

**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^a. Dr^a. 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

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- δ -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.

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).

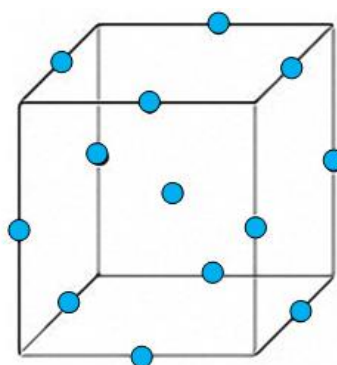


Figura 1- Representação esquemática dos pontos do planejamento Box-Behnken no cubo multidimensional.

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 epidérmicas, 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- β (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 α -tocoferol é o homólogo de maior abundância. A vitamina E (α -tocoferol) tem sido descrita como o mais importante antioxidante lipossolúvel ligado à membrana celular (THIELE; HSIEH; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, 2005).

O α -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 α -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 α -tocoferila.

O acetato de α -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- δ -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- δ -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 α -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 α -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 α -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 α -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- δ -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*[®], *Tewameter*[®], *Cutometer*[®], e *Colorimeter*[®] 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*[®] (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 mm², 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[®] (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[®], 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⁻².h⁻¹ (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[®] (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[®] 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[®] 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[®]) 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 (GNIADHECKA 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 μm (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).

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 transepidermica 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>. 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- δ -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.