

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

**BIANCA APARECIDA MARTIN**

**Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de  
Cold Cream em pacientes portadores de dermatite atópica**

Ribeirão Preto  
2019

BIANCA APARECIDA MARTIN

Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de Cold  
Cream em pacientes portadores de dermatite atópica

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e  
Cosméticos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Renata Fonseca  
Vianna Lopez

Ribeirão Preto  
2019

MARTIN,  
B.A.

Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de  
Cold Cream em pacientes portadores de dermatite atópica

Espaço de **2,5**  
**cm** reservado  
para etiqueta de  
localização da  
biblioteca

MESTRADO  
FCFRPUSP  
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Martin, Bianca Aparecida

Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de Cold Cream em pacientes portadores de dermatite atópica. Ribeirão Preto, 2019.

93 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Lopez, Renata Fonseca Vianna

1. Cold Cream. 2. Dermatite atópica. 3. Extrato de própolis verde.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Bianca Aparecida Martin

Título do trabalho: Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de Cold Cream em pacientes portadores de dermatite atópica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

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

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

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

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

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

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

A minha família, em especial meus pais Amélia e Claudinei e minha irmã Luma, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todas as minhas escolhas profissionais e pessoais e me dando forças para que esse sonho fosse possível se tornar realidade. Ao Rafael, meu namorado e companheiro de todas as horas. Aos meus amigos especiais, que de perto ou de longe sei que sempre estiveram torcendo por mim. À Deus por mais essa grande oportunidade e etapa concluída da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Claudinei e Amélia e a minha irmã Luma, por todo apoio, incentivo em todas as minhas escolhas e força para que mais essa etapa da minha vida fosse concluída com muito sucesso.

Ao meu namorado Rafael, pelo companheirismo, ajuda e entendimento nos momentos de ausência para realização deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, muito obrigada por toda confiança em meu trabalho, incentivo e motivação para que esse trabalho pudesse ser realizado da melhor maneira. Obrigada pelos ensinamentos, ajuda, carinho e principalmente por fazer eu acreditar que tudo isso seria possível e me mostrar que sou capaz de muitas coisas que nem eu imaginava que pudesse conseguir. Obrigada pela oportunidade de fazer parte do Centro de Inovação em Sistemas Nanoestruturados e de Administração Tópica (NanoTop) da FCFRP-USP.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Leonardo Régis Leira Pereira por todas as orientações, ensinamentos e oportunidades. À toda equipe do CPAFF, pelo acolhimento maravilhoso e por toda ajuda durante a realização deste trabalho.

À técnica Patrícia Sper, técnica do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pelo apoio e disponibilidade em ajudar.

Aos meus amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Íris, Gabriela, Camila Cubayachi, Camila Lemos, Danielle, Luciana, Paula, Raquel, Abayomi e Yugo, pelo compartilhamento de novas experiências, aprendizados, cotidiano de bancadas e acima de tudo, bons momentos. Agradeço especialmente à Camila Lemos, Luciana e Íris, por me ajudarem muito nos experimentos, ideias, sempre me apoiando e me ajudando com muita paciência e dedicação para que o trabalho ficasse da melhor forma possível.

À Me. Estael Luzia Coelho Madeira da Cruz e Maurílio Polizello Júnior por todas as ajudas, compreensão, paciência, disposição em ajudar e disponibilidade em utilizar a Farmácia Ensino.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), pela oportunidade de realizar o meu trabalho, aos médicos, residentes e funcionários do ambulatório de dermatologia, pela compreensão e auxílio durante a realização do estudo clínico em humanos, especialmente à Dra. Renata Nahas Cardili, pela ajuda nas análises do estudo clínico.

Aos médicos e funcionários do ambulatório de alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), obrigada pela disponibilidade e ajuda para realização do estudo piloto clínico em humanos.

Ao Maurílio Cazarim pela ajuda e paciência na realização das estatísticas do ensaio clínico em humanos.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e à doutoranda Caroline Arruda que me ajudou na realização dos testes de própolis no HPLC, obrigada por todos ensinamentos e ajuda para realização dos experimentos.

À Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca e ao técnico José Roberto Jabor, por toda ajuda e atenção na realização dos testes antioxidantes.

À técnica Cristina e Pós-Doutoranda Paula, obrigada por toda ajuda relacionada a análise da cera de abelha e extrato de própolis.

À Profa. Dra. Lucia Facioli e técnica Alyne Fávero Galvão pela realização dos testes de elisa.

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela oportunidade de aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CAPES pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 2017/19193-4) e pelo suporte financeiro (Processo nº 2014/22451-7) concedido ao laboratório.

E a todos que contribuíram e torceram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

Muito obrigada.



“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”.

(Eleanor Roosevelt)

## RESUMO

MARTIN, B. A. **Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de Cold Cream em pacientes portadores de dermatite atópica.** 2019. 093f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A dermatite atópica (DA) é uma inflamação crônica da pele que geralmente provoca prurido intenso e lesões eczematosas. A ausência de tratamentos seguros e eficazes faz com que o tradicional *Cold Cream*, creme água-em-óleo composto por cera de abelha e bórax seja usado na prática clínica para aliviar os sintomas da DA. São poucos, no entanto, os estudos científicos que comprovam sua eficácia. Além disso, sua formulação oficial, o *Cold Cream* Farmacopeico, apresenta baixa estabilidade. O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar formulações de *Cold Cream* estáveis e entender sua contribuição no tratamento da DA. Para tanto, o impacto da pureza da cera de abelha que compõe os cremes nas características mecânicas, de textura e reológicas foi investigado. Com a identificação de componentes da própolis verde na cera de abelha bruta, suas propriedades anti-inflamatórias foram avaliadas *in vitro* e comparadas àquelas de um extrato de própolis verde padronizado. O efeito do uso do *Cold Cream*, adicionado ou não de própolis na mesma concentração que a presente na cera de abelha bruta, na qualidade de vida, gravidade da doença e hidratação da pele de pacientes com DA do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (CAAE 83521418.5.0000.5403) também foi estudado. A identificação dos componentes majoritários das ceras de abelha bruta e purificada foi realizada por CG/MS. Componentes característicos da própolis verde foram separados por HPLC na cera bruta, e o artepelin C, marcador da própolis, quantificado. O tratamento de cultura de macrófagos (AMJ-2), estimulados com LPS, com 6,25 a 25 µg/mL de extrato metanólico da cera de abelha bruta, relativos a 3,5 a 14 ng/mL de artepelin C, resultou na redução significativa dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ , sugerindo um efeito anti-inflamatório do extrato da cera de abelha bruta. Cremes preparados com estabilizantes e a cera de abelha bruta (*Cold Cream B.*) ou purificada (*Cold Cream P.*), esta última acrescida ou não de 2,3 mg/100 g de própolis verde (*Cold Cream P. + Própolis*), mantiveram suas características reológicas e organolépticas durante os 60 dias de armazenamento. O *Cold Cream* Farmacopeico, por outro lado, apresentou alterações no comportamento reológico e separação de parte da fase oleosa já após 30 dias. Esse *Cold Cream*, no entanto, também preparado com cera de abelha purificada, apresentou propriedades mecânicas e de bioadesão semelhantes às apresentadas pelos *Cold Cream P.* e *Cold Cream P. + Própolis*. O *Cold Cream B.*, por sua vez, apresentou dureza e compressibilidade quase 3 vezes menores do que os cremes feitos com a cera purificada, além de maiores valores de coesividade, força e trabalho de bioadesão. No estudo clínico, o *Cold Cream* apresentou, de forma geral, capacidade de evitar a agudização da doença. A avaliação do conjunto de instrumentos aplicados para cada paciente sugeriu que a adição de uma pequena concentração de própolis no *Cold Cream* melhorou a qualidade de vida do paciente, hidratação e gravidade da doença.

Palavras-chave: dermatite atópica, Cold Cream, extrato de própolis verde.

## ABSTRACT

MARTIN, B. A. **Evaluation of the effectiveness and safety of a new formulation of Cold Cream in patients with atopic dermatitis.** 2019. 093f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disorder, frequently characterized by severe itching and eczematous lesions. The traditional *Cold Cream*, an water-in-oil cream made up by beeswax and borax, is used in the clinical practice to relieve AD symptoms, although its effectiveness has not scientifically been proved. Furthermore, the officinal formula of this cream, the *Cold Cream Pharmacopoeia*, presents a low physical stability. Therefore, this work aimed to prepare and characterize stable *Cold Cream* formulations and understand how *Cold Cream* can contribute with AD treatment. The influence of beeswax purity of the creams on the mechanical, texture and rheological characteristics was investigated. The components of the green propolis present in raw beeswax were identified and anti-inflammatory properties were investigated *in vitro* and compared to a standardized extract of green propolis. The effect of using propolis-free and propolis-added (at the same concentration as raw beeswax) *Cold Cream* formulations on life quality, disease severity and skin hydration of AD patients from the FMRP-USP Hospital das Clínicas (CAAE 83521418.5.0000.5403) was also assessed. Identification of the major components of the raw and purified beeswaxes was carried out using GC/MS. Artepelin C, the main marker of propolis, was quantified using HPLC after separation of the representative components of green propolis from the raw beeswax. Methanolic extract of raw beeswax ranging from 6.25 to 25 µg/mL, which respectively corresponds to artepelin C concentrations from 3.5 to 14 ng/mL, was used to treat AMJ-2 macrophage culture previously stimulated with LPS. The results showed a significant reduction in IL-6 and TNF-α levels, suggesting an anti-inflammatory effect of the beeswax extract. The raw beeswax cream (*Cold Cream B.*), the propolis-free purified-beeswax cream (*Cold Cream P.*) and the propolis-added purified-beeswax cream (*Cold Cream P. + Propolis*) were stable in terms of rheology and sensorial characteristics over a 60-day storage period. Conversely, *Cold Cream Pharmacopoeia* showed changes in rheological characteristics along with oil phase separation after 30 days. The *Cold Cream Pharmacopoeia* prepared with purified beeswax presented mechanical and bioadhesion properties similar to those of the *Cold Cream P.* and *Cold Cream P. + Propolis*. On the other hand, *Cold Cream B.* showed hardness and compressibility properties decreased by 3 times and cohesiveness and bioadhesion strength properties increased when compared to the purified-beeswax prepared creams. Human clinical study showed that *Cold Cream* prevented worsening of AD. In addition, the analysis of the evaluative instruments used in clinical study suggested that the addition of small concentration of propolis to the *Cold Cream* improved the life quality of patients, skin hydration and disease severity.

Keywords: atopic dermatitis, Cold Cream, extract of green propolis.

## LISTRA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da anatomia da pele humana (A), com ampliação do estrato córneo, mostrando a estrutura dos corneócitos organizada em clusters na forma hexagonal e a matriz lipídica, com o modelo de “tijolo e argamassa” (B).....	4
Figura 2. Representação ilustrativa da composição do estrato córneo mostrando a presença da proteína filagrina no envelope cornificado.....	6
Figura 3. Lesões características da DA localizadas em diferentes regiões do corpo, dependentes da faixa etária: (A) lesões na face na fase infantil, (B) lesões eritomasos nas dobras na fase pré-puberal e (C) lesões liquinificadas na fase adulta.....	7
Figura 4. Ilustração da incidência das doenças presentes na marcha atópica.....	8
Figura 5. Ilustração da aplicação de compressas úmidas ( <i>wet wrap</i> ), sobre a pele hidratada com um creme, em pacientes com DA.....	12
Figura 6. Esquema ilustrativo das emulsões óleo-em-água (A) e água-em-óleo (B).....	13
Figura 7. Ilustração dos tipos de fenômenos de instabilidade que podem ocorrer em emulsões do tipo A/O.....	14
Figura 8. Estruturas químicas de alguns compostos presentes na própolis verde.....	17
Figura 9. Esquema representativo do preparo dos cremes.....	25
Figura 10. Representação esquemática do gráfico obtido a partir da análise de textura. Onde: H: dureza, A <sub>1</sub> : compressibilidade, A <sub>2</sub> /A <sub>1</sub> : coesividade e I/L: elasticidade.....	27
Figura 11. Representação da região do antebraço demarcada para avaliação da hidratação e <i>tape stripping</i> .....	38
Figura 12. Cromatogramas das amostras das ceras de abelha bruta e purificada nas diferentes frações estudadas, obtidos por CG/MS. Cromatogramas das frações (A) metanólica, (B) hexânica, (C) diclorometano:hexano, (D) diclorometânica M e (E) diclorometânica H. Condições cromatográficas: Pressão de gás hélio de 187,1 kPa, velocidade linear 31,9 cm/s e fluxo de coluna 1,5 mL/min. Temperatura da fonte de íons de 250°C e faixa de massa de 40 a 700 m/z a cada 0,3 s. Banco de dados: NIST11, NIST11-S, WILEY7, NIST08 e FFNSC3.1...	42
Figura 13. Cromatograma do extrato metanólico concentrado da (A) cera de abelha bruta, (B) cera de abelha purificada e (C) própolis verde. Condições cromatográficas: coluna C18 com fase móvel composta por água contendo 0,4% de ácido fórmico, 5% de metanol e 2% de isopropanol (A) acetonitrila e 2% de isopropanol (B) a um fluxo de 1 mL/min em gradiente de concentração, sendo 20% B por 3 min, 20-25% B de 3-4 min, 25% B de 4-15 min, 25-45% B de 15-20 min, 45% B de 20-40 min, 45-60% B de 40-45 min, 60-80% B de 45-68.83 min, 80-20% B de 68.86-70 min, 20% B de 70-80 min. Volume de injeção de 15 µL, temperatura do forno de 30°C e comprimento de onda de quantificação de 300 nm.....	45

Figura 14. Viabilidade de macrófagos (AMJ-2) submetidos ao tratamento por 24 h com extrato metanólico da cera de abelha bruta e extrato de própolis verde analisados por citometria de fluxo (n=6): A) controle, B) células tratadas com o solvente dos extratos: 0,05% de DMSO, C) extrato metanólico da cera de abelha bruta a 6,25, 12,5 e 25 µg/mL, correspondente a 3,5, 7 e 14 ng/mL de artemelin C, D) extrato de própolis verde a 34, 60 e 119 ng/mL, correspondente a 4, 6,7 e 14 ng/mL de artemelin C. Os quadrantes P2 representam as células viáveis e o P3 as células mortas.....	47
Figura 15. Porcentagem de células viáveis (AMJ-2) após tratamentos com diferentes concentrações de extrato metanólico de cera de abelha bruta (A) e extrato de própolis verde (B).....	48
Figura 16. Modulação da expressão de TNF- $\alpha$ pelos macrófagos (AMJ-2) após estímulo com LPS e tratamento com extrato metanólico da cera de abelha bruta (A) e extrato de própolis verde (B) contendo artemelin C na faixa de concentração de 3,5 a 14 ng/mL.....	49
Figura 17. Modulação da expressão de TNF- $\alpha$ pelos macrófagos (AMJ-2) após estímulo com LPS e tratamento com extrato metanólico da cera de abelha bruta (A) e extrato de própolis verde (B) contendo artemelin C na faixa de concentração de 3,5 a 14 ng/mL.....	50
Figura 18. Fotografia dos cremes: A) <i>Cold Cream</i> Farmacopeico após 30 dias armazenado, B) <i>Cold Cream</i> B. após 60 dias, C) <i>Cold Cream</i> P. após 60 dias e D) <i>Cold Cream</i> P.+Própolis após 60 dias.....	53
Figura 19. Curva de fluxo (tensão de cisalhamento vs. taxa de cisalhamento) do <i>Cold Cream</i> B. (A) <i>Cold Cream</i> P. (B), <i>Cold Cream</i> P.+Própolis (C) e <i>Cold Cream</i> Farmacopeico (D) armazenados a temperatura ambiente e avaliados logo após o preparo (T0) e após 15 (T15), 30 (T30), 45 (T45) e 60 (T60) dias. O <i>Cold Cream</i> Farmacopeico foi avaliado por apenas 15 dias devido a separação de fases observada no 30º dia. As setas indicam a direção da taxa de cisalhamento.....	53
Figura 20. Propriedades mecânicas do <i>Cold Cream</i> Farmacopeico, <i>Cold Cream</i> B., <i>Cold Cream</i> P. e <i>Cold Cream</i> P.+Própolis.....	56
Figura 21. Força bioadesiva e trabalho de bioadesão das formulações <i>Cold Cream</i> Farmacopeico, <i>Cold Cream</i> B., <i>Cold Cream</i> P. e <i>Cold Cream</i> P.+Própolis.....	56
Figura 22. Ruptura de ligação bioadesiva entre a formulação e a pele de orelha de porco. <i>Cold Cream</i> preparado com cera de abelha bruta (A), <i>Cold Cream</i> preparado com cera de abelha purificada (B).....	58
Figura 23. Porcentagem de hidratação (A) e de teor de água (B) da pele após 8 h de contato com os cremes: <i>Cold Cream</i> B. (B.), <i>Cold Cream</i> Farmacopeico (Farmacopeico), <i>Cold Cream</i> P. (P.) e <i>Cold Cream</i> P.+Própolis (P.+Própolis). Controle: PBS.....	59
Figura 24. Fluxograma da seleção de pacientes para o estudo clínico...	62
Figura 25. Fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica, modo fase tapping, de fitas adesivas contendo fragmentos do estrato córneo de um paciente saudável (A), de um paciente com DA moderada que usou o <i>Cold Cream</i> P. (B) e de um paciente com DA moderada que usou o <i>Cold Cream</i> P.+Própolis (C). Para as imagens dos pacientes com DA, as da esquerda mostram o estrato córneo antes do tratamento e as da direita depois de 60 dias de uso dos cremes.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos <i>Cold Cream</i> preparados.....	24
Tabela 2 - Cálculo do N de acordo com o poder do teste estatístico unicaudal quanto a variação da resposta clínica.....	34
Tabela 3 - Substâncias presentes nas ceras de abelha bruta e purificada identificadas por CG/MS com base na similaridade dos espectros teóricos encontradas nos bancos de dados NIST11, NIST11-S, WILEY7, NIST08 e FFNSC3.1.....	40
Tabela 4 - Diâmetro médio das gotículas que compõem os cremes preparados.....	52
Tabela 5 - Viscosidade aparente (30 s) e área de histerese dos cremes em função do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente.....	54
Tabela 6 - Dados sociodemográficos e acesso ao serviço de saúde dos pacientes.....	62
Tabela 7 - Variáveis confundíveis levadas em consideração na distribuição dos grupos.....	63
Tabela 8 - Comorbidades alérgicas apresentadas pelos pacientes incluídos no estudo.....	64
Tabela 9 - Aspectos relacionados a adesão do paciente ao uso dos cremes.....	65
Tabela 10 - Escore da gravidade da doença (SCORAD) no início e após 60 dias de tratamento com o <i>Cold Cream P.</i> (Controle) e com o <i>Cold Cream P.+Própolis</i> (Intervenção).....	66
Tabela 11 - Efeito na qualidade de vida do paciente (DLQI) do tratamento com o <i>Cold Cream P.</i> (Controle) e com o <i>Cold Cream P.+Própolis</i> (Intervenção) por 60 dias.....	67
Tabela 12 - Efeito na hidratação da pele do tratamento com o <i>Cold Cream P.</i> (Controle) e com o <i>Cold Cream P.+Própolis</i> (Intervenção) por 60 dias.....	67
Tabela 13 - SCORAD, DLQI e Hidratação de cada paciente tratado com <i>Cold Cream P.</i> .....	69
Tabela 14 - SCORAD, DLQI e Hidratação de cada paciente tratado com <i>Cold Cream P. +Própolis</i> .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MFA	Microscopia de força atômica
CEP	Comitê de Ética em Humanos
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DA	Dermatite Atópica
DLQI	Índice de Qualidade de Vida em Dermatologia ( <i>Dermatology Life Quality Index</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
g	gramas
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Mili-molar
mm	Milímetros
N	Newton
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
PBS	Tampão Fosfato Isotônico
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
s	Segundo
SCORAD	Escore de Dermatite Atópica ( <i>Scoring atopic dermatitis</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
USP	Universidade de São Paulo
vs.	Versus
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
ATCC	American Type Culture Collection
Kpa	Kilopascal
m/z	Massa/carga

eV	Eletrovolt
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
IP	Iodeto de propídeo
BHT	Butil-hidroxitolueno
n	Número de pacientes
qsp	Quantidade suficiente para
IPBC	Butilcarbamato de Iodopropinil
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ed.	Edição



## SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1 ESTRUTURA DA PELE HUMANA	4
2.1.1 Anatomia da pele	4
2.2 DERMATITE ATÓPICA	7
2.2.1 Alterações da função barreira derivadas da DA	10
2.3 CREMES	13
2.4 EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE	15
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES GRAXOS PRESENTES NAS CERAS DE ABELHA	19
4.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA PRÓPOLIS VERDE NA CERA DE ABELHA	20
4.2.1 Preparo do extrato de própolis verde padronizado	21
4.3 TESTES <i>IN VITRO</i> EM CULTURA DE CÉLULAS	22
4.3.1 Citotoxicidade	22
4.3.2 Atividade anti-inflamatória da cera de abelha bruta e do extrato de própolis verde	23
4.4 PREPARO DE FORMULAÇÕES DE <i>COLD CREAM</i>	24
4.4.1 Determinação do tamanho de gotícula	25
4.5 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR	26
4.5.1 Características organolépticas	26
4.5.2 Avaliação reológica de cisalhamento contínuo	26
4.6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS	27
4.7 DETERMINAÇÃO DA FORÇA BIOADESIVA	27
4.8 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA HIDRATAÇÃO DA PELE POR MEDIDA DE RESISTIVIDADE ELÉTRICA DO ESTRATO CÓRNEO	28
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS NOS ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	29
4.10 ENSAIO CLÍNICO EM HUMANOS	29
4.10.1 Caracterização do local do estudo	30
4.10.2 Tipo de estudo	30
4.10.3 População de estudo	30
4.10.4 Protocolo clínico	31
4.10.5 Delineamento do estudo	32
4.10.6 Cálculo do tamanho amostral	33

<b>4.10.7 Estudo Piloto</b> .....	35
<b>4.10.8 Instrumentos utilizados no ensaio clínico</b> .....	35
4.10.8.1 Escore da gravidade da dermatite atópica (SCORAD).....	35
4.10.8.2 Dados sociodemográficos e clínicos.....	36
4.10.8.3 Avaliação da qualidade de vida (DLQI).....	36
4.10.8.4 Avaliação da hidratação da pele.....	36
4.10.8.5 Avaliação da morfologia geral dos corneócitos.....	37
<b>4.10.9 Análise estatística dos dados obtidos dos experimentos <i>in vivo</i></b> .....	38
<b>4.10.10 Riscos e desconfortos</b> .....	39
<b>4.10.11 Benefícios</b> .....	39
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES GRAXOS PRESENTES NAS CERAS DE ABELHA.....	40
5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA PRÓPOLIS VERDE NA CERA DE ABELHA.....	45
5.3 CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA CERA DE ABELHA BRUTA E DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE.....	46
5.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS CREMES.....	51
<b>5.4.1 Características organolépticas e reológicas dos cremes</b> .....	52
<b>5.4.2 Avaliação das propriedades mecânicas e força de bioadesão</b> .....	55
<b>5.4.3 Avaliação <i>in vitro</i> da hidratação da pele através da medida de resistividade elétrica do estrato córneo</b> .....	58
5.5 ENSAIO CLÍNICO EM HUMANOS.....	60
<b>5.5.1 Estudo Piloto</b> .....	61
<b>5.5.2 Características da população de estudo</b> .....	61
<b>5.5.3 Avaliação do SCORAD, DLQI e Hidratação da pele</b> .....	66
5.5.3.1 Análise individual do estado clínico do paciente.....	68
<b>5.5.4 Avaliação da morfologia geral dos corneócitos</b> .....	71
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	74
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	75
<b>APÊNDICES</b> .....	85
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).....	85
APÊNDICE B - Ficha Sociodemográfica e Clínica.....	87
<b>ANEXOS</b> .....	91
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	91
ANEXO B - Questionário de avaliação da qualidade de vida em dermatologia (DLQI).....	92
ANEXO C - Ferramenta Escore de Dermatite Atópica (SCORAD) para avaliação da gravidade da doença.....	93

## 1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) ou eczema atópico é uma doença inflamatória crônica da pele associada a atopia com evoluções em surto (FLOHR; MANN, 2014). Os sintomas mais comuns associados à doença são o prurido intenso em determinados locais da pele e lesões eczematosas com evolução cíclica (HANIFIN; RAJKA, 1980). Na fase aguda da doença, essas lesões aparecem como edemas e eritemas mal definidos, enquanto que na fase crônica elas se tornam mais definidas, liquinizadas e descamativas, localizadas principalmente em regiões de dobras do corpo. Além disso, pacientes com a doença apresentam intensa xerose (ANTUNES et al., 2017; CASTRO et al., 2006).

A fisiopatologia da DA envolve múltiplas etiologias inter-relacionadas, como fatores genéticos, ambientais e imunológicos, que acometem a função barreira da pele, conferida especialmente pelo estrato córneo, e desencadeiam respostas inflamatórias (POWER et al., 2015; CASTRO et al., 2006).

Assim, o estrato córneo do paciente atópico sofre alterações nas cadeias lipídicas e conteúdo de água, ocasionando xerose e aumento do pH. Acredita-se que essas alterações sejam ocasionadas principalmente pela deficiência de filagrina, proteína essencial para a formação do estrato córneo, e pela organização da matriz lipídica, com ceramidas com tamanho de cadeias e proporções distintas da pele saudável (ANTUNES et al., 2017).

O estrato córneo alterado do paciente com DA leva a um aumento da perda de água transepidermica e consequente desidratação da pele (PROKSCH; JENSEN; ELIAS, 2003). Os terminais dendríticos das células de Langherans, presentes na epiderme viável, também ficam mais expostos à antígenos que normalmente não seriam capazes de atravessar o estrato córneo, desencadeando respostas inflamatória e imune exacerbadas (CASTRO et al., 2006; SILVERBERG; WONG; YOSIPOVITCH, 2016). A resposta inflamatória culmina na produção de anticorpos IgE e na liberação de diversas interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (BATISTA et al., 2015; CASTRO et al., 2006; LEUNG; BOGUNIEWICZ, 2003; BRUNNER; YASSKY; LEUNG, 2017). A pele do paciente com DA apresenta ainda deficiência de peptídeos antimicrobianos responsáveis pela defesa do organismo contra a invasão de bactérias, vírus e fungos. Sendo assim, pacientes com DA apresentam maior facilidade em desenvolver infecções

microbianas (CASTRO et al., 2006).

Por ser uma doença recidivante, o tratamento da DA está relacionado a redução dos sinais e sintomas da doença (CASTRO et al., 2006). A administração tópica de cremes nas lesões é a principal forma de tratamento. Esses cremes podem conter corticosteroides ou inibidores de calcineurina, que causam efeitos adversos, tais como foliculite, estrias, atrofia cutânea e hipopigmentação (SCHIMMER; PARKER, 2005; CASTRO et al., 2006), além de apresentarem alto custo. Além disso, como o quadro da DA é de difícil controle, o uso de corticosteroides por um tempo prolongado torna a prática não segura (ODEDRA, 2014).

Diante disso, levando em consideração o caráter de cronicidade da DA (HARPER et al., 2001), são necessárias alternativas terapêuticas que retardem o aparecimento das lesões e evitem os períodos de crise da doença. Assim, para proteger a pele e ainda evitar o uso constante de corticosteroides e inibidores de calcineurina, a aplicação tópica de creme base, não adicionado de fármacos, pode ser considerada uma abordagem terapêutica segura. Ela ainda tem o potencial de melhorar o curso da doença, pois pode aumentar a hidratação do estrato córneo e restabelecer a função da barreira cutânea.

O *Cold Cream* é uma das formas farmacêuticas dermatológicas mais antigas que se tem notícia, desenvolvida no século II por Galeno. Ele é uma emulsão semi-sólida do tipo água-em-óleo cuja formulação clássica oficial, descrita na Farmacopeia Brasileira, é constituída basicamente por cera de abelha, óleo mineral, água e bórax (ANVISA, 2012). Por possuir elevado teor de lipídios, esta forma farmacêutica é usada em situações em que se requer alta emoliência, como na psoríase e na DA, afecções cutâneas essas caracterizadas por ressecamento intenso da pele (BEHESHTIA et al., 2013; ROMAY; FRANCO; MALDONADO, 1991; EHSANI et al., 2011; KIKUCHI; TAGAMI, 2008).

A efetividade do uso de *Cold Cream* no tratamento de pacientes com DA vem sendo observada na clínica (KOPPES et al., 2016), mas com poucos estudos relatados na literatura científica (KIKUCHI; TAGAMI, 2008).

A Farmácia Ensino da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP avia, desde 1979, o *Cold Cream* para pacientes com DA. Há aproximadamente dois anos a formulação do *Cold Cream* Farmacopeico, originariamente aviada, foi modificada com o intuito de aumentar sua vida de

prateleira. A nova formulação foi denominada *Cold Cream B.* e apresenta em sua composição, além da cera de abelha, do óleo mineral e do bórax, a vaselina sólida, a manteiga de cacau e o álcool cetosteárico como agentes de consistência, e o álcool cetosteárico etoxilado e o monoestearato de glicerila como agentes emulsificantes e estabilizantes. Apesar da maior variedade de material graxo, a porcentagem de fase oleosa é semelhante àquela que compõe o *Cold Cream* Farmacopeico. No entanto, a cera de abelha utilizada no *Cold Cream B.* não é purificada, sendo aqui denominada de cera de abelha bruta. Por passar por menos processos de purificação, a cera de abelha bruta pode apresentar própolis em sua composição, conferindo à formulação possíveis propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (LUSTOSA et al., 2008) (MARQUELE et al., 2006; OSKOUEI; NAJAFI, 2013).

Com o aviamento do *Cold Cream B.* em substituição ao *Cold Cream* Farmacopeico pela Farmácia Ensino houve um aumento da demanda de produção, visto que a maioria dos pacientes com DA relataram melhora dos sinais e sintomas característicos da doença após utilização do *Cold Cream B.*

Desta forma, quatro hipóteses foram levantadas para explicar a melhora da DA com o uso do *Cold Cream B.* em relação ao uso do *Cold Cream* Farmacopeico:

- 1) Aperfeiçoamento das características mecânicas, de textura, bioadesão e reológicas do creme, resultando em maior aceitação pelo paciente;
- 2) Maior reposição do conteúdo graxo do estrato córneo, com aumento das propriedades de barreira da pele;
- 3) Influência da própolis, que pode estar presente na cera de abelha bruta, na resposta anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana conferida pelo uso do creme na DA, resultando em melhora da lesão;
- 4) Impacto da efetividade do creme na evolução da DA.

Assim, no presente trabalho, foram preparadas e caracterizadas as duas diferentes formulações do *Cold Cream*, o Farmacopeico e o B., além de uma outra formulação composta pelos mesmos componentes do *Cold Cream B.*, mas preparada com cera de abelha purificada (*Cold Cream P.*), para avaliar a influência da nova formulação e da cera de abelha bruta nas propriedades do creme. O *Cold Cream P.* foi ainda acrescido de extrato de própolis verde (*Cold Cream P.+ Própolis*) para investigar a influência *in vivo* desta substância no tratamento da DA.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

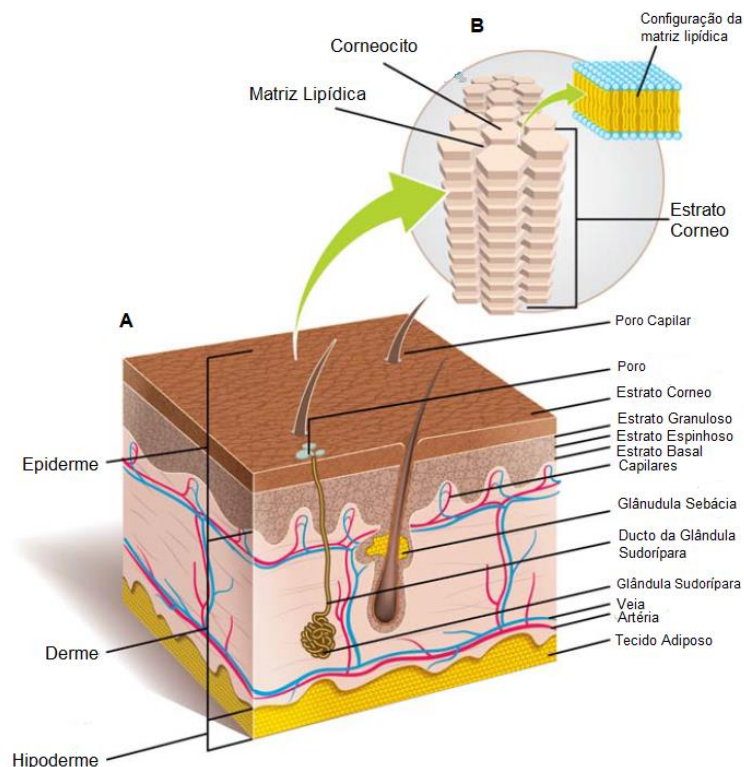
### 2.1 ESTRUTURA DA PELE HUMANA

#### 2.1.1 Anatomia da pele

A pele representa 15% do peso corporal total, por esse motivo é considerada o maior órgão do corpo humano. Sua principal função é a de proteger o organismo dos fatores externos, agindo como uma barreira protetora complexa contra entrada de substâncias e patógenos externos. Sua camada mais externa, o estrato córneo, tem ainda a capacidade de evitar a perda excessiva de água transepidermal (PETRILLI; LOPEZ, 2018; LEE; JEONG; AHN, 2006).

A pele pode ser dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme. Essa última é acompanhada de um tecido subcutâneo, a hipoderme, que confere a pele suporte e resistência mecânica (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da anatomia da pele humana (A), com ampliação do estrato córneo, mostrando a estrutura dos corneócitos organizada em clusters na forma hexagonal e a matriz lipídica, com o modelo de “tijolo e argamassa” (B).



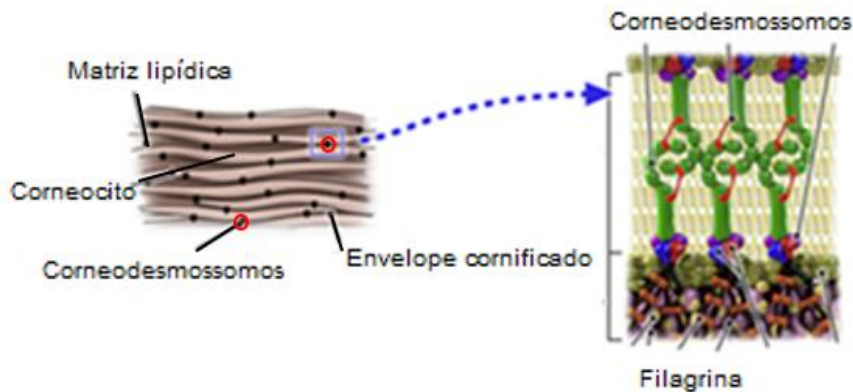
Fonte: Adaptado de (LEMOS et al., 2018).

A epiderme é, de fora do organismo para dentro, a primeira camada da pele, caracterizada como um epitélio estratificado escamoso. Sua espessura pode variar de acordo com a parte do corpo, sendo geralmente mais fina nas pálpebras e mais grossa nas palmas das mãos e sola dos pés (LEMOS et al., 2018). Aproximadamente 95% de sua composição é de queratinócitos que estão em contínua renovação e diferenciação, organizados, didaticamente, em duas subcamadas: estrato córneo e epiderme viável.

A epiderme viável é um tecido avascular, onde os queratinócitos se diferenciam, a partir da derme, formando os estratos basal, espinhoso e granuloso (Figura 1). Cada camada é definida em relação a morfologia, posição e estado de diferenciação dos queratinócitos (MENON, 2002; BAROLI, 2010). Conforme se diferenciam, essas células se queratinizam até formarem os corneócito, células mortas que compõem o estrato córneo. Melanócitos e células imunológicas, como as células de Langerhans, também estão presentes na epiderme viável (BASLER et al., 2016).

O estrato córneo é a camada mais superficial da epiderme, de espessura fina, de cerca de 10 a 20  $\mu\text{m}$  (JOHNSON; BLANKSCHTEIN; ANGER, 1997). Possui características lipofílicas e é a principal barreira da pele para proteção do organismo contra fatores externos e prevenção da perda excessiva de água transepidermal. Os corneócitos que o compõem são células anucleadas e achatadas, que se organizam na forma de clusters hexagonais, formados com até 12 corneócitos (CEVC, 2004). As células são conectadas por corneodesmossomos, envoltos por filamentos de queratina, fornecendo uma camada impermeável a água (KUBO et al., 2013). Circundando os corneócitos tem-se uma matriz lipídica composta por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres capazes de reter água na pele formando uma estrutura organizada em bicamadas (Figura 1B) (SMEDEN; BOUWSTRA, 2016; FEINGOLD, 2009). Os corneócitos são ainda envoltos por um envelope cornificado composto por uma proteína denominada de filagrina (Figura 2).

Figura 2 - Representação ilustrativa da composição do estrato córneo mostrando a presença da proteína filagrina no envelope cornificado.



Fonte: Adaptado de (EGAWA; KABASHIMA, 2016).

A filagrina tem a função de manter a estrutura e integridade do estrato córneo (KALILIN; KAJAVA; STEINERT, 2002; SIMON et al., 1996; ARMENGOT-CARBO; MARTIN; TORRELO, 2015). Derivada da profilagrina, que é uma poliproteína de aproximadamente 500 kDa, a filagrina tem em torno de 35 kDa e se reticula ao envelope lipídico que circunda os corneócitos. A filagrina é degradada pelas enzimas caspase 14, peptidil arginina-desiminases ou bleomicina hidrolase, originando ácido urocânico e ácido pirrolidona carboxílico, esses presentes na composição do fator de hidratação natural (FHN), importantes em manter a hidratação adequada e baixo pH da pele (CANDI; SCHMIDT; MELINO, 2005).

Logo abaixo da epiderme viável tem-se a derme. O estrato basal está conectado a ela por meio de proteínas, como laminina e colágeno IV. A derme é altamente vascularizada por vasos linfáticos e sanguíneos, sendo capaz de realizar a nutrição, suprimento de oxigênio na pele e transporte rápido de substâncias para a circulação sistêmica. É formada principalmente por fibroblastos, onde colágeno e elastina são produzidos (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999), conferindo elasticidade e flexibilidade à pele (BAROLI, 2010).

Várias estruturas adjacentes a pele, como glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículo piloso são originadas na derme (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013). Além disso, células do sistema imunológico, como linfócitos, mastócitos, macrófagos, células T e B também estão presentes nesta camada da pele.



Finalmente, a hipoderme ou camada subcutânea é um tecido localizada abaixo da derme. É composta por tecido conjuntivo fibroso, fibroblasto e adipócitos, com capacidade de armazenar gordura e contribuir para a manutenção da temperatura corporal (BASLER et al., 2016; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

## 2.2 DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica (DA) ou eczema atópico é uma doença inflamatória crônica da pele com evoluções em surto (FLOHR; MANN, 2014). Ela não é uma doença contagiosa, mas apresenta amplas variações em suas manifestações clínicas, acometendo diferentes regiões do corpo (SHARMA, 2001). É caracterizada principalmente por lesões eczematosas e pruridos intensos com evoluções cíclicas de piora e melhora. Geralmente se manifesta em crianças desde a primeira infância, mas em cerca de 1-3% dos pacientes aparece apenas na fase adulta (ORFALI et al., 2013; BATISTA et al., 2015; HANIFIN; RAJKA, 1980). Sua localização e disseminação varia de acordo com a faixa etária do paciente (HANIFIN; RAJKA, 1980) (Figura 3). Na fase infantil, a partir do terceiro mês de vida, é caracterizada principalmente por eritema e pápulas localizadas na face. Já na fase pré-puberal, a partir dos dois anos de idade até a puberdade, as lesões eritematosas são substituídas gradualmente por liquenificação e localizadas na maioria das vezes nas dobras dos cotovelos, joelhos, tornozelo, pescoço e pulso. Na fase adulta apresenta liquenificação localizada nas regiões flexurais do pescoço, braços, pernas e mãos (CASTRO et al., 2006).

Figura 3 - Lesões características da DA localizadas em diferentes regiões do corpo, dependentes da faixa etária: (A) lesões na face na fase infantil, (B) lesões eritomasas nas dobras na fase pré-puberal e (C) lesões liquinificadas na fase adulta.



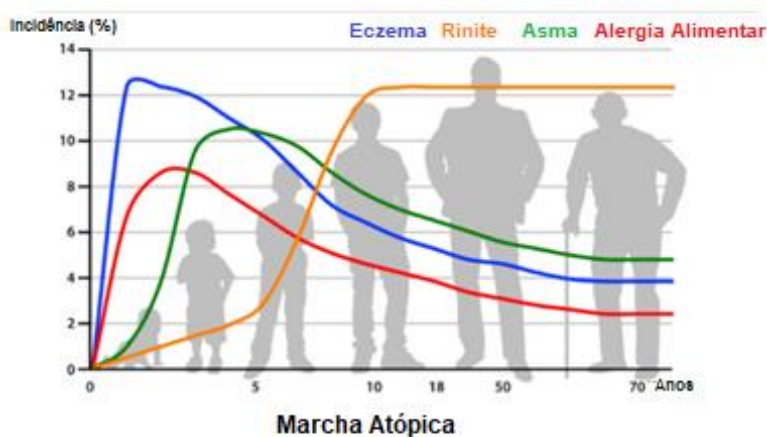
Fonte: (ANTUNES et al., 2017).

No Brasil, segundo o censo realizado pela Sociedade Brasileira de

Dermatologia, a DA é a 11ª doença dermatológica mais comum. Um levantamento realizado em 23.422 crianças de seis a sete anos e 58.144 adolescentes de 13 a 14 anos verificou que a prevalência da DA ocorre em 5,3 a 13% dos pacientes de seis a sete anos e em 3,9 a 7,9% em pacientes de 13 a 14 anos de idade (SOLÉ et al., 2006). Sua prevalência vem aumentando, sendo que, nas últimas três décadas, o aumento foi de duas a três vezes, afetando 18% das crianças e 5% dos adultos. Os possíveis motivos do aumento da prevalência das doenças alérgicas, como a DA, são fatores hereditários, imunológicos e ambientais (CASTRO et al., 2006).

A maioria dos pacientes que apresentam DA manifestam também outras atopias. Essas manifestações estão relacionadas com o conceito de marcha atópica (Figura 4), o qual correlaciona a história natural de doenças alérgicas que acometem o paciente, como asma, rinite, alergia alimentar e eczema, com sua idade.

Figura 4 - Ilustração da incidência das doenças presentes na marcha atópica.



Fonte: Adaptado de (DAVIDSON et al., 2019).

Estudos longitudinais mostram uma maior prevalência da DA nos primeiros anos de vida (até 20%), podendo esta ser acompanhada de sensibilização por diversos alimentos, como proteína do leite de vaca, amendoim e ovo. Com o passar dos anos, sua prevalência cai significativamente. Após aproximadamente 7 anos de idade, o quadro de DA pode ser sucedido por uma sensibilização a ácaros domiciliares, pêlos de animais, entre outros, até que posteriormente o paciente manifeste episódios de infecções virais das vias aéreas posteriores (Figura 4) (CASTRO et al., 2006; THOMSEN, 2015).

Os sinais e sintomas da DA acabam por causar transtornos psicossociais e

financeiros aos pacientes e sua família. Diagnósticos de ansiedade, depressão e estresse são bastante comuns (MULLER; RAMOS, 2004). As condições psiquiátricas ocorrem devido a cronicidade da DA e a própria aparência das lesões que a acompanham, principalmente na fase de agudização, causando sentimentos de vergonha, baixa autoestima e humilhação (TAYLOR; BEWLEY; MELIDONIS, 2006). Nos EUA, o impacto financeiro da DA é de quase US\$ 1 bilhão por ano, sendo que 84% dos pacientes relatam dificuldade em dormir, diminuição das atividades escolares e no trabalho e, mais de um terço dos pacientes, se sentem envergonhados com a sua aparência (CAROLL et al., 2005; MANCINI; KAULBACK; CHAMLIN, 2008).

Para o diagnóstico da DA leva-se em consideração a história completa e detalhada do paciente, de forma a analisar principalmente as doenças respiratórias e históricos familiares, além do exame clínico, com identificação de sinais e sintomas específicos. Caso haja alguma dúvida, a biópsia cutânea é realizada. Vale ressaltar que pacientes com DA podem apresentar dermatite de contato associada ao eczema atópico. As possíveis causas são avaliadas com a realização do teste de contato (*patch test*) (ANTUNES et al., 2017). A recidiva, distribuição e aspecto das lesões conforme a faixa etária do paciente e o comprometimento que a DA causa em sua qualidade de vida, são de extrema importância para o diagnóstico e para a classificação da doença.

A DA pode ser classificada como leve, moderada ou grave. Na DA leve, são observadas clinicamente áreas xeróticas, prurido não muito frequente, com ou sem presença de áreas inflamadas e pequeno impacto nas atividades diárias, sono ou nas atividades psicossociais. Na moderada, são observadas além das áreas xeróticas, prurido frequente associado a inflamação, com ou sem sinais de escoriações, áreas localizadas de espessamento da pele, moderado impacto nas atividades diárias e psicossociais e distúrbios do sono frequentes. Finalmente, na DA grave, a área xerótica apresenta-se difusa, com prurido constante e associado a inflamação, com ou sem sinais de escoriações, pele espessa com sangramentos, liquenificação e alterações da pigmentação, limitação das atividades diárias e psicossociais e noites de sono perdidas (GRIFFITHS et al., 2016).

A forma mais utilizada para classificar a DA é por meio de pontuações que levam em consideração os sintomas objetivos e subjetivos da doença. Um instrumento utilizado para tanto é o Escore da Dermatite Atópica (do inglês *Scoring Atopic*

*Dermatitis*), conhecido como SCORAD. Ele confere pontos para a extensão e gravidade da doença, perda de sono e intensidade do prurido (KUNZ et al., 1997). Dependendo da pontuação final obtida o médico classifica a doença como leve, moderada ou grave.

### **2.2.1 Alterações na função barreira derivadas da DA**

A fisiopatologia da DA ainda não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que ela envolve múltiplas etiologias relacionadas entre si, como fatores ambientais, genéticos e imunológicos, que acabam por acometer a ativação do sistema imunológico, inflamatório e causar alterações na função da barreira da pele (CASTRO et al., 2006).

Como já relatado, o estrato córneo, camada mais externa da pele, possui como função proteger o organismo contra agentes externos. Uma vez comprometido, possibilita o acúmulo e entrada desses agentes na pele. Esse comprometimento pode ser ocasionado pela deficiência da filagrina e de ceramidas, alterações nas cadeias lipídicas e aumento da desidratação da pele atópica (BENEDETTO; KUBO; BECK, 2012; MARGOLIS et al., 2012).

Devido a deficiência da filagrina e de ceramidas, as quais ainda apresentam cadeia carbônica mais curta do que as ceramidas que compõe a pele saudável, há uma desregularização na produção dos ácidos urocânico, pirrolidona, hidratação e pH da pele do atópico. Com isso, a pele do paciente atópico apresenta elevada desidratação e elevado pH. Essas alterações favorecem a exposição dos terminais dendríticos das células apresentadoras de antígenos, como as células de Langerhans, quando comparadas as células sadias. Assim, agentes patógenos, como bactérias, mais comumente *Staphylococcus aureus*, e alérgenos, penetram na pele com mais facilidade e são capturados pelas células apresentadoras de antígenos, desencadeando uma resposta inflamatória e uma reação exarcebada nos linfonodos (KOBAYASHI et al., 2015).

A resposta inflamatória desencadeada ativa o linfócito T auxiliar (LT CD4+), atrai mastócitos e promove a liberação de histaminas. A pele passa a apresentar-se então avermelhada, com prurido e quente. Os mastócitos são diferenciados em macrófagos, culminando na liberação de diversas citocinas inflamatórias, incluindo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (BATISTA et al., 2015).

A pele do atópico apresenta também deficiência de peptídeos antimicrobianos (AMP). Esses são responsáveis pela proteção do organismo contra a invasão de fungos, vírus e bactérias. Assim, a pele do paciente com DA apresenta maior facilidade em desenvolver infecções microbianas (CASTRO et al., 2006).

Sendo assim, é de extrema importância para pacientes portadores de DA protejam a pele para evitar o desencadeamento de reações imunológicas e contaminação (GU et al., 2001; WASSERBAUER; BALLOU, 2009). Essa proteção pode ser feita, por exemplo, com o uso de cremes hidratantes, os quais podem auxiliar na recomposição da função barreira da pele.

Como a DA não tem cura, o seu tratamento está relacionado com a redução dos sinais e sintomas da doença. Assim, para evitar o prurido são administrados anti-histamínicos. O controle da inflamação é feito com a administração de corticosteroides e até mesmo de imunossupressores, como de inibidores de calcineurina (MORE; NANDGUDE; PODDAR, 2016; CORREA; NEBUS, 2012). Para evitar os períodos de fase aguda e auxiliar na contenção de seus sintomas, o paciente é aconselhado a manter sempre a pele hidratada.

O papel da utilização de hidratantes no paciente atópico visa a emoliência e hidratação do estrato córneo e consequente reconstituição da barreira cutânea. Os hidratantes mais indicados são aqueles desenvolvidos especificamente para paciente com DA, os quais apresentam em sua composição substâncias emolientes e componentes lipídicos que se encontram alterados na pele, como ceramidas, ácidos graxos e colesterol (WOLLENBERG et al., 2016). Associado ao hidratante, compressas úmidas, conhecidas como *wet wrap*, também são recomendadas (Figura 5). Nesses casos, o paciente veste uma roupa justa úmida sobre o hidratante e, por cima desta, uma outra veste seca (PALLER; MANCINI; HURWITZ, 2016; DEVILLERS; ORANJE, 2012).

Figura 5 - Ilustração da aplicação de compressas úmidas (*wet wrap*), sobre a pele hidratada com um creme, em pacientes com DA.



Fonte: (DEVILLERS; ORANJE, 2012).

Para evitar agressões à pele, recomenda-se que os pacientes evitem o uso excessivo de sabonete, o banho prolongado e quente, o uso de bucha, produtos químicos e cremes com fragrância, as quais podem estimular reações alérgicas (CASTRO et al., 2006).

Pacientes com DA grave, que não respondem positivamente ao tratamento tópico, são tratados também por via sistêmica, com corticoides ou imunomoduladores. Dentre os imunomoduladores administrados por via sistêmica pode-se destacar a ciclosporina, o metotrexato e a azatioprina. É necessário monitorar periodicamente os níveis séricos e a função renal desses pacientes (CARVALHO et al., 2017).

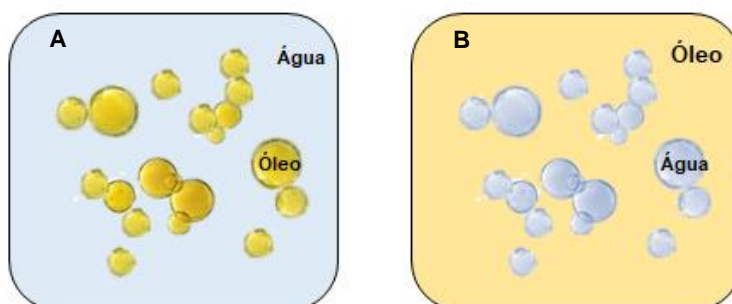
Os tratamentos com corticoides sistêmicos, imunomoduladores e corticoides tópicos são frequentes, porém o seu uso a longo prazo deve ser cauteloso devido aos efeitos adversos que provocam (SCHMITT et al., 2010). Corticoides tópicos podem, por exemplo, causar taquifilaxia, estrias, dermatite perioral, dispigmentação e atrofia da pele (HILL; ROSTENBERG, 1978). Portanto, para evitar o uso contínuo de medicamentos, a aplicação tópica de cremes base, sem fármaco, é bastante recomendada na clínica (AOYAMA et al., 1995). A composição desses cremes pode conter lipídios que auxiliem na reconstituição do estrato córneo (SENYIGIT; OZCAN;

OZE, 2012; WOLLENBERG et al., 2016).

### 2.3 CREMES

Crems são emulsões semi-sólidas constituídas por dois meios imiscíveis dispersos um no outro com o auxílio de agentes emulsionantes. Quando uma fase oleosa está dispersa numa fase aquosa contínua tem-se um creme do tipo óleo-em-água (O/A). Por outro lado, quando a fase oleosa é a fase dispersante e a fase interna aquosa está nela incorporada na forma de gotículas tem-se um creme do tipo água-em-óleo (A/O) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema ilustrativo das emulsões óleo-em-água (A) e água-em-óleo (B).



Fonte: Autoria própria.

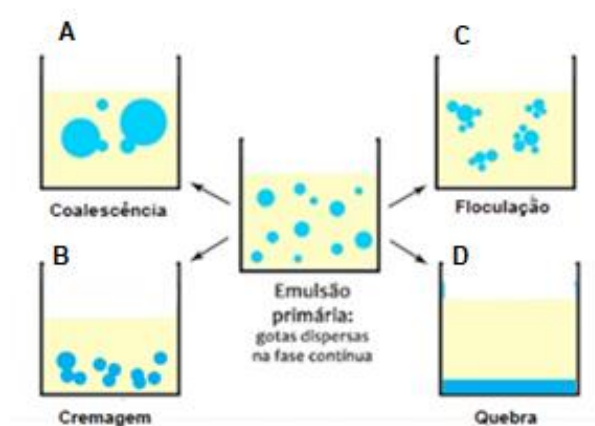
A maioria dos cremes disponíveis no mercado é do tipo O/A. Isso porque a fase aquosa externa facilita a espalhabilidade e diminui a sensação de oleosidade que ocorre com os cremes do tipo A/O. Esses últimos, no entanto, contêm uma maior porcentagem de material oleoso, bastante requerido para a pele do paciente atópico. Sendo assim, tradicionalmente, o creme mais recomendado para uso em pacientes com DA é o *Cold Cream*.

Carregando fundamentalmente as características de sua fase externa, o *Cold Cream* apresenta elevado teor graxo, sendo dessa forma usado em situações que se exigem alto poder de emoliência, tais como rachadura de calcanhar, joelhos e cotovelos secos, mãos e braços de profissionais como pedreiros e pintores, e ainda em afecções cutâneas caracterizadas por ressecamento intenso, com ou sem descamação como, por exemplo, psoríase, queimadura, sarna e a DA (BEHESHTIA et al., 2013; ROMAY; FRANCO; MALDONADO, 1991; EHSANI et al., 2011; KIKUCHI;

TAGAMI, 2008). Clinicamente, acredita-se que o *Cold Cream* forme uma película oleosa na superfície da pele, evitando a perda de água transepidérmica, diminuindo assim a desidratação. Além disso, devido ao elevado teor de fase oleosa também se supõe que ele reponha o conteúdo lipídico da barreira cutânea alterada do paciente atópico, e tenha ação emoliente. Sua aplicação pode, ainda, tornar o manto hidrolipídico da pele mais estável e evitar a descamação da pele e a desidratação (CASTRO et al., 2006).

Para assegurar os benefícios do arranjo dos lipídios no creme A/O e sua melhor interação com o estrato córneo é necessário que o creme se mantenha estável durante o período de armazenamento até o uso. Uma emulsão estável é aquela que mantém as mesmas características iniciais com o passar do tempo. A estabilidade do *Cold Cream* é alcançada pela combinação de agentes emulsionantes com equilíbrio hidrófilo-lipofilo adequado para emulsificar a fase aquosa na alta e distinta proporção de lipídios que compõem a fase oleosa. Os tamanhos médios das gotículas da fase interna devem se manter constante durante o armazenamento, sem apresentar fenômenos de instabilidade física, como floculação, cremagem, coalescência e, na pior das hipóteses, separação total das fases, ou quebra, da emulsão (FRANZOL; REZENDE, 2015) (Figura 7). Apesar de reversíveis, os processos de floculação e cremagem acabam por facilitar o fenômeno da coalescência, esse irreversível, e devem ser evitados (FRANZOL; REZENDE, 2015).

Figura 7 - Ilustração dos tipos de fenômenos de instabilidade que podem ocorrer em emulsões do tipo A/O.



Fonte: Adaptado de (TADROS, 2004).



Apesar de muito utilizado na clínica, poucos estudos descrevem os benefícios específicos do *Cold Cream* em pacientes com DA. Em um estudo clínico recente, em humanos, 58% dos pacientes com DA tratados em regime de monoterapia com um creme com composição lipídica semelhante aos lipídeos presentes no estrato córneo, ou seja, contendo ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, ou fazendo o uso deste creme em conjunto com outros tratamentos apresentaram melhora na escala de gravidade da doença com base na Avaliação Global do Investigador (do inglês *Investigator Global Assessment* (IGA)), um instrumento validado semelhante ao SCORAD (KIRCIK; DEL ROSSO, 2011). A presença de extratos de cacau, extratos de folhas e cascas da espécie *Alnus* e da *Equinacea purpúrea*, estas com atividade anti-inflamatória, aplicados topicamente na lesão do paciente atópico também se mostrou eficaz no tratamento da DA com base na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias testadas. O extrato de cacau também se mostrou capaz de diminuir a perda de água transepidermal e aumentar a hidratação da pele (KANG et al., 2017; CHOI et al., 2011; OL'AH et al., 2017).

#### 2.4 EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE

A propólis é uma substância resinosa natural formada por vários componentes complexos, coletada pelas abelhas, de diferentes partes das plantas (galhos, flores, pólen e exsudatos de árvores). A resina coletada é depositada na colmeia com saliva e enzimas do inseto para selar as rachaduras, manter a temperatura e evitar a proliferação de microorganismo na colmeia (DALEPRANE et al., 2002; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

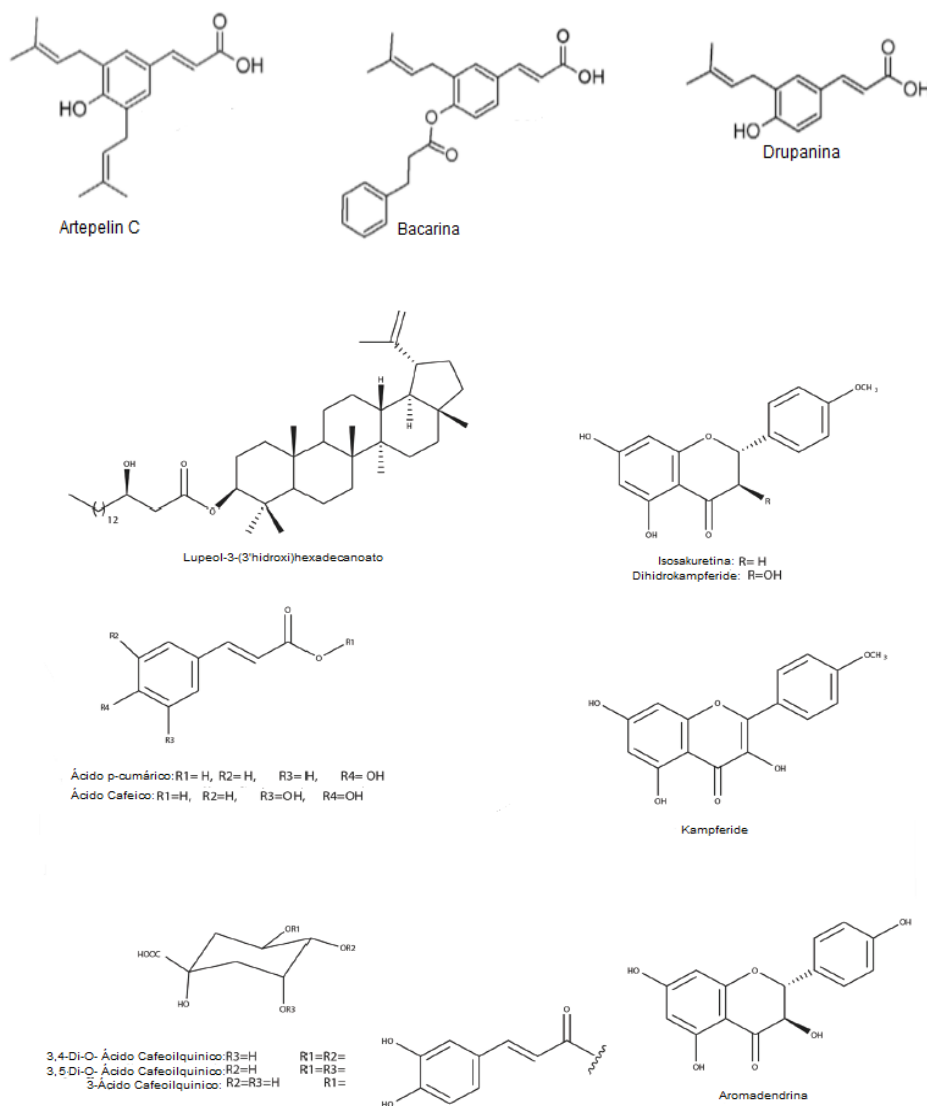
No Brasil, existem vários tipos de propólis, uma uma vez que as diferentes regiões geográficas possuem grande diversidade de espécies botânicas. Sendo assim, sua composição química também é variável e altamente complexa. Propólis com mais de 300 substâncias diferentes já foram identificadas, porém, em geral, elas são compostas por 5% de pólen, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal e os 5% restante de outras substâncias variadas, como resíduos (BURDOCK, 1998).

Independente de sua composição, a propólis apresenta baixa toxicidade para humanos (HAUSEN et al., 1987; GHISALBERTI, 1979; KANEEDA; NISHINA, 1994),

mostrando-se segura na dose de até 70 mg/dia (BURDOCK, 1998) e sem causar efeitos adversos graves (KANEEDA; NISHINA, 1994).

A própolis verde é encontrada em diversas regiões do Brasil, como por exemplo, leste de São Paulo e leste, sul e centro de Minas Gerais (NASCIMENTO et al., 2008). É, portanto, uma das mais estudadas e utilizadas em medicamentos fitoterápicos no Brasil. Ela apresenta em sua composição, além da elevada porcentagem de cera e outras substâncias, uma grande mistura de flavonóides e ácidos fenólicos. Estes compostos são obtidos dos ápices vegetativos da alecrim-do-campo (*Bacaris dracunculifolia*), sua principal fonte. Esta espécie vegetativa não possui uma adaptação adequada em relação as condições naturais existentes em outros países (MIYATAKA et al., 1997) o que a leva a possuir características químicas e biológicas diferenciadas. Os principais flavonóides e ácidos fenólicos nela presentes são o artepelin C, a bacarina, a drupanina, a kampferide, a isosakuranetina, a dihidrokampferide, o ácido p-cumárico, o ácido caféico, a aromadendrina, derivados do ácido cafeoilquinico, dentre outros compostos, como o lupeol-3- (3'R-hidroxi) hexadecanoato (Figura 8) (BERRETTA et al., 2017). O artepelin C, a bacarina e a drupanina são marcadores específicos da própolis verde coletados pela espécie de abelha *Apis mellífera* (MACHADO et al., 2012; SAITO et al., 2015; LUSTOSA et al., 2008).

Figura 8 - Estruturas químicas de alguns compostos presentes na própolis verde.



Fonte: Adaptado de (BERRETTA et al., 2017; HATA et al., 2012).

A própolis apresenta várias propriedades benéficas, como anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antioxidante, imunomodulatória, antiulcerogênica e antimutagênica (DE BARROS et al., 2007; ORSATTI et al., 2010). Suas propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antioxidantes são atribuídas principalmente aos compostos fenólicos que a compõe (SONG et al., 2002; FITZPATRICK; WANG; LE, 2001; DUTHIE; GARDNER; KYLE, 2003; HORI et al., 2013).

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar diferentes formulações de *Cold Cream*, compostas por ceras de abelha purificada e bruta, e investigar sua efetividade no tratamento da DA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Identificar os componentes majoritários que compõem as ceras de abelha bruta e purificada usadas no preparo das formulações;
- Avaliar *in vitro*, em cultura de células de macrófagos, a atividade anti-inflamatória da própolis encontrada na cera de abelha bruta;
- Preparar formulações de *Cold Cream* estáveis compostas por cera de abelha bruta (*Cold Cream B.*) e purificada (*Cold Cream P.*), esta última acrescida ou não de própolis (*Cold Cream P. + Própolis*) na mesma concentração que a presente no *Cold Cream B.*;
- Avaliar as características organolépticas e reológicas das formulações em função do tempo de armazenamento;
- Determinar as propriedades mecânicas e bioadesivas das formulações;
- Avaliar, *in vitro*, a influência das formulações na hidratação da pele;
- Avaliar o impacto do creme, contendo ou não própolis, na evolução da DA em ensaio clínico em humanos;
- Analisar a influência da própolis na evolução da DA em ensaio clínico em humanos.

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES GRAXOS PRESENTES NAS CERAS DE ABELHA

Em colaboração com o grupo do Prof. Norberto P. Lopes (FCFRP-USP), os componentes graxos presentes na cera de abelha purificada (GM CERAS Comércio de Ceras e Derivados Ltda., lot:1321) e bruta (Vale do Mel, lot:153A), sendo elas obtidas de abelhas silvestres e *Apis Mellifera* respectivamente, foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS) (Shimadzu, QP-2010, JP), de acordo com a metodologia proposta por GARNIER et al., 2002, com modificações. Resumidamente, 1 g das ceras de abelha pesadas em balança semi analítica (Shimadzu, São Paulo, Brasil) foi solubilizado em 10 mL de hexano (Honeywell, EUA). A essa solução foi adicionado 10 mL de metanol (J.T. Baker, Ecatepec, México) /água purificada (Grau Milli-Q, condutividade de 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , Millipore, Direct-Q UV, FR) (9:1), seguida de agitação e separação das fases em funil de separação originando uma fração hexânica e uma fração metanólica. À fração hexânica foram adicionados 10 mL de diclorometano (Honeywell, EUA) que, após separação em funil de separação, deu origem a fração hexânica e a fração diclorometânica H. À fração metanólica foram adicionados 5 mL de diclorometano/hexano (1:1), que, após separação das fases, deu origem a fração diclorometano/hexano e a segunda fração metanólica. À essa fração metanólica resultante adicionou-se mais 5 mL de diclorometano que, após separação das fases, deu origem a fração diclorometânica M e a fração metanólica final. Cada uma das 5 frações obtidas (hexânica, diclorometânica H, diclorometano/hexano, diclorometânica M e metanólica final) foi evaporada e adicionada de 550  $\mu\text{L}$  de solução de N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) e trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) (98:2) como agentes de sililação, além de 100  $\mu\text{L}$  de piridina (Vetec Química, EUA) como catalisador nucleofílico. Essa mistura foi mantida em banho maria (314/4 Nova Ética, Brasil) a 80°C por 30 min para que a reação de sililação ocorresse, tornando os compostos presentes na cera de abelha voláteis para a análise no CG. As injeções foram realizadas a 260°C e a separação dos compostos foi realizada usando coluna DB-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), mantida a uma temperatura de 80°C. A pressão do

hélio foi de 187,1 kPa, a uma velocidade linear de 31,9 cm/s, com fluxo da coluna de 1,5 mL/min. O espectro de massas foi registrado no modo SCAN a 70 eV, com uma temperatura da fonte de íons de 250°C. No modo de varredura completa, a faixa de massa foi varrida de 40 m/z até 700 m/z a cada 0,3 s. Com base nos cromatogramas obtidos, o espectro de massas correspondente a cada pico foi comparado com os espectros teóricos dos bancos de dados de espectros de substâncias, tais como NIST11, NIST11-S, WILEY7, NIST08 e FFNSC1.3, através do índice de similaridade. Os componentes presentes em ambas as ceras bruta e purificada foram discriminados na forma de tabela separados daqueles presentes apenas na cera bruta e apenas na cera purificada.

#### 4.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA PRÓPOLIS VERDE NA CERA DE ABELHA

Foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatograph*) baseando-se no método descrito por Sousa et al., 2007, com modificações. Esses experimentos foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Jairo K. Bastos (FCFRP-USP).

Resumidamente, 1 g das ceras de abelha bruta e purificada foi solubilizado, em banho maria (Heating Bath, B-491, Suíça), em 10 mL de hexano e essa solução foi particionada com 10 mL de metanol e água Milli-Q (9:1) por três vezes. As frações metanólicas foram combinadas, filtradas em filtro com porosidade de 0,45 µm (GVS, RPFSE0002, EUA), evaporadas e o precipitado resultante solubilizado em 1 mL de metanol e injetado no cromatógrafo. A análise cromatográfica foi feita usando HPLC (Waters, Massachusetts, EUA) equipado com bomba binária, injetor automático, detector de arranjo de diodos e software (Empower, Massachusetts, EUA). A coluna empregada foi uma C18 (Phenomenex LUNA, Califórnia, EUA) de 250 mm x 4,6 mm x 5 µm com pré-coluna C18 de 4 mm x 3,0 mm. A fase móvel, composta por (A) água purificada contendo 0,4% de ácido fórmico (Synth, São Paulo, Brasil), 5% de metanol e 2% de isopropanol (Honeywell, Morris Plains, NJ, EUA) (A) e (B) 2% de isopropanol em acetonitrila (J.T. Baker, Ecatepec, México) foi passada a um fluxo de 1 mL/min em gradiente de concentração, sendo 20% B por 3 min, 20-25% B de 3-4 min, 25% B de 4-15 min, 25-45% B de 15-20 min, 45% B de 20-40 min, 45-60% B de 40-45 min, 60-80% B de 45-68.83 min, 80-20% B de 68.86-70 min, 20% B de 70-80 min. O volume

de injeção foi de 15 µL, a temperatura do forno da coluna de 30°C e o comprimento de onda de quantificação de 300 nm.

O perfil cromatográfico das ceras de abelha foi comparado com o perfil cromatográfico de um extrato de própolis verde padronizado eluído nas mesmas condições cromatográficas. O extrato de própolis foi preparado de acordo com Costa et al., 2018, como descrito no item 4.2.1.

Para a análise quantitativa, o artepelin C foi utilizado como marcador da própolis verde. Uma curva de calibração foi construída na faixa de 0,38 a 112 µg/mL de artepelin C (obtida e purificada no laboratório do Prof. Jairo Kenupp Bastos da FCFRP-USP) em metanol. Cada ponto da curva continha 25 µg/mL de veratraldeído (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), usado como padrão interno (SOUSA et al., 2007). A concentração de artepelin C presente na cera de abelha bruta foi determinada a partir da fração metanólica particionada da solução hexânica da cera, como descrito acima. A esta fração metanólica seca foram adicionados 1 mL de veratraldeído a 25 µg/mL em metanol, e essa solução foi injetada no HPLC.

Em função da massa de extrato metanólico seco obtido a partir dos procedimentos de partilha, determinou-se que ele continha  $0,56 \pm 0,12$  mg/g de artepelin C. Este extrato, a partir de agora tratado como extrato concentrado, foi utilizado para o preparo das soluções de cera de abelha bruta analisadas nos estudos de citotoxicidade (item 4.3.1) e atividade anti-inflamatória (item 4.3.2). A cera de abelha bruta, usada para fazer esse extrato concentrado, continha  $21 \pm 2,98$  µg/g de artepelin C.

#### **4.2.1 Preparo do extrato de própolis verde padronizado**

Em 50 g de própolis verde (Apis Flora, São Paulo, Brasil) pulverizado foram adicionados 500 mL de etanol (Labsynth, Diadema, Brasil) e água purificada (7:3). Esta mistura foi macerada em macerador (Marshall Scientific, Innova 4300, Nova Hampshire, EUA) a 120 rpm, 35°C, por 24 h. Após este período, a dispersão foi filtrada com papel de filtro em funil de vidro. Esse processo foi repetido por três vezes e o filtrado rotaevaporado (Rotaevaporador, R-210, Vacum Controller, V-855, Vacum Pump, V-700, Heating Bath, B-491, Buchi, Suíça) para obtenção de aproximadamente 44 g de extrato de própolis verde. O teor de artepelin C no extrato seco foi determinado utilizando-se a curva analítica e método cromatográfico descrito no item 4.2. Para

tanto, pesou-se 500 µg do extrato de própolis seco em balança analítica (Adventur™ - Ohaus, EUA) e a ele adicionou-se 1 mL de veratraldeído a 25 µg/mL em metanol. A concentração de artepelin C determinada foi de 117,36±2,74 mg/g de extrato seco.

### 4.3 TESTES *IN VITRO* EM CULTURA DE CÉLULAS

#### 4.3.1 Citotoxicidade

Macrófagos da linhagem AMJ-2 foram mantidos na condição de criopreservação em nitrogênio líquido, em solução de congelamento com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Labsynth, Brasil) e 90% de soro bovino fetal inativado (Gibco, Nova York, EUA). Esta linhagem celular foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA). No momento da realização dos experimentos, as células foram descongeladas em banho maria a 37°C e expandidas em garrafas de cultura celular, adicionadas de meio *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (meio completo) (Gibco, Nova York, EUA), e então foram mantidas em estufa incubadora (Thermo Fisher Scientific, Oshio, EUA) a 37°C e com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

No momento da remoção das células das garrafas de cultura foi utilizado um método de desagregação da monocamada por método mecânico, com a ajuda do *rubber policeman* (Kasvi, China) um dispositivo semelhante a um rodo estéril que retira as células do fundo da garrafa de cultivo. Posteriormente a isso, o conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubo falcon e centrifugado (Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific, EUA) a 24°C e 1200 rpm durante 8 min. O sobrenadante foi descartado e as células reesuspendidas em meio de cultura completo. As células foram contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha) utilizando microscópio óptico invertido (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

O plaqueamento foi realizado em placas de 6 poços de 2000 µL (Kasvi, China) contendo 1x10<sup>6</sup> células/poço. No dia seguinte ao plaqueamento das células, o meio de cultura foi removido e os poços da placa foram lavados duas vezes com solução salina. Em placas distintas, foram adicionados às células, em sextuplicata, extrato concentrado da cera de abelha bruta nas concentrações de 6,25 a 25 µg/mL e extrato de própolis verde nas concentrações de 34 a 119 ng/mL, todas as soluções



preparadas em meio de cultura DMEM completo contendo 0,05% de DMSO. Essas concentrações de ambos os extratos continham de 3,5 a 14 ng/mL de artemelin C. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24 h (OECD, 2004). Como controle, as células foram tratadas com solução de DMSO 0,05% em meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo através de um citômetro BD FACSCanto II (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Para tanto, após 24h da amostra em contato com as células, os sobrenadantes foram retirados, as placas mantidas em banho de gelo e às células foram adicionados 1,5 mL de PBS gelado para lavagem e total desagregação das células com auxílio de uma ponteira e do *rubber policeman*. As células dispersas em PBS foram então transferidas para *ependorf* e submetidas a centrifugação à 1200 rpm por 3 min. O sobrenadante foi retirado e ao pellet de células foi adicionado 150 µL de meio DMEM incompleto, contendo 10.000 U/mL de penicilina G e 10.000 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Nova York, EUA), para reesuspensão das células e análise por citometria de fluxo. As células não viáveis foram marcadas com 1 µL de iodeto de propídeo (IP) na concentração de 50 µg/mL (Sigma Aldrich, Missouri, EUA). A análise do ensaio foi realizada em sextuplicata em comprimento de onda de 570-700 nm.

#### **4.3.2 Atividade anti-inflamatória da cera de abelha bruta e do extrato de própolis verde**

Macrófagos da linhagem AMJ-2 foram cultivados conforme descrito no item 4.3.1. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços (Kasvi, China), de 500 µL, contendo 4x10<sup>5</sup> células/poço. Foram adicionados às células, em sextuplicata, dissolvido em meio de cultura DMEM completo contendo 0,05% de DMSO, 6,25 a 25 µg/mL do extrato concentrado da cera de abelha bruta e 34 a 119 ng/mL do extrato de própolis verde, além de 10 µL de uma solução de Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) a 100 µg/mL. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h (OECD, 2004). Após este período, 50 µL do sobrenadante sem diluição foi removido e a concentração de IL-6, TNF-α, IL-17 e INF-γ nele presente analisada por Elisa utilizando kits específicos, seguindo as especificações do fabricante (R&D Systems Corporation, Minnesota, EUA). A análise foi realizada no comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplacas SpectraMax Paradigm (SoftMax Pro 6.2.1, Molecular Devices, Califórnia, EUA) (LEMOS et al., 2018).

#### 4.4 PREPARO DE FORMULAÇÕES DE *COLD CREAM*

Foram preparados quatro cremes: o Farmacopeico, a partir da formulação oficial do *Cold Cream* descrita na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2012), um contendo estabilizantes e cera de abelha bruta (*Cold Cream B.*), outro com a mesma composição do *Cold Cream B.*, mas substituindo-se a cera de abelha bruta pela purificada (*Cold Cream P.*) e outro adicionando-se extrato de própolis verde padronizado ao *Cold Cream P.* (*Cold Cream P. + Própolis*) em quantidade equivalente de artepelin C a presente no *Cold Cream B.*

A composição de cada um dos quatro cremes preparados está apresentada na Tabela 1.

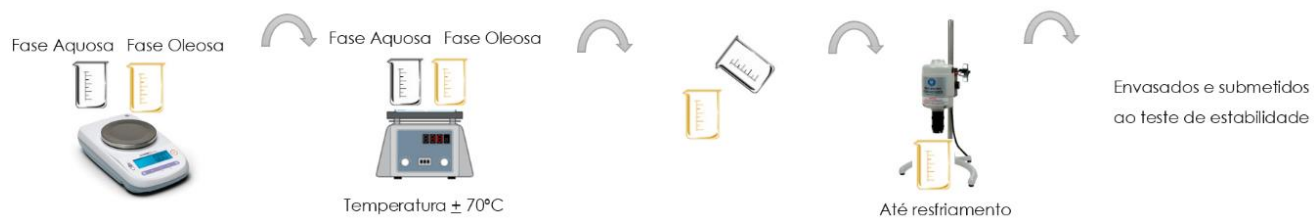
Tabela 1 - Composição dos *Cold Cream* preparados.

Componentes	% no <i>Cold Cream</i> (m/m)			
	Farmacopeico	B.	P.	P. + Própolis
Cera de abelha purificada	15	-	13,5	13,5
Cera de abelha bruta	-	13,5	-	-
Vaselina sólida	-	13,5	13,5	13,5
Álcool cetosteárico	-	1,5	1,5	1,5
Manteiga de Cacau	-	1,5	1,5	1,5
Vaselina líquida	50	32	32	32
Monoestearato de glicerila	-	1	1	1
Álcool Cetosteárico Etoxilado 20	-	0,3	0,3	0,3
Butil hidroxitolueno (BHT)	0,05	0,05	0,05	0,05
Borato de sódio	1	1	1	1
Glydant Plus Liquid*	0,2	0,2	0,2	0,2
Água qsp	100	100	100	100
Extrato de Própolis verde	-	-	-	$2,3 \cdot 10^{-3}$

\* Conservante que combina 1,3-Dimetilol-5,5-dimetil-hidantoína (DMDM-Hidantoína) e Butilcarbamat de Iodopropinil (IPBC).

Os cremes foram preparados aquecendo-se a fase aquosa (borato de sódio (Labsynth, São Paulo, Brasil) e água purificada) e a fase oleosa (álcool cetosteárico, álcool cetosteárico etoxilado 20, BHT, manteiga de cacau, monoestearato de glicerila, vaselina sólida (Mapric, São Paulo, Brasil) e vaselina líquida (Fagron, São Paulo, Brasil)) separadamente, em béqueres, até aproximadamente 70°C. A fase aquosa foi então vertida sobre a fase oleosa e a mistura submetida a agitação mecânica (Fisatom, 722, São Paulo, Brasil) a 245 rpm por 5 min e em seguida mantida a 300 rpm até arrefecer ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) (Figura 9). O conservante (Glydant Plus Liquid® Synbios, São Paulo, Brasil) foi então adicionado e agitado mecanicamente.

Figura 9 - Esquema representativo do preparo dos cremes.



Fonte: Autoria própria.

Para obter o *Cold Cream P.* + Própolis, 2,3 mg de extrato de própolis verde padronizado (item 4.2.1) foram adicionados a 100 g do *Cold Cream P.* já pronto, a temperatura ambiente, por espatulação com auxílio de uma espátula de plástico. Esta quantidade de própolis corresponde a  $2,7 \mu\text{g}$  de artepelin C por grama de creme.

#### 4.4.1 Determinação do tamanho de gotícula

O diâmetro médio das gotículas da fase interna dos cremes foi avaliado, em duplicata, por microscopia óptica (Nikon, eclipse E100, Nova York, EUA). As amostras analisadas (25 mg) foram diluídas 1000 vezes em vaselina líquida (Synth, Brasil) sob agitação em agitador de tubos (IKA Vortex, Genius 3, São Paulo, Brasil). Após diluição, uma câmara de Neubauer foi preenchida com a dispersão e o número médio de gotículas contados em 10 quadrantes da parte central da Câmara para se determinar o número médio de gotículas por unidade de peso dos cremes ( $N$ ) (Equação I).

$$N = \frac{\tilde{n}E}{VQ\rho_d} \quad (\text{Equação I})$$

Onde,  $\tilde{n}$  = número médio de gotículas por quadrante,  $Q$  = quantidade em g da fase interna da emulsão por g de emulsão,  $E$  = diluição,  $\rho_d$  = densidade do líquido de diluição ( $0,88 \text{ g/mL}$ ),  $V$  = volume embaixo do quadrado de observação ( $25 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^3$ ). A partir do valor de  $N$  obtido e da densidade da fase interna ( $\rho_i$ ), composta basicamente por água ( $1 \text{ g/cm}^3$ ), foi calculado o diâmetro volume-número ( $d_{VN}$ ) das gotículas (Equação II).

$$d_{VN} = \frac{\sqrt[3]{6}}{\rho_i N_w \pi} \quad (\text{Equação II})$$

#### 4.5 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

Os cremes foram armazenados a temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), em frascos de polietileno brancos de boca larga com tampa de rosca, por um período de 60 dias (tempo e condição em que ficaram sob os cuidados dos pacientes no ensaio clínico). Amostras foram analisadas após 1, 15, 30, 45 e 60 dias quanto as características organolépticas e comportamento reológico.

##### 4.5.1 Características organolépticas

Cor, odor, aparência e separação de fases foram analisados macroscopicamente e denominados de acordo com BUHLER, FERREIRA, 2008 como:

- N:** Normal; Sem alteração;
- LMA:** Leve Modificação da Aparência;
- LMC:** Leve Modificação da Cor;
- LMO:** Leve Modificação do Odor;
- MA:** Modificação da Aparência;
- MC:** Modificação da Cor;
- MO:** Modificação do Odor;
- IMA:** Intensa Modificação da Aparência;
- IMC:** Intensa Modificação da Cor;
- IMO:** Intensa Modificação do Odor.

##### 4.5.2 Avaliação reológica de cisalhamento contínuo

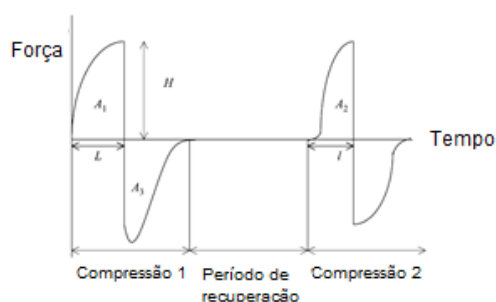
Curvas de fluxo e de viscosidade foram obtidas em reômetro (TA, Discovery HR-2 Hybrid Rheometer, Delaware, EUA) com taxa de cisalhamento controlada, em modo de fluxo, com geometria do dispositivo de medição do tipo cone e placa de aço de 40 mm, *gap* de 59  $\mu\text{m}$  e ângulo de  $2^\circ$ . Os experimentos foram realizados a  $25^\circ\text{C}$ , em triplicata. Aproximadamente 3 g dos cremes foram aplicados à placa e mantidos em repouso durante 60 s assegurando o mínimo de cisalhamento. As curvas de fluxo (ascendente e descende) foram obtidas com taxa de cisalhamento crescente de 1 a  $100\text{ s}^{-1}$  com intervalo de 30 s. As áreas de histerese foram calculadas utilizando o programa *Origin 6.1.*, para isso, foram obtidas as integrais de cada curva ascendente

e descende, e então, os valores da ascendente foram subtraídas dos valores da descendente.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas foram determinadas utilizando-se um analisador de textura (Stable Micro Systems Ltd., TA-XT Texture Analyser, Surrey, UK). Amostras de 10 g dos cremes foram colocadas em béquer e deixadas a temperatura ambiente (25°C) por 24 h antes do teste. As amostras foram então comprimidas duas vezes com uma prova analítica de policarbonato (10 mm de diâmetro), com velocidade de 2 mm.s<sup>-1</sup>, profundidade de 5 mm e tempo de 15 s entre o final da primeira e o início da segunda compressão (ESTANQUEIRO; AMARAL; SOUSA LOBO, 2016). As análises foram realizadas em 10 replicatas. Foram construídos gráficos de força vs. tempo para determinar a dureza (força necessária para atingir uma dada deformação), compressibilidade (trabalho necessário para deformar o produto durante a primeira compressão da prova), coesividade (capacidade de reestruturação da formulação após remoção do frasco) e elasticidade (taxa de deformação após aplicação de uma força) (Figura 10) com o auxílio do *software Exponent* (Stable Micro Systems, UK).

Figura 10 - Representação esquemática do gráfico obtido a partir da análise de textura. Onde: H: dureza,  $A_1$ : compressibilidade,  $A_2/A_1$ : coesividade e  $l/L$ : elasticidade.



Fonte: Adaptado de (AGHAZARIAN et al., 2004).

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA FORÇA BIOADESIVA

A força necessária para destacar o creme da superfície de uma amostra de pele foi avaliada utilizando o analisador de textura em módulo de tensão (HECK et al., 2016) e as peles utilizadas foram obtidas de orelha de porco coletadas imediatamente após o abate dos animais (Frigorífico Olhos D'água, Ipuã, SP, Brasil). As orelhas foram mantidas a aproximadamente 4°C enquanto transportados para o laboratório, onde as

peles foram dissecadas. As amostras de pele foram colocadas no acessório do equipamento (parte inferior) e o creme fixado no acessório superior. Em seguida, o dispositivo superior do equipamento foi movimentado para baixo até encontrar a superfície da pele, mantendo contato com força de 0,5 N por 60 s. Após este período, o acessório foi movimentado para cima (módulo de tensão), a velocidade constante de 1 mm.min<sup>-1</sup>, até que o corpo de prova se destacasse da pele. Foram determinadas a força necessária para destacar o creme da pele (força de destacamento) e o trabalho de bioadesão (área sob a curva de força vs. distância), com auxílio do software *Exponent* (Stable Micro Systems, UK). O ensaio foi realizado em quintuplicata.

#### 4.8 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA HIDRATAÇÃO DA PELE POR MEDIDA DE RESISTIVIDADE ELÉTRICA DO ESTRATO CÓRNEO

Com o objetivo de analisar a capacidade de hidratação das formulações, peles de orelha de porco foram colocadas em células de difusão (células de Franz, área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) e o compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato isotônico (PBS), pH 7,4. A resistividade elétrica do estrato córneo foi medida antes e após 8 h de contato com 200 mg dos cremes. Como controle, a pele foi tratada por 8 h apenas com 2 mL de PBS. Para as medidas, a formulação em contato com a pele foi removida, a pele lavada gentilmente com água corrente, seca delicadamente com papel absorvente e o compartimento doador preenchido com PBS. Eletrodos de Ag/AgCl foram inseridos nos compartimentos doador e receptor e uma corrente elétrica alternada gerada a 100 mV e 10 Hz (Arbitrary Waveform Generator, 33220A, Agilent, Califórnia, EUA) foi aplicada. A intensidade da corrente elétrica que atravessou esse circuito foi medida com auxílio de um multímetro a resistividade elétrica da pele (R) foi calculada segundo a lei de Ohm usando a Equação III. A análise foi realizada em quintuplicata.

$$R = \frac{(U/i)}{A} \quad (\text{Equação III})$$

Onde, *U*: tensão elétrica aplicada (V); *i*: intensidade de corrente medida (A) e *A*: área da pele (cm<sup>2</sup>) em contato com o meio receptor.

O aumento da hidratação da pele foi relacionado com a menor resistividade da mesma à passagem da corrente elétrica devido a um aumento do conteúdo de água. Assim, a porcentagem de hidratação foi calculada de acordo com a Equação IV.

$$\%Hidratação = \frac{R_i \cdot 100}{R_f} - 100 \quad (\text{Equação IV})$$

Onde,  $R_i$  corresponde a R da pele antes do tratamento e  $R_f$  corresponde a R da pele após as 8 h de contato com o creme ou com o PBS (controle). Além disso, para validação do método acima foi realizado a medida do teor de água (%) das peles com auxílio de um equipamento portátil SkinUp (Skin Analyser Digital, SkinUp, Brasil). As medidas foram realizadas antes e após 8 horas de tratamento. Para tanto, as formulações foram retiradas, as peles lavadas cuidadosamente com água corrente, secas encostando suavemente um papel absorvente e então colocadas em contato com a sonda do equipamento.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS NOS ESTUDOS *IN VITRO*

As comparações das médias de duas populações foram realizadas empregando-se o teste *t-student* pareado ou não pareado. No caso de três ou mais populações, os dados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) segundo um critério, seguidos do pós-teste de Tukey, utilizando o *software* GraphPad InStat 4.0 (GraphPad Software Inc., Califórnia, EUA). Foram considerados significativos valores de  $p$  menores do que 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.10 ENSAIO CLÍNICO EM HUMANOS

Esse estudo foi realizado com pacientes portadores de DA do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) em colaboração com a Professora Doutora Renata Nahas Cardili, especialista em dermatologia e médica assistente do ambulatório de alergia e Dermatite Atópica do HCFMRP, e do Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade, especialista em dermatologia e coordenador da Divisão de Dermatologia do HCFMRP. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) e do HCFMRP-USP (CAAE 83521418.5.0000.5403 Anexo A) e o protocolo em humanos somente foi iniciado após a aprovação dos referidos CEPs.

Para avaliar a influência do uso do creme na necessidade de introduzir novos medicamentos para o controle da DA, de maneira geral, os pacientes foram divididos em dois grupos: o grupo controle foi tratado com o *Cold Cream P.* e o grupo intervenção com o *Cold Cream P. + Própolis*. O *Cold Cream P.* foi escolhido para ser

aplicado nos pacientes devido a sua estabilidade e maior controle lote a lote na produção da cera de abelha purificada, que faz parte de sua formulação, em relação a cera de abelha bruta, que faz parte do *Cold Cream B*. Além disso, o *Cold Cream P*. e o *Cold Cream P. + Própolis* tem, com exceção da presença da própolis, a mesma composição e características mecânicas e reológicas semelhantes, o que permite avaliar o impacto da presença da própolis verde na evolução da DA eliminando qualquer influência que a formulação base do creme possa ter.

#### **4.10.1 Caracterização do local do estudo**

O estudo foi conduzido no ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O ambulatório é vinculado a Unidade de Clínica Médica a qual possui diversas subespecialidades, incluindo: alergia e imunologia, dermatologia, dermatologia oncológica e dermatologia infantil. Essa unidade presta assistência médica hospitalar a pacientes internados e ambulatoriais e desenvolve atividades de Ensino e Pesquisa. Os pacientes foram atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (HCFMRP).

#### **4.10.2 Tipo de estudo**

Trata-se de um ensaio clínico randomizado triplo cego, onde a médica, paciente e pesquisadora não sabiam qual a formulação que cada paciente estava usando. Uma pesquisadora externa foi a responsável pelo envase e rotulagem das formulações, para garantir o sigilo das composições. Essa pesquisadora foi quem distribuiu os pacientes entre os dois grupos, controle e intervenção, para garantir a homogeneidade dos mesmos. Os resultados foram analisados comparando-se os dados dos instrumentos escolhidos antes (tempo 0) e após 60 dias da utilização das formulações de *Cold Cream*. Para a realização do estudo clínico foi utilizada as recomendações presentes no guia CONSORT para estudos clínicos (CONSORT, 2010).

#### **4.10.3 População de estudo**

A partir dos prontuários de pacientes do ambulatório de dermatologia do HCFMRP foram recrutados pacientes que atendiam aos critérios de inclusão citados a seguir:



- Ambos os sexos de pessoas diagnosticadas com DA, em acompanhamento no ambulatório de dermatologia do HCFMRP;
- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Não grávidas;
- Capacidade de comunicação verbal e de entendimento;
- Não possuir alergia a quaisquer dos componentes presente em pelo menos uma das formulações, principalmente a própolis;
- Possuir interesse em participar da pesquisa;
- Comparecer na primeira consulta, mesmo reagendando.

Como critérios de exclusão foram estipulados o abandono do estudo e o relato da presença ou aumento de lesões e/ou prurido, após início da utilização das formulações.

#### **4.10.4 Protocolo Clínico**

Os pacientes que atendiam aos critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo após consulta médica pré-agendada no ambulatório de dermatologia do HCFMRP. No primeiro momento (tempo 0) o paciente recebeu as informações detalhadas sobre a pesquisa e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) para assinar e então fazer parte da pesquisa. O TCLE foi emitido em duas vias de igual conteúdo: uma permaneceu com o paciente e a outra sob a guarda do responsável pela pesquisa.

Os pacientes que assinaram o TCLE foram divididos em 2 grupos buscando a homogeneidade entre raça, sexo, medicamentos em uso e introdução ou retirada de medicamentos de uso oral ou tópico feitas pelo médico no dia 0, consideradas variáveis confundíveis. Um grupo recebeu aleatoriamente o *Cold Cream P.*, e o outro grupo o *Cold Cream P. + Própolis*. Cada paciente recebeu 10 potes, cada um contendo 200 g de creme, quantidade suficiente para uso por 60 dias. A escolha da formulação entregue ao paciente foi realizada de forma aleatória pela pesquisadora externa, independente da coleta e da análise de dados.

O estudo clínico foi dividido em três partes, com duração total de dois meses. Foram realizados dois encontros presenciais, no dia 0 e após 60 dias, e um contato telefônico no meio do tratamento, após 30 dias. Nos encontros presenciais o paciente foi avaliado pelo médico quanto a gravidade da doença e pelo pesquisador quanto a

hidratação da pele, qualidade de vida, adesão da formulação e, em alguns pacientes, morfologia e topografia dos corneócitos, além da coleta de dados sociodemográficos e clínico do paciente. No acompanhamento por telefone, o pesquisador questionou o paciente sobre o aparecimento de qualquer reação adversa, dúvidas, adesão e opinião relacionada ao uso da formulação.

#### **4.10.5 Delineamento do estudo**

Após o paciente passar pela consulta de rotina com o clínico dermatologista, o mesmo era encaminhado para uma sala para atendimento pela pesquisadora farmacêutica, onde eram aplicados os instrumentos selecionados para o ensaio clínico. A seguinte rotina era aplicada para todos os pacientes:

- Consulta 1 (dia 0): o clínico calculava o SCORAD (item 4.10.8.1) do paciente e o encaminhava para o pesquisador principal. Para esse, o paciente respondia a um questionário sociodemográfico e clínico (item 4.10.8.2) e a um questionário para avaliação da qualidade de vida (DLQI) (item 4.10.8.3). A medida de hidratação da pele com o auxílio de um equipamento portátil (Skin Analyser Digital, SkinUp, Brasil) (item 4.10.8.4) era então realizada. Em alguns pacientes escolhidos aleatoriamente, o *tape stripping* foi realizado para avaliar a morfologia geral dos corneócitos (item 4.10.8.5). O paciente era então orientado a aplicar uma fina camada do creme recebido, duas vezes ao dia, no corpo todo, menos na face, pela manhã e à noite após o banho, até o retorno, após 60 dias.
- Consulta 2 (após 30 dias): O pesquisador principal ligava para o paciente para que o mesmo relatasse dúvidas, adesão, reação adversa e opiniões em relação a formulação em uso.
- Consulta 3 (após 60 dias): o clínico calculava o SCORAD e encaminhava o paciente para o pesquisador principal. Esse avaliava a adesão e aplicava novamente o questionário DLQI. A medida de hidratação e o *tape stripping*, esse último apenas nos pacientes nos quais foi aplicado na primeira consulta, eram também novamente realizados.

Os pacientes eram informados que poderiam, a qualquer momento, se desligar do estudo sem comprometimento do seu atendimento nas unidades de saúde e no HCFMRP. Em nenhum momento da pesquisa houve retirada dos medicamentos prescritos e utilizados previamente pelo paciente, apenas deixavam de utilizar o creme

hidratante já utilizado e passaram a aplicar o *Cold Cream* recebido durante o período da pesquisa.

O estudo clínico teve início no dia 13 de Agosto de 2018 e foi finalizado no dia 11 de Março de 2019, totalizando aproximadamente sete meses. Durante a realização do estudo pode-se analisar pacientes em três estações do ano distintas (inverno, primavera e verão). Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos, que apresentavam um dos três perfis clínicos da DA: leve, moderada ou grave; todos determinados pelo mesmo profissional.

#### **4.10.6 Cálculo do tamanho amostral**

O planejamento amostral foi realizado com base no cálculo do número amostral para estudos experimentais de população infinita, considerando a análise bicaudal para o alfa de 5% e poder de teste igual a 80% ou mais. Para isso, foi utilizada a amplitude do DP ( $\Delta DP$ ) entre os grupos controle e intervenção e o valor do erro estimado ( $\epsilon$ ), diferença clínica final entre os grupos, no intuito de se obter o  $n$  final para o estudo. O cálculo foi rodado no *software* estatístico MINITAB, versão 17, realizado para cada variável principal de análise do estudo e, então, considerado o maior  $n$  revelado (MEDRONHO, 2009).

Foi considerado o valor de  $Z$  para o alfa de 5% em testes bicaudais, o qual é de 1,96. Os valores da  $\Delta DP$  e o  $\epsilon$  foram calculados com base na literatura, por estudos que objetivaram as mesmas análises deste estudo. Para a variável SCORAD, o  $\Delta DP$  e  $\epsilon$  foram a média de 5,14 e 7,67, respectivamente (YOU et al., 2016; GRIMALT; MENGEAUD; CAMBAZARD, 2007); quanto a variável DLQI, o  $\Delta DP$  e  $\epsilon$  foram 0,48 e 0,51, respectivamente (GRIMALT; MENGEAUD; CAMBAZARD, 2007); e quanto a variável hidratação, o  $\Delta DP$  e  $\epsilon$  foram 23,00 e 21,80, respectivamente (SZCZEPANOWSKA; REICH; SZEPIETOWSKI, 2008). Diante disso, o  $n$  calculado para SCORAD, DLQI e hidratação foi, respectivamente, cinco, sete e sete.

O maior número amostral obtido diante das variáveis do estudo, sete, foi então adotado e a ele foram acrescentados 20% para considerar eventuais perdas, resultando em um total de 8,4 pacientes. Assim, o planejamento amostral foi realizado para cinco controles e cinco intervenções, totalizando dez pacientes, o que aumentou a margem de uma possível perda para aproximadamente 30%.

Em adição, foram testados o tamanho amostral diante do poder de teste estatístico unicaudal quanto a variação da resposta clínica para a comparação de médias entre controle e intervenção quanto as principais variáveis do estudo (Tabela 2). De acordo com a Tabela 2 e com os valores de erro ( $\epsilon$ ) encontrados na literatura para cada um dos instrumentos que serão avaliados, o valor ideal para o N da avaliação por SCORAD é 3 e para o DLQI e hidratação é 4. Assim, seria necessário realizar o estudo com 8 pacientes, 4 para cada grupo, para obter a precisão estimada dos testes de hipótese e aumentar o nível de evidência dos resultados (Tabela 2).

Tabela 2 - Cálculo do N de acordo com o poder do teste estatístico unicaudal quanto a variação da resposta clínica.

Erro ( $\epsilon$ )	N	Poder do teste	Poder real do teste
<b>SCORAD</b>			
-2,00	12	0,8	0,81
-3,00	7	0,8	0,86
-4,00	5	0,8	0,88
-5,00	4	0,8	0,90
-6,00	3	0,8	0,81
-7,70	3	0,8	0,93
-8,00	3	0,8	0,94
-9,00	3	0,8	0,97
<b>DLQI</b>			
0,10	38	0,8	0,80
0,30	6	0,8	0,83
0,40	5	0,8	0,91
0,51	4	0,8	0,93
0,60	3	0,8	0,84
0,70	3	0,8	0,92
0,80	3	0,8	0,96
0,90	3	0,8	0,98
1,00	3	0,8	0,99
<b>Hidratação</b>			
5,00	42	0,8	0,80
7,00	23	0,8	0,81
9,00	14	0,8	0,80
10,00	12	0,8	0,81
12,00	9	0,8	0,82
14,00	7	0,8	0,82
15,00	7	0,8	0,86
18,00	5	0,8	0,82

20,00	5	0,8	0,88
21,80	4	0,8	0,82
23,00	4	0,8	0,85
25,00	4	0,8	0,90
26,00	4	0,8	0,92
27,00	4	0,8	0,93
28,00	4	0,8	0,94
30,00	3	0,8	0,81

#### 4.10.7 Estudo piloto

No início do mês de agosto de 2018, com duração de aproximadamente duas semanas e quatro encontros, foi realizado um estudo piloto com seis pacientes com idade igual ou superior a 18 anos e com diagnóstico de DA do ambulatório de Alergia do HCFMRP. Esse ambulatório foi escolhido para esse estudo devido ao número limitado de pacientes com DA do ambulatório de Dermatologia, onde o estudo principal foi realizado.

O estudo piloto teve como objetivo apenas testar se a ficha para coleta de dados sociodemográficos e clínicos atendia aos propósitos do estudo, pois a mesma nunca havia sido aplicada para paciente com DA. Além disso, o piloto permitiu avaliar a confiabilidade da ficha para o registro das atividades do farmacêutico e dos desfechos da DA, familiarizar e capacitar a pesquisadora para trabalhar nos ambulatórios do HCFMRP e padronizar a técnica de coleta de dados.

Os pacientes submetidos ao teste piloto não foram incluídos no estudo principal.

#### 4.10.8 Instrumentos utilizados no ensaio clínico

##### 4.10.8.1 Escore da gravidade da dermatite atópica (SCORAD)

O Scrad (*Scoring Atopic Dermatitis*) (Anexo C) permite mensurar a gravidade da doença e orientar a conduta terapêutica. Este instrumento já foi validado e traduzido para o português. Neste critério avalia-se a área de pele acometida pela DA, eritemas, edema/pápulas, liquenificação, xerose, exudato/crosta e escoriação, além de uma avaliação do paciente sobre a qualidade do sono e intensidade do prurido. As notas atribuídas variam de 0 a 103 pontos. Pacientes que recebem pontuação menor do que 25 apresentam DA classificada como leve. Pontuação entre 25 e 50 caracteriza DA moderada e pontuação maior do que 50 caracteriza DA grave (WOLLENBERG et

al., 2016). O SCORAD foi atribuído pela dermatologista Profa. Dra. Renata Nahas Cardili, com o acompanhamento da pesquisadora principal, durante as consultas nos tempos 0 e 60 dias.

#### 4.10.8.2 Dados sociodemográficos e clínicos

Todos os participantes da pesquisa foram cadastrados no estudo mediante o preenchimento de uma ficha de identificação (Apêndice B) para a caracterização sociodemográfica e para traçar o perfil da população estudada. Aspectos clínicos e de adesão, bem como as opiniões sobre as características da formulação também foram avaliados por meio desse questionário. Esta ficha foi desenvolvida pela própria pesquisadora, e submetida a uma pré-validação no estudo piloto descrito no item 4.10.7.

#### 4.10.8.3 Avaliação da qualidade de vida (DLQI)

A qualidade de vida dos pacientes com DA foi avaliada por meio do questionário DLQI (*Dermatology Life Quality Index*) (Anexo B), o qual já foi traduzido e validado para o português. Ele mensura a forma como a DA afeta a vida do paciente nos sete dias anteriores ao seu preenchimento. Esse teste consiste em 10 questões divididas em seis dimensões, sintomas e sentimentos; atividades diárias; lazer; trabalho e escola; relações pessoais e tratamento. Cada pergunta tem quatro possíveis alternativas: nada, um pouco, muito e muitíssimo. Os itens foram pontuados variando de zero (melhor estado de saúde) a 30 (pior estado de saúde), sendo de 0-1 classificado como sem efeito na qualidade de vida do paciente, 2-5 pequeno efeito, 6-10 moderado efeito, 11-20 muito grande efeito e 21-30 extremamente grande o efeito (HJALTE; STEEN; SCHMITT, 2017). O DLQI foi aplicado ao paciente pela pesquisadora nos tempos 0 e 60 dias e a pesquisadora foi a responsável pelo preenchimento manual do questionário.

#### 4.10.8.4 Avaliação da hidratação da pele

Para avaliar a hidratação da pele, com auxílio de um sabonete líquido neutro, gase e água, a região a ser analisada foi lavada cuidadosamente 10 min antes da análise, para padronizar as leituras e eliminar possíveis interferentes. A avaliação da hidratação da superfície da pele foi realizada em uma área do antebraço (Figura 11)

do braço direito e esquerdo, padronizadas previamente, com o auxílio do equipamento *Skin Analyser Digital*. A hidratação da área da pele em tratamento foi avaliada nos tempos 0 e 60 dias e a média e desvio padrão das medidas nos dois braços foi utilizada para as comparações.

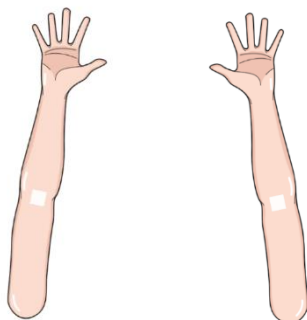
#### 4.10.8.5 Avaliação da morfologia geral dos corneócitos

A avaliação da morfologia geral dos corneócitos foi realizada pela técnica de *tape stripping*, com análise posterior dos mesmos por microscopia de força atômica (MFA) nos tempos 0 e 60 dias, de acordo com Franz et al., 2016 e Koppes et al., 2017. Após limpeza da região e avaliada a hidratação da superfície da pele (item 4.10.8.4), três pedaços de fita adesiva (Scotch, 3M) 3x3 cm<sup>2</sup> foram aplicadas sucessivamente no antebraço esquerdo do paciente (Figura 11) e retiradas após serem pressionadas por seis vezes. A terceira fita retirada foi colocada em lâmina de vidro e armazenada a -80°C até análise por microscopia de força atômica (MFA) para observar a topografia e a morfologia dos corneócitos antes e após o tratamento com a formulação.

Esta técnica foi realizada aleatoriamente em alguns pacientes, mas apenas duas amostras foram selecionadas ao final do estudo, depois dos grupos, antes cegos, serem revelados. Foram escolhidos dois pacientes com DA classificada como moderada, um do grupo controle e outro do grupo intervenção. Para fim de comparação, uma pessoa saudável, sem DA, foi utilizada como controle.

A análise da superfície dos corneócitos foi realizada empregando-se um Microscópio de Varredura (Scanning Probe Microscope (SPM-9600, Shimadzu)), em modo "*tapping*" (Modo Phase), utilizando-se pontas de silício (PPP-NCHR, Nanosensors), mantendo-se as amostras sob condições de força constante, à temperatura ambiente e expostas ao ar. As especificações do cantilever adotadas foram: espessura: 4±1 µm, comprimento: 125±10 µm, largura: 30±7,5 µm, frequência de ressonância: 204-497 kHz, constante de força: 10-130 N/m e altura da ponta: 10-15 µm.

Figura 11 - Representação da região do antebraço demarcada para avaliação da hidratação e *tape stripping*.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.10.9 Análise estatística dos dados obtidos dos experimentos *in vivo*

Os dados foram tabulados por meio do Microsoft Office Excel® (Office 2016). As variáveis quantitativas qualidade de vida, gravidade da doença e hidratação da pele tiveram os valores comparados antes e após o tratamento para cada paciente separadamente, todas elas resumidas por meio da média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo.

As variáveis qualitativas categóricas: sexo, escolaridade, raça, estado civil, frequências de consultas ao dermatologista anual, classificação do escore da gravidade da doença e as variáveis confundíveis foram analisadas por meio das frequências absolutas e relativas. A associação entre as variáveis categóricas foi avaliada por meio do teste Exato de Fisher quando havia presença de duas categorias. Para mais de duas categorias o teste de qui-quadrado por associação foi utilizado, com o objetivo de saber se ambos os grupos estavam homogêneos quanto à possíveis interferências ao tratamento. Para realizar o teste Exato de Fisher para as variáveis confundíveis, estas foram reunidas em duas categorias: com confundimento e sem confundimento, devido ao baixo  $n$  para cada uma. Além disso, dados em tabelas 2x2 foram avaliados por teste de McNemar e em 3x2 para o Modelo de Poisson transformado para ordinal, com o objetivo de determinar se a taxa de ocorrência diferia para os dois grupos.

As variáveis quantitativas foram comparadas por meio dos testes “*t student*”, seja ele pareado ou independente para duas amostras. Foi fixado um nível de significância ( $\alpha$ ) de 5% e as análises estatísticas foram conduzidas com o *software* MINITAB, versão 17.



#### **4.10.10 Riscos e desconfortos**

Esta pesquisa não previu desconfortos e não incluiu alteração do tratamento prévio do paciente, porém poderiam ocorrer reações idiossincráticas com o uso do creme, que foram monitoradas durante o acompanhamento dos pacientes e quando detectadas, o uso do *Cold Cream* foi suspenso imediatamente. Além disso, o nome do paciente não foi divulgado e foram adotadas medidas para manter a confidencialidade dos dados, como por exemplo, o uso de códigos.

#### **4.10.11 Benefícios**

O estudo previu auxílio nas duas vertentes do tratamento: não farmacológico e farmacológico. Durante o período da pesquisa os pacientes receberam informações úteis, por profissionais habilitados e especialistas, sobre a sua doença e tratamento que corroboraram com o sucesso da terapêutica da DA. Ainda, receberam gratuitamente as formulações de *Cold Cream* para o tratamento das lesões durante o período de pesquisa.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES GRAXOS PRESENTES NAS CERAS DE ABELHA

A Tabela 3 mostra o conjunto das substâncias identificadas por CG/MS nas frações hexânica, diclorometânica H e M, diclorometano:hexano e metanólica das ceras de abelha bruta e purificada, com base nos cromatogramas apresentados na Figura 12, após análise de similaridade com espectros teóricos dos bancos de dados de espectros de substâncias, tais como NIST11, NIST11-S, WILEY7, NIST08 e FFNSC1.3.

Tabela 3 - Substâncias presentes nas ceras de abelha bruta e purificada identificadas por CG/MS com base na similaridade dos espectros teóricos encontradas nos bancos de dados NIST11, NIST11-S, WILEY7, NIST08 e FFNSC1.3.

N°	Componentes*	Amostras					Classe Metabólica	Fração (Extrato)				
		Cera de Abelha Bruta	Cera de Abelha Purificada	TR		IS		Metanólica:Água	Diclorometânica M	Diclorometânica H	Hexânica	Diclorometano:hexano
				(min)	Banco de dados							
1	(Z) 3-Phenyl-2-propenoic acid ou Cinnamic acid (1TMS)*	x	-	15,16	NIST11s	95	Fenilpropanóides	x				
2	1,3-Dipalmitin (1TMS)	-	x	43,72	NIST11s	69	Glicerolípido					x
3	1,9- Nonanedioic acid ou Azelaic acid (2TMS)	x	x	18,01	NIST11s	92	Ácido Graxo	x				
4	2-Ethylbutyric acid, nonadecyl ester	-	x	41,31	NIST08	79	Ácido Graxo					x
5	4-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[3-oxo-1-butenyl]-2-cyclohexen-1-one	x	-	18,10	NIST11s	93	Cetona	x				
6	4-Hydroxy-3-methoxy benzoic acid ou Vanillic acid (2TMS)	x	x	17,57	WILEY7	85	Benzeno e derivados substituídos	x				
7	4-Hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ou Ferulic acid (1TMS)*	x	-	21,62	NIST08	83	Fenilpropanóides	x				
8	4-methoxy-benzeneacetic acid (1TMS)	x	-	15,04	NIST11	86	Benzeno e derivados substituídos	x				
9	4-Methoxy-benzoic acid (1TMS)	x	x	14,81	NIST11	92	Benzeno e derivados substituídos	x				
10	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) (1TMS)	x	-	23,60	WILEY7	96	Ácido Graxo	x	x	x		
11	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	x	-	13,71	WILEY7	82	Ácido Graxo					x
12	9-Octadecadienoic acid, ethyl ester	x	-	22,91	NIST11	94	Ácido Graxo	x				
13	9-Octadecenoic acid (1TMS)	x	-	14,05	WILEY7	96	Ácido Graxo					x
14	9-Octadecenoic acid, ethyl ester	x	-	22,92	NIST11	95	Ácido Graxo				x	x
15	beta.-L-Mannofuranose, 6-deoxy-1,2,3,5-tetrakis-O-(1TMS)-?	x	-	18,21	WILEY7	88	Açúcar	x				
16	Butanedioic acid (2TMS)	-	x	11,81	WILEY7	95	Ácido Carboxílico e derivados	x				
17	D-(-)-Tagatofuranose, pentakis, (1TMS) ether (isomer 1)?	x	-	17,88	NIST11	91	Açúcar	x				

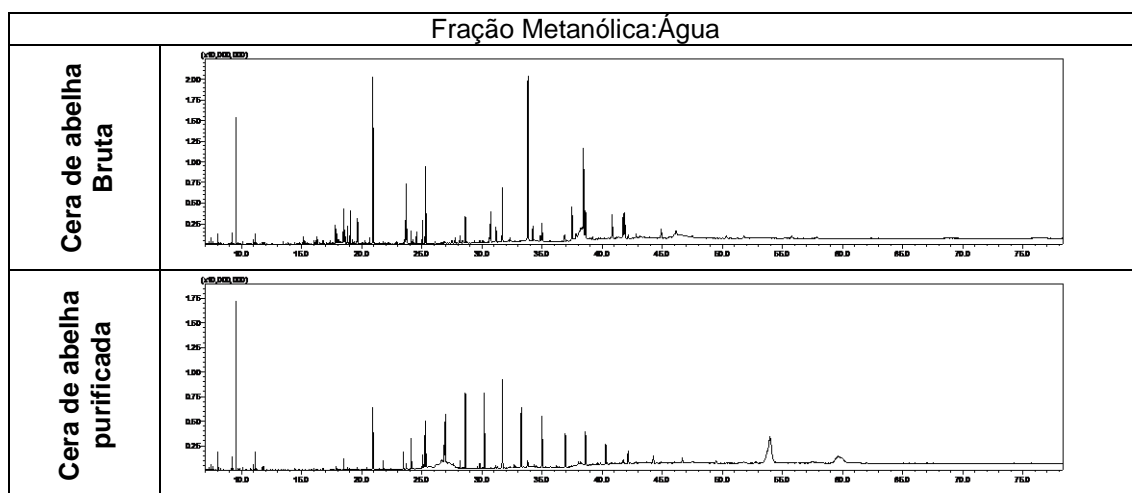
18	D-(+)-Talofuranose, pentakis, (1TMS) ether (isomer 1)?	x	-	18,17	NIST11	87	Açúcar	x					
19	Decanedioic acid ou Sebacic acid (2TMS)	-	x	18,96	NIST08	92	Ácido Graxo	x					
20	Docosane	-	x	23,45	FFNSC1.3	97	Hidrocarboneto	x	x	x	x	x	
21	Docosanoic acid (1TMS)	x	-	30,71	NIST11s	95	Ácido Graxo	x	x	x			x
22	Dodecanoic acid (1TMS)	x	-	16,28	WILEY7	94	Ácido Graxo	x					
23	Dotriacontanoic acid (1TMS)	x	-	50,36	NIST08	86	Ácido Graxo		x	x	x	x	
24	Dotriacontanol (1TMS)	x	-	47,50	NIST11	95	Ácido Graxo		x	x	x	x	
25	D-Psicofuranose, pentakis, (1TMS) ether (isomer 2)?	x	-	17,80	NIST11	91	Açúcar	x					
26	Eicosane	x	x	20,38	FFNSC1.3	97	Hidrocarboneto	x	x	x	x	x	
27	Glucopyranose, pentakis-O (1TMS)?	x	-	19,24	NIST11	94	Açúcar	x					
28	Glyceric acid (3TMS)	x	-	11,94	NIST11s	90	Açúcar	x					
29	Hecacosyl hexadecanoate	x	-	54,00	NIST11	88	Ácido Graxo						x
30	Hentriacontane	x	x	38,61	FFNSC1.3	97	Hidrocarboneto		x				
31	Heptacosane	x	x	31,70	FFNSC1.3	97	Hidrocarboneto		x				
32	Heptadecanoic acid (1TMS)	-	x	22,39	NIST11s	92	Ácido Graxo	x					
33	Heptanoic acid, docosyl ester	-	x	87,15	WILEY7	69	Ácido Graxo						x
34	Heptatriacontane	-	x	52,80	NIST08	96	Ácido Graxo		x	x			x
35	Hexacosane	x	x	30,20	NIST11	97	Hidrocarboneto						x
36	Hexacosanoic acid (1TMS)	x	x	37,48	NIST08	96	Ácido Graxo		x	x	x	x	
37	Hexacosanol (1TMS) ether	x	-	35,71	NIST11	84	Ácido Graxo		x				
38	Hexadecanoic acid (1TMS)	x	x	20,66	WILEY7	96	Ácido Graxo	x					
39	Hexadecanoic acid, eicosyl ester	-	x	92,17	NIST08	79	Ácido Graxo						x
40	Hexadecanoic acid, ethyl ester	x	-	20,29	WILEY7	96	Ácido Graxo		x	x			
41	Hexadecanoic acid, ethyl ester, ethyl palmitate	x	-	20,28	WILEY7	95	Ácido Graxo	x					
42	Hexadecanoic acid, octacosyl ester	x	-	85,48	WILEY7	89	Ácido Graxo						x
43	Hexadecanoic acid, propyl ester (2TMS)	x	x	29,80	NIST11s	93	Ácido Graxo	x					
44	Hexadecenoic acid (1TMS)	x	x	20,67	NIST11	92	Ácido Graxo	x	x				
45	Hexatriacontane	-	x	49,50	NIST08	97	Hidrocarboneto	x	x	x	x	x	
46	Hexatriacontanoic acid (1TMS)	x	-	68,59	NIST08	78	Hidrocarboneto		x				
47	Hydrocinnamic acid ou benzenepropanoic acid (1TMS)	x	x	13,44	NIST11	93	Fenilpropanóide	x					
48	Hydroxycinnamic acid ou p-Coumaric acid (1TMS)	x	-	19,66	WILEY7	87	Fenilpropanóide	x					
49	Monopalmitin (1TMS) ether	-	x	32,75	NIST11s	93	Glicerolipídeo	x					
50	Nonacosane ou n-Nonacosase	x	x	35,35	FFNSC1.3	97	Hidrocarboneto	x	x	x			x
51	Nonadecane ou n-Nonadecane	x	-	19,17	WILEY7	97	Hidrocarboneto		x	x	x	x	
52	Nonatriacontane	-	x	61,40	WILEY7	97	Hidrocarboneto		x				x
53	Octacosane	x	x	33,27	FFNSC1.3	97	Ácido Graxo		x				
54	Octacosanoic acid (1TMS)	x	x	40,80	NIST08	89	Ácido Graxo	x	x				x
55	Octacosanol (1TMS)	x	-	39,19	NIST11s	97	Ácido Graxo		x			x	x
56	Octadecanoic acid ou stearic acid (1TMS)	x	x	24,12	NIST11s	95	Ácido Graxo	x	x	x			x
57	Octadecenoic acid (1TMS)	x	x	23,69	WILEY7	96	Ácido Graxo	x	x				x
58	Octadecenoic acid, ethyl ester	x	-	22,90	NIST11	94	Ácido Graxo	x					
59	Octatriacontane	-	x	56,70	NIST08	96	Ácido Graxo		x	x			x
60	Pentacosane	x	x	28,61	FFNSC1.3	97	Hidrocarboneto	x	x	x			x
61	Pentatriacontane	-	x	46,66	NIST11s	92	Hidrocarboneto	x	x	x			x
62	p-Hydroxybenzoic acid (1TMS)	x	x	16,02	NIST11s	90	Benzeno e derivados substituídos	x					

63	Ricinoleic acid (1TMS)	x	x	26,87	WILEY7	93	Ácido Graxo	x	x	x	x
64	Tetracontane	-	x	67,00	FFNSC1.3	83	Hidrocarboneto	x			x
65	Tetracontanoic acid (1TMS)	x	-	40,94	NIST08	85	Ácido Graxo				x
66	Tetracosan-1-ol (1TMS) ether	x	-	32,31	NIST08	81	Ácido Graxo	x	x		
67	Tetracosane	x	x	26,95	WILEY7	97	Hidrocarboneto	x	x	x	x
68	Tetracosanoic acid (1TMS)	x	x	33,80	NIST11	95	Ácido Graxo	x	x	x	x
69	Tetracosanoic acid, ethyl ester	x	-	33,18	FFNSC1.3	93	Ácido Graxo	x			
70	Tetracosanol (1TMS) ether	x	-	32,32	NIST08	81	Hidrocarboneto	x			
71	Tetradecanoato, ethyl	x	-	33,17	FFNSC1.3	94	Hidrocarboneto			x	
72	Tetradecanoic acid ou myristic acid (1TMS)	x	x	18,50	WILEY7	96	Ácido Graxo	x	x	x	x
73	Tetratriacontane	-	x	44,25	NIST11	97	Hidrocarboneto	x	x	x	x
74	Triacotane	x	x	36,95	FFNSC1.3	97	Hidrocarboneto	x		x	x
75	Triacotanoic acid (1TMS)	x	-	44,91	WILEY7	86	Ácido Graxo	x	x	x	x
76	Triacotanol (1TMS) ether	x	-	42,82	NIST11	89	Ácido Graxo		x	x	x
77	Tricosane ou n-Tricosane	x	x	25,21	WILEY7	97	Hidrocarboneto	x	x	x	x
78	Tritriacontadiene	x	-	41,39	NIST11	94	Hidrocarboneto			x	

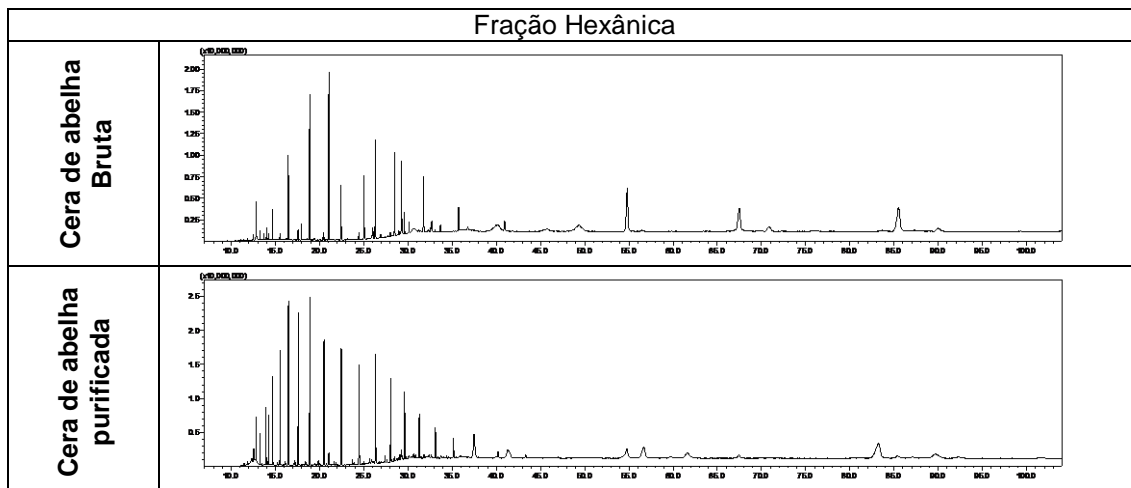
Os compostos sombreados são substâncias aromáticas encontradas na própolis verde. TMS: Substâncias identificadas nas bases de dados na forma de derivados siliados. TR: Tempo de retenção médio considerando todos os valores encontrados nas diferentes frações. IS: Índice de Similaridade. OBS<sub>1</sub>: A classificação das substâncias identificadas foi realizada de acordo com a base de dados Classyfire. OBS<sub>2</sub>: A nomenclatura fornecida pelos registros de banco de dados foi mantida na discriminação dos compostos.

Figura 12 - Cromatogramas das amostras das ceras de abelha bruta e purificada nas diferentes frações estudadas, obtidos por CG/MS. Cromatogramas das frações (A) metanólica, (B) hexânica, (C) diclorometano:hexano, (D) diclorometânica M e (E) diclorometânica H. Condições cromatográficas: Pressão de gás hélio de 187,1 kPa, velocidade linear 31,9 cm/s e fluxo de coluna 1,5 mL/min. Temperatura da fonte de íons de 250°C e faixa de massa de 40 a 700 m/z a cada 0,3 s. Banco de dados: NIST11, NIST11-S, WILEY7, NIST08 e FFNSC3.1.

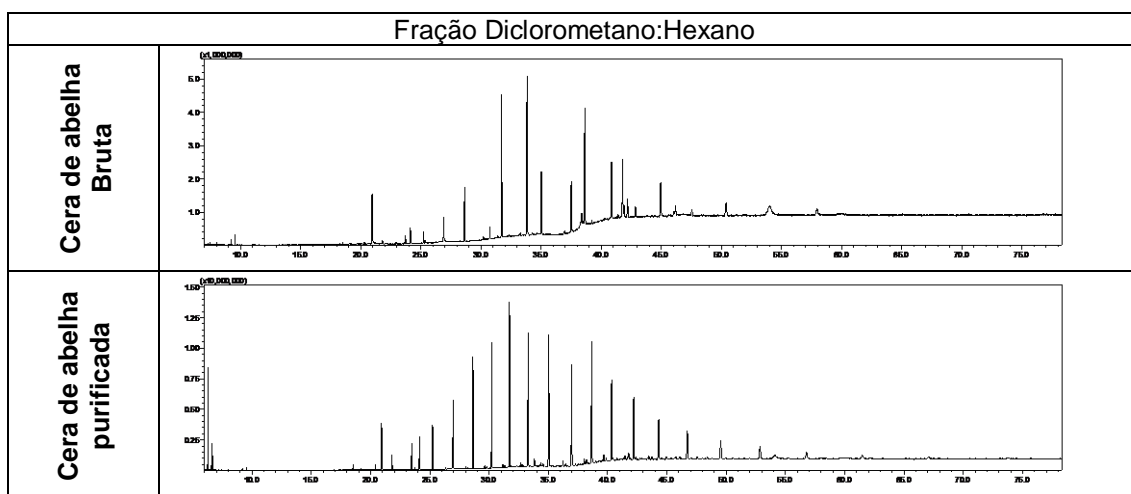
A



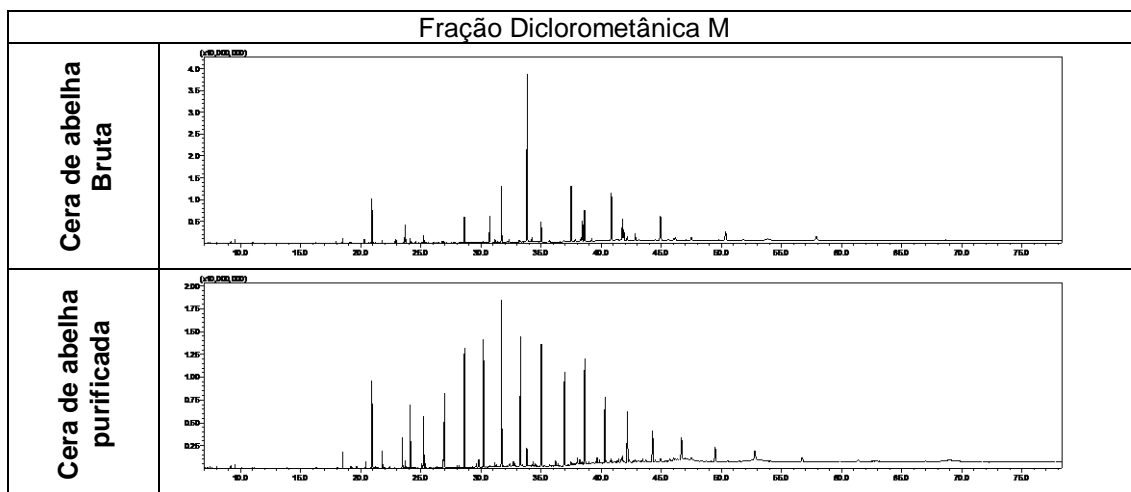
B



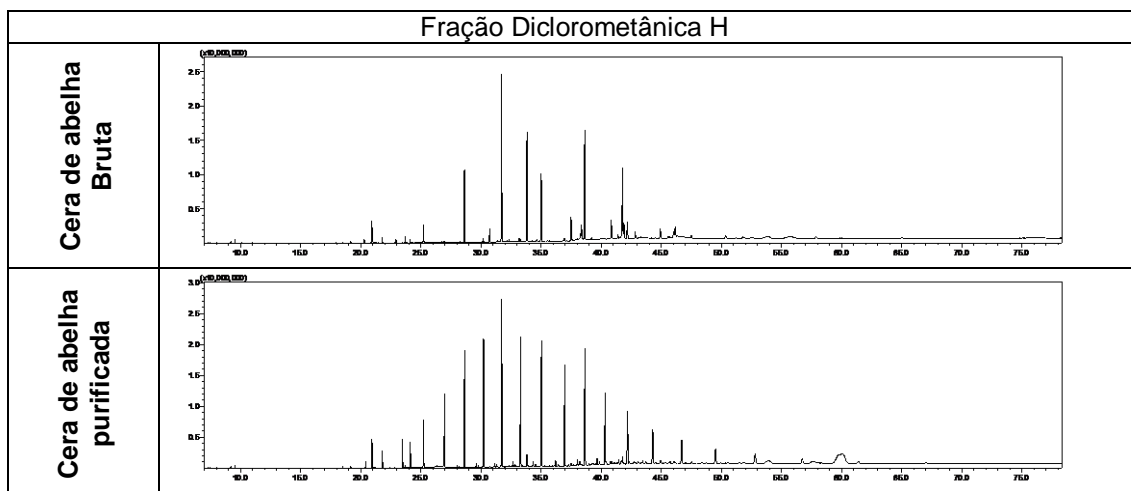
C



D



E



Os padrões de fragmentações dos compostos graxos presentes nas diferentes frações das ceras de abelha bruta e purificada revelaram que a cera de abelha bruta apresenta alguns componentes distintos daqueles presentes na cera de abelha purificada (Tabela 3). Dentre eles, pode-se destacar os ácidos aromáticos. Ausentes na cera de abelha purificada, esses ácidos são característicos da própolis verde (SZLISZKA et al., 2013; BERRETTA et al., 2017) e tem atividade anti-inflamatória (MACHADO et al., 2012), como o ácido cinâmico e o ácido p-cumárico, e atividade antioxidante, como o ácido ferúlico (SILVA et al., 2010). Assim, esses resultados indicam a presença da própolis verde na cera de abelha bruta.

Ambas as ceras apresentam uma gama de ácidos graxos alifáticos, como o ácido ricinoléico, ácido esteárico, mirístico, entre outros (Tabela 3). O estrato córneo também apresenta em sua composição diversos ácidos graxos. Esses são saturados, muitos com mais de 20 carbonos de comprimento, com C<sub>22:0</sub> e C<sub>24:0</sub> sendo os mais abundantes (WERTZ, 2013), mas ácidos graxos de cadeia curta também estão presentes, como o ácido linoleico (BOUWSTRA et al., 1998). O comprometimento do estrato córneo decorrente da DA pode ser em parte recuperado pelos ácidos graxos presentes nas ceras. A cera de abelha bruta, por exemplo, apresenta em sua composição o ácido linoleico (9,12-Octadecadienoic acid), que está presente no estrato córneo.

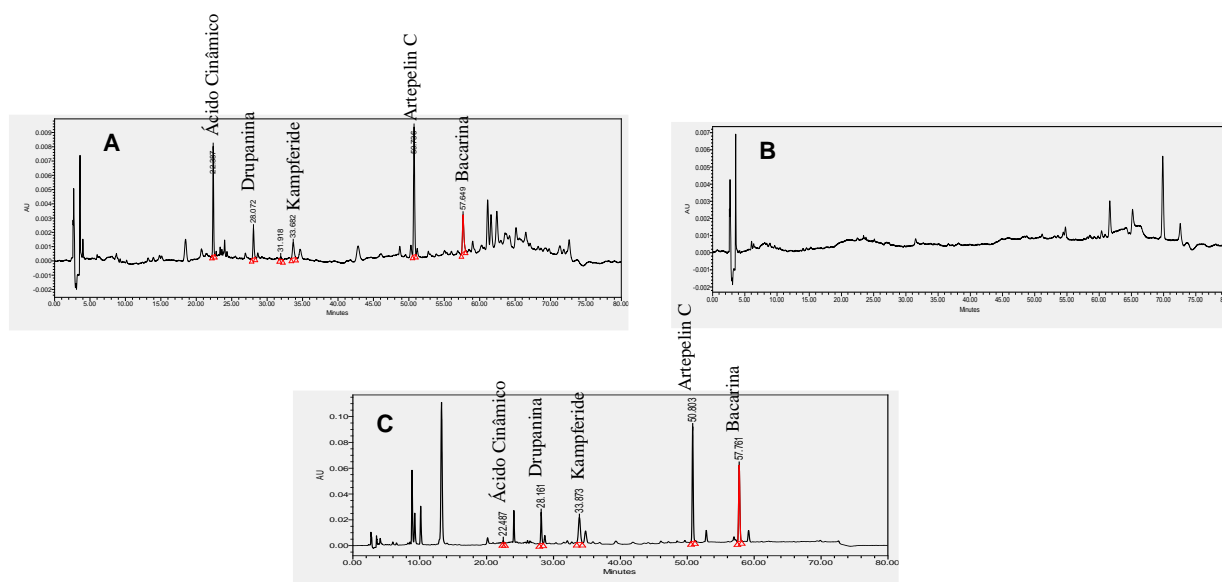
Por outro lado, a cera de abelha purificada apresenta principalmente ácido cerótico (C<sub>26</sub>) e palmitato de merissila (C<sub>46</sub>) que são ácidos graxos de cadeia longa,

além de outros ácidos graxos e álcoois (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 1929). Devido a essa composição lipídica, a cera de abelha deve contribuir para a recomposição dos ácidos graxos de cadeia longa, cuja a deficiência tem sido descrita em pacientes com DA (CASTRO et al., 2006).

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA PRÓPOLIS VERDE NA CERA DE ABELHA

Para complementar as identificações dos compostos da própolis verde presentes nas ceras de abelha, a fração metanólica das ceras foi avaliada por HPLC/UV e os cromatogramas comparados com o apresentado pelo extrato de própolis verde padronizado. Assim, a Figura 13 mostra os perfis cromatográficos dos extratos concentrados das ceras de abelha bruta e purificada e da própolis verde.

Figura 13 - Cromatograma do extrato metanólico concentrado da (A) cera de abelha bruta, (B) cera de abelha purificada e (C) própolis verde. Condições cromatográficas: coluna C18 com fase móvel composta por água contendo 0,4% de ácido fórmico, 5% de metanol e 2% de isopropanol (A) acetonitrila e 2% de isopropanol (B) a um fluxo de 1 mL/min em gradiente de concentração, sendo 20% B por 3 min, 20-25% B de 3-4 min, 25% B de 4-15 min, 25-45% B de 15-20 min, 45% B de 20-40 min, 45-60% B de 40-45 min, 60-80% B de 45-68.83 min, 80-20% B de 68.86-70 min, 20% B de 70-80 min. Volume de injeção de 15  $\mu$ L, temperatura do forno de 30°C e comprimento de onda de quantificação de 300 nm.



Comparando-se o perfil cromatográfico da cera de abelha bruta (Figura 13A) com o da própolis verde (Figura 13C) pode-se observar que os picos da própolis verde eluídos em aproximadamente 22,5 min, 28,2 min, 33,9 min, 50,8 min e 57,8 min, correspondentes ao ácido cinâmico, drupanina, kampferide, artepelin C e bacarina,

respectivamente, também aparecem no cromatograma da cera de abelha bruta. Na cera de abelha bruta pode-se observar ainda, em aproximadamente 22,4 min, um pico intenso, correspondente ao ácido cinâmico, que assim como o artepelin C e a bacarina tem atividade anti-inflamatória e antioxidante (JEONG et al., 2007; MACHADO et al., 2012). Este pico também aparece no extrato da própolis verde, mas em menor intensidade. Já no cromatograma referente a cera de abelha purificada (Figura 13B) não foram observados picos de nenhum desses componentes.

A própolis verde é constituída por uma grande quantidade da mistura de compostos de flavonoides e ácidos fenólicos, dentre eles, artepelin C, bacarina, drupanina, kampferide, isosakuranetina, dihidrokampferide, ácido p-cumárico, ácido cafeico, aromadendrina, derivados do ácido cafeoilquinico e outros compostos, como o lupeol-3- (3'R-hidroxi) -hexadecanoato de triterpeno. A principal fonte desses compostos é a *Bacaris dracunculifolia*. Artepelin C, bacarina e drupanina são compostos característicos da própolis verde produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera* (MACHADO et al., 2012; SAITO et al., 2015; LUSTOSA, et al., 2008), mesma espécie que produziu a cera de abelha bruta utilizada neste trabalho. Desta forma, pode-se inferir que a cera de abelha não processada possui resíduos de própolis verde e que provavelmente são abelhas da espécie *Apis mellífera* a qual o produzem, cujo a principal fonte de coleta são as fontes botânicas *Bacaris dracunculifolia*.

Para quantificação da própolis na cera de abelha bruta utilizada para fazer os cremes, utilizou-se o artepelin C como marcador devido este ser o composto majoritário presente na própolis verde. Assim, a avaliação no HPLC de várias concentrações conhecidas de artepelin C purificado possibilitou a construção de uma curva analítica ( $y = 0,0374x + 0,0061$ ,  $R^2 = 0,9993$ ) (SOUSA et al., 2007) que permitiu determinar a concentração de artepelin C presente na cera de abelha bruta. Determinou-se a quantidade de  $21 \pm 2,98 \mu\text{g}$  de artepelin C por grama de cera de abelha bruta e de  $0,56 \pm 0,12 \text{ mg/g}$  de artepelin C no extrato metanólico concentrado.

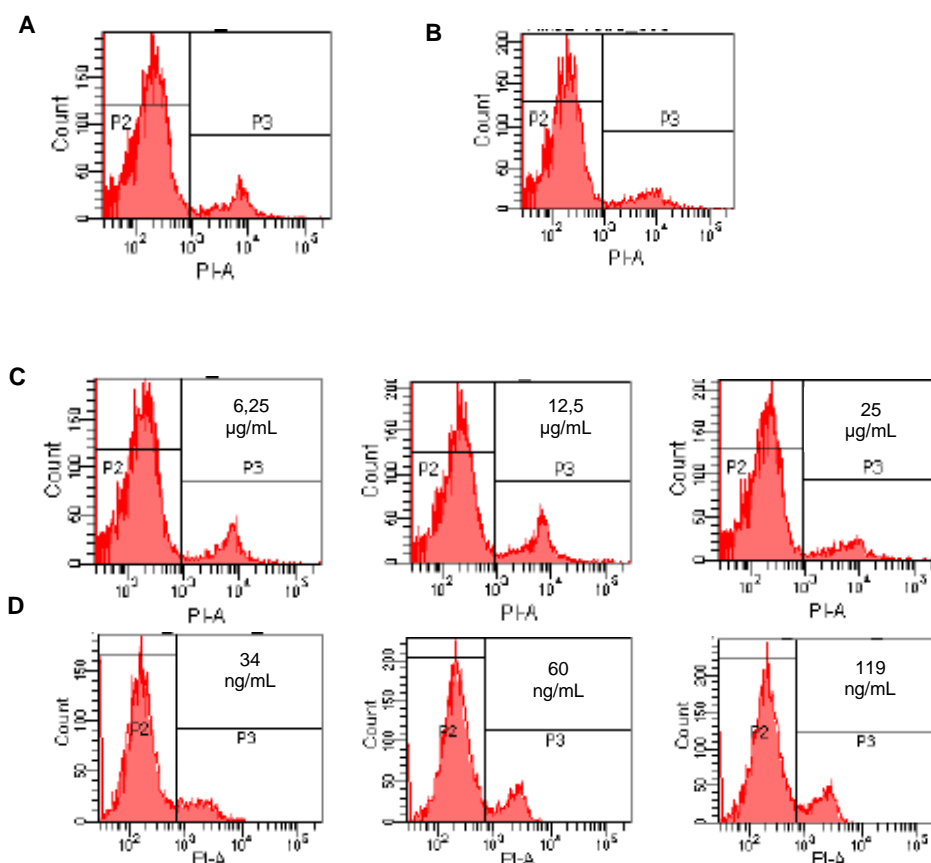
### 5.3 CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA CERA DE ABELHA BRUTA E DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE

Para se avaliar a capacidade dos extratos das ceras em influenciar na produção de mediadores inflamatórios, as concentrações dos mesmos não devem ser citotóxicas para as células. Assim, a Figura 14 mostra a viabilidade de macrófagos na



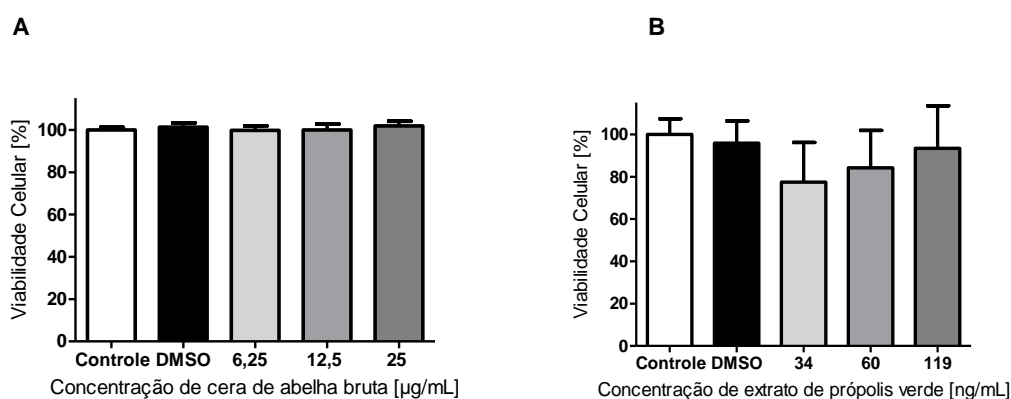
presença de diferentes concentrações de extrato metanólico da cera de abelha bruta e extrato de própolis verde padronizado após 24 h de tratamento.

Figura 14 - Viabilidade de macrófagos (AMJ-2) submetidos ao tratamento por 24 h com extrato metanólico da cera de abelha bruta e extrato de própolis verde analisados por citometria de fluxo (n=6): A) controle, B) células tratadas com o solvente dos extratos: 0,05% de DMSO, C) extrato metanólico da cera de abelha bruta a 6,25, 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , correspondente a 3,5, 7 e 14  $\text{ng/mL}$  de artepelin C, D) extrato de própolis verde a 34, 60 e 119  $\text{ng/mL}$ , correspondente a 4, 6,7 e 14  $\text{ng/mL}$  de artepelin C. Os quadrantes P2 representam as células viáveis e o P3 as células mortas.



A Figura 15 é possível visualizar os resultados de toxicidade celular em forma de porcentagem de células viáveis com o tratamento das células com diferentes concentrações de extrato metanólico da cera de abelha bruta e do extrato de própolis verde.

Figura 15 - Porcentagem de células viáveis (AMJ-2) após tratamentos com diferentes concentrações de extrato metanólico de cera de abelha bruta (A) e extrato de própolis verde (B).



Nenhuma das concentrações testadas de extrato da cera de abelha bruta e de extrato de própolis verde matou número significativo de macrófagos, os quais apresentaram viabilidade celular de aproximadamente 100% e 85%, respectivamente (Figura 14 e 15). Deve-se ressaltar que ambos os extratos, da cera bruta e própolis verde possuíam a mesma concentração de artemelin C, sendo elas de 3,5 - 14 ng/mL.

Sendo assim, essas concentrações de extratos puderam ser utilizadas no estudo de atividade anti-inflamatória nos macrófagos estimulados com LPS.

O processo de inflamação presente na DA envolve uma resposta inflamatória com ativação de linfócitos LTCD4 e atração de macrófagos, culminando na liberação de diversas citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (BATISTA et al., 2015; CASTRO et al., 2006; LEUNG; BOGUNIEWICZ, 2003; BRUNNER; YASSKY; LEUNG, 2017).

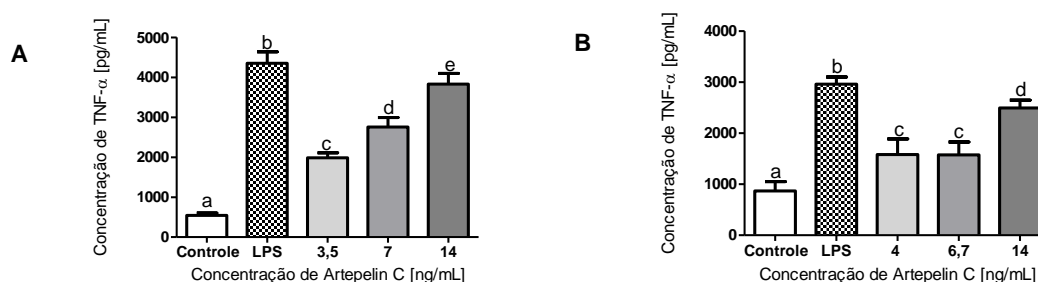
Para verificar a influência dos componentes presentes no extrato concentrado da cera de abelha bruta na resposta inflamatória característica da DA, LPS foi adicionado ao meio de cultura de macrófagos. O LPS é uma toxina que gera um estresse celular na cultura de células que resulta no aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios (TUIN et al., 2006). Assim, cultura de macrófagos estimuladas com LPS podem ser utilizadas como modelo de meio inflamado (MARTIN, 2000).

Após estímulo dos macrófagos com LPS (1000 ng), monitorou-se a expressão dos marcadores pró-inflamatórios IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  comparada a expressão desses mesmos marcadores pelas células não estimuladas com LPS. Observou-se que as células AMJ-2, nas condições em que o experimento foi realizado, não

produziram quantidades significativas de IL-17 e INF- $\gamma$  antes ou após o estímulo com LPS. Sendo assim, monitorou-se a influência do tratamento das células com a cera de abelha bruta e do extrato de própolis verde apenas em relação a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ .

A Figura 16 mostra a expressão de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos estimulados com LPS após tratamento dos mesmos com diferentes concentrações de extrato de cera de abelha bruta e extrato de própolis verde contendo de 3,5 a 14 ng/mL de artepelin C.

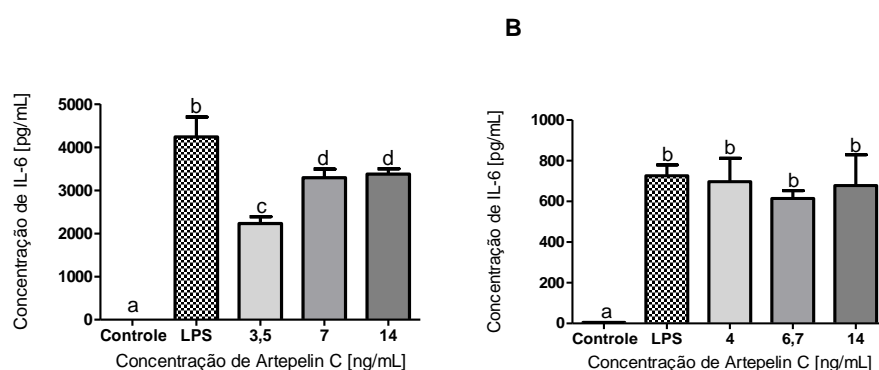
Figura 16 - Modulação da expressão de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (AMJ-2) após estímulo com LPS e tratamento com extrato metanólico da cera de abelha bruta (A) e extrato de própolis verde (B) contendo artepelin C na faixa de concentração de 3,5 a 14 ng/mL.



Letras iguais indicam semelhança estatística enquanto letras diferentes indicam diferença estatística (One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ ) ( $n=6$ ).

A Figura 17 mostra a expressão de IL-6 pelos macrófagos estimulados com LPS após tratamento dos mesmos com diferentes concentrações de extrato de cera de abelha bruta e extrato de própolis verde contendo de 3,5 a 14 ng/mL de artepelin C.

Figura 17 - Modulação da expressão de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (AMJ-2) após estímulo com LPS e tratamento com extrato metanólico da cera de abelha bruta (A) e extrato de própolis verde (B) contendo artepelin C na faixa de concentração de 3,5 a 14 ng/mL.



Letras iguais indicam semelhança estatística enquanto letras diferentes indicam diferença estatística (One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ ) ( $n=6$ ).

Pode-se observar na Figura 16 e 17 que o estímulo dos macrófagos com LPS aumentou significativamente a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-6 expressa em relação às células não estimuladas (controle). O tratamento das células estimuladas com LPS tanto com o extrato de cera de abelha bruta como com o extrato de própolis verde parece diminuir mais efetivamente a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando presente em concentrações menores do que 4 ng/mL de artepelin C. O tratamento com 3,5 ng/mL de artepelin C do extrato de cera de abelha bruta diminuiu, por exemplo, aproximadamente 2 vezes a expressão de TNF- $\alpha$  em relação as células apenas estimuladas com LPS e não tratadas (Figura 16A). Já para o extrato de própolis, tanto o tratamento com 4 ng/mL quanto o tratamento com 6,7 ng/mL de artepelin C reduziu essa expressão em aproximadamente 2 vezes. O tratamento com 14 ng/mL de artepelin C reduziu, para ambos os extratos, apenas em torno de 1 vez a expressão de TNF- $\alpha$ .

A maior redução na expressão de IL-6, em relação ao tratamento com concentrações maiores, também foi observada quando as células foram tratadas com 3,5 ng/mL em artepelin C do extrato de cera de abelha bruta (Figura 17A). No tratamento com o extrato de própolis verde, no entanto, uma concentração de artepelin C um pouco mais alta, de 4 ng/mL, não permitiu que esse efeito na redução da IL-6 fosse visível (Figura 17B), sendo, nesse caso, semelhante a observada quando as células foram tratadas com 6,7 e 14 ng/mL de artepelin C. No entanto, pode-se observar na Figura 17B que a expressão de IL-6 em resposta ao estímulo com LPS para essa série de experimentos foi aproximadamente 6 vezes menor do

que para a série de experimentos que receberam o tratamento com o extrato da cera de abelha bruta (Figura 17A). A menor sensibilidade ao teste na série de experimentos realizados com a própolis verde pode ter resultado na maior dificuldade em se observar o efeito potencial da própolis verde em reduzir a expressão de IL-6 quando presente em baixas concentrações, como o observado para a cera de abelha bruta. No entanto, como a resposta das células tratadas com LPS em relação a citocina TNF- $\alpha$  foi semelhante a obtida com o extrato da cera bruta, sugere-se que sejam os componentes da própolis verde presentes na cera de abelha bruta que estão conferindo a ela uma atividade anti-inflamatória quando presentes em baixas concentrações.

Considerando o acima exposto, a redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias por extratos contendo componentes da própolis verde, ricos principalmente em artepelin C, indicam que seu emprego em baixas concentrações em formulações de uso tópico possa ser vantajoso para o controle e tratamento de DA. Além disso, quando usado em baixas concentrações, o odor marcante característico da própolis não é percebido, o que é uma vantagem para pacientes com DA visto que estímulos fortes, como fragrâncias, podem desencadear reações alérgicas (CARVALHO et al., 2017).

#### 5.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS CREMES

É sabido que o uso de hidratantes, principalmente aqueles com elevado teor de óleo, como por exemplo o *Cold Cream*, consiste em uma medida básica para o tratamento de pacientes atópicos. Eles apresentam como vantagens emoliência e elevada hidratação da pele, sendo capazes de estabilizar a função da barreira cutânea, visto que esses pacientes apresentam comprometimento da barreira cutânea bem como sensibilidade a diversos estímulos (CASTRO et al., 2006).

O *Cold Cream B.* e o *Cold Cream P.* foram preparados com componentes semelhantes, exceto em relação a pureza da cera de abelha, sendo que o *Cold Cream B.* foi formulado com cera de abelha bruta e o *Cold Cream P.*, assim como o Farmacopeico, com cera de abelha purificada.

A quantificação do artepelin C na cera de abelha bruta, como relatado no item 5.2, permitiu calcular a quantidade de artepelin C, marcador da própolis verde, presente no *Cold Cream B.*, que foi de 2,7  $\mu\text{g/g}$ . Sendo assim, o *Cold Cream*

P.+Própolis foi preparado com quantidade de extrato de própolis padronizado equivalente a essa concentração de artepelin C, para que tanto o *Cold Cream B.* quanto o *Cold Cream P.+Própolis* apresentassem mesma concentração do marcador da própolis verde.

Considerando, portanto, que cada mg de creme aplicado fornece à pele 2,7 ng de artepelin C, se o creme for aplicado de maneira contínua, como requerido nos tratamentos de DA, estima-se que concentrações de própolis verde terapêuticas cheguem às células e tenham alguma atividade anti-inflamatória que possa ser benéfica para o controle da doença.

Todos os cremes apresentaram-se semissólidos, homogêneos, com coloração branca e odor leve característico de material graxo. O tamanho médio das gotículas que compõe os cremes, determinado por microscopia ótica, encontra-se apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Diâmetro médio das gotículas que compõem os cremes preparados.

Formulação	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )
Cold Cream Farmacopeico	$1,5 \pm 0,1$
Cold Cream B.	$1,5 \pm 0,1$
Cold Cream P.	$1,8 \pm 0,2$
Cold Cream P.+ Própolis	$1,9 \pm 0,2$

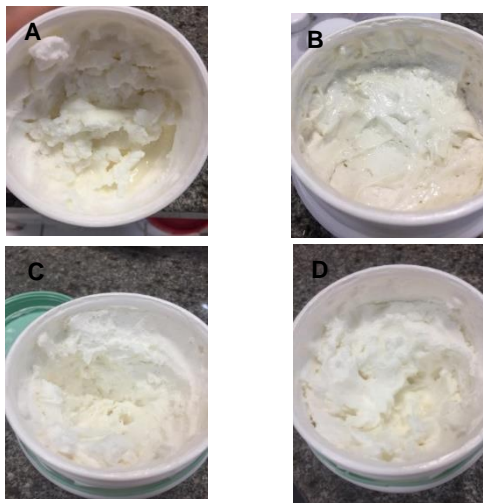
Valores expressos como média  $\pm$  DP. Não houve diferença significativa entre o diâmetro das gotículas dos cremes (One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ ,  $n=2$ ).

Pode-se observar na Tabela 4 que a mudança nas características de pureza da cera, a adição de própolis e a composição dos cremes não alteraram significativamente o tamanho das gotículas.

#### 5.4.1 Características organolépticas e reológicas dos cremes

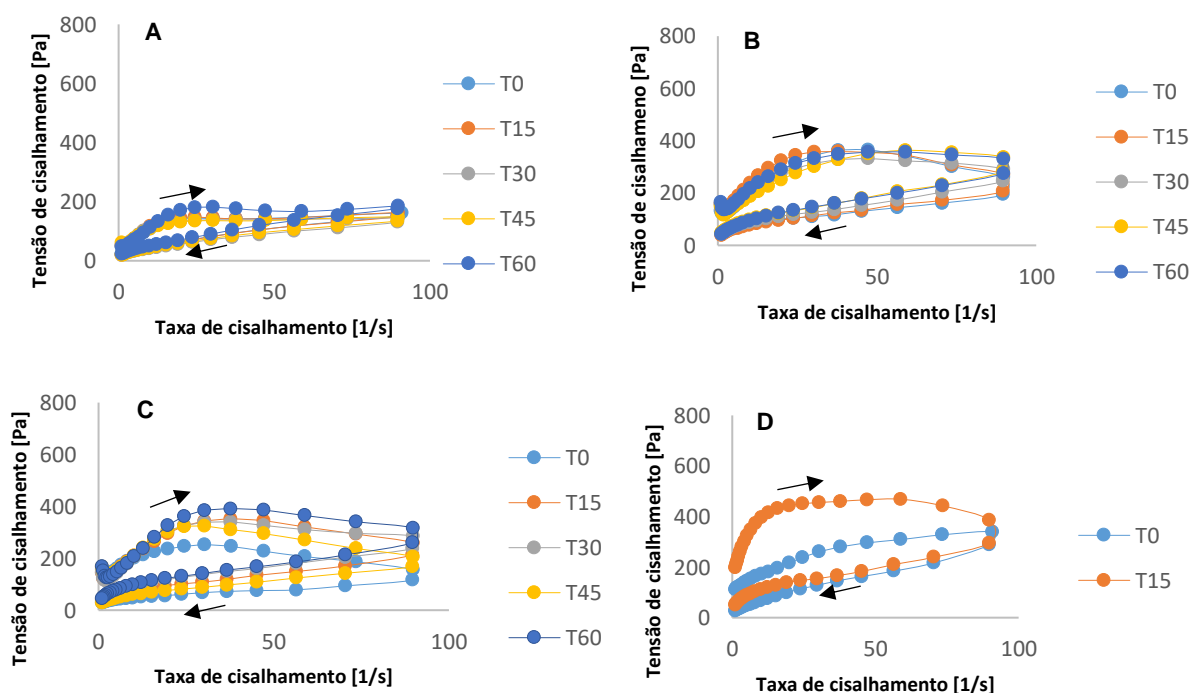
Armazenados por 60 dias a temperatura ambiente, o *Cold Cream B.* e o *Cold Cream P.*, contendo ou não própolis, não apresentaram modificações aparentes na cor, odor e aspecto físico, sendo classificados como N (Normal; Sem alteração) (BUHLER; FERREIRA, 2008). Já o *Cold Cream Farmacopeico* apresentou leve separação da fase oleosa após 30 dias, com conseqüente alteração no aspecto físico, se mostrando instável (Figura 18).

Figura 18 - Fotografia dos cremes: A) *Cold Cream* Farmacopeico após 30 dias armazenado, B) *Cold Cream* B. após 60 dias, C) *Cold Cream* P. após 60 dias e D) *Cold Cream* P.+Própolis após 60 dias.



Na Figura 19 pode-se observar o perfil reológico dos cremes em função do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente.

Figura 19 - Curva de fluxo (tensão de cisalhamento vs. taxa de cisalhamento) do *Cold Cream* B. (A) *Cold Cream* P. (B), *Cold Cream* P.+Própolis (C) e *Cold Cream* Farmacopeico (D) armazenados a temperatura ambiente e avaliados logo após o preparo (T0) e após 15 (T15), 30 (T30), 45 (T45) e 60 (T60) dias. O *Cold Cream* Farmacopeico foi avaliado por apenas 15 dias devido a separação de fases observada no 30º dia. As setas indicam a direção da taxa de cisalhamento.



Todos os cremes apresentaram comportamento não newtoniano e não necessitando de uma tensão de cisalhamento inicial para começarem a escoar, com características, portanto, pseudoplásticas, ou seja, com diminuição da viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento (SILVA; VALARINI; LEONARDI, 2013). Apresentaram também tixotropia, ou seja, com redução da viscosidade dependente também do tempo de cisalhamento. Sendo assim, as curvas de taxa crescente e decrescente foram distintas, fenômeno conhecido como histerese que pode ser quantificado pela determinação da área de histerese (ANDRADE; ROSA; SILVA, 2013). Essas características são de interesse para formulação cosmética e dermatológica, uma vez que o comportamento pseudoplástico facilita o processo de envase, produção e aplicação do creme na pele (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

As curvas de fluxo dos cremes preparados com os agentes estabilizantes (*Cold Cream* B., P. e P.+Própolis) não apresentaram alterações significativas em função do tempo de armazenamento. Por outro lado, a curva de fluxo do *Cold Cream* Farmacopeico armazenado por 15 dias (T15) apresentou nítida diferença daquela apresentada logo após 24 horas do preparo (T0) (Figura 19). Essas diferenças foram confirmadas com a determinação dos valores de viscosidade aparente (30 s) e área de histerese (Tabela 5).

Tabela 5 - Viscosidade aparente (30 s) e área de histerese dos cremes em função do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente.

Tempo	B.		P.		P.+Própolis		Farmacopeico	
	Viscosidade (Pa.s)	Área de Histerese	Viscosidade (Pa.s)	Área de Histerese	Viscosidade (Pa.s)	Área de Histerese	Viscosidade (Pa.s)	Área de Histerese
0	1,7±0,2	3737 ±924	2,9±0,2	14959 ±1171	1,7±0,5	11783 ± 309	3,7±0,1	10157 ±1274
15	1,8±0,4	3745 ±1018	3,0±0,1	15653 ±909	2,9±0,2	14296 ±3319	4,3±0,1#	21792±1266#
30	1,6±0,2	4222 ±1228	3,2±0,5	12166 ±452	3,2±0,1	11689 ±1586	-*	-*
45	1,6±0,2	3750 ±1545	3,7±1,1	11220 ±1214	2,3±0,3	13595 ±2301	-*	-*
60	2,1±0,3	4289 ±1401	3,7±0,2	12400 ±2586	3,5±0,7	14379 ±3152	-*	-*

Valores expressos como média ± DP. T-test ( $p < 0,05$ ) ( $n=3$ ). # Diferença estatística em relação ao T0. -\* Não foram analisados devido separação de fases.

Um dos parâmetros que podem caracterizar a estabilidade de emulsões é a viscosidade aparente. A viscosidade aparente é um dado que pode ser medido a partir da inclinação de uma tangente traçada à curva de fluxo em um ponto específico. Ela



é calculada em conjunto com a taxa de cisalhamento. A alteração de suas características indica sinais de instabilidade da formulação. Alterações na área de histerese com o tempo de armazenamento também sugerem problemas de estabilidade.

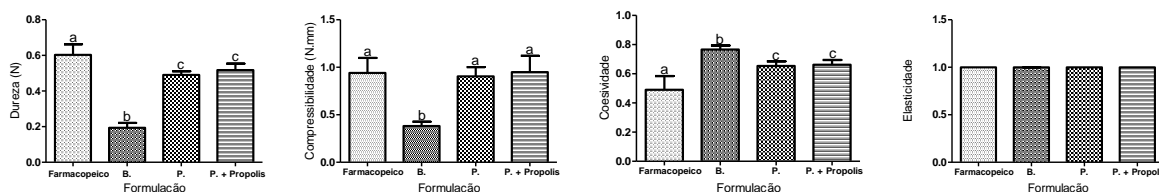
Pode-se observar na Tabela 5 que tanto a viscosidade aparente como a área de histerese do *Cold Cream* Farmacopeico apresentaram alterações estatisticamente significativas no T15 em relação ao T0, atestando a sua instabilidade. Essa foi confirmada pela separação de fases deste creme após 30 dias (Figura 18A). Já os outros cremes não apresentaram alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados durante os 60 dias do estudo.

Comparando-se as características dos cremes de composição similar, porém preparados com cera de abelha de pureza distinta, observou-se que o *Cold Cream B.*, preparado com a cera de abelha bruta, apresentou viscosidade média de aproximadamente 1,8 Pa.s, quase 2 vezes menor do que a viscosidade do creme preparado com a cera de abelha purificada (~3,3 Pa.s). A área de histerese média do *Cold Cream B.* também foi menor do que a do *Cold Cream P.*, aproximadamente 3 vezes, possivelmente devido a sua menor viscosidade. Já a adição da própolis ao *Cold Cream P.*, dando origem ao *Cold Cream P.+Própolis*, não alterou significativamente as características de fluxo do creme. Exceção às características similares dos dois cremes obtidos com a cera purificada, está na viscosidade um pouco menor do *Cold Cream P.+Própolis* logo após o preparo, sugerindo a necessidade de um maior tempo para a formulação entrar em equilíbrio quando a própolis é adicionada. Todas essas formulações, no entanto, foram estáveis durante os 60 dias de armazenamento.

#### **5.4.2 Avaliação das propriedades mecânicas e força de bioadesão**

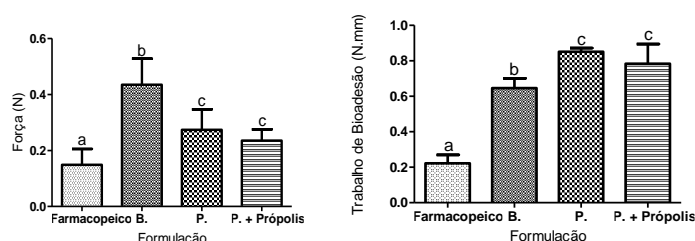
As propriedades mecânicas, bem como a força bioadesiva dos cremes estão apresentadas nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Figura 20 - Propriedades mecânicas do *Cold Cream* Farmacopeico, *Cold Cream B.*, *Cold Cream P.* e *Cold Cream P.+Própolis*.



Letras iguais indicam semelhança estatística enquanto letras diferentes indicam diferença estatística. T-test ( $p < 0,05$ ) ( $n=10$ ).

Figura 21 - Força bioadesiva e trabalho de bioadesão das formulações *Cold Cream* Farmacopeico, *Cold Cream B.*, *Cold Cream P.* e *Cold Cream P.+Própolis*.



Letras iguais indicam semelhança estatística enquanto letras diferentes indicam diferença estatística. T-test ( $p < 0,05$ ) ( $n=5$ ).

A análise das propriedades mecânicas e força bioadesiva de uma formulação tópica é essencial para garantir uma adesão, conforto e eficácia do tratamento. Para isso é realizado a análise do perfil de bioadesão e textura, de modo a determinar os valores de dureza, compressibilidade, coesividade e elasticidade (JONES; WOOLFSON; DJOKIC, 1997), além da força bioadesiva e trabalho de bioadesão.

A bioadesão está relacionada com o contato de um polímero natural ou sintético com um substrato biológico. Ela fornece algumas vantagens como, contato íntimo com o substrato, liberação sustentada de fármacos e capacidade de atingir tecidos específicos (NEEDLEMAN; SMALES, 1995).

Interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, hidrofóbicas ou de Van der Waals são os principais tipos de interações que podem ocorrer entre o polímero e o substrato biológico, sendo determinantes para força bioadesiva e consequentemente para diferentes de ruptura quando em contato com a pele (CARVALHO et al., 2010).

Pode-se observar na Figura 20 que o *Cold Cream B.* foi o que apresentou propriedades de dureza e compressibilidade mais distintas dos demais cremes, apesar da sua composição ser semelhante ao dos *Cold Cream P.* e *P.+Própolis*.

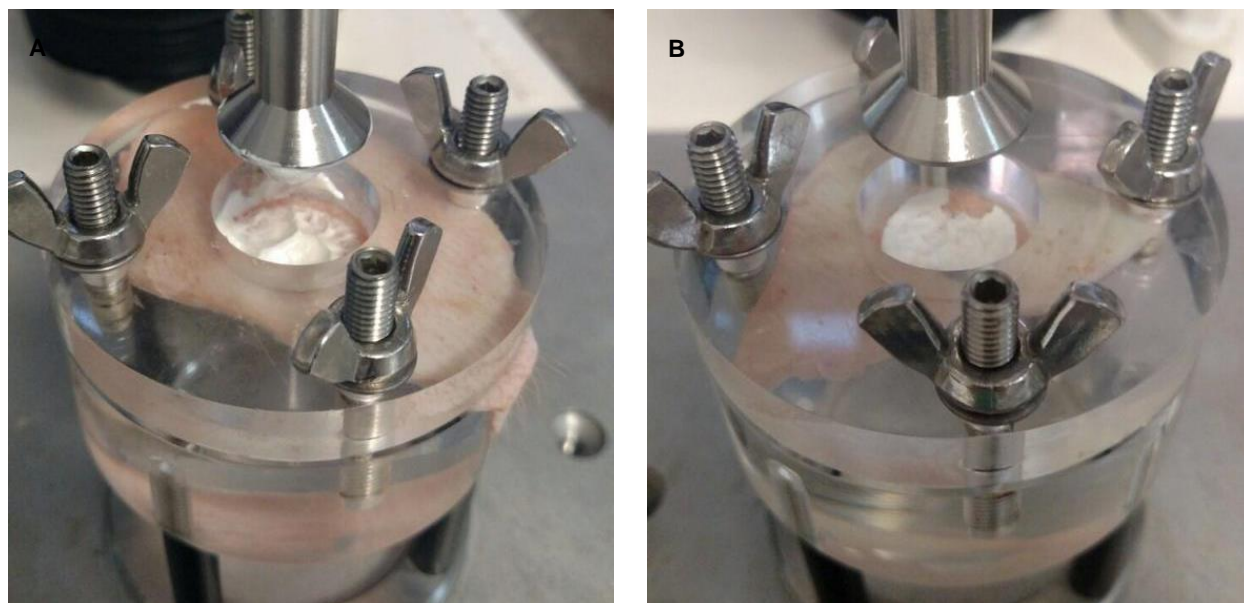
Esses resultados sugerem que os componentes da cera de abelha influenciam significativamente nessas propriedades. A menor dureza e compressibilidade do *Cold Cream B.*, preparado com a cera de abelha bruta, indica maior facilidade de aplicação e espalhabilidade, retirada da embalagem e reestruturação (SILVA; VALARINI; LEONARDI, 2013) quando comparado aos outros cremes. A maior coesividade e força bioadesiva (Figura 21) do *Cold Cream B.* em relação aos demais também foi observada, sugerindo uma maior capacidade deste creme em se reestruturar e permanecer em contato com a pele por mais tempo, visto que, na análise bioadesiva é preciso maior força para destacar o creme da pele (NEEDLEMAN; SMALES, 1995).

Os cremes preparados com a cera purificada, todos eles, inclusive o Farmacopeico, apresentaram propriedades mecânicas similares, apesar dos valores de dureza e coesividade ligeiramente maior e menor, respectivamente, do *Cold Cream Farmacopeico* (Figura 20). As forças e trabalho de bioadesão também foram menores para o *Cold Cream Farmacopeico*. Assim, além da pureza da cera de abelha, a composição da formulação também apresenta alguma influência nas propriedades mecânicas e de bioadesão.

Em sistemas semissólidos, a ruptura de ligação bioadesiva pode ocorrer em três regiões distintas: dentro da pele (quando as ligações bioadesivas são fortes), na interface entre o sistema e a pele (quando as interações são fracas) ou ainda na parte hidratada do próprio sistema (quando as ligações são muito fracas) (CARVALHO et al., 2010).

Conforme demonstrado na Figura 22, o local de ruptura dos cremes preparados com cera de abelha bruta e cera de abelha purificada também foram diferentes. A ruptura dos cremes compostos por cera de abelha bruta ocorreu na camada hidratada do sistema bioadesiva (ligações muito fracas), enquanto que os cremes compostos por cera de abelha purificada a ruptura ocorreu na interface entre o sistema e a pele (ligações fracas). Assim, por mais que o *Cold Cream B.* (composto por cera de abelha bruta) se mostrasse mais bioadesivo, de acordo com o teste de força bioadesiva, o mesmo apresentou região de ruptura com forças muito fracas. Acredita-se que o mesmo possua uma força de interação maior com a pele do que com ele mesmo, se rompendo então na parte hidratada do próprio sistema.

Figura 22 - Ruptura de ligação bioadesiva entre a formulação e a pele de orelha de porco. *Cold Cream* preparado com cera de abelha bruta (A), *Cold Cream* preparado com cera de abelha purificada (B).



Ainda cabe ressaltar que o trabalho de bioadesão dos *Cold Cream* P. e P.+Própolis foi maior inclusive do que o realizado para destacar o *Cold Cream* B. da pele. Ou seja, a quantidade de energia consumida nesta tarefa é maior quando os *Cold Cream* P. são aplicados, sugerindo possibilidade de um maior tempo de permanência destes cremes na pele.

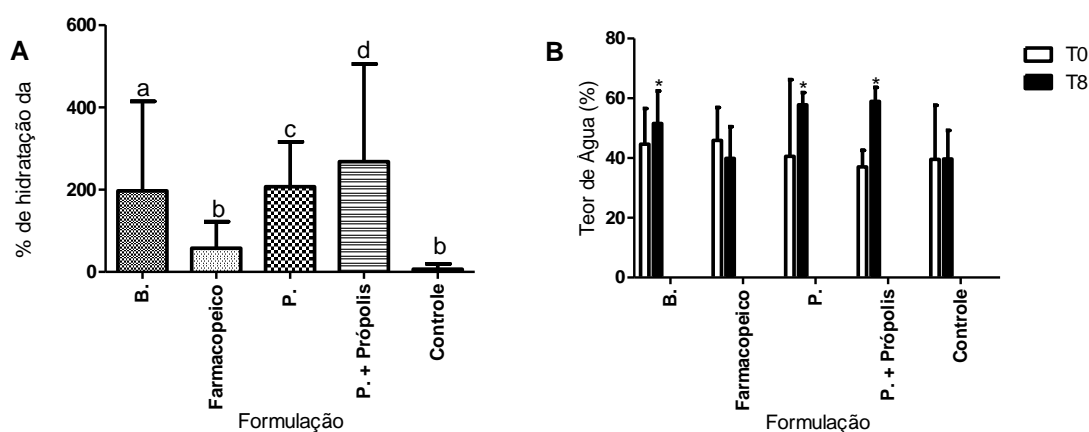
Como as propriedades mecânicas e de bioadesão dos *Cold Cream* P. foram estatisticamente semelhantes e similares as apresentadas pelo *Cold Cream* Farmacopeico, este último já utilizado na clínica, o *Cold Cream* P. e o *Cold Cream* P.+Própolis foram os escolhidos para os estudos *in vivo*, em pacientes com DA. Desta forma, foi possível avaliar clinicamente a influência da própolis na DA e a sua efetividade no impacto da evolução da doença, já que a adição da mesma ao *Cold Cream* P. não alterou as propriedades físico-química e bioadesiva do creme.

#### **5.4.3 Avaliação *in vitro* da hidratação da pele através da medida de resistividade elétrica do estrato córneo**

A hidratação está relacionada com o fornecimento e retenção de água adequada nos tecidos biológicos (WILLIAMS; BARRY, 2004). Já a resistividade elétrica está relacionada com a passagem de corrente elétrica, sendo dependente da quantidade de água presente na pele, ou seja, quanto maior a quantidade de água

menor a resistividade elétrica. Assim, uma menor resistividade elétrica pode indicar uma maior hidratação da pele. A Figura 23 mostra a porcentagem de hidratação do estrato córneo, determinada de acordo com a Equação IV, e a porcentagem de teor de água, determinada utilizando o aparelho *Skin Up*, após 8 horas de contato dos cremes com a pele da orelha de porco, *in vitro*.

Figura 23 - Porcentagem de hidratação (A) e de teor de água (B) da pele após 8 h de contato com os cremes: *Cold Cream B.* (B.), *Cold Cream Farmacopeico* (Farmacopeico), *Cold Cream P.* (P.) e *Cold Cream P.+Própolis* (P.+Própolis). Controle: PBS.



Letras iguais indicam semelhança estatística enquanto letras diferentes indicam diferença estatística. T-Test ( $p < 0,05$ ) ( $n=5$ ). \* Diferença estatística do T8 das formulações em relação ao T8 do controle. T-Test ( $p < 0,05$ ) ( $n=5$ ).

A Figura 23A sugere que todos os cremes avaliados, exceto o *Cold Cream Farmacopeico*, apresentaram capacidade de hidratação da pele quando comparado ao tratamento apenas com PBS. A medida de resistividade da pele, como feita para se determinar a porcentagem de hidratação mostrada na Figura 23A, é geralmente realizada para verificar alterações no estrato córneo sofridas após tratamento da pele com algum estímulo físico, como o ultrassom (PRAUSNITZ et al., 1993; POLAT et al., 2011), que acaba por desorganizar o estrato córneo e facilitar a passagem da corrente elétrica, ou seja, diminuir sua resistividade. O aumento da corrente elétrica verificado nos experimentos de hidratação poderia estar relacionado, portanto, a uma desorganização do estrato córneo e não a maior hidratação da pele. Assim, para validar essa determinação, a hidratação da pele foi avaliada também utilizando um aparelho próprio para determinar teor de água na pele. Com pode ser observado na Figura 23B, os resultados de teor de água corroboraram com os resultados de hidratação analisados pelo método de resistividade elétrica, visto que os *Cold Cream*

B., P. e P.+Propolis também levaram a um aumento da porcentagem de água na pele após 8 h quando comparado ao controle (PBS). A aplicação dos cremes, devido ao alto conteúdo de material graxo, parece estar, portanto, evitando a perda de água transepidermal, resultando no aumento da hidratação. Como a pele dos pacientes com DA apresentam elevada perda de água transepidermal (PROKSCH; JENSEN; ELIAS, 2003), o uso dos cremes em análise deve contribuir para evitar essa perda excessiva.

### 5.5 ENSAIO CLÍNICO EM HUMANOS

O estudo clínico foi feito principalmente visando avaliar a influência de baixas concentrações de própolis verde no controle da DA. A própolis verde é normalmente adicionada em cremes em concentrações na faixa de 3% a 10%, concentrações essas pelo menos 1000 vezes maiores do que a presente no *Cold Cream B.* ou no *Cold Cream P.+Própolis.* Os estudos em cultura de células (Figuras 16 e 17) mostraram, no entanto, que concentrações baixas de própolis verde parecem modular a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6, exacerbadas na pele do paciente atópico, de maneira mais eficiente do que concentrações mais elevadas. Além disso, altas concentrações de própolis deixam um odor característico nos cremes, como já salientado anteriormente, que podem estimular processos alérgicos no paciente. A possibilidade de se ter um efeito anti-inflamatório da própolis em baixas concentrações é, portanto, vantajosa para o tratamento de DA.

Para evitar que as propriedades mecânicas, de textura e de hidratação do creme ocasionasse um viés na avaliação do efeito da própolis, o estudo clínico foi conduzido com o *Cold Cream P.*, adicionado ou não da própolis. A cera de abelha purificada que faz parte desses cremes apresenta composição mais reprodutível, devido exatamente ao processo de purificação, do que a cera de abelha bruta, presente no *Cold Cream B.* Variações na composição da matéria prima, como as que podem ocorrer com a cera de abelha bruta, não são vantajosas para o controle de qualidade do produto final e podem resultar em dificuldades na produção industrial.

Assim, o grupo controle do estudo clínico foi o *Cold Cream P.* e o grupo intervenção o *Cold Cream P.+Própolis.* No entanto, como os cremes possuem ácidos graxos em sua composição, os quais podem auxiliar na recomposição do estrato córneo da pele com DA, a adesão do paciente ao tratamento assim como o impacto

do uso do creme na qualidade de vida, independente da presença de própolis em sua composição, também foram levados em consideração na avaliação do paciente.

### **5.5.1 Estudo Piloto**

No estudo piloto, realizado para ajustar o questionário sociodemográfico e clínico às necessidades da pesquisa, observou-se que alguns pacientes não sabiam o significado de determinadas palavras e não entendiam alguns questionamentos e instruções. O questionário foi, portanto, adequado para facilitar a compreensão de pacientes com escolaridade distintas.

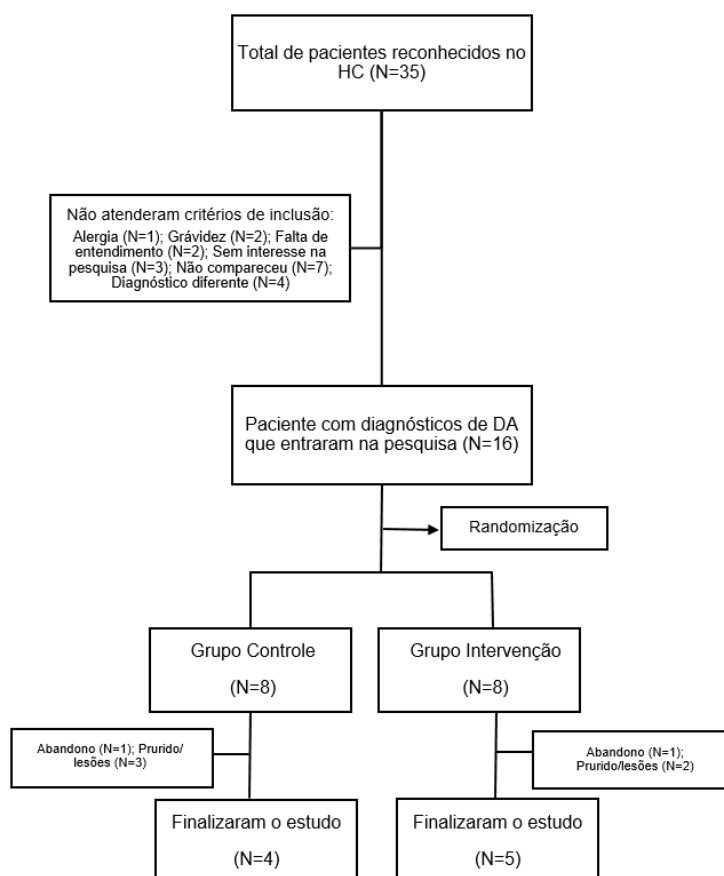
Esse estudo foi também importante para ajudar a pesquisadora a se familiarizar com o ambiente ambulatorial e a adotar postura adequada no trato com os pacientes.

### **5.5.2 Características da população de estudo**

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao acompanhamento do uso do *Cold Cream P.* ou do *Cold Cream P.+Própolis* pelos pacientes do ambulatório de dermatologia do HCFMRP no período de agosto de 2018 a março de 2019.

A partir da análise geral dos prontuários dos pacientes diagnosticados, em consultas anteriores, com DA foram recrutados 35 pacientes. Sabe-se, no entanto, que a DA é uma doença que a maioria dos médicos dermatologistas encontra dificuldade para confirmar o diagnóstico (HANIFIN; RAJKA, 1980). Sendo assim, 4 pacientes inicialmente diagnosticados com DA, conforme especificação no prontuário, obtiveram, após a consulta médica realizada imediatamente antes da entrevista do primeiro contato com o paciente, diagnóstico diferente e, por isso, não foram incluídos no estudo. Além deles, outros 15 pacientes selecionados a partir do prontuário não foram incluídos devido a relato de alergia a algum componente da formulação, gravidez, incapacidade de compreensão básica do questionário, não comparecimento a consulta e falta de interesse em participar da pesquisa (Figura 24). Os 16 pacientes incluídos no estudo foram então randomizados e distribuídos em dois grupos com 8 pacientes cada: grupo controle (*Cold Cream P.*) e grupo intervenção (*Cold Cream P.+Própolis*).

Figura 24 - Fluxograma da seleção de pacientes para o estudo clínico.



Após o início do estudo outros 7 pacientes, ou seja, 44% dos 16 selecionados, foram excluídos devido ao abandono da pesquisa e ao aparecimento de lesões e/ou prurido após início da utilização da formulação. O estudo foi concluído com 4 pacientes no grupo controle (50%) e 5 pacientes no grupo intervenção (62,5%) (Figura 24).

Os dados sociodemográficos dos 16 pacientes que foram incluídos no estudo estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados sociodemográficos e acesso ao serviço de saúde dos pacientes.

População	Grupo controle (n=8)	Frequência (%)	Grupo intervenção (n=8)	Frequência (%)	Valor-P
<b>Sexo</b>					
Feminino	5	62,5	6	75	P=0,999*
Masculino	3	37,5	2	25	
<b>Raça</b>					
Branco	7	87,5	6	75	P=0,999*
Mulato	1	12,5	2	25	
<b>Estado Civil</b>					
Casado (a)	4	50	3	37,5	P=0,120



Solteiro (a)	2	25	5	62,5	
Separado (a)/Divorciado (a)	2	25	0	0	
<b>Escolaridade</b>					
Fundamental Completo	1	12,5	0	0	
Fundamental Incompleto	1	12,5	1	12,5	P=1,000
Ensino Médio Completo	5	62,5	6	75	
Ensino Superior Completo	1	12,5	1	12,5	
<b>Frequência de consultas ao dermatologista (anual)</b>					
0-4 vezes	6	75	4	50	
5-7 vezes	1	12,5	1	12,5	P=0,999
8-12 vezes	1	12,5	3	37,5	

\* Probabilidade de significância (Valor-P) calculada pelo teste Exato de Fisher. O teste qui quadrado foi utilizado para o cálculo de P das outras variáveis.

A média de idade dos pacientes elegíveis para o estudo foi de 32,5 anos (DP=11,68), variando entre 18 e 58 anos. Em relação ao sexo, 69% dos pacientes eram do sexo feminino e 31% do sexo masculino (Tabela 6). A maioria dos pacientes estudados foi, portanto, do sexo feminino, de raça branca e com ensino médio completo. Ainda se observa que a maioria desses pacientes consultam o dermatologista do ambulatório da HCFMRP até 4 vezes por ano, com uma média de  $3,67 \pm 0,52$  vezes por ano. Este resultado permite evidenciar que a DA é uma doença que preocupa e interfere diretamente na qualidade de vida do paciente.

Para a distribuição homogênea dos pacientes entre os grupos controle e intervenção, além do sexo, raça e medicamentos em uso, as variáveis confundíveis apresentadas na Tabela 7 também foram levadas em consideração.

Tabela 7 - Variáveis confundíveis levadas em consideração na distribuição dos grupos.

População	Grupo controle (n=8)	Frequência (%)	Grupo intervenção (n=8)	Frequência (%)	Valor-P
Aumento da dose de MTX	1	12,5	0	0	
Introdução de corticoide oral	0	0	1	12,5	
Introdução de antibiótico oral e de corticoide tópico	1	12,5	0	0	
Retirada de MTX	0	0	1	12,5	P= 0,608*
Diminuição da dose de ciclosporina	0	0	1	12,5	
Retirada gradual do corticoide oral	0	0	1	12,5	

MTX= metotrexato, \*Probabilidade de significância (Valor-P) calculada pelo teste Exato de Fisher.

As variáveis confundíveis foram introduzidas pelo médico na primeira consulta após inclusão dos pacientes. O pesquisador externo foi o responsável pela redistribuição dos grupos considerando essas variáveis.

Para analisar a homogeneidade dos grupos após distribuição foi realizado o teste Exato de Fisher para as variáveis sexo, raça e variáveis confundíveis e o teste qui-quadrado por associação para as demais variáveis. Pode-se observar nas Tabelas 6 e 7 que o valor de P foi maior do que 0,05 para todas as variáveis consideradas para a aleatorização dos grupos, comprovando que os grupos foram distribuídos homogeneamente.

Na Tabela 8 estão apresentadas as frequências das comorbidades alérgicas, asma e rinite, relatadas pelos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 8 - Comorbidades alérgicas apresentadas pelos pacientes incluídos no estudo.

Comorbidade	Grupo controle (n=8)	Frequência (%)	Grupo intervenção (n=8)	Frequência (%)
<b>Rinite</b>	3	37,5	3	37,5
<b>Asma</b>	2	25	0	0
<b>Asma e Rinite</b>	0	0	3	37,5

Foi possível observar que a maioria dos pacientes, tanto do grupo controle, quanto do grupo intervenção apresentavam doenças alérgicas, como rinite e/ou asma, como esperado para pacientes com DA. Essas doenças podem acabar por exacerbar a DA (ANTUNES et al., 2017; ILLI, S. et al., 2004) e influenciar no tratamento. Mas os pacientes que delas sofriam também estavam distribuídos homogeneamente entre os grupos (Tabela 8). É importante ressaltar, no entanto, que, de maneira geral, pacientes atópicos são sensíveis a diversos alérgenos (DARSOW; VIELUF; RING, 1999).

Assim, 5 pacientes dos 16 incluídos, ou seja, 31%, foram excluídos do estudo devido ao relato do aparecimento de novas lesões e prurido cutâneo (Figura 24). Essas reações podem ter sido causadas por alguma reação alérgica ao uso do creme ou a outros fatores que não puderam ser controlados durante o estudo, como exposição a outros alergênicos ou equilíbrio psicológico do paciente. Alguns dos pacientes que apresentaram lesão cutânea relataram, por exemplo, que estavam estressados, fator este que colabora para o desencadeamento de lesões na DA (TOYODA et al., 2002). Porém, pode-se observar na Figura 24, que no grupo intervenção, tratado com o creme que continha própolis, apenas 25% dos pacientes relataram a presença de novas lesões e prurido contra 37,5% dos pacientes tratados com o creme sem própolis. Essa distribuição sugere que o extrato de própolis verde

adicionado ao creme não foi o causador do aparecimento das lesões e prurido. Ao contrário, os resultados sugerem que a própolis, devido à sua atividade anti-inflamatória, evitou ou diminuiu o aparecimento de prurido. Essa melhora corrobora com os resultados obtidos no teste anti-inflamatório realizado *in vitro* (Figuras 16 e 17).

A ficha sociodemográfica e clínica também permitiu questionar o paciente sobre as características sensoriais dos cremes, como espalhabilidade e oleosidade, que pudessem influenciar na sua adesão (Apêndice B). A adesão ao tratamento pode ser definida como o grau de comportamento do paciente frente ao seguimento terapêutico que correspondem às recomendações dadas por um profissional da saúde (SHAH et al., 2015). É sabido que as propriedades mecânicas, bioadesivas e reológicas de uma formulação influenciam na aceitabilidade e adesão do paciente (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997). De acordo com os estudos *in vitro* de propriedades mecânicas (Figura 20) e bioadesivas (Figura 21), ambos os cremes utilizados no grupo controle e no grupo intervenção apresentaram características semelhantes. Assim, os aspectos da adesão foram tratados em conjunto (Tabela 9).

Tabela 9 - Aspectos relacionados a adesão do paciente ao uso dos cremes.

<b>Relatos relacionados ao uso do creme</b>	<b>Número de pacientes</b>
Tratamento não eficiente	0
Tratamento interferiu nas atividades diárias	0
Medo de efeitos secundários	1
Instruções pouco claras	0
Cheiro desagradável	1
Provoca coceira	1
Deixa manchas nas roupas ou superfícies	0
Mudou de aparência	1
Deixou a pele seca	0
Provocou ardência	0
Deixou a pele oleosa	8
Difícil de espalhar	3
Difícil de retirar do pote	0

Como pode ser observado na Tabela 9, 89% dos pacientes relatou que o creme deixava a pele oleosa. Esse aspecto foi considerado, no entanto, positivo para 7 dos 8 pacientes que o relataram, que tem a pele muito ressecada por causa da doença.

As características mecânicas e de textura das formulações não foram, dessa forma, a causa do abandono do estudo por 2 pacientes (Figura 24), os quais não responderam às ligações telefônicas de meio termo e não compareceram à consulta médica após 60 dias.

A adesão do paciente pode ser influenciada, além das características de textura e mecânicas, por aspectos relacionados ao custo, número de medicamentos utilizados, à doença em si, escolaridade, efeitos adversos, características individuais do paciente e pela percepção de melhora ao tratamento (TAVARES et al., 2013; LEITE; VASCONCELLOS, 2003). Ainda, a inclusão do farmacêutico clínico no acolhimento, acompanhamento e explicação correta sobre o tratamento podem contribuir com a melhora da adesão. Com isso, verificou-se que a adesão e aceitabilidade dos pacientes no grupo intervenção foi semelhante ao do grupo controle, pois o número de pacientes que abandonou o estudo foi o mesmo nos 2 grupos (1 paciente de cada grupo).

### 5.5.3 Avaliação do SCORAD, DLQI e Hidratação da pele

Nas Tabelas 10, 11 e 12 pode-se observar os resultados de SCORAD, DLQI e hidratação da pele, respectivamente, obtidos no início e após 60 dias de uso dos cremes para os grupos controle e intervenção.

Tabela 10 - Escore da gravidade da doença (SCORAD) no início e após 60 dias de tratamento com o *Cold Cream P.* (Controle) e com o *Cold Cream P.+Própolis* (Intervenção).

Paciente	Grupo Controle				Grupo Intervenção			
	Início		60 dias		Início		60 dias	
	Pontos	Classificação	Pontos	Classificação	Pontos	Classificação	Pontos	Classificação
1	42,0	Moderada	52,5	Grave	65,0	Grave	42,0	Moderada
2	47,2	Moderada	32,5	Moderada	62,5	Grave	58,5	Grave
3	45,5	Moderada	49,0	Moderada	12,4	Leve	12,9	Leve
4	13,0	Leve	25,1	Moderada	29,0	Moderada	32,5	Moderada
5	-	-	-	-	21,5	Leve	19,0	Leve
Média	37		40		38		33	
DP	16		13		24		18	

Análise estatística Início x 60 dias: Pontos: T-test Valor-P Controle = 0,674; Intervenção: 0,175. Classificação: Controle: Teste McNemar, Valor-P = 0,705; Intervenção: Modelo de Poisson, Valor-P = 0,739. Controle 60 dias x Intervenção 60 dias: Pontos: T-test Valor-P = 0,5526.

Tabela 11 - Efeito na qualidade de vida do paciente (DLQI) do tratamento com o *Cold Cream P.* (Controle) e com o *Cold Cream P.+Própolis* (Intervenção) por 60 dias.

Paciente	Grupo Controle				Grupo Intervenção			
	Pontos	Início Efeito na QV	Pontos	60 dias Efeito na QV	Pontos	Início Efeito na QV	Pontos	60 dias Efeito na QV
1	2	Pequeno	1	Sem	15	Muito Grande	1	Sem
2	8	Moderado	6	Moderado	17	Muito Grande	16	Muito Grande
3	15	Muito Grande	7	Moderado	8	Moderado	3	Pequeno
4	15	Muito Grande	1	Sem	10	Moderado	4	Pequeno
5	-	-	-	-	5	Pequeno	0	Sem
Média	10		4		11		5	
DP	6		3		5		6	

QV = Qualidade de Vida

Análise estatística Início x 60 dias: Pontos, T-test: Valor-P Controle: 0,129; Valor-P Intervenção: 0,051. Controle 60 dias x Intervenção 60 dias: Pontos: T-test: Valor-P = 0,7768.

Tabela 12 - Efeito na hidratação da pele do tratamento com o *Cold Cream P.* (Controle) e com o *Cold Cream P.+Própolis* (Intervenção) por 60 dias.

Paciente	Grupo Controle		Grupo Intervenção	
	Início	60 dias	Início	60 dias
1	28	14	18	27
2	39	31	46	48
3	58	56	86	36
4	44	27	16	30
5	-	-	51	45
Média	42	32	43	37
DP	12	17	29	9

Análise estatística Início x 60 dias: T-test: Valor-P Controle: 0,055; Valor-P Intervenção: 0,665. Controle 60 dias x Intervenção 60 dias: T-test: Valor-P 0,5816.

De maneira geral, comparando-se as médias obtidas do SCORAD, DLQI e hidratação antes e após 60 dias de tratamento, não houve alteração significativa dos valores e das classificações deles derivadas, com significância maior do que 5% em todos os parâmetros avaliados. Pode-se inferir, portanto, que o uso dos cremes foi capaz de controlar a evolução da doença, evitando a introdução de novos medicamentos no tratamento da DA.

Chama-se a atenção para os valores de DLQI (Tabela 11) que, apesar da ausência de diferença estatística do início do tratamento, foram menores para todos os pacientes estudados após 60 dias. O questionário DLQI mensura a influência da DA na qualidade de vida do paciente, de maneira que quanto menor a influência da doença na qualidade de vida, menores os valores do questionário. De uma maneira geral, portanto, fatores que prejudicam a qualidade de vida do paciente com DA, como prurido e sensação de pele seca, foram reduzidos após 60 dias de uso dos cremes.

Assim, o uso dos cremes auxiliou no controle da DA, mas não foi possível observar a influência da própolis no tratamento, já que os valores médios de SCORAD, DLQI e hidratação determinados após 60 dias nos pacientes que usaram *Cold Cream*

P. foram estatisticamente semelhantes aos dos que usaram *Cold Cream P.+Própolis* (Valor-P > 0,05). A análise dos valores individuais de SCORAD (Tabela 10), no entanto, foram menores após 60 dias para a grande maioria dos pacientes que usaram o *Cold Cream P.+Própolis*, com um paciente sendo até mesmo classificado em uma categoria de gravidade menor do que a do início do tratamento (paciente 1).

Como as pontuações e classificações utilizadas na análise dos parâmetros de SCORAD, DLQI e hidratação dependem do estado clínico de cada paciente no início do tratamento, a análise das médias não permite a avaliação fiel do impacto clínico do uso das formulações. Assim, o impacto das três variáveis em conjunto foi avaliado para cada paciente individualmente.

#### 5.5.3.1 Análise individual do estado clínico do paciente

Para análise do impacto das três variáveis estudadas no estado clínico do paciente, a avaliação de cada paciente individualmente pode aportar mais informações sobre a influência da própolis na DA do que a média dos valores de cada uma dessas variáveis isoladas.

Aliado ao estado clínico peculiar de cada paciente no início do tratamento, devido a questões éticas, nenhum medicamento em uso antes do início do estudo foi retirado, mas a médica teve a liberdade de retirar ou introduzir medicamentos na primeira consulta realizada imediatamente após a inclusão do paciente no estudo. Essas alterações, denominadas variáveis confundíveis, estão especificadas na Tabela 7 e podem ser levadas em consideração pontualmente para a melhor compreensão dos resultados. Assim, apesar dos grupos controle e intervenção serem homogêneos, a análise individual dos pacientes permite avaliar mais fielmente o estado clínico do mesmo durante o uso do creme, levando em consideração variáveis individuais.

As Tabelas 13 e 14 mostram o impacto do uso do *Cold Cream P.* e *Cold Cream P.+Própolis*, respectivamente, no SCORAD, DLQI e hidratação da pele de cada paciente.

Tabela 13 - SCORAD, DLQI e Hidratação de cada paciente tratado com *Cold Cream P*.

Variável	Paciente			
	Paciente 1		Paciente 2	
	Antes	Depois	Antes	Depois
SCORAD	42 (moderado)	52,5 (grave)	47,2 (moderado)	32,5 (moderado)
DLQI	2 (pequeno)	1 (sem efeito)	8 (moderado)	6 (moderado)
Hidratação	28	14	39	31
	Paciente 3		Paciente 4	
	Antes	Depois	Antes	Depois
	SCORAD	45,5 (moderado)	49 (moderado)	13 (leve)
DLQI	15 (muito grande)	7 (moderado)	15 (muito grande)	1 (sem efeito)
Hidratação	58	56	44	27

Tabela 14 - SCORAD, DLQI e Hidratação de cada paciente tratado com *Cold Cream P* +Própolis

Variável	Paciente			
	Paciente 1		Paciente 2	
	Antes	Depois	Antes	Depois
SCORAD	65 (grave)	42 (moderado)	62,5 (grave)	58,5 (grave)
DLQI	15 (muito grande)	1 (sem efeito)	17 (muito grande)	16 (muito grande)
Hidratação	18	27	46	48
	Paciente 3		Paciente 4	
	Antes	Depois	Antes	Depois
	SCORAD	12,4 (leve)	12,9 (leve)	29 (moderado)
DLQI	8 (moderado)	3 (pequeno)	10 (moderado)	4 (pequeno)
Hidratação	86	36	16	30
	Paciente 5			
	Antes	Depois		
	SCORAD	21,5 (leve)	19 (leve)	
DLQI	5 (pequeno)	0 (sem efeito)		
Hidratação	51	45		

Do grupo de pacientes que utilizou o *Cold Cream P.* (Tabela 13), apenas o paciente 2 apresentou variáveis confundíveis (Tabela 7), que foi a introdução de antibiótico oral e corticoide tópico imediatamente após sua inclusão na pesquisa. Neste paciente o uso do creme não alterou os parâmetros analisados, ou seja, não houve agudização da doença, o que pode ter sido efeito da utilização do *Cold Cream* ou da introdução dos novos tratamentos. Para os pacientes que não apresentavam variáveis confundíveis, pode-se observar na Tabela 13 um aumento da classificação da gravidade da doença e diminuição da hidratação para os pacientes 1 e 4, mas melhora na qualidade de vida. Para o paciente 4 essa melhora foi bastante significativa, com DLQI antes do uso do creme classificado como “muito grande” e alcançando a classificação “sem efeito” após os 60 dias de uso. No paciente 3 o uso do creme não modificou a classificação da doença e a hidratação da pele, no entanto, a qualidade de vida melhorou, sugerindo que seu uso foi capaz de controlar a DA, impedindo sua agudização.

Com base na análise individual desses quatro pacientes pode-se afirmar que o uso do *Cold Cream P.* melhorou a maneira com a qual o paciente lidava com a doença, aumentando sua qualidade de vida. Seu uso não parece, no entanto, ter interferido no curso da DA.

Já no grupo de pacientes que utilizou o *Cold Cream P.+Própolis*, a grande maioria apresentou diminuição dos valores de SCORAD (Tabela 14). O paciente 1, inclusive, que não apresentava variáveis confundíveis, mostrou melhora até mesmo na classificação da doença, de grave para moderada, além da melhora significativa na qualidade de vida e hidratação. Ainda, com exceção do paciente 2, que tem DA grave e apresentou como variável confundível a introdução de corticoide oral, todos os pacientes relataram melhora na qualidade de vida (Tabela 14). O paciente 3, que não teve nenhuma variável confundível, apresentou redução da hidratação da pele, mas o SCORAD se manteve e, como já relatado, a qualidade de vida melhorou.

De forma interessante, na primeira consulta antes do início do tratamento, o médico diminuiu a dosagem de ciclosporina e indicou a retirada gradual do corticosteroide oral em uso pelos pacientes 4 e 5, o que poderia acarretar em piora do quadro de DA. Mas com o uso do *Cold Cream P.+Própolis* a classificação de gravidade da doença se manteve nos dois casos e a hidratação e DLQI melhoraram (Tabela 14).



Além disso, foi relatado durante a entrevista final, por quatro dos cinco pacientes do grupo intervenção, ou seja, por 80% deles, que o creme foi capaz de reduzir o prurido e de possuir alta capacidade de hidratação, sendo melhor inclusive do que outros cremes utilizados previamente, enquanto que apenas um paciente de quatro do grupo controle, ou seja, 25%, fez relato semelhante. Assim, considerando as limitações do ensaio clínico, que a DA é uma doença que requer a utilização de diversas terapias concomitantes (CASTRO et al., 2006) e que pode ainda estar relacionada com fatores psicológicos como estresse, o uso do *Cold Cream P.+Própolis* parece ter sido uma alternativa melhor do que o *Cold Cream P.* para evitar a agudização da DA. Ambos cremes, no entanto, melhoraram a qualidade de vida dos pacientes, ponto este importante para o controle emocional e, conseqüentemente, da doença.

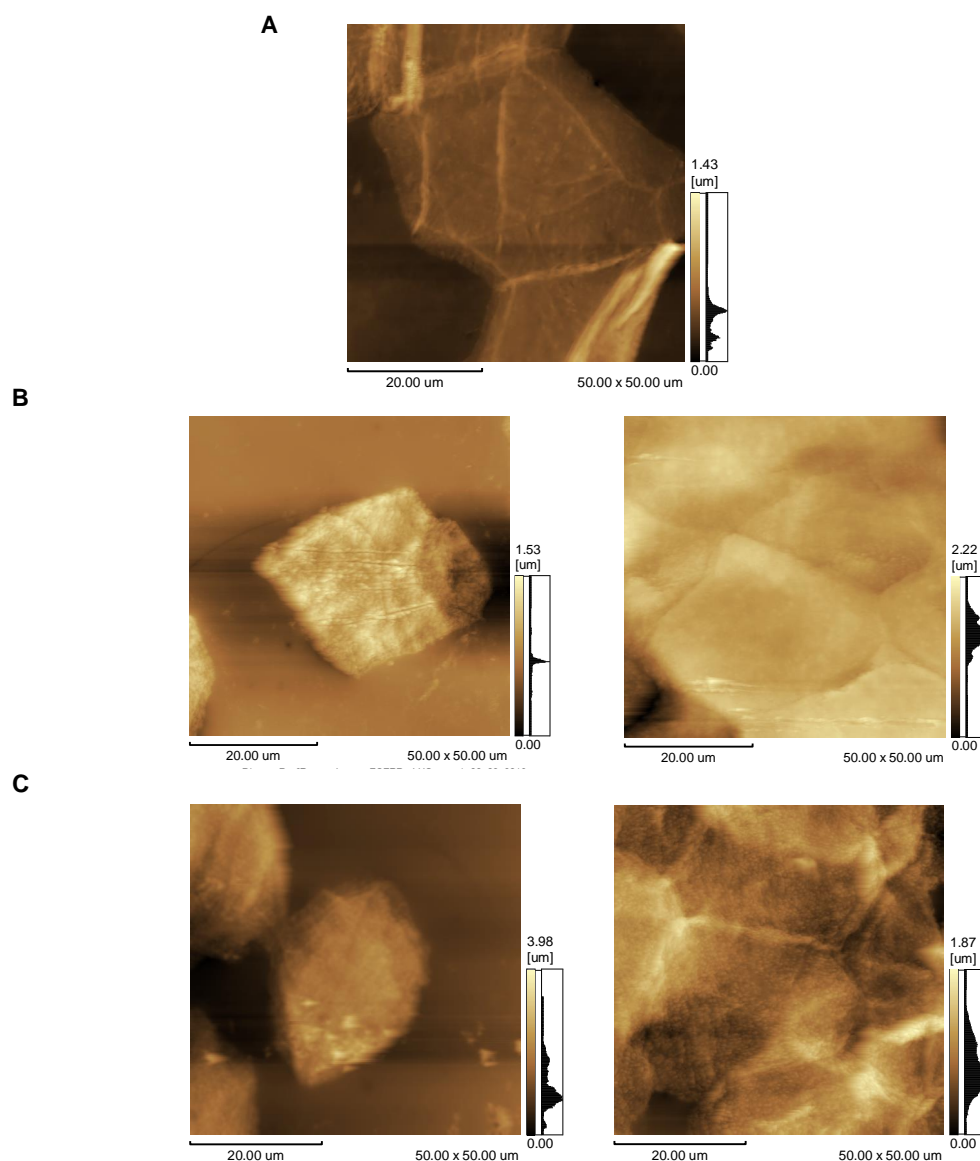
Deve-se ressaltar, no entanto, que um número maior de pacientes participantes do estudo talvez permitisse uma avaliação mais precisa das diferenças entre o uso dos cremes. Apesar do número de pacientes avaliado estar de acordo com o obtido a partir do cálculo amostral, esse foi feito com base em números obtidos da literatura para experimentos realizados com fármacos convencionais adicionados aos cremes. Estudos que avaliam apenas o efeito do creme-base na DA, como o realizado neste trabalho, não foram encontrados. Sendo assim, por mais que o estudo clínico em questão tenha sido realizado com número de pacientes conforme o cálculo amostral obtido antes do início do tratamento, a ausência de fármaco nos cremes aumenta a variabilidade entre os indivíduos e as variáveis categóricas.

#### **5.5.4 Avaliação da morfologia geral dos corneócitos**

A análise da morfologia dos corneócitos após *tape stripping* por MFA foi realizada apenas como estudo preliminar, para vislumbrar a possibilidade de, em estudos futuros, se avaliar a influência de formulações na pele de pacientes com DA de forma não invasiva. Para tanto, foi observada, antes e após 60 dias de tratamento com os cremes, a morfologia dos corneócitos de pacientes com DA moderada. Como controle, foi avaliada a pele de um indivíduo saudável, sem DA.

A Figura 25 mostra imagens de MFA dos corneócitos da pele de um indivíduo saudável, do paciente 3 que usou o *Cold Cream P.* (Tabela 13) e do paciente 1 que usou o *Cold Cream P.+Própolis* (Tabela 14) antes e após 60 dias do uso do creme.

Figura 25 - Fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica, modo fase *tapping*, de fitas adesivas contendo fragmentos do estrato córneo de um paciente saudável (A), de um paciente com DA moderada que usou o *Cold Cream P.* (B) e de um paciente com DA moderada que usou o *Cold Cream P.+Própolis* (C). Para as imagens dos pacientes com DA, as da esquerda mostram o estrato córneo antes do tratamento e as da direita depois de 60 dias de uso dos cremes.



Na imagem do estrato córneo da pele do indivíduo sem DA (Figura 25A), pode-se observar mais de um corneócito unido a outro por campo, os quais apresentam formato hexagonal e topografia plana (BAROLI, 2010; FRANZ et al., 2016). Já as imagens do estrato córneo dos pacientes com DA antes do uso do creme (Figura 25B e C, painel da esquerda) mostram corneócitos isolados, com formato distinto daquele apresentado pela célula saudável. O tratamento com os cremes por 60 dias (Figura 25B e C, painel da direita), independente da presença de própolis, possibilitou a

observação de mais corneócitos por campo, circunvizinhos e com formato mais próximo do hexagonal normal.

A técnica empregada para análise da morfologia permitiu, portanto, a visualização adequada dos corneócitos. Além disso, pode-se inferir que o tratamento com os cremes resultou na melhora da morfologia dessas células, ou seja, auxiliou no reparo do estrato córneo do paciente atópico.

## 6 CONCLUSÃO

As substâncias graxas que compõem a cera de abelha bruta e a cera de abelha purificada foram identificadas. Essa identificação mostrou que a cera de abelha bruta apresenta em sua composição uma gama maior de componentes do que a cera de abelha purificada, com destaque para a presença de compostos aromáticos característicos da própolis verde. O extrato concentrado da cera de abelha bruta, assim como o extrato de própolis verde padrão, apresentou atividade anti-inflamatória em baixas concentrações, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias. O creme oficial, *Cold Cream* Farmacopeico, apresentou-se instável após 15 dias de armazenamento a temperatura ambiente e propriedades mecânicas e bioadesivas inferiores aos cremes adicionados de estabilizantes. A presença da cera de abelha bruta no *Cold Cream* B. conferiu a ele propriedades mecânicas e bioadesivas mais promissoras do que os cremes com mesma composição, mas contendo cera de abelha purificada ao invés da bruta. A adição da própolis ao *Cold Cream* P. não alterou suas características reológicas, mecânicas ou bioadesivas. Os resultados de hidratação da pele sugeriram que apenas a formulação *Cold Cream* Farmacopeico não apresentou capacidade de hidratação da pele superior ao PBS. O ensaio clínico em humanos com o *Cold Cream* P., adicionado ou não da própolis, possibilitou inferir que o uso do creme ajuda a evitar a agudização da DA. A análise qualitativa de cada paciente, levando em consideração seu estado clínico inicial e o conjunto dos instrumentos aplicados, SCORAD, DLQI e medida da hidratação, sugeriram que a adição de uma pequena concentração de própolis no *Cold Cream* melhora a qualidade de vida do paciente, hidratação e gravidade da doença. Porém, a análise de um número maior de pacientes, além do uso de mais instrumentos, possivelmente permitiria a melhor avaliação entre o tratamento com o creme base e aquele contendo própolis.

## 7 REFERÊNCIAS

As referências e formatação do trabalho estão de acordo com o recomendado pela Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP (ABNT). 3.ed., 2016.

AGHAZARIAN, V. L. et al. Texture Optimization of Water-in-Oil Emulsions. **Pharmaceutical Development And Technology**, v.9, n.2, p.125-134, 2004.

ANDRADE, K. C. S.; ROSA, C. L. S.; SILVA, B. A. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p.12-20, 2013.

ANTUNES, A. A. et al. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v.1, n.2, p.131-156, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259372/FNFB+2\\_Revisao\\_2\\_COFAR\\_s\\_eteembro\\_2012\\_atual.pdf/20eb2969-57a9-46e2-8c3b-6d79dccb0741](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259372/FNFB+2_Revisao_2_COFAR_s_eteembro_2012_atual.pdf/20eb2969-57a9-46e2-8c3b-6d79dccb0741). Acesso em: 15 jun. 2019.

AOYAMA, H. et al. Successful treatment of resistant facial lesions of atopic dermatitis with 0.1% FK506 ointment. **British of Journal Dermatology**, v.133, p.494–6, 1995.

ARMENGOT-CARBO, M.; MARTIN, A. H.; TORRELO, A. The Role of Filaggrin in the Skin Barrier and Disease Development. **Dermosifiliográficas**, v.106, n.4, p.86-95, 2015.

BAROLI, B. M. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality?. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.1, 2010.

BATISTA, D. I. S. et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. **Journal of the European Academy Dermatology Venereology**, v.29, p.1091-1095, 2015.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recente advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BAÑSLER, K. et al. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. **Journal of Controlled Release**, v.242, p.105-118, 2016.

BEHESHTIA, A. et al. Comparison of Topical Sucralfate and Silve Sulfadiazine Cream in Second Degree Burns in Rats. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, Iran, v.22, n.4, p.481-487, 2013.

BENEDETTO, A.; KUBO, A.; BECK, L. A. Skin barrier disruption: a requirement for

allergen sensitization?. **Journal Invest Dermatology**, v.132, n.3 pt 2, p.949-963, 2012.

BERRETTA, A. A. et al. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market. **Superfood and Functional Food**, 2017.

BRUNNER, P. M.; YASSAY, E. G.; LEUNG, D. Y. M. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.139, n.4, 2017.

BOUWSTRA, J. A. et al. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 39, 1998.

BUHLER, F. V.; FERREIRA, J. R. N. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de *Ilex paraguariensis* St.Hil. a 5 e 10%. **Revista Perspectiva**, v.32, p.47-55, 2008.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, n.4, p.347-363, 1998.

CANDI, E. SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, p.328-40, 2005.

CAROLL, C. L. et al. The burden of atopic dermatitis: impact on the patient, family, and society. **Pediatric Dermatol**, v.22, p.192-199, 2005.

CARVALHO, O. V. et al. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte II: abordagem terapêutica. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arquivos de Asma, Imunologia e Alergia**, v.1, n.2, 2017.

CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.1, 2010.

CASTRO, A. P. M. et al. Guia Prático para manejo de Dermatite Atópica - opinião conjunta de especialistas em alergologia da Associação Brasileira de Alergia de Imunopatologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Revista Brasileira de Alergia Imunopatologia**, v.29, n.6, 2006.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.675-711, 2004.

CORREA, M. C. M.; NEBUS, J. Management of patients with atopic dermatitis: the role of emollient therapy. **Dermatololy Research and Practice**, v.2, p.1-20, 2012.

COSTA, P. et al. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

CHOI, S. E. et al. Effect of *Alnus japonica* extract on a model of atopic dermatitis in

NC/Nga mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.406-413, 2011.

DALEPRANE, J. B. et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p.557-566, 2002.

DARSOW, U.; VIELUF, D.; RING, J. Evaluating the relevance of aeroallergen sensitization in atopic eczema using the tool 'atopy patch test': a randomized, double-blind multicenter study. Atopy patch test study group. **Journal of American Academy Dermatology**, v.40, p.187-93, 1999.

DAVIDSON, W. F. et al. Report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop on "Atopic dermatitis and the atopic march: Mechanisms and interventions". **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.143, n.3, 2019.

DE BARROS, M. P. et al. Effect of Brazilian green própolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.3, p.567-571, 2007.

DEVILLERS, A. C.; ORANJE, A. P. Wet-wrap treatment in children with atopic dermatitis: a practical guideline. **Pediatric Dermatology**, v.29, p.24-7, 2012.

DUTHIE G. G.; GARDNER P. T.; KYLE J. A. M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, n.3, p.599-603, 2003.

EGAW, G. KABASHIMA, K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.138, n.2, 2016.

**Encyclopedia Britannica**, v.3, 14 ed., p.316, 1929.

FEINGOLD, K. R. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. **The Journal of Lipid Research**, 2009.

EHSANI, A. H. et al. Comparison of topical 8-methoxypsoralen and narrowband ultraviolet B with narrowband ultraviolet B alone in treatment-resistant sites in plaque-type psoriasis: a placebo-controlled study. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.27, n.6, 2011.

ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M. H.; SOUSA LOBO, J. M. Comparison between sensory and instrumental characterization of topical formulations: impact of thickening agents. **International Journal of Cosmetic Science**, v.38, n.4, p.389-398, 2016.

FITZPATRICK L. R.; WANG J.; LE, T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.299, n.3, p.915-920, 2001.

FLOHR, C.; MANN J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. **Allergy**, v.69, p.3-16, 2014.

FRANZ, J. et al. Nanoscale alterations of corneocytes indicate skin disease. **Skin Research and Technology**, v.22, n.2, p.174-180, 2016.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, n.25, p.1-9, 2015.

GARNIER, N. et al. Characterization of archaeological beeswax by electron ionization and electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.74, n.19, p.4868-4877, 2002.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreen. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v.250, n.1, p.35-44, 2003.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59–84, 1979.

GU, H. et al. Evaluation of diagnostic criteria for atopic dermatitis: validity of the criteria of Williams et al. in a hospital-based setting. **British Journal of Dermatology**, v.145, p.428–433, 2001.

GRIFFITHS, C. et al. **Rook's Textbook of Dermatology**, v.4, Set: Wiley, 2016.

GRIMALT, R.; MENGEAUD, V.; CAMBAZARD, F. The Steroid-Sparing Effect of an Emollient Therapy in Infants with Atopic Dermatitis: A Randomized Controlled Study. **Dermatology**, v.214, p.61-67, 2007.

HANIFIN, J. M.; RAJKA, G. Diagnostic features of atopic dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica (Stockh)**, v.92, p.44-47, 1980.

HARPER, J. I. et al. Cyclosporin for Atopic Dermatitis in Children. **Dermatology**, v.203, p.3-6, 2001.

HATA, T. et al. Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, Induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. **Plos One**, v.7, n.11, 2012.

HAUSEN, B. M. et al. Propolis allergy I. Origin properties usage and literature review. **Contact Dermatitis**, v.17, p.163–170, 1987.

HECK, R. et al. Film-forming formulations containing porous silica for the sustained delivery of actives to the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.108, p.1-8, 2016.

HJALTE, F.; STEEN, C. K.; SCHMITT, E. M. Sustained PASI, DLQI and EQ-5 response of biological treatment in psoriasis: 10 years of real-world data in the Swedish National Psoriasis Register. **British Journal of Dermatology**, 2017.

HILL, C. J.; ROSTENBERG, A. Adverse effects from topical steroids. **Cutis**, v.21, n.5, p.624-8, 1978.



HORI J. I. et al. The Inhibition of inflammasome by Brazilian Propolis (EPP-AF). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

ILLI, S. et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.113, p.925-31, 2004.

JEONG, J. M. et al. Antioxidant and Chemosensitizing Effects of Flavonoids with Hydroxy and/or Methoxy Groups and Structure-Activity Relationship. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.4, p.537-546, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, vol. 9. Guanabara Koogan, Brasil, p.111-128, 1999.

JOHNSON, M. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Evaluation of Solute Permeation through the Stratum Corneum: Lateral Bilayer Diffusion as the Primary Transport Mechanism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, n.10, 1997.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. D. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.151, p.223–233, 1997.

KALILIN, A. E.; KAJAVA, A. V.; STEINERT, P. M. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. **BioEssays**, v.24, p.789–800, 2002.

KANEEDA, J.; NISHINA, T. Safety of propolis acute toxicity. **Honeybee Science**, v.15, p.29–33, 1994.

KANG, H. et al. Theobroma cacao extract attenuates the development of Dermatophagoides farinae-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. **Food Chemistry**, v.1, n.216, p.19-26, 2017.

KIKUCHI, K.; TAGAMI, H. Noninvasive biophysical assessments of the efficacy of a moisturizing cosmetic cream base for patients with atopic dermatitis during different seasons. **Department of Dermatology**, p.980-8574, 2008.

KIRCIK, L. H.; DEL ROSSO, J. Q. Nonsteroidal treatment of atopic dermatitis in pediatric patients with a ceramide-dominant topical emulsion formulated with an optimized ratio of physiological lipids. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v.4, n.12, p.25, 2011.

KOBAYASHI, T. et al. Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. **Immunity**, v.42, 2015.

KOPPEL, S. A. et al. Efficacy of a Cream Containing Ceramides and Magnesium in the Treatment of Mild to Moderate Atopic Dermatitis: A Randomized, Double-blind, Emollient-and Hydrocortisone-controlled Trial. **Acta dermato-venereologica**, v.96, n.7, p.948-953, 2016.

KOPPES, S. A. et al. Effect of allergens and irritants on levels of natural moisturizing factor and corneocyte morphology. **Contact dermatitis**, v.76, n.5, p.287-295, 2017.

KUBO, A. et al. The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties. **Scientific Reports**, v.3, p.1731, 2013.

KUNZ, B. et al. Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. **Dermatology**, v.195, n.1, p.10-9, 1997.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (Baltimore)**, v.41, n.6, p.317-20, 2013.

LEE, S. H.; JEONG, S. K.; AHN, S. K. An update of the defensive barrier function of skin. **Yonsei Medical Journal**, v.47, p.293-306, 2006.

LEMOS, C. N. et al. **Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization**. In: LEMOS, C. N.; PEREIRA, F.; DALMOLIN, L. F.; CUBAYACHI, C.; RAMOS, D. N.; LOPEZ, R. F. V. Pharmaceutical Nanotechnology Series. 1.ed. Estados Unidos: Elsevier, 2018. cap. 6, p.187-229.

LEMOS, C. N. et al. Iontophoresis-stimulated silk fibroin films as a peptide delivery system for wound healing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.128, p.147-155, 2018.

LEITE, S. N.; VASCONCELLOS, M. D. P. C. Adesão à terapêutica medicamentosa: elementos para a discussão de conceitos e pressupostos adotados na literatura. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.8, n.3, p.775-782, 2003.

LEUNG, D. Y. M.; BOGUNIEWICZ, M. Advances in allergic skin diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, n.3, 2003.

LUSTOSA S. R. et al. Propolis: updates on chemistry and pharmacology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.447-454, 2008.

MACHADO J. L. et al. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.157652, 2012.

MANCINI, A. J.; KAULBACK, K.; CHAMLIN, S. L. The socioeconomic impact of atopic dermatitis in the United States: a systematic review. **Pediatric Dermatology**, v.25, p.1-6, 2008.

MARGOLIS, D. J. et al. The persistence of atopic dermatitis and filaggrin (FLG) mutations in a US longitudinal cohort. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.130, n.4, p.912-917, 2012.

MARQUELE, F. D. et al. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.2, p.461-468, 2006.

MARTIN, T. R. Recognition of Bacterial Endotoxin in the Lungs. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.23, p.128-132, 2000.

MEDRONHO, A. R. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2009, p.305.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54 Suppl. 1, p.S3-S17, 2002.

MIYATAKA, H. et al. Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physicochemical methods. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.20, n.5, p.496-501, 1997.

MOHER, D. et al. CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **Journal of Clinical Epidemiology**, v.63, n.8, p.1-37, 2010.

MORE, S. B.; NANDGUDE, T. D.; PODDAR, S. S. Vesicles as a tool for enhanced topical drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.10, p.196–208, 2016.

MULLER, M. C.; RAMOS, D. G. Psicodermatologia: uma interface entre a Psicologia e a Dermatologia. **Psicologia Ciência e Profissão**, v.24, n.3, p.76-84, 2004.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, 2008.

NEEDLEMAN, I. G; SMALES, F. C. *In vitro* assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. **Biomaterials**, v.16, n.617-624, 1995.

OEDRA, K. M. Current clinical practice in atopic dermatitis. **Nursing Standard**, v.28, n.49, p.45-51, 2014.

OECD. **Method B.41**, EU, 2000, 2008; Test Guideline 432, 2004.

OL´AH, A. et al. Echinacea purpurea-derived alkylamides exhibit potent anti-inflammatory effects and alleviate clinical symptoms of atopic eczema. **Journal of Dermatological Science**, 2017.

ORFALI, R. L. et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.59, n.3, p.270–275, 2013.

ORSATTI, C. L. et al. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v.24, n.8, p.1141-1146, 2010.

OSKOU EI, T. E.; NAJAFI, M. Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. **Iran Journal of Basic Medical Sciences**, v.16, n.6, p.731-742, 2013.

PALLER, A. S.; MANCINI, A. J.; HURWITZ, S. **Clinical Pediatric Dermatology: a textbook of skin disorders of childhood and adolescence**. 5<sup>a</sup>ed. Nova Iorque: Elsevier, 2016, p.640.

PETRILLI, R.; LOPEZ, R. F. V. Physical methods for topical skin drug delivery: concepts and applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.54, 2018.

PLANZ, V.; LEHR, C. M.; WINDBERGS, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.242, p.89-104, 2016.

POLAT, B. E. et al. Ultrasound-Mediated Transdermal Drug Delivery: Mechanisms, Scope, and Emerging Trends. **Journal of Control Release**, v.152, n.3, 2011.

POWER, C. E. et al. Microbiome and pediatric atopic dermatitis. **The Journal of Dermatology**, v.42, n.12, p.1137-1142, 2015.

PRAUSNITZ, M. R. et al. Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p.10504-10508, 1993.

PROKSCH, E.; JENSEN, J. M.; ELIAS, P.M. Skin Lipids and Epidermal Differentiation in Atopic Dermatitis. **Clinics in dermatology**, v.21, p.134-144, 2003.

ROMAY, A. A.; FRANCO, M. A.; MALDONADO, R. R. Therapeutic Efficacy, Secondary Effects, and Patient Acceptability of 10% Sulfur in Either Pork Fat or Cold Cream for the Treatment of Scabies. **Pediatric Dermatology**. México, v.8, n.1, p.64-66, 1991.

SAITO, Y. et al. Brazilian green propolis water extract up-regulates the early expression level of HO-1 and accelerates Nrf2 after UVA irradiation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p.421, 2015.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. **Hormônio Adrenocorticotrópico: Esteróides Adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios Adrenocorticais**. In: SCHIMMER, B. P. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10.ed. Rio de Janeiro, 2005.

SCHMITT, J. et al. Prednisolone vs. ciclosporin for severe adult eczema. An investigator-initiated double-blind placebo-controlled multicentre trial. **British Journal of Dermatology**, v.162, p.661-8, 2010.

SENYIGIT, T.; OZCAN, I.; OZER O. Innovative topical formulations for treatment of dermatitis. **Recent Patents of Inflammation Allergy Drug Discovery**, v.6, p.186-201, 2012.

SHARMA, L. Diagnostic clinical features of atopic dermatitis. **Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology**, v.67, p.25-27, 2001.

SHAH, K. N. et al. Psoriasis in childhood: effective strategies to improve treatment adherence. **Psoriasis: Targets and Therapy**, v.5, p.43-54, 2015.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.669-682, 2010.

SILVA, S. A. M.; VALARINI, M. F. C.; LEONARDI, G. R. Estudo de estabilidade, análise de comportamento reológico e investigação de Cristais-Líquidos de formulações contendo pó-de-pérola. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.94, n.2, p.109-114, 2013.

SIMON, M. et al. Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. **Biochemical Journal**, v.317, p.173–177, 1996.

SILVERBERG, N. B.; WONG, L. M.; YOSIPOVITCH, G. Diet and atopic dermatitis. **Cutis**, v.97, n.3, p.227-232, 2016.

SMEDEN, V.; BOUWSTRA, J. A. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. **Currents Problems in Dermatology Basel**, v.49, p.8-26, 2016.

SOLÉ, D. et al. Prevalência de sintomas de asma, rinite e eczema atópico entre crianças e adolescentes brasileiros identificados pelo *International Study of Asthma and Allergies* (ISAAC): Fase 3. **J Pediatric**, v.82, n.5, p.341-6, 2006.

SONG Y. S. et al. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, n.2-3, p.155-161, 2002.

SOUSA, J. P. B. et al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reserve phase high performance liquid chromatography. **Journal of separation science**, v.30, n.16, 2007.

SZLISZKA, E. et al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

SZCZEPANOWSKA, J.; REICH, A.; SZEPIETOWSKI, J. C. Emollients improve treatment results with topical corticosteroids in childhood atopic dermatitis: a randomized comparative study. **Pediatric Allergy and Immunology**, v.19, p.614-618, 2008.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, p.227-258, 2004.

TAVARES, N. U. L. et al. Fatores associados à baixa adesão ao tratamento medicamentoso em idosos. **Revista de Saúde Pública**, v.47, n.6, p.1-9, 2013.

TAYLOR, R.; BEWLEY, A.; MELIDONIS, N. Psychodermatology. **Psychiatry and Medicine**, v.5, n.3, p.81-84, 2006.

THOMSEN, S. F. Epidemiology and natural history of atopic diseases. **European Clinical Respiratory Journal**, v. 24, 2015.

TOYODA, M. et al. Never growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v.147, p.71-9, 2002.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.290, p.377-385, 2006.

WASSERBAUER, N.; BALLOW, M. Atopic dermatitis. **American Journal of Medicine**, v.122, p.121-125, 2009.

WERTZ, P.W. Current Understanding of Skin Biology Pertinent to Skin Penetration: Skin Biochemistry. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.26, p.217-226, 2013.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.603-618, 2004.

WOLLENBERG, A. et al. ETFAD/EADV Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and pediatric patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.30, n.5, p.729-47, 2016.

YOU, C. E. et al. Effects of emollient containing bee venom on atopic dermatitis: a double-blinded, randomized, base-controlled, multicenter study of 136 patients. **Annals of Dermatology**, v.28, n.5, p.593-599, 2016.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

### FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO - USP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar do estudo vinculado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) em parceria com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP), cujo título é **“Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de Cold Cream em pacientes portadores de dermatite atópica”**. Ressalto que você tem total liberdade para aceitar ou recusar a participação, sem nenhum prejuízo do seu atendimento em relação ao serviço de saúde no qual está inserido. O tratamento prévio realizado no HC-FMRP, de forma alguma, será prejudicado.

Este estudo tem como objetivo investigar a influência de diferentes formulações de Cold Cream no tratamento da Dermatite Atópica (DA). Essa é uma das formulações mais antigas e seguras, que tem sido utilizada com sucesso em pacientes com dermatite atópica. Há relatos que demonstram a diminuição da profundidade da lesão e aumento da hidratação da pele com o uso desse creme, mas ainda é necessário mais pesquisas para comprovar o seu benefício no tratamento da dermatite atópica.

O estudo será composto por dois encontros presenciais e um contato telefônico, totalizando dois meses. As visitas serão realizadas no ambulatório do HC-FMRP, localizado no segundo andar, corredor seis. No primeiro encontro você receberá as informações detalhadas sobre a pesquisa para que decida se quer ou não participar. Após a leitura completa deste termo e, feitos os esclarecimentos que você solicitar, caso aceite participar da pesquisa deverá assinar este documento emitido em duas vias de igual conteúdo, uma permanecerá com você e a outra sob a guarda do responsável pela pesquisa. Neste momento, será feita a primeira aplicação do creme e entregue um pote com quantidade suficiente para uso até a próxima consulta. Os cremes serão disponibilizados apenas durante o período de pesquisa. Importante saber que cada paciente irá receber uma das duas possíveis formulações, sendo estas: Cold Cream M. contendo cera de abelha purificada ou Cold Cream M. contendo cera de abelha purificada com extrato de própolis verde. A escolha da formulação a ser entregue será realizada por meio de sorteio onde paciente, médico e farmacêutica não saberão qual creme estará sendo entregue a você. Apenas uma pessoa que não está participando da pesquisa saberá a formulação que você utilizará.

Durante a primeira consulta: **1)** será medida a hidratação da sua pele com o auxílio de um equipamento que apenas será encostado na pele, sem previsão de dor; **2)** será aplicado um questionário para avaliar sua qualidade de vida; **3)** o médico responsável realizará uma avaliação da pele com dermatite atópica e de uma lesão em especial, e também uma avaliação sobre a qualidade do seu sono e a intensidade da coceira e **4)** será feita a avaliação das medidas da sua pele com o auxílio de fitas adesivas que serão coladas e descoladas três vezes consecutivas (*tape stripping*), procedimento sem previsão de dor, desconforto ou lesões.

Assim você estará apto (a) a fazer as próximas aplicações, em sua residência, na qual deverá

aplicar no corpo todo, conforme orientação médica, uma fina camada do creme recebido, 2 (duas) vezes ao dia, de manhã e à tarde após o banho, até o retorno. Depois de 30 dias da 1ª (primeira) consulta você receberá um telefonema nosso. Precisamos saber se houve alguma reação adversa ou se você tem novas dúvidas. Em 60 dias depois da 1ª (primeira) consulta será realizado novo acompanhamento pelo pesquisador, no ambulatório do HC-FMRP, para avaliar a hidratação da pele, a qualidade de vida, a pele com dermatite, a lesão e as camadas da pele. A qualquer momento você poderá entrar em contato conosco nos telefones que estão informados abaixo e também precisamos do seu telefone para entrarmos em contato com você durante a pesquisa.

Todos os seus dados serão confidenciais e a sua identidade será mantida em sigilo. Não será feito registro de áudio na coleta dos dados. Não haverá custo para a sua inclusão na pesquisa e atendimento em consultas, além disso, o creme utilizado durante o período do estudo será disponibilizado gratuitamente. Toda a pesquisa irá acontecer durante as suas consultas de rotina no ambulatório de dermatologia do HC-FMRP. Neste sentido, a locomoção e outros eventuais gastos pessoais não serão custeados. Não haverá também qualquer remuneração financeira relacionada à sua participação.

As pesquisadoras responsáveis são a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Fonseca Vianna Lopez e a Mestranda Bianca Aparecida Martin, que podem ser encontradas no seguinte endereço: Avenida do Café, S/Nº, Departamento de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP - USP, Ribeirão Preto, SP, ou pelos telefones (16) 3315-4202; (19) 99649-6448. Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, no endereço Avenida do Café, s/n, Campus Universitário, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto/SP, pelo telefone (16) 3315-4213, em dias úteis, das 8h00 às 12h00 ou pelo e-mail: [cep@fcrp.usp.br](mailto:cep@fcrp.usp.br). Caso não queira mais participar deste estudo, basta entrar em contato com os pesquisadores no endereço e/ou telefones informados acima.

\_\_\_\_\_  
Renata Fonseca Vianna Lopez

\_\_\_\_\_  
Bianca Aparecida Martin

Eu (nome do paciente), \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, telefone: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_, ouvi e compreendi a explicação do estudo do qual fui convidado a participar. Neste sentido, tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas e decidi por minha própria vontade participar deste estudo e sei que posso retirar-me do mesmo em qualquer momento.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Participante)



## APÊNDICE B - Ficha Sociodemográfica e Clínica



## PESQUISA DERMATITE ATÓPICA – FCFRP/USP

**FICHA SÓCIO-DEMOGRÁFICA E CLÍNICA**  
**PESQUISA DERMATITE ATÓPICA**  
 “Avaliação da efetividade e segurança de uma nova formulação de  
 Cold Cream para pacientes portadores de dermatite atópica”



Nome: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Nº de Registro: \_\_\_\_\_ Endereço: \_\_\_\_\_  
 Data da 1º Entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data da 2º Entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data da 3º Entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS**

1. Sexo:  M  F 2. Gestante ou lactante?  Não  Sim 3. Idade \_\_\_\_\_  
 4. Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 5. Estado Civil:  Solteiro  Casado  Viúvo  Separado/Divorciado  
 Outros: \_\_\_\_\_  
 6. Escolaridade:  Analfabeto  Fundamental completo (1ª a 8ª série)  Fundamental incompleto  
 Médio completo (1º ao 3º colegial)  Médio incompleto  Superior Completo  Superior incompleto  
 Pós Graduação 7. Profissão: \_\_\_\_\_  
 8. Situação Profissional:  Empregado  Desempregado  Estudante  Aposentado/Pensionista  
 9. Acompanhante:  Não  Sim  
 Quem? \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

**DADOS CLÍNICOS**

10. Primeiro diagnóstico médico de dermatite atópica em: \_\_\_\_\_  
 11. Número de consultas com o dermatologista por ano: \_\_\_\_\_  
 12. Possui dermatite de contato?  Não  Sim A quais elementos? \_\_\_\_\_  
 12.1 Evita contato?  Não  Sim Com quais? \_\_\_\_\_  
 13. Realiza profilaxia ambiental?  Não  Sim  
 14. Possui cachorro?  Não  Sim  
 15. Possui gato?  Não  Sim  
 16. Faz o uso de capas?  Não  Sim 17. Possui tapetes em casa?  Não  Sim  
 18. Possui alergia a algum medicamento?  Não  Sim Quais: \_\_\_\_\_  
 19. Possui alergia a própolis (substância presente no mel de abelha)?  Não  Sim  Não sabe  
 20. Possui alergia a manteiga de cacau e/ou cacau?  Não  Sim  Não sabe

## PESQUISA DERMATITE ATÓPICA – FCFRP/USP

21. Foi recomendado pelo médico o uso de cosméticos? (Creme Hidratante):  Não  Sim Qual? \_\_\_\_\_

22. Utiliza cosméticos como complemento do tratamento da dermatite atópica:  Não  Sim Qual? \_\_\_\_\_

23. Qual o tempo de banho? \_\_\_\_\_ 23.1 Utiliza bucha?  Não  Sim

23.2 Utiliza água morna?  Não  Sim

24. Realizou alguma cirurgia prévia:  Não  Não sei  Sim, Quais:  
 Amigdalectomia  Adenectomia Outras: \_\_\_\_\_

25. Possui doenças alérgicas:  Não  Não sei  Sim, Quais:  
 Rinite alérgica  Asma  Conjuntivite alérgica Outras: \_\_\_\_\_

26. Possui outras doenças diagnosticadas:  Não  Sim, Quais:  
 Doenças Hepáticas  Depressão  Doenças Neurológicas  
 Ansiedade  Doenças Renais  Doenças Cardiovasculares  
 Doenças Metabólicas  Doenças Osteo-articulares Outras: \_\_\_\_\_

27. Existem outros membros na família com dermatite atópica?  Não  Sim Quem? \_\_\_\_\_

28. Período do ano/clima com agravamento:  Verão  Inverno  Chuva  Indiferente Outros \_\_\_\_\_

29. Considera a sua doença:  Leve  Moderada  Grave

30. Você entendeu como utilizar o creme?  Sim  Não

## TERAPEUTICA MEDICAMENTOSA

Medicamento (Via oral)	Quantas vezes/dia e Qual horário	Uso contínuo (sim ou não)	Tempo de tratamento
Medicamento (Tópico)	Quantas vezes/dia e Qual horário	Uso contínuo (sim ou não)	Tempo de tratamento
Medicamento (Injetável)	Quantas vezes/dia e Qual horário	Uso contínuo (sim ou não)	Tempo de tratamento

## PESQUISA DERMATITE ATÓPICA – FCFRP/USP

Medicamento (Sublingual)	Quantas vezes/dia e Qual horário	Uso contínuo (sim ou não)	Tempo de tratamento
Medicamento (Nasal)	Quantas vezes/dia e Qual horário	Uso contínuo (sim ou não)	Tempo de tratamento

## REGIÕES DAS LESÕES

31. Presença de lesões 0 mês:                      Presença de lesões 2 meses:

## COMPORTAMENTOS DE SAÚDE

32. Consome bebida alcoólica?  Não  Sim Quantidade por dia: \_\_\_\_\_

33. Você fuma?  Não  Ex-Fumante  Sim Quantidade por dia: \_\_\_\_\_

34. Pratica exercícios físicos?  Não  Sim Frequência: \_\_\_\_\_

## DADOS SOBRE A ADESÃO DA FORMULAÇÃO – Após 1 mês de tratamento

35. Você deixou de usar o creme algum dia?  Não  Sim Quantos dias: \_\_\_\_\_ Por quê? \_\_\_\_\_

36. O uso do creme está causando desconforto?  Não  Sim Quais: \_\_\_\_\_

37. Em relação ao creme, quais são as queixas abaixo:

Tratamento não eficiente     Tratamento interfere atividades diárias     Tenho medo de efeitos secundários

As instruções são pouco claras     Creme tem cheiro desagradável     Creme provocou coceira

Creme deixa manchas nas roupas ou superfície

Creme mudou de aparência     Creme deixou a pele seca

Creme provocou ardência     Creme deixa a pele oleosa

Creme difícil de espalhar     Creme difícil de tirar do pote

Outras: \_\_\_\_\_

## PESQUISA DERMATITE ATÓPICA – FCFRP/USP

**DADOS SOBRE A ADESÃO DA FORMULAÇÃO – Após 2 mês de tratamento**

38. Você deixou de usar o creme algum dia?  Não  Sim Quantos dias: \_\_\_\_\_ Por quê? \_\_\_\_\_

39. O uso do creme está causando desconforto?  Não  Sim Quais: \_\_\_\_\_

40. Você utilizou algum outro hidratante no período do estudo?  Não  Sim Por quê? \_\_\_\_\_

41. Sobrou formulação?  Não  Sim 41.1 Quantos potes? \_\_\_\_\_

42. Em relação ao creme, quais são as queixas abaixo:

Tratamento não eficiente  Tratamento interfere atividades diárias  Tenho medo de efeitos secundários

As instruções são pouco claras  Creme tem cheiro desagradável  Creme provocou coceira

Creme deixa manchas nas roupas ou superfície

Creme mudou de aparência  Creme deixou a pele seca

Creme provocou ardência  Creme deixa a pele oleosa

Creme difícil de espalhar  Creme difícil de tirar do pote

Outras: \_\_\_\_\_

**EXAMES LABORATÓRIAS**

43. Valores IgE:

44. Prick teste:  Realizado  Não Realizado

Quais elementos? \_\_\_\_\_

45. Patch teste:  Realizado  Não Realizado

Quais elementos e número de cruces? \_\_\_\_\_

## ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
*Comitê de Ética em Pesquisa*

Of. CEP/FCFRP n°. 025/2018  
 kms

Ribeirão Preto, 18 de dezembro de 2018.

À pós-graduanda

**Bianca Aparecida Martin**

Orientadora: Profª. Drª. Renata Fonseca Vianna Lopez  
 FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE E SEGURANÇA DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE COLD CREAM EM PACIENTES PORTADORES DE DERMATITE ATÓPICA**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP n°. 462 – CAAE: 83521418.5.0000.5403, foi aprovado “*ad referendum*” do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em 02/07/2018, conforme Parecer Consubstanciado do CEP n° 2.749.077, sendo referendado, por unanimidade, na 179ª reunião ordinária, realizada em 15/08/2018.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO  
 Coordenadora do CEP/FCFRP

**Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP**  
 Avenida do Café s/nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão  
 Preto – SP Fone: (16) 3315-4213 – Fax: (16) 3315-4892 -  
 cep@fcfrp.usp.br

## ANEXO B - Questionário de avaliação da qualidade de vida em dermatologia (DLQI)



## ÍNDICE DE QUALIDADE DE VIDA EM DERMATOLOGIA



Nº Hospital:

Data:

Nome:

Endereço:

Diagnóstico:

Escore DLQI:

\_\_\_\_mês

Telefone:

O objetivo deste questionário é medir o quanto seu problema de pele afetou sua vida NO DECORRER DA ÚLTIMA SEMANA. Marque com um X a melhor resposta para cada pergunta.

**1. Na última semana, quanto sua pele coçou, esteve sensível, dolorida ou ardida?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada
**2. Na última semana, você ficou com vergonha ou se preocupou com sua aparência por causa de sua pele?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada
**3. Na última semana, quanto sua pele interferiu nas suas compras ou nas suas atividades dentro e fora de casa?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada  Não relevante
**4. Na última semana, quanto sua pele influenciou na escolha das roupas que você vestiu?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada  Não relevante
**5. Na última semana, quanto sua pele afetou as atividades sociais ou de lazer?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada  Não relevante
**6. Na última semana, quanto sua pele atrapalhou a prática de esportes?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada  Não relevante
**7. Na última semana, sua pele o impediu de trabalhar ou ir à escola?**
 Sim  Não  Não relevante
**Caso sua resposta seja NÃO, na última semana quanto sua pele lhe causou problemas no trabalho ou na escola?**
 Muito  Um pouco  Nada
**8. Na última semana, quanto sua pele lhe causou problemas com seu parceiro ou amigos mais próximos e parentes?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada  Não relevante
**9. Na última semana, quanto seu problema de pele lhe causou dificuldades sexuais?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada  Não relevante
**10. Na última semana, quanto o seu tratamento para a pele foi um problema deixando sua casa desorganizada ou tomando muito o seu tempo?**
 MUITÍSSIMO  Muito  Um pouco  Nada  Não relevante

Pedimos a gentileza de verificar se todas as perguntas foram respondidas.

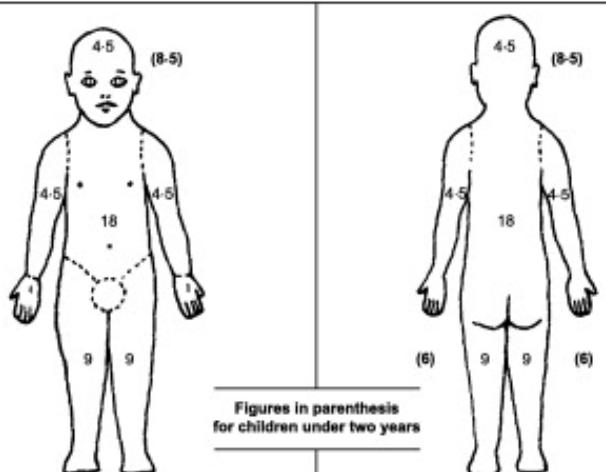
Muito obrigado.

MARTINS; ARRUDA; MUGNAINI, 2004.

ANEXO C - Ferramenta Escore de Dermatite Atópica (SCORAD) para avaliação da gravidade da doença

**SCORAD INDEX**  
**EUROPEAN TASK FORCE**  
**ON ATOPIC DERMATITIS**

Last Name  First Name   
Date of Birth:       DD/MM/YY  
Date of Visit:



Figures in parenthesis  
for children under two years

**A: EXTENT** Please indicate the area involved

**B: INTENSITY**

**C: SUBJECTIVE SYMPTOMS**  
PRURITUS + SLEEP LOSS

**A/5 + 7B/2 + C**

CRITERIA	INTENSITY
Erythema	
Oedema/Papulation	
Oozing/crust	
Excoriation	
Lichenification	
Dryness*	

\* Dryness is evaluated on uninvolved areas

MEANS OF CALCULATION	
INTENSITY ITEMS (average representative area)	
0 = absence	
1 = mild	
2 = moderate	
3 = severe	

Visual analog scale  
(average for the last 3 days or nights)

PRURITUS (0 to 10)  0 10

SLEEP LOSS (0 to 10)  0 10