receptores nucleares: os receptores do ácido retinoico (RARs) e os receptores de retinoide X (RXRs). As principais funções de retinoides na pele são o controle da diferenciação da epiderme a partir da camada basal até à camada córnea, bem como a renovação epidérmica, e possui um papel



fundamental na homeostasia cutânea, tanto em condições fisiológicas, quanto quando há lesões epidérmicas. Os retinoides também estão envolvidos na síntese de queratina, na regulação da secreção sebácea e na composição da matriz extracelular (SORG; SAURAT, 2014).

Além dos efeitos dos retinoides na homeostasia cutânea, em condições eudérmicas, a radiação UV possui um papel importante na redução das atividades de retinoides na pele.

A radiação UV diminui rapidamente a expressão dos dois receptores de retinoides predominantes na pele humana e está associada à redução da indução dos genes em queratinócitos e melanócitos. Nos melanócitos, há uma normalização após dois a três dias, mas o mesmo não ocorre nos queratinócitos. A radiação UV gera uma deficiência funcional da vitamina A, o que aumenta a atividade do AP-1 e a atividade de MMPs. A aplicação tópica “a suplementação tópica” utilizando retinoides vem a suprir esta deficiência funcional gerada pela radiação UV. Além disso, tem sido descrita a redução de vitamina A na pele após exposição à radiação UV (RABE et al., 2006).

Dentre os retinoides, o ácido retinoico tem sido considerado como padrão ouro no tratamento do fotoenvelhecimento, uma vez que apresenta uso consagrado e eficácia clínica comprovada na melhoria das condições da pele fotoenvelhecida e no tratamento da acne (KLIGMAN, 1996; MUKHERJEE et al., 2006; WEBSTER, 2011).

No entanto, em função dos efeitos adversos atribuídos ao ácido retinoico, como irritação e mutagenicidade, há a crescente demanda de substâncias ativas de uso tópico que possam trazer os benefícios do mesmo, sem os efeitos indesejáveis (OKANO et al., 2006; SHAPIRO; SALIOU, 2001).

O palmitato de retinila, um derivado da vitamina A na forma de éster, quando aplicado topicamente, pode estimular a síntese de colágeno e a renovação celular e atuar na manutenção da pele em bom estado, e melhoria da hidratação e função barreira (GASPAR; CAMPOS, 2007; KAFI et al., 2007; RICCI; SEMPRINI, 1999). Esse derivado da vitamina A apresenta vantagem devido à estabilidade química da formulação e, ao contrário do ácido retinoico, que é usado apenas em produtos farmacêuticos, o uso do palmitato de retinila é permitido em cosméticos na concentração de até 10.000 UI de vitamina A/g de produto acabado (ANVISA, 2010).

Sendo um derivado de retinoide, um dos mecanismos de ação para obter ação antienvhecimento é o efeito nos receptores nucleares. Alguns estudos tem demonstrado que o palmitato e retinila pode ser metabolizado no tecido cutâneo e transformado em retinol, o qual é oxidado em muitos tecidos para ácido retinoico pela enzima álcool desidrogenase. Na

pele humana, 44% do palmitato de retinila que é absorvido foi hidrolisado para retinol, portanto, o uso de palmitato de retinila em formulações cosméticas pode resultar na entrega significativa de retinol na pele (BOEHNLEIN et al., 1994; FU et al., 2007).

#### 2.4.2.1. Éster de all-trans-ácido retinoico e D- $\delta$ -tocoferol

Com base no conceito dos benefícios atribuídos na pele pelos retinoides e pela vitamina E, foi proposto um novo composto inovador, o *Tocoretinate* (éster de all-trans-ácido retinoico e D- $\delta$ -tocoferol), como substância ativa com grande potencial de eficácia alternativa ao ácido retinoico.

A primeira versão do *Tocoretinate* foi um éster do ácido retinoico e  $\alpha$ -tocoferol, cujas funções têm sido reportadas para o tratamento de úlceras baseada na sua ação na proliferação e migração de fibroblastos. O éster do ácido retinoico e  $\alpha$ -tocopherol é caracterizado como um agonista do RAR, antagonista de síntese proteica e antagonista de colágenase microbiana. Estudos mostraram que o *Tocoretinate* é resistente a degradação de esterases na derme e foi considerado estável em estudos *in vitro* e *in vivo* (NJAR et al., 2006; OKANO et al., 2006).

Estes resultados são coerentes com os efeitos biológicos obtidos pelo éster do ácido retinoico e  $\alpha$ -tocopherol, uma vez que o tratamento leva ao crescimento de fibroblastos humanos e estimula a formação de tecido de granulação em úlceras, efeitos distintos dos obtidos pelo ácido retinoico e da vitamina E isolados. A análise de toxicidade desta molécula em modelo animal mostrou que é 150 vezes menos tóxico que o ácido retinoico (KAMM, 1982; NJAR et al., 2006).

O éster do ácido retinoico e  $\alpha$ -tocoferol é proibido pela legislação para ser utilizado como um produto cosmético, uma vez que foi aprovado como uma fármaco para o tratamento de úlceras. Portanto, foi realizado o desenvolvimento de um derivado do ácido retinoico, o éster de all-trans-ácido retinoico e D- $\delta$ -tocoferol (OKANO et al., 2006).

De acordo com testes *in vitro* de eficácia, este tem sido descrito como seguro e eficaz na síntese de colágeno e de ácido hialurônico, inibição da atividade da enzima colagenase, possui atividade sequestradora de radicais livres, previne peroxidação lipídica, além de atuar na renovação celular, e aumentar a expressão de aquaporina-3. Os testes de segurança realizados para o *Tocoretinate* forneceram resultados negativos para a irritação primária da pele, sensibilização, fototoxicidade e mutagenicidade (OKANO et al., 2006).

Assim, esse composto apresenta potencial relevante como alternativa ao ácido retinoico para atuar na melhoria das condições gerais da pele e atenuar os sinais clínicos do

envelhecimento, porém, estudos clínicos conclusivos devem ser realizados para avaliar se, de fato, os efeitos observados *in vitro* são possíveis de se serem obtidos nas reais condições de uso, quando este está veiculado em uma formulação cosmética.

## **2.5. Técnicas de biofísica e análise de imagem na caracterização da pele e na avaliação de eficácia de produtos cosméticos**

A grande variedade de equipamentos e tecnologias disponíveis atualmente para o estudo da biologia da pele pode ser considerada como uma nova era no desenvolvimento de dermocosméticos, baseado em um entendimento robusto da fisiologia cutânea, suas variações e suas respostas aos tratamentos, a fatores intrínsecos e aos mais diferentes estímulos ambientais (DRENO et al., 2014).

As técnicas de biofísica e de análise de imagem são técnicas não invasivas que permitem avaliar as condições da pele, e os efeitos de produtos cosméticos nas reais condições de uso, de forma totalmente não invasiva, em tempo real (ELSNER et al., 2011).

As referidas técnicas utilizam vários equipamentos com diferentes princípios físicos e/ou físico-químicos que facilitam a interpretação dos resultados sobre como determinado produto cosmético pode atuar na pele. A avaliação dessas propriedades como a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, da perda transepidermica de água, propriedades mecânicas (viscoelasticidade), e coloração da pele podem ser realizados utilizando-se os equipamentos *Corneometer*<sup>®</sup>, *Tewameter*<sup>®</sup>, *Cutometer*<sup>®</sup>, e *Colorimeter*<sup>®</sup> respectivamente (COURAGE; KHAZAKA, 2004; O'GOSHI; SERUP, 2005; PIERARD, 1998, 1999; ROGIERS, 2001).

Dentre os métodos utilizados para avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, o método da capacitância é o mais utilizado, pois utiliza corrente de baixa frequência e é pouco afetado pela temperatura e umidade relativas (DAL'BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). Este é o método utilizado pelo *Corneometer*<sup>®</sup> (Courage Khazaka, Alemanha), equipamento que mede a capacitância de acordo com a constante dielétrica da água (CLARYS et al., 2012).

Uma lâmina de vidro separa duas placas metálicas da pele, e quando aplicado sobre esta, é formado um campo elétrico, sendo que uma placa fica com a carga positiva e outra com a carga negativa, permitindo medir a constante dielétrica da água, que é convertida em

unidades arbitrárias, equivalente ao conteúdo aquoso do estrato córneo medido (DAL'BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; O'GOSHI; SERUP, 2005).

A sonda exerce uma pressão constante na superfície cutânea de 3,5N, e cobre uma área de 49 mm<sup>2</sup>, o que permite estimar o conteúdo aquoso no estrato córneo até uma profundidade de 60 a 100µm. Os resultados são influenciados também pela rugosidade da superfície que está sendo estudada (BERARDESCA; (EEMCO), 1997).

O equipamento Tewameter<sup>®</sup> (Courage Khazaka, Alemanha) realiza medidas da perda transepidérmica de água (em inglês, *transepidermal water loss* – TEWL), que representa a evaporação de água pela pele. A medida da perda transepidérmica de água é de grande importância na dermatologia e cosmetologia, e apresenta grande utilidade para monitorar a função barreira do estrato córneo. A pele intacta possui a barreira cutânea funcional e os valores de TEWL são baixos. Em peles danificadas, o TEWL apresenta valores maiores (COURAGE; KHAZAKA, 2004; ROGIERS, 2001).

Por meio do equipamento Tewamater<sup>®</sup>, o gradiente de evaporação é medido por uma sonda que é colocada perpendicularmente na região de estudo da pele. A sonda é composta por um cilindro aberto com dois sensores de temperatura e umidade em duas distâncias da pele. Nos dois locais, a temperatura e umidade relativa são medidas e a pressão de vapor correspondente é calculada. A diferença entre a pressão de vapor nos dois sensores é diretamente relacionada à taxa de evaporação (CAMPOS et al., 2012; PIERARD, 1999).

O cálculo da difusão é dado pela lei de Adolf Fick:

$$\frac{dm}{dt} = D \cdot A \cdot \frac{dp}{dx}$$

Onde,  $dm/dt$  é o fluxo de difusão,  $A$  é a área,  $dp/dx$  é a alteração da concentração por distância e  $D$  é o coeficiente de difusão do vapor de água no ar. Os valores são dados em g.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> (COURAGE; KHAZAKA, 2004).

A avaliação da viscoelasticidade da pele pode ser medida por várias maneiras, dentre elas podemos mencionar os testes tensionais, torsionais, por indentação, por impacto, ou por elevação/sucção (RODRIGUES, 2001).

O equipamento Cutometer<sup>®</sup> (Courage Khazaka, Alemanha) atua por sucção. Por meio da pressão negativa exercida pelo equipamento, a pele é succionada para a abertura na sonda. No interior da sonda, a medida de penetração da pele é determinada por medição ótica por um sistema que consiste de uma fonte de luz e um receptor, e por dois prismas voltados um para o outro, que projetam a luz do transmissor ao receptor (PIERARD, 1999; RODRIGUES, 2001).

A intensidade da luz captada varia devido à penetração da pele. A resistência da pele a ser puxada por pressão negativa pode estar relacionada à firmeza, e sua capacidade de voltar à sua posição original, relacionada com a viscoelasticidade (PIERARD, 1999; RODRIGUES, 2001).

O *software* do Cutometer permite quatro modos operacionais, com a diferença da forma de aplicação de pressão negativa. No modo 1 há aplicação de pressão negativa constante e o Modo 4 com pressão subindo linearmente e, em seguida, parando abruptamente. O Modo 1 tem sido o mais utilizado (COURAGE; KHAZAKA, 2004).

A sucção exercida pelo equipamento pode variar entre 20 e 500 mbar, e o tempo de aspiração de 0,1 a 60 s. Este procedimento é tipicamente repetido para uma série de três ou mais ciclos de cada vez, e a alteração na forma da pele ao longo do tempo, é registrada a cada 0,1 s durante o ciclo de medição. O número de ciclos é dependente do tempo definido de sucção e liberação, que é limitada a um total máximo de 320s (COURAGE; KHAZAKA, 2004).

As sondas do Cutometer têm aberturas que variam em tamanho de 2 a 8 mm de diâmetro. As menores aberturas menores (2-4 mm) são usadas para avaliar as camadas superiores da epiderme, chegando a avaliar a derme papilar, enquanto que a maior abertura (8 mm) permite a avaliação de camadas mais profundas da pele (DOBREV, 2002; RODRIGUES, 2001).

A análise do *software* acoplado fornece resultados quantitativos de acordo com o perfil de distensão e retorno da pele de diversos parâmetros relacionados à viscoelasticidade e firmeza da pele (LUEBBERDING; KRUEGER; KERSCHER, 2014).

A cor da pele é predominantemente determinada por pigmentos tais como hemoglobina, melanina, bilirrubina e caroteno. A coloração da pele pode ser significativamente alterada por luz UV e aplicação de produtos cosméticos, e, portanto, a quantificação este parâmetro é um assunto de grande interesse na área dermocosmética (DEL BINO; BERNERD, 2013; PIERARD, 1998).

Dentre as metodologias utilizadas para a colorimetria cutânea, a sonda do Colorimeter CL 400 (Courage Khazaka, Alemanha), baseado no princípio da espectroscopia da reflectância difusa é frequentemente utilizada. A sonda é composta por uma parte cilíndrica e na sua extremidade encontra-se uma abertura onde é realizada a medida (COURAGE; KHAZAKA, 2004).

A sonda emite uma luz LED que é alinhada de maneira circular que permite iluminar a pele uniformemente. A luz emitida é dispersa em todas as direções, parte passa

pelas camadas da pele e outra parte é dispersa fora da pele e a luz que é refletida pela pele é medida pela sonda (COURAGE; KHAZAKA, 2004).

Os valores de medição são expressos como valores de XYZ e estão calculados em  $L^*$   $a^*$   $b^*$  e RGB como valores de índice. Além disso, é realizado o cálculo do ângulo tipológico individual. Os dados brutos da sonda são corrigidos com uma matriz de cores especial para adaptá-los para valores padrões (CLARYS et al., 2000; GIANETI; MAIA CAMPOS, 2014).

Além das informações obtidas pelas técnicas de biofísica, o estudo da superfície cutânea tem sido cada vez mais explorado com detalhes por técnicas de análise de imagem, uma vez que possibilita o registro de imagens que demonstram o efeito de cosméticos na topografia cutânea, permitindo a análise qualitativa, bem como a análise de imagens por *softwares* resultando em parâmetros quantitativos da superfície cutânea (LEVEQUE, 1999).

A avaliação dos parâmetros relacionados ao microrrelevo da pele é de grande interesse na área cosmética. Esses parâmetros podem ser avaliados pelo equipamento Visioscan<sup>®</sup> VC98 (Courage Khazaka, Alemanha), que se baseia em uma representação gráfica da pele viva sob iluminação especial e avaliação da presente imagem de acordo com parâmetros clínicos. O aparelho possui uma câmera que possui iluminação UVA e captura imagens de alta resolução da pele por profilometria óptica (PENA FERREIRA; COSTA; BAHIA, 2010a; TROJAHN et al., 2015).

O microrrelevo é caracterizado por padrões típicos de linhas que se interceptam, e aberturas na pele que correspondem aos anexos cutâneos. Os diferentes aspectos do microrrelevo cutâneo estão classificados de acordo com a orientação e a profundidade destas linhas. As linhas primárias e secundárias são discretas e possuem uma profundidade de 210 – 200 um, formando um sistema com configuração poligonal. As linhas terciárias correspondem aos picos dos corneócitos, as quais são invisíveis ao olho humano. As linhas quartenárias são extremamente finas, e formam uma rede trabecular na membrana do corneócito (PIÉRARD; UHODA; PIÉRARD-FRANCHIMONT, 2003).

A avaliação do microrrelevo é de grande importância em formulações com propriedades hidratantes e emolientes. A imagem obtida permite uma avaliação clara e criteriosa da pele, além disso, os parâmetros obtidos utilizando o software SELS (Surface Evaluation of Living Skin) permitem avaliação quantitativa de parâmetros como maciez, rugosidade, aspereza e descamação da pele (DZWIGALOWSKA et al., 2013; LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002; PENA FERREIRA; COSTA; BAHIA, 2010a)

Além do microrrelevo, algumas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para a obtenção e padronização de fotografias de alta resolução. O Visioface<sup>®</sup> é composto por uma câmera de alta resolução situada em uma cabine facial iluminada em que o voluntário coloca a face e é possível tirar uma fotografia de alta resolução com luz branca e luz UV. O *software* acoplado (Visioface Quick<sup>®</sup>) permite avaliação de características como poros, manchas, manchas visíveis apenas na luz UV (GIANETI; MAIA CAMPOS, 2014; MBG et al., 2015).

Um sistema similar é o VISIA-CR (Canfield, Estados Unidos), com o qual imagens obtidas sob iluminação de luz visível, UV, permite avaliar a pele em condições acima e “abaixo” da superfície cutânea. Além disso, é possível realizar a análise de porfirinas, por meio da fluorescência emitida a partir da luz UV. A análise de imagem nos tons vermelho e marrom permite ainda o estudo de características cutâneas como vascularização, hiperpigmentação, rosácea e acne (JANG et al., 2015). Esses equipamentos têm sido muito utilizados para a avaliação dermatológica, e também é uma ferramenta de grande valia para a avaliação de eficácia de produtos cosméticos.

O AEVA – HE é um equipamento baseado em “fringe projection” cujo princípio envolve iluminação e esterimetria. Por meio da análise pelo AEVA- HE, é possível realizar a digitalização tridimensional e análise da textura da face e de diferentes partes do corpo.

O equipamento está equipado com uma bancada de posicionamento e uma câmara de alta resolução para a aquisição das imagens. O *software* AEVA permite que o perfil de rugosidade de cálculo e 2D, a rugosidade da superfície ou ondulação, a detecção e avaliação de objetos 3D e cálculo do volume dos sulcos da pele (CANTECOR et al., 2013; EOTECH, 2015).

As técnicas de biofísica e de análise de imagem permitem o estudo e elucidação das propriedades da pele, e fornecem resultados conclusivos da avaliação de eficácia de produtos cosméticos. A aplicação de diferentes técnicas em conjunto permite realizar a correlação das diferentes características cutâneas fornecendo resultados de grande relevância científica (ELSNER et al., 2011).

Nos últimos anos, houve aumento do foco no desenvolvimento tecnológico de metodologias confiáveis e reprodutíveis para caracterizar a pele e avaliar as respostas da aplicação de um produto. Com essas técnicas, busca-se o conhecimento de características da arquitetura celular e tecidual, uma vez que são de extrema importância para avaliar as respostas terapêuticas e caracterizar a pele. Dentre as técnicas, pode-se destacar a ultrassonografia de alta frequência e a microscopia confocal de reflectância a laser (DRENO et al., 2014).

### 2.5.1. Ultrassom de alta frequência

A ultrassonografia é uma das ferramentas de diagnóstico mais utilizadas na medicina. O início da aplicação da técnica na dermatologia foi em 1979, com um equipamento 15 MHz de frequência, que possibilitou a avaliação da espessura da derme. Desde então, vários estudos foram desenvolvidos para a avaliação da reprodutibilidade e para avaliar a adequação da técnica para esta finalidade (BAGATIN; DE VASCONCELOS; SOARES, 2013).

Em 1987, a análise bidimensional de 20 MHz (B-Scan) foi possível devido à disponibilidade de transdutores mecânicos que permitiram a obtenção de imagens seccionais cruzadas, e consolidou a aplicação da ultrassonografia como ferramenta diagnóstica na dermatologia (BAGATIN; DE VASCONCELOS; SOARES, 2013; UNHOLZER; KORTING, 2002).

O ultrassom *Dermascan® C* é um equipamento de alta frequência (20 MHz) (Cortex, Hadsund, Denmark), tem sido muito utilizado na área cosmética e dermatológica para a avaliação das características da derme. O ultrassom possui um foco transdutor que é utilizado para criar uma imagem transversa, de duas dimensões, representada pelo software no modo – B (GIANETI; MAIA CAMPOS, 2014).

A onda de ultrassom é emitida na velocidade de 1580 m/s e é parcialmente refletida pela estrutura cutânea, originando ecos com diferentes amplitudes. A escala de coloração da imagem obtida, em relação ao eco emitido segue seguinte escala: branco>vermelho>amarelo>verde> azul>preto. Os maiores ecos estão associados com as ligações entre a água e a pele, entre a pele e o tecido adiposo ou entre o tecido adiposo e a musculatura. A distância entre os ecos tem sido calculada para medir a espessura da pele (ULRICH et al., 2014; UNHOLZER; KORTING, 2002)

A ecogenicidade da pele é possível ser calculada por meio da relação de pixels de baixa ecogenicidade e o número total de pixels, com o cálculo obtido a partir do *software* do equipamento (GNIADCKA et al., 1994).

O equipamento tem sido utilizado no diagnóstico e acompanhamento do câncer pele, e auxiliar no planejamento da remoção cirúrgica de tumores (UNHOLZER; KORTING, 2002). Além disso, pode ser utilizado para o estudo de outras desordens cutâneas como psoríase, feridas, cicatrizes, dentre outras (BAGATIN; DE VASCONCELOS; SOARES, 2013).

A técnica tem sido utilizada para a caracterização do envelhecimento cutâneo, por meio da determinação da espessura da derme, bem como para a análise de bandas



hipoecogênicas as quais vem sendo correlacionadas com a severidade do fotoenvelhecimento (GNIADÉCKA; JEMEC, 1998).

O ultrassom também pode ser utilizado para o estudo do efeito de formulações tópicas na pele, como os efeitos do afinamento da pele devido ao uso de corticoides tópicos. Na área cosmética, permite demonstrar o aumento da síntese de colágeno de formulações tópicas ou por suplementação oral (MAIA CAMPOS et al., 2015). Além disso, a técnica tem sido aplicada no estudo da celulite e estrias (BAGATIN; DE VASCONCELOS; SOARES, 2013; SOARES et al., 2015).

Portanto, o ultrassom de 20 MHZ é uma técnica rápida, não invasiva e segura para avaliação de alterações cutâneas na derme, tais como ecogenicidade e espessura da pele e de grande potencial de aplicação na área cosmética (CAETANO et al., 2015; CRISAN et al., 2012; UNHOLZER; KORTING, 2002).

### **2.5.2. Microscopia confocal de reflectância a laser (MCR)**

A Microscopia tem sido uma técnica de análise muito utilizada na ciência, e consideravelmente na dermatologia. O microscópio ótico convencional permite a visualização do tecido após o preparo tecidual e análise morfológica e estrutural de tecidos. Essa técnica se desenvolveu com os avanços tecnológicos, e surgiram opções como a microscopia por fluorescência e a microscopia de transmissão eletrônica. Além disso, o surgimento de marcadores e anticorpos também representou um avanço na microscopia, uma vez que permitiu a relação entre a estrutura e a atividade biológica. Cumpre salientar que, apesar das grandes vantagens da microscopia, o preparo tecidual envolve procedimentos como fixação, corte, coloração, o que pode contribuir para o aparecimento de artefatos indesejados (PIERARD, 1993; WURM; SOYER, 2012).

Diante desta dificuldade, alguns desenvolvimentos tecnológicos na área de microscopia ocorreram para reduzir a interferência devido ao preparo do tecido e melhorar a rapidez das análises. Inicialmente foi desenvolvida a Microscopia por fase de contraste, que permitiu a avaliação microscópica sem a necessidade de coloração. No entanto, era necessário que o material fosse fino e transparente e a falta de resolução limitava consideravelmente a sua aplicação (CORCUFF; LÉVÊQUE, 1993; PIERARD, 1993).

Em 1967, Microscopia confocal foi introduzida como uma nova tecnologia na dermatologia. Microscopia confocal é uma técnica utilizada para aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício

de abertura, pinhole, que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal. Com esta nova tecnologia, era possível visualizar células em tecidos *ex vivo* não cortados e não corados (PIERARD, 1993).

Este marco representou um avanço significativo na ciência, e com grande aplicação da microscopia na avaliação de tecidos grossos semiopacos. Em 1991, Jester e colaboradores divulgaram a microscopia confocal *in vivo*, para ser utilizada em tempo real, com a análise de vários tecidos: cérebro, olho, dente, entre outros. Desta forma, já era possível avaliar os eventos de forma dinâmica, mostrando que as informações histológicas obtidas pela metodologia *in vivo*, eram muito parecidas com os resultados histológicos de tecidos *ex vivo*. Além disso, era indiscutível a vantagem de avaliar alterações ao longo do tempo em um mesmo local, tecido, e então, esta tecnologia foi considerada um “novo paradigma na microscopia” (JESTER et al., 1991).

Em 1991, Jester e colaboradores indicavam que com futuros refinamentos contínuos no microscópio, no sistema de detecção e objetiva, e melhorias na resolução lateral e axial, o microscópio iria permitir que nós, observadores, poderíamos ver o que ninguém tinha sido capaz de ver anteriormente. Diante da nova tecnologia, os primeiros estudos realizados na pele foram divulgados por Corcuff e colaboradores em 1993 (CORCUFF; BERTRAND; LEVEQUE, 1993; CORCUFF; LÉVÊQUE, 1993).

De acordo com a análise fornecida pelo Microscópio confocal, os autores descreveram alguns pontos de referência que podiam ser visualizados: a estratificação das camadas córneas, o núcleo de queratinócitos e as alças capilares na derme superficial. Destacaram ainda desafios referentes à interpretação da secção ótica horizontal, e não vertical, como na histologia convencional, e também a dificuldade de conhecer a morfologia cutânea em um tecido que não foi processado. No entanto, a preservação da tensão natural da pele, a hidratação celular fisiológica e contraste natural da estrutura foram descritos como vantagens da técnica que estava sendo explorada. (CORCUFF; BERTRAND; LEVEQUE, 1993; CORCUFF; LÉVÊQUE, 1993).

A tecnologia já permitia a avaliação de espessura da epiderme com uma precisão de 1 µm. Além disso, foi estudado o efeito da pressão do equipamento sobre a pele, a qual não impactou significativamente na medida de espessura (CORCUFF; BERTRAND; LEVEQUE, 1993; CORCUFF; LÉVÊQUE, 1993).

Diante do grande potencial de aplicação, os estudos de avaliação cutânea pela técnica foram se desenvolvendo, e vários estudos foram realizados comparando com a histologia

convencional, considerando condições cutâneas fisiológicas e patológicas. A melanina como agente de contraste foi evidenciado por Rajadhyaksha e colaboradores (1995), com a avaliação de diferentes fototipos cutâneos (RAJADHYAKSHA; GROSSMAN; ESTEROWITZ, 1995).

Neste estudo, Rajadhyaksha mostrou características da pele humana ao aplicar diferentes comprimentos de onda (entre 400 e 900 nm). Na microscopia de Reflectância, a resolução é inversamente proporcional ao comprimento de onda da fonte de iluminação, portanto, o confocal comercial atualmente trabalha perto da banda de comprimento de onda do infravermelho (RAJADHYAKSHA; GROSSMAN; ESTEROWITZ, 1995).

Em 1997, a empresa Lucid, introduziu o equipamento Vivascope com uma fonte de laser de 830 nm com um poder de 30mW que não causa nenhum tipo de dano ao tecido. No ano de 2000 foi lançado o Vivascope 1500, e em 2006, foi lançado o equipamento portátil Vivascope 3000.

O Vivascope 1500 usa um feixe de laser de 35 mW com o comprimento de onda próximo ao infravermelho (830 nm) e lentes objetivas de 30x, sendo a profundidade alcançada de 200-300 mm com resolução lateral de 0,5-1 mm e resolução axial 2-5 mm. Cada imagem tem campo de visão de 500x500  $\mu\text{m}$  (ANDRADE; MERCURIO; MAIA CAMPOS, 2015).

A formação das imagens se baseia na emissão da luz que ilumina um pequeno ponto no interior do tecido, a luz é refletida e passa através de uma pequena abertura e em seguida a imagem é formada no detector. Esta abertura não permite que a luz refletida vinda de outro ponto do tecido alcance o detector, então somente a luz refletida da região que esta no foco é detectada. Dessa forma, para se criar a imagem da região de interesse inteira, cada ponto é registrado (ANDRADE; MERCURIO; MAIA CAMPOS, 2015).

Diferentes microestruturas da pele causam variações naturais do índice de refração e, portanto, fornecem contraste na imagem. Por exemplo, citoplasma com um índice de refração aproximando-se da água (1,33) é representado com um contraste muito baixo. A melanina apresenta índice de refração relativamente elevado (1,7) e funciona como agente natural contrastante. Outros componentes cutâneos que fornecem contrastes são a queratina, mitocôndrias e organelas citoplasmáticas, cromatina presente nos núcleos e o colágeno dérmico (BIELFELDT; BÖHLING; WILHELM, 2011; MAJDZADEH et al., 2015)

Devido ao princípio do equipamento, a melanina e os melanossomos são fontes de grande contraste que aparecem como coloração branca e “brilho” nas imagens. Neste contexto, houve uma grande aplicação em lesões melanocíticas nos primeiros estudos realizados com o Vivascope 1500. Em 2001, a morfologia de nevos e melanoma foi descrita, e posteriormente tem sido explorada em lesões não melanocíticas e inflamatórias (AGOZZINO et al., 2011; BUSAM et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2003; PELLACANI et al., 2008).

Assim como outras metodologias que analisam a morfologia cutânea, a descrição das estruturas é subjetiva e pode depender do observador. Devido a essa particularidade, é muito importante um consenso na metodologia e terminologia empregada, assim, um guia de terminologias do confocal foi elaborado em 2007(SCOPE et al., 2007).

As camadas observadas pela MCR são bem descritas, e o conhecimento do padrão morfológico da epiderme saudável é de grande importância para a detecção de disfunções cutâneas (ANDRADE; MERCURIO; MAIA CAMPOS, 2015). As imagens obtidas pelo microscópio confocal permitem a avaliação de características cutâneas tais como espessura das diferentes camadas da epiderme, identificação de áreas hiperqueratóticas na epiderme superficial, visualização de células de queimadura, aspecto superficial da pele, organização dos queratinócitos, alterações no padrão de pigmentação, quantidade de papilas dérmicas por área, formato dos contornos das papilas dérmicas, tamanho das glândulas sebáceas, e estrutura da rede de colágeno, contagem e tamanho de poros e microcomedões, características da acne (KAWASAKI; YAMANISHI; YAMADA, 2015; MANFREDINI et al., 2015; SAUERMAN et al., 2002; ULRICH et al., 2009; WURM et al., 2012; XIANG et al., 2015). Além disso, a técnica tem sido utilizada em estudos para a avaliação dos sinais primários de irritação cutânea (SWINDELLS et al., 2004) e em estudos de penetração cutânea (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004).

A microscopia confocal de reflectância a laser tem sido considerada uma ferramenta de extensa aplicação na clínica dermatológica, e representa uma revolução no diagnóstico de doenças de pele e na avaliação de características cutâneas, por permitir a visualização em nível celular com resolução quase histológica de características celulares e teciduais por um método não invasivo, em tempo real. No entanto, poucos estudos foram realizados para a avaliação dos efeitos de produtos cosméticos na pele utilizando esta técnica (BRANZAN; LANDTHALER; SZEIMIES, 2007; GONZALEZ; GILABERTE-CALZADA, 2008).

Todos os parâmetros que podem ser avaliados pela presente técnica representa grande potencial de aplicação da mesma na avaliação de eficácia clínica de cosméticos, para a avaliação em tempo real dos efeitos de produtos para diversas aplicações: avaliação de efeitos de despigmentantes, ação antienvhecimento, anti-acne, dentre outros. E, portanto, é de grande importância a padronização das medidas, estudos de reprodutibilidade, bem como o treinamento de recursos humanos qualificados para interpretação das imagens.

## **2.6. Análise sensorial e percepção de eficácia**

Quando os consumidores interagem com um produto cosmético e consideram as características do produto tais como cor, perfume e textura, esta informação é então integrada de modo que os consumidores possam identificar um valor simbólico ou sentir uma emoção positiva com o produto cosmético (PENSÉ-LHÉRITIER, 2015).

Enquanto a qualidade avaliada por um formulador é baseada na estabilidade e confiabilidade que o produto permaneça nas condições originais. Para o consumidor, entretanto, a qualidade do produto, além da eficácia, está relacionada à sensação de bem estar, e à percepção fisiológica de diferentes parâmetros sensoriais. Portanto, as características sensoriais de uma formulação podem influenciar diretamente na escolha do produto e na adesão ao seu uso. Além disso, o usuário pode variar a forma de aplicação, a frequência de uso, e a quantidade de produto utilizada, de acordo com a aceitação das características sensoriais deste (PARENTE; GAMBARO; ARES, 2008; WORTEL; WIECHERS, 2000).

Considerando a importância deste parâmetro na área cosmética, torna-se de grande valia a realização de estudos de avaliação sensorial, uma vez que, esses podem influenciar significativamente no sucesso do produto, devido às diferenças entre as percepções de qualidade ao formulador e ao consumidor serem diferentes (PENSÉ-LHÉRITIER, 2015).

Há uma grande variedade de estudos na literatura sobre a caracterização dos atributos sensoriais de produtos cosméticos. O método sensorial padrão utilizado para esta aplicação é a caracterização quantitativa descritiva, que permite obter resultados quantitativos precisos dos parâmetros sensoriais dos produtos. Nesta metodologia, os painelistas são treinados para qualificar e quantificar atributos sensoriais, e muitas vezes podem descrever os produtos estudados. No entanto, esta metodologia, apesar de amplamente aceita, apresenta uma limitação, pois demanda tempo a formação e treinamento do painel (PENSÉ-LHÉRITIER, 2015).

Quanto à necessidade de métodos mais rápidos que podem integrar as necessidades dos consumidores, novos métodos sensoriais foram propostos. Dentre eles, o método CATA (Check-all-that-apply) foi desenvolvido para que possa ser realizado por consumidores, não havendo a necessidade de painelistas treinados. Cada consumidor recebe um questionário com atributos para serem escolhidos. Os atributos podem estar relacionados com qualidades sensoriais do produto, intenção de compra ou conceitos de aceitabilidade (PENSÉ-LHÉRITIER, 2015)

O método CATA tem sido considerado efetivo em distinguir produtos quanto as características sensoriais também quanto à qualidade percebida. No entanto, a sua principal limitação é que estabelece frequência de citações ao invés de classificações ou intensidades (PENSÉ-LHÉRITIER, 2015).

Além da avaliação sensorial, para complementar os resultados obtidos pelas medidas objetivas, é de extrema importância a avaliação da percepção dos indivíduos frente aos efeitos causados pela radiação ultravioleta na pele, como manchas, rugas e perda da elasticidade, bem como a avaliação do impacto desses efeitos e da melhora diante da aplicação de produtos cosméticos por meio da aplicação de questionários direcionados a auto percepção das características cutâneas descritas (HILLEBRAND et al., 2001; NOUVEAU-RICHARD et al., 2005).

**3. OBJETIVO**

---

O objetivo desse trabalho é caracterizar as alterações cutâneas decorrentes do fotoenvelhecimento e desenvolver e avaliar a estabilidade e a eficácia clínica de formulações cosméticas antienvhecimento contendo *tocoretinate*, palmitato de retinila ou acetato de tocoferila.



#### ***4. MATERIAL E MÉTODOS***

---

#### 4.1. Matérias Primas

As matérias primas descritas estão de acordo com o INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) e quando necessário também está descrito o nome comercial e o fornecedor/ fabricante.

- Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Pemulen TR2 Polymeric Emulsifier – Lubrizol;

- Água destilada e deionizada;
- Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, Tinosorb® S - Basf;
- BHT – Fluka;
- Butylene glycol – Unichem;
- Caprylic/Capric Triglyceride, Crodamol GTCC – Croda;
- C12-15 Alkyl benzoate, Crodamol® AB - Croda;
- Cetearyl Alcohol, Dicetyl Phosphate e Ceteth-10 Phosphate, Crodafos CES - Croda;
- Cyclopentasiloxane, DC 245® - Dow Corning;
- Decametilciclopentassiloxano (ciclometicone), Dimethicone Crosspolymer, DC 9040 - Dow Corning;
- Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate, Uvinul® A Plus – Basf;
- Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer (and) Silica, DC 9701® – Dow Corning;
- Disodium EDTA - Ciba;
- Ethylhexyl Triazone, Uvinul® T 150 – Basf;
- Lecithin, Lipoid S 75® – Lipoid;
- Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (MBBT), Tinosorb® M – Basf;
- Octyl Methoxycinnamate, Uvinul® MC 80 – Basf;
- Octyl Stearate, Cetiol® 868 – Pharmaespecial;
- Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, butylparaben, propylparaben, isobutylparaben, Phenova® - Croda;
- Phytantriol – DSM;
- Retinyl palmitate, Palmitato de retinila – DSM;
- Sodium Polyacrylate (and) Dimethicone (and) Cyclopentasiloxane (and) Trideceth-6 (and) PEG/PPG 18/18 Dimethicone, DC RM 2051® – Dow Corning;
- Steareth-21, Brij S21® - Croda;
- Steareth-2, Brij S2® - Croda;

- Titanium dioxide, Dióxido de Titânio TT rutilo – Juk;
- Tocopheryl Acetate, Acetato de Tocoferila – DSM;
- Tocopheryl Retinoate, Tocoretinate- 10, Nikkol.

#### 4.2. Equipamentos e acessórios

- AEVA HE, Eotech, França;
- Analisador de tamanho de partícula, Particle Size Analyzer LS 131320, Beckman Coulter<sup>®</sup>;
- Agitador mecânico, Heidolph<sup>®</sup>, RZR 2021;
- Balança analítica Ohaus, modelo AS 200;
- Balança eletrônica Marte, modelo AS 2000;
- Centrífuga Centribio, modelo 80-2B, frequência 60Hz ;
- Chapa de aquecimento;
- Colorimeter<sup>®</sup> CR, Courage-Khazaka, Alemanha;
- CR-410 chromameter, Konica Minolta, Japão;
- Corneometer<sup>®</sup> CM 825, Courage-Khazaka, Alemanha;
- Cutometer<sup>®</sup> SEM 575, Courage-Khazaka, Alemanha;
- Dermascan<sup>®</sup> C, Cortex Technology, Dinamarca
- Embalagens plásticas de PVC opacas, com capacidade para 15 gramas
- Embalagens plásticas de PVC, 30 e 50 gramas, com pump de tecnologia *airless*
- Embalagens plásticas de PVC, bisnagas de 30 gramas
- Microscópio de luz polarizada Axioplan 2, Zeiss<sup>®</sup>
- Peagâmetro, Digimed<sup>®</sup>, modelo DM 20;
- Reômetro DV-III digital, tipo Cone e Placa, Brookfield,
- Termômetro;
- Tewameter<sup>®</sup> TM 210, Courage-Khasaka, Alemanha;
- Vidrarias em geral;
- Visioscan<sup>®</sup> VC 98, Courage-Khasaka, Alemanha;
- Visioface<sup>®</sup>, Courage Khazaka, Alemanha;
- Vivascope<sup>®</sup> 1500, Lucid, Estados Unidos;

### 4.3. Desenvolvimento das formulações

O desenvolvimento das formulações foi dividido em duas etapas: Etapa 1 - Estudo dos efeitos da concentração da cera autoemulsionante, polímero hidrofílico e proporção de tensoativos não iônicos.

Etapa 2 – Estudo dos efeitos da concentração de lecitina de soja, phytantriol e triglicérides de ácido cáprico e caprílico.

Um planejamento fatorial foi utilizado em ambas as etapas do desenvolvimento para a caracterização da formulação e otimização das formulações de acordo com os parâmetros desejados. Um planejamento de três fatores, de três níveis de experimentos (Box-Behnken) com metodologia de superfície de resposta (MSR) foi executado para avaliar os principais efeitos e as interações das variáveis da formulação em formulações cosméticas.

Assim, a resposta das variáveis independentes no planejamento envolvendo três fatores a equação tem a forma da equação X, onde Y é a resposta; Xi são os fatores estudados que influenciam a resposta Y,  $\beta_0$  é a constante,  $\beta_i$  é o coeficiente linear,  $\beta_{ii}$  é o coeficiente quadrático e  $\beta_{ij}$  ( $i \neq j$ ) é a interação linear entre Xi e Xj.

$$(1) \quad y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

De acordo com as características apresentadas na etapa de planejamento experimental, três formulações de cada etapa foram selecionadas e submetidas aos testes preliminares de estabilidade e avaliação da estabilidade física.

#### 4.3.1. Etapa 1: Estudo dos efeitos da concentração da cera auto emulsionante, polímero hidrofílico e proporção de tensoativos não iônicos.

Foram desenvolvidas formulações utilizando Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO, Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30, Steareth-2 e Steareth-21, Estearato de Octila, BHT, Butilenoglicol, Glicerina, EDTA, Ciclometicone, Ciclometicone e polímero de Dimeticone reticulado, Fenoxietanol e parabenos. Essas formulações foram adicionadas, ou não, de 0,1% de *Tocoretinate*, ou 0,5% de palmitato de retinila, ou 5% de acetato de tocoferila.

Para caracterização dos efeitos e para auxiliar na determinação da concentração das matérias primas Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO, Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30, e proporção dos tensoativos Steareth-2 e Steareth-21, o planejamento Box-Behnken foi selecionado a fim de avaliar o comportamento reológico das formulações desenvolvidas. O planejamento experimental e análise de resultados foram realizados utilizando-se o *Software Minitab 16*.

Assim, os níveis utilizados para a codificação dos fatores encontram-se na Tabela 1. Os experimentos realizados de acordo com os níveis propostos estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 1-** Fatores estudados no planejamento Box-Behnken e seus níveis +1, 0, -1.

Fatores		Níveis		
		-1	0	+1
X <sub>1</sub>	% de Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO	1	2,5	4
X <sub>2</sub>	Proporção Steareth-21/Steareth-2	30:70	50:50	70:30
X <sub>3</sub>	% Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30	0,2	0,3	0,4

**Tabela 2-** Planejamento Box-Behnken com fatores codificados. X<sub>1</sub>= % de Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO X<sub>2</sub> = Proporção Steareth-21/Steareth-2 e X<sub>3</sub>= % Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
E1	-1	1	0
E2	1	1	0
E3	0	-1	1
E4	0	1	1
E5	0	0	0
E6	-1	0	-1
E7	1	0	1
E8	0	0	0
E9	0	0	0
E10	0	-1	-1
E11	-1	0	1
E12	-1	-1	0
E13	0	1	-1
E14	1	-1	0
E15	1	0	-1

De acordo com as concentrações propostas pelo *software* estatístico, foram elaboradas 15 formulações (Tabela 3). As formulações foram adicionadas de 0,5% de palmitato de retinila, ou 5% de acetato de tocoferila, ou de 1% de *Tocoretinate*, totalizando 60 formulações.

**Tabela 3-** Formulações elaboradas para a etapa do planejamento experimental

<b>Matéria-prima</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>	<b>E9</b>	<b>E10</b>	<b>E11</b>	<b>E12</b>	<b>E13</b>	<b>E14</b>	<b>E15</b>
Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO	1	4	2,5	2,5	2,5	1	4	2,5	2,5	2,5	1	1	2,5	4	4
Steareth-21	0,2 679 2	0,2 679 2	0,1 178	0,2 679 2	0,1 924 4	0,1 924 4	0,1 924 4	0,1 924 4	0,1 924 4	0,1 178	0,1 924 4	0,1 178	0,2 679 2	0,1 178	0,1 924 4
Steareth-2	0,1 320 8	0,1 320 8	0,2 822	0,1 320 8	0,2 075 6	0,2 075 6	0,2 075 6	0,2 075 6	0,2 075 6	0,2 822	0,2 075 6	0,2 822	0,1 320 8	0,2 822	0,2 075 6
Esterato de Octila	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
BHT	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5
Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2
Butilenoglicol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Glicerina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
EDTA	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5	0,0 5
Ciclometicone	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Ciclometicone e polímero de Dimeticone reticulado	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fenoxietanol e Parabenos	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Água qsp	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

#### 4.3.1.1. Determinação do Comportamento Reológico

As 60 formulações foram submetidas em triplicata ao estudo do comportamento reológico, em reômetro DV-III digital, tipo Cone e Placa, marca Brookfield, utilizando-se spindle CP52 por meio de avaliação dos seguintes parâmetros reológicos: viscosidade, índice de consistência, índice de fluxo e tixotropia (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003b).

#### 4.3.1.2. Análise da distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz

A avaliação do tamanho de gotícula das formulações estudadas contendo *Tocoretinate* foi realizada com o equipamento LS 131320 Particle Size Analyzer, Beckman Coulter®, para a obtenção do tamanho médio de partículas.

#### 4.3.1.3. Formulações selecionadas

Após avaliação dos efeitos reológicos, três formulações foram selecionadas nesta etapa para serem submetidas aos testes preliminares de estabilidade e avaliação da estabilidade física (Tabela 4).

**Tabela 4** - Formulações selecionadas na primeira etapa do estudo

<b>Matéria</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO	1	4,0	2,8715
Steareth-21	0,334906	0,218642	0,240566
Steareth-2	0,165094	0,281358	0,259434
Esterato de Octila	3	3	3
BHT	0,05	0,05	0,05
Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30	0,4	0,2	0,2505
Butilenoglicol	2,5	2,5	2,5
Glicerina	2,5	2,5	2,5
EDTA	0,05	0,05	0,05
Ciclometicone	4	4	4
Ciclometicone e polímero de Dimeticone reticulado	2	2	2
Fenoxietanol e Parabenos	0,8	0,8	0,8
Água qsp	82,7	79,8427	80,978

As formulações F1, F2 e F3 adicionadas de 0,5% de palmitato de retinila foram chamadas de A1, A2 e A3, as que foram acrescidas de 5% de acetato de tocoferila foram denominadas E1, E2 e E3, e as contendo de 0,1% de *Tocoretinate* foram chamadas de T1, T2 e T3. Sem a adição dos ativos, foram denominadas V1, V2 e V3.

#### 4.3.2. Etapa 2 – Estudo dos efeitos da concentração de lecitina de soja, phytantriol e triglicérides do ácido cáprico e caprílico.

Para a caracterização dos efeitos e auxiliar na determinação da concentração de substâncias adjuvantes nas formulações já desenvolvidas na etapa 1 com a finalidade de proporcionar benefícios adicionais à formulação cosmética, foi realizado um novo planejamento fatorial Box-Behnken.

O planejamento Box-Behnken foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito das matérias primas phytantriol, lecitina de soja, e triglicérides do ácido cáprico e caprílico no comportamento reológico, sensorial e na hidratação das formulações desenvolvidas. O

planejamento experimental e análise de resultados foram realizados utilizando-se o *Software Minitab 16*.

Assim, os níveis utilizados para a codificação dos fatores encontram-se na Tabela 5. Os experimentos realizados de acordo com os níveis propostos estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 5**– Fatores estudados no planejamento Box-Behnken e seus níveis -1, 0 , +1.

Fatores		Níveis		
		-1	0	+1
<b>X<sub>1</sub></b>	<b>% de Phytantriol</b>	0	1,5	3
<b>X<sub>2</sub></b>	<b>% de Lecitina de Soja</b>	0	1,5	3
<b>X<sub>3</sub></b>	<b>% de Triglicérides de ácido cáprico e caprílico</b>	0	2,5	5

**Tabela 6**- Planejamento Box-Behnken com fatores codificados. X<sub>1</sub>=% de phytantriol X<sub>2</sub> = % de lecitina de soja e X<sub>3</sub>= % de triglicérides do ácido cáprico e caprílico.

Ensaio	X1	X2	X3
<b>1</b>	0	1	1
<b>2</b>	0	0	0
<b>3</b>	1	0	1
<b>4</b>	0	0	0
<b>5</b>	1	0	-1
<b>6</b>	0	1	-1
<b>7</b>	-1	1	0
<b>8</b>	0	-1	-1
<b>9</b>	1	-1	0
<b>10</b>	-1	-1	0
<b>11</b>	-1	0	-1
<b>12</b>	0	0	0
<b>13</b>	-1	0	1
<b>14</b>	0	-1	1
<b>15</b>	1	1	0

De acordo com as concentrações propostas pelo software estatístico, foram elaboradas 15 formulações (Tabela 7). Essas formulações foram avaliadas quanto ao comportamento reológico, efeito hidratante imediato e características sensoriais.



**Tabela 7** – Formulações elaboradas para a etapa do planejamento experimental

Matérias-primas	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15
Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO	4	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4	4	4	5	5
Phytantriol	1,5	1,5	3	1,5	3	1,5	0	1,5	3	0	0	1,5	0	1,5	3
Lecitina de Soja	3	1,5	1,5	1,5	1,5	3	3	0	0	0	1,5	1,5	1,5	0	3
Triglicérides do ácido cáprico e caprílico	5	2,5	5	2,5	0	0	2,5	0	2,5	2,5	0	2,5	5	5	2,5
Steareth-21	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Steareth-2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Esterato de Octila	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
BHT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Butilenoglicol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Glicerina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
EDTA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciclotricone	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ciclotricone e polímero de Dimeticone reticulado	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Ciclotricone e polímero de Dimeticone reticulado	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fenoxietanol e Parabenos	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Água qsp	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

#### 4.3.2.1. Determinação do Comportamento Reológico

As 15 formulações foram submetidas ao estudo do comportamento reológico em triplicata, em reômetro DV-III digital, tipo Cone e Placa, marca Brookfield, utilizando-se spindle CP52 por meio de avaliação dos seguintes parâmetros reológicos: viscosidade, índice de consistência, índice de fluxo e tixotropia (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003b).

#### 4.3.2.2. Avaliação dos Efeitos Imediatos – Hidratação

Para a avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo antes e após três horas de aplicação do produto foi utilizado o equipamento *Corneometer*<sup>®</sup> CM 825 em 10 voluntárias, foram efetuadas 5 medidas em cada região de estudo, sendo calculada a média dos valores obtidos. Posteriormente foi calculada a relação do valor final/ inicial para a análise estatística (GIANETI; MERCURIO; MAIA CAMPOS, 2013; MAIA CAMPOS et al., 2014).

#### 4.3.2.3. Avaliação sensorial

A avaliação Sensorial foi realizada com a aplicação das 300 µL formulações objeto de estudo em uma região circular de 5 cm de diâmetro no antebraço de 10 voluntárias. As formulações foram avaliadas quanto aos parâmetros oleosidade e pegajosidade. Essas

características foram avaliadas em uma escala de 0 a 10 (MANÇO et al., 2015; WORTEL; WIECHERS, 2000).

#### 4.3.2.4. Formulações selecionadas

Levando em consideração o equilíbrio das propriedades reológicas, os efeitos sensoriais e as propriedades hidratantes, três formulações foram selecionadas na segunda etapa (Tabela 8).

**Tabela 8** – Formulações selecionadas na segunda etapa

<b>Matéria</b>	<b>PV</b>	<b>LV</b>	<b>PLV</b>
Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO	4	4	4
Phytantriol	1	-	1
Lecitina de Soja	-	1	1
Trglicérides do ácido cáprico e caprílico	5,0	5,0	5,0
Steareth-21	0,22	0,22	0,22
Steareth-2	0,28	0,28	0,28
Esterato de Octila	3	3	3
BHT	0,1	0,1	0,1
Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30	0,2	0,2	0,2
Butilenoglicol	2,5	2,5	2,5
Glicerina	2,5	2,5	2,5
EDTA	0,05	0,05	0,05
Ciclometicone	4	4	4
Ciclometicone e polímero de Dimeticone reticulado	2	2	2
Fenoxietanol e Parabenos	0,8	0,8	0,8

As formulações PV, LV e PLV adicionadas de 0,5% de palmitato de retinila foram chamadas de PA, LA e PLA, as que foram acrescidas de 5% de acetato de tocoferila foram denominadas PE, LE e PLE, e as contendo de 0,1% de *Tocoretinate* foram chamadas de PT, LT e PLT.

#### 4.4. Testes preliminares de estabilidade

As formulações em estudo foram submetidas a testes preliminares de estabilidade por centrifugação, determinação de pH e avaliação visual semanal durante 28 dias, quando

mantidas em temperatura ambiente e quando submetidas ao estresse térmico à 37°C e 45°C.

#### **4.4.1. Centrifugação**

No teste de centrifugação, 5 gramas de cada amostra objeto de estudo foram centrifugadas a 3000rpm, por 30 minutos em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440, Fanem.

#### **4.4.2. Determinação do pH**

A medida de pH foi realizada em peagômetro Analion, utilizando-se amostras diluídas em água destilada (10%) (DAVIS et al., 1977).

#### **4.4.3. Avaliação das características organolépticas**

Na avaliação visual foram consideradas as seguintes alterações: cor, separação de fases e homogeneidade (GIANETI et al., 2012; MANÇO et al., 2015).

### **4.5. Estudo de estabilidade física**

As formulações consideradas estáveis nos testes preliminares de estabilidade foram submetidas ao estudo do comportamento reológico, em reômetro DV-III digital, tipo Cone e Placa, marca Brookfield, utilizando-se spindle CP52 por meio de avaliação dos seguintes parâmetros reológicos: viscosidade, índice de consistência e índice de fluxo. As amostras foram mantidas na temperatura de 25°C em câmara climática modelo TE-4001-TE, marca Tecnal e submetidas a estresse térmico, nas temperaturas de 37°C e 45°C, em estufas termostatizadas com controle de umidade e fotoperíodo, modelo 111FC (Eletrolab). Foram coletadas para o estudo reológico, alíquotas de 0,5g das amostras em intervalos de tempo de 7, 14, 21, 28 e 56 dias (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003b; MANÇO et al., 2015).

### **4.6. Análise estrutural das formulações**

#### **4.6.1. Análise por Microscopia de luz polarizada**

Uma pequena amostra das formulações V2, PLV, PLA, PLE e PLT foi aplicada em lâminas de vidro e cobertas por uma lamínula. Em seguida, as formulações foram analisadas no microscópio de luz polarizada Axioplan 2, Zeiss® após armazenamento em temperatura ambiente (25°C) e em estufa (45°C) nos tempos 24 horas, e após 7 dias (CHORILLI et al., 2009).

#### **4.6.2. Análise da distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz**

A avaliação do tamanho de gotícula das formulações V2, PLV, PLA, PLE e PLT foi realizada utilizando o equipamento LS 131320 Particle Size Analyzer, Beckman Coulter<sup>®</sup>, permitindo a obtenção do diâmetro interno. A análise foi realizada após armazenamento em temperatura ambiente e em estufa (45°C) nos tempos 24 horas, e após 7 dias.

## ***5. CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---

## **5.1. Triagem de Voluntárias**

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (ANEXO I), 80 voluntárias de fototipo II, III e IV foram selecionadas e divididas em dois grupos de idade: 20 voluntárias com pele jovem (18-35 anos) e outro grupo de 60 voluntárias com pele fotoenvelhecida (40-65 anos) (PATHAK et al., 1993). As voluntárias foram orientadas sobre os objetivos e métodos da pesquisa e, concordando em participar da mesma, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (CEP/ FCFRP – Protocolo nº 273/2012). O Estudo foi conduzido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP;

Adicionalmente, uma parte do estudo clínico foi realizada na França, em parceria com a EVIC Idec e Chanel. Com a finalidade de realizar uma caracterização comparativa da pele brasileira e francesa, 41 voluntárias Francesas de 40 a 65 anos de fototipos II, III e IV foram recrutadas.

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

As participantes do estudo deveriam atender aos critérios de inclusão: sexo feminino, saudáveis, motivadas para livre participação no estudo, não realizar algum procedimento estético e dermatológico ou estudo de avaliação médica que poderia interferir com a presente pesquisa, não apresentar hipersensibilidade cutânea ou alergia aos componentes da formulação, possuir pele saudável na zona de medição (ausência de psoríase, eczemas, eritema, edema, cicatrizes, feridas, lesões), compreender o idioma que o estudo é realizado (português/francês), capaz de ler os documentos recebidos e do cumprimento das explicações dadas, não ter tomado sol nas últimas duas semanas.

Além disso, não poderia apresentar nenhum dos critérios de exclusão: não concordar em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, apresentar problemas de saúde que poderiam afetar adversamente o experimento, ter sido submetida a uma grande cirurgia há pelo menos um ano, mulheres grávidas ou lactantes, uso de medicamentos tópicos ou sistêmicos que podem contrariar o objetivo do estudo (agentes imunossupressores, agentes citostáticos, corticóides, anti-histamínicos), uso de produtos autobronzeadores ou outras técnicas para a remoção de camadas mais profundas da pele testes nas áreas e durante 4 semanas anteriores ao estudo, uso de substâncias irritantes ou medidas para aumentar a circulação sanguínea, massagem durante o período do estudo.

As principais orientações durante o estudo envolvem: a voluntária não deveria aplicar quaisquer produtos cosméticos nas datas das medidas e deve continuar usando o seu produto habitual de higiene.

Todas as voluntárias preencheram um questionário sobre hábitos de proteção e exposição solar, autoavaliação das características cutâneas, hábitos de uso de cosméticos e foram submetidas ao estudo e caracterização cutânea por técnicas de biofísica e análise de imagem.

### **5.1.2. Protocolos de estudos clínicos**

Três protocolos de estudos clínicos foram desenvolvidos: Caracterização da pele fotoenvelhecida em dois grupos de idade; Caracterização da pele fotoenvelhecida no Brasil e na França e Avaliação de eficácia clínica de formulações dermocosméticas. Os protocolos estão descritos a seguir:

#### **5.1.2.1. Caracterização da pele fotoenvelhecida em dois grupos de idade**

40 voluntárias participaram da análise comparativa das características cutâneas grupo jovem (Grupo 1) e pele madura (Grupo 2). O grupo 1 consistia de 20 voluntárias com faixa etária entre 18 a 35 anos, e o grupo 2, de 20 voluntárias de 40 a 65 anos. Foram realizadas avaliações do conteúdo aquoso do estrato córneo, perda de água transepidermica, viscoelasticidade da pele, microrrelevo cutâneo, coloração da pele, espessura e ecogenicidade da derme e características morfológicas e estruturais da epiderme na face, no antebraço volar, no antebraço dorsal e no dorso das mãos.

#### **5.1.2.2. Caracterização da pele fotoenvelhecida no Brasil e na França**

82 voluntárias de 40 a 65 anos participaram da análise comparativa das características cutâneas da pele Brasileira e pele Francesa. O grupo 1 consistia de 41 voluntárias francesas de idade média  $53.95 \pm 7.54$  anos, e o grupo 2 de 41 voluntárias brasileiras de idade de  $53.9 \pm 7.22$  anos. Foram realizadas avaliações do conteúdo aquoso do estrato córneo, perda de água transepidermica, viscoelasticidade da pele, microrrelevo cutâneo, coloração da pele, espessura e ecogenicidade da derme e características morfológicas e estruturais da epiderme na face, no antebraço volar, no antebraço dorsal e no dorso das mãos. Adicionalmente, na pele francesa foi realizada a análise da imagem tridimensional (3D) da pele.

### **5.1.2.3. Avaliação de eficácia clínica de formulações dermocosméticas**

48 voluntárias participaram do estudo de eficácia clínica em longo prazo. Para a avaliação dos efeitos na face, 24 voluntárias receberam a formulação contendo 0,1% de TR (FT) e 24 voluntárias receberam a formulação veículo (FV). As voluntárias eram orientadas a aplicar 1,2 g da formulação na face todas as noites. As voluntárias receberam um protetor solar padrão para ser aplicado nas regiões de estudo.

Para a avaliação dos antebraços e dorso das mãos, 22 voluntárias foram orientadas a aplicar formulação veículo (FV), 22 aplicaram a formulação contendo 0,1% de TR (FT), e 17 aplicaram a formulação contendo 5% de Acetato de Tocoferila (FE), e 17 aplicaram a formulação contendo 0,5% de Palmitato de Retinila (FA), sendo que 18 voluntárias foram orientadas a não aplicar nenhuma formulação em um dos antebraços e mãos (Controle).

Foram realizadas medidas utilizando técnicas de biofísica e análise de imagem no tempo inicial (antes da aplicação dos produtos) e após 4, 8 e 12 semanas (28, 56 e 84 dias) de aplicação diária das formulações objeto de estudo. Após o tratamento, foi realizada a avaliação de percepção de eficácia por meio da aplicação de questionários.

Foram avaliadas as características morfológicas e estruturais da epiderme, o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidermica de água, as propriedades mecânicas (viscoelasticidade), o microrrelevo e coloração da pele, manchas, poros e rugas na pele, além de avaliação da ecogenicidade e espessura da derme.

### **5.1.3. Questionário de avaliação de hábitos de proteção e exposição solar.**

As participantes preencheram um questionário sobre a sua exposição ao sol e hábitos de proteção em diferentes períodos de sua vida: antes de 15 anos de idade, entre 15 e 25 anos, entre 25 e 35 anos (quando aplicável) e os hábitos atuais. Os hábitos de proteção solar e exposição foram graduados e a média de cada grupo foi calculada.

O tempo médio de exposição solar por dia foi classificada: (1) menos de uma hora, (2) entre 1 e 3 horas, (3) entre 3 e 6 horas e, (4) mais do que 6 horas por dia. a frequência de bronzeamento foi classificada: (1) nunca (2), raramente (0-1 vezes em um mês), (3) às vezes (1-3 vezes em um mês), (4) frequentemente (mais de 3 vezes em um mês). a frequência de uso de protetores solares foi graduada: (1) nunca, (2) raramente, (3) frequentemente, (4) sempre.



#### **5.1.4. Avaliação da percepção dos sinais do fotoenvelhecimento**

As voluntárias receberam um questionário quanto aos parâmetros relacionados ao fotoenvelhecimento tais como manchas, rugas, rugosidade da pele, tamanho de poros antes da participação do estudo de eficácia clínica, para caracterizar a pele fotoenvelhecida.

#### **5.1.5. Avaliação por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele**

##### **5.1.5.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo**

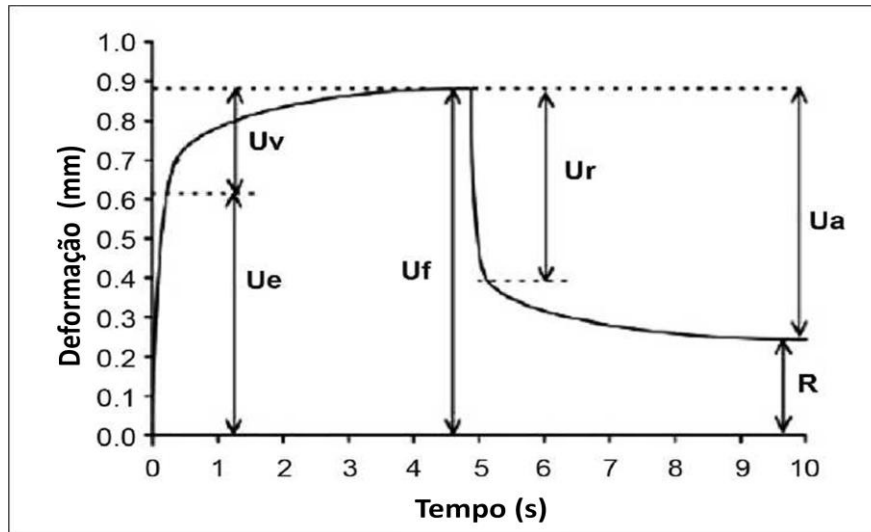
Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento *Corneometer*<sup>®</sup> *CM 825*, baseado no princípio da medida da capacitância elétrica, ou seja, na variação da constante dielétrica da água. Os resultados são fornecidos em unidades arbitrárias (UA) onde se estima que 1 UA corresponda a 0,2 - 0,9 mg de água por grama de estrato córneo. Foram efetuadas 5 medições em cada região de estudo, sendo calculada a média dos valores obtidos (GIANETI; MERCURIO; MAIA CAMPOS, 2013; MAIA CAMPOS et al., 2014).

##### **5.1.5.2. Determinação da perda transepidermica de água (TEWL)**

Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento *Tewameter*<sup>®</sup> *TM 210*, acoplado a um software, cuja função é medir a perda transepidermica de água, baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick. Os valores são dados em  $\text{g}\cdot\text{m}^2\cdot\text{h}^{-1}$ . A sonda do aparelho permaneceu por 2 minutos sobre a pele nas regiões dos antebraços e da face (GIANETI; MERCURIO; MAIA CAMPOS, 2013; MAIA CAMPOS et al., 2014).

##### **5.1.5.3. Determinação das propriedades viscoelásticas da pele**

Foram realizadas medidas utilizando o equipamento *Cutometer*<sup>®</sup> *SEM 575*, acoplado a um software. Este aparelho possui uma sonda com um orifício de 2 mm de diâmetro contendo um sistema de leitura óptico. Essa sonda exerce uma pressão negativa sobre a pele, sendo que a intensidade de luminosidade captada é proporcional à penetração da pele no dispositivo (DOBREV, 2000; GIANETI; MERCURIO; MAIA CAMPOS, 2013; MAIA CAMPOS et al., 2014). O *software* fornece os seguintes parâmetros relacionados à viscoelasticidade da pele (Figura 2):



**Figura 2-** Parâmetros avaliados pelo equipamento Cutometer.

$R0 = Uf$  = Primeira amplitude máxima, ponto mais elevado da primeira curva, tem implicação na firmeza da pele.

$R1 = Uf - Ua$  = Primeira amplitude mínima, ponto inferior da primeira curva (capacidade de voltar ao estado original)

$R2 = Ua/Uf$  = Porção entre a amplitude máxima e a capacidade de redefinição da pele (elasticidade bruta). O valor mais próximo de 1 (100%) é o da curva mais elástica

$R3$  = Última amplitude máxima, o ponto mais alto da última curva, comparado com a amplitude máxima da primeira curva. “Efeitos de cansaço” da pele são visíveis, pois a amplitude aumenta a cada nova sucção.

$R4$  = Última amplitude mínima, ultimo ponto de medição, comparada com a amplitude mínima da primeira curva, “efeitos de cansaço” da pele são visíveis, pois a capacidade de deformação diminui a cada nova sucção.

$R5 = Ur/Ue$  = elasticidade líquida. Quanto mais o valor se aproximar de 1 (100%) maior será a elasticidade da curva.

$R6 = Uv/Ue$  = parte da viscoelasticidade na parte elástica da curva. Quanto menor o valor, maior será a elasticidade. O aumento de  $R6$  pode estar relacionado à hidratação.

$R7 = Ur/Uf$  = parte da elasticidade comparada com a curva completa; quando mais próximo de 1 (100%) mais elástica será a curva.

$R8 = Ua$  da primeira curva. Quanto mais  $Ua$  estiver próximo de 0, maior será a capacidade da pele de voltar a seu estado original.

$R9 = R3 - R0$ . Representa efeitos de cansaço da pele, após sucções repetidas da pele. Quanto menor for  $R9$ , menores serão os efeitos do cansaço. (COURAGE; KHAZAKA, 2004)

#### 5.1.5.4. Determinação do microrrelevo cutâneo

Neste estudo foi utilizado o equipamento *Visioscan*<sup>®</sup> VC 98, o qual permite a avaliação quali e quantitativa da superfície da pele nas condições fisiológicas, por meio de técnicas de profilometria óptica, as quais utilizam um processo de digitalização de imagem obtida por uma câmera de vídeo. Com este método foram avaliados os seguintes parâmetros relacionados à superfície da pele (SELS - *Surface Evaluation of Living Skin*): rugosidade ( $Se_r$ ) - porção de pontos escuros que representa a rugosidade;  $Se_w$  - número e largura das rugas, sendo que quanto maior número de rugas maior é este valor;  $Se_{sm}$  refere-se à forma e largura das rugas, sendo que quanto maior o valor dessa variável melhor a textura e maciez da pele. Foi avaliado ainda o parâmetro  $R_t$  (rugosidade), relacionado à profundidade das rugas (DZWIGALOWSKA et al., 2013; PENA FERREIRA; COSTA; BAHIA, 2010b).

#### 5.1.5.5. Avaliação das características da derme

Para a avaliação da espessura e ecogenicidade da derme foi utilizado um equipamento de ultrassom de 20MHz (*Dermascan*<sup>®</sup> C, Cortex Technology). A espessura da derme foi determinada por um analisador de imagem. Foi ainda determinada a espessura da derme e a ecogenicidade, por unidade de área, determinada em pixels, com o auxílio de um software que está relacionada com retenção de água entre as fibras de colágeno e com o envelhecimento e fotoenvelhecimento. Foram calculadas as quantidades de pixels de baixa ecogenicidade (próximos abaixo de 30 – próximo à coloração preta) em relação ao número total de pixels na derme superior, na derme inferior e na derme total. Para estes parâmetros, quanto mais próximo de 1, menor a ecogenicidade (GIANETI; MAIA CAMPOS, 2014; GNIADHECKA; JEMEC, 1998).

#### 5.1.5.6. Determinação da coloração da pele

A avaliação da coloração da pele foi realizada utilizando o *Colorimeter*<sup>®</sup> CL 400 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany) no Brasil e o equipamento *Chroma Meter CR-400* (Konica Minolta) na França. A cor analisada é convertida em valores numéricos de acordo com as coordenadas no espaço de cor  $L^*a^*b^*$  e determinação do ângulo tipológico individual (ITA) (CLARYS et al., 2000; GIANETI; MAIA CAMPOS, 2014).

### **5.1.5.7. Avaliação das características morfológicas e estruturais da epiderme e derme papilar**

A avaliação das características celulares das diferentes camadas da pele foi realizada utilizando o microscópio confocal de reflectância a laser *Vivascope*® 1500, o qual utiliza uma fonte a laser com um comprimento de onda de 830 nm e uma objetiva de imersão com capacidade de detectar 20 imagens por segundo (SAUERMAN et al., 2002).

As imagens microscópicas foram realizadas utilizando dois sistemas de obtenção de imagens, o *Vivastack* e o *Vivablock*. O conjunto de imagens do *Vivastack* são múltiplas imagens confocais em profundidade sucessivas em um certo local do tecido, e foram obtidas imagens a cada 1,5  $\mu\text{m}$  até a profundidade de 37,5 $\mu\text{m}$ , a cada 3  $\mu\text{m}$  até a profundidade de 112,5 $\mu\text{m}$  e a cada 4,5  $\mu\text{m}$  até a profundidade de 132,5 $\mu\text{m}$ . O conjunto de imagens do *Vivablock* representa um mosaico de imagens de uma determinada profundidade do tecido cutâneo, de 2 mm<sup>2</sup>. Além disso, foram obtidas imagens macroscópicas por meio da câmera macroscópica digital com qualidade dermatoscópica (*VivaCam*®). Foi realizada a interpretação das imagens de acordo com a literatura recente, e com auxílio do software *Image J*® (BIELFELDT; BÖHLING; WILHELM, 2011; BÖHLING et al., 2014; LONGO et al., 2013a).

Para a definição dos perfis de imagem correspondentes a cada característica, foi realizada uma vasta pesquisa na literatura, quanto às características histológicas relacionadas ao fotoenvelhecimento, tais como alterações na arquitetura tecidual e manchas. Baseado nessa pesquisa, foi elaborado um tutorial de análise das características de interesse, e definição do protocolo para a avaliação das imagens da microscopia confocal de reflectância a laser para a avaliação das características do fotoenvelhecimento e melhoria das condições da pele após a aplicação de formulações dermocosméticas. Os parâmetros analisados estão descritos nas tabelas 9 a 11. Adicionalmente, a presença de características como: queratinócitos com núcleos picnóticos, presença de células dendríticas na JDE, anéis policíclicos (lentigo solar), elastose solar severa e infiltrado inflamatório na derme superior foram avaliados na pele fotoenvelhecida de mulheres francesas e brasileiras (SAUERMAN et al., 2002; ULRICH et al., 2009; WURM et al., 2012).

**Tabela 9-** Parâmetros da microscopia confocal de reflectância analisados no estrato córneo.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
<b>Espessura do estrato córneo</b>	Distância entre o topo do estrato córneo e as primeiras células vivas
<b>Tamanho dos corneócitos</b>	Média do diâmetro de três corneócitos.

**Tabela 10-** Parâmetros da microscopia confocal de reflectância analisados na epiderme viável

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
<b>Espessura Mínima da Epiderme Viável</b>	Primeira imagem que revela o padrão de favo de mel até o início da papila dérmica
<b>Espessura Máxima da Epiderme Viável</b>	Primeira imagem que revela o padrão de favo de mel até o fim da papila dérmica
<b>Espessura Média da Epiderme Viável</b>	Primeira imagem que revela o padrão de favo de mel até metade da papila dérmica
<b>Espessura da Epiderme Total</b>	Espessura média da Epiderme Viável + Espessura do Estrato Córneo
<b>Espessura da Camada Granulosa</b>	Primeira imagem que revela o padrão de favo de mel até início da camada espinhosa
<b>Homogeneidade da epiderme (superior e inferior)</b>	Classificação que varia de 1 – Padrão de favo de mel regular até 4- Desarranjo total do padrão de favo de mel (WURM et al., 2012)
<b>Contorno de queratinócitos</b>	O padrão do brilho entre os contornos dos queratinócitos foram classificados de 1(pouco brilho) até 4 (Muito brilho) (MARCO et al., 2013)

**Tabela 11-** Parâmetros da microscopia confocal de reflectância analisados na junção dermoepidérmica

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
<b>Profundidade da papila dérmica</b>	Distância entre o topo da papila até o fim
<b>Pigmentação das papilas dérmicas</b>	A pigmentação das papilas dérmicas foi classificada de 1 – Baixo brilho até 4 – Alto brilho
<b>Uniformidade das papilas dérmicas</b>	1 – Padrão regular até 4 – Ausência de papilas dérmicas (WURM et al., 2012; LONGO, CATERINA et al., 2013)

A reprodutibilidade da técnica para a avaliação da espessura das camadas cutâneas no estudo clínico em longo prazo foi avaliada. A reprodutibilidade foi definida de duas formas: (1) a concordância entre três imagens obtidas sucessivamente no antebraço volar, ou seja, a

reprodutibilidade de reposicionamento e (2) a concordância entre duas imagens obtidas em intervalos de 3 meses, considerada como reprodutibilidade temporal (NOUVEAU-RICHARD et al., 2004). Em ambos os casos as imagens foram obtidas no antebraço volar das voluntárias, pelo mesmo operador, analisadas pelo mesmo observador, utilizando o mesmo equipamento na mesma região dos mesmos voluntários. Para avaliar a confiabilidade das medidas, o Coeficiente de Correlação Intraclasse foi determinado.

#### **5.1.5.8. Avaliação fotográfica de alta resolução**

Fotografias padrão foram feitas usando Visioface (Courage Khazaka, Alemanha) no Brasil, e o VISIA-CR (Canfield, Estados Unidos) na França. A fotografia de alta definição resolução da face foi adquirida em condições padronizadas para avaliação dos sinais de fotoenvelhecimento (GIANETI; MAIA CAMPOS, 2014; JANG et al., 2015).

#### **5.1.5.9. Imagem 3D**

O sistema AEVA-HE com a lente objetiva FOV HE-250 foi usado para obter as imagens 3D do rosto das voluntárias na França. O AEVA-HE é um processo de medição multiparamétrico que pode determinar uma série de parâmetros relevantes da superfície o rosto em uma única medida com o auxílio do scanner 3D de luz estruturada.

O equipamento está equipado com uma bancada de posicionamento e uma câmara de alta resolução para a aquisição das imagens. O software AEVA permite o cálculo do perfil de rugosidade (2D), o cálculo da rugosidade da superfície ou ondulação (3D), a detecção de objetos 3D e o cálculo do volume dos sulcos da pele (EOTECH,2015).

Os seguintes parâmetros de rugosidade foram quantificados: SQ: rugosidade no que diz respeito à variação média quadrática (mm). Variações na amplitude média. Uma diminuição SQ indica suavização da superfície e uma diminuição nas rugas e linhas de expressão. ST: amplitude máxima do relevo (mm). Uma diminuição ST mostra uma redução nas maiores rugas. SA: média de rugosidade (mm). Uma redução de SA evidência uma diminuição das rugas e linhas finas. Stm: diferença média entre os picos e vales (mm). Uma diminuição Stm indica suavização da superfície estudada (CANTECOR et al., 2013).

Também foram calculados os parâmetros da morfologia das rugas periorbitais: Volume (mm<sup>3</sup>), profundidade máxima (mm), profundidade (mm), Área Total (mm<sup>2</sup>) e Circunferência das rugas periorbitais (mm<sup>2</sup>). Além disso, o *software* de avaliação 3D calculada a área total dos sulcos na face, e a sua densidade (Área de sulcos / área total).

### **5.1.6. Avaliação Sensorial**

A avaliação sensorial das formulações FT e FV foi realizada pela metodologia check-all-that-apply- CATA, “Checagem de tudo o que é necessário”. As voluntárias foram orientadas a responder um questionário sobre a qualidade da formulação: oleosa, pegajosa, suave, fácil de espalhar, facilmente absorvida, e também nos efeitos após a aplicação na pele: resíduo oleoso, pele macia, pele hidratada, resíduo oleoso e resíduo esbranquiçado (WAGEMAKER et al., 2014).

### **5.1.7. Percepção de eficácia**

Após a aplicação dos produtos por 84 dias, as voluntárias foram solicitadas a responder um questionário de percepção de eficácia em relação à melhoria da pele referente aos atributos: pele mais hidratada, manchas mais claras, melhoria de rugas, pele mais macia, pele mais firme, redução de cravos e espinhas, poros mais fechados.

### **5.1.8. Delineamento Estatístico**

#### **5.1.8.1. Caracterização da pele fotoenvelhecida em dois grupos de idade**

Os dados experimentais obtidos nos estudos clínicos de caracterização da pele foram submetidos à análise estatística para a interpretação dos mesmos sendo que, no caso da distribuição ser normal, o teste indicado foi a Análise de Variância (ANOVA) com a aplicação do pós-teste de Tukey para comparar as diferentes regiões de estudo. No caso de distribuição não paramétrica, os dados foram analisados por Friedman. O teste T de Student não pareado foi utilizado para comparar o Grupo 1 e Grupo 2 em caso de distribuição normal, ou Mann Whitney, no caso de dados não paramétricos. Um nível de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

De acordo com os resultados dos parâmetros avaliados no estudo clínico de caracterização, foi proposto um modelo matemático que permitiu a integração dos parâmetros de biofísica e análise de imagem em apenas um índice por meio de uma análise multivariada: da análise do componente principal (Principal component Analysis – PCA). Para tal, o modelo matemático foi desenvolvido com os dados experimentais da face das voluntárias. As seguintes características foram consideradas para a obtenção do Índice de Fotoenvelhecimento: Rugosidade da pele; Número e largura dos sulcos; Profundidade máxima dos sulcos;  $U_a/U_f$  – Elasticidade bruta; Redeformação residual após a sucção (R4);  $U_v/U_E$  – componente viscoso;  $U_r/U_f$  (Elasticidade); Espessura da epiderme; Espessura do estrato córneo; Tamanho dos

corneócitos; Pigmentação da pele (Ângulo Tipológico Individual); Hipoecogenicidade (LEP/TEP); Espessura da derme.

### **5.1.8.2. Caracterização da pele fotoenvelhecida no Brasil e na França**

Para comparar as duas populações, o teste T de Student não pareado foi utilizado se a distribuição foi paramétrica e o teste Mann - Whitney foi utilizado quando a distribuição foi não paramétrica. A prevalência das características cutâneas foi avaliada pelo teste Qui-quadrado ( $X^2$ ). Um nível de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### **5.1.8.3. Avaliação de eficácia clínica de formulações dermocosméticas**

Os efeitos das formulações ao longo do tempo foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) com a aplicação do pós-teste de Tukey se a distribuição for normal. No caso de distribuição não paramétrica, os dados foram analisados por Friedman. Um nível de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Para a avaliação da reprodutibilidade do MCR, o coeficiente de correlação intraclassa entre as medidas em triplicata obtidas em um mesmo tempo foi obtido. Além disso, coeficiente de correlação intraclassa das médias obtidos nos tempos iniciais e após 84 dias foram calculados. Um índice de 0,7 foi considerado como reprodutível.



**6. RESULTADOS**

---

## 6.1. Desenvolvimento das formulações

### 6.1.1. Etapa 1: Estudo dos efeitos da concentração da cera autoemulsionante, polímero hidrofílico e proporção de tensoativos não iônicos.

A influência dos fatores sobre os parâmetros reológicos: índice de consistência, índice de fluxo, viscosidade aparente mínima e área de histerese foi estudado com o planejamento Box-Behnken. Os resultados para cada resposta estudada estão apresentados nas tabelas 12 a 15. A identificação dos parâmetros significativos foi realizada pelo *software Minitab 16*. Estabeleceu-se como significativos os parâmetros com  $p < 0,05$  e negligenciados os parâmetros que apresentaram nível de significância maior que 0,05.

**Tabela 12** – Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) e VAM (Viscosidade aparente mínima) estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações sem adição do ativo.

Ensaio	IC	IF	AH	VAM
E1	45443	0,16	4932,694	1347,556
E2	48507	0,21	5689,604	1689,328
E3	23247	0,11	2256,968	602,1689
E4	11830	0,11	1038,048	312,4768
E5	25072	0,16	774,604	787,702
E6	34405	0,14	2005,32	1009,04
E7	28167	0,26	4346,826	1337,791
E8	18984	0,26	3762,924	885,351
E9	13544	0,08	635,018	299,457
E10	28120	0,11	2083,96	742,1325
E11	25371	0,25	5681,74	1132,728
E12	5557	0,12	377,472	149,7285
E13	24588	0,1	1844,108	628,2086
E14	40937,5	0,255	5341,622	1847,194
E15	24375	0,13	503,296	693,3079

**Tabela 13** – Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) e VAM (Viscosidade aparente mínima) estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 0,5% de Palmitato de retinila.

<b>Ensaio</b>	<b>IC<sub>A</sub></b>	<b>IF<sub>A</sub></b>	<b>AH<sub>A</sub></b>	<b>VAM<sub>A</sub></b>
E1	44678	0,16	5135,192	1341,046
E2	47887	0,2	6000,232	1611,209
E3	27718	0,11	2667,862	722,6026
E4	11552	0,12	1018,388	325,4967
E5	21856	0,22	654,678	836,5265
E6	31827	0,17	1999,422	1015,55
E7	28050	0,26	4474,616	1318,262
E8	20382	0,26	4097,144	1002,53
E9	14305	0,07	623,222	318,9868
E10	26835	0,11	2467,33	693,3079
E11	24276	0,24	5378,976	1048,099
E12	5710	0,14	385,336	172,5132
E13	26561	0,11	2076,096	686,798
E14	38217	0,255	5489,072	1703,975
E15	21428	0,15	513,126	664,0132

**Tabela 14**– Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) e VAM (Viscosidade aparente mínima) estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 5% de Acetato de tocoferila.

<b>Ensaio</b>	<b>IC<sub>E</sub></b>	<b>IF<sub>E</sub></b>	<b>AH<sub>E</sub></b>	<b>VAM<sub>E</sub></b>
E1	45780	0,18	6212,56	1474,5
E2	56419	0,225	7254,54	1868,351
E3	28207	0,11	2591,188	729,1126
E4	15835	0,13	1564,936	452,4404
E5	26021	0,18	1134,382	865,8212
E6	40494	0,15	3188,852	1178,298
E7	29080	0,24	5728,924	1230,377
E8	13891	0,22	2404,418	582,6391
E9	17012	0,08	1043,946	390,596
E10	31958	0,12	2485,024	865,8212
E11	29157	0,25	6611,658	1256,417
E12	7544	0,15	640,916	227,8477
E13	31511	0,13	2984,388	865,8212
E14	43240,5	0,24	7407,888	1809,762
E15	27326	0,15	878,802	826,7616

**Tabela 15** – Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) , VAM (Viscosidade aparente mínima) e Tamanho de partícula (TP) estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 0,1% de *Tocoretinate* .

Ensaio	IC <sub>T</sub>	IF <sub>T</sub>	AH <sub>T</sub>	VAM <sub>T</sub>	TP <sub>T</sub>
1	45780	0,18	6212,56	1474,5	5,34409
2	56419	0,225	7254,54	1868,351	5,05698
3	28207	0,11	2591,188	729,1126	4,61443
4	15835	0,13	1564,936	452,4404	4,8195
5	26021	0,18	1134,382	865,8212	6,86923
6	40494	0,15	3188,852	1178,298	6,38925
7	29080	0,24	5728,924	1230,377	9,898
8	13891	0,22	2404,418	582,6391	14,2901
9	17012	0,08	1043,946	390,596	6,61526
10	31958	0,12	2485,024	865,8212	5,71455
11	29157	0,25	6611,658	1256,417	9,46815
12	7544	0,15	640,916	227,8477	6,34829
13	31511	0,13	2984,388	865,8212	6,6706
14	43240,5	0,24	7407,888	1809,762	7,81553
15	27326	0,15	878,802	826,7616	8,59471

#### 6.1.1.1. Análise Estatística para Índice de Consistência (IC):

As equações 2-5 representam os modelos ajustados obtidos a partir análise estatística que relaciona a resposta, índice de consistência (IC), e os fatores significativos codificados  $X_1$  = Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO de e  $X_2$ = Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30.

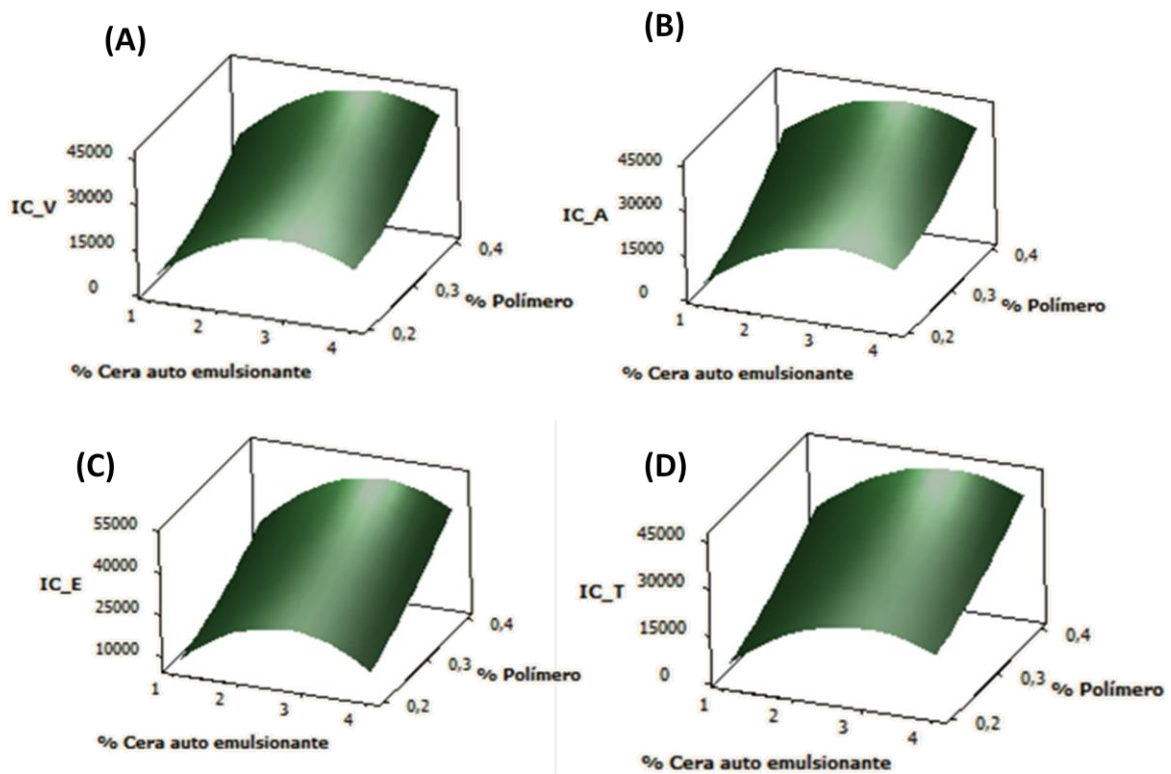
$$(2) \quad IC_V = 29037 + 7410 X_{1+} + 10518 X_2 - 11488,8 X_1^2$$

$$(3) \quad IC_A = 28407,7 + 6455 X_{1+} + 11140,5 X_2 - 9908,7 X_1^2 + 4507,8 X_2^2$$

$$(4) \quad IC_E = 35645 + 5846,3 X_{1+} + 12358,1 X_2 - 14 774,6 X_1^2$$

$$(5) \quad IC_T = 31371 + 6904 X_{1+} + 11116,4 X_2 - 10618,6 X_1^2$$

Os fatores “% de cera autoemulsionante” e “% de polímero” foram significativos afetando de forma linear a resposta objeto de estudo. A proporção de tensoativos não forneceu resultados significativos para a resposta em análise. Além disso, para todas as formulações estudadas, o fator “Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO” apresentou um efeito quadrático negativo. Por meio dos coeficientes das equações obtidas, observa-se que  $X_2$  apresenta efeito mais pronunciado para a resposta estudada que  $X_1$ . Os efeitos dos fatores estudados podem ser também observados na figura 3, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir das equações 2- 5.



**Figura 3** - Superfícies de resposta para Índice de Consistência (IC) em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de *Tocoretinate* (D).

#### 6.1.1.2. Análise Estatística para Índice de Fluxo (IF):

As equações 6-9 representam os modelos ajustados obtidos a partir análise estatística que relaciona a resposta, índice de fluxo (IF), e os fatores significativos codificados  $X_1 =$  Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO de e  $X_2 =$  Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30.

$$(6) \quad IF_V = 0,11667 + 0,0756 X_1 + 0,03979 X_1^2 + 0,029792 X_2^2$$

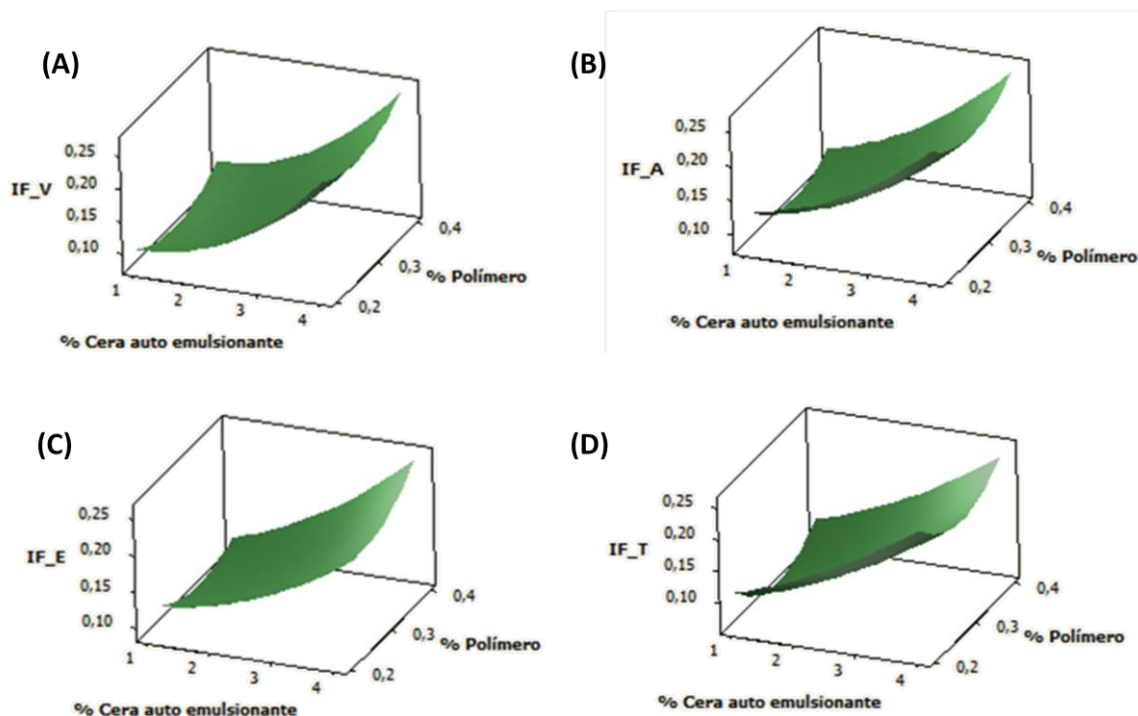
$$(7) \quad IF_A = 0,13 + 0,071875 X_1 + 0,035625 X_2^2$$

$$(8) \quad IF_E = 0,13333 + 0,06 X_1 + 0,027708 X_2^2$$

$$(9) \quad IF_T = 0,12 + 0,072 X_1 + 0,045 X_2^2$$

O fator “% de cera autoemulsionante” ( $X_1$ ) afetou de forma linear a resposta em estudo. Por outro lado, efeitos quadráticos positivos foram obtidos para a “% de polímero”. A proporção de tensoativos não forneceu resultados significativos para a resposta em análise. Além disso, para uma das formulações estudadas, o fator “Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO” apresentou efeito quadrático negativo.

Os efeitos dos fatores estudados podem ser também observados na figura 4, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir das equações 6-9.



**Figura 4-** Superfícies de resposta para Índice de Fluxo (IF) em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de Tocoretinate (D).

### 6.1.1.3. Análise Estatística para Área de Histerese (AH)

As equações 10-13 representam os modelos ajustados obtidos a partir análise estatística que relaciona a resposta, Área de Histerese (AH), e os fatores significativos codificados  $X_1$  = Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO de e  $X_2$ = Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30.

$$(10) \quad AH_V = 1977,80 + 1853,2 X_{1+} + 1600,32 X_2$$

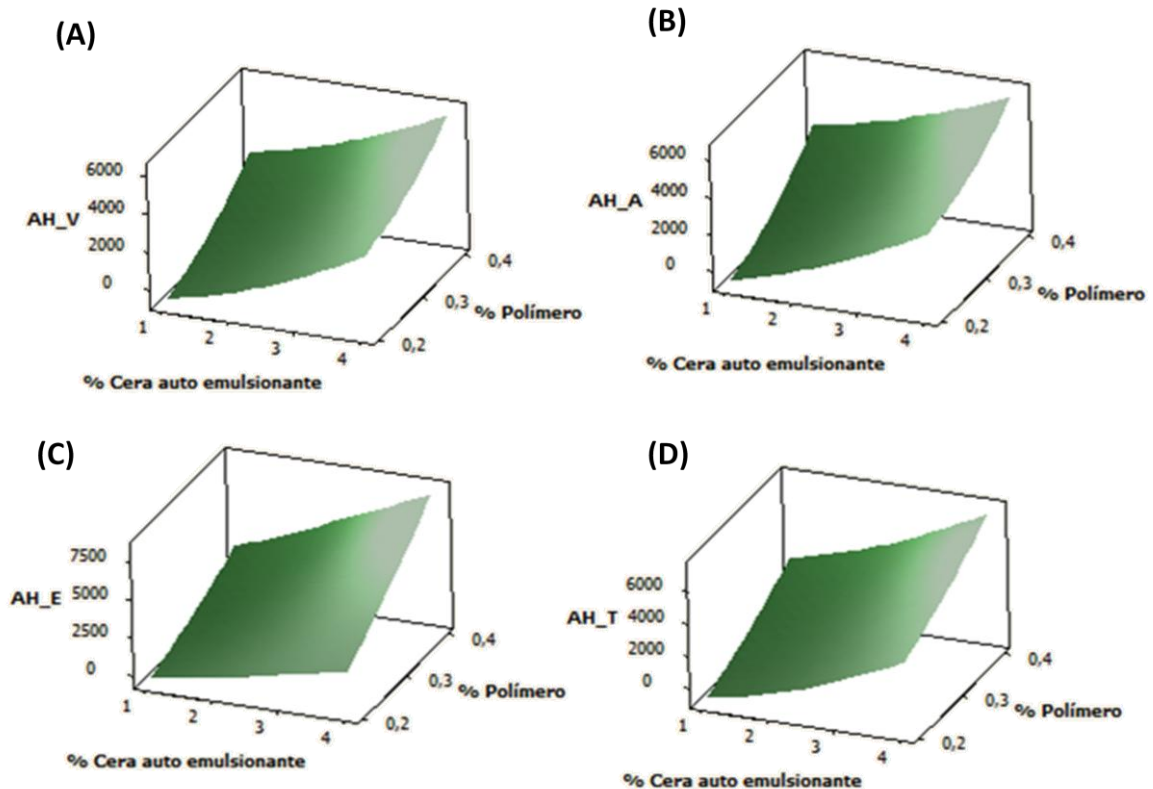
$$(11) \quad AH_A = 2180 + 1843,1 X_{1+} + 1705,3 X_2$$

$$(12) \quad AH_E = 2886,09 + 1980 X_{1+} + 2038,99 X_2$$

$$(13) \quad AH_T = 2388,7 + 2197,3 X_{1+} + 1871,9 X_2$$

A proporção de tensoativos não forneceu resultados significativos para a resposta em análise. Os fatores % de cera autoemulsionante ( $X_1$ ) e % de polímero ( $X_2$ ) influenciaram de forma linear e positiva a resposta em estudo. Não foram obtidos efeitos quadráticos e de interação para nenhuma variável em questão.

Os efeitos dos fatores estudados podem ser também observados na figura 5, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir das equações 10-13.



**Figura 5-** Superfícies de resposta para Área de Histerese (AH) em função dos fatores: % de Cera auto emulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de *Tocoretinate* (D).

#### 6.1.1.4. Análise Estatística para Viscosidade Aparente Mínima (VAM)

As equações 14 - 17 representam os modelos ajustado obtidos a partir da análise estatística que relaciona a resposta, Viscosidade aparente mínima (VAM), e os fatores significativos codificados  $X_1 = \text{Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicitila e Fosfato Cetílico 10 EO}$  de e  $X_2 = \text{Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30}$ .

$$(14) \quad VAM_V = 793,13 + 479,90 X_1 + 371,27 X_2 + 218,42 X_2^2$$

$$(15) \quad VAM_A = 798,55,7 + 441,66 X_1 + 337,91 X_2 + 231,17 X_2^2$$

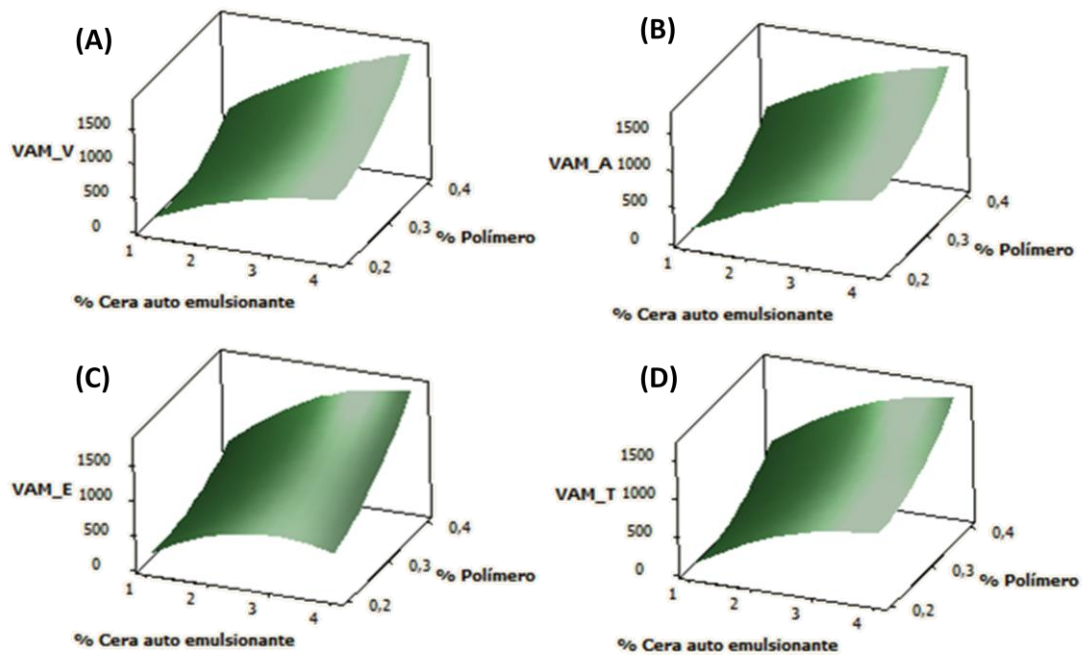
$$(16) \quad VAM_E = 969,98 + 381,9 X_1 + 422,33,1 X_2 - 279,52 X_1^2 + 146,88 X_2^2 + 181,464 X_1 X_2$$

$$(17) \quad VAM_T = 847,38 + 434,3 X_1 + 344,42 X_2$$



Efeitos lineares positivos foram obtidos para os fatores  $X_1$  e  $X_2$ . Por outro lado, a proporção de tensoativos não apresentou efeito significativo na resposta estudada. Efeitos quadráticos positivos de  $X_2$  foram obtidos para as formulações veículo e contendo vitaminas A e E. Além disso, observa-se efeito de interação positivo entre as variáveis  $X_1$  e  $X_2$  para a formulação contendo vitamina E.

Os efeitos dos fatores estudados podem ser também observados na figura 6, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir das equações 14-17.



**Figura 6-** Superfícies de resposta para Viscosidade Aparente Mínima (VAM) em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para as formulações veículo (A), contendo 0,5% de palmitato de retinila (B), 5% de acetato de tocoferila (C) e 0,1% de *Tocoretinate* (D).

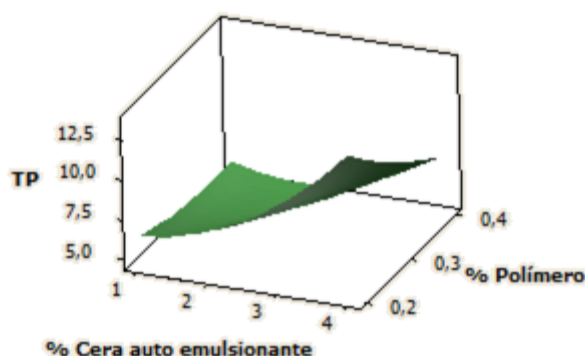
#### 6.1.1.5. Análise estatística para tamanho de partícula.

A equação 18 representa o modelo ajustado obtido a partir da análise estatística que relaciona a resposta, Tamanho de partícula (TP), e os fatores significativos codificados  $X_1$  = Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO de e  $X_2$  = Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30.

$$(18) \quad TP = 6,2581 + 2,3843 X_1 - 1,6589 X_2 + 1,6215 X_1^2 - 1,18529 X_1 X_2$$

Foi obtido efeito linear e efeitos quadráticos positivos para  $X_1$  e efeito linear negativo para  $X_2$ . Além disso, efeitos negativos na interação entre  $X_1$  e  $X_2$  foram observados. Assim, assume-se que o aumento da cera autoemulsionante está relacionado a tamanho de partículas maiores. Por outro lado, a concentração de polímero auxilia na redução do tamanho de partícula da formulação estudada.

Os efeitos dos fatores estudados podem ser também observados na figura 7, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir da equação 18.



**Figura 7-** Superfície de resposta para Tamanho de partícula em função dos fatores: % de Cera autoemulsionante (Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO) e % de Polímero (Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30) para a formulação contendo 0,1% de *Tocoretinate*.

Em síntese, de acordo com os resultados da regressão multivariada realizada na primeira etapa do desenvolvimento, os principais efeitos do “Álcool Cetearílico, Fosfato de Dicetila e Fosfato Cetílico 10 EO” nos parâmetros reológicos das formulações foram: aumento do índice de consistência, do índice de fluxo, da área de histerese, da viscosidade aparente mínima e do tamanho de partícula. Os efeitos do “Acrilatos/ Polímero cruzado de alquil acrilato C10-30” foram: aumento do índice de consistência, da área de histerese, da viscosidade aparente mínima e no aumento índice de fluxo. A proporção de tensoativos não apresentou resultados significativos nos parâmetros reológicos estudados.

### **6.1.2. Etapa 2 – Estudo dos efeitos da concentração de lecitina de soja, phytantriol e triglicérides do ácido cáprico e caprílico.**

A influência dos fatores de sobre os parâmetros reológicos: índice de consistência, índice de fluxo, viscosidade aparente mínima e área de histerese, sobre os parâmetros sensoriais pegajosidade e oleosidade e sobre o efeito hidratante da formulação foi estudado

utilizando o planejamento Box- Behnken. Os resultados para cada resposta estudada estão apresentados na tabela 16.

A identificação dos parâmetros significativos foi realizada pelo *software Minitab 16*. Estabeleceu-se como significativos os parâmetros com  $p < 0,05$  e negligenciados os parâmetros que apresentaram nível de significância maior que 0,05.

**Tabela 16** – Resultados para as respostas IC (índice de consistência), IF (índice de fluxo), AH (área de histerese) , VAM (Viscosidade aparente mínima), Oleosidade, Pegajosidade e Hidratação estudadas no planejamento Box-Behnken para determinação do comportamento reológico das formulações adicionadas de 0,1% de *Tocoretinate* .

Ensaio	IC	IF	AH	V.A.M.	Oleosidade	Pegajosidade	Hidratação
E1	29503,67	0,266667	437,3677	437,3677	2,6	3	1,473787
E2	27112	0,206667	322,0287	322,0287	2,4	2,8	1,382903
E3	28185,33	0,303333	420,1993	420,1993	4,6	2,8	1,60907
E4	27340,33	0,296667	396,082	396,082	4,8	4,8	1,528686
E5	26860	0,233333	252,391	252,391	4	5,2	1,487307
E6	28098,67	0,32	389,9227	389,9227	2,4	3,8	1,615449
E7	29243,33	0,3	509,1933	509,1933	3	4,4	1,675488
E8	24851	0,36	334,7437	334,7437	1	1,8	1,439671
E9	25613,67	0,343333	388,192	388,192	1,4	2,2	1,442191
E10	23028	0,226667	288,2733	288,2733	1,8	2,4	1,315672
E11	25011	0,39	400,6683	400,6683	2,2	3,6	1,540618
E12	27509,33	0,356667	411,2867	411,2867	2,6	3,2	1,589918
E13	24933,33	0,256667	332,6467	332,6467	3,6	3,8	1,419608
E14	27071,33	0,343333	380,89	380,89	1	1,8	1,488479
E15	31675,67	0,456667	504,0973	504,0973	3	3,5	1,669631

### 6.1.2.1. Análise Estatística - Parâmetros Reológicos

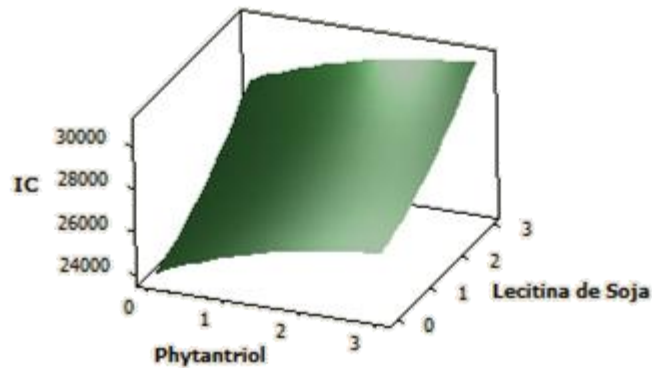
Não foi possível ajustar um modelo correlacionando os fatores estudados e as respostas índice de fluxo e área de histerese. Assim, nenhum dos fatores foi significativo para as respostas.

A equação 19 representa o modelo ajustado obtido a partir da análise estatística que relaciona a resposta, Índice de Consistência (IC), e os fatores significativos codificados  $X_1 =$  % de phytantriol de e  $X_2 =$  % de lecitina de soja.

$$(19) \quad IC = 27320 + 1264,9 X_1 + 2244,7 X_2$$

Foram observados efeitos lineares para as variáveis  $X_1$  e  $X_2$ . Não foram observados efeitos quadráticos e de interação para nenhuma das variáveis. Os efeitos dos fatores

estudados podem ser também observados na figura 8, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir da equação 19.



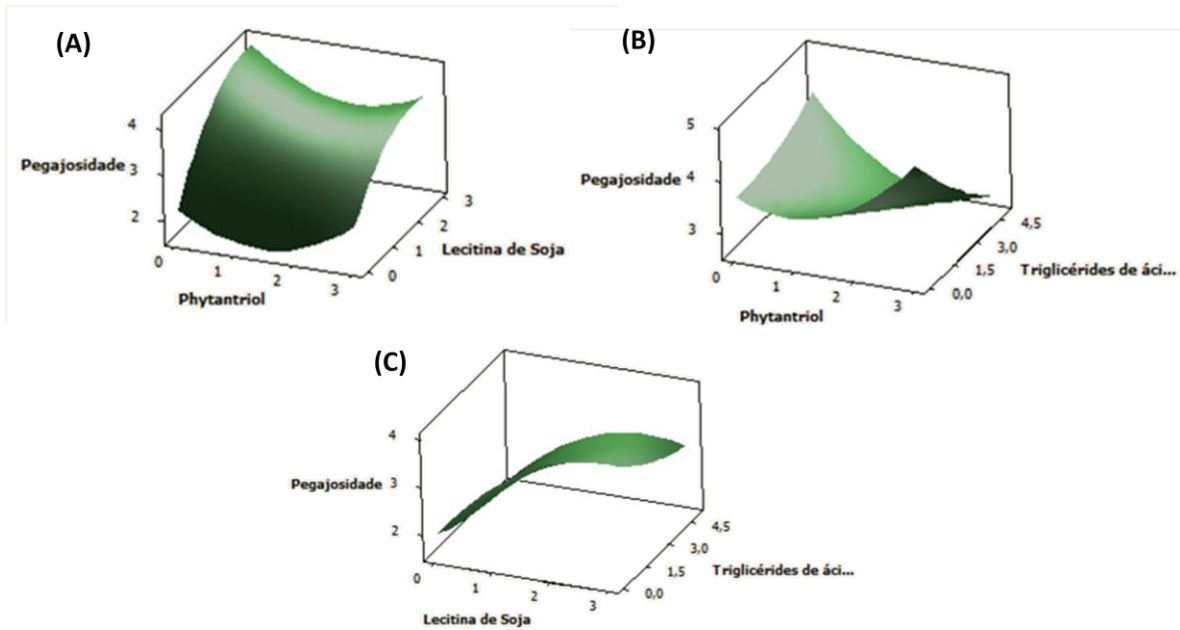
**Figura 8-** Superfícies de resposta para Índice de Consistência (IC) em função dos fatores: % phytantriol e % de lecitina de soja.

#### 6.1.2.2. Análise Estatística – Avaliação Sensorial

A equação 20 representa o modelo ajustado obtido a partir da análise estatística que relaciona a resposta, pegajosidade (P), e os fatores significativos codificados  $X_1$ = % de phytantriol,  $X_2$ = % de lecitina de soja e  $X_3$ = % de triglicérides de ácido cáprico e caprílico.

$$(19) \quad P = 3,0 + 0,81250 X_2 - 0,375 X_3 + 0,68750 X_1^2 - 0,56250 X_2^2 - 0,65 X_1 X_2.$$

Foi observado que a lecitina de soja apresentou efeitos lineares positivos, e efeitos quadráticos negativos. A variável  $X_3$  (% de triglicérides do ácido cáprico e caprílico) apresentou efeitos lineares negativos e a variável  $X_2$  apresentou efeitos quadráticos negativos. Além disso, as variáveis  $X_1$   $X_2$  apresentaram efeitos de interação negativos. Os efeitos dos fatores estudados podem ser também observados na Figura 9, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir da equação 20.



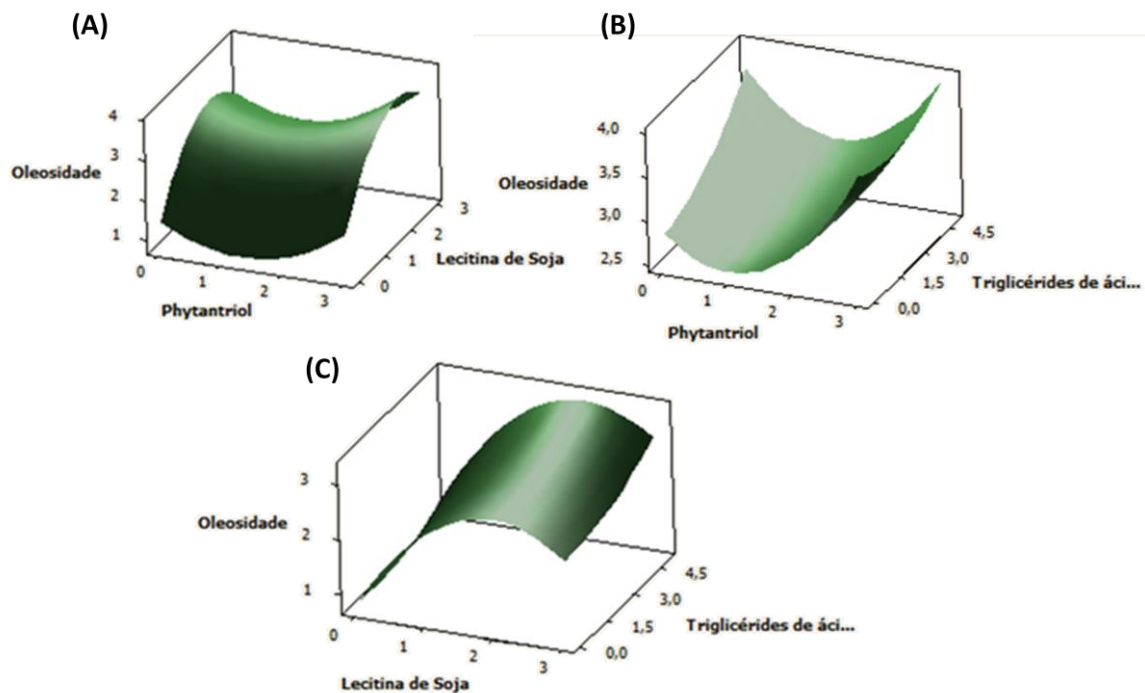
**Figura 9** - Superfícies de resposta para o *Score* Sensorial de Pegajosidade (P) em função dos fatores % phytantriol , % de lecitina de soja e % de triglicérides de ácido cáprico e caprílico.

A lecitina de soja apresentou um aumento significativo da pegajosidade da formulação nas concentrações estudadas, o phytantriol não influenciou significativamente este efeito, por outro lado, a adição de triglicérides de ácido cáprico e caprílico reduziu a sensação de pegajosidade da formulação.

A equação 21 representa o modelo ajustado obtido a partir da análise estatística que relaciona a resposta, oleosidade, e os fatores significativos codificados  $x_1$ = % de phytantriol de ,  $x_2$ = % de lecitina de soja e  $x_3$ = % de triglicérides de ácido cáprico e caprílico.

$$(21) \quad O = 2,66667 + 0,725 X_2 + 0,74167 X_1^2 - 1,10833 X_2^2$$

Foi observado que a lecitina de soja ( $X_2$ ) apresentou efeitos lineares positivos, e efeitos quadráticos negativos. Além disso,  $X_1$  (% de phytantriol) apresentou efeitos quadráticos negativos. Os efeitos dos fatores estudados podem ser também observados na figura 10, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir da equação 21.



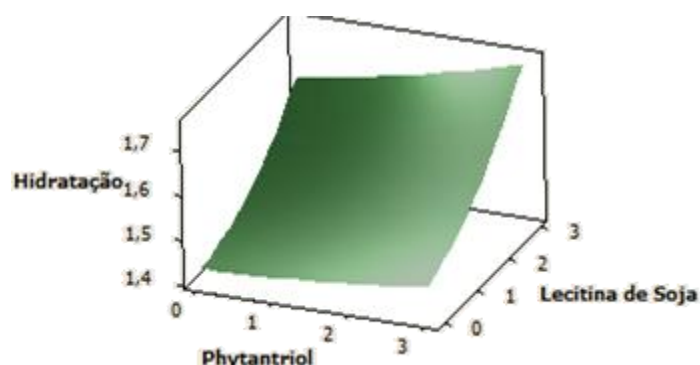
**Figura 10-** Superfícies de resposta para o *Score* Sensorial de Oleosidade (O) em função dos fatores % phytantriol , % de lecitina de soja e % de triglicérides de ácido cáprico e caprílico.

### 6.1.2.3. Análise Estatística – Hidratação

A equação 22 representa o modelo ajustado obtido a partir da análise estatística que relaciona a resposta, oleosidade, e os fatores significativos codificados  $X_1$ = % de phytantriol de ,  $x_2$ = % de lecitina de soja e  $x_3$ = % de triglicérides de ácido cáprico e caprílico.

$$(22) \quad H = 1,5 + 0,09354X_2$$

De acordo com a equação obtida, apenas o fator  $X_2$ , % de lecitina de soja, apresentou efeito linear positivo para a resposta hidratação. O efeito do fator  $X_2$  pode ser também observado na figura 11, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir da equação 20.



**Figura 11-** Superfícies de resposta para a hidratação (H) em função dos fatores: % phytantriol e % de lecitina de soja.

A adição da lecitina de soja apresentou efeitos significativos nas formulações em termos de aumento do índice de consistência, aumento da pegajosidade e oleosidade e também na melhora dos efeitos imediatos de hidratação. O phytantriol apresentou efeitos no aumento do índice de consistência e aumento da sensação de oleosidade. A adição do emoliente triglicérides do ácido cáprico e caprílico apresentou uma pequena redução na pegajosidade das formulações.

### 6.1.3. Testes preliminares de estabilidade

#### 6.1.3.1. Centrifugação

As formulações estudadas não apresentaram separação de fases frente ao teste de centrifugação, sendo consideradas estáveis e assim, foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada por estresse térmico.

#### 6.1.3.2. Avaliação Visual

As formulações objeto de estudo não apresentaram alterações do tipo: cor, odor ou separação de fases e homogeneidade após estocagem no ambiente e a 37°C e 45°C

#### 6.1.3.3. Determinação do pH das formulações

Não houve alteração pronunciada de pH das formulações no período de estudo (Tabelas 17 a 21).

**Tabela 17** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 24 horas de preparo

	V1	V2	V3	A1	A2	A3	E1	E2	E3	T1	T2	T3
<b>1</b>	6,10	6,14	6,23	6,13	6,08	6,27	6,21	6,00	6,16	6,07	6,03	6,17
<b>2</b>	6,17	6,15	6,23	6,13	6,05	6,25	6,16	6,01	6,17	6,09	6,92	6,15
<b>3</b>	6,13	6,17	6,27	6,20	6,10	6,28	6,15	6,03	6,20	6,08	6,08	6,12

**Tabela 18** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 28 dias de armazenamento em temperatura ambiente , a 37°C e 45°C.

	V1	V2	V3	A1	A2	A3	E1	E2	E3	T1	T2	T3
<b>Ambiente</b>	5,90	5,99	6,03	6,11	5,97	6,07	6,01	6,00	6,06	6,06	6,00	6,20
	5,97	5,97	5,97	6,10	5,96	5,97	5,96	5,97	6,13	6,08	6,72	6,03
	6,00	5,96	6,09	6,15	6,00	5,93	5,95	5,99	6,08	6,04	6,50	6,05
<b>37°C</b>	6,00	6,04	6,13	5,88	5,96	6,07	5,98	5,93	5,98	6,03	6,04	6,10
	6,01	6,05	6,13	5,99	6,00	6,15	5,78	6,00	5,99	6,07	6,55	6,11
	5,97	5,96	6,25	5,87	6,01	6,08	5,87	5,97	6,02	6,05	6,67	6,09
<b>45°C</b>	6,03	6,05	6,03	5,98	6,06	6,17	5,98	5,98	5,99	6,06	6,04	6,11
	5,99	6,07	6,17	5,87	6,04	6,08	5,99	6,01	5,97	6,10	6,02	6,12
	5,99	5,92	6,10	5,84	5,98	6,08	5,94	6,03	5,88	6,06	6,68	6,14

**Tabela 19** – Valores de pH das formulações da segunda etapa após 24 horas de preparo

	PV	PA	PE	PT	LV	LA	LE	LT	PLV	PLA	PLE	PLT
<b>1</b>	5,77	5,72	5,50	5,70	5,51	5,48	5,58	5,61	5,62	5,60	5,66	5,41
<b>2</b>	5,47	5,65	5,66	5,61	5,63	5,57	5,63	5,56	5,55	5,56	5,65	5,43
<b>3</b>	5,60	5,59	5,59	5,66	5,55	5,55	5,62	5,60	5,59	5,63	5,67	5,45

**Tabela 20** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente , a 37°C e 45°C.

	PV	PA	PE	PT	LV	LA	LE	LT	PLV	PLA	PLE	PLT
<b>Ambiente</b>	5,63	5,62	5,48	5,70	5,45	5,40	5,50	5,41	5,23	5,48	5,68	5,20
	5,55	5,55	5,60	5,61	5,53	5,45	5,51	5,56	5,34	5,30	5,66	5,33
	5,48	5,59	5,52	5,66	5,50	5,47	5,45	5,61	5,20	5,58	5,69	5,10
<b>37°C</b>	5,67	5,60	5,47	5,65	5,50	5,48	5,52	5,51	5,29	5,48	5,65	5,32
	5,65	5,60	5,56	5,62	5,50	5,56	5,56	5,46	5,32	5,49	5,66	5,30
	5,56	5,59	5,57	5,57	5,55	5,48	5,56	5,30	5,23	5,47	5,66	5,28
<b>45°C</b>	5,55	5,45	5,48	5,57	5,41	5,38	5,48	5,41	5,32	5,50	5,66	5,15
	5,60	5,55	5,57	5,61	5,33	5,47	5,53	5,36	5,31	5,53	5,65	5,18
	5,60	5,59	5,59	5,60	5,55	5,40	5,52	5,40	5,32	5,48	5,67	5,15



**Tabela 21** – Valores de pH das formulações da primeira etapa após 28 dias de armazenamento em temperatura ambiente, a 37°C e 45°C.

	PV	PA	PE	PT	LV	LA	LE	LT	PLV	PLA	PLE	PLT
<b>Ambiente</b>	5,60	5,45	5,40	5,45	5,47	5,48	5,48	5,51	5,49	5,53	5,65	5,21
	5,47	5,54	5,45	5,47	5,53	5,49	5,53	5,54	5,53	5,57	5,58	5,32
	5,61	5,38	5,50	5,48	5,57	5,51	5,52	5,60	5,39	5,54	5,73	5,40
<b>37°C</b>	5,57	5,42	5,48	5,67	5,41	5,46	5,48	5,56	5,50	5,45	5,74	5,38
	5,55	5,55	5,49	5,58	5,53	5,47	5,53	5,53	5,56	5,53	5,75	5,38
	5,56	5,56	5,51	5,59	5,45	5,43	5,42	5,50	5,52	5,58	5,75	5,39
<b>45°C</b>	5,55	5,62	5,56	5,62	5,47	5,48	5,48	5,53	5,51	5,37	5,77	5,67
	5,60	5,55	5,46	5,58	5,57	5,47	5,53	5,49	5,46	5,55	5,77	5,67
	5,62	5,47	5,49	5,61	5,46	5,45	5,51	5,56	5,56	5,53	5,75	5,56

#### **6.1.4. Estudo da estabilidade física por determinação do comportamento reológico**

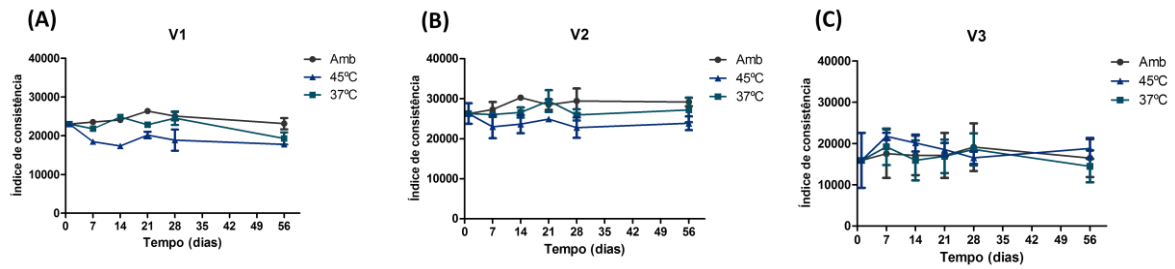
A avaliação de estabilidade física por determinação do comportamento reológico foi realizada em duas etapas.

A avaliação da estabilidade física por determinação do comportamento reológico das formulações V1, V2, V3, A1, A2, A3, E1, E2, E3, T1, T2, T3 selecionadas na primeira etapa pôde ser avaliado por meio dos valores de viscosidade aparente mínima, de índice de consistência e de índice de fluxo, obtidos ao longo do período de 56 dias.

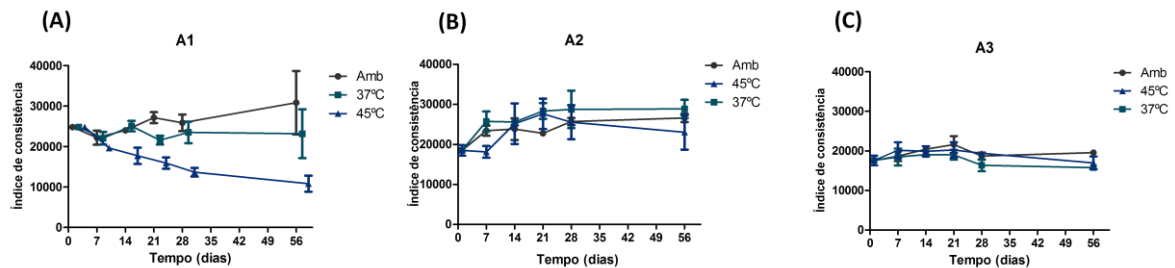
As figuras 12 a 15 representam o Índice de consistência das formulações estudadas na primeira etapa.

De acordo com a avaliação do índice de consistência ao longo do tempo, foi possível observar que as formulações F1 e F2 apresentaram maiores valores comparadas às formulações F3. As formulações F1 contendo vitaminas (A1, E1 e T1) acrescidas de vitaminas apresentaram redução do índice de consistência ao longo do tempo, sendo um sinal evidente de instabilidade. A formulação F2 não apresentou alterações significativas ao longo do tempo. No entanto, para as formulações adicionadas de vitaminas, há um aumento do índice de consistência entre a avaliação inicial e após sete dias.

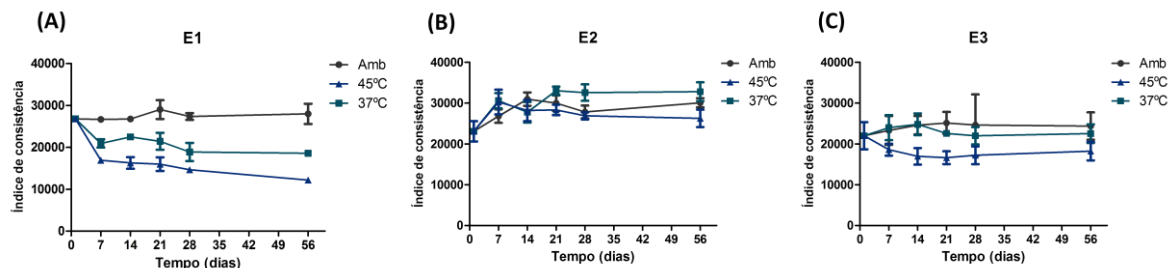
As formulações V3, A3 e E3 não apresentaram modificações significativas ao longo do tempo, nas diferentes temperaturas. No entanto, a formulação E3, quando mantida a 45°C apresentou menores valores de índice de consistência.



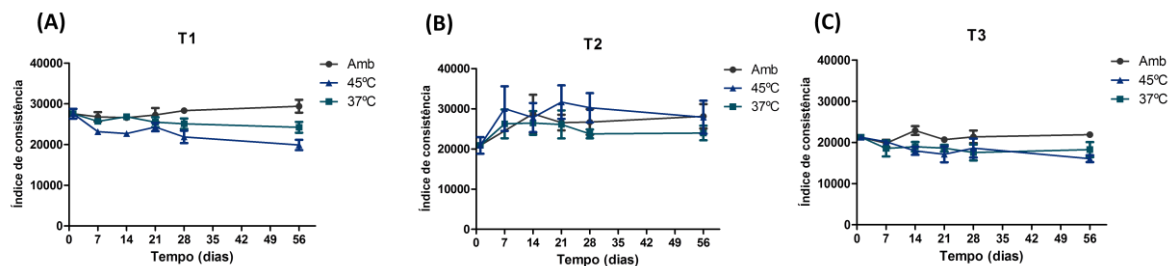
**Figura 12** - Índice de consistência das formulações V1 (A), V2 (B) e V3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 13**- Índice de consistência das formulações A1 (A), A2 (B) e A3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 14**- Índice de consistência das formulações E1 (A), E2 (B) e E3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

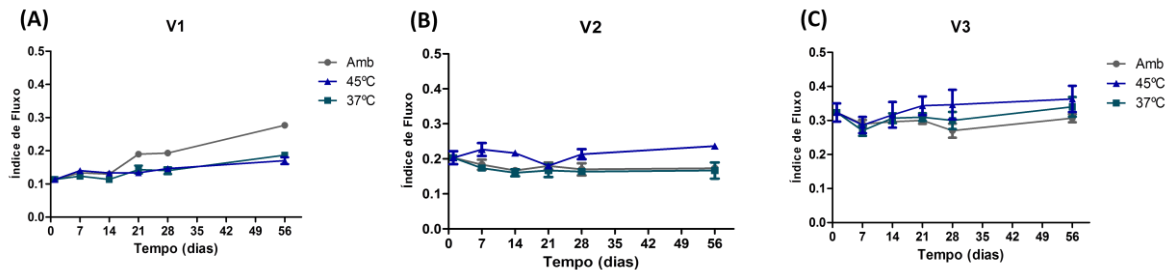


**Figura 15**- Índice de consistência das formulações T1 (A), T2 (B) e T3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

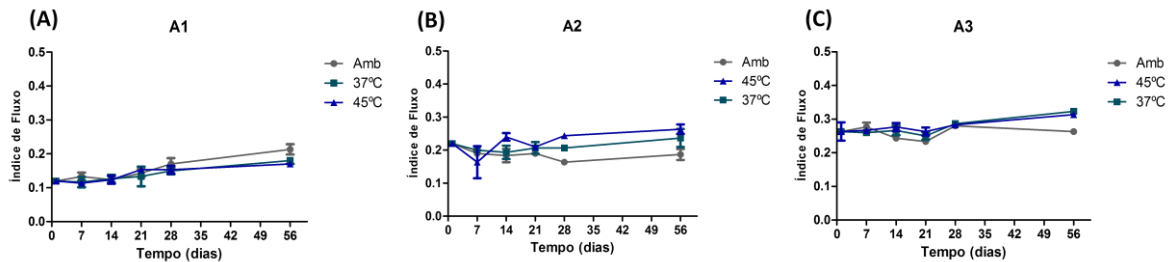
As figuras 16 a 19 representam o Índice de fluxo das formulações estudadas na primeira etapa.

Todas as formulações estudadas apresentaram índice de fluxo abaixo de 1, e, portanto, apresentaram comportamento pseudoplástico. Dentre as formulações estudadas, as formulações F3 foram as que apresentaram maior índice de fluxo.

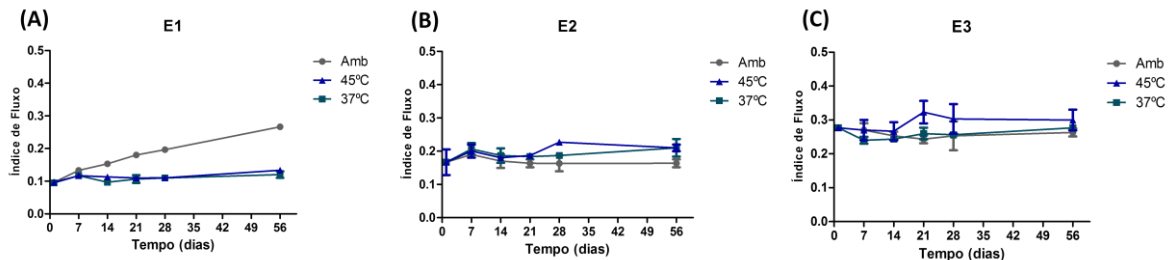
Na temperatura ambiente, as formulações V1 e E1 apresentaram um aumento significativo do índice de fluxo ao longo do tempo. As formulações F2 e F3 não apresentaram tais alterações, exceto pela formulação T3 que apresentou um aumento do índice de fluxo ao longo dos 56 dias de estudo, quando mantidas a 45°C.



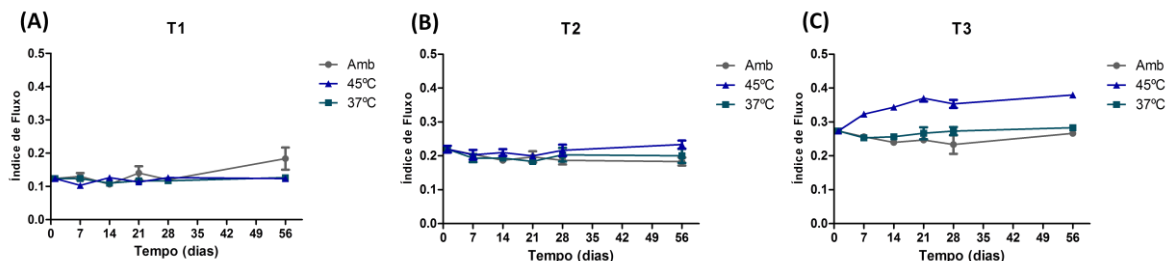
**Figura 16-** Índice de fluxo das formulações V1 (A), V2 (B) e V3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 17-** Índice de fluxo das formulações A1 (A), A2 (B) e A3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



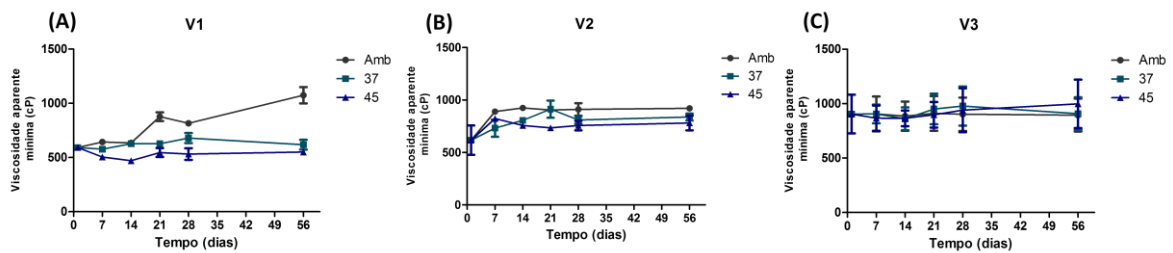
**Figura 18-** Índice de fluxo das formulações E1 (A), E2 (B) e E3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



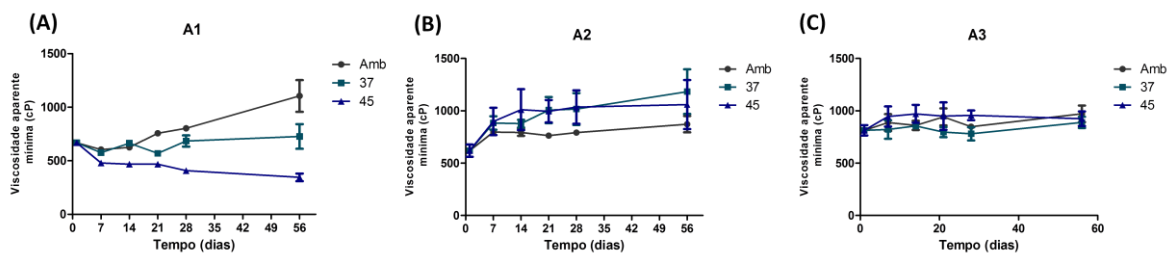
**Figura 19-** Índice de fluxo das formulações T1 (A), T2 (B) e T3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

As figuras 20 a 23 representam a Viscosidade aparente mínima das formulações estudadas na primeira etapa.

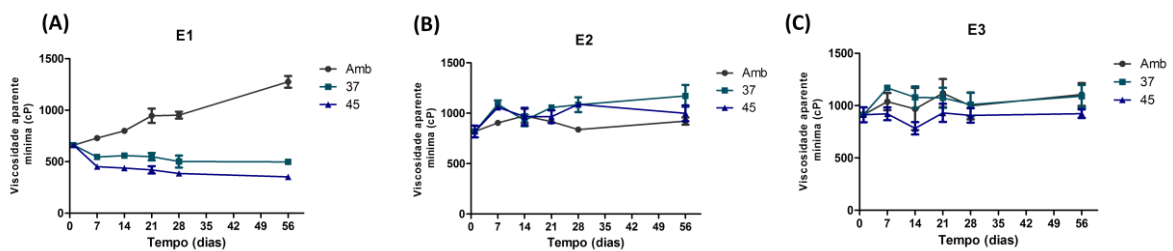
As formulações F1 apresentaram um aumento da viscosidade aparente mínima ao longo dos 56 dias. No entanto, tais alterações não foram observadas para as amostras mantidas em temperaturas de 37°C e 45°C. A formulação F2 apresentou aumento deste parâmetro entre as medidas iniciais e os sete dias. As formulações F3 não apresentaram alterações significativas neste parâmetros.



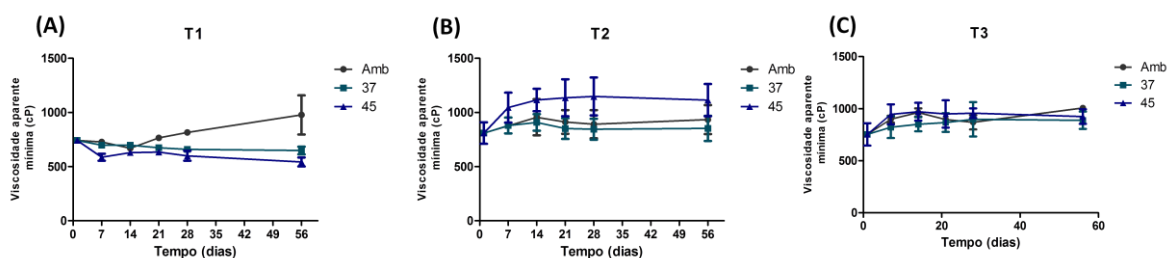
**Figura 20**– Viscosidade aparente mínima das formulações V1 (A), V2 (B) e V3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 21**– Viscosidade aparente mínima das formulações A1 (A), A2 (B) e A3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 22**– Viscosidade aparente mínima das formulações E1 (A), E2 (B) e E3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



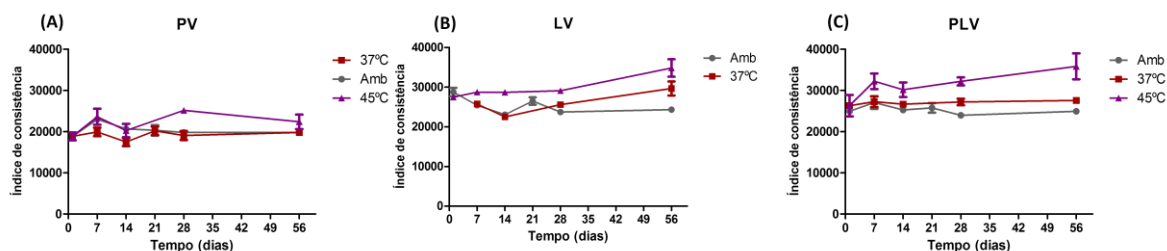
**Figura 23**- Viscosidade aparente mínima das formulações T1 (A), T2 (B) e T3 (C), nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

De acordo com o estudo dos parâmetros reológicos analisados ao longo do tempo em diferentes temperaturas, as formulações dos grupos F2 e F3 apresentaram melhor estabilidade, quando comparada às formulações do grupo F1.

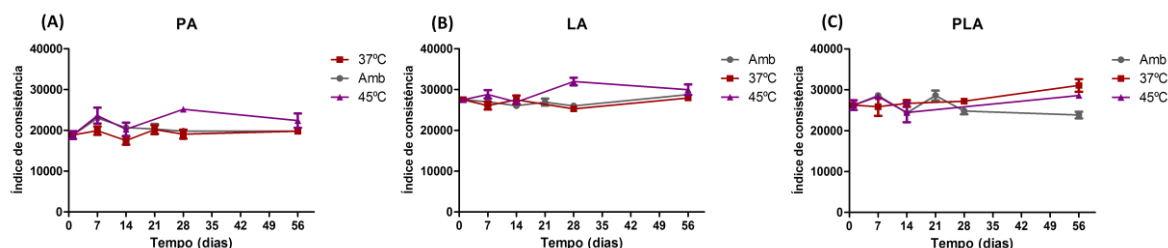
A avaliação da estabilidade física por determinação do comportamento reológico das formulações PV, PA, PE, PT, LV, LA, LE, LT, PLV, PLA, PLE, PLT selecionadas na segunda etapa pôde ser avaliado por meio dos valores de viscosidade aparente mínima, de índice de consistência e de índice de fluxo, obtidos ao longo do período de 56 dias.

As figuras 24 a 27 representam o Índice de Consistência das formulações estudadas na segunda etapa.

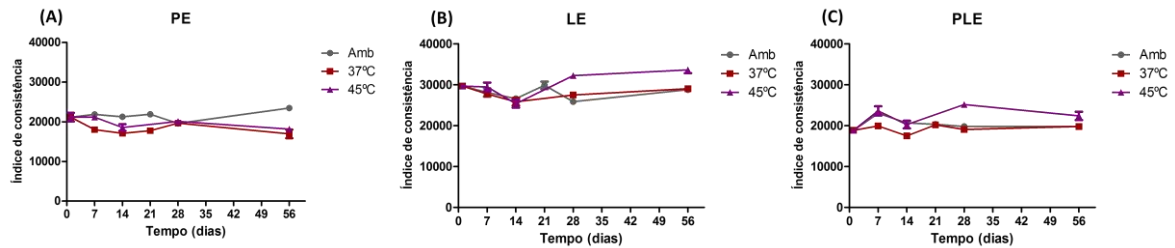
Pela análise do Índice de Consistência, foi possível observar que as formulações não apresentaram alterações significativas ao longo do tempo. Em geral, as formulações mantidas a 45°C apresentaram um leve aumento no IC após 56 dias.



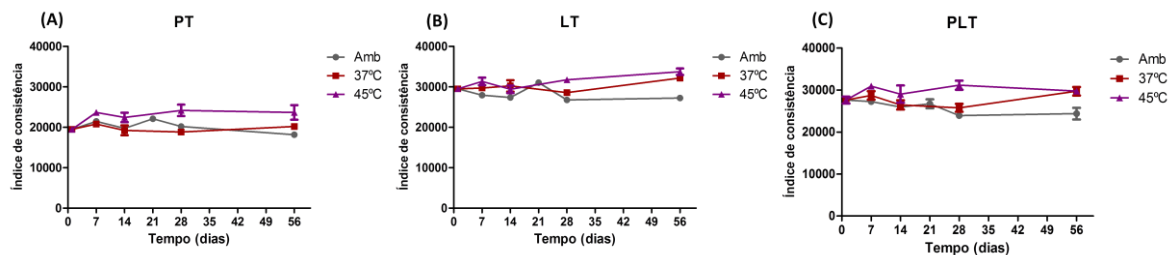
**Figura 24-** Índice de consistência das formulações PV – contendo 1% de phytantriol (A), LV – contendo 1% de lecitina (B), PLV - contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 25-** Índice de consistência das formulações PA – contendo 1% de phytantriol e 0,5% de palmitato de retinila (A), LA – contendo 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila (B), PLA - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



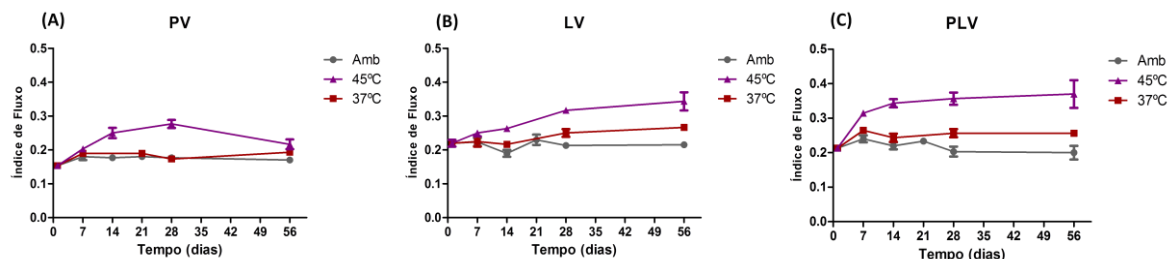
**Figura 26-** Índice de consistência das formulações PE – contendo 1% de phytantriol e 5% de acetato de tocoferila (A), LE – contendo 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila (B), PLE% - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



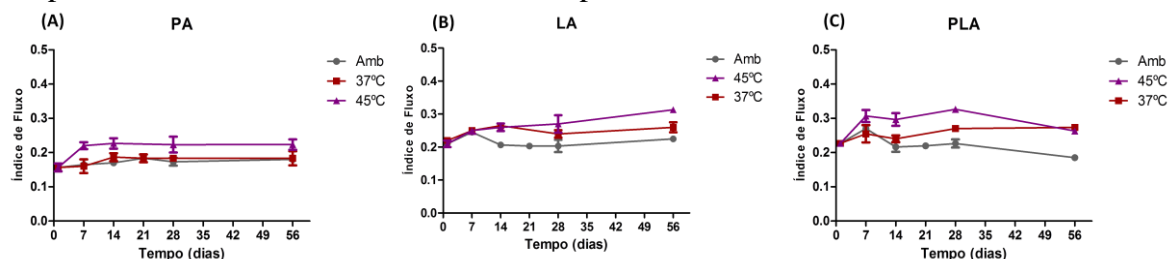
**Figura 27 -** Índice de consistência das formulações PT – contendo 1% de phytantriol e 0,1% *Tocoretinate* (A), LT – contendo 1% de lecitina e 0,1% *Tocoretinate* (B), PLT - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,1% *Tocoretinate* nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

As figuras 28 a 31 representam o Índice de fluxo das formulações estudadas na segunda etapa.

As formulações mantidas a 45°C apresentaram um aumento significativo no índice de fluxo na maior parte das formulações objeto de estudo.

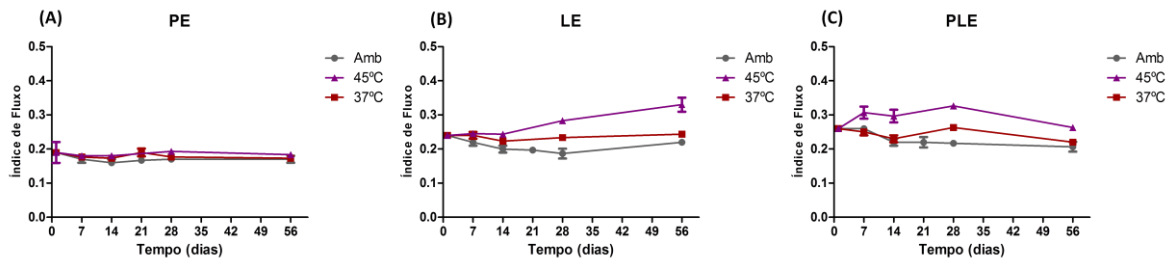


**Figura 28-** Índice de fluxo das formulações PV – contendo 1% de phytantriol (A), LV – contendo 1% de lecitina (B), PLV - contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

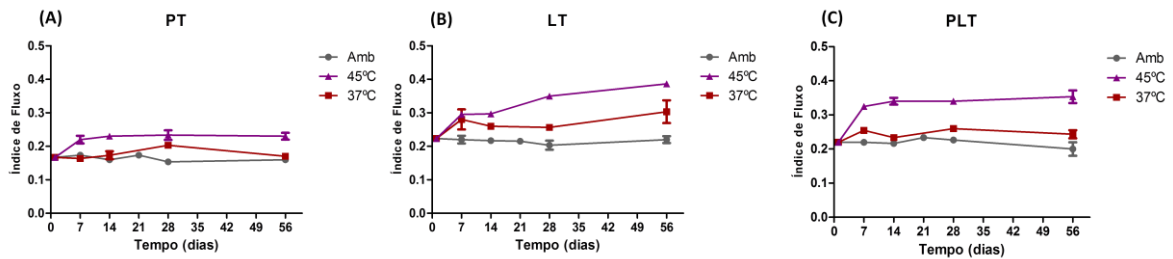


**Figura 29-** Índice de fluxo das formulações PA – contendo 1% de phytantriol e 0,5% de palmitato de retinila (A), LA – contendo 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila (B),

PLA - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

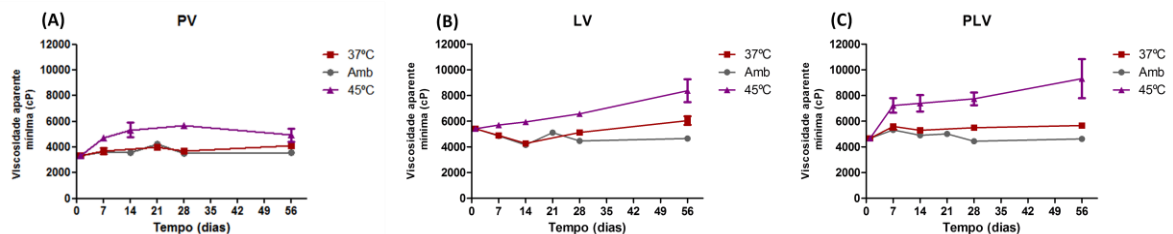


**Figura 30-** Índice de fluxo das formulações PE – contendo 1% de phytantriol e 5% de acetato de tocoferila (A), LE – contendo 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila (B), PLE% - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

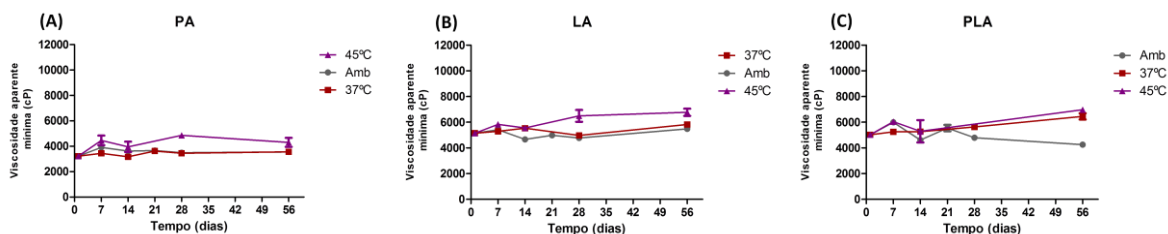


**Figura 31-** Índice de fluxo das formulações PT – contendo 1% de phytantriol e 0,1% *Tocoretinate* (A), LT – contendo 1% de lecitina e 0,1% *Tocoretinate* (B), PLT - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,1% *Tocoretinate* nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

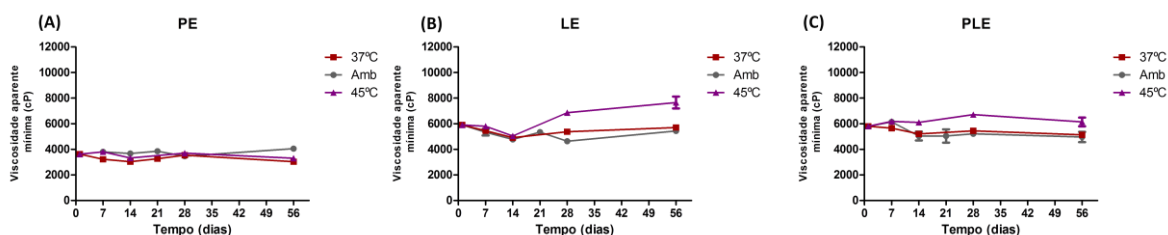
As figuras 32 a 35 representam a viscosidade aparente mínima das formulações estudadas na segunda etapa. As formulações não apresentaram alterações deste parâmetro quando armazenadas nas temperaturas ambiente e 37°C. No entanto, nas formulações contendo lecitina, foi observado um aumento da viscosidade aparente mínima, quando mantida a 45°C.



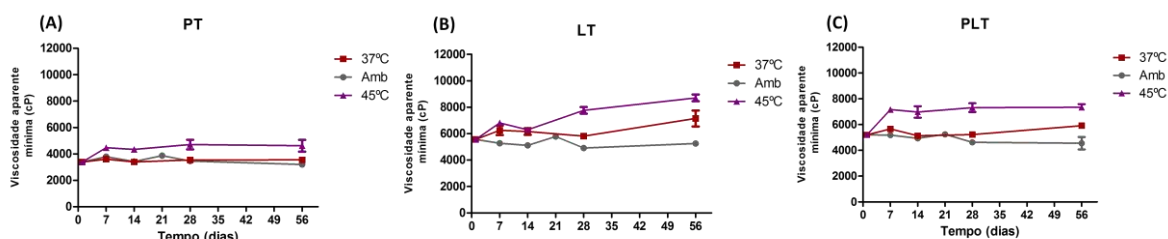
**Figura 32-** Viscosidade aparente mínima das formulações PV – contendo 1% de phytantriol (A), LV – contendo 1% de lecitina (B), PLV - contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 33-** Viscosidade aparente mínima das formulações PA – contendo 1% de phytantriol e 0,5% de palmitato de retinila (A), LA – contendo 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila (B), PLA - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



**Figura 34-** Viscosidade aparente mínima PE das formulações – contendo 1% de phytantriol e 5% de acetato de tocoferila (A), LE – contendo 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila (B), PLE% - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.



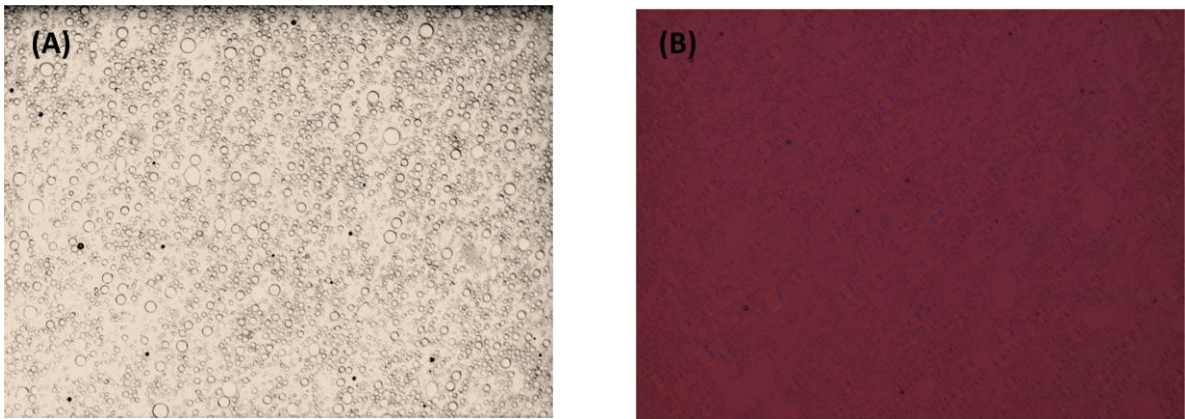
**Figura 35-** Viscosidade aparente mínima das formulações PT – contendo 1% de phytantriol e 0,1% *Tocoretinate* (A), LT – contendo 1% de lecitina e 0,1% *Tocoretinate* (B), PLT - contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,1% *Tocoretinate* nas temperaturas ambiente, 37°C e 45°C, nos tempos inicial, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

## 6.1.5. Análise estrutural das formulações

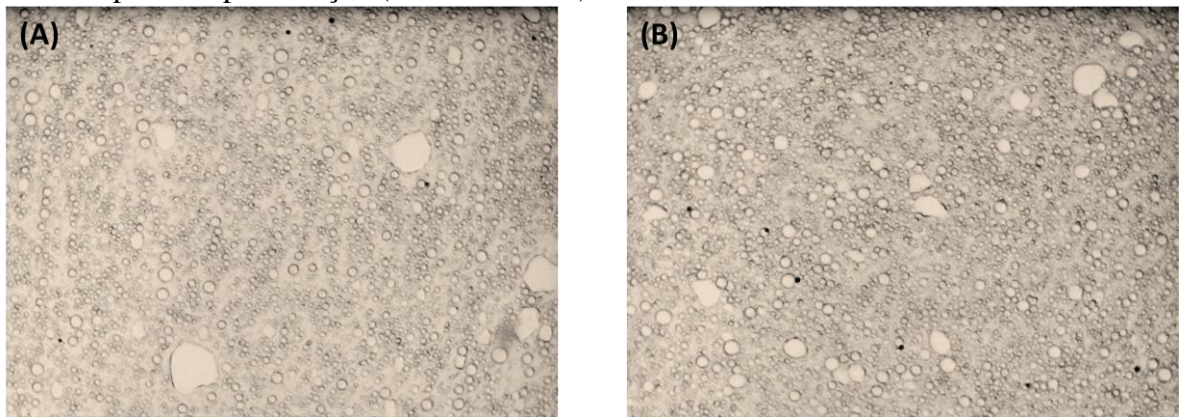
### 6.1.5.1. Análise por Microscopia de luz polarizada

As formulações apresentaram distribuição homogênea das partículas, e não apresentaram alterações do padrão microscópico após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente e a 45°C. Além disso, as formulações não apresentaram refração na luz polarizada, indicando que não houve a formação de fase líquido cristalina nas formulações (Figuras 36 a 45).

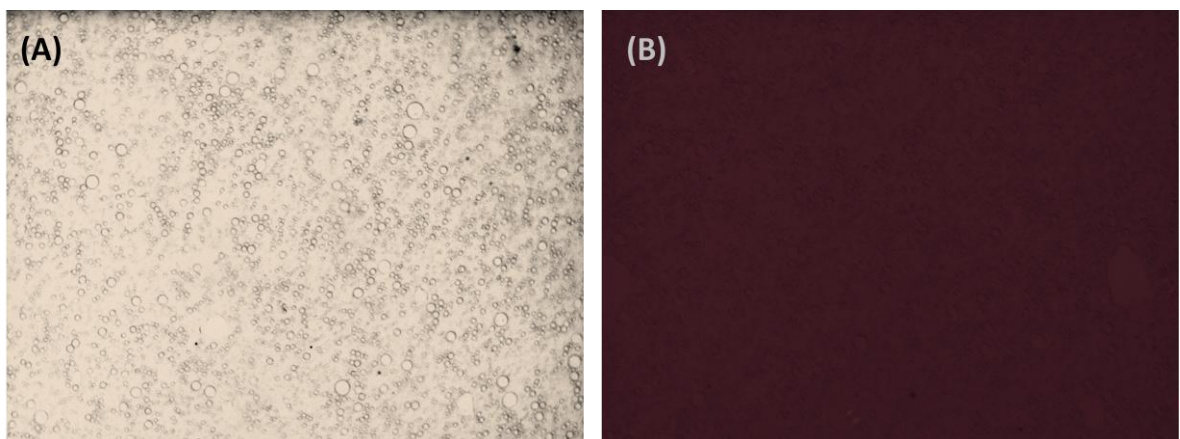




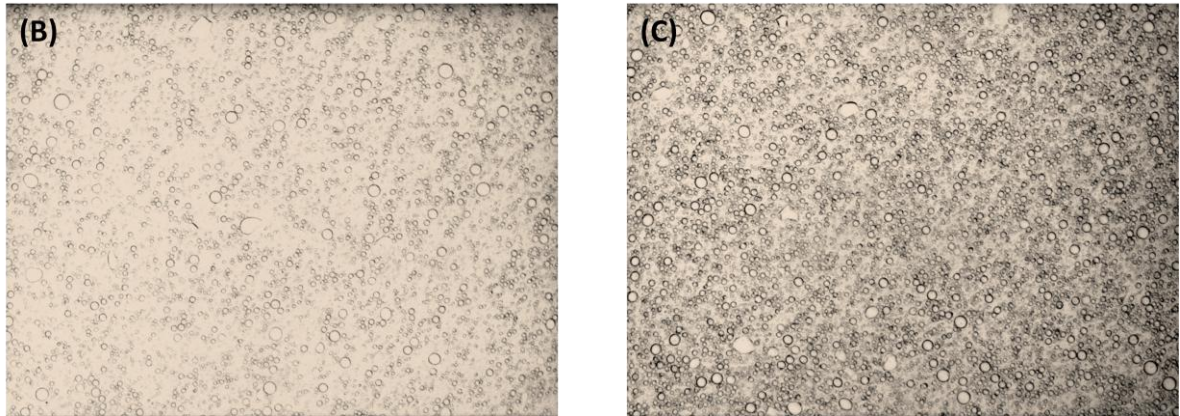
**Figura 36-** Fotomicrografias da formulação F2 (sem adição de phytantriol e lecitina) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X).



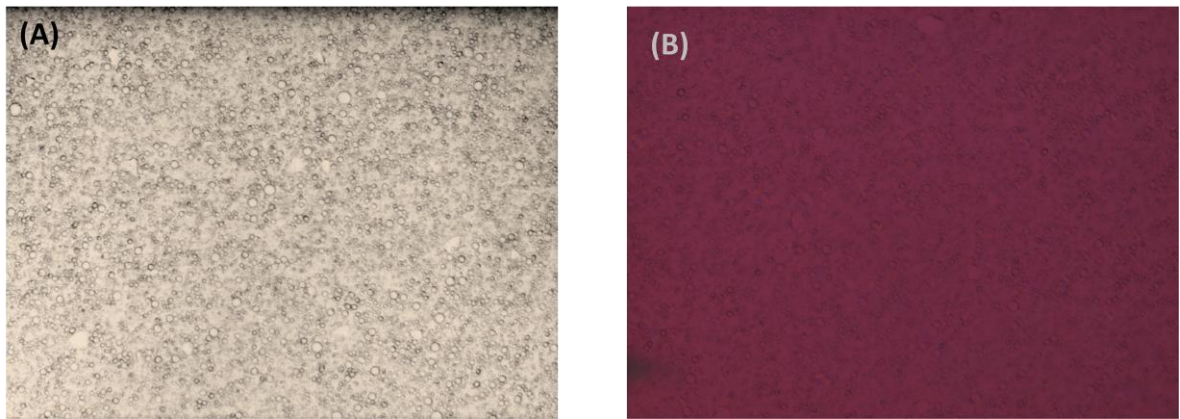
**Figura 37-** Fotomicrografias da formulação F2 (sem adição de phytantriol e lecitina de soja) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X).



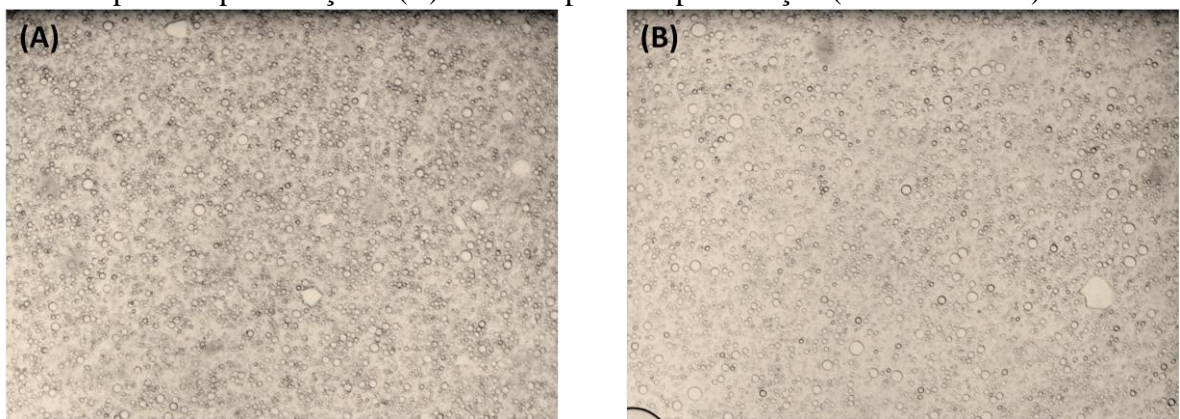
**Figura 38-** Fotomicrografias da formulação PLV (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X).



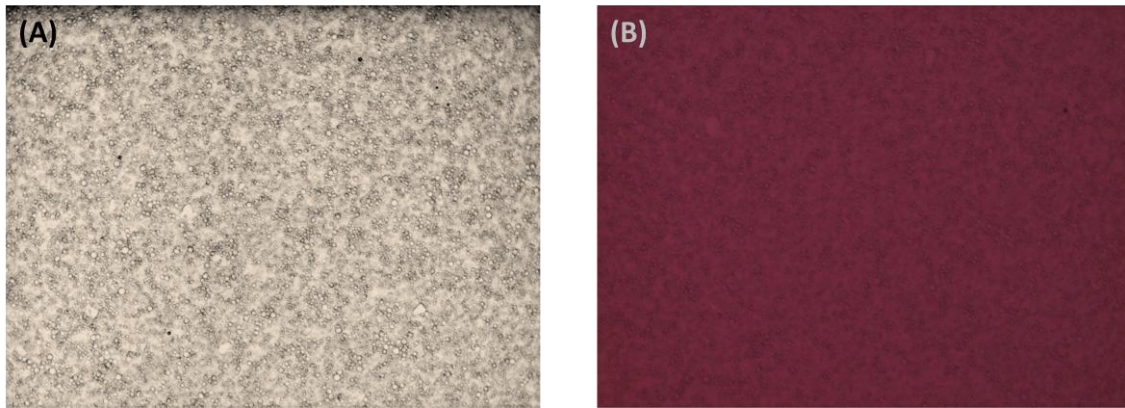
**Figura 39-** Fotomicrografias da formulação PLV (contendo 1% de phytantriol e 1% de lecitina) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X).



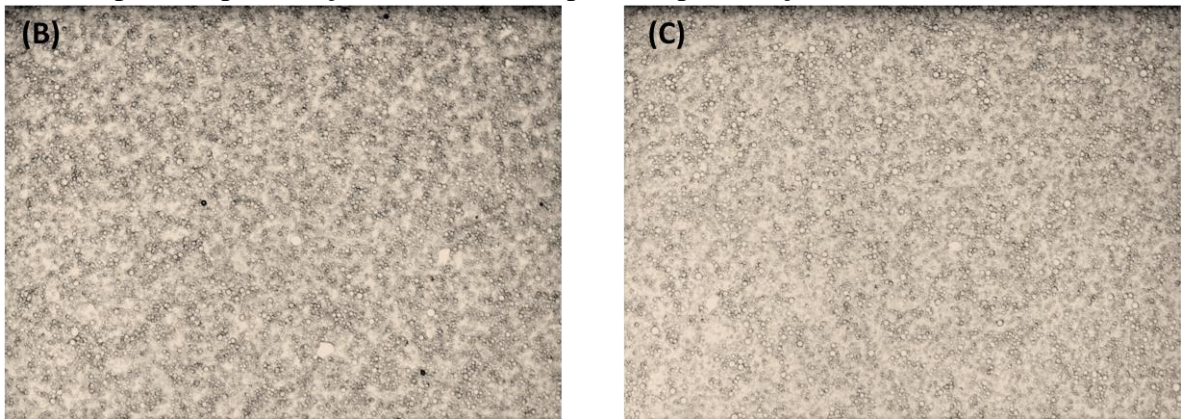
**Figura 40-** Fotomicrografias da formulação PLA (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X).



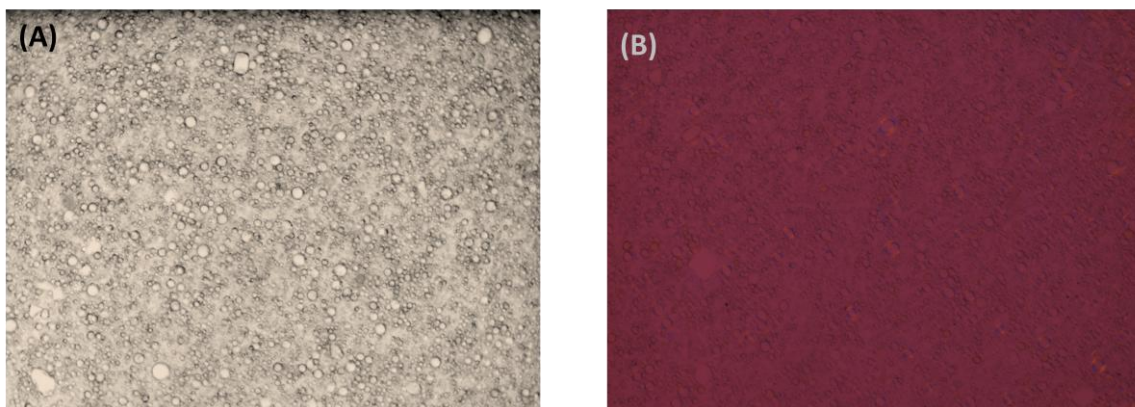
**Figura 41-** Fotomicrografias da formulação PLA (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,5% de palmitato de retinila) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X).



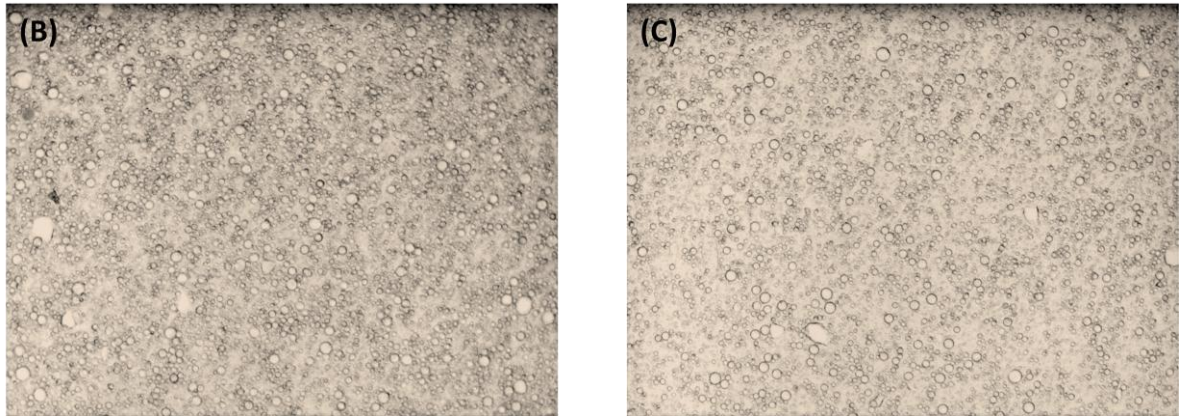
**Figura 42-** Fotomicrografias da formulação PLE (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (a) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X).



**Figura 43-** Fotomicrografias da formulação PLE (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 5% de acetato de tocoferila) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X).



**Figura 44-** Fotomicrografias da formulação PLT (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,1% de *Tocoretinate*) após 24 horas de preparo da formulação visualizada por (A) microscopia sem polarização e (B) microscopia com polarização (aumento 100X).

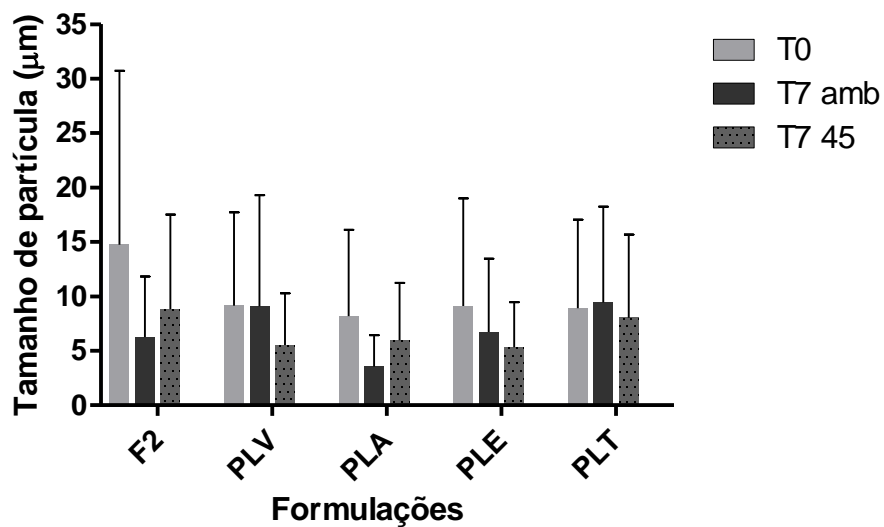


**Figura 45-** Fotomicrografias da formulação PLT (contendo 1% de phytantriol, 1% de lecitina e 0,1% de *Tocoretinate*) visualizada por microscopia sem polarização após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente (A) e a 45°C (B) (aumento 100X).

#### 6.1.5.2. Análise do tamanho médio de partícula

As formulações são classificadas como macroemulsões, pois apresentam tamanho de partícula na ordem de 2- 15  $\mu\text{m}$ .

Por meio da análise do tamanho médio de partícula observou-se que não houve aumento do tamanho de partícula durante o armazenamento. Além disso, para as formulações F2, PLV, PLA e PLE, uma redução do tamanho de partícula foi observada. As formulações contendo lecitina e phytantriol apresentaram menor tamanho de partícula inicial que a formulação F2 (Figura 46).



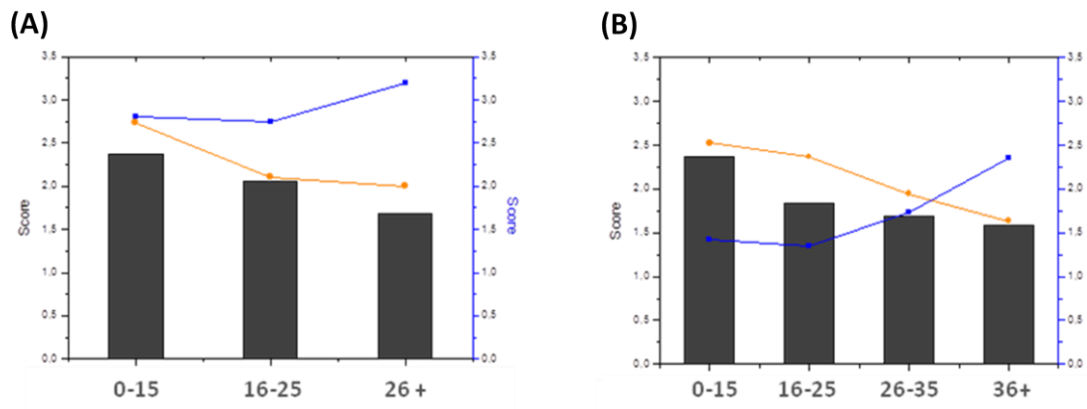
**Figura 46-** Tamanho médio de partícula das formulações estudadas

## 6.2. Estudo Clínico

### 6.2.1. Caracterização da pele fotoenvelhecida em dois grupos de idade

#### 6.2.1.1. Questionário de avaliação de hábitos de proteção e exposição solar

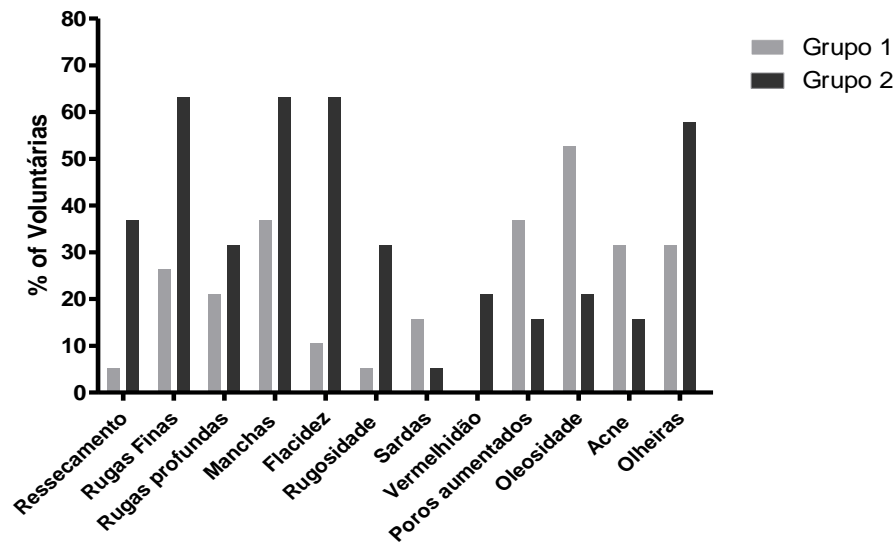
Neste estudo, os hábitos de proteção solar e exposição apresentaram mudanças progressivas ao longo dos anos. O uso de protetores solares aumentou e o tempo de exposição solar e frequência de bronzeamento diminuíram nos dois grupos de idade (Figura 47).



**Figura 47-** Evolução do *Score* obtido da frequência de exposição solar (barras), frequência de bronzeamento (●) e de fotoproteção (■) ao longo dos anos na população do grupo 1 (A) e do grupo 2 (B).

#### 6.2.1.2. Avaliação da Percepção dos sinais do fotoenvelhecimento

Por meio dos resultados obtidos nos questionários de autoavaliação, observa-se que, para o grupo jovem, as principais características da sua pele que as preocupam são oleosidade (52,6%), poros aumentados (36,8%), manchas (36,8%), acne (31,6%) e olheiras (31,6%). Por outro lado, no grupo de maior idade, as principais preocupações envolvem: Rugas finas (63,1%), manchas (63,1%), flacidez (63,1%), e olheiras (63,1%) (Figura 48).

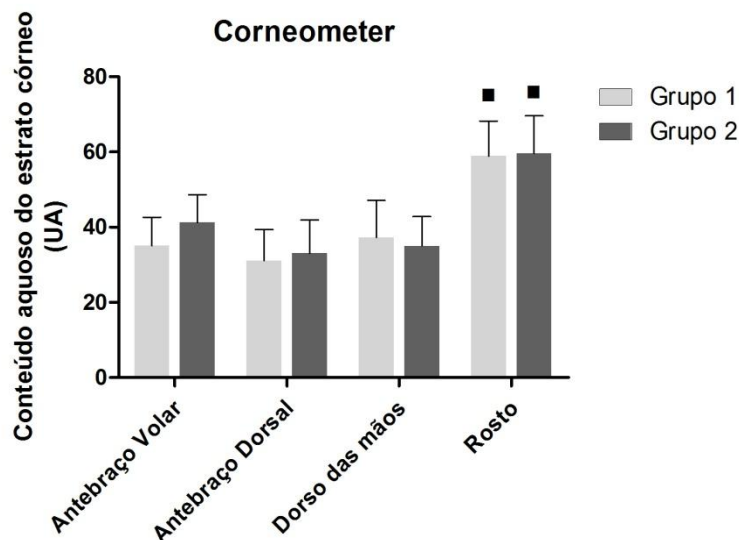


**Figura 48**– Características cutâneas do rosto que incomodam as voluntárias participantes do estudo.

### 6.2.1.3. Avaliação por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele

#### 6.2.1.3.1. Conteúdo aquoso do estrato córneo

Os valores de hidratação não foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados. A face foi a região que apresentou maiores valores de hidratação em ambos os grupos (Figura 49).

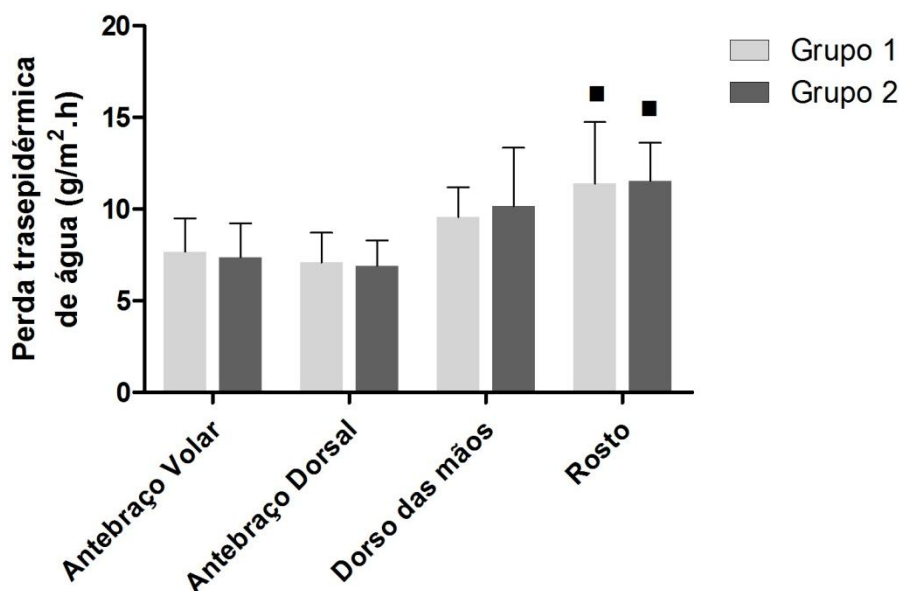


**Figura 49**- Conteúdo aquoso do estrato córneo do Grupo 1 (18- 35 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média  $\pm$  DP) (n=20).

■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.1.3.2. Perda transepidermica de água (TEWL)

Os valores de perda transepidermica de água não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Dentre as regiões estudadas, o rosto e as mãos foram às regiões que apresentaram maior perda transepidermica de água (Figura 50).



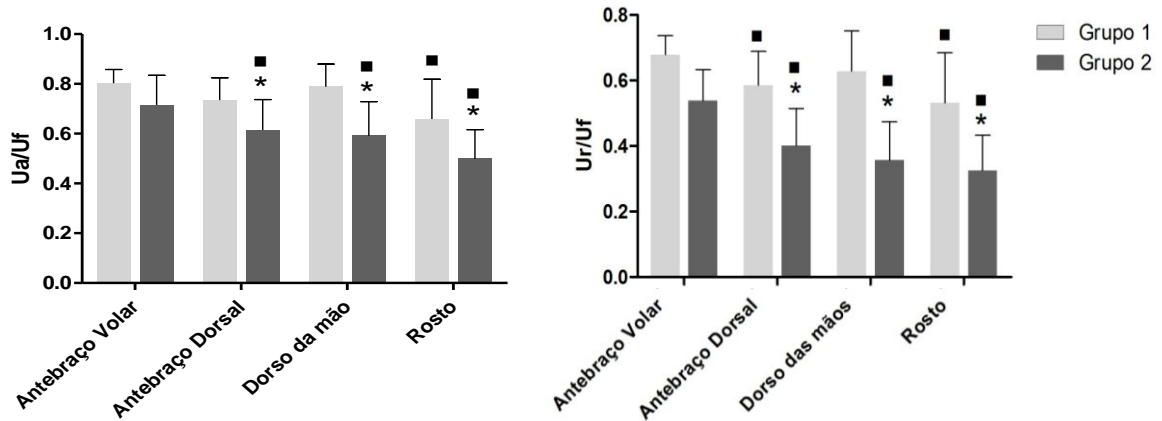
**Figura 50**– Perda transepidermica de água do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média  $\pm$  DP).

■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraccio Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.1.3.3. Propriedades viscoelásticas da pele

A análise do comportamento viscoelástico da pele foi realizado em termos de  $U_a/U_f$  e  $U_r/U_f$  para a avaliação da elasticidade da pele, e determinação do  $U_v/U_e$ , corresponde à parte viscoelástica da curva. Além disso, também foi avaliado o resíduo após a deformação da pele, sendo que, quanto maior este valor, menor a capacidade da pele se recuperar após uma deformação.

Em todas as regiões fotoexpostas, o grupo 2 apresentou menor elasticidade representada pela diferença significativa dos valores  $U_a/U_f$  e  $U_r/U_f$  em relação ao grupo 1. Além disso, observa-se que as regiões fotoexpostas apresentam menor elasticidade que a região protegida do sol (antebraço volar) (Figura 51).

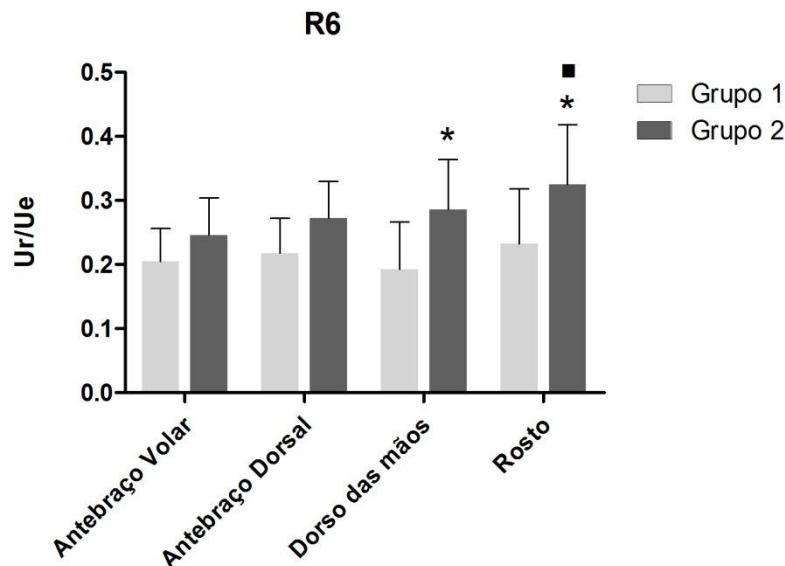


**Figura 51**– Elasticidade bruta (Ua/Uf) e Elasticidade (Ur/Uf) do Grupo 1 (18- 35 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média  $\pm$  DP).

\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Pela avaliação do componente viscoelástico da pele (Uv/Ue) (Figura 51), o grupo 2 apresentou maiores valores que o grupo 1, sendo esta diferença significativa para as mãos e para o rosto (Figura 52).



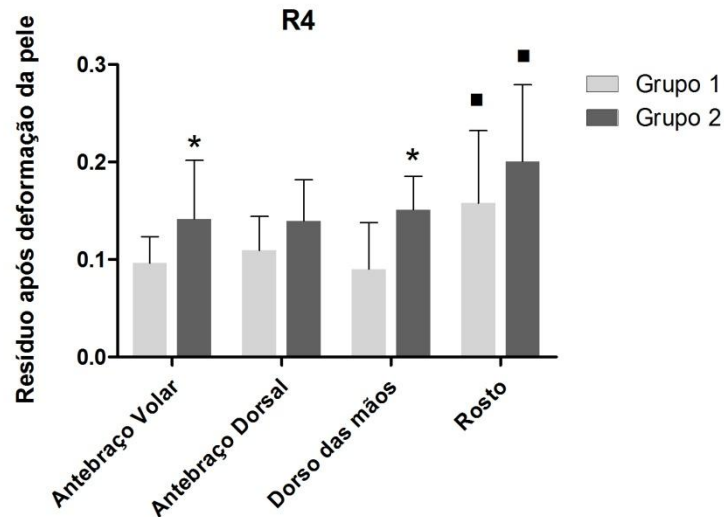
**Figura 52**– Componente visco elástico da curva (Uv/Ue) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média  $\pm$  DP).

\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

■ Significativamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



Considerando o resíduo após a deformação da pele, as regiões fotoexpostas apresentaram maior dificuldade de recuperação, o sendo o rosto a região que apresentou os maiores valores (Figura 53).



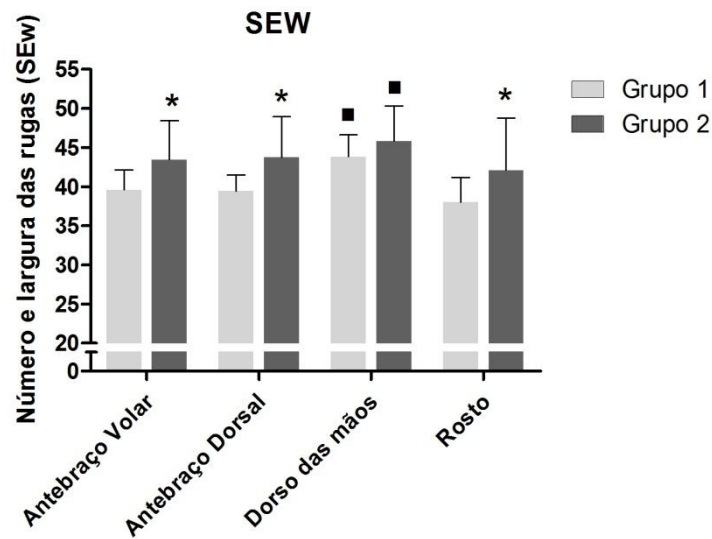
**Figura 53** – Resíduo de deformação da pele do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 6.2.1.3.4. Microrrelevo cutâneo

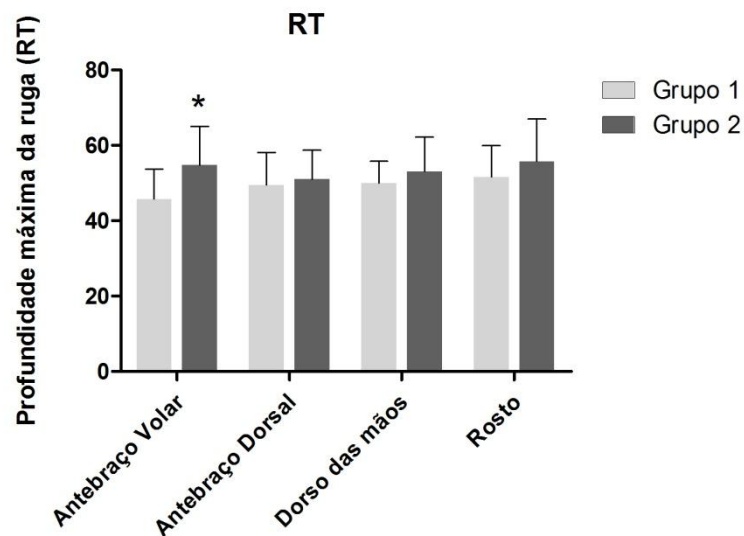
Pela avaliação do microrrelevo cutâneo, observou-se que o grupo 2 apresentou maior número e largura de rugas nas regiões estudadas (SEw) (Figura 54). Para os valores de profundidade máxima da ruga (RT), foi obtido um valor significativamente maior no grupo 2 em relação ao grupo 1 na região não fotoexposta (Figura 55).



**Figura 54**– Número e largura das rugas do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

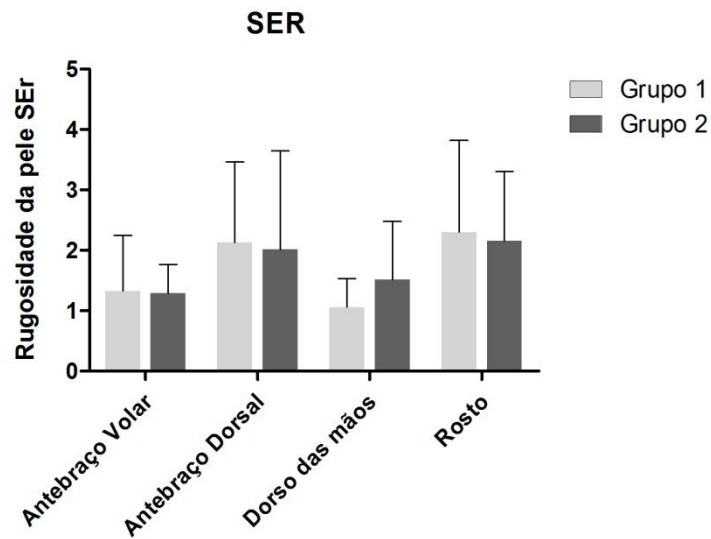
■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



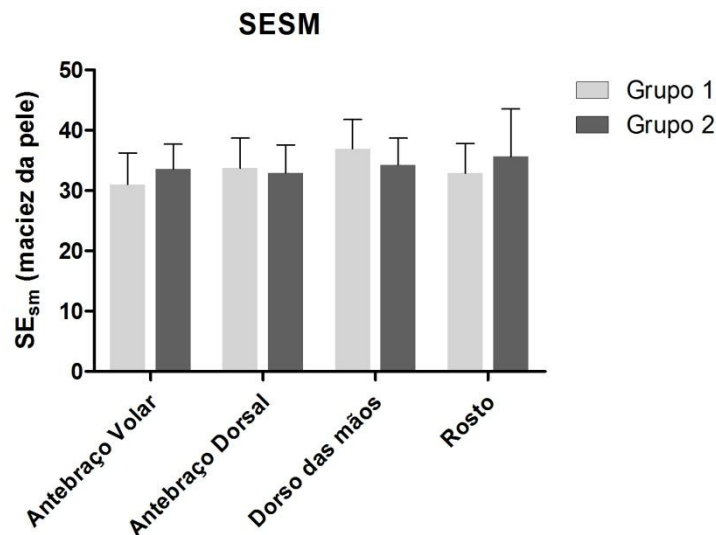
**Figura 55**– Profundidade máxima da ruga (RT) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

Não foram encontradas diferenças significativas quanto aos parâmetros maciez (SEsm) e rugosidade (Ser) (Figura 56 e Figura 57).



**Figura 56**– Rugosidade da pele (Ser) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).



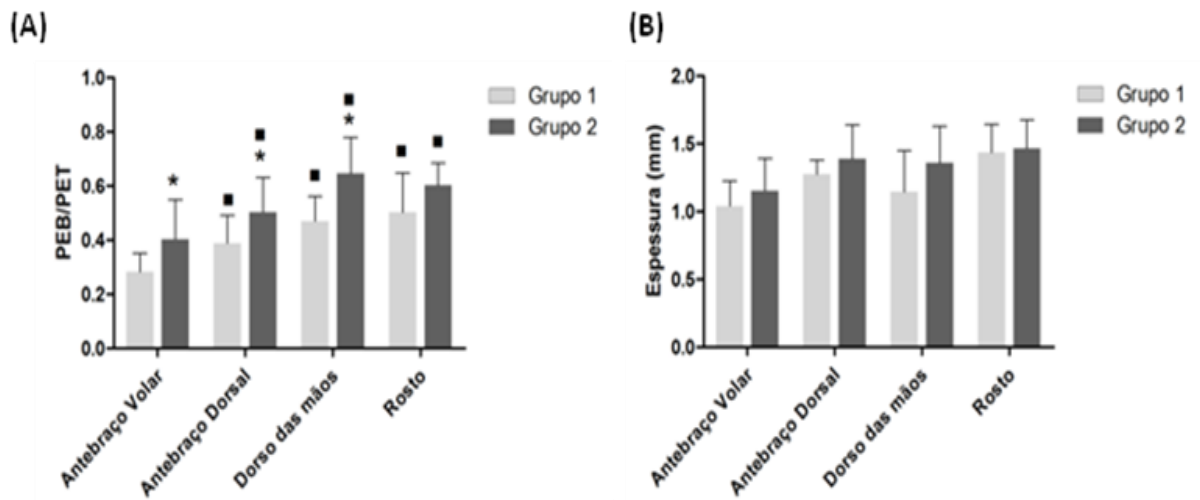
**Figura 57**- Maciez da pele (Sesm) do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

#### 6.2.1.3.5. Avaliação das características da derme

Por meio da análise quantitativa das imagens obtidas pelo ultrassom, foi possível observar diferenças significativas quanto ao nível de pixels de baixa ecogenicidade (representados pelas cores mais escuras, próximas de preto) nos dois grupos estudados e nas regiões fotoexpostas.

A relação pixels de baixa ecogenidade (PBE) e pixels totais (PT), indica que o grupo 2 apresenta menor ecogenicidade nas regiões estudadas (Figura 58). Pela análise das imagens, observa-se que as regiões expostas ao sol apresentam uma área de baixa ecogenicidade sob a epiderme, com destaque nas regiões das mãos e rosto (Figura 59).

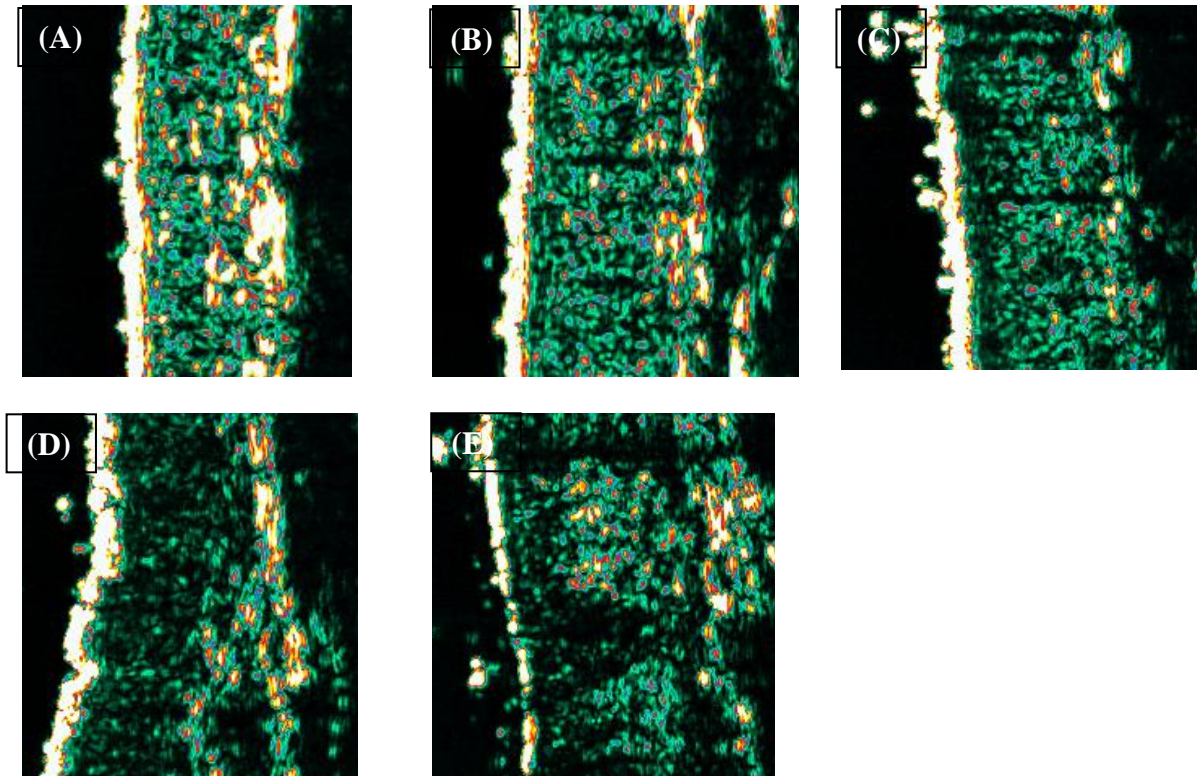
O grupo 2 apresentou maior espessura da derme, porém, tal diferença não foi significativa (Figura 58).



**Figura 58**– Relação Pixels de baixa ecogenidade (PBE) e Pixels totais (PT) (A) e Espessura da derme do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

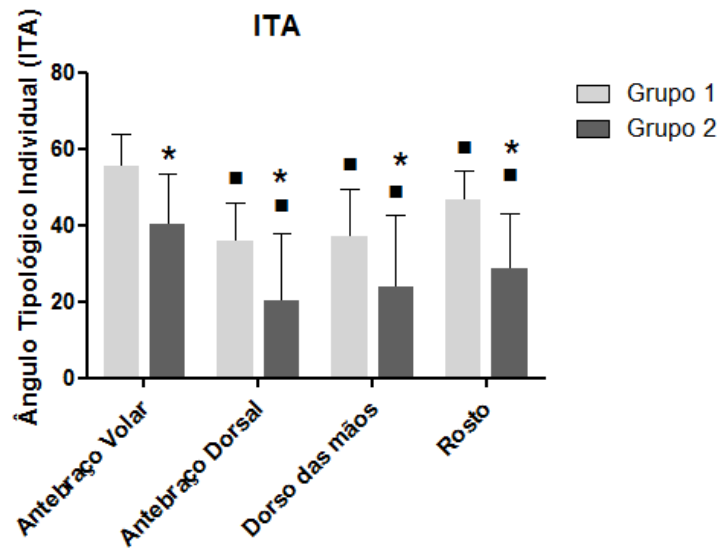
■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Figura 59**– Imagens representativas obtidas do ultrassom de 20 MHz do antebraço volar (A) de uma participante de 20 anos e dos antebraços volar (B) e dorsal (C), dorso das mãos (D) e rosto (E) de uma mulher de 60 anos. A escala de ecogenicidade é dada por: branco>vermelho>amarelo>verde> azul>preto. Para as regiões fotoenvelhecidas, uma área de baixa ecogenicidade abaixo da epiderme pode ser observada.

#### 6.2.1.3.6. Coloração da pele

Pela análise do ângulo tipológico individual, quanto maior o valor, mais clara a pele. Observou-se que as voluntárias do grupo 2 apresentaram menor valor do ângulo tipológico individual (ITA), e, portanto, possuíam a pele mais escura. A diferença de coloração ficou evidente também nas regiões expostas e não expostas ao sol (Figura 60).



**Figura 60**—Ângulo Tipológico Individual do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

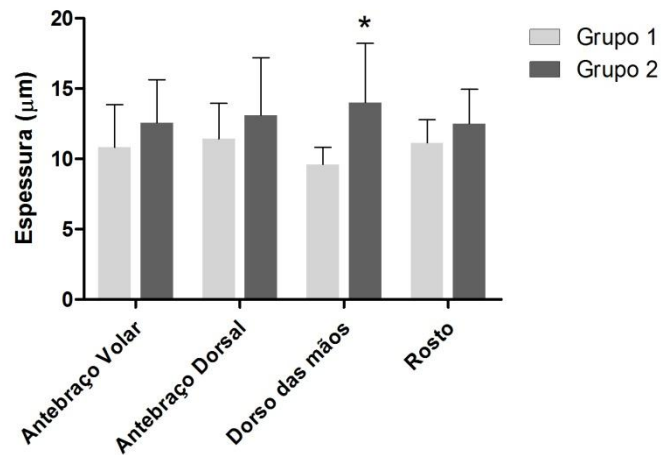
■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 6.2.1.3.7. Avaliação das camadas da pele em nível celular

Pela análise das características morfológicas, cutâneas e estruturais utilizando microscopia confocal de reflectância a laser foi possível analisar quantitativamente a espessura da epiderme e estrato corneo e o diâmetro dos corneócitos. Além disso, foi realizada a análise qualitativa do padrão de pigmentação da epiderme, padrão de organização dos queratinócitos, padrão da junção dermoepidérmica e características marcantes da derme papilar.

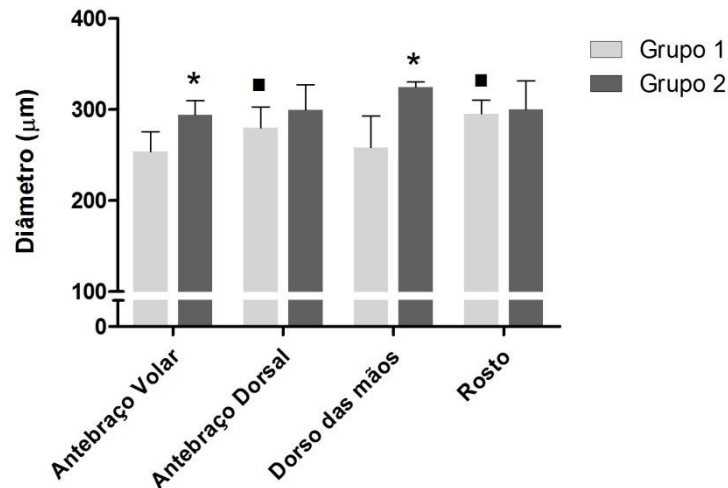
O grupo 2 apresentou maior espessura do estrato corneo, sendo esta diferença significativa para a região do dorso das mãos (Figura 61).

Quanto ao diâmetro dos corneócitos, o grupo 2 apresentou maior diâmetro nas regiões dos antebraços e nas mãos (Figura 62). No grupo jovem, maiores diâmetros foram observados nas regiões fotoexpostas antebraço dorsal e rosto em relação à região não fotoexposta (antebraço volar). Não foram observadas diferenças significativas na espessura da epiderme nos grupos e nas regiões estudadas (Figura 63).



**Figura 61**– Espessura do estrato córneo do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

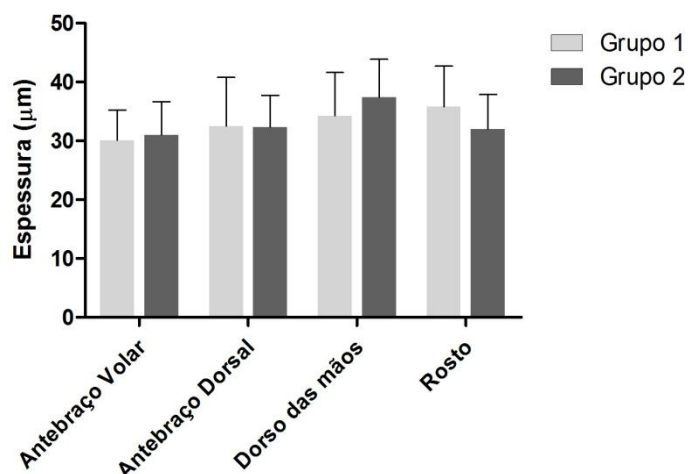
\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ ).



**Figura 62**– Diâmetro de corneócitos do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média ± DP).

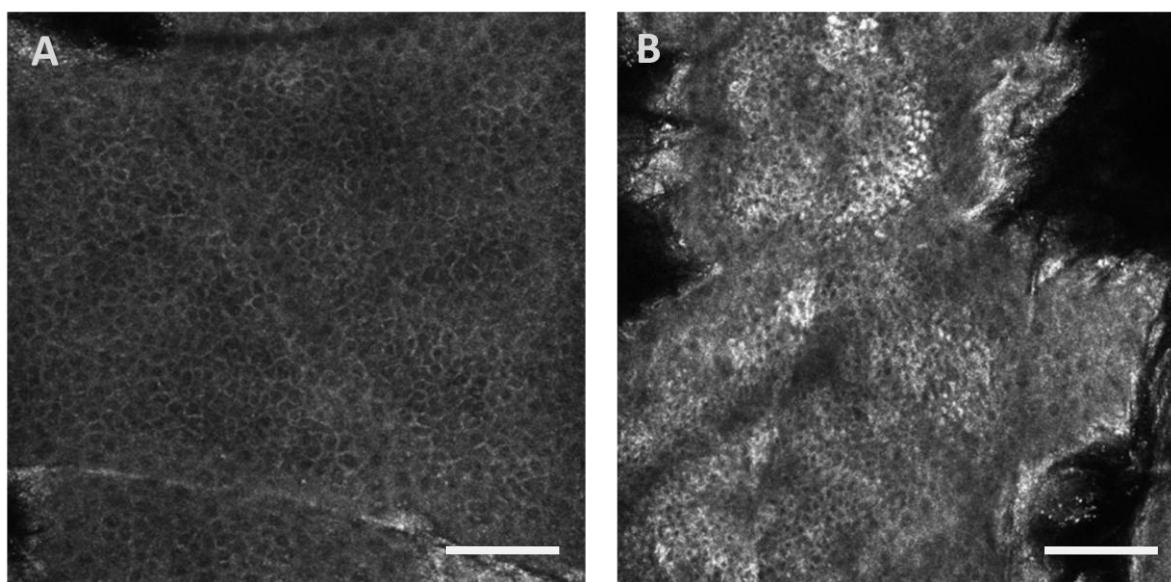
\*Estatisticamente diferente do Grupo 1 (Teste T de Student,  $p < 0,05$ )

■ Estatisticamente diferente da região não exposta ao sol (Antebraço Volar) do respectivo grupo (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



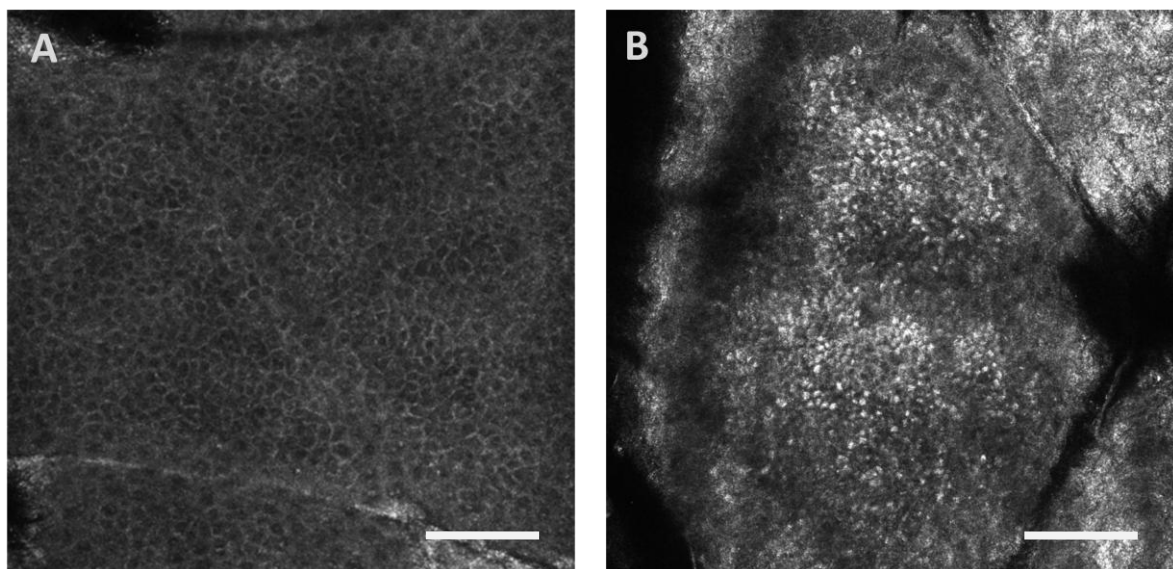
**Figura 63**– Espessura da epiderme do Grupo 1 (18- 30 anos) e do Grupo 2 (40-65 anos) (média  $\pm$  DP).

Em relação ao padrão de apresentação das imagens, observa-se uma desordem do padrão de “favo de mel” com pleomorfismo de tamanho e forma de queratinócitos e também pigmentação irregular na pele fotoenvelhecida. Quanto à pigmentação, observa-se que há um acúmulo de melanina nos queratinócitos, o que caracteriza um padrão de pigmentação irregular (Figura 64 e Figura 65).



**Figura 64**– Padrão de distribuição dos queratinócitos no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Observa-se desordem do padrão de “favo de mel” com pleomorfismo de tamanho e forma de queratinócitos e também pigmentação irregular. (Escala = 100µm).

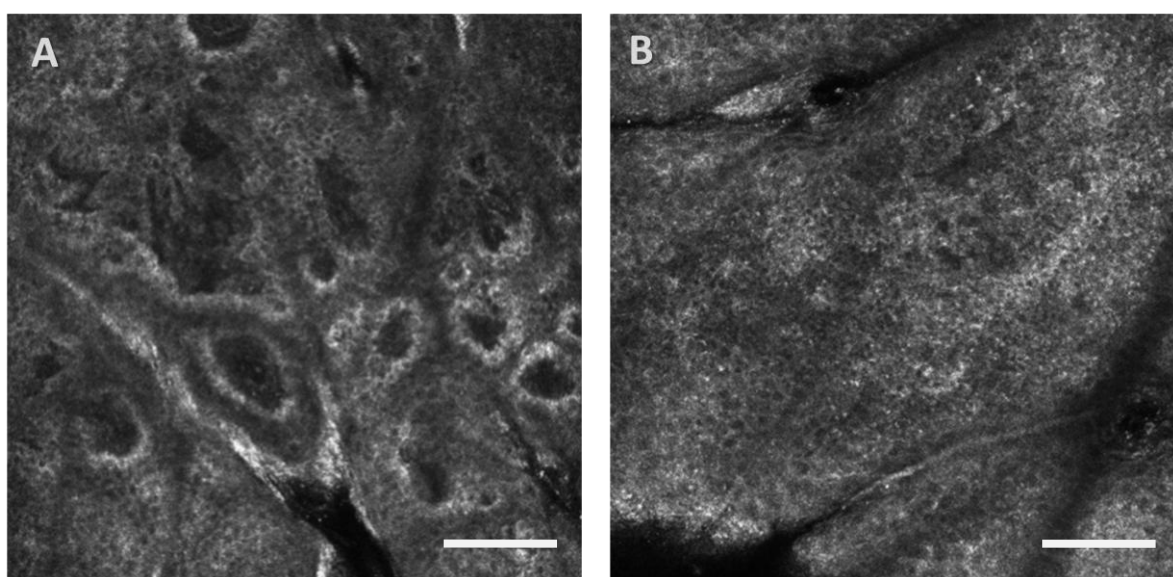




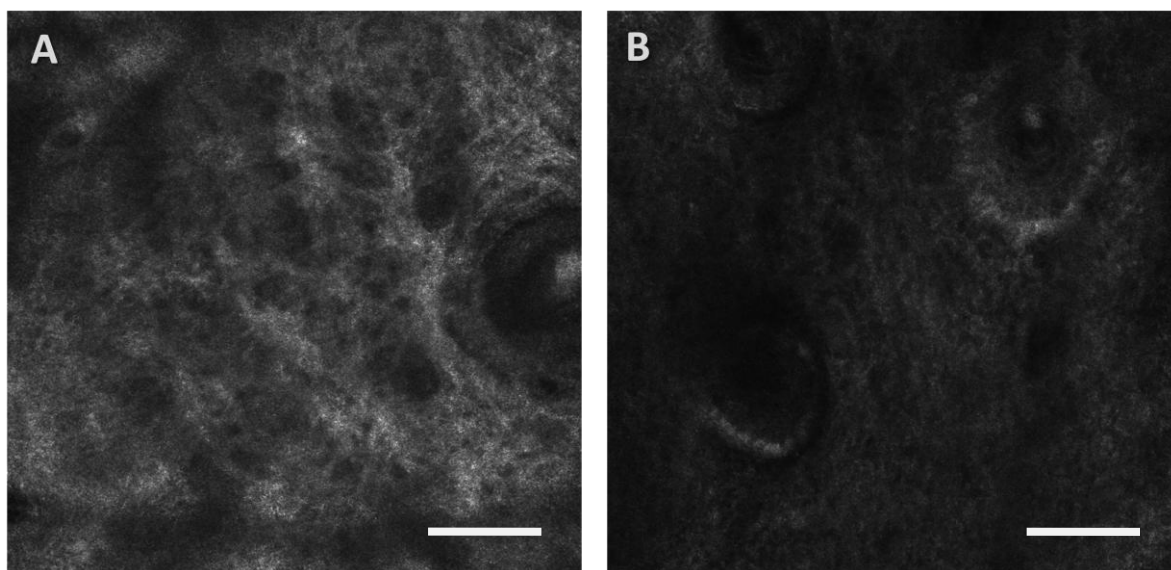
**Figura 65**– Padrão de pigmentação no queratinócitos no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Em B, queratinócitos pigmentados são representados por pontos claros, de alta refringência. (Escala = 100 $\mu$ m).

O padrão da junção dermoepidérmica apresenta-se completamente alterado nas regiões com fotodano (Figura 66). Observa-se uma perda das papilas dérmicas, e conseqüentemente há um achatamento da epiderme.

Na derme papilar, as fibras de colágeno, a pele jovem apresenta fibras de colágeno finas e altamente refringentes, e na pele envelhecida, as fibras são pouco visíveis e apresentam a aparência encolhida (Figura 67).



**Figura 66**– Padrão da junção dermoepidérmica no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Observa-se em (A) que a região fotoenvelhecida há um achatamento da epiderme e, portanto, perda das papilas dérmicas. (Escala = 100 $\mu$ m).



**Figura 67**– Características da derme papilar no rosto em uma pele jovem (A) e em uma pele fotoenvelhecida (B). Observa-se que na pele jovem, as fibras de colágeno são finas e altamente refringentes, e na pele envelhecida, as fibras são pouco visíveis e apresentam a aparência encolhida. (Escala = 100 $\mu$ m).

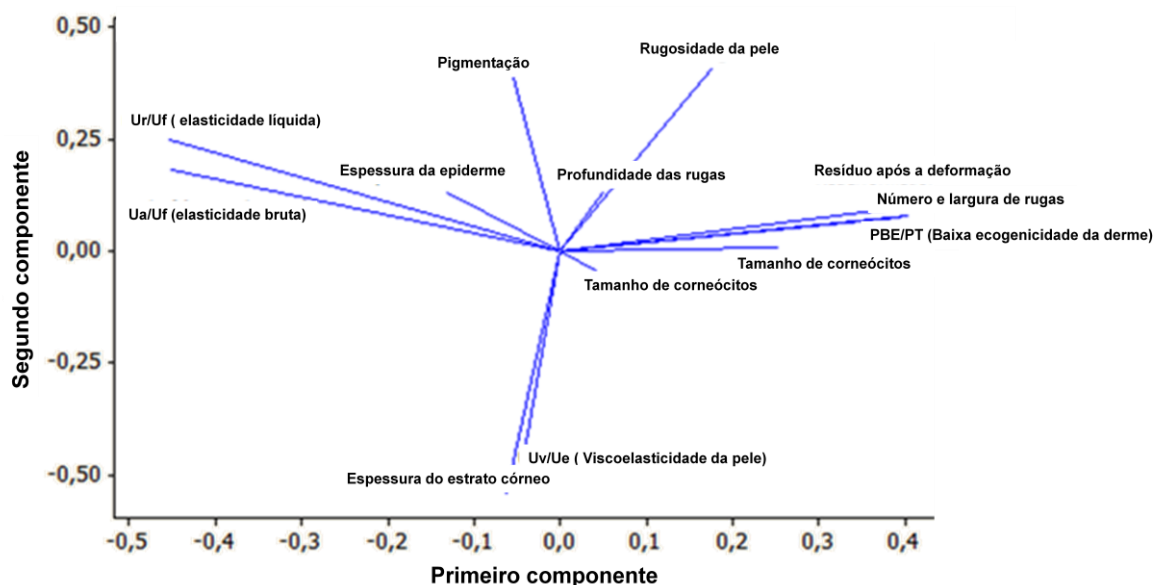
#### 6.2.1.3.8. Índice de Fotoenvelhecimento

De acordo com os resultados dos parâmetros avaliados no estudo clínico de caracterização, foi proposto um modelo matemático que permitiu a integração dos parâmetros de biofísica e análise de imagem em apenas um índice por meio de uma análise multivariada: análise do componente principal.

O “Loading Plot” descreve a distribuição das características da pele, de modo que os pontos que estão próximos exibem um padrão similar de distribuição na população estudada. O primeiro componente é uma combinação linear das variáveis originais que explica a maior variância (Figura 68).

Um modelo matemático foi desenvolvido com os dados experimentais da face das voluntárias dos dois grupos de idade. Com o PCA foi possível a construção de diversas variáveis latentes (Componentes do PCA) que capturam a maior parte da variabilidade dentre os grupos originais de variabilidade, sendo que o primeiro componente é uma combinação linear das variáveis originais que explicam o máximo da variância (KAMAT; CHAVAN;

PATIL, 2014). Ou seja, foi proposto um modelo matemático que integra os parâmetros de biofísica e análise de imagem em um único parâmetro utilizando Análise do Componente Principal para caracterizar a pele fotoenvelhecida (Figura 68).



**Figura 68-** “Loading plot”: Gráfico de PCA com primeiro e segundo componente principal dos resultados da face obtidos pelas técnicas de biofísica e análise de imagem dos dois grupos de idade.

$$\text{Índice} = 0,176 X_1 + 0,385 X_2 + 0,048 X_3 - 0,452 X_4 + 0,403 X_5 - 0,045 X_6 + 0,453 X_7 - 0,131 X_8 + 0,063 X_9 + 0,253 X_{10} - 0,053 X_{11} + 0,395 X_{12} + 0,041 X_{13}$$

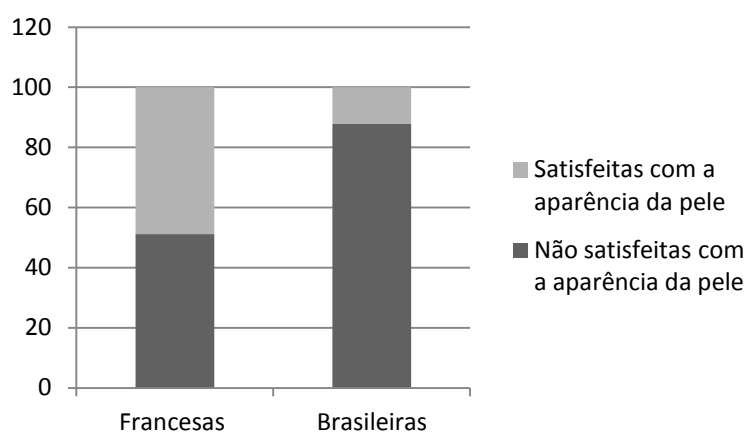
Sendo que,  $X_1$  - Rugosidade da pele;  $X_2$  - Número e largura dos sulcos;  $X_3$  - Profundidade máxima dos sulcos;  $X_4$  - Ua/Uf - Elasticidade bruta;  $X_5$  - Redeformação residual após a sucção (R4);  $X_6$  - Uv/Ue - componente viscoso;  $X_7$  - Ur/Uf (Elasticidade);  $X_8$  - Espessura da epiderme;  $X_9$  - Espessura do estrato córneo;  $X_{10}$  - Tamanho dos corneócitos;  $X_{11}$  - Pigmentação da pele (Ângulo Tipológico Individual);  $X_{12}$  - Hipocogenicidade (LEP/TEP);  $X_{13}$  - Espessura da derme.

## 6.2.2. Caracterização da pele fotoenvelhecida no Brasil e na França

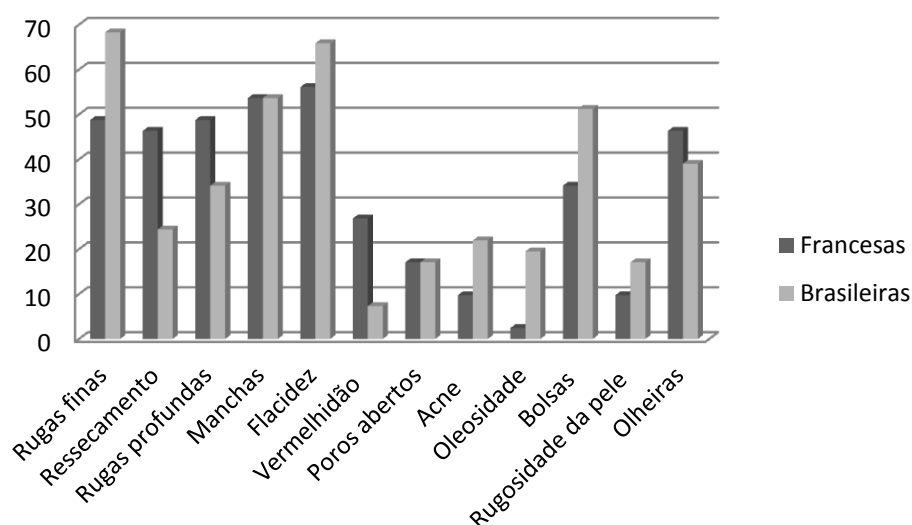
### 6.2.2.1. Questionários

#### 6.2.2.1.1. Características da pele e uso de cosméticos

Quando as voluntárias foram questionadas sobre sua satisfação em relação à aparência da pele do rosto, 48% das voluntárias francesas estão satisfeitas com sua aparência. Estes resultados são muito diferentes do painel brasileiro, com apenas 12% de satisfação (Figura 69). As principais características da pele rosto que incomodam as voluntárias francesas são: flacidez (56,1%), manchas (53,6%), rugas finas (48,8%), rugas profundas (48,8%), ressecamento (46,3%), olheiras (46,3%) e bolsas sob os olhos (34,1%) (Figura 70). As principais características dos voluntários brasileiros são: rugas finas (68,3%), flacidez (65,8%), pontos (53,6%), bolsas sob os olhos (50,0%), olheiras (38%). 71% das voluntárias francesas já buscaram um tratamento para estas alterações, enquanto apenas 27% das brasileiras buscaram.

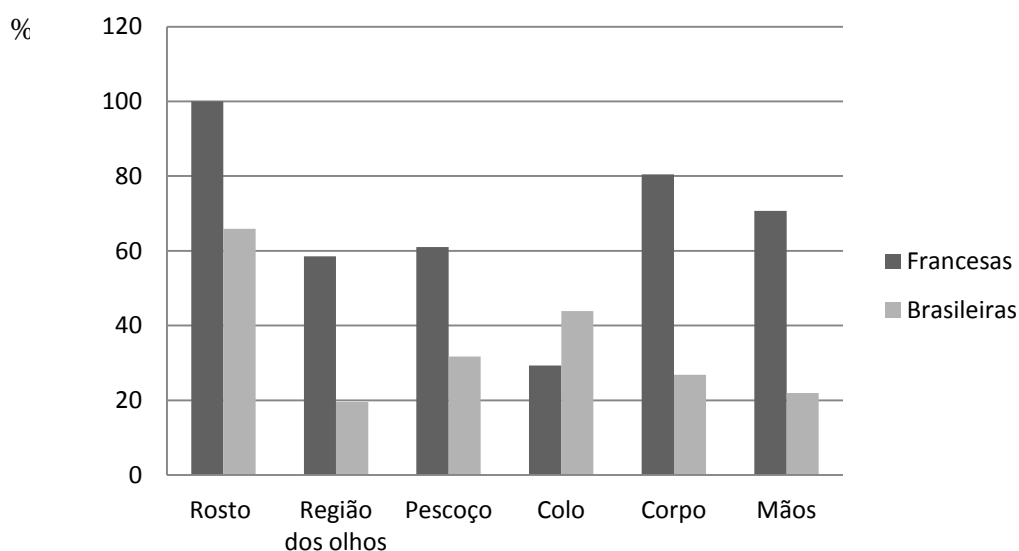


**Figura 69-** Porcentagem de voluntárias francesas e brasileiras que estão, ou não, satisfeitas com a pele do rosto.



**Figura 70-**Principais características do rosto que incomodam as voluntárias

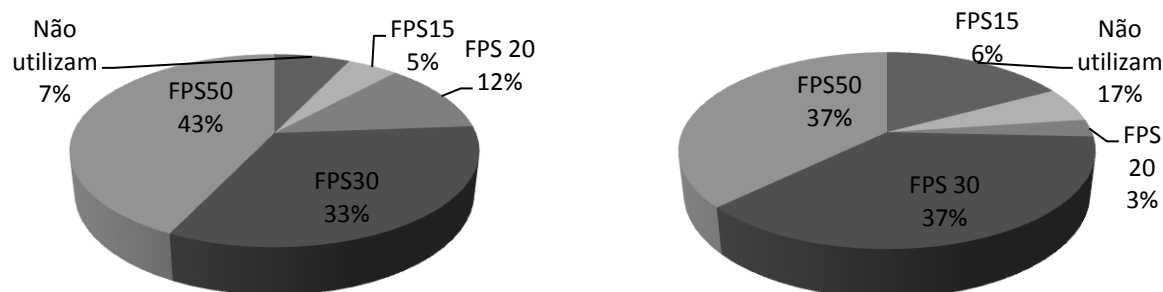
No que se refere aos hábitos de uso de produtos cosméticos, todas as voluntárias francesas utilizam produtos cosméticos na face (100%), 80% usam cosméticos para o corpo, 71% usam nas mãos, 58% em torno dos olhos, 61% no pescoço e 29% no colo. Para os voluntários brasileiros, estes hábitos são significativamente reduzidos, com exceção das regiões do colo (Figura 71).



**Figura 71-** Regiões de aplicação de cosméticos

26% das participantes brasileiras relataram câncer de pele em família, entretanto, nenhum caso foi relatado em famílias francesas. Entre as voluntárias francesas do estudo,

59% já tiveram algum tipo de queimadura solar e a grande maioria tem o hábito de usar protetores solares, e os protetores solares com FPS 30 e 50 são os mais frequentemente escolhidos por elas (Figura 72).



**Figura 72-** FPS dos protetores solares utilizados no rosto (A) e no corpo (B) pelas voluntárias do painel francês

#### 6.2.2.1.2. Hábitos de proteção e exposição solar

O tempo diário de exposição ao sol, a frequência de banhos de sol, o uso de protetor solar em diferentes períodos de suas vidas dos dois painéis estudados são mostrados nas figuras 73 a 75.

Em relação à exposição solar diária, a maioria das voluntárias expõe-se atualmente menos de 1 hora ou entre 1 e 3 horas por dia. Entre 16 e 25 anos de idade foi o período de maior exposição solar para as voluntárias francesas. Para as participantes brasileiras, observa-se a redução do tempo de exposição ao sol ao longo dos anos, e o período de maior exposição ao sol foi até 15 anos de idade.

Os hábitos de bronzeamento solar estão amplamente presentes nas populações estudadas. A frequência de bronzeamento tem reduzido ao longo dos anos, entretanto, o uso de protetor solar aumentou. Até 25 anos de idade, a frequência de uso de protetores solares é significativamente mais baixa na população brasileira.

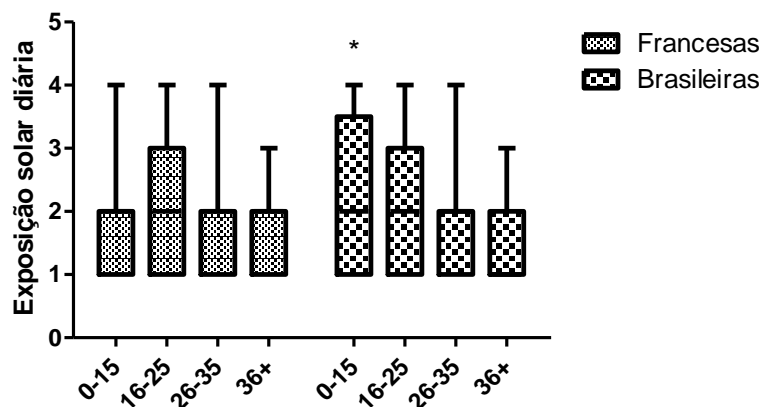


Figura 73- Representação em box-plot do tempo de exposição ao sol diariamente em diferentes períodos da vida. Pontuação: (1) Menos de uma hora, (2) entre 1 e 3 horas, (3) entre 3 e 6 horas e (4) mais de 6 horas. \*Estatisticamente diferente do grupos das voluntárias francesas (Teste T de Student,  $p < 0,05$ ).

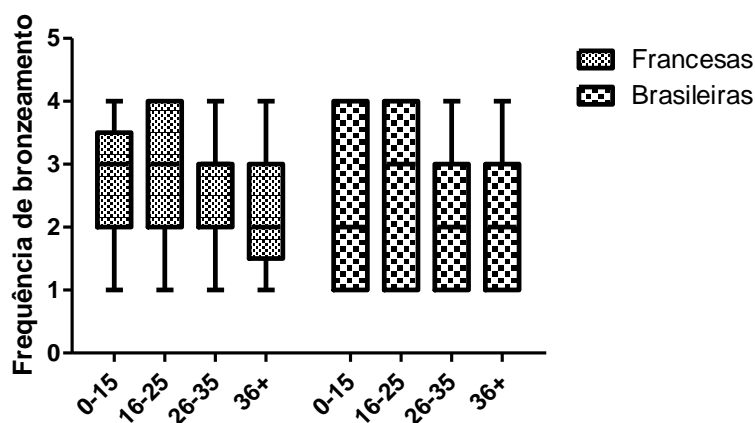


Figura 74- Representação box-plot da frequência de banhos de sol em diferentes períodos da vida. Pontuação: (1) Nunca, (2) Raramente (0-1 vez em um mês); (3) Esporadicamente (1-3 vezes em um mês) e (4) com frequência (mais de 3 vezes em um mês). \*Estatisticamente diferente do grupos das voluntárias francesas (Teste T de Student,  $p < 0,05$ ).

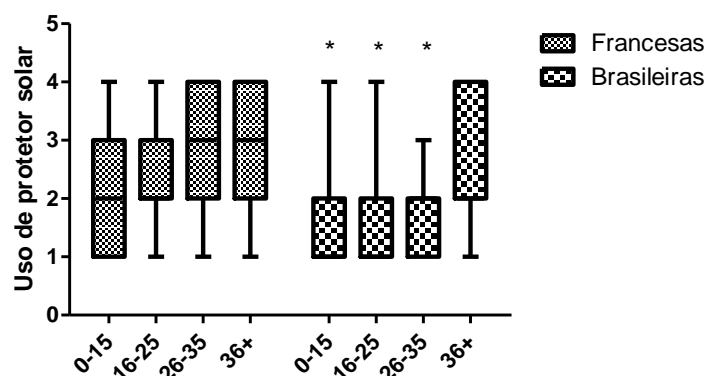


Figura 75- Representação box-plot do uso de protetores solares em diferentes períodos da vida. Pontuação: (1) Nunca; (2) Raramente; (3) frequentemente; (4) Sempre. \*Estatisticamente diferente do grupos das voluntárias francesas (Teste T de Student,  $p < 0,05$ ).

De acordo com os questionários, as participantes brasileiras e francesas apresentaram um perfil parecido em relação à exposição diária e proteção solar. Mas as voluntárias brasileiras expuseram mais horas por dia na infância e a proteção solar era menos frequente. Os hábitos de banhos de sol não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os hábitos de proteção solar e hábitos de exposição solar atuais são semelhantes.

### 6.2.2.2. Caracterização da pele por técnicas de biofísica e análise de imagem

#### 6.2.2.2.1. Fotografias de alta resolução

Para a análise dos dados da avaliação fotográfica e imagens 3D, o painel composto pelas voluntárias francesas foi dividido em três grupos de acordo com pontuações relativas à idade e hábitos de exposição solar.

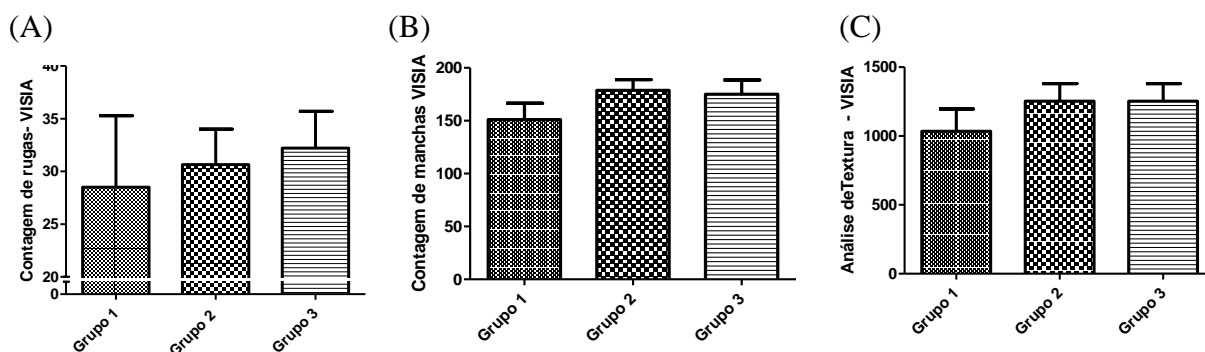
A pontuação para o fotoenvelhecimento foi obtido da seguinte forma: Idade x (média do *Score* de exposição solar + média do *Score* de bronzeamento).

De acordo com a pontuação obtida, foram divididos nos grupos: Grupo 1 (menos de 100 pontos), grupo 2 (entre 100 e 140 pontos) e Grupo 3 (mais de 140 pontos).

A pontuação fotográfica com o software VISIA mostrou que o número de rugas é diferente nos três grupos estudados. O grupo 3 é a que o número de rugas é maior. Para a



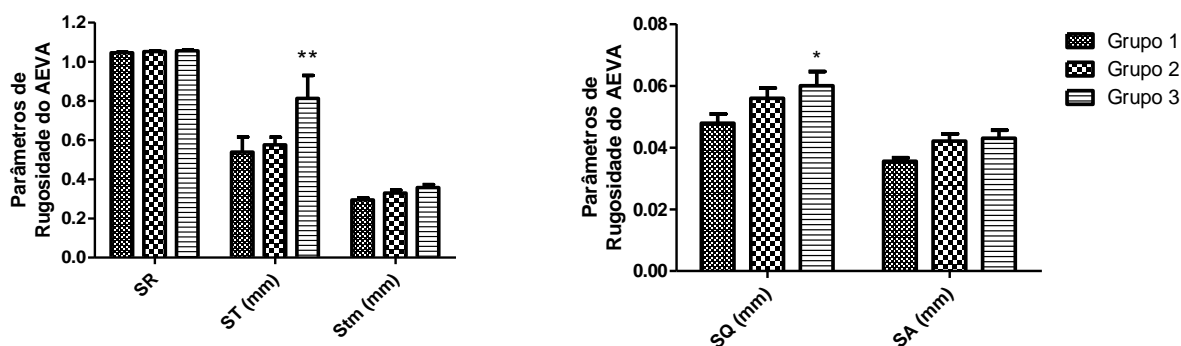
textura e manchas, os grupos 2 e 3 apresentaram valores semelhantes, que são significativamente mais elevados que o grupo 1 (Figura 76).



**Figura 76** - Análise do software VISIA para os parâmetros: rugas (A), pontos (B) e textura (C).

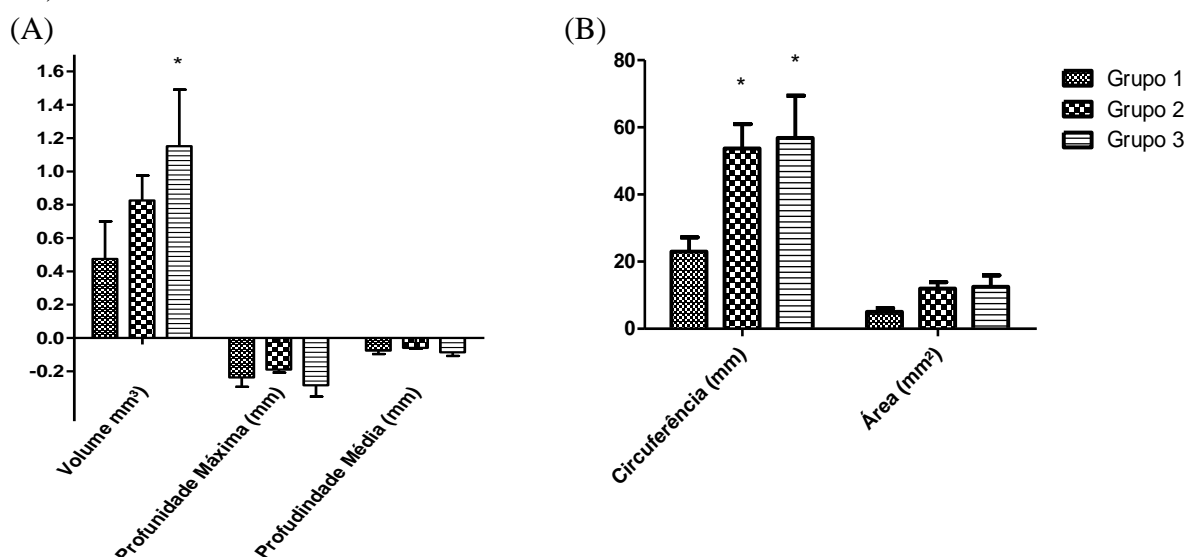
#### 6.2.2.2.2. Análise 3D

A análise realizada por AEVA 3D – HE mostrou que a topografia, morfologia e rugosidade da pele é significativamente diferente entre os grupos estudados. É possível observar que o comprimento dos sulcos (SR) não se alterou de forma significativa, mas os parâmetros relacionados com a profundidade mudou significativamente, principalmente para o parâmetro ST (amplitude máxima do relevo), que apresentaram um aumento expressivo do grupo 3 (Figura 77).



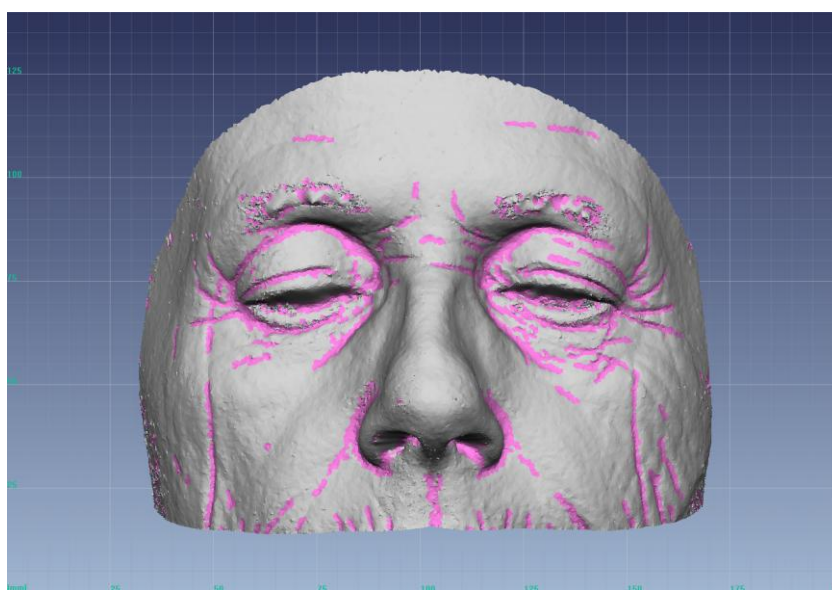
**Figura 77** - Avaliação da rugosidade por AEVA - HE: SR: comprimento e área de sulcos; ST: amplitude máxima do relevo (mm). Stm: diferença entre os picos e vales média (mm). SQ: rugosidade no que diz respeito à variação média quadrática (mm). SA: rugosidade média (mm). (\* Diferença significativa em relação ao grupo 1, \*\* Diferença significativa em relação aos grupos 1 e 2).

A análise da morfologia das rugas da região periorbital mostrou que os grupos apresentaram aumento do volume destas rugas. Quando a profundidade foi analisada separadamente, observou-se que o Grupo 1 e 2 têm perfis semelhantes, entretanto o grupo 3 apresentou valores aumentados. Em relação à soma da área de circunferência, observamos que o grupo 2 e o grupo 3 apresentam valores semelhantes, significativamente diferentes do grupo 1 (Figura 78).

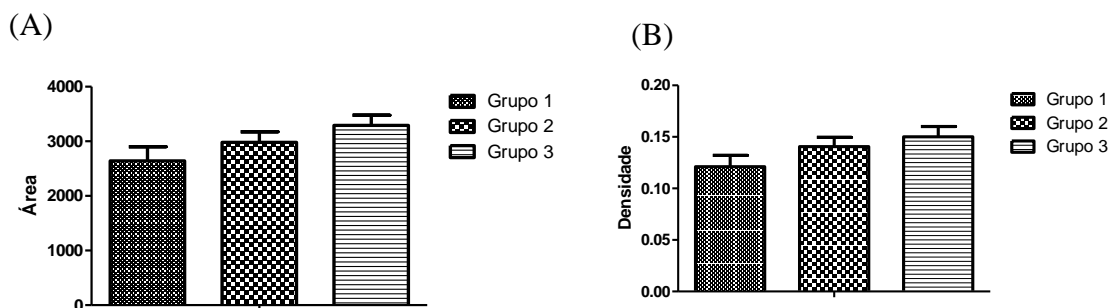


**Figura 78-** Avaliação das rugas periorbitais AEVA - HE (A) soma do volume, profundidade máxima e profundidade média (B) soma da circunferência e soma área média.

Em relação ao total de sulcos da pele e densidade calculada pelo software, a figura 80 mostra a representação da máscara e o cálculo da área dos sulcos. Quando comparamos os três grupos em estudo, observa-se um aumento desses sulcos (Figura 80).



**Figura 79-** Reconstrução 3D do rosto de uma voluntários por tecnologia de fringe protection. A coloração rosa significa detecção dos sulcos pelo software.



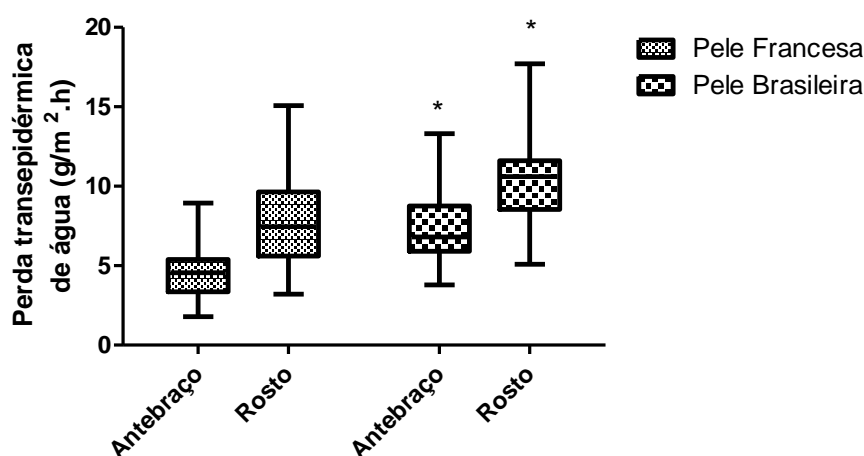
**Figura 80-** Área de sulcos (A) e densidade (B) (Área de sulcos / área total).

### 6.2.2.2.3. Coloração da pele

As medidas do ângulo tipológico individual (ITA°) mostraram que as participantes dos painéis tinham a pele mais escura na face (área fotoexposta). O ITA° dos antebraços das francesas e brasileiras foram 39,77 ( $\pm 10,56$ ) e 38,05 ( $\pm 13,75$ ), respectivamente. Na face, os valores foram 29,34 ( $\pm 8,31$ ) e 31,52 ( $\pm 10,20$ ), respectivamente.

### 6.2.2.2.4. Perda de água transepidérmica

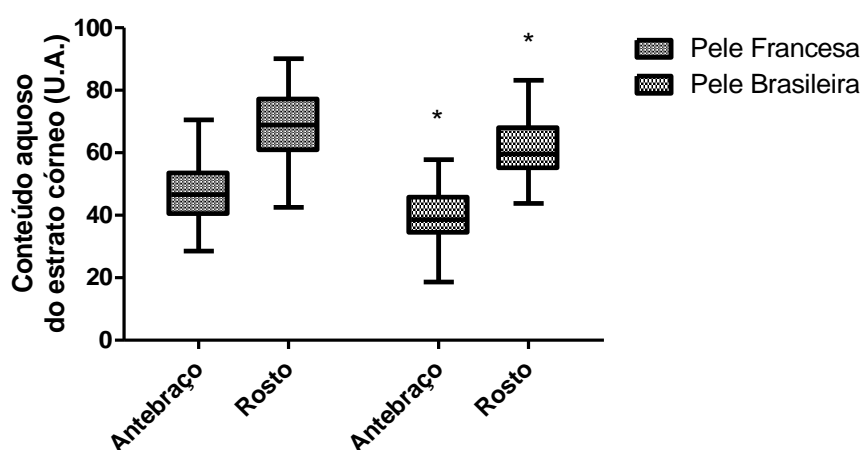
Os resultados de perda de água transepidérmica mostraram que a pele brasileira apresentou valores mais elevados para este parâmetro. Ao comparar as duas regiões, ambas as populações apresentaram o mesmo perfil, com valores mais elevados para a perda de água transepidérmica na face (Figura 81).



**Figura 81** - Perda transepidermica de água do antebraço volar e do rosto de voluntárias francesas e brasileiras. \* Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa ( $p < 0,05$ ).

#### 6.2.2.2.5. Conteúdo aquoso do estrato córneo

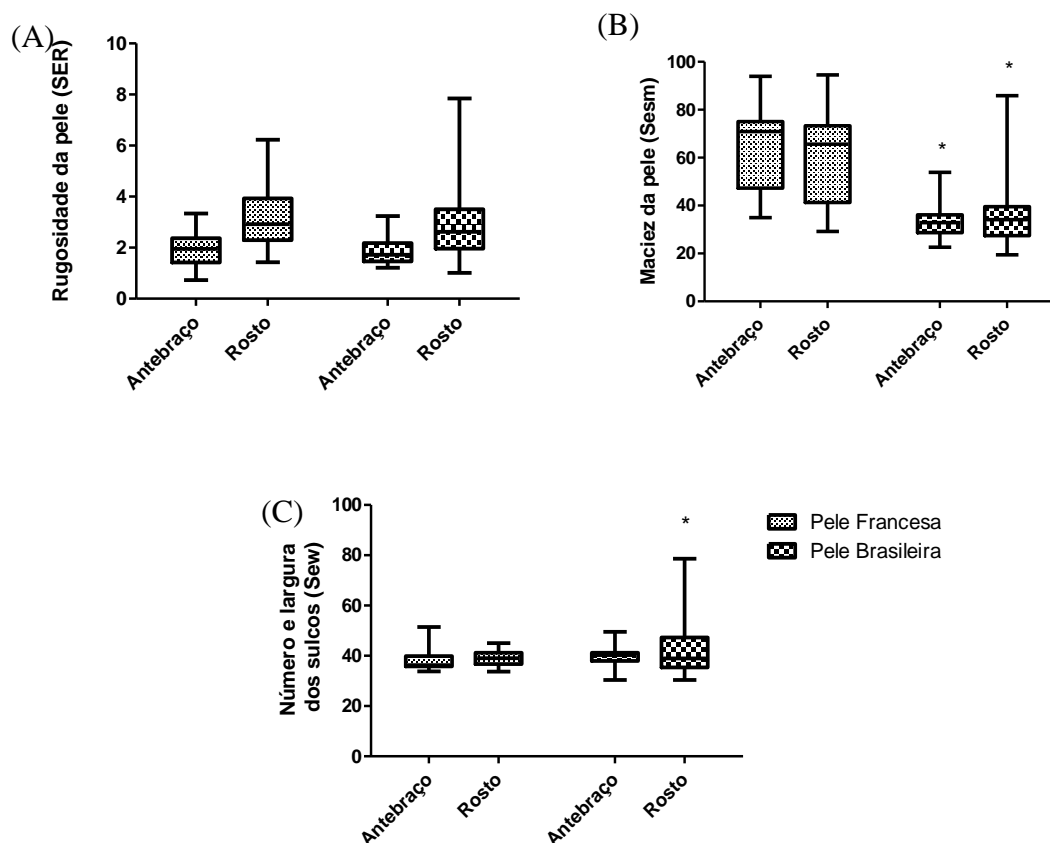
Os resultados do conteúdo aquoso do estrato córneo mostraram o mesmo perfil nas duas populações: a pele do rosto é mais hidratada. Ao comparar as duas populações, a pele brasileira mostrou valores mais baixos para o conteúdo aquoso do estrato córneo em ambas as regiões (Figura 82).



**Figura 82-** Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço volar e do rosto de voluntárias francesas e brasileiras. \* Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.2.2.6. Microrrelevo cutâneo

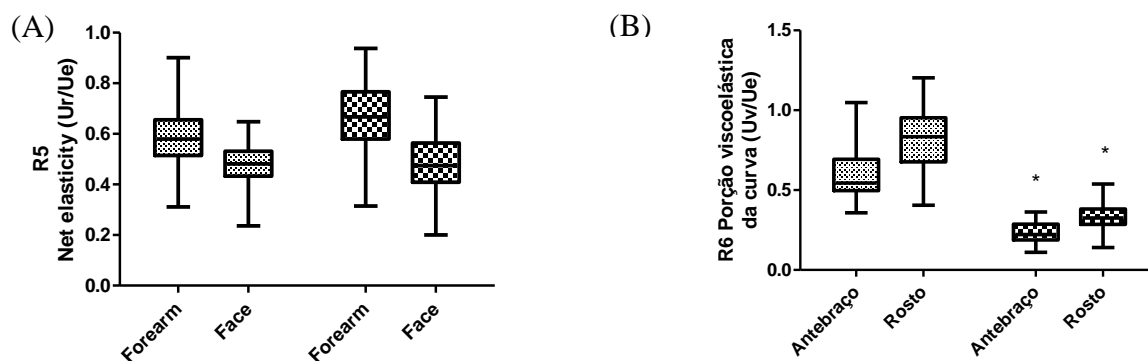
Os parâmetros do microrrelevo cutâneo avaliados estão demonstrados na figura 83. A pele francesa apresentou maiores valores para maciez da pele, e a pele brasileira apresentou valores significativamente maiores para o número de largura das rugas na face.



**Figura 83-** Aspereza da pele (Ser) (A), a suavidade da pele (SESM) (B) e número e a largura das sulcos (costurar) (C) do antebraço e da face dos voluntários. \* Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa (p < 0,05).

### 6.2.2.2.7. Viscoelasticidade da pele

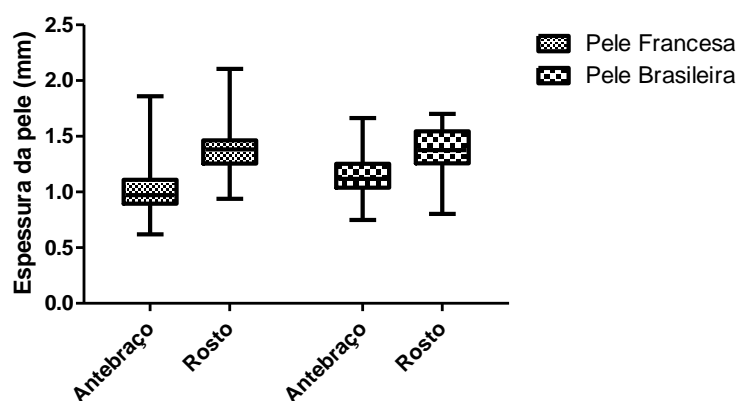
Para ambas as populações, os antebraços e rosto apresentam diferenças significativas em relação aos parâmetros de viscoelasticidade da pele. Na área fotoexposta (face), observa-se a redução da elasticidade da pele ( $U_a/U_f$  e  $U_r/U_e$ ) e aumento da porção viscoelástica da curva (Figura 84).



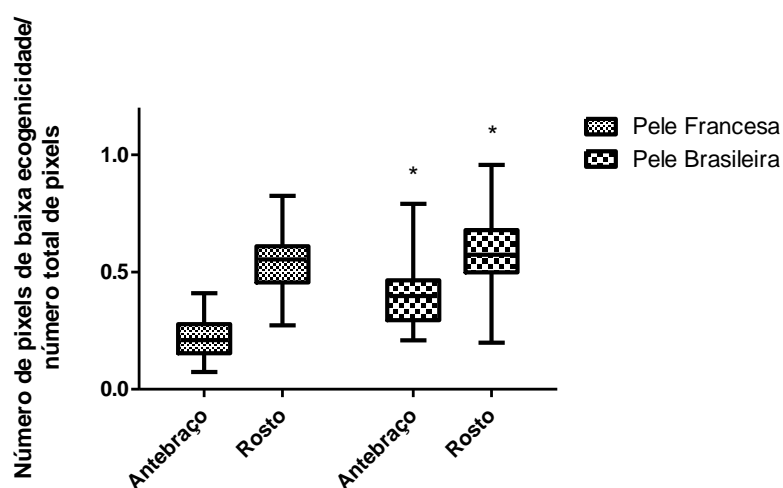
**Figura 84-** (A)  $R5 = U_r / U_e =$  elasticidade líquida e (B)  $R6 = U_v/U_e =$  porção da viscoelasticidade da parte elástica da curva. \* Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa ( $p < 0,05$ ).

#### 6.2.2.2.8. Espessura e Ecogenicidade da derme

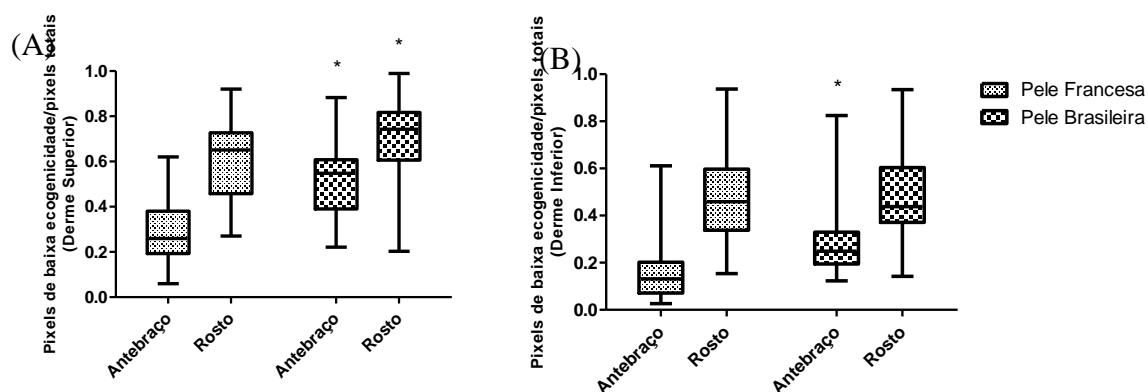
Diferenças significativas na espessura da derme e ecogenicidade foram observadas nas diferentes regiões das populações estudadas. Como esperado, a face foi a região com menor ecogenicidade, e pode ser relacionada com a degradação do colágeno. A pele brasileira apresentou menor ecogenicidade, principalmente na derme superior em ambas as regiões estudadas (Figura 85 a 87).



**Figura 85-** Espessura da derme do antebraço e no rosto dos voluntários franceses e brasileiros.



**Figura 86** - Proporção de pixels de baixa ecogenicidade na derme do antebraço volar e do rosto das voluntárias francesas e brasileiras. \* Significativamente diferente da respectiva região da pele francesa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 87**- Proporção de pixels de baixa ecogenicidade na derme do antebraço volar e do rosto das voluntárias francesas e brasileiras \* Significativamente diferente da respectiva região da pele Francês ( $p < 0,05$ ).

#### 6.2.2.2.9. Características morfológicas e estruturais da epiderme

Em relação à espessura das camadas da epiderme, o estrato córneo é mais fino na face em relação aos antebraços em ambos os grupos e a pele francesa apresentou um estrato córneo mais espesso. Não foram observadas diferenças significativas da espessura das outras camadas cutâneas (Tabela 22).

**Tabela 22** - Espessura das diferentes camadas cutâneas na pele brasileira e francesa

			<i>Pele Francesa</i>	<i>Pele Brasileira</i>	<i>Valor de P</i>
Espessura do estrato córneo ( $\mu\text{m}$ ), Média (DP)	Forearm		12,91(3,0)	10,41 (1,96)	<0.0001 *
	Face		9,94(1,57)	8,95 (1,51)	<0.01*
Espessura mínima da epiderme ( $\mu\text{m}$ ), Média (DP)	Forearm		21,9(5,86)	20,04(4,51)	NS
	Face		28,43(8,79)	28,82 (7,92)	NS
Espessura máxima da epiderme ( $\mu\text{m}$ ), Média (DP)	Forearm		49,04 (11,35)	48,20(5,93)	NS
	Face		42,08 (10,37)	37,85 (9,46)	NS
Espessura da epiderme viável ( $\mu\text{m}$ ), Média (DP)	Forearm		36,59 (8,32)	34,35 (3,45)	NS
	Face		35,26(7,47)	33,44 (5,51)	NS
Profundidade das papilas dérmicas ( $\mu\text{m}$ ), Média (DP)	Forearm		27,01 (12,73)	28,16 (8,23)	NS
	Face		13,66 (12,73)	9,21 (12,41)	NS

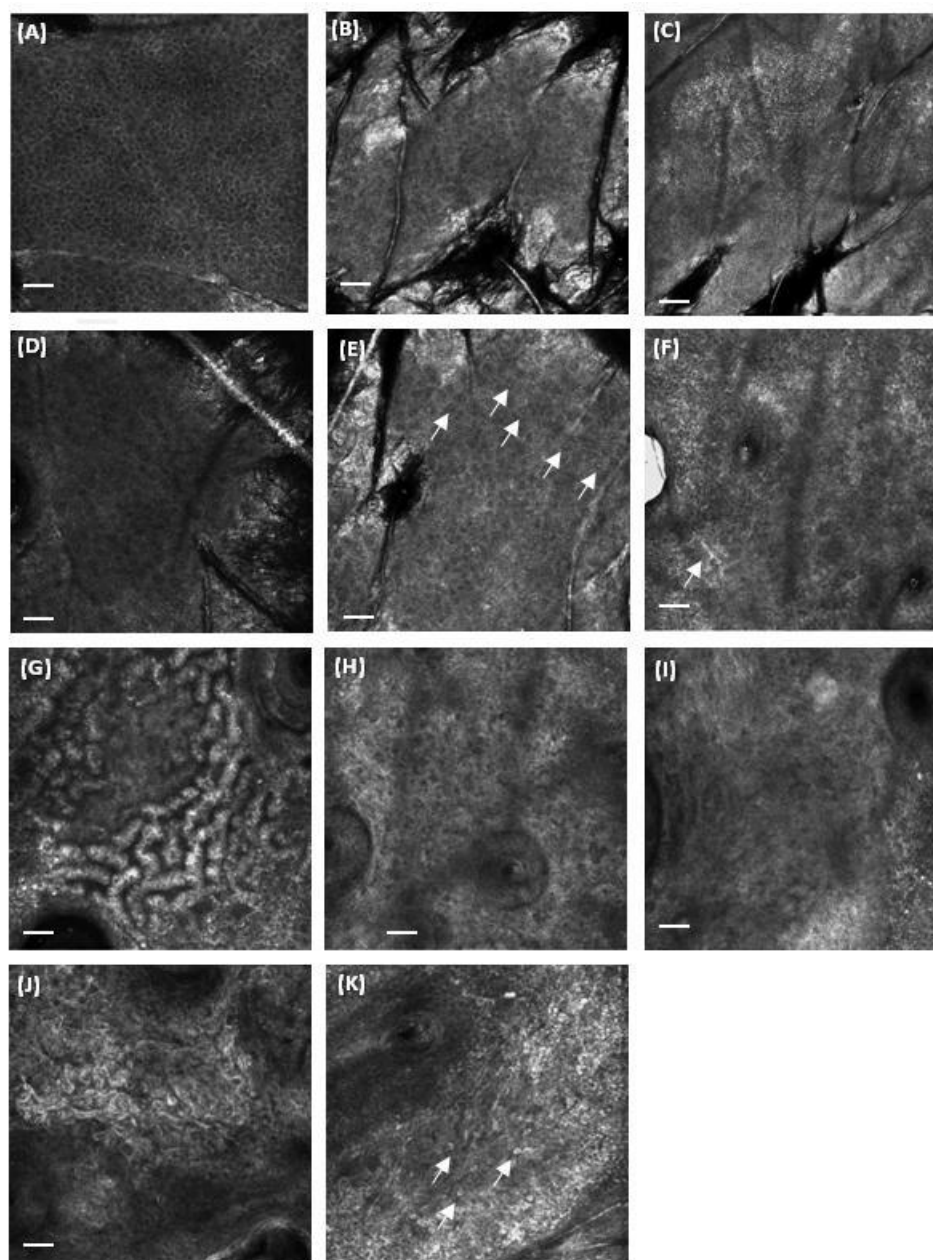
\*Student T test não pareado

As características morfológicas e estruturais observadas nas imagens da microscopia confocal de reflectância a laser estão descritas na tabela 23 e demonstradas na figura 88.

**Tabela 23** – Frequências absolutas e relativas de características observadas nas imagens da microscopia confocal de reflectância a laser. (NS: não significante).

	<b>Pele Francesa, n (%)</b>	<b>Pele Brasileira, n (%)</b>	<b>Valor de P (Teste X<sup>2</sup>)</b>
Padrão irregular das células da epiderme	23 (56,1%)	26 (63,4%)	NS
Pigmentação irregular na epiderme	32 (78,04%)	30 (73,17%)	NS
Baixa reflectância entre os queratinócitos	3 (7,3%)	13 (31,7%)	< 0,01
Queratinócitos com núcleos picnóticos	25 (60,97%)	19 (46,34%)	NS
Células dendríticas na JDE	14 (34,14%)	17 (41,46%)	NS
Achatamento das papilas dérmicas (Extensão>50%)	15 (36,6%)	24 (58,5%)	<0,05
Anis policíclicos (lentigo solar)	2 (4,87%)	9 (21,95%)	<0,05
Fibras grossas de colágeno (extensão > 25%)	41 (100%)	41 (100%)	NS
Rede de colágeno amorfa hiporrefrativa (extensão > 25%)	21 (48,8%)	33 (80,48)	<0,01
Elastose solar	11 (26,8%)	18 (43,9%)	NS
Infiltrado inflamatório na derme superior	18 (43,9%)	15 (36,6%)	NS





**Figura 88** – Exemplos de características celulares da epiderme, da junção dermo-epidermica e morfologia das fibras colágenas utilizadas na análise: (A) Padrão regular de favo de mel com queratinócitos poligonais bem demarcados, com tamanho e formato regular; (B) Padrão irregular de favo de mel mostrando queratinócitos com formatos e tamanhos irregulares e com contorno pouco definido; (C) Pigmentação mosqueada; (D) Baixa reflectância entre os queratinócitos (contornos não estão bem definidos); (E) queratinócitos com pontos brancos circundados por uma periferia escura, o que pode representar cromatina condensada (setas); (F) Células dendríticas (seta); (G) anéis policíclicos hiper-refrativos na JDE (lentigo solar); (H) Colágeno grosso, com fibras com menor brilho, formando uma rede desorganizada (I) Colágeno encolhido, amorfo; (J) Elastose solar; (K) infiltrado inflamatório na derme superficial. (Escala = 50  $\mu$ m).

### 6.2.3. Avaliação de eficácia clínica de formulações dermocosméticas

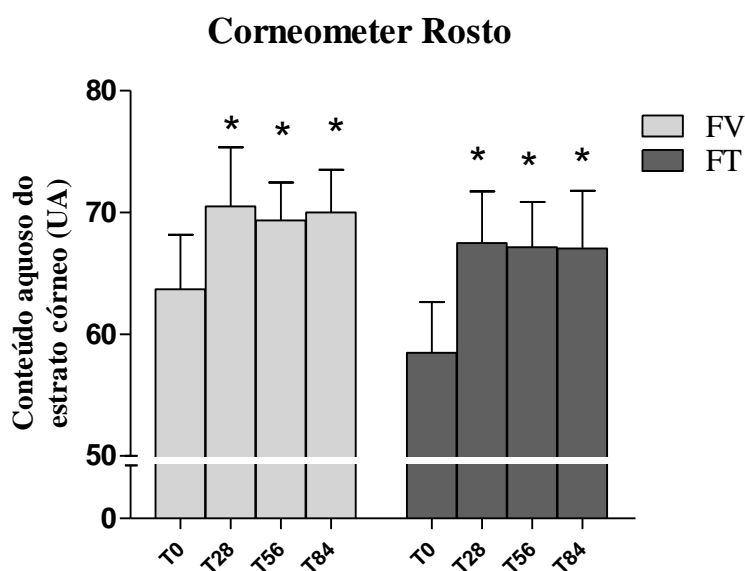
Dentre as 48 voluntárias que foram recrutadas e iniciaram o estudo para a avaliação de eficácia clínica, 38 voluntárias terminaram o estudo. O número de voluntárias que encerraram o estudo para cada tratamento está descrito na Tabela 24.

**Tabela 24-** Número de voluntárias que completaram os estudos para cada tratamento.

Região	Rosto		Antebraço volar, antebraço dorsal e dorso das mãos				
	FV	FT	Controle	FV	FA	FE	FT
Número de voluntárias	18	20	12	20	11	13	20

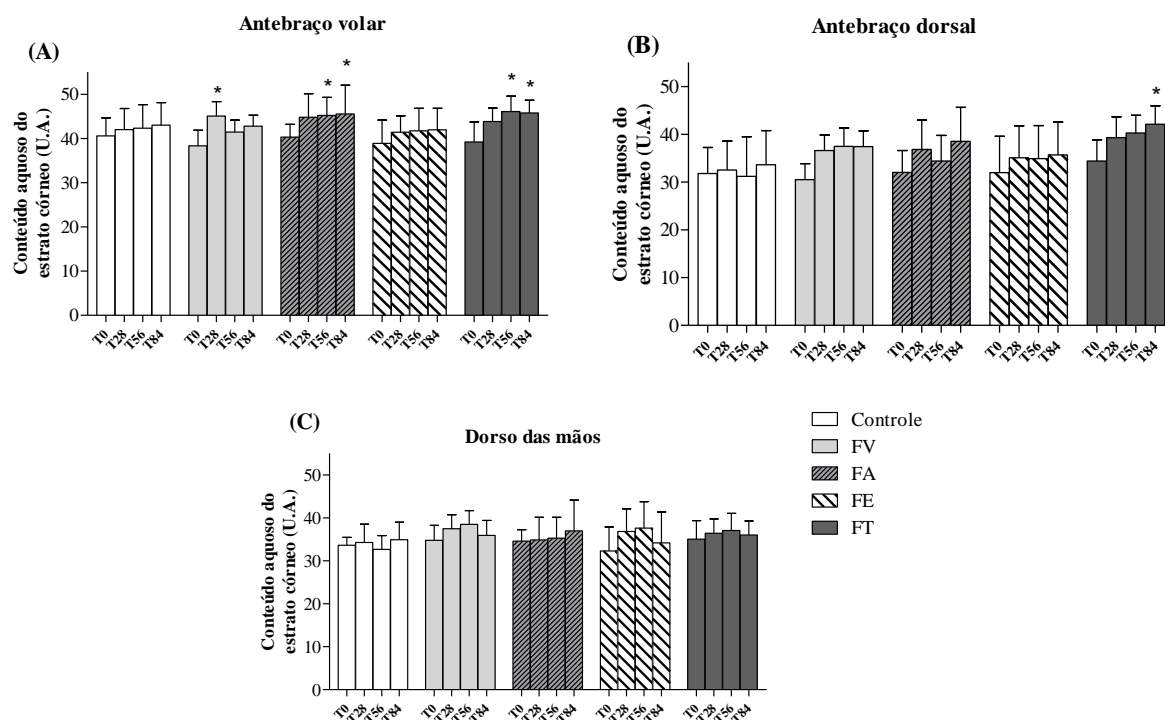
#### 6.2.3.1. Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo

A aplicação das formulações FV e FT proporcionou um aumento significativo no conteúdo aquoso do estrato córneo na face das voluntárias após 28 dias de aplicação. Os efeitos foram mantidos durante o período de 84 dias (Figura 89).



**Figura 89**– Conteúdo aquoso do estrato córneo antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face das voluntárias (média, IC 95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Todas as formulações aumentaram o conteúdo aquoso do estrato córneo quando aplicadas no antebraço volar e no antebraço dorsal das voluntárias. No entanto, apenas as formulações FV, FA e FT apresentaram resultados significativos no antebraço volar e apenas a formulação FT proporcionou um aumento significativo no antebraço dorsal. As formulações estudadas não apresentaram efeito significativo no dorso das mãos (Figura 90).

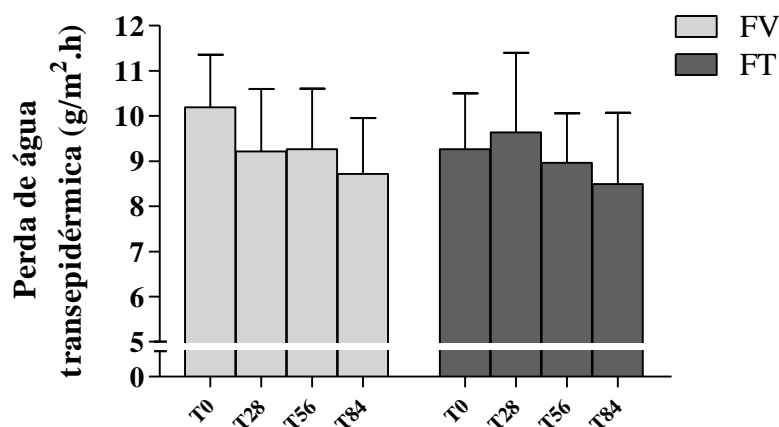


**Figura 90**– Conteúdo aquoso do estrato córneo antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ )

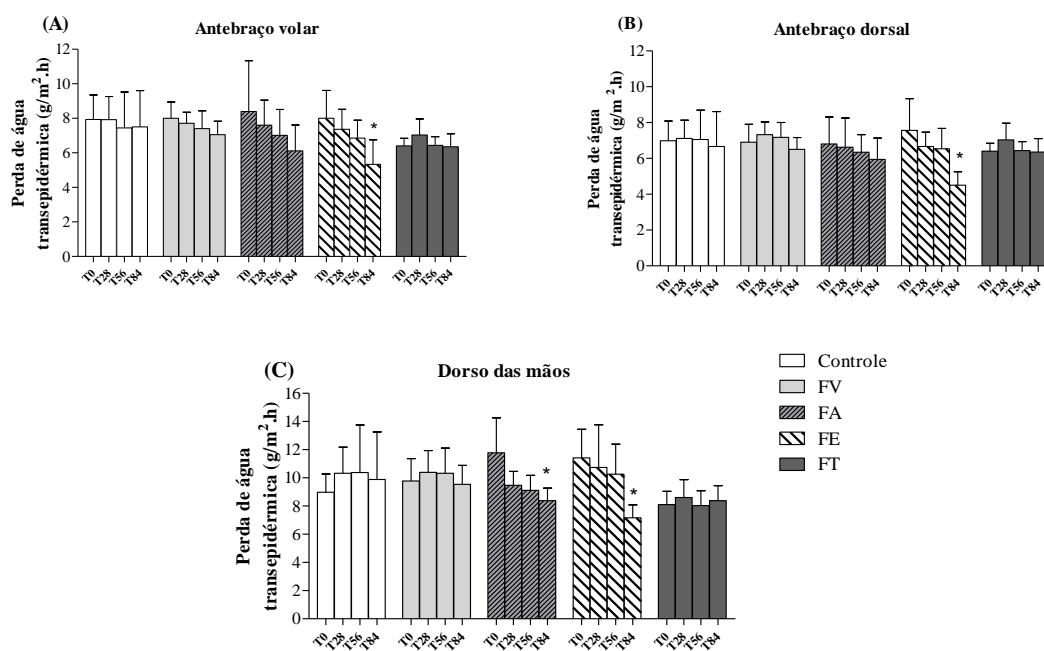
### 6.2.3.2. Perda de água transepidermica

As formulações FV e FT apresentaram uma redução na perda de água transepidermica quando aplicadas na face, no entanto, o efeito não foi significativo (Figura 91).

As formulações FA e FE apresentaram redução da perda transepidermica nos antebraços e no dorso das mãos. No entanto, o resultado foi apenas significativo em todas as regiões para a formulação FE devido à variação interindividual (Figura 92).



**Figura 91**– Perda de água transepidermica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%).

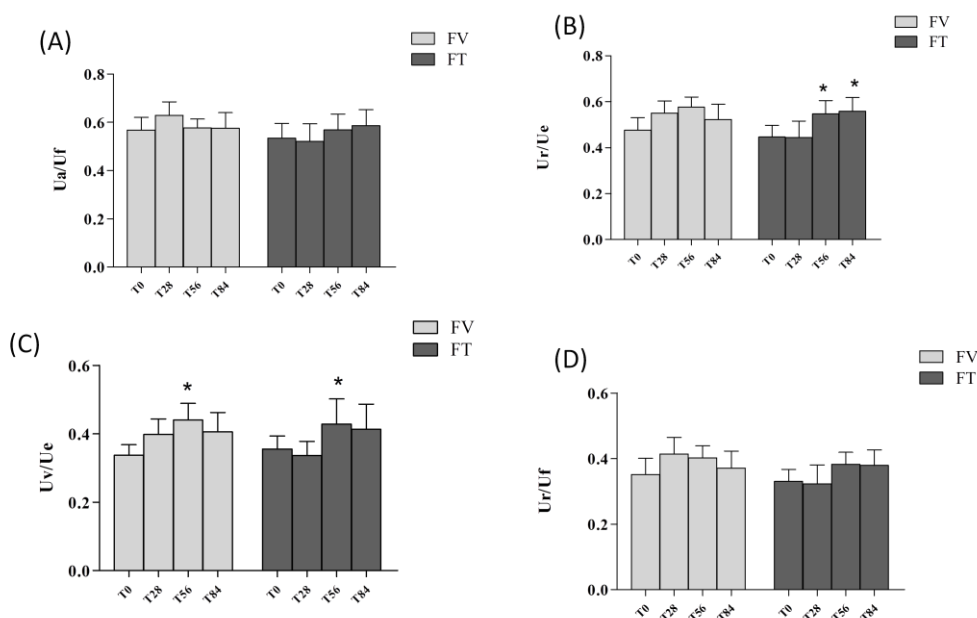


**Figura 92**– Perda de água transepidermica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (T0).

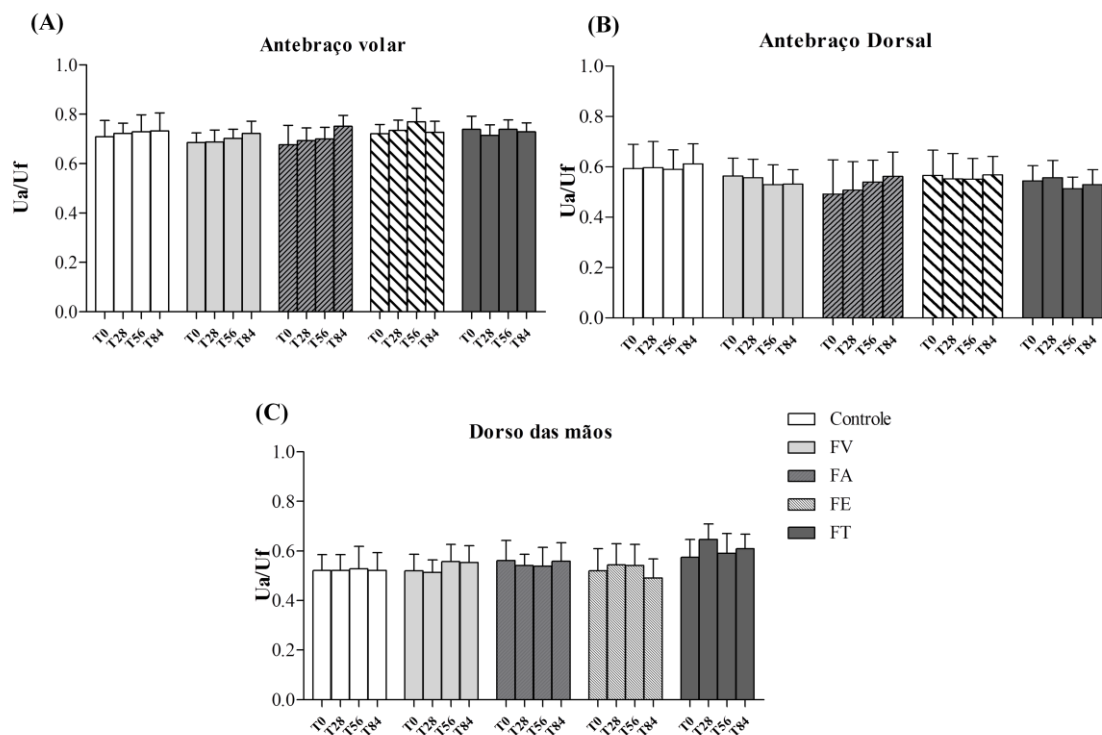
### 6.2.3.3. Viscoelasticidade da pele

A formulação FT proporcionou uma melhoria da elasticidade líquida da pele após 56 dias de aplicação. As formulações FV e FT levaram ao aumento do componente viscoso da pele após 56 dias de aplicação (Figura 93).

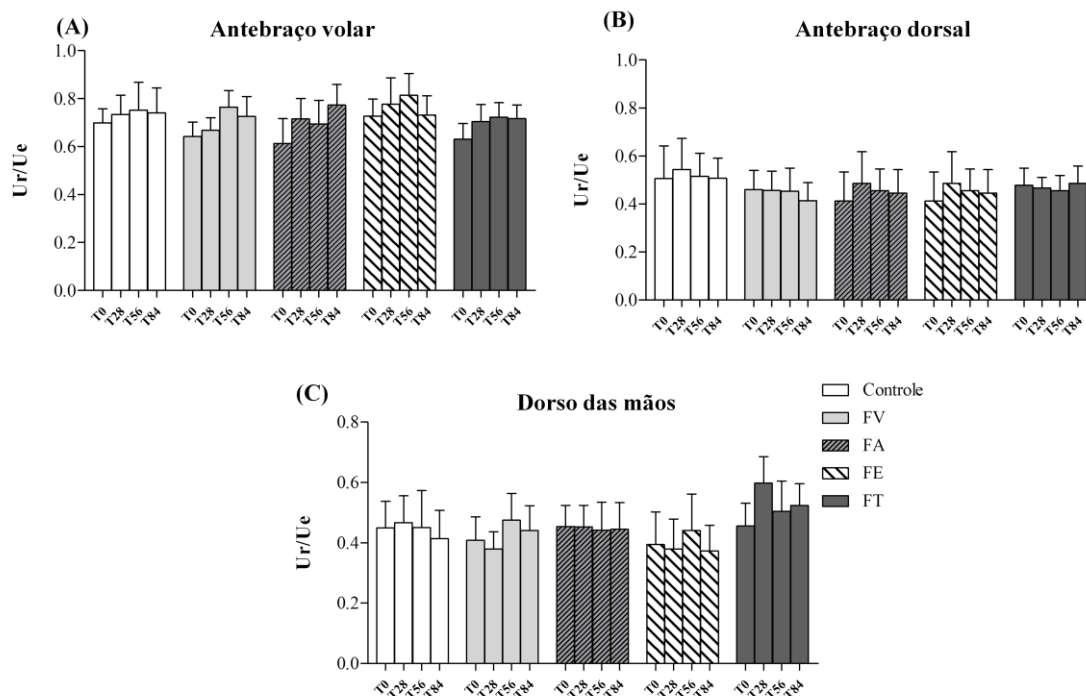
As formulações estudadas não apresentaram efeitos significativos na elasticidade líquida, elasticidade biológica e elasticidade bruta nos antebraços e no dorso das mãos (Figura 94 a 97). Por outro lado, as formulações FV, FA e FE levaram ao aumento da porção viscoelástica da curva ( $Uv/Ue$ ) no antebraço volar e a formulação FA aumentou este parâmetro no antebraço dorsal (Figura 97).



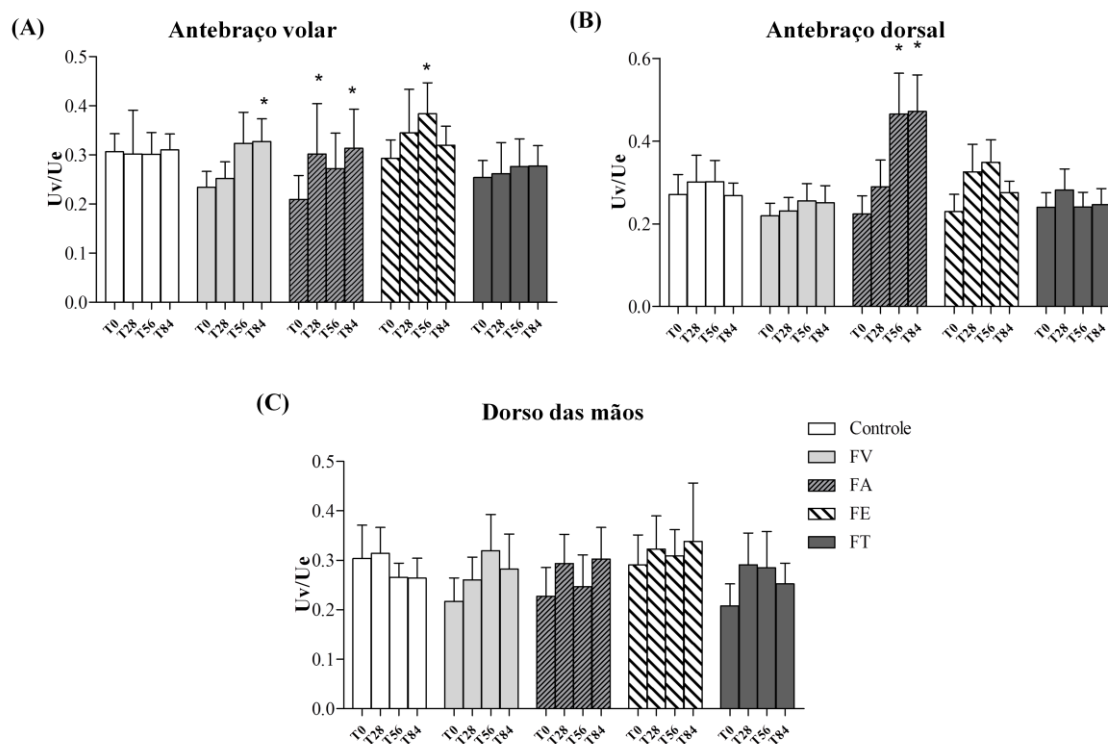
**Figura 93-**  $R2 = Ua / Uf$  elasticidade bruta (A) ;  $R5 = Ur / Ue =$  elasticidade líquida (B),  $R6 = Uv/Ue =$  porção viscoelástica da curva (C) e  $R7 Ur/Uf$  (Elasticidade biológica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de Tocoretinate) na face (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



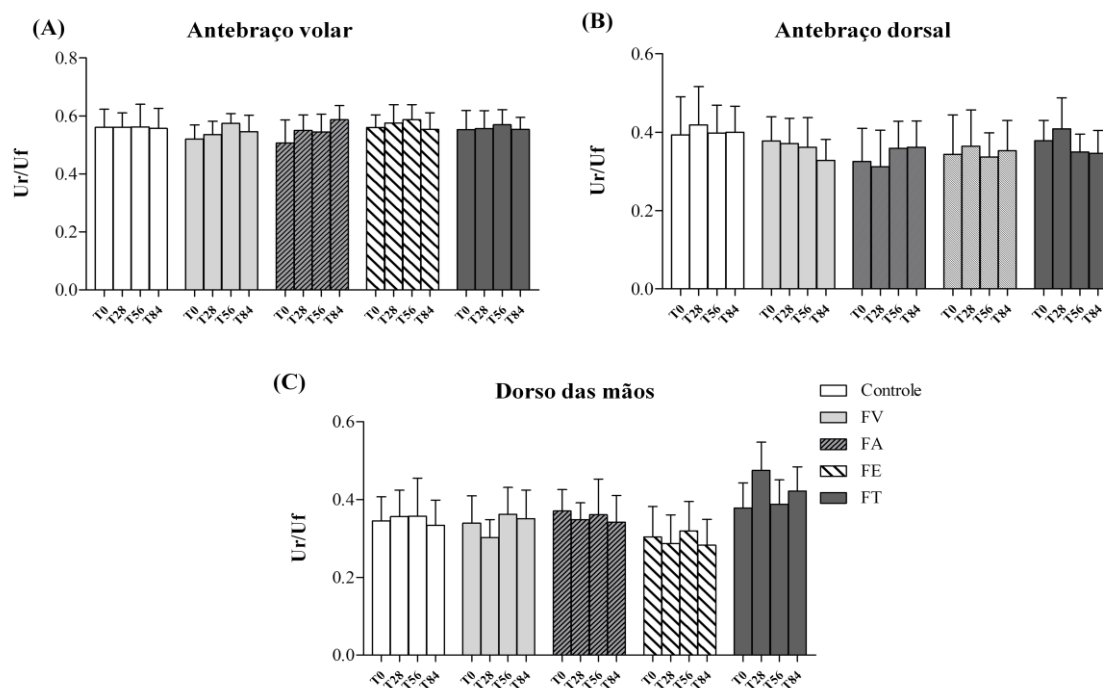
**Figura 94-**  $R_2 = U_a / U_f$  elasticidade bruta antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC).



**Figura 95-**  $R_5 = U_r / U_e =$  elasticidade líquida (B) antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC).



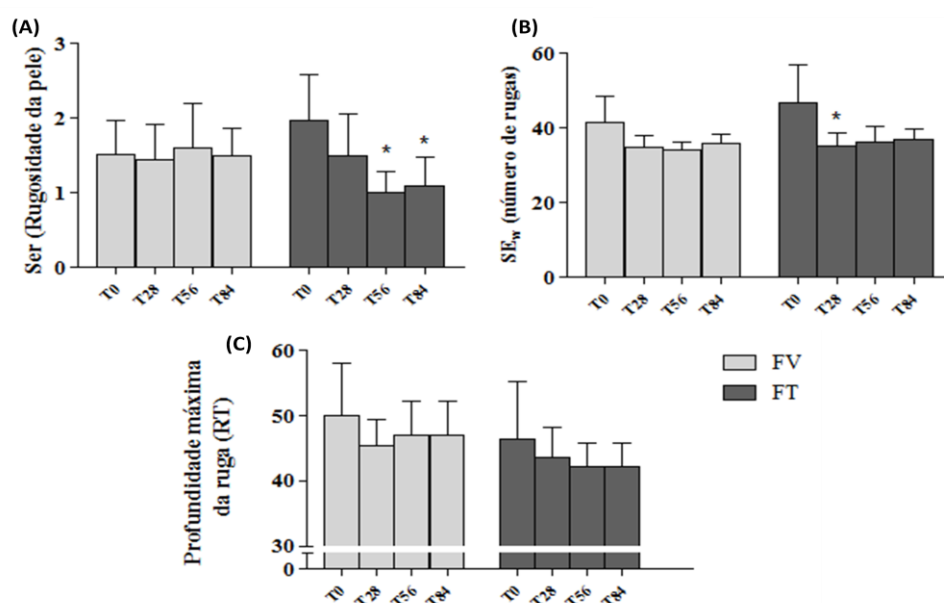
**Figura 96-**  $R6 = Uv/Ue$  = porção viscoelástica da curva antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Figura 97-**  $R7 = Ur/Uf$  (Elasticidade biológica antes (T0), e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A), no antebraço braço dorsal (B) e no dorso das mãos (C) (média, 95% IC).

### 6.2.3.4. Microrrelevo Cutâneo

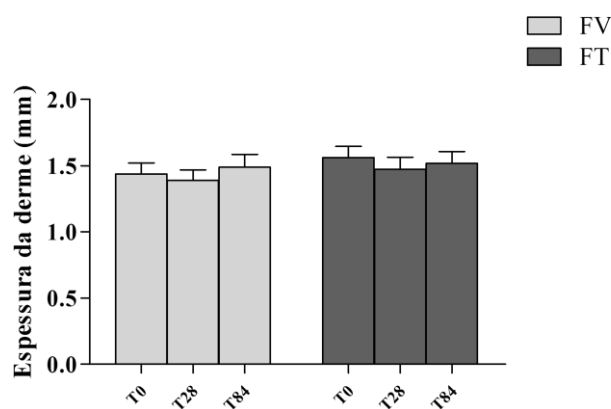
A formulação FT proporcionou uma redução significativa número de rugas e na rugosidade da pele após 28 e 56 dias, respectivamente (Figura 98).



**Figura 98-** Rugosidade da pele (A), número de rugas (B) e profundidade máxima da ruga (C) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

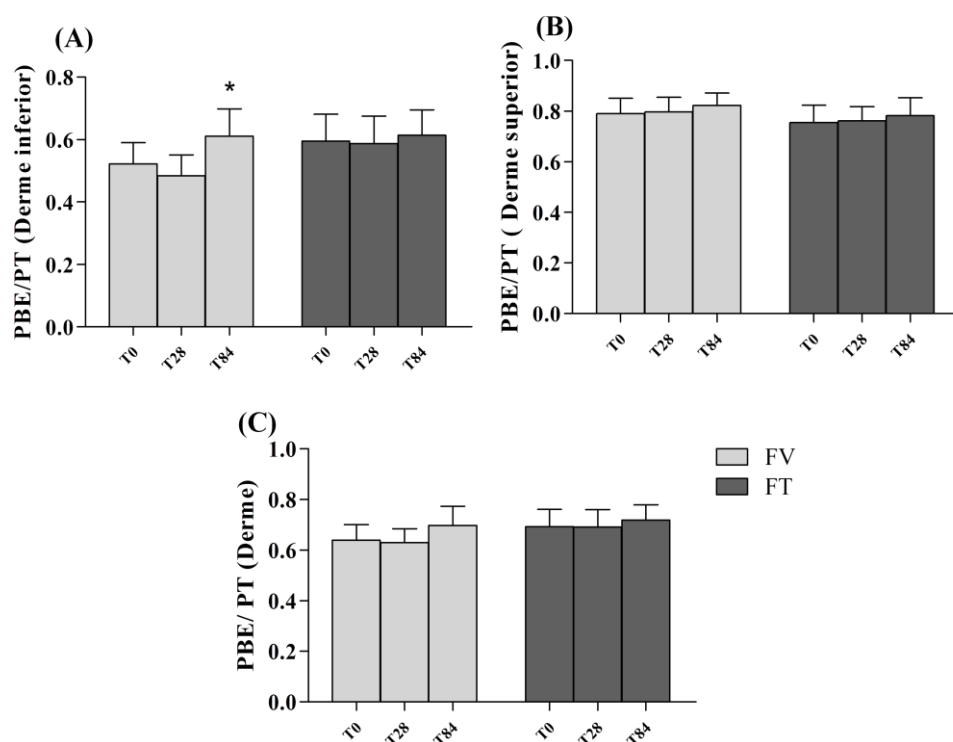
### 6.2.3.5. Espessura e ecogenicidade da derme

Não foram observadas alterações significativas na espessura da derme após a aplicação das formulações FV e FT (Figura 99). A formulação veículo apresentou redução da ecogenicidade na derme inferior após 84 dias (Figura 100).



**Figura 99-** Espessura da derme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%).





**Figura 100** - Relação de pixels de baixa ecogenicidade (PBE) em relação ao número total de pixels (PT) na derme inferior (A), na derme superior (B) e na derme total, antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.3.6. Características estruturais e morfológicas da epiderme

#### 6.2.3.6.1. Estudo de reprodutibilidade

No estudo da reprodutibilidade de reposicionamento, os parâmetros “espessura do estrato córneo, espessura da camada granulosa, profundidade das papilas dérmicas e máxima espessura da epiderme” apresentaram valores de CCI acima de 0,70, mostrando a alta reprodutibilidade da técnica para estas medidas (Tabela 25).

No estudo em longo prazo, foram realizadas triplicatas e o coeficiente de correlação linear da média das triplicatas foi calculado. Em todos os parâmetros, observa-se que a média das medidas no tempo inicial e após 84 dias do grupo de voluntárias são muito parecidas para todos os parâmetros, mostrando que não houve diferenças significativas entre os dois tempos. Os coeficientes de correlação intraclassa foram maiores que 0,70 para os parâmetros “espessura do estrato córneo, espessura da camada granulosa, profundidade das papilas

dérmicas, mínima espessura da epiderme e máxima espessura da epiderme” e podem ser considerados como reproduzíveis (Tabela 26).

**Tabela 25** - Média, desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV) coeficientes de correlação intraclasse (CCI com intervalo de confiança de 95%) para a reprodutibilidade intra-observador dos parâmetros obtidos in vivo em triplicata por microscopia confocal de reflectância no tempo inicial (T0) e após 84 dias (T84).

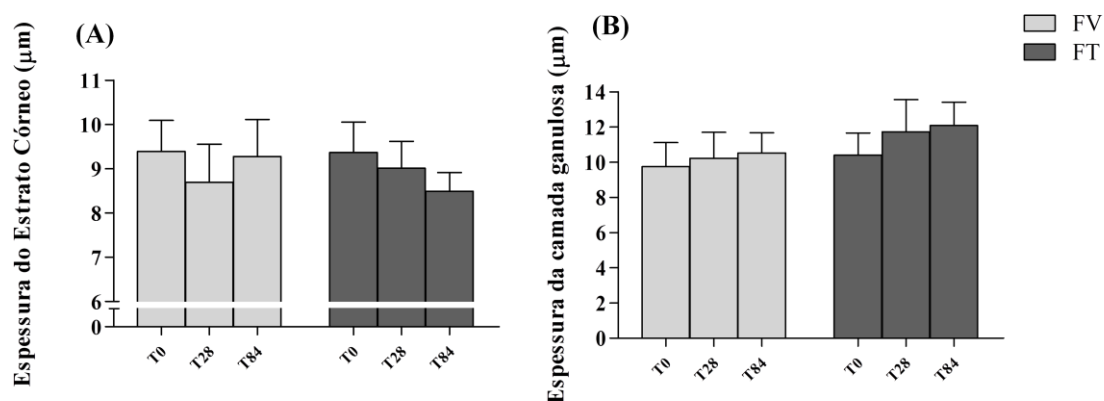
		<i>Média(D.P.)</i>	<i>C.V. (%)</i>	<i>CCI</i>	95% Intervalo de Confiança
Espessura do estrato córneo ( $\mu\text{m}$ ),	T0	10,11 (1,23)	12,12	0,74	0,3350 to 0,9172
	T84	10,20 (0,86)	8,41	0,73	0,2983 to 0,9163
Espessura da camada granulosa ( $\mu\text{m}$ ),	T0	11,04 (3,16)	28,65	0,77	0,3798 to 0,9277
	T84	10,72 (1,96)	18,33	0,65	0,1665 to 0,8888
Profundidade da papila dérmica ( $\mu\text{m}$ ),	T0	30,56 (7,43)	24,33	0,94	0,8371 to 0,9806
	T84	30,40(6,31)	20,78	0,96	0,8855 to 0,9860
Mínima espessura da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	T0	16,17(3,69)	22,79	0,6737	0,1281 to 0,8984
	T84	15,62 (2,13)	13,62	0,539	-0,2346 to 0,8567
Máxima espessura da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	T0	46,74(4,81)	10,29	0,7696	0,4034 to 0,9274
	T84	46,01(5,9)	12,83	0,7167	0,2883 to 0,9061
Espessura da epiderme viável ( $\mu\text{m}$ )	T0	32,00(3,19)	9,98	0,60	-0,05915 to 0,8742
	T84	31,05(3,18)	10,25	0,55	-0,2187 to 0,8624
Espessura total da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	T0	42,11(2,87)	6,82	0,6291	0,1698 to 0,8151
	T84	41,25(2,81)	6,82	0,7261	0,2598 to 0,9151

**Tabela 26-** Coeficientes de correlação intraclasse (CCI com intervalo de confiança de 95%) para a reprodutibilidade de tempo dos parâmetros obtidos por análise de imagem in vivo de microscopia confocal de reflectância no tempo inicial (T0) e depois de 84 dias (T84),

	<i>CCI ( intra-observador – Média da triplicata )</i>	95% Intervalo de confiança
Espessura do estrato córneo ( $\mu\text{m}$ ),	0,7214	-0,01845 to 0,9209
Espessura da camada granulosa ( $\mu\text{m}$ )	0,8231	0,3813 to 0,9492
Profundidade das papilas dérmicas ( $\mu\text{m}$ )	0,8771	0,5617 to 0,9649
Mínima espessura da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	0,8099	0,3527 to 0,9450
Máxima espessura da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	0,7835	0,2369 to 0,9379
Espessura da epiderme viável ( $\mu\text{m}$ )	0,6377	-0,2100 to 0,8945
Espessura total da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	0,4465	-0,9241 to 0,8407

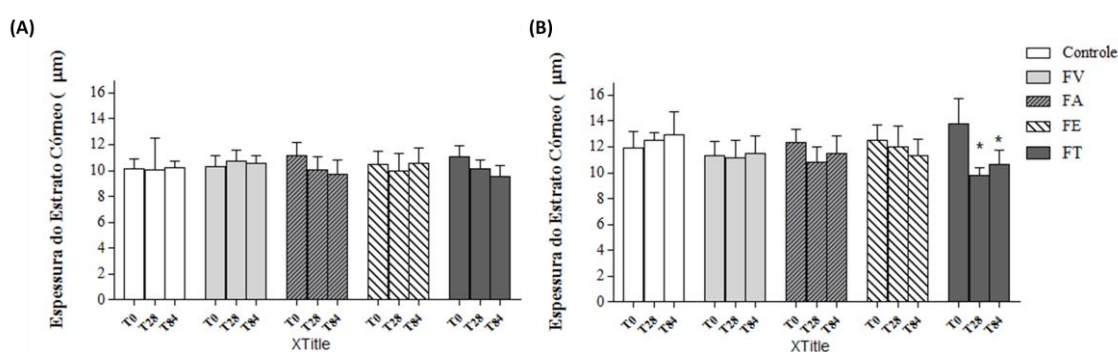
### 6.2.3.6.2. Eficácia Clínica

A formulação FT causou uma redução na espessura do estrato córneo e aumento da espessura da camada granulosa após 84 dias de aplicação na face. No entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 101).

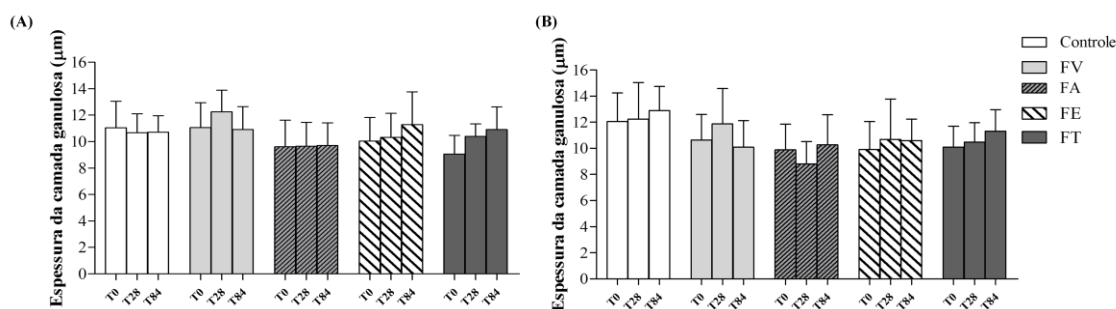


**Figura 101**– Espessura do estrato córneo (A) e espessura da camada granulosa (B) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%).

A formulação FT reduziu significativamente a espessura do estrato córneo no antebraço volar. As outras formulações estudadas não apresentaram alterações significativas na espessura do estrato córneo e da camada granulosa (Figura 102 e 103).

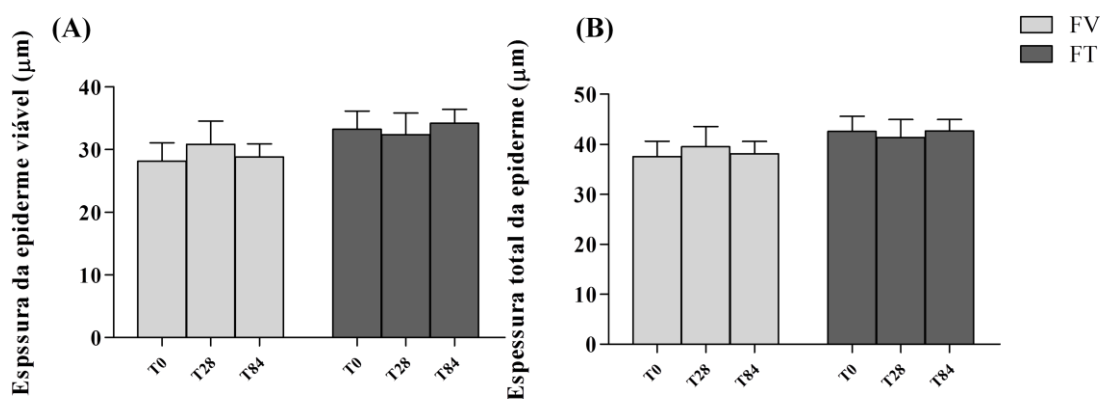


**Figura 102** - Espessura do estrato córneo antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço braço dorsal (B) (média, 95% IC). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

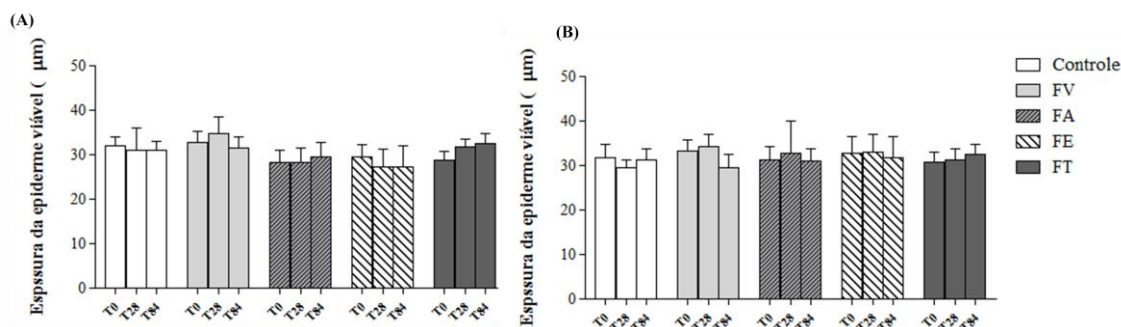


**Figura 103-** Espessura da camada granulosa antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço braço dorsal (B) (média, 95% IC).

Não foram observadas alterações significativas na espessura da epiderme viável e espessura total da epiderme após a aplicação das formulações objeto de estudo (Figura 104 a 105).

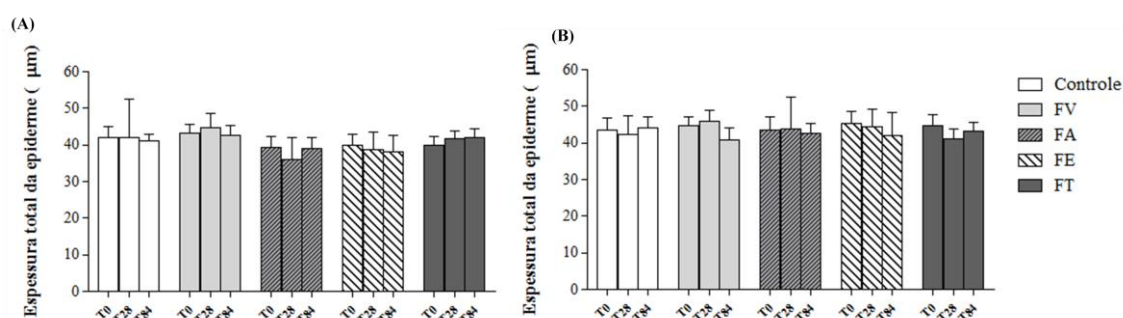


**Figura 104-** Espessura da epiderme viável (A) e espessura total da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%).



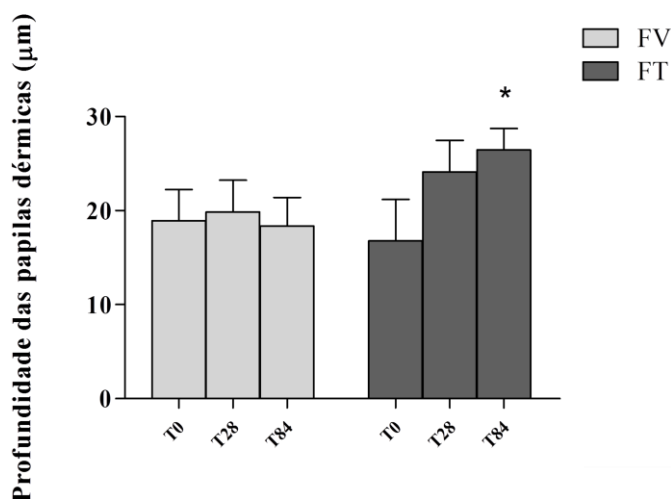
**Figura 105-** Espessura da epiderme viável antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5%

de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC).

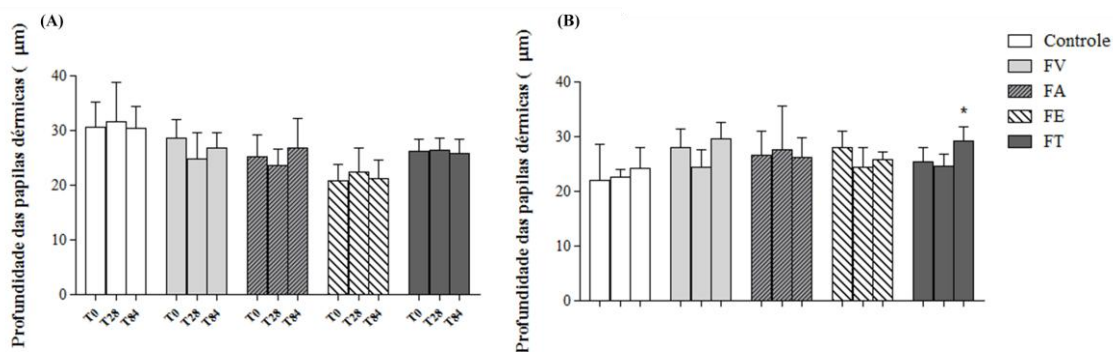


**Figura 106-** Espessura total da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço braço dorsal (B) (média, 95% IC).

A formulação FT proporcionou um aumento da profundidade das papilas dérmicas após 84 dias de aplicação da formulação na face e no antebraço dorsal. As formulações FV, FA e FE não apresentaram efeitos significativos neste parâmetro (Figura 107 a 109).

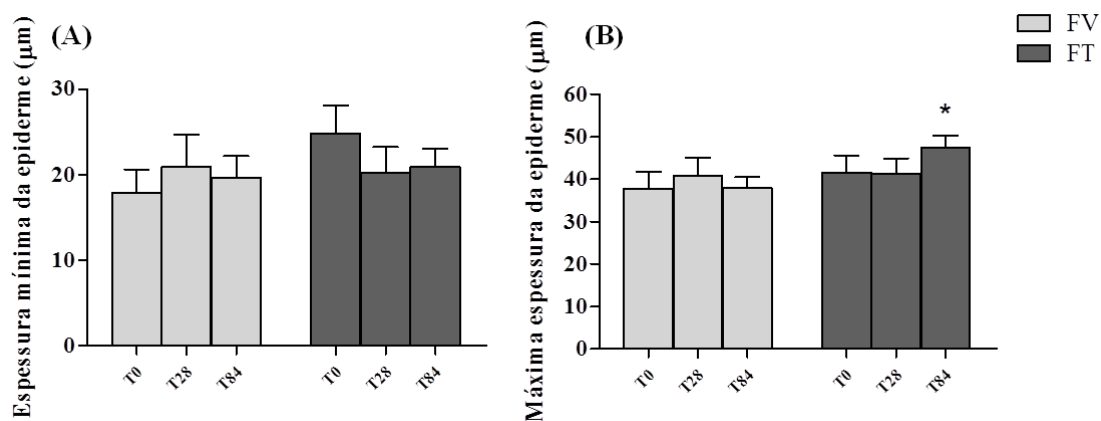


**Figura 107–** Profundidade das papilas dérmicas antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

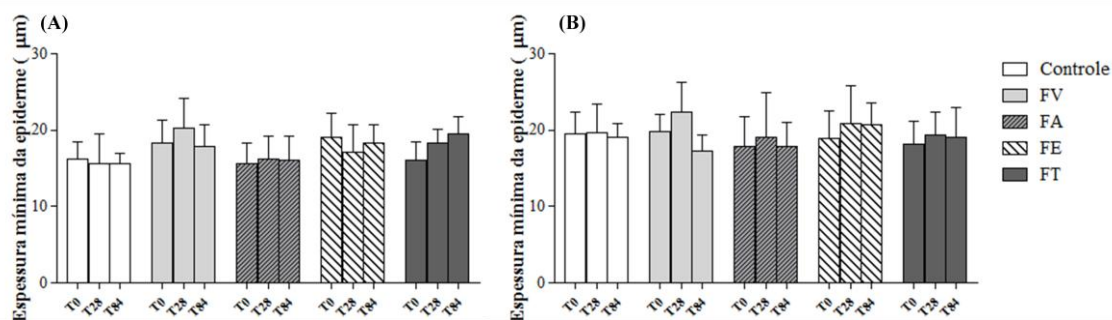


**Figura 108** - Profundidade das papilas dérmicas antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

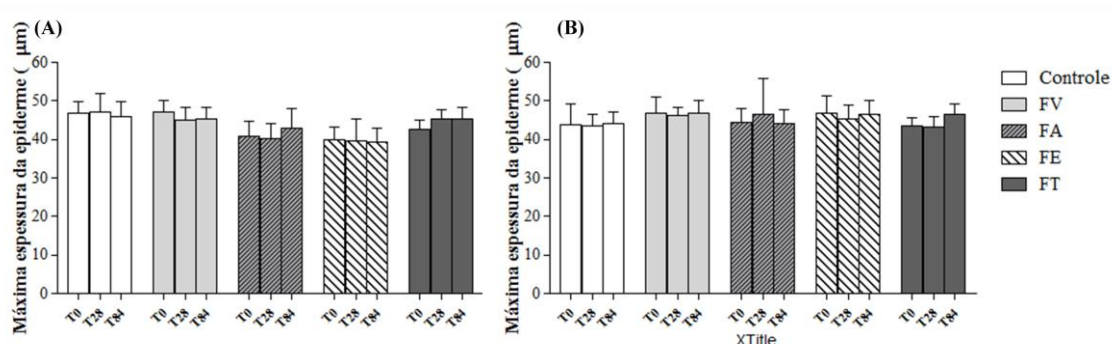
A aplicação da formulação FT na face levou a um aumento significativo da espessura máxima da epiderme após 84 dias. Nos antebraços, as formulações não alteraram significativamente a espessura da epiderme (Figura 109 a 111).



**Figura 109**– Espessura mínima da epiderme (A) e Máxima espessura da epiderme (B) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

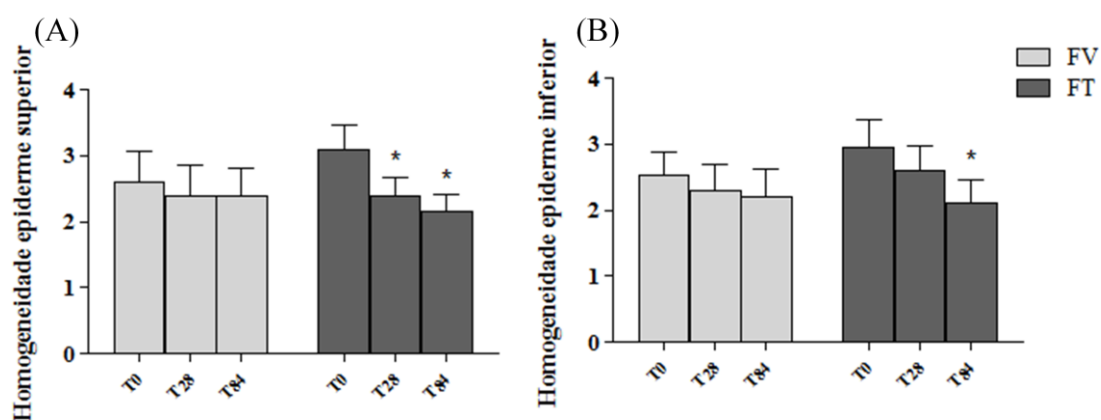


**Figura 110-** Espessura mínima da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC).



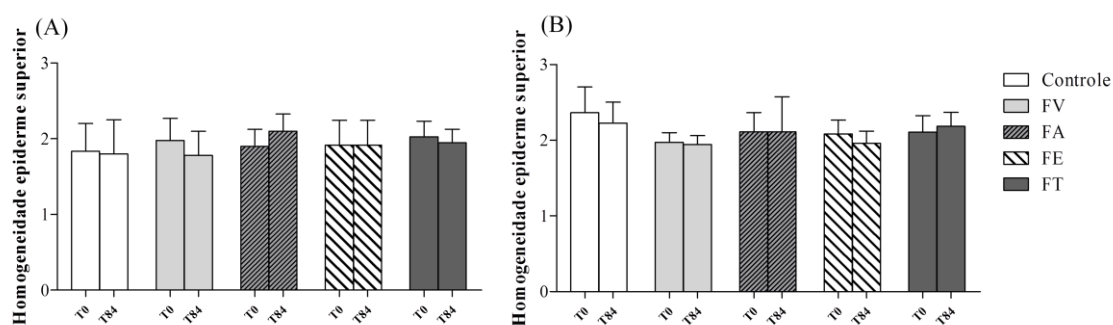
**Figura 111–** Máxima espessura da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC).

A formulação FT melhorou a homogeneidade da epiderme superior e inferior (Figura 112) após 84 dias de aplicação na face. Estes efeitos não foram observados com a aplicação da formulação FV.

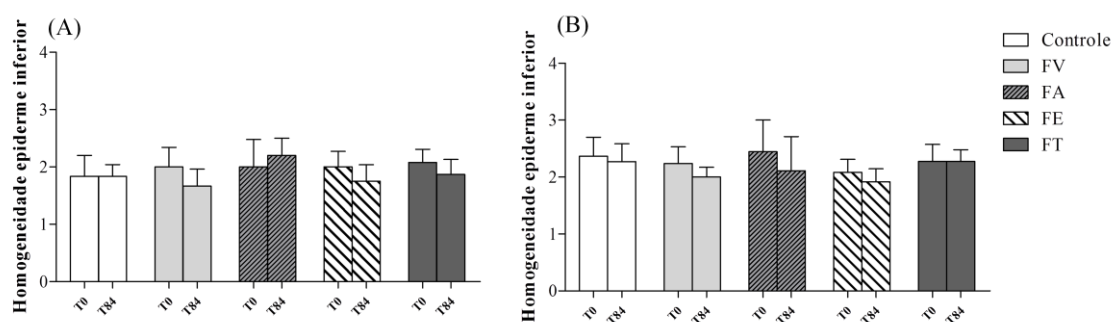


**Figura 112-** Homogeneidade da epiderme superior (A) e inferior (B) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face. Score: 1 = epiderme homogênea até 4 = desarranjo total do padrão da epiderme (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Nos antebraços, as formulações não apresentaram efeitos significativos na melhoria da homogeneidade da epiderme (Figura 113 e 114).



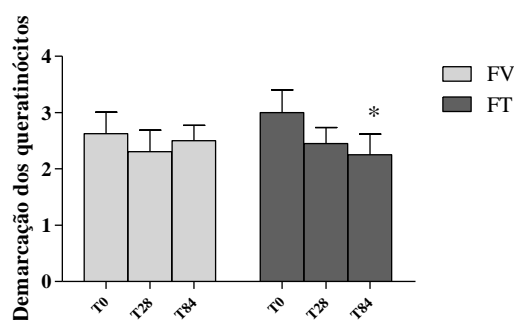
**Figura 113-** Homogeneidade da epiderme superior antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC).Score: 1 = epiderme homogênea até 4 = desarranjo total do padrão da epiderme (média, IC95%).



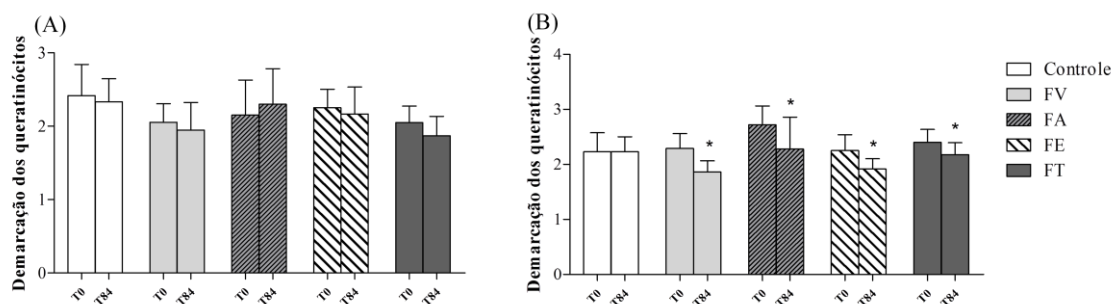
**Figura 114-** Homogeneidade da epiderme inferior antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC).Score: 1 = epiderme homogênea até 4 = desarranjo total do padrão da epiderme (média, IC95%).

A formulação FT levou a uma melhoria da demarcação dos queratinócitos após 84 dias de aplicação na face (Figura 115). As formulações FV, FA, FE e FT melhoraram a demarcação dos queratinócitos no antebraço volar (Figura 116).



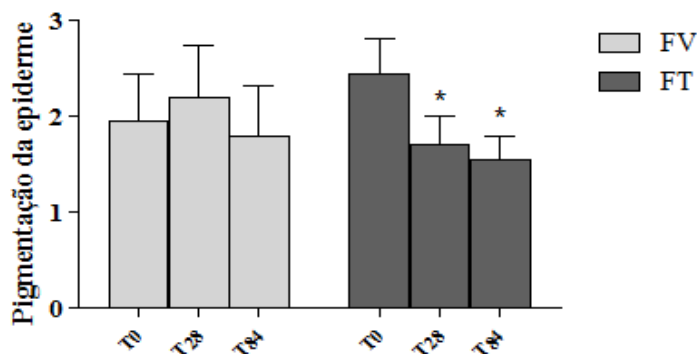


**Figura 115-** Demarcação dos queratinócitos antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face. Score: 1 = Muito bem demarcado até 4= perda total da demarcação (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

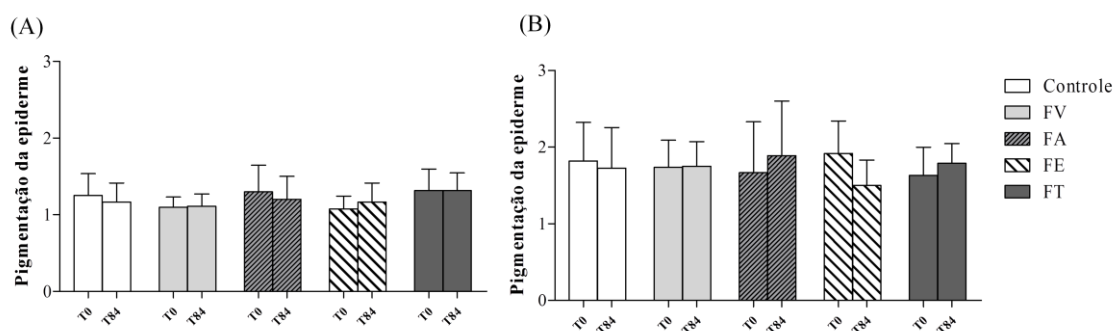


**Figura 116-** Demarcação dos queratinócitos antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score: 1 = Muito bem demarcado até 4= perda total da demarcação (média, IC95%).

A aplicação da formulação FT reduziu a pigmentação da epiderme na face (Figura 117). Não foram obtidos efeitos significativos das formulações na pigmentação da epiderme quando aplicadas nos antebraços (Figura 118).

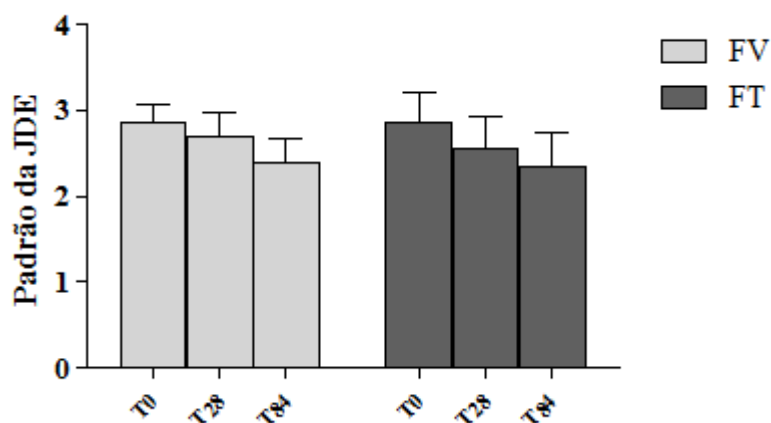


**Figura 117-** Pigmentação da epiderme antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face. Score: 1 = baixa pigmentação até 4= alta pigmentação (média, IC95%). \*Estatisticamente diferente dos valores basais (T0) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

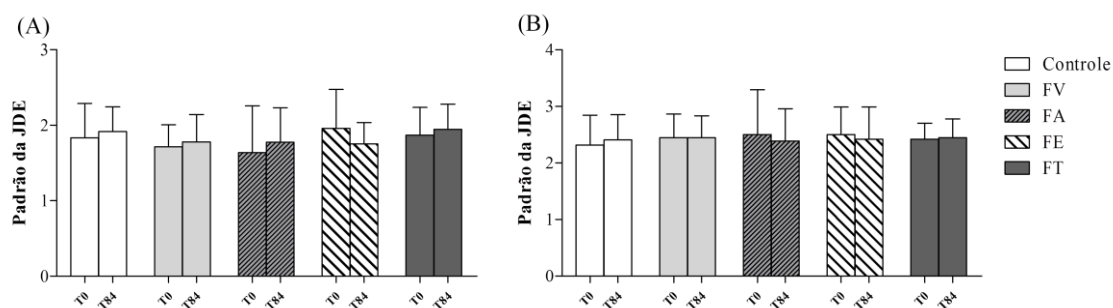


**Figura 118-** Pigmentação da epiderme antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score: 1 = baixa pigmentação até 4= alta pigmentação (média, IC95%).

Na face, as formulações apresentaram uma melhoria no padrão morfológico da JDE, no entanto, o efeito não foi significativo (Figura 119). As formulações aplicadas nos antebraços não apresentaram melhoria do padrão da JDE (Figura 120).

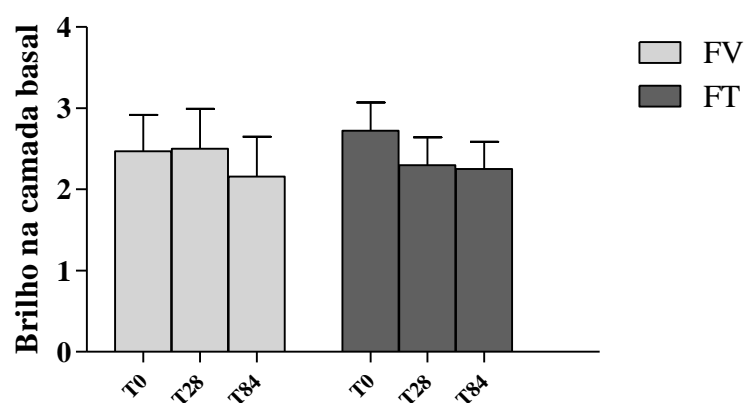


**Figura 119** – Padrão morfológico da junção dermoepidérmica (JDE) antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação da formulação FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). Score= 1 Anéis regulares, com contorno bem definidos até 4 = perda total da JDE.

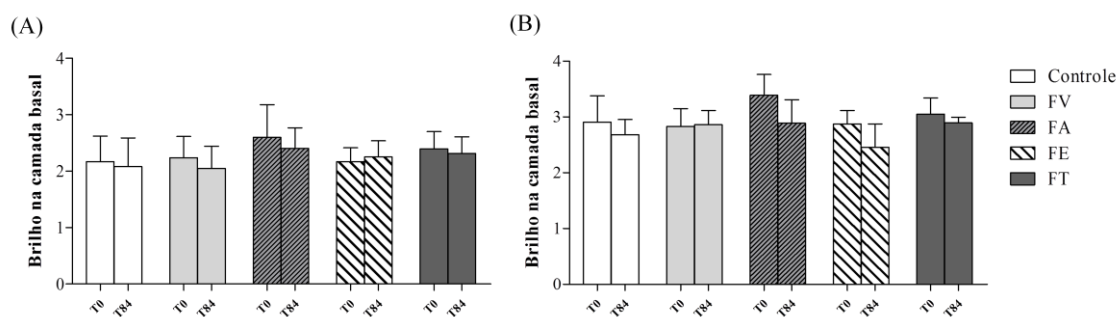


**Figura 120-** Padrão morfológico da junção dermoepidérmica (JDE) antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score= 1 Anéis regulares, com contorno bem definidos até 4 = perda total da JDE.

As formulações FA, FE e FT proporcionaram uma redução no brilho da camada basal, no entanto, este efeito não foi significativo (Figura 121e Figura 122).

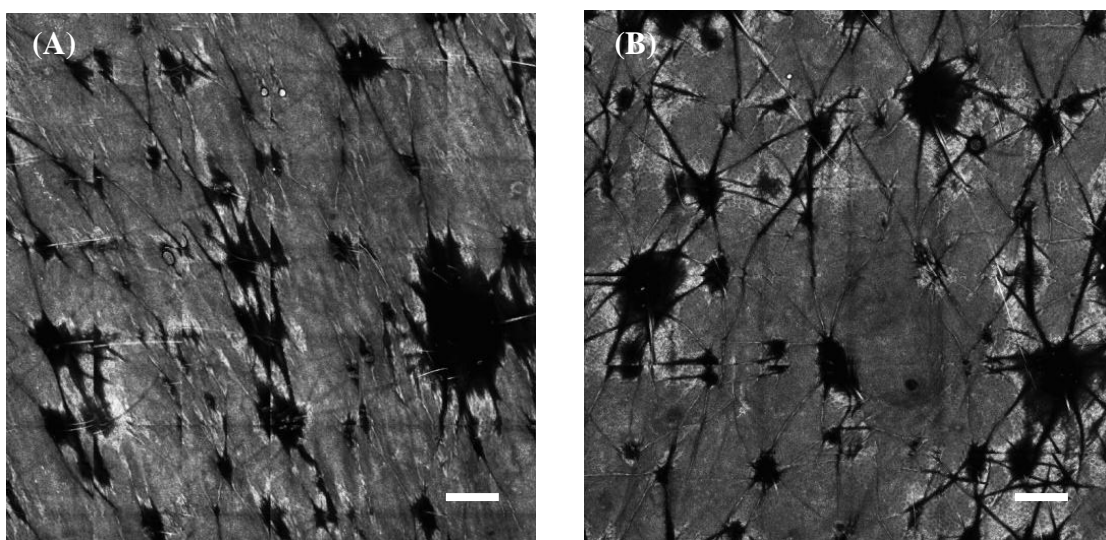


**Figura 121-** Brilho na camada basal antes (T0), e após 28 e 84 dias de aplicação das formulações FV e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) na face (média, IC95%). Score= 1 Baixo brilho até 4 = alto brilho.

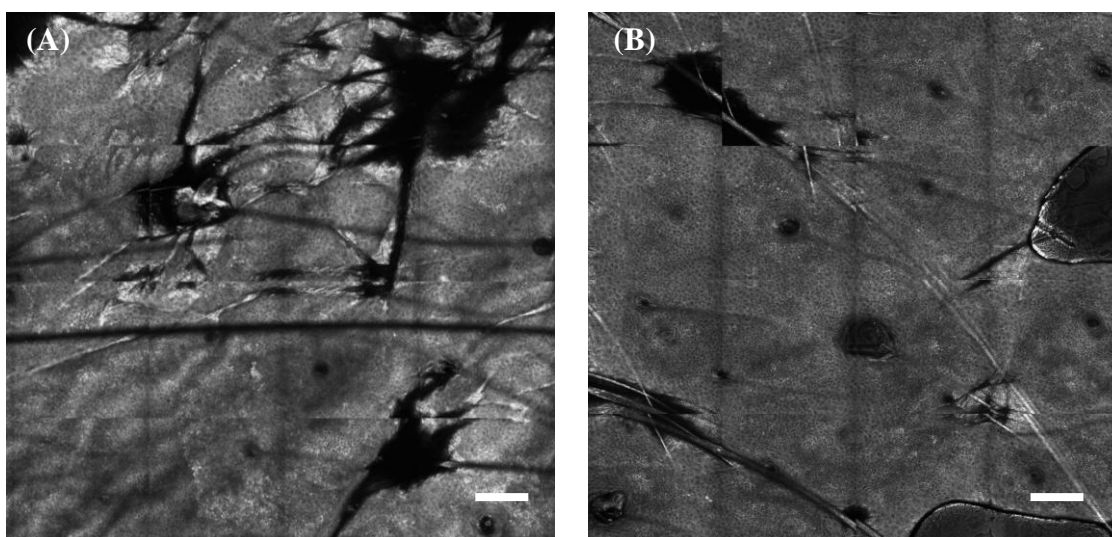


**Figura 122-** Brilho na camada basal antes (T0), e após 84 dias de aplicação das formulações FV (Veículo), FA (Veículo+ 0,5% de Palmitato de Retinila), FE (Veículo + 5% de Acetato de Tocoferila) e FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*) no antebraço volar (A) e no antebraço dorsal (B) (média, 95% IC). Score= 1 Baixo brilho até 4 = alto brilho.

A aplicação da formulação contendo *Tocoretinate* (FT) apresentou efeitos na estrutura e morfologia da pele, que demonstram a sua eficácia na melhoria da pele fotoenvelhecida. As imagens obtidas pela microscopia confocal de reflectância a laser permitem a visualização dos efeitos da melhoria da formulação antes e após o tratamento com FT (Figura 123 e 124).



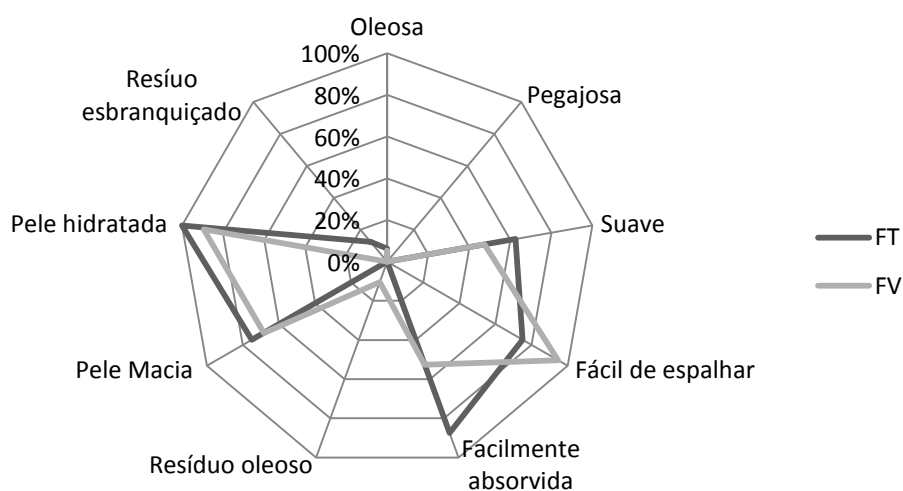
**Figura 123-** Imagens de microscopia confocal de reflectância a laser antes (A) e após 84 dias (B) de aplicação da formulação FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*). Observa-se maior homogeneidade da superfície cutânea, com melhoria da topografia em padrão romboidal, bem como a melhoria da homogeneidade da epiderme, com queratinócitos com tamanho e formato mais uniformes (Escala = 300 $\mu$ m).



**Figura 124** - Imagens de microscopia confocal de reflectância a laser antes (A) e após 84 dias (B) de aplicação da formulação FT (Veículo + 0,1% de *Tocoretinate*). Observa-se maior homogeneidade, com redução da hiperpigmentação da epiderme (Escala: 200 $\mu$ m).

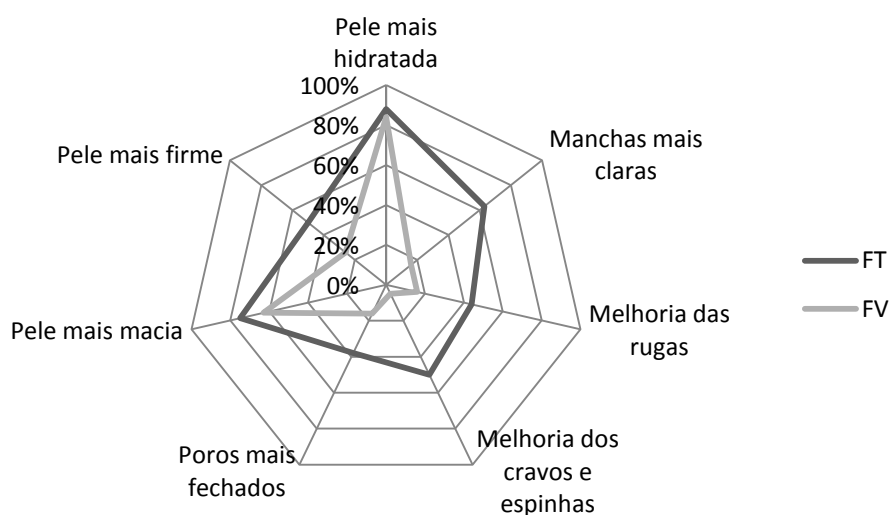
#### 6.2.3.7. Análise sensorial e percepção de eficácia

As formulações FV e FT foram bem avaliadas na avaliação sensorial e não apresentaram diferenças nos parâmetros estudados. As formulações não apresentaram propriedades indesejadas de oleosidade, pegajosidade e resíduo oleoso. Além disso, foram muito bem avaliadas, e receberam atribuições de suavidade, fácil de espalhar, facilmente absorvida, pele hidratada e pele macia pela grande maioria das voluntárias (Figura 125).



**Figura 125**- Avaliação sensorial das formulações FV e FT

No estudo de percepção de eficácia, em torno de 90% das voluntárias sentiram a pele mais hidratada após aplicação de FV e FT. Em geral, a formulação FT apresentou resultados superiores em relação à FV. Os principais efeitos percebidos pelas voluntárias após aplicação de FT foram: pele mais macia, manchas mais claras, melhoria de cravos e espinhas, melhoria de rugas e pele mais firme.



**Figura 126-** Percepção de eficácia das formulações FV e FT

Em síntese, a formulação FT apresentou efeitos na hidratação, na elasticidade cutânea, além de melhorar a estrutura da epiderme e da junção dermoepidérmica. De acordo com a percepção das voluntárias, a formulação foi eficaz na melhoria da hidratação, maciez e melhoria de manchas na pele. Além de serem observadas melhoras nas rugas, firmeza e acne. Portanto, a formulação FT mostrou-se eficaz na melhoria das condições da pele fotoenvelhecida.

***7. DISCUSSÃO***

---

A Cosmetologia é uma ciência interdisciplinar, uma vez que envolve o estudo, interação e aplicação de diversas áreas do conhecimento para o desenvolvimento de produtos cosméticos estáveis, seguros e eficazes. Além do desenvolvimento tecnológico de formulações, o conhecimento da biologia da pele e o estudo da interação entre o produto dermocosmético e os sistemas biológicos permitem a elucidação dos mecanismos de ação destes, bem como a obtenção de produtos adequados à finalidade de uso.

O desenvolvimento de formulações para os cuidados da pele é um processo que envolve a pesquisa detalhada e a escolha criteriosa de matérias-primas. Nesta etapa, deve-se levar em consideração diversos fatores como o pH de estabilidade dos princípios ativos, além das características sensoriais, interações entre os ingredientes da formulação e a seleção de matérias-primas biocompatíveis de acordo com o tipo de pele. Deste modo, nesta etapa avaliam-se os benefícios que tais matérias-primas podem acrescentar ao produto final.

Assim, considerando a importância da pesquisa e do conhecimento das propriedades das matérias-primas em relação aos efeitos que estas podem proporcionar à formulação cosmética, a técnica estatística de metodologia de superfície de resposta (MSR) mostrou-se de grande aplicabilidade no protocolo de estudo aplicado. Com esta ferramenta, foi possível obter a relação matemática da resposta com variáveis por regressão múltipla, ou seja, foi possível a obtenção de uma equação que permite a previsão de resposta em função das variáveis estudadas. Além disso, a MSR permitiu a identificação dos efeitos dos fatores estudados de forma isolada, assim como a interação entre elas e suas respectivas contribuições quadráticas.

Poucos estudos foram encontrados na literatura utilizando o planejamento experimental na área de desenvolvimento de cosméticos. Recentemente, Berthele e colaboradores (2014) utilizaram o planejamento experimental para otimizar a eficácia antimicrobiana de formulações cosméticas. A composição ótima da mistura de co-emulsionantes também foi estudada utilizando o planejamento experimental com a análise dos parâmetros: comportamento reológico, teste de centrifugação, condutividade específica e mensuração do valor de pH (DJURIS et al., 2014).

Além disso, vários estudos utilizam o planejamento experimental para avaliação da liberação de substâncias ativas (BABY et al., 2009) e para produzir sistemas de liberação mais eficientes para a área cosmética e dermatológica como a produção de lipossomas (PADAMWAR; POKHARKAR, 2006), nanopartículas (JUNG et al., 2013), nanoemulsões (GUTIÉRREZ et al., 2008), dentre outros.



Na primeira etapa do desenvolvimento utilizando a metodologia de superfície de resposta, foram avaliados os efeitos das matérias-primas no comportamento reológico e no tamanho de partícula das formulações.

O estudo do comportamento reológico de uma formulação e do efeito das matérias primas nesta propriedade é de grande importância para a escolha da embalagem adequada, nos processos de fabricação, que envolvem agitação e transferência, bem como em situações de transporte e armazenamento. Além disso, a performance e aceitação de muitos produtos dermatocósméticos podem estar relacionados com o comportamento reológico do mesmo (GIANETI et al., 2012; JIAO; BURGESS, 2003).

O aumento da concentração da cera autoemulsionante e do polímero provocaram alterações no comportamento reológico das formulações: aumento do Índice de Consistência, do Índice de Fluxo, da Área de Histerese, da Viscosidade Aparente Mínima. Diversos estudos relatam que o aumento da concentração de agentes de consistência e aditivos reológicos poliméricos influenciou parâmetros reológicos das formulações (BABY et al., 2008; CORRÊA et al., 2005; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003b). No entanto, no presente estudo, foi possível avaliar a dimensão deste efeito em uma faixa de concentração, bem como a interação sinérgica, ou não dos componentes da formulação.

O aumento da concentração de cera autoemulsionante levou a um aumento significativo do tamanho de partícula, este efeito pode estar relacionado com o aumento da concentração de substâncias presente na fase interna da emulsão (fase oleosa) (SEPULVEDA; KILDSIG; GHALY, 2003).

Por outro lado, o aumento da concentração do polímero levou à redução do tamanho de partícula. O polímero cruzado de alquil acrilato C10-30 é um emulsificante polimérico de ácido poliacrílico predominantemente de alto peso molecular. Suas moléculas possuem uma pequena porção lipofílica e uma grande porção com afinidade hidrofílica. Esta configuração espacial diferenciada permite que, além de ser um agente polimérico doador de viscosidade, o mesmo atue também como um emulsificante primário em emulsões do tipo óleo em água, o que possibilita um aumento da densidade da rede polimérica com propriedades emulsionantes, e conseqüente redução do tamanho de partícula (BELSITO et al., 2011; TADROS, 2006).

Após a triagem e estudo das propriedades, três formulações foram selecionadas e submetidas aos testes de estabilidade. Todas as formulações desta etapa foram consideradas estáveis, pela determinação do pH e avaliação das características organolépticas, o que pode ser um indicativo de estabilidade destas formulações (KLEIN, 1999).

A estabilidade física de uma formulação cosmética pode ser avaliada pelo estudo do comportamento reológico em temperatura ambiente e sob alterações de temperatura. Tal avaliação consiste num conjunto de parâmetros que permitem ao pesquisador determinar qual a formulação cosmética é mais estável, uma vez que, em condições de *stress térmico*, é possível realizar uma predição da instabilidade da formulação. Nestas condições, parâmetros como viscosidade, solubilidade, coalescência, alteração dos agentes de consistência graxos e hidratação dos polímeros são alterados (GIANETI et al., 2012; JIAO; BURGESS, 2003).

As formulações com concentração de cera autoemulsionante acima de 2,8% (formulações F2 e F3) foram consideradas estáveis, sendo que a formulação contendo uma baixa concentração de cera autoemulsionante (1%) e concentração mais alta de polímero emulsionante (Formulação F1) não foi estável frente ao teste de estabilidade física. Esta apresentou redução de viscosidade aparente mínima e índice de consistência em temperaturas mais altas, indicando instabilidade física da mesma.

Desta forma, apesar das vantagens do polímero emulsionante em formulações dermocosméticas, o seu uso como emulsionante primário é limitado, o que evidencia a importância do balanço entre os emulsionantes da formulação, bem como a realização de estudos de estabilidade física.

Na segunda etapa do desenvolvimento, foram adicionadas substâncias adjuvantes com a finalidade de melhorar o desempenho da formulação. Alguns estudos evidenciam que a interação da lecitina de soja no estrato córneo (BENTLEY et al., 1997), poderia melhorar a deposição de substâncias ativas lipofílicas na pele. O phytantriol é uma substância utilizada em produtos cosméticos para a pele e para o cabelo. Este atua na retenção da hidratação cutânea e atua como um promotor de absorção permitindo maior penetração de substâncias lipofílicas e hidrofílicas em formulações cosméticas contendo esta matéria-prima (RICHERT; SCHRADER; SCHRADER, 2003).

Na segunda etapa do desenvolvimento, a inclusão de parâmetros sensoriais, bem como a avaliação da hidratação na etapa de triagem das formulações utilizando a ferramenta estatística proposta, foi possível avaliar uma maior gama de fatores e fornecer informações técnicas e sensoriais para a melhor definição das formulações que foram submetidas aos testes de estabilidade. Nas concentrações estudadas, o phytantriol e a lecitina apresentaram aumento do índice de consistência nas concentrações estudadas.

A lecitina foi a única matéria prima que apresentou aumento de hidratação nas concentrações estudadas, por outro lado, também impactou negativamente no sensorial, com o aumento da sensação de pegajosidade e oleosidade da pele. Na avaliação sensorial foi

possível observar a interação das matérias-primas e a influência destas nos parâmetros estudados. O phytantriol isolado apresentou um aumento significativo na sensação de pegajosidade, no entanto, quando associado à lecitina, houve interação com redução da pegajosidade. Além disso, o emoliente triglicérides de ácido cáprico e caprílico proporcionou uma redução da pegajosidade.

Considerando que durante a etapa de Pesquisa & Desenvolvimento de produtos cosméticos, diversos aspectos devem ser considerados, para obter a formulação com as características desejadas, os resultados deste estudo abrem perspectivas para a aplicação da técnica de planejamento de experimentos na etapa de Desenvolvimento de formulações, e triagem das mesmas, possibilitando um delineamento de desenvolvimento de formulações menos empírico, e mais embasado em medidas quantitativas.

Além da análise dos fatores estudados, podemos incluir outros parâmetros que podem ser analisados, tais como, custos de matérias primas, análise de textura, ou até mesmo análise das propriedades antioxidantes da mesma.

Nos testes de estabilidade, as três formulações escolhidas foram consideradas estáveis pela determinação do pH, avaliação das características organolépticas e avaliação do comportamento reológico. Adicionalmente foi realizada avaliação do tamanho de partículas durante sete dias, o qual permite acompanhar o comportamento das partículas em suspensão evidenciando fenômenos de instabilidade (ANVISA, 2004).

Não foi observado aumento no tamanho de partículas durante o estudo, sendo um sinal de estabilidade, pois o aumento do tamanho de partículas poderia indicar coalescência das partículas dispersas (ANVISA, 2004).

Ao lado do desenvolvimento tecnológico, é de fundamental importância o estudo da biologia da pele, uma vez que o mesmo impacta diretamente no direcionamento do protocolo de Pesquisa & Desenvolvimento e na eficácia do produto.

Há uma constante demanda pelo estudo da biologia cutânea, bem como a elucidação dos mecanismos do fotoenvelhecimento, causas e alterações fenotípicas, para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento e prevenção da pele fotoenvelhecida (BAILLIE et al., 2011).

Assim, no presente estudo, por meio da caracterização da pele nas diferentes regiões em dois grupos de idade, foi possível fazer uma análise completa sobre quais são as alterações clínicas biofísicas, morfológicas e estruturais mais frequentes resultantes do fotoenvelhecimento.

O fotoenvelhecimento é influenciado pela exposição e proteção solar ao longo dos anos, e, portanto, os hábitos de exposição e proteção solar foram investigados na população estudada (KIMLIN; GUO, 2012) por meio de questionários de exposição e proteção solar, os quais têm sido considerados ferramentas confiáveis para serem aplicadas em estudos retrospectivos (DOBBINSON et al., 2014).

Observou-se uma redução da exposição solar ao longo dos anos, e aumento da proteção solar. Essas mudanças de comportamento podem ser devido à preocupação com o câncer de pele ou com características indesejáveis do fotoenvelhecimento, ou até mesmo mudanças nos hábitos de trabalho e lazer. Deste modo, o presente estudo se mostra em consonância com outros, os quais também mostram essas alterações de comportamento de exposição e proteção solar nos últimos anos (KIMLIN; GUO, 2012).

Segundo o relato das voluntárias, cerca de 30 anos atrás, o acesso aos protetores solares era nulo ou limitado e havia uma cultura muito comum de bronzamento para obter uma melhor aparência da pele. Por outro lado, o grupo de jovens, atualmente, tem mais informações e hábitos mais saudáveis de proteção solar.

Nos questionários de autoavaliação, o grupo com pele madura apresentou maior prevalência de queixas relacionadas ao fotoenvelhecimento, enquanto o grupo jovem apresentou maior prevalência de queixas relacionadas à pele oleosa e acne, mostrando uma alteração no perfil do consumidor de dermocosméticos nas duas faixas etárias.

Embora o processo de envelhecimento leve a um ressecamento progressivo da pele e ainda maior probabilidade de danos na barreira cutânea, na avaliação por técnicas de biofísica, no presente estudo não foram obtidas diferenças significativas no conteúdo aquoso do estrato córneo e perda transepidérmica de água em diferentes grupos de idade. Vários estudos descritos na literatura também não relataram diferenças significativas de hidratação e da perda transepidérmica de água com o envelhecimento (LUEBBERDING; KRUEGER; KERSCHER, 2013; MARRAKCHI; MAIBACH, 2007; TAGAMI, 2008; (KOTTNER; LICHTERFELD; BLUME-PEYTAVI, 2013; LUEBBERDING; KRUEGER; KERSCHER, 2013; TROJAHN et al., 2015 KRUEGER et al., 2011)).

No entanto, os resultados de hidratação cutânea no envelhecimento apresentam algumas controvérsias na literatura, sendo que, em alguns estudos, observa-se uma redução da hidratação com a idade, em outros, um aumento (FIROOZ et al., 2012; MARRAKCHI; MAIBACH, 2007; TAGAMI, 2008). Há relatos na literatura de redução do TEWL com o envelhecimento, mas geralmente isto ocorre em indivíduos acima de 65 anos (KOTTNER; LICHTERFELD; BLUME-PEYTAVI, 2013).

Tais diferenças podem estar relacionadas a fatores individuais, ambientais, estilo de vida e hábitos saudáveis, como o uso de cosméticos e ingestão adequada de líquidos.

Dentre as regiões estudadas, o rosto e as mãos foram as regiões que apresentaram maior perda transepidérmica de água. Os resultados encontrados em cada região apresentam valores semelhantes com outros estudos, de acordo com dados analisados em uma revisão sistemática (KOTTNER; LICHTERFELD; BLUME-PEYTAVI, 2013).

O grupo com pele madura apresentou maior espessura da derme, porém, tal diferença não foi significativa. Alguns estudos corroboram com os resultados obtidos e demonstram o aumento da espessura da derme com o fotoenvelhecimento (GNIADÉCKA; JEMEC, 1998; PELLACANI; SEIDENARI, 1999; WALLER; MAIBACH, 2005). No entanto, não existe um consenso geral na literatura em relação à espessura da derme e o envelhecimento cutâneo em diferentes regiões do corpo, uma vez que a espessura da derme pode ser reduzida devido à atrofia decorrente do envelhecimento cronológico, e pode ser influenciada pela exposição solar, levando ao aumento da espessura (POURADIER et al., 2013).

Em um estudo realizado por Gniadecka e Jemec (GNIADÉCKA; JEMEC, 1998) foi encontrada uma relação entre PBE/PT na derme superior e a idade e grau de exposição solar dos participantes, indicando que esta análise pode ser considerada como uma forma objetiva de caracterizar dano solar e fotoenvelhecimento. A análise realizada pelos autores está coerente com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que uma menor ecogenicidade (aumento da relação de PBE/PT) foi obtida nas regiões fotoexpostas no grupo de maior idade.

O fenômeno responsável pela redução da ecogenicidade da derme é devido uma série de fatores como elastose, degradação de colágeno, acúmulo de glicosaminoglicanos e água na derme papilar (GNIADÉCKA; JEMEC, 1998). Estes efeitos sobre a matriz de colágeno estão associados à ação da radiação UV sobre a indução de metaloproteinases e redução da síntese de pró-colágeno (TALWAR; GRIFFITHS; FISHER, 1995; WLASCHEK et al., 2001).

Além disso, os parâmetros de viscoelasticidade corroboram com estes resultados, uma vez que foi observado que houve redução dos parâmetros de elasticidade, aumento do componente viscoelástico, e perda da capacidade de recuperação após a deformação com a idade e nas regiões fotoexpostas, resultantes das alterações estruturais da derme e epiderme.

Na literatura, encontra-se uma correlação negativa entre a idade os parâmetros de elasticidade ( $U_a/U_f$ ,  $U_r/U_f$  e  $U_r/U_e$ ) (KRUEGER et al., 2011; LUEBBERDING; KRUEGER; KERSCHER, 2014; OHSHIMA et al., 2013). Essa perda de elasticidade reflete no aumento do resíduo após a deformação da pele pode ser interpretado como “fadiga” da pele, e também

no aumento da relação onde há um aumento do componente viscoso em relação ao componente elástico ( $U_v/U_e$ ) (DIRIDOLLOU et al., 2001; KRUEGER et al., 2011).

Considerando que a radiação UV provoca alterações degenerativas em feixes de fibras de colágeno dérmico, o principal elemento de construção na derme, a linearidade tridimensional das fibras elásticas podem ser afetadas e então fibras elásticas tortuosas não são capazes de recuperar sua elasticidade original (GILCHREST, 2013; NISHIMORI et al., 2001).

As alterações na derme e na elasticidade descritas acima, refletem ainda na aparência de rugas e na textura da pele, que foi avaliada por técnica de análise imagem. As características do microrrelevo dependem da hidratação e da estrutura da derme papilar, e se relaciona também com a densidade, atrofia da derme reticular e perda de elasticidade (NISHIMORI et al., 2001; PIÉRARD; UHODA; PIÉRARD-FRANCHIMONT, 2003).

Com o envelhecimento, alterações conformacionais e estruturais das proteínas as tornam mais hidrofóbicas, além de reduzir proteoglicanos e ácido hialurônico que diminuem as interações água-proteína, o que pode contribuir com a aparência enrugada da pele envelhecida (DIRIDOLLOU et al., 2001). As alterações do microrrelevo consistem também na alteração do padrão morfológico da superfície cutânea, em que o padrão poligonal e regular do microrrelevo é transformado por um padrão linear a anisotrópico (PIÉRARD; UHODA; PIÉRARD-FRANCHIMONT, 2003).

O estudo das características estruturais e morfológicas do fotoenvelhecimento utilizando Microscopia Confocal de Refletância a laser forneceram informações mais detalhadas sobre a estrutura da pele.

Em relação à espessura das camadas da epiderme, o estrato córneo é mais fino na face em relação aos antebraços em ambos os grupos. Este resultado está de acordo com outros resultados na literatura (HUZAIRA et al., 2001). O grupo com pele madura apresentou maior espessura do estrato córneo e tamanho dos corneócitos. A hiperqueratose é uma característica da pele fotoenvelhecida, na qual uma camada córnea defeituosa é produzida, composta por de corneócitos mal organizados, com tamanhos e formas variáveis (KLIGMAN et al., 1986; NISHIMORI et al., 2001). A redução da renovação celular, característica do envelhecimento, pode contribuir para o espessamento do estrato córneo, bem como para o aumento do tamanho dos corneócitos (BINIEK et al., 2015).

Com o envelhecimento, a epiderme apresenta desarranjo do padrão de favo de mel, além de distribuição irregular de melanina na epiderme. Esse perfil morfológico reflete a resposta irregular, defeituosa e com funcionalidade prejudicada de queratinócitos e

melanócitos frente ao envelhecimento e à exposição crônica a radiação UV. Estes resultados também foram observados em outros estudos em que o padrão da epiderme foi avaliado por Microscopia confocal de reflectância a laser (LONGO et al., 2013b; MIZUKOSHI et al., 2014; WURM et al., 2012).

O achatamento das papilas dérmicas é uma característica do envelhecimento crônico, agravado pela exposição à radiação UV. Um mecanismo possível para este efeito de achatamento é que a modificação de proteínas no tecido pelos radicais livres, levando ao acúmulo de derivados carbonílicos na derme papilar da pele fotoenvelhecida, prejudicando a conformação estrutural da junção dermoepidérmica (PINNELL, 2003). Além disso, as metaloproteinases e plasminas, estimuladas pela radiação ultravioleta, causam danos contínuos na membrana basal, a qual possui um papel muito importante na manutenção de uma epiderme e derme saudável. Outro mecanismo proposto é a redução do colágeno tipo VII, que contribui para a estabilização da junção dermoepidérmica (BILAÇ; ŞAHİN; ÖZTÜRKCAN, 2014a).

O achatamento da junção dermoepidérmica causa um impacto no fornecimento de nutrientes e água na epiderme, e há uma redução das fibrilas de ancoragem e aderência entre a derme e a epiderme, o que torna a pele envelhecida mais vulnerável a danos mecânicos, uma vez que o turgor cutâneo é reduzido e as camadas da epiderme podem se separar com mais facilidade entre elas (EL-DOMYATI et al., 2002; TAKEMA et al., 1994; WALLER; MAIBACH, 2005).

A avaliação da MCR na derme apresenta algumas limitações, pois abaixo da camada basal pode haver redução da resolução da técnica. No entanto, as características da derme papilar têm sido bem descritas na literatura utilizando MCR, sendo possível analisar o morfológico dérmico no presente estudo. Na derme papilar, a pele jovem apresenta fibras de colágeno finas e altamente refringentes, e na pele envelhecida, as fibras são pouco visíveis e apresentam a aparência encolhida. Estes resultados também foram encontrados em outros estudos, onde o colágeno envelhecido sofre modificações progressivas de fibras finas, para fibras grossas ou por conteúdo amorfo hiporrefrativo (LONGO et al., 2013a, 2013b).

Os resultados visualizados pela MCR se alinham aos achados histológicos já extensamente estudados, nos quais a derme fotoenvelhecida apresenta uma substituição do padrão normal fibrilar por grandes quantidades de fibras elásticas degradadas, grossas, emaranhadas, e não funcionais (BILAÇ; ŞAHİN; ÖZTÜRKCAN, 2014b; KLIGMAN et al., 1986) além de haver desorganização e fragmentação do colágeno (DIRIDOLLOU et al., 2001).

As diferentes propriedades cutâneas estão correlacionadas e influenciam o surgimento de sinais clínicos, o que sugere a necessidade de uma abordagem multifatorial tanto para uma caracterização efetiva, quanto para a detecção de múltiplos alvos para garantir a melhoria das condições gerais da pele.

Para tal, o Índice de Fotoenvelhecimento foi obtido por meio da aplicação de diferentes pesos nas variáveis estudadas. A aplicação desse modelo na caracterização da pele traz como diferencial a consideração dos diferentes aspectos que a compõem, facilitando a discussão e a obtenção de resultados conclusivos, e que atendam diretamente à finalidade proposta. A análise multivariada permite avaliar a relação entre as características estudadas, facilitando a interpretação dos dados como um todo, e não apenas de forma isolada.

Dentre as principais aplicações do modelo proposto, podemos mencionar: a detecção dos principais fatores que realmente contribuem para uma condição específica, a caracterização e comparação de diferentes grupos, considerando a idade, sexo, e hábitos. Além disso, pode colaborar com comprovação de *claims* cosméticos propostos e também é uma excelente ferramenta para a comparação de eficácia multiparamétrica de diferentes formulações cosméticas.

Além da caracterização da população brasileira em dois grupos de idade, foi realizada a caracterização da pele francesa, utilizando o mesmo protocolo de estudo aplicado no Brasil, visando aumentar a complexidade do estudo.

Uma grande variedade de fatores pode estar relacionada com o envelhecimento cutâneo, e poderiam interferir nos parâmetros de biofísica e análise de imagem da pele nas populações estudadas. Portanto, o estudo foi realizado no verão em ambos os centros de pesquisa, para evitar influência ambiental. O recrutamento do painel foi cuidadosamente delineado com voluntárias com um perfil similar em fototipos cutâneos, idade, menopausa para obter dados comparáveis. Os hábitos de proteção e exposição solar foram comparados com a finalidade de obter um panorama geral dos hábitos que podem impactar nas condições cutâneas.

É importante ressaltar que, no Brasil, a avaliação do questionário reflete a exposição ao sol durante todo o ano, pois a região estudada (Ribeirão Preto) tem um clima ensolarado ao longo do ano, entretanto, na população francesa, esta exposição reflete apenas meses com tempo ensolarado (meses de primavera-verão).

As duas cidades onde foram realizados os estudos não são na mesma latitude. Ribeirão Preto está mais perto do equador do que Bordeaux, o que impacta a quantidade total de radiação UV que os participantes receberam ao longo dos anos. Além disso, o hemisfério sul



está mais próximo do sol no verão. Esta posição geográfica e outros fatores ambientais, também impactam diretamente o índice UV entre as regiões estudadas (GODAR, D. E., 2005).

Portanto, devido à posição geográfica, as condições climáticas e os hábitos de exposição ao sol, os participantes brasileiros foram muito mais sujeitos a danos totais da radiação UV.

As técnicas de biofísica mostraram que a pele francesa é mais hidratada e apresenta menor perda transepidérmica de água. O uso de cosméticos pode impactar nos parâmetros de barreira cutânea e hidratação da pele. Deste modo, é preciso considerar a maior frequência de aplicação de produtos cosméticos pelo painel francês.

Além disso, as diferenças na hidratação da pele e na função de barreira podem ser explicadas pelo aumento do *stress* oxidativo causado pela radiação solar na pele, com um acúmulo de radicais livres de oxigênio, capazes de gerar modificações em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, promovendo alterações celulares e influenciando no processo de queratinização (WLASCHEK et al., 2001; PINNELL, 2003).

A radiação UV tem efeitos sobre a coesão celular e integridade mecânica que estão relacionadas com os seus efeitos sobre os componentes intercelulares do estrato córneo, incluindo lipídios intercelulares e corneodesmosomos, comprometer a função de barreira e prejudicando a hidratação cutânea (BINIEK; LEVI; DAUSKARDT, 2012).

É importante considerar que o ressecamento foi considerado uma grande preocupação na autoavaliação da população francesa, diferente da percepção do painel brasileiro. As participantes brasileiras não são submetidas às condições climáticas do inverno severo, o que impacta na percepção desta condição cutânea.

A aparência da superfície da pele reflete algumas propriedades estruturais importantes da epiderme e derme, que podem estar relacionadas à menor hidratação cutânea (CAMPOS et al., 2012; PENA FERREIRA; COSTA; BAHIA, 2010a) ou refletir os efeitos topográficos da pele fotoenvelhecida (PENA FERREIRA; COSTA; BAHIA, 2010b; WURM et al., 2012).

Os parâmetros de elasticidade, elasticidade bruta ( $U_a/U_f$ ) e elasticidade líquida ( $U_r/U_e$ ), apresentaram valores semelhantes em ambas as populações que mostram que a elasticidade é similar em ambos os grupos. As principais diferenças obtidas neste estudo são os valores mais baixos de porção viscoelástica da curva ( $U_v/U_e$ ) e maiores valores de recuperação após deformação ( $U_r/U_f$ ) na pele brasileira.

Considerando que alguns estudos sugerem que os parâmetros relacionados com a elasticidade da pele (como  $U_r/U_e$ ) são influenciados principalmente pelo envelhecimento cronológico (LIU, 2007), nossos resultados sugerem que nem todos os parâmetros de elasticidade foram influenciados pelo envelhecimento extrínseco.

As diferenças obtidas nos parâmetros relacionados com a viscoelasticidade da pele ( $U_v/U_e$ ) podem estar relacionadas com a hidratação da epiderme. O parâmetro  $U_v$  é relacionado com a viscosidade de fluido intersticial, como resultado da quantidade total de glicosaminoglicanos e colágeno solúvel. Assim, os maiores valores do parâmetro viscoelástico da população francesa pode ser também devido ao aumento da hidratação e da viscosidade do fluido intersticial devido à aplicação de produtos cosméticos (DOBREV, 2000; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. et al., 2012; MAIA CAMPOS, P. M. et al., 2014).

Comparando as duas populações, a profundidade das papilas dérmicas é menor na pele brasileira e o achatamento da junção dermoepidérmica é mais pronunciado. A pele francesa apresentou maior ecogenicidade que a pele brasileira principalmente na derme superior. Na análise por RCM, todos os participantes de ambos os grupos apresentaram fibras de colágeno grossas, e a prevalência de colágeno amorfo hiporrefrativo e elastose solar é superior na pele brasileira. Os resultados obtidos pela análise da JDE e derme mostram o fotoenvelhecimento mais pronunciado na pele brasileira (GNIADOCKA et al., 1994; IMAYAMA; BRAVERMAN, 1989; QUAN et al., 2009; WALLER; MAIBACH, 2005; WLASCHEK et al., 2001; WURM et al., 2012).

A pele francesa apresentou um estrato córneo mais espesso, o que pode estar relacionado com efeitos de hidratantes que podem aumentar a espessura do estrato córneo (HUZAIRA et al., 2001).

A prevalência de anéis papilares policíclicos foi maior na pele brasileira e tem o mesmo aspecto morfológico descrito para lentigos solares (LANGLEY, R. G. B. et al., 2001; LANGLEY, R. G.; BURTON; WALSH, 2006; POLLEFLIET et al., 2013). Assim, estes resultados podem ser analisados como lentigos solares ou alterações lentiginosas subclínicas (LANGLEY, R. G.; BURTON; WALSH, 2006; WURM et al., 2012).

O padrão irregular das células da epiderme é frequente em ambas as populações. Esta descrição morfológica está relacionada ao envelhecimento e a danos agudos e crônicos da radiação UV (ULRICH et al., 2009; WURM et al., 2012; KUTLU HAYTOGLU et al., 2014).

Os queratinócitos com núcleos picnóticos estão presentes em ambas as populações e podem ser analisados como condensação locais de cromatina (CORCUFF et al., 2001), que estão em conformidade com a descrição histológica e confocal de células apoptóticas

(TERHORST et al., 2011), e células de queimadura. Como as medidas foram realizadas no verão em ambos os grupos, devemos considerar também os efeitos agudos da exposição solar, além dos efeitos crônicos considerados. Essa característica pode representar estímulo da renovação celular ou danos subclínicos nos queratinócitos causados pelo sol em condições reais.

Células dendríticas foram observadas na junção dérmico-epidérmica nos dois painéis, o que pode ser descrito como melanócitos ativados, com a visualização de dendritos durante o processo de pigmentação da pele (YAMASHITA et al., 2007). Além disso, essas células podem ser descritas como células de Langerhans na JDE (YAMASHITA et al., 2007; HASHEMI et al., 2012).

Algumas células inflamatórias, que foram reconhecidas como pequenas partículas brilhantes e /ou células volumosas brilhantes na derme, foram identificadas em voluntárias brasileiras e francesas. Os estudos prévios de fotoenvelhecimento têm demonstrado que o número de mastócitos e macrófagos são aumentados na pele exposta ao sol, que mostra a inflamação subclínica, suportando a hipótese de que o fotoenvelhecimento pode estar associado com uma inflamação crônica da pele (BHAWAN et al., 1995; BOSSET et al., 2003). Os efeitos superficiais da inflamação também podem modificar a organização e função de queratinócitos e células-tronco basais, e apresentar impacto a longo prazo sobre a função de barreira da pele e pigmentação (BHAWAN et al., 1995; BOSSET et al., 2003).

A elevada prevalência de algumas características decorrentes da exposição solar “aguda” em ambos os painéis, mostra que, com a finalidade de evitar o fotoenvelhecimento, estratégias de proteção mais eficazes devem ser consideradas em ambas as populações, a fim de evitar danos crônicos causados pela radiação solar.

Tratamentos de cuidados da pele que atuam sobre a reestruturação dérmica e da JDE são de grande importância para a melhoria das condições da pele brasileira. Além disso, cuidados precoces com a pele são de fundamental importância para prevenir o fotoenvelhecimento, e, portanto, evitar tratamentos invasivos.

Em síntese, as diferenças morfológicas, estruturais e biofísicas foram encontradas na pele brasileira e francesa, as quais são submetidas a diferentes fatores ambientais e apresentam hábitos distintos. Assim, uma abordagem distinta pode ser necessária para a Pesquisa & Desenvolvimento de produtos dermocosméticos para melhorar as características específicas dos diversos tipos de pele.

Considerando as características clínicas da pele fotoenvelhecida, medidas para a prevenção, retardo e tratamento do fotoenvelhecimento são um assunto de muito interesse na

área cosmética e dermatológica, tanto por questões de melhoria do caráter inestético, mas também devido à preocupação de lesões pré-malignas que podem levar ao câncer de pele.

A aplicação de dermocosméticos é considerada como uma das estratégias para estes tipo de tratamento. Vários estudos reportam os efeitos de formulações tópicas nas condições cutâneas. Os estudos clínicos, randomizados, duplo-cego, tem recebido atenção na área científica e aplicada, uma vez que trazem, de forma embasada cientificamente, informações que orientam a terapia clínica e o desenvolvimento de novos dermocosméticos. Além disso, as técnicas de biofísica e análise de imagem se destacam por fornecer resultados confiáveis, utilizando métodos quantitativos e qualitativos da eficácia das formulações objeto de estudo (DRENO et al., 2014).

Dentre as técnicas utilizadas, a microscopia confocal de reflectância a laser tem se destacado como uma técnica de alta tecnologia para a avaliação de produtos dermocosméticos, pela possibilidade de fornecer análises cutâneas na epiderme em uma resolução quase histológica. Apesar do potencial, poucos estudos científicos para a avaliação de produtos dermocosméticos foram realizados utilizando essa técnica. Portanto, por ser uma técnica de vanguarda, há a necessidade de padronização, bem como avaliação da reprodutibilidade da mesma em estudos clínicos de eficácia.

Os valores obtidos de CCI no estudo de reprodutibilidade da técnica mostraram a variação de reposicionamento, ou seja, três análises obtidas em locais próximos, porém distintos. A variação no reposicionamento nos parâmetros estudados é esperada, uma vez que a pele é heterogênea e possui pequenas variações na estrutura do tecido. Considerando essas variações, a realização da análise em triplicata e cálculo da média dos parâmetros é uma método útil para redução do viés estatístico (KOTTNER et al., 2011; TROJAHN et al., 2015).

Além da análise de reposicionamento, foi avaliada a reprodutibilidade da técnica em relação ao tempo. Quando comparamos os resultados do estudo antes e após 84 dias, observamos que a média entre os diferentes tempos são similares, e o C.V. apresentado é menor que 10%, mostrando baixa variação interindividual para os parâmetros analisados. Diversos parâmetros apresentaram CCI acima de 0,7, os quais indicam alta reprodutibilidade (KOTTNER et al., 2011). Estudos reprodutibilidade de outras técnicas que são amplamente utilizadas na área de eficácia clínica de cosméticos mostraram resultados parecidos, o que demonstra a grande aplicação da técnica para avaliação da espessura das camadas cutâneas em estudos de eficácia clínica de cosméticos (KOTTNER et al., 2013; TROJAHN et al., 2015).

De acordo com o presente estudo, ficou evidente que a microscopia confocal de refletância a laser é uma ferramenta de vanguarda valiosa para a avaliação não invasiva de características do fotoenvelhecimento bem como da eficácia clínica de dermocosméticos uma vez que oferece resultados conclusivos e complementares, agregando conhecimento substancial de biologia pele quando analisado em conjunto com outras técnicas de análise de imagem e biofísica.

No estudo clínico de eficácia, as formulações veículo e as adicionadas de vitaminas estudadas apresentaram um aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo. Além disso, as formulações contendo palmitato de retinila e acetato de tocoferila atuaram significativamente na redução da perda transepidérmica de água, mostrando os efeitos protetores dos derivados de vitaminas.

Os efeitos das vitaminas A e E na perda transepidérmica de água também foram estudados por Gianeti e Maia Campos (2014), onde a associação de vitaminas e extratos vegetais atuaram na redução do TEWL em um estudo clínico de eficácia. Gaspar e Maia Campos mostraram os efeitos da associação de vitaminas A, C e E, obtendo redução do TEWL, aumento do componente viscoso (Uv/Ue) e aumento da espessura da pele em camundongos, por técnicas histométricas (GASPAR; CAMPOS, 2007).

Pela análise da microscopia confocal de refletância a laser, as formulações estudadas apresentaram efeito na melhoria do delineamento e contorno dos queratinócitos, que podem estar relacionados com a hidratação e com a presença de queratinócitos funcionais (MARCO et al., 2013), indicando hidratação não apenas no estrato córneo, mas também nas camadas mais profundas da epiderme. Estes dados vão de encontro com os resultados obtidos pelo aumento da viscoelasticidade Uv/Ue que, no caso do uso de produtos cosméticos, pode estar relacionado com a hidratação da epiderme viável (MAIA CAMPOS et al., 2014, 2012).

Em um estudo de análise histológica, Maia Campos e colaboradores observaram ainda aumento de hidratação intra e extracelular nas camadas profundas da epiderme após a aplicação de formulações cosméticas contendo vitamina A em animais de experimentação (MAIA CAMPOS et al., 1999).

Pela análise por técnicas de biofísica, a formulação contendo *Tocoretinate* atuou na melhoria da hidratação e da elasticidade da pele, bem como aumento do componente viscoso. O efeito observado no espessamento da epiderme (espessura máxima) é observado em vários outros estudos usando retinoides, e mostra atuação do ativo na renovação celular e regulação da diferenciação epitelial (DARLENSKI; SURBER; FLUHR, 2010; KLIGMAN et al., 1986). Além disso, testes *in vitro* demonstram que o TR pode aumentar a produção de ácido

hialurônico nos queratinócitos, o que também poderia levar ao aumento da espessura da epiderme viável, e aumento do componente viscoso (OKANO et al., 2006).

O afinamento do estrato córneo é um resultado decorrente do estímulo da renovação celular, e é um efeito interessante para a pele fotoenvelhecida pois pode haver uma homogeneização da camada córnea e melhorar o aspecto áspero e rugoso da pele fotoenvelhecida, como foi observado pela análise do microrrelevo, por meio da redução da rugosidade e do número de rugas. Em um estudo realizado por análise histométrica de formulações contendo ácido retinoico, um aumento da espessura da epiderme e redução da espessura da camada córnea foi observada, devido ao estímulo da renovação celular (MAIA CAMPOS et al., 2015).

Além disso, a formulação contendo TR atuou no aumento da profundidade das papilas dérmicas, o que pode representar a melhoria do padrão de ondulação da junção dermoepidérmica. Alguns estudos demonstram o efeito clínico de retinoides na JDE (MUKHERJEE et al., 2006; TANCRÈDE-BOHIN et al., 2015) e também a melhoria no aumento do colágeno VII e expressão de fibrilina-1, que são estruturas importantes de ancoragem (DT et al., 1990; WATSON et al., 1999).

As características morfológicas e estruturais obtidas demonstram o efeito do TR na homogeneidade da epiderme, bem como na redução da pigmentação na epiderme e aumento da reflectâncias dos queratinócitos, indicando melhoria da homogeneidade e pigmentação da epiderme.

Apesar dos efeitos significativos na junção dermoepidérmica e derme, a formulação contendo TR não proporcionou melhorias significativas na derme. Durante o uso do produto, as voluntárias não apresentaram reações adversas, as voluntárias não declararam irritação, ou vermelhidão com o uso dos mesmos e as formulações apresentaram boa aceitação sensorial e

As evidências obtidas pelas técnicas não invasivas mostram que o TR atuou na renovação celular, entretanto, a presente formulação não aumentou o TEWL, mostrando que houve a manutenção da integridade da função barreira da pele e melhor estruturação da epiderme. Uma formulação que oferece estes efeitos é de grande interesse, pois muitos tratamentos podem aumentar o estímulo da renovação celular, e por o estrato córneo ficar mais fino, e desprotegido e, deixar a pele mais sensível a radiação UV e causar irritação. Em muitos casos, devido a função barreira prejudicada e condições inflamatórias, observa-se um efeito “rebote”, após o tratamento para melhoria da hiperpigmentação (CHEONG et al., 2014).

A formulação FT apresentou efeitos na hidratação e na elasticidade cutânea, além de melhorar a estrutura da epiderme e da junção dermoepidérmica. De acordo com a percepção das voluntárias, a formulação foi eficaz na melhoria da hidratação, maciez e melhoria de manchas na pele. Além de serem observadas melhoras nas rugas, firmeza e acne. Portanto, a formulação FT mostrou-se eficaz na melhoria das condições da pele fotoenvelhecida.

Em síntese, o protocolo de desenvolvimento proposto no presente estudo possibilitou a obtenção de formulações contendo palmitato de retinila, acetato de tocoferila e tocoretinate estáveis e otimizadas com sensorial adequado às finalidades propostas. Tais formulações foram eficazes no estudo de eficácia clínica, sendo que a formulação contendo TR, apresentou resultados mais pronunciados. As técnicas de biofísica e análise de imagem da pele possibilitaram um estudo completo de caracterização da pele em diferentes grupos de idade e em diferentes populações e a microscopia confocal apresentou reprodutibilidade e possibilitou a caracterização detalhada das características morfológicas e estruturais da epiderme.

Finalizando, o presente trabalho apresenta contribuição relevante para as áreas cosmética e dermatológica tanto em termos de novas opções de formulações eficazes e seguras para os cuidados e proteção da pele, como na indicação de uso direcionado de acordo com a biologia da pele.

**8. CONCLUSÕES**

---



Nas condições experimentais desse trabalho foi possível concluir que:

O planejamento experimental Box-Beheken realizado na primeira etapa do desenvolvimento possibilitou identificar e quantificar a influência das matérias primas, bem como a interação entre elas no tamanho de partícula nos parâmetros reológicos índices de consistência e de fluxo, área de histerese, viscosidade aparente mínima.

Na segunda etapa, o planejamento experimental possibilitou ainda identificar a influencia da lecitina de soja, do phytantriol e do triglicérides do ácido cáprico e caprílico no índice de consistência, pegajosidade e oleosidade e na hidratação cutânea. Assim, o planejamento experimental com Metodologia de Superfície de Resposta demonstrou ser uma ferramenta efetiva na Pesquisa & Desenvolvimento de Cosméticos, uma vez que permitiu a avaliação dos efeitos isolados bem como da interação de matérias primas em respostas como: parâmetros reológicos, sensorial e eficácia clínica.

As formulações desenvolvidas foram consideradas estáveis no estudo de estabilidade física, com exceção das formulações que continham menores concentrações de cera-autoemulsionante que apresentaram alterações nos parâmetros reológicos ao longo do tempo.

A microscopia confocal de reflectância a laser mostrou-se como uma técnica reproduzível e robusta para a avaliação da espessura das camadas da pele em testes clínicos de eficácia em longo prazo. A MCR oferece resultados conclusivos e complementares, agregando conhecimento substancial da biologia pele quando analisado em conjunto com outras técnicas de análise de imagem e biofísica.

Os principais efeitos clínicos e morfológicos relacionados ao fotoenvelhecimento foram: perda da qualidade elástica, maior número e largura de rugas, menor ecogenicidade, maior ângulo tipológico individual, maior tamanho de corneócitos, maior espessura do estrato córneo, padrão de pigmentação irregular, queratinócitos distribuídos irregularmente, achatamento da junção dermoepidermica e a presença de fibras de colágeno deterioradas.

Diferentes características morfológicas, estruturais e biofísicas foram encontradas na pele brasileira e francesa fotoenvelhecida, que são submetidas a diferentes fatores ambientais e apresenta hábitos distintos. A pele francesa é mais hidratada e tem uma perda de água transepidérmica menor do que a pele brasileira, e apresenta um perfil viscoelástico diferente. A pele brasileira no rosto apresenta maior número de largura de rugas e a derme é menos ecogênica. As participantes francesas apresentaram o estrato córneo mais espesso e a pele brasileira apresentou maior prevalência de achatamento das papilas dérmicas, anéis policíclicos e elastose solar.

A formulação contendo *Tocoretinate* atuou na melhoria da hidratação, na elasticidade líquida e na alteração da relação viscoelasticidade/elasticidade da pele, bem como na redução da espessura do estrato córneo e aumento da espessura da epiderme viável. A análise morfológica mostrou melhoria da homogeneidade e redução da pigmentação da epiderme, e aumento da profundidade das papilas dérmicas.

As formulações contendo vitamina A e vitamina E apresentaram efeitos na hidratação, na perda transepidérmica de água e na viscoelasticidade da pele. No estudo morfológico, todas as formulações aumentaram o contorno dos queratinócitos.

A caracterização da pele por técnicas de biofísica e análise de imagem foi fundamental para a definição do protocolo de estudo clínico de eficácia aplicando as referidas técnicas. O estudo clínico mostrou a eficácia da aplicação da formulação desenvolvida contendo *Tocoretinate* na melhoria das condições da pele fotoenvelhecida, e fornece embasamento científico relevante para o uso deste ingrediente ativo inovador tanto em produtos cosméticos como na clínica dermatológica.

## ***9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

AGOZZINO, M. et al. Confocal microscopic features of scarring alopecia: preliminary report. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 3, p. 534–540, 2011.

AKHALAYA, M. Y. et al. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. **Ageing research reviews**, v. 16, p. 1–11, jul. 2014.

ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 301–316, 2004.

ANDRADE, J. P.; MERCURIO, D. G.; MAIA CAMPOS, P. M. Avaliação celular das estruturas cutâneas por meio da microscopia confocal de reflectância. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 71, p. 5–14, 2015.

ANVISA. **Guia de Estabilidade de produtos cosméticos**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia\\_series.htm](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm)>. Acesso em: 10 mar. 2015.

BABY, A. R. et al. Emulsified systems based on glyceryl monostearate and potassium cetyl phosphate: scale-up and characterization of physical properties. **International journal of pharmaceutics**, v. 361, n. 1, p. 99–103, 2008.

BABY, A. R. et al. Influence of urea, isopropanol, and propylene glycol on rutin in vitro release from cosmetic semisolid systems estimated by factorial design. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 35, n. 3, p. 272–282, 2009.

BAGATIN, E.; DE VASCONCELOS NASSER CAETANO, L.; SOARES, J. L. M. Ultrasound and dermatology: basic principles and main applications in dermatologic research. **Expert Review of Dermatology**. v.8, n. 5, p. 463-477, 2013.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–62, jan. 2012.

BECHELLI, L. M.; CURBAN, G. V. *Compêndio de Dermatologia*. São Paulo. **Atheneu Editora, Lepra**, v. 13, p. 132–163, 1988.

BELSITO, D. V et al. *Crosslinked Alkyl Acrylates as Used in Cosmetics*. 2011.

BENTLEY, M. V. L. B. et al. The influence of lecithin and urea on the in vitro permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. **International journal of pharmaceutics**, v. 146, n. 2, p. 255–262, 1997.

BERARDESCA, E.; (EEMCO), E. G. FOR E. M. ON C. AND O. T. P. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. **Skin Research and Technology**, v. 3, n. 2, p. 126–132, 1 maio 1997.

BERNSTEIN, E. F. et al. The Polyhydroxy Acid Gluconolactone Protects Against Ultraviolet Radiation in an In Vitro Model of Cutaneous Photoaging. **Dermatologic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 189–196, 1 fev. 2004.

BERTHELE, H. et al. Determination of the influence of factors (ethanol, pH and a(w) ) on the preservation of cosmetics using experimental design. **International journal of cosmetic science**, v. 36, n. 1, p. 54–61, fev. 2014.

BIELFELDT, S.; BÖHLING, A.; WILHELM, K. P. Bioengineering methods to assess aging parameters in the depth of the skin. **SOFW J**, v. 137, p. 2–9, 2011.

BILAÇ, C.; ŞAHİN, M. T.; ÖZTÜRKCAN, S. Chronic actinic damage of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 752–762, nov. 2014a.

BINIEK, K. et al. Understanding age-induced alterations to the biomechanical barrier function of human stratum corneum. **Journal of dermatological science**, 2015.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal Stem Cells of the Skin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 1, p. 339–373, 9 out. 2006.

BOEHNLEIN, J. et al. Characterization of Esterase and Alcohol Dehydrogenase Activity in Skin. Metabolism of Retinyl Palmitate to Retinol (Vitamin A) During Percutaneous Absorption. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 8, p. 1155–1159, 1994.

BÖHLING, A. et al. Comparison of the stratum corneum thickness measured in vivo with confocal Raman spectroscopy and confocal reflectance microscopy. **Skin Research and Technology**, v. 20, n. 1, p. 50–57, 2014.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.

BRADLEY, E. J. et al. Over-the-counter anti-ageing topical agents and their ability to protect and repair photoaged skin. **Maturitas**, v. 80, n. 3, p. 265–272, 2015.

BRANZAN, A. L.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R.-M. In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. **Lasers in medical science**, v. 22, n. 2, p. 73–82, 2007.

BURGESSON, R. E.; CHRISTIANO, A. M. The dermal—epidermal junction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 651–658, out. 1997.

BURNETT, M. E.; WANG, S. Q. Current sunscreen controversies: a critical review. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 27, n. 2, p. 58–67, 2011.

BUSAM, K. J. et al. Morphologic features of melanocytes, pigmented keratinocytes, and melanophages by in vivo confocal scanning laser microscopy. **Modern Pathology**, v. 14, n. 9, p. 862–868, 2001.

CAETANO, L. et al. Reliable assessment of forearm photoageing by high- frequency ultrasound: a cross- sectional study. **International journal of cosmetic science**, 2015.

CAMPOS, P. M. et al. Efficacy of cosmetic formulations containing dispersion of liposome with magnesium ascorbyl phosphate, alpha-lipoic acid and kinetin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 748–752, 2012.

CAMPOS, P. M. B. G. M.; MERCÚRIO, D. G. Farmacologia e a pele. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. supl. 4, 2009.

CANTECOR, B. et al. Anti-Aging Efficacy of a New Alendronate-Pravastatin Cosmetic Combination: A Randomized Double Blind Comparative Study. 2013.

CHEONG, K. A. et al. Retinoic acid and hydroquinone induce inverse expression patterns on cornified envelope-associated proteins: Implication in skin irritation. **Journal of dermatological science**, v. 76, n. 2, p. 112–119, 2014.

CHIARELLI-NETO, O. et al. Melanin photosensitization and the effect of visible light on epithelial cells. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113266, 2014.

CHIU, A.; KIMBALL, A. B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 4, p. 681–691, 1 out. 2003.

CHORILLI, M. et al. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, p.1036-1040, 2009.

CHRISTIAN, M. S. et al. A developmental toxicity study of tretinoin emollient cream (Renova) applied topically to New Zealand white rabbits. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 36, n. 3, p. S67–S76, mar. 1997.

CIARLETTA, P.; BEN AMAR, M. Papillary networks in the dermal–epidermal junction of skin: A biomechanical model. **Mechanics Research Communications**, v. 42, p. 68–76, jun. 2012.

CLARYS, P. et al. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter(R), the DermaSpectrometer(R) and the Mexameter(R). **Skin Research and Technology**, v. 6, n. 4, p. 230–238, 2000.

CLARYS, P. et al. Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825®) and the impedance method (Skicon200EX®). **Skin Research and Technology**, v. 18, n. 3, p. 316–323, 2012.

CORCUFF, P.; BERTRAND, C.; LEVEQUE, J. L. Morphometry of human epidermis in vivo by real-time confocal microscopy. **Archives of Dermatological Research**, v. 285, n. 8, p. 475–481, 1993.

CORCUFF, P.; LÉVÊQUE, J. L. In vivo Vision of the Human Skin with the Tandem Scanning Microscope. **Dermatology**, v. 186, n. 1, p. 50–54, 1993.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, , 2005.

COSTA-MACHADO, A. R. M.; BASTOS, J. K.; DE FREITAS, L. A. P. Dynamic maceration of *Copaifera langsdorffii* leaves: a technological study using fractional factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 79–85, 2013.

COURAGE, K.; KHAZAKA, G. **Information and operating instructions for the multi probe adapter MPA and its probes**, 2004.

CRISAN, D. et al. Ultrasonographic assessment of the cutaneous changes induced by topical flavonoid therapy. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 5, p. 7–13, 2012.

DAL'BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Research and Technology**, v. 12, n. 4, p. 241–246, 2006.

DARLENSKI, R.; SURBER, C.; FLUHR, J. W. Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence-based practical approach. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 6, p. 1157–1165, 2010.

DARR, D. et al. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. **Acta dermato-venereologica**, v. 76, n. 4, p. 264–268, jul. 1996.

DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. [s.l.] Editora da UNICAMP, 2003.

DEL BINO, S.; BERNERD, F. Variations in skin colour and the biological consequences of ultraviolet radiation exposure. **Br J Dermatol**, v. 169 Suppl , p. 33–40, 2013.

DIRIDOLLOU, S. et al. Skin ageing: changes of physical properties of human skin in vivo. **International journal of cosmetic science**, v. 23, n. 6, p. 353–362, dez. 2001.

DJURIS, J. et al. Application of D-optimal experimental design method to optimize the formulation of O/W cosmetic emulsions. **International journal of cosmetic science**, v. 36, n. 1, p. 79–87, fev. 2014.

DOBBINSON, S. et al. Assessing population-wide behaviour change: concordance of 10-year trends in self-reported and observed sun protection. **International Journal of Public Health**, v. 59, n. 1, p. 157–166, 2014.

DOBREV, H. Use of Cutometer to assess epidermal hydration. **Skin Research and Technology**, v. 6, n. 4, p. 239–244, 2000.

DOBREV, H. P. A study of human skin mechanical properties by means of Cutometer. **Folia medica**, v. 44, n. 3, p. 5–10, 2002.

DRENO, B. et al. The science of dermocosmetics and its role in dermatology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 11, p. 1409–1417, 2014.

DT, W. et al. Treatment of photoaged skin with topical tretinoin increases epidermal-dermal anchoring fibrils: A preliminary report. **JAMA**, v. 263, n. 22, p. 3057–3059, 13 jun. 1990.

DZWIGALOWSKA, A. et al. Preliminary study in the evaluation of anti-aging cosmetic treatment using two complementary methods for assessing skin surface. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 2, p. 155–161, 2013.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in dermatology**, v. 13, n. 4, p. 375–380, 1995.

EDWARDS, D. J.; MEE, R. W. Fractional Box-Behnken Designs. **Journal of Quality Technology**, 2010.

ELBASHIR, S.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 494–498, 2001.

EL-DOMYATI, M. et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Experimental dermatology**, v. 11, n. 5, p. 398–405, out. 2002.

ELSNER, P. et al. Anti-Aging Data and Support Claims—Consensus Statement. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 9, n. s3, p. S1–S32, 2011.

EOTECH. **AEVA-HE**. Disponível em: <<http://www.eotech-sa.com/Life-science/Systems/Products/t1/r9>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

FARAGE, M. A. et al. Characteristics of the Aging Skin. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 1, p. 5–10, 22 fev. 2013.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 10 ago. 2007.

FIROOZ, A. et al. Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender, and Body Region. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 386936, 12 mar. 2012.

FU, P. P. et al. Physiological role of retinyl palmitate in the skin. **Vitamins & Hormones**, v. 75, p. 223–256, 2007.

GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 181–189, 2007.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. Evaluation of the protective effect of alpha-tocopheryl acetate in a sunscreen, preventing erythema formation, transepidermal water loss and sunburn cell formation. **IFSCC Magazine**, v. 6, n. 3, p. 213–217, 2003a.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 35–44, jan. 2003b.

GEHRING, W.; FLUHR, J.; GLOOR, M. Influence of vitamin E acetate on stratum corneum hydration. **Arzneimittel-Forschung**, v. 48, n. 7, p. 772–775, jul. 1998.

GIANETI, M. D. et al. Benefits of combinations of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetic formulations. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 2219–2230, 2012.

GIANETI, M. D.; MAIA CAMPOS, P. M. Efficacy evaluation of a multifunctional cosmetic formulation: the benefits of a combination of active antioxidant substances. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18268–18282, 2014.

GIANETI, M. D.; MERCURIO, D. G.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. The use of green tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient. **Dermatologic Therapy**, v. 26, n. 3, p. 267–271, 2013.

GILCHREST, B. A. Photoaging. **Nature Milestones**, p. E2–E6, 2013.

GJ, F. et al. MEchanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1462–1470, 1 nov. 2002.

GNIADACKA, M. et al. Ultrasound structure and digital image analysis of the subepidermal low echogenic band in aged human skin: diurnal changes and interindividual variability. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 3, p. 362–365, 1994.



GNIADOCKA, M.; JEMEC, G. B. Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo: studies on skin echogenicity and thickness. **The British journal of dermatology**, v. 139, n. 5, p. 815–821, nov. 1998.

GODAR, D. E. Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma. **Journal of Skin Cancer**, v. 2011, p. 858425, 2011.

GONZÁLEZ, S. et al. Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. **Clinics in Dermatology**, v. 21, n. 5, p. 359–369, 2003.

GONZALEZ, S.; GILABERTE- CALZADA, Y. In vivo reflectance- mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology. **International journal of cosmetic science**, v. 30, n. 1, p. 1–17, 2008.

GRIFFITHS, C. The clinical identification and quantification of photodamage. **British Journal of Dermatology**, v. 127, p. 37–42, 1992.

GUARATINI, T.; GIANETI, M. D.; CAMPOS, P. M. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: chemical and physical aspects. **International journal of pharmaceutics**, v. 327, n. 1, p. 12–16, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245–251, 2008.

HILLEBRAND, G. G. et al. Quantitative evaluation of skin condition in an epidemiological survey of females living in northern versus southern Japan. **Journal of Dermatological Science**, v. 27, Supple, n. 0, p. 42–52, 2001.

HOUBEN, E.; DE PAEPE, K.; ROGIERS, V. A Keratinocyte's Course of Life, v. 20, n.3, p. 122-132.

HUZAIRA, M. et al. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 6, p. 846–852, 2001.

IMAYAMA, S.; BRAVERMAN, I. M. A hypothetical explanation for the aging of skin. Chronologic alteration of the three-dimensional arrangement of collagen and elastic fibers in connective tissue. **American Journal of Pathology**, v. 134, n. 5, p. 1019–1025, 1989.

JANG, S. I. et al. A quantitative evaluation method using processed optical images and analysis of age-dependent changes on nasolabial lines. **Skin research and technology**, v. 21, n. 2, p. 201–206, maio 2015.

JESTER, J. V et al. In vivo, real-time confocal imaging. **Journal of Electron Microscopy Technology**, v. 18, n. 1, p. 50–60, 1991.

JIAO, J.; BURGESS, D. J. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. **AAPS pharmSci**, v. 5, n. 1, p. E7, 2003.

JUNG, Y. J. et al. A robust experimental design method to optimize formulations of retinol solid lipid nanoparticles. **Journal of microencapsulation**, v. 30, n. 1, p. 1–9, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. **Histologia Básica**, ed, v. 9, p. 303–309, 2004.

KAFI, R. et al. Improvement of naturally aged skin with vitamin A (retinol). **Archives of dermatology**, v. 143, n. 5, p. 606–612, maio 2007.

KAMAT, D. K.; CHAVAN, A. P.; PATIL, P. M. Bio-Impedance Measurement System for Analysis of Skin Diseases. **System**, v. 3, n. 2, 2014.

KAMM, J. J. Toxicology, carcinogenicity, and teratogenicity of some orally administered retinoids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 6, n. 4 Pt 2 Suppl, p. 652–659, abr. 1982.

KAWABATA, K. et al. A new objective histological scale for studying human photoaged skin. **Skin Research and Technology**, v. 20, n. 2, p. 155–163, 2014.

KAWASAKI, K.; YAMANISHI, K.; YAMADA, H. Age-related morphometric changes of inner structures of the skin assessed by in vivo reflectance confocal microscopy. **International Journal of Dermatology**, v. 54, n. 3, p. 295–301, mar. 2015.

KELLER, K. L.; FENSKE, N. A. Uses of vitamins A, C, and E and related compounds in dermatology: A review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 4, p. 611–625, 1 nov. 2015.

KIM, R. H.; ARMSTRONG, A. W. Nonmelanoma skin cancer. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 1, p. 125–139, 2012.

KIMLIN, M. G.; GUO, Y. Assessing the impacts of lifetime sun exposure on skin damage and skin aging using a non-invasive method. **Science of The Total Environment**, v. 425, p. 35–41, 15 maio 2012.

KLIGMAN, A. M. et al. Topical tretinoin for photoaged skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 836–859, 1986.

KLIGMAN, A. M. Topical retinoic acid (tretinoin) for photoaging: conceptions and misperceptions. **Cutis**, v. 57, n. 3, p. 142–144, mar. 1996.

KLIGMAN, L. H.; KLIGMAN, A. M. The nature of photoaging: its prevention and repair. **Photodermatology**, v. 3, n. 4, p. 215–227, 1986.

KOTTNER, J. et al. Guidelines for Reporting Reliability and Agreement Studies (GRRAS) were proposed. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 64, n. 1, p. 96–106, 2011.

KOTTNER, J. et al. Comparison of two in vivo measurements for skin surface topography. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 2, p. 84–90, 2013.

KOTTNER, J.; LICHTERFELD, A.; BLUME-PEYTAVI, U. Transepidermal water loss in young and aged healthy humans: a systematic review and meta-analysis. **Archives of dermatological research**, v. 305, n. 4, p. 315–323, maio 2013.

KRUEGER, N. et al. Age-related changes in skin mechanical properties: a quantitative evaluation of 120 female subjects. **Skin Research and Technology**, v. 17, n. 2, p. 141–148, 1 maio 2011.

LAMBERS, H. et al. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 5, p. 359–370, out. 2006.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563–569, 2002.

LEVEQUE, J. L. EEMCO guidance for the assessment of skin topography. The European Expert Group on Efficacy Measurement of Cosmetics and other Topical Products. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 12, n. 2, p. 103–114, mar. 1999.

LIEBEL, F. et al. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1901–1907, 2012.

LONGO, C. et al. Proposal for an in vivo histopathologic scoring system for skin aging by means of confocal microscopy. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 1, p. e167–73, 2013a.

LONGO, C. et al. Skin aging: In vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 3, p. e73–e82, 2013b.

LUEBBERDING, S.; KRUEGER, N.; KERSCHER, M. Age-related changes in skin barrier function - quantitative evaluation of 150 female subjects. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 2, p. 183–190, abr. 2013.

LUEBBERDING, S.; KRUEGER, N.; KERSCHER, M. Mechanical properties of human skin in vivo: a comparative evaluation in 300 men and women. **Skin Research and Technology**, v. 20, n. 2, p. 127–135, 1 maio 2014.

LUPO, M. P. Antioxidants and vitamins in cosmetics. **Clinics in dermatology**, v. 19, n. 4, p. 467–473, 2001.

MADISON, K. C. Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Etre" of the Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231–241, 23 jul. 2003.

MAHMOUD, B. H. et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 8, p. 2092–2097, ago. 2010.

MAIA CAMPOS, P. M. et al. Synergistic effects of green tea and ginkgo biloba extracts on the improvement of skin barrier function and elasticity. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 13, n. 9, p. 1092–1097, 2014.

MAIA CAMPOS, P. M. et al. Comparative effects of retinoic acid or glycolic acid vehiculated in different topical formulations. **Biomedical Research International**, v. 2015, p. 650316, 2015.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G. et al. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 3, p. 580–586, 2012.

MAIA CAMPOS, P.; MARA SILVA, G. Ascorbic acid and its derivatives in cosmetic formulations. **Cosmetics and toiletries**, v. 115, n. 6, p. 59–62, 2000.

MAJDZADEH, A. et al. Real-time visualization of melanin granules in normal human skin using combined multiphoton and reflectance confocal microscopy. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 2015.

MANÇO, L. M. et al. Development of cosmetic formulations containing glucan polymer of Cassava (*Manihot esculenta*): stability and sensory analysis. 2015.

MANFREDINI, M. et al. Acne: in vivo morphologic study of lesions and surrounding skin by means of reflectance confocal microscopy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 29, n. 5, p. 933–939, maio 2015.

MARCO, M. et al. Does skin hydration influence keratinocyte biology? In vivo evaluation of microscopic skin changes induced by moisturizers by means of Reflectance Confocal Microscopy. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 3, p. 299–307, 2013.

MARRAKCHI, S.; MAIBACH, H. I. Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. **Contact Dermatitis**, v. 57, n. 1, p. 28–34, 1 jul. 2007.

MARX, S. Guidelines on stability testing of cosmetics product. **Cosmetics Europe–The Personal Care Association. Colipa**, 2004.

MASON, T. G. New fundamental concepts in emulsion rheology. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 4, n. 3, p. 231–238, 1999.

MATSUI, M. S. et al. **Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen**Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. **Anais...**Nature Publishing Group, 2009

MBG, P. M. C. et al. An Oral Supplementation Based on Hydrolyzed Collagen and Vitamins Improves Skin Elasticity and Dermis Echogenicity: A Clinical Placebo-Controlled Study. **Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics**, v. 2015, 2015.

MCGRATH, J. A.; ROBINSON, M. K.; BINDER, R. L. Skin differences based on age and chronicity of ultraviolet exposure: results from a gene expression profiling study. **British Journal of Dermatology**, v. 166 Suppl , p. 9–15, 2012.

MENON, G. K.; KLIGMAN, A. M. Barrier functions of human skin: a holistic view. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 4, p. 178–189, 2009.

MINE, S. et al. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. **PloS one**, v. 3, n. 12, p. e4066, 2008.

MIZUKOSHI, K. et al. Changes in dermal papilla structures due to aging in the facial cheek region. **Skin Research and Technology**, v. 21, n.2, p. 224-231, 2015.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell biology international**, v. 20, n. 1, p. 15–27, jan. 1996.

MUKHERJEE, S. et al. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. **Clinical Interventions in Aging**, v. 1, n. 4, p. 327–348, dez. 2006.

NISHIMORI, Y. et al. Degenerative Alterations of Dermal Collagen Fiber Bundles in Photodamaged Human Skin and UV-Irradiated Hairless Mouse Skin: Possible Effect on Decreasing Skin Mechanical Properties and Appearance of Wrinkles. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 117, n. 6, p. 1458–1463, 2001.

NJAR, V. C. O. et al. Retinoids in Clinical Use. **Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 4, p.431-438, 2006.

NOUVEAU-RICHARD, S. et al. Skin ageing: a comparison between Chinese and European populations: a pilot study. **Journal of dermatological science**, v. 40, n. 3, p. 187–193, 2005.

O'GOSHI, K.-I.; SERUP, J. Inter-instrumental variation of skin capacitance measured with the Corneometer. **Skin Research and Technology**, v. 11, n. 2, p. 107–109, maio 2005.

OHSHIMA, H. et al. Use of Cutometer area parameters in evaluating age-related changes in the skin elasticity of the cheek. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 1, p. e238–e242, 1 fev. 2013.

OKANO, Y. et al. Improvement of wrinkles by an all-trans-retinoic acid derivative, D- $\delta$ -tocopheryl retinoate. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 2, n. 1, p. S65–S74, 2006.

PADAMWAR, M. N.; POKHARKAR, V. B. Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. **International journal of pharmaceutics**, v. 320, n. 1, p. 37–44, 2006.

PARENTE, M. E.; GAMBARO, A.; ARES, G. Sensory characterization of emollients. **Journal of Sensory Studies**, v. 23, n. 2, p. 149–161, 2008.

PATHAK, M. A. et al. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun-protective agents. **Dermatology in General Medicine**, v. 4, p. 1689–1717, 1993.

PEDERSEN, L.; JEMEC, G. B. E. Mechanical properties and barrier function of healthy human skin. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 86, n. 4, p. 308–311, 2006.

PELLACANI, G. et al. IN vivo confocal microscopic and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions. **Archives of Dermatology**, v. 144, n. 12, p. 1597–1608, 2008.

PELLACANI, G.; SEIDENARI, S. Variations in facial skin thickness and echogenicity with site and age. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 79, n. 5, p. 366–369, set. 1999.

PENA FERREIRA, M. R.; COSTA, P. C.; BAHIA, F. M. Efficacy of anti-wrinkle products in skin surface appearance: a comparative study using non-invasive methods. **Skin Research and Technology**, v. 16, n. 4, p. 444–449, 2010a.

PENA FERREIRA, M. R.; COSTA, P. C.; BAHIA, F. M. Efficacy of anti-wrinkle products in skin surface appearance: a comparative study using non-invasive methods. **Skin Research and Technology**, v. 16, n. 4, p. 444–449, 2010b.

PENSÉ-LHÉRITIER, A.-M. Recent developments in the sensorial assessment of cosmetic products: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 5, p. 465–473, 1 out. 2015.

PEREIRA, S. V. **Sistemas microestruturados contendo extratos de Chamomilla recutita L. para aplicações dermocosméticas** Universidade de São Paulo, , [2015].

PIERARD, G. E. In vivo confocal microscopy: a new paradigm in dermatology. **Dermatology**, v. 186, n. 1, p. 4–5, 1993.

PIERARD, G. E. EEMCO guidance for the assessment of skin colour. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 10, n. 1, p. 1–11, jan. 1998.

- PIERARD, G. E. EEMCO guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 1: relevance to the structures and ageing of the skin and subcutaneous tissues. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 12, n. 6, p. 352–362, 1999.
- PIÉRARD, G. E.; UHODA, I.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. From skin microrelief to wrinkles. An area ripe for investigation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 1, p. 21–28, 1 jan. 2003.
- PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1–2, 2003.
- POLEFKA, T. G. et al. Effects of solar radiation on the skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 134–143, jun. 2012.
- POON, F.; KANG, S.; CHIEN, A. L. Mechanisms and treatments of photoaging. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 31, n. 2, p. 65–74, mar. 2015.
- POURADIER, F. et al. Functional and structural age-related changes in the scalp skin of Caucasian women. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 4, p. 384–393, 1 nov. 2013.
- PROST-SQUARCIONI, C. et al. [Functional histology of dermis]. **Annales de Dermatologie et de Venerologie**, v. 135, n. 1 Pt 2, p. 1S5–20, jan. 2008.
- QUAN, T. et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Procedures**, v. 14, n. 1, p. 20–24, 2009.
- RABE, J. H. et al. Photoaging: Mechanisms and repair. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1–19, 2006.
- RAJADHYAKSHA, M.; GROSSMAN, M.; ESTEROWITZ, D. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, p. 946–952, 1995.
- RANDHAWA, M. et al. Visible Light Induces Melanogenesis in Human Skin through a Photoadaptive Response. **PloS One**, v. 10, n. 6, p. e0130949, 2015.
- RICCI, G.; SEMPRINI, M. Histopathological, morphometric, and stereologic studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid. **Journal of Cosmetic Science**, v. 50, p. 159–170, 1999.
- RICHERT, S.; SCHRADER, A.; SCHRADER, K. Transdermal delivery of two antioxidants from different cosmetic formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 25, n. 1-2, p. 5–13, 1 abr. 2003.
- RODRIGUES, L. EEMCO guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 2: instrumentation and test modes. **Skin pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, n. 1, p. 52–67, 2001.
- ROGIERS, V. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, n. 2, p. 117–128, 2001.
- SAUERMAN, K. et al. Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. **Skin Research and Technology**, v. 8, n. 1, p. 52–56, 2002.

SCHALKA, S. et al. Brazilian consensus on photoprotection. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 6 Suppl 1, p. 1–74, 2014.

SCHROEDER, P. et al. Photoprotection beyond Ultraviolet Radiation – Effective Sun Protection Has to Include Protection against Infrared A Radiation-Induced Skin Damage. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 1, p. 15–17, 2010.

SCOPE, A. et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: Consensus terminology glossary and illustrative images. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 4, p. 644–658, 2007.

SEPULVEDA, E.; KILDSIG, D. O.; GHALY, E. S. Relationship between internal phase volume and emulsion stability: the cetyl alcohol/stearyl alcohol system. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 8, n. 3, p. 263–275, ago. 2003.

SHAH, H.; RAWAL MAHAJAN, S. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 3, n. 3, p. 161–169, jul. 2013.

SHAPIRO, S. S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 839–844, 2001.

SOARES, J. L. M. et al. Cellulite: poor correlation between instrumental methods and photograph evaluation for severity classification. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 1, p. 134–140, 2015.

SORG, O.; SAURAT, J.-H. Topical Retinoids in Skin Ageing: A Focused Update with Reference to Sun-Induced Epidermal Vitamin A Deficiency. **Dermatology**, v. 228, n. 4, p. 314–325, 2014.

SORRELL, J. M.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 200, n. 1, p. 134–145, jul. 2004.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 5, p. 667–675, 30 jan. 2004.

SWINDELLS, K. et al. Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 2, p. 220–228, 2004.

TACON, L. A.; FREITAS, L. A. P. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 65–71, 2013.

TADROS, T. Principles of emulsion stabilization with special reference to polymeric surfactants. **Journal of Cosmetic Science**, v. 57, n. 2, p. 153–169, 2006.

TAGAMI, H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 6, p. 413–434, dez. 2008.

TAKEMA, Y. et al. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. **British Journal of Dermatology**, v. 131, n. 5, p. 641–648, 1994.

TALWAR, H. S.; GRIFFITHS, C. E. M.; FISHER, G. J. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 105, p. 285–290, 1995.

TANCRÈDE-BOHIN, E. et al. Non-invasive short-term assessment of retinoids effects on human skin in vivo using multiphoton microscopy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 4, p. 673–681, 1 abr. 2015.

THIELE, J. J.; HSIEH, S. N.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S. Vitamin E: critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 7 Pt 2, p. 805–13; discussion 813, 2005.

TIMPL, R. Macromolecular organization of basement membranes. **Current opinion in cell biology**, v. 8, n. 5, p. 618–624, out. 1996.

TROJAHN, C. et al. Reliability and validity of two in vivo measurements for skin surface topography in aged adults. **Skin Research and Technology**, v. 21, n. 1, p. 54–60, 2015.

TSOURELI-NIKITA, E.; WATSON, R. E.; GRIFFITHS, C. E. Photoageing: the darker side of the sun. **Photochemistry and Photobiology Sciences**, v. 5, n. 2, p. 160–164, 2006.

ULRICH, J. et al. Sonographic diagnostics in dermatology. **Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 12, n. 12, p. 1083–98; quiz 1099, dez. 2014.

ULRICH, M. et al. Comparison of UV-induced skin changes in sun-exposed vs. sun-protected skin-preliminary evaluation by reflectance confocal microscopy. **British Journal of Dermatology**, v. 161, p. 46–53, 2009.

UNHOLZER, A.; KORTING, H. C. High-frequency ultrasound in the evaluation of pharmacological effects on the skin. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 15, n. 2, p. 71–84, 2002.

USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives of histology and cytology**, v. 65, n. 2, p. 109–126, jun. 2002.

VANDERSEE, S. et al. Blue-Violet Light Irradiation Dose Dependently Decreases Carotenoids in Human Skin, Which Indicates the Generation of Free Radicals. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015.

WAGEMAKER, T. A. L. et al. Green Coffea arabica L. seed oil influences the stability and protective effects of topical formulations. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 34–40, 2015.

WALLER, J. M.; MAIBACH, H. I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. **Skin research and technology**. v. 11, n. 4, p. 221–235, nov. 2005.

WANG, F. et al. Dermal damage promoted by repeated low-level uv-a1 exposure despite tanning response in human skin. **JAMA Dermatology**, v. 150, n. 4, p. 401–406, 1 abr. 2014.

WARREN, R. et al. Age, sunlight and facial skin: a histological and quantitative study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, p. 751–760, 1991.

WATSON, R. E. B. et al. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin: Distribution at the dermal-epidermal junction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, p. 782–787, 1999.



WEBB, A.; LI, A.; KAUR, P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 72, n. 8, p. 387–95, out. 2004.

WEBSTER, G. F. Evidence-based review: fixed-combination therapy and topical retinoids in the treatment of acne. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, v. 10, n. 6, p. 636–644, jun. 2011.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 10, p. S98–S110, 6 out. 2015.

WLASCHEK, M. et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1–3, p. 41–51, 2001.

WÖLFLE, U. et al. Reactive Molecule Species and Antioxidative Mechanisms in Normal Skin and Skin Aging. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 6, p. 316–332, 2014.

WORTEL, V. A. L.; WIECHERS, J. W. Skin sensory performance of individual personal care ingredients and marketed personal care products. **Food quality and preference**, v. 11, n. 1, p. 121–127, 2000.

WURM, E. M. et al. In vivo assessment of chronological ageing and photoageing in forearm skin using reflectance confocal microscopy. **British Journal Dermatology**, v. 167, n. 2, p. 270–279, 2012a.

WURM, E. M. T.; SOYER, H. P. The confocal story. In: **Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases**. [s.l.] Springer, 2012. p. 3–5.

XIANG, W. et al. In vivo visualization of honeycomb pattern, cobblestone pattern, ringed pattern, and dermal papillae by confocal laser scanning microscopy. **Skin research and technology**, mar. 2015.

ZASTROW, L. et al. The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. **Skin pharmacology and physiology**, v. 22, n. 1, p. 31–44, 2009.

ZOUBOULIS, C. C.; MAKRANTONAKI, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in dermatology**, v. 29, n. 1, p. 3–14, 2011.



**ANEXO 1 – Carta de Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP.**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 082/2012  
kms

Ribeirão Preto, 12 de dezembro de 2012.

À Pós-graduanda  
**Daiani Garcia Mercúrio**  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia M. B. G. Maia Cammpos  
FCFRP/USP

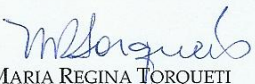
Prezada Pós-graduanda

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP **aprovou**, em sua 110<sup>a</sup> Sessão Ordinária, realizada em 11 de dezembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DA PELE FOTOENVELHECIDA, DESENVOLVIMENTO E EFICÁCIA CLÍNICA DE FORMULAÇÕES DERMOCOSMÉTICAS POR TÉCNICAS DE BIOFÍSICA E ANÁLISE DE IMAGEM", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 276.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

  
PROF.ª DR.ª MARIA REGINA TORQUETI  
Coordenadora do CEP/FCFRP

## ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Termo de consentimento** (frente)

**Pesquisadora responsável:** Daiane Garcia Mercurio

**Médico responsável:** Dr. João Carlos Lopes Simão (CRM: 94214)

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Meu nome é Daiane Garcia Mercurio, sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e gostaria de lhe convidar para participar da minha pesquisa como voluntária. Estou desenvolvendo a pesquisa **“Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e análise de imagem”** na qual serão avaliados a estabilidade e os efeitos da aplicação de emulsões cosméticas contendo, ou não, *Tocoretinate*, éster de vitamina A e éster de vitamina E por métodos que avaliam a pele sem causar nenhum dano.

Para tal, antes do estudo será realizada a caracterização da pele, por avaliação do pesquisador (irá avaliar manchas, rugas, textura, poros e firmeza da pele) e por questionário de autoavaliação. Depois, serão realizadas medidas no tempo inicial para a obtenção dos valores basais (medidas na pele sem aplicação do produto cosmético) e após 2, 4 e 8 horas (efeitos imediatos) e após 14, 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações, determinando-se a hidratação, a “perda de água pela pele”, a textura, a elasticidade, a firmeza, as características e espessura da epiderme e da derme e a presença de poros e manchas na pele, utilizando-se equipamentos que avaliam a pele de maneira não invasiva, ou seja, sem causar corte, dor ou qualquer tipo de desconforto, pois possuem sondas especiais, que são somente encostadas na pele durante a leitura.

As formulações serão aplicadas na face, no dorso das mãos e na parte do braço onde há poucos pelos, entre o cotovelo e o punho (região interna do antebraço), sendo que em um dos antebraços não será aplicada nenhuma formulação (controle). Você receberá uma embalagem cosmética (bisnaga) contendo a formulação que será estudada. No rótulo da embalagem consta a região de aplicação da formulação (face e/ou qual região do antebraço), bem como a frequência e períodos de aplicação, ou seja, duas vezes ao dia, todos os dias durante os 84 dias do experimento. Na primeira visita, serão agendadas as próximas visitas (após 14, 28, 56 e 84 dias) e durante estes dias serão realizadas as mesmas análises novamente. Após o uso do produto, você receberá perguntas relacionadas à percepção de eficácia de uso do mesmo. Na avaliação sensorial as formulações contendo ou não as substâncias ativas serão aplicadas no seu antebraço, e após dez movimentos ordenados circulares, você preencherá uma ficha de avaliação frente aos parâmetros sensoriais durante e após 5 minutos de aplicação.

O principal efeito esperado com o uso destas formulações é o aumento da hidratação, melhora da textura e aparência da pele, melhora de rugas, poros, manchas e aumento da firmeza da pele. Porém, as formulações poderão eventualmente causar vermelhidão e/ou coceira, o que pode ocorrer com o uso de qualquer formulação cosmética, mas para a sua segurança haverá acompanhamento da pesquisa pela pesquisadora e pelo médico, responsáveis pela mesma, sendo que, caso você venha a apresentar o menor sinal de alguma reação indesejável, você será imediatamente excluída da pesquisa e serão tomadas todas as providências necessárias para a recuperação do estado normal da sua pele e para que não fiquem seqüelas, estando nós pesquisadores obrigados a arcar com as despesas necessárias para isto.

Se você está de acordo em participar da pesquisa, posso garantir-lhe que as informações fornecidas serão confidenciais e somente serão utilizadas neste trabalho, e se houver interesse de sua parte, os resultados lhes serão fornecidos. Se tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, poderá entrar em contato comigo por meio dos telefones: (16) 3234-7594 ou (16) 91192742 ou no endereço: Rua Floriano Peixoto, nº 870, ap.124 - Centro - Ribeirão Preto-SP, com o médico responsável pela pesquisa por meio do telefone: (16) 3602-2447 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa que esta pesquisa está cadastrada: (16) 3602-4213

Daiane Garcia Mercurio  
PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

PESQUISADORA

**Termo de consentimento (verso)**

**EU:** \_\_\_\_\_,

**R.G. n°:** \_\_\_\_\_, abaixo assinado, acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) sobre a pesquisa “Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e análise de imagem” e tendo recebido as informações contidas neste termo de consentimento, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar como voluntário da pesquisa citada.

- 1 – A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 2 – A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar do estudo sem que isso me traga alguma penalidade ou prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- 3 – A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
- 4 – O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
- 5 – A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
- 6 – Que se existirem gastos adicionais, o valor gasto será reembolsado pelo orçamento da pesquisa.
- 7 – Que se ocorrerem reações adversas na pele (como alergia, irritações e outras), decorrente da aplicação local das formulações, os voluntários deverão interromper imediatamente o uso destas.
- 8- Que receberei uma cópia deste termo de compromisso.

**Tenho ciência do exposto acima e desejo colaborar com a pesquisa.**

*Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_*

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário



## APÊNDICE 1 – Questionário de autoavaliação

### CARACTERÍSTICAS DA PELE

1) Você está descontente com a aparência da pele do seu rosto?

( ) Sim ( ) Não

2) Qual alteração na pele do seu rosto que te incomoda?

( ) Ressecamento ( ) Rugas finas ( ) Rugas profundas ( ) Manchas claras ( ) Manchas escuras  
( ) Flacidez (pele não está firme) ( ) Aspreza da pele ( ) Sardas ( ) Vermelhidão ( ) Poros  
abertos ( ) Oleosidade ( ) Acne ( ) Bolsas e olheiras ( ) Pintas.

Outros: \_\_\_\_\_

3) Já procurou tratamento para essa(s) alteração(ões)?

( ) Sim ( ) Não. Se sim, qual? \_\_\_\_\_

### PERGUNTAS GERAIS

4) Você utiliza cosméticos para cuidar da região do(a):

( ) Rosto ( ) Olhos ( ) Colo ( ) Mãos ( ) Corpo ( ) Outros: \_\_\_\_\_ ( ) Nenhum

5) Quais cosméticos você usa:

( ) No rosto: \_\_\_\_\_

( ) Nas mãos: \_\_\_\_\_

( ) Nos braços: \_\_\_\_\_

6) Já fez ou faz algum tipo de tratamento estético? ( ) Sim ( ) Não Qual?

( ) Laser ( ) Peeling ( ) Luz Pulsada. Quando? \_\_\_\_\_

7) Quantidade de água ingerida diariamente, em copos:

( ) 1 a 3, ( ) 4 a 6, ( ) 7 a 9, ( ) mais de 10 copos

8) Você é/já foi fumante?

( ) Não ( ) Sim

9) Método anticoncepcional:

( ) não ( ) pílula ( ) DIU ( ) outros: \_\_\_\_\_

10) Está na menopausa: ( ) Sim ( ) Não. Faz reposição Hormonal? ( ) Não ( ) Sim

11) Reações alérgicas a cosméticos: ( ) Sim ( ) Não

Quais? \_\_\_\_\_

12) Possui algum caso de câncer de pele na família?

( ) Sim ( ) Não

**EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO SOLAR ATUAL**

- 13) Quanto tempo você se expõe ao sol diariamente?  
( ) Menos de 1 hora por dia ( ) Entre 1 hora e 3 horas por dia ( ) Entre 3 horas e 6 horas por dia  
( ) Mais de 6 horas por dia
- 14) Qual o motivo da sua exposição solar?  
( ) Bronzeamento ( ) Lazer ( ) Forma ocupacional (trabalho) ( ) Prática de exercícios físicos/esportes ( ) Apenas para me deslocar de um lugar para outro ( )  
Outros: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 15) Já fez bronzeamento artificial?  
( ) Sim ( ) Não
- 16) Com que frequência você se bronzeia (banhos de sol):  
( ) Nunca  
( ) Raramente (0-1 vez ao mês)  
( ) Esporadicamente (1 - 3 vezes ao mês)  
( ) Frequentemente ( mais de 3 vezes ao mês)
- 17) Utiliza protetor solar?  
( ) Todos os dias (mesmo em dias nublados),  
( ) Apenas quando está sol,  
( ) Quando irá se expor ao sol por muito tempo,  
( ) Quando lembro (raramente),  
( ) Apenas quando vou a praia/piscina,  
( ) Apenas quando pratico exercícios físicos/esportes,  
( ) Quando sinto o sol queimando,  
( ) Apenas durante o verão  
( ) Nunca
- 18) Com que frequência aplica durante o dia?  
( ) uma vez ( ) duas vezes ( ) três vezes ou mais
- 19) Qual o Fator de Proteção Solar do filtro solar que você usa no rosto?  
( ) 15 ( ) 20 ( ) 30 ( ) 50 ( ) 60 Outro \_\_\_\_\_
- 20) Qual o Fator de Proteção Solar do filtro solar que você usa nas outras partes do corpo?  
( ) 15 ( ) 20 ( ) 30 ( ) 50 ( ) 60 Outro \_\_\_\_\_



**HISTÓRICO DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO SOLAR**

- 21) Já sofreu queimaduras solares (vermelhidão, bolhas)?  
( ) Sim ( ) Não. Se sim, em qual região do corpo?
- 

**Em relação aos seus hábitos de exposição solar e proteção solar até 15 anos de idade:**

- 22) Em média, quanto tempo você se expunha ao sol diariamente?  
( ) Menos de 1 hora por dia ( ) Entre 1 hora e 3 horas por dia ( ) Entre 3 horas e 6 horas por dia  
( ) Mais de 6 horas por dia

- 23) Com que frequência você se bronzeava (banhos de sol):  
( ) Nunca ( ) Raramente (0-1 vez ao mês) ( ) Esporadicamente (1 - 3 vezes ao mês)  
( ) Frequentemente ( mais de 3 vezes ao mês)

- 24) Você usava protetor solar?  
( ) Nunca ( ) Raramente ( ) Frequentemente ( ) Sempre

**Em relação aos seus hábitos de exposição solar entre 16 a 25 anos:**

- 25) Em média, quanto tempo você se expunha ao sol diariamente?  
( ) Menos de 1 hora por dia ( ) Entre 1 hora e 3 horas por dia ( ) Entre 3 horas e 6 horas por dia  
( ) Mais de 6 horas por dia

- 26) Com que frequência você se bronzeava (banhos de sol):  
( ) Nunca ( ) Raramente (0-1 vez ao mês) ( ) Esporadicamente (1 - 3 vezes ao mês)  
( ) Frequentemente ( mais de 3 vezes ao mês)

- 27) Você usava protetor solar?  
( ) Nunca ( ) Raramente ( ) Frequentemente ( ) Sempre

**Em relação aos seus hábitos de exposição solar entre 26 a 35 anos:**

- 28) Em média, quanto tempo você se expunha ao sol diariamente?  
( ) Menos de 1 hora por dia ( ) Entre 1 hora e 3 horas por dia ( ) Entre 3 horas e 6 horas por dia  
( ) Mais de 6 horas por dia

- 29) Com que frequência você se bronzeava (banhos de sol):  
( ) Nunca ( ) Raramente (0-1 vez ao mês) ( ) Esporadicamente (1 - 3 vezes ao mês)  
( ) Frequentemente ( mais de 3 vezes ao mês)

- 30) Você usava protetor solar?  
( ) Nunca ( ) Raramente ( ) Frequentemente ( ) Sempre