

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estabilidade e eficácia clínica de formulações dermocosméticas
contendo filtros solares, vitaminas lipossolúveis
e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas**

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado(a): Mirela Donato Gianeti

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Ribeirão Preto

2013

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.

Gianeti, Mirela Donato

Estabilidade e eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo filtros solares, vitaminas lipossolúveis e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas. Ribeirão Preto, 2013.
217 p.; 30cm.

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

Orientador: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves.

1. Cosméticos. 2. Eficácia clínica. 3. Estabilidade.
4. Vitaminas. 5. Extratos vegetais. 6. Segurança

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mirela Donato Gianeti

Estabilidade e eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo filtros solares, vitaminas lipossolúveis e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas.

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha querida mãe, Judite, pelo exemplo de amor, alegria e dedicação, por me ensinar a ser quem eu sou, pelo amor incondicional, por estar sempre presente, por saber sempre exatamente o que dizer, por me mostrar que não há nada mais importante do que a família. Por ser simplesmente a melhor mãe do mundo.

Ao meu querido pai, Djalma, por me apresentar à ciência, que por sua curiosidade, dedicação e paixão me fez querer ser uma cientista também. Por sempre me mostrar qual o caminho certo a seguir e por estar sempre presente. Por ser simplesmente o melhor pai do mundo.

Ao meu amado marido, Vitor, pelo seu amor e confiança, pela compreensão e principalmente, por aceitar formar comigo uma família. Por entender os momentos que tive que ficar longe, por me ajudar a enfrentar as mudanças, por saber quando falar e quando calar. Pelo companheirismo profissional e as boas discussões. Por ser o melhor marido.

Ao meu querido “Pito” filho, João Vitor, que chegou assim tão de repente, mas me mostrou a verdadeira alegria da vida, por mesmo tão pequenino entender os momentos de ausência, por não se surpreender com as mudanças e por alegrar a todos os ambientes por onde passa. A mamãe te ama!

Devo essa conquista a vocês!

Agradecimento especial

Agradeço a minha querida amiga e orientadora Profa. Dra. Patrícia M.B.G. Maia Campos, a “Paty”, por não se contentar em ser apenas orientadora, mas também pela amizade. Por acreditar e confiar em mim, pelo incentivo em todos os momentos e por mostrar o amor à vida e a ciência!

Agradecimentos

Aos meus queridos irmãos Mateus e Michel pelo exemplo de dedicação e coragem, pelo carinho, paciência, companheirismo, motivação e amor. Por mesmo de longe se fazerem presentes e por embarcarem comigo em todas as loucuras da minha vida.

Aos meus queridos avós, Judith e Américo (*in memorian*), pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida e por serem o exemplo de que avós são pais duas vezes.

À querida amiga Mariana, técnica do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, pela organização do laboratório sem a qual este trabalho não seria possível, pela amizade e carinho, pela compreensão e paciência, pela risada gostosa, por tornar o ambiente do laboratório um ambiente mais agradável, pela adorável convivência e pelos momentos de descontração.

À Profa. Dra. Lorena, exemplo de dedicação à pesquisa, pela amizade e por todos os ensinamentos durante a minha iniciação científica.

À minha querida amiga Camila Ferezin pela amizade incondicional, por me entender apenas pelo olhar, pelo incentivo, carinho, companheirismo e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

À minha querida amiga Dayana Gouvea pelo carinho e parceria, pelo sorriso gostoso, por me mostrar que a vida é bonita e pra ser vivida.

Aos queridos amigos da primeira turma do noturno da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, a saudosa 01, por tornarem o meu caminho acadêmico muito mais agradável e por fazerem parte da minha história. Dizem que quem tem amigos tem tudo, e eu tenho!

A todos os amigos do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos pela amizade e profissionalismo, pelas ideias e discussões, por todas as conversas e boas risadas.

Aos amigos de todas as etapas da minha vida que de alguma maneira contribuíram nesta caminhada.

À Dra. Frédérique Morizot do CE.R.I.E.S. pela oportunidade de estágio, pelos ensinamentos e pelas discussões.

A toda a equipe do CE.R.I.E.S. por compartilharem comigo tão grandioso conhecimento e pela confiança na utilização dos equipamentos. Principalmente a Aurélie e Randa pelo acolhimento, carinho e amizade, e por fazerem meu estágio um período de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Norberto Lopes pela concessão do HPLC e pelas discussões.

Aos todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que tanto contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo ótimo atendimento, paciência e imprescindível assistência durante todos esses anos.

A CAPES pelo apoio financeiro, bolsa e apoios concedidos.

“O ato mais corajoso ainda é pensar pela sua própria cabeça. Em voz alta.”

Gabrielle “Coco” Chanel

Trabalho realizado no Laboratório de tecnologia de Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil e no Centro de Pesquisa e Investigações Epidérmicas da Chanel (CE.R.I.E.S.), Paris (França).

RESUMO

GIANETI, M. D. **Estabilidade e eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo filtros solares, vitaminas lipossolúveis e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas.** 2013.

217f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A associação de substâncias ativas no desenvolvimento de produtos multifuncionais eficazes para a manutenção e restauração da integridade da pele têm sido imprescindível na área cosmética. Desta maneira, destaca-se a associação de filtros solares com substâncias antioxidantes, tais como as vitaminas lipossolúveis e os extratos vegetais, com propriedades de filtros solares biológicos, os quais podem fornecer benefícios únicos à pele, aumentando a proteção contra a radiação UV e melhorando suas condições e aspectos em geral. Ainda, no desenvolvimento de formulações cosméticas é fundamental a seleção rigorosa e o balanço adequado de matérias-primas para a obtenção de produtos seguros, eficazes e estáveis durante todo seu tempo de prateleira. Assim, o objetivo do presente projeto é a avaliação da estabilidade física e química e da eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo filtros solares, vitaminas lipossolúveis e extratos de *Ginkgo biloba* e de algas marinhas vermelhas. Para tal, foram desenvolvidas 11 formulações fotoprotetoras as quais foram acrescidas ou não dos extratos de *Ginkgo biloba* ou de algas marinhas vermelhas e/ou de uma associação de vitaminas lipossolúveis. Após a realização de testes preliminares de estabilidade, as formulações F11, F11X e F11N (á base de poliacrilamida, C13-14 isoparafina e lauret-7) não apresentaram sinais de instabilidade e, portanto, foram submetidas à avaliação da estabilidade física (reologia). As formulações F11X e F11N foram consideradas mais estáveis, uma vez que não apresentaram grandes variações nos parâmetros analisados durante o estudo reológico (viscosidade aparente mínima, índice de fluxo, índice de consistência e área de histerese) e foram então utilizadas nos estudos posteriores. No estudo de estabilidade química as formulações contendo as diferentes substâncias ativas apresentaram diferentes prazos de validades, sendo que para a formulação que continha a associação de extratos e vitaminas (F11XVGA), o prazo de validade foi considerado maior quando comparado com as formulações que continham estas substâncias isoladas. Na avaliação da compatibilidade cutânea nenhum sinal clínico ou sensação de desconforto foi observado. No estudo de quantificação do limiar de percepção a uma corrente elétrica a formulação contendo associação de vitaminas e extratos vegetais de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas proporcionou um aumento a sensibilidade das fibras A β devido a um aumento da hidratação, o que é essencial para manter as condições de percepção da pele. Na avaliação do efeito protetor contra as variações do clima a formulação F1XVGA apresentou efeito significativo benéfico na sensação de hidratação da pele e uma tendência em melhorar a sensibilidade das fibras nervosas C e Ad. Após uma única aplicação formulação estudada aumentou o conteúdo aquoso do estrato córneo, mostrando, portanto, efeito hidratante na pele, e ainda protegeu a função barreira da pele. No estudo de eficácia clínica a formulação multifuncional proposta proporcionou uma melhora na função barreira da pele e uma hidratação que atinge até as camadas mais profundas da epiderme, levando a uma melhora na aparência da pele pela diminuição de rugas e da aspereza cutânea, podendo ser proposta para prevenir e melhorar as condições da pele foto envelhecida.

Palavras-chave: Eficácia, análise de imagens, estabilidade, cosméticos, envelhecimento cutâneo, proteção da pele.

ABSTRACT

GIANETI, M. D. **Stability and clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing UV filters, liposoluble vitamins and *Ginkgo biloba* and red alga extracts.** 2013. 217f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The association of active substances in the development of multifunctional cosmetic products, to be effective for the maintenance and restoration of skin integrity, have been essential in cosmetic area. Thus, a combination of sunscreen with antioxidant substances, such as liposoluble vitamins derivatives and vegetable extracts may provide unique benefits to the skin, increasing their protection against UV radiation and improving their conditions and appearance. Further, in the development of cosmetic formulations it is essential to assure the selection and balance of raw materials desirable for obtaining safe, efface and stable cosmetic formulations. The objective of this study is to evaluate the physical and chemical stability and clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing sunscreens, liposoluble vitamins and *Ginkgo biloba* and red sea algae extracts For this, formulations it were developed 11 sunscreens which were added or not with vegetables extracts of *Ginkgo biloba* or from red sea algae and / or a combination of liposoluble vitamins derivatives. After conducting preliminary stability tests, formulations F11, F11X and F11N (based on polyacrylamide, C13-14 isoparaffin and laureth-7) showed no signs of instability and therefore were evaluated for physical stability (rheology). The formulations F11X and F11N were considered more stable, since they do not show variations in the parameters examined during the rheology study (viscosity, flow index, and consistency index, and tixotrophy) and were then used in further studies. In the chemical stability study formulations containing different active substances showed different shelf lives, and the formulation containing the combination of active substances (F11XVGA), the shelf life was considered higher when compared with formulations containing these substances alone. In the assessment of skin compatibility no clinical signs or discomfort was observed. In the current perception threshold study the formulation containing the combination of vitamins and vegetable extracts increased sensitivity of the A β fibers due to increased hydration, which is essential for maintaining conditions of skin perception. In the evaluations of the protective effect against the environments variations the formulation F1XVGA was effective on the beneficial feeling of hydration of the skin and a tendency to improve the sensitivity of nerve fibers C and A δ . After a single application, the studied formulation increased the water content of the stratum corneum, showing therefore moisturizing effect on the skin, and also protected the skin barrier function. In clinical efficacy study the multifunctional proposed formulation provided an improvement in skin barrier function and hydrations until the deeper layers of the epidermis, leading to an improvement in skin appearance by reducing wrinkles and skin roughness, which can be suggest preventing and improving skin conditions mainly related with photo aging.

Keywords: Efficacy, image analysis, stability, cosmetics, skin aging, skin protection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas e estruturas da pele	06
Figura 2. Sonda para determinação da hidratação cutânea (Cornemometer®).	21
Figura 3. Sonda para determinação da TEWL (Tewameter®).	22
Figura 4. Sonda para determinação do sebo cutâneo (Sebumeter®).	24
Figura 5. Sonda para determinação das propriedades mecânicas da pele por vibração (Reviscomer®).	25
Figura 6. Sonda para determinação das propriedades mecânicas da pele por sucção (Cutometer®).	26
Figura 7. Curva de deformação da pele obtida pelo equipamento Cutometer® SEM 575	26
Figura 8. Imagem digitalizada da pele obtida por uma câmera de vídeo - <i>Visioscan</i> ® VC 98	29
Figura 9. Cálculo do parâmetro Sesm (media da largura das rugas)	29
Figura 10. Cálculo do parâmetro R_t , distância entre o valor mais alto (pico) e o mais baixo (vale).	29
Figura 11. Descrição espacial da cor segundo o espaço de cor $L^*a^*b^*$.	32
Figura 12. Sistema digital de imagens fotográficas para a avaliação da pele facial e imagem real e de luz de LED obtida com o equipamento (VisioFace Qick®).	33
Figura 13. Reogramas das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura ambiente, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.	67
Figura 14. Reogramas das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 37°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.	68
Figura 15. Reogramas das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 45°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.	69
Figura 16. Reogramas das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura ambiente, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.	70

- Figura 17.** Reogramas das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 37°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo. **71**
- Figura 18.** Reogramas das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 45°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo. **72**
- Figura 19.** Reogramas das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura ambiente, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo. **73**
- Figura 20.** Reogramas das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 37°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo. **74**
- Figura 21.** Reogramas das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 45°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo. **75**
- Figura 22.** Valores de viscosidade aparente mínima das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **77**
- Figura 23.** Valores de viscosidade aparente mínima das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **78**
- Figura 24.** Valores de viscosidade aparente mínima das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **79**
- Figura 25.** Valores de índice de fluxo das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **81**
- Figura 26.** Valores de índice de fluxo das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **82**
- Figura 27.** Valores de índice de fluxo das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **83**

- Figura 28.** Valores de índice de consistência das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **85**
- Figura 29.** Valores de índice de consistência das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **86**
- Figura 30.** Valores de índice de consistência das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **87**
- Figura 31.** Valores de área de histerese obtidos para as formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **89**
- Figura 32.** Valores de área de histerese obtidos para as formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **90**
- Figura 33.** Valores de área de histerese obtidos para as formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C). **91**
- Figura 34.** Cromatograma da formulação F11X contendo apenas os filtros solares benzofenona-3 (Bz-3 – 24,69 min), octocrileno (Oct – 27,11 min) e metoxicinamato de etilexila (Met – 27,79 min), sem a adição dos extratos e vitaminas objeto de estudo, analisada a 325 nm nas condições cromatográficas estabelecidas. **92**
- Figura 35.** Cromatograma da formulação F11XV, analisada à 235nm, contendo as vitaminas C (19,75 min) e E (36,87 min), nas condições cromatográficas estabelecidas. **92**
- Figura 36.** Cromatograma da formulação F11XV, analisada à 325 nm, contendo a vitamina A (45,76 min), nas condições cromatográficas estabelecidas. **93**
- Figura 37.** Cromatograma da formulação F11XG, analisada à 370 nm, contendo o marcador químico do extrato de *Ginkgo biloba*, quercetina (18,06 min), nas condições cromatográficas estabelecidas. **93**
- Figura 38.** Cromatograma da formulação F11XA, analisada à 334 nm, contendo o extrato de algas marinhas vermelhas padronizado com seu marcador químico *Phorphyra-334* (4,92 min), nas condições cromatográficas estabelecidas. **94**
- Figura 39.** Curva analítica da vitamina A ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). **94**
- Figura 40.** Curva analítica da vitamina C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). **95**

Figura 41. Curva analítica da vitamina E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).	95
Figura 42. Curva analítica da quercetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).	95
Figura 43. Curva analítica do extrato de <i>Phorphyra-334</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).	96
Figura 44. Log da concentração remanescente de vitamina A nas formulações F11XV, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.	103
Figura 45. Log da concentração remanescente de vitamina C nas formulações F11XV, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.	104
Figura 46. Log da concentração remanescente de vitamina E nas formulações F11XV, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.	105
Figura 47. Log da concentração remanescente de quercetina nas formulações F11XG, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas ambiente, 37 e 45°C.	106
Figura 48. Log da concentração remanescente de <i>Phorphyra-334</i> nas formulações F11XA e F11XVGA armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.	107
Figura 49. Valores de avaliação sensorial das formulações em estudo em relação aos parâmetros: sensação ao toque (A), espalhabilidade (B), sensação da pele imediatamente após a aplicação (C), sensação da pele após 5 minutos da aplicação (D) e sensação de hidratação da pele (E).	113
Figura 50. Conteúdo de sebo (A), conteúdo aquoso do estrato córneo (B), perda transepidérmica de água (TEWL) (C), CPT 5Hz (D), CPT 250Hz (E) e CPT 2000Hz (F) antes (valores basais) e depois de 2 horas da aplicação da formulação F11XGVA e da região controle, na face das voluntárias (Teste de Friedeman).	114
Figura 51. Média dos valores de CPT 5 Hz (A), 250Hz (B) e 2000Hz (C) obtidos na face das voluntárias com e sem a aplicação da formulação objeto de estudo, nos tempos T1, T2, T3 e T4.	115
Figura 52. Média dos valores de temperatura da pele, (A), Perda transepidérmica de água (B) e conteúdo aquoso do estrato córneo (C) obtidos na face das voluntárias com e sem a aplicação da formulação objeto de estudo, nos tempos T1, T2, T3 e T4.	115
Figura 53. Média dos valores do julgamento do conforto térmico (A), da sensação térmica global (B), da sensação térmica da face (C), da hidratação da pele (D) e de sensações desagradáveis (E), obtidos na escala analógica pelas voluntárias, com e sem a aplicação da formulação objeto de estudo nos tempos T1, T2, T3 e T4.	116
Figura 54. Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	118

Figura 55. Perda transepidérmica de água do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	120
Figura 56. Suavidade da pele (Sesm) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	121
Figura 57. Aspereza da pele (Ser) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	122
Figura 58. Número e largura de rugas da pele (Sew) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	123
Figura 59. Rugosidade da pele (Rt) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	124
Figura 60. Relação visco-elasticidade/ elasticidade (Uv/UE) da pele do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	126
Figura 61. Elasticidade biológica da pele (Ur/Uf) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	127
Figura 62. Anisotropia da pele (RRTMMax/RRTMMin) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	129
Figura 63. Espessura da derme do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	130
Figura 64. Valores obtidos no estudo de eficácia em curto prazo das formulações em estudo em relação aos parâmetros: conteúdo aquoso do estrato córneo (A), perda transepidérmica de água (B), suavidade da pele (C) e número e largura das rugas (D), avaliados nos antebraços das voluntárias.	132
Figura 65. Valores de: conteúdo aquoso do estrato córneo (A), perda transepidérmica de água (B), aspereza (C), número e largura das rugas (D), relação viscoelasticidade/elasticidade (E) e anisotropia da pele (F) antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo nos antebraços das voluntárias.	134
Figura 66. Valores de: luminosidade da pele (A), % de manchas faciais (B), % de rugas faciais (C) e ecogenicidade da derme (D) da pele antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo na face das voluntárias.	137
Figura 67. Imagens representativas dos parâmetros obtidos com o equipamento Visioface Quick: manchas visíveis (A), rugas (B), poros (C) e manchas visíveis apenas com a luz UV (D).	138
Figura 68. Figura demonstrativa obtida no ultrassom de 20mHz (Dermascan) da face de duas voluntárias, destacando-se a área de baixa ecogenicidade característica de fotoenvelhecimento.	139

- Figura 69.** Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância das diferentes camadas da pele: (A) Estrato córneo, (B) Camada granulosa, (C) Camada espinhosa, (D) Camada basal e junção dermo epidérmica, e fibras dérmicas (E). **140**
- Figura 70.** Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância da camada espinhosa apresentando queratinócitos irregulares e com áreas de pigmentação desigual característicos de uma pele envelhecida (A) comparado com uma imagem de pele jovem com queratinócitos regulares e sem área de pigmentação (B). **141**
- Figura 71.** Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância da camada córnea apresentando rugosidade no formato romboidal característicos da pele jovem (A) e linear característico da pele envelhecida (B). **141**
- Figura 72.** Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância da junção dermo epidérmica apresentando uma distribuição mais regular na pele jovem (A) comparada com a pele envelhecida (B). **142**
- Figura 73.** Valores de: espessura do estrato córneo (A), espessura da camada espinhosa (B), espessura da camada granulosa (C), número de células da camada granulosa (D) e espessura da camada basal (E) antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo na face das voluntárias. *: estatisticamente diferente dos valores basais. **142**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis fornecidas pelo equipamento <i>Cutometer® SEM 575</i> .	27
Tabela 2. Principais parâmetros topográficos da superfície cutânea, obtidos através do método SELS	30
Tabela 3. Formulações estudadas.	47
Tabela 4. Formulações estudadas.	48
Tabela 5. Concentração de substâncias ativas presentes nas formulações objeto de estudo.	48
Tabela 6. Critérios de avaliação de teste de contacto propostos pelo ICDRG	55
Tabela 7. Valores de pH obtidos para as formulações estudadas.	65
Tabela 8. Valores de viscosidade aparente mínima (cP) obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.	76
Tabela 9. Valores de índice de fluxo obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.	80
Tabela 10. Valores de índice de consistência obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.	84
Tabela 11. Valores de área de histerese (dina/cm ²) obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.	88
Tabela 12. Precisão e exatidão intra-ensaio das substâncias ativas.	96
Tabela 13. Precisão e exatidão inter-ensaio da vitamina A.	97
Tabela 14. Precisão e exatidão inter-ensaio da vitamina C.	98
Tabela 15. Precisão e exatidão inter-ensaio da vitamina E.	99

Tabela 16. Precisão e exatidão inter-ensaio da quercetina.	100
Tabela 17. Precisão e exatidão inter-ensaio do <i>Phorphyra-334</i> .	101
Tabela 18 - Concentrações remanescentes de vitamina A presentes nas formulações, armazenadas à temperatura ambiente, a 37 e a 45°C.	102
Tabela 19. Concentração remanescente de vitamina C.	103
Tabela 20. Concentração remanescente de vitamina E.	104
Tabela 21. Concentração remanescente de quercetina.	105
Tabela 22. Concentração remanescente de <i>Phorphyra-334</i> .	106
Tabela 23. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XG.	108
Tabela 24. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XA.	108
Tabela 25. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XV.	109
Tabela 26. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XVG.	110
Tabela 27. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XVGA.	111
Tabela 28. Prazos de validade das formulações em estudo.	112
Tabela 29. Ângulo tipológico individual do antebraço das voluntárias selecionadas para o estudo.	117
Tabela 30. Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	118
Tabela 31. Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço – Análise de Variância, n=6.	119
Tabela 32. Perda transepidérmica de água do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	119

Tabela 33. Perda transepidermica de água do antebraço – Análise de Variância, n=6.	120
Tabela 34. Suavidade da pele (Sesm) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	121
Tabela 35. Aspereza da pele (Ser) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	122
Tabela 36. Número e largura das rugas (Sew) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	123
Tabela 37. Rugosidade da pele (Rt) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	124
Tabela 38. Suavidade da pele (Sesm) do antebraço – Análise de Variância, n=6.	125
Tabela 39. Aspereza da pele (Ser) do antebraço – Análise de Variância, n=6.	125
Tabela 40. Número e largura das rugas (Sew) do antebraço – Análise de Variância, n=6.	125
Tabela 41. Rugosidade da pele (Rt) do antebraço – Análise de Variância, n=6.	125
Tabela 42. Relação visco-elasticidade/elasticidade (Uv/Ue) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	126
Tabela 43. Elasticidade biológica da pele (Ur/Uf) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	127
Tabela 44. Relação visco-elasticidade/elasticidade (Uv/Ue) da pele do antebraço – Análise de Variância, n=6.	128
Tabela 45. Elasticidade biológica da pele (Ur/Uf) da pele do antebraço – Análise de Variância, n=6.	128
Tabela 46. Anisotropia da pele (RRTMMax/RRTMMin) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	128
Tabela 47. Anisotropia da pele (RRTMMax/RRTMMin) do antebraço – Análise de Variância, n=6.	129
Tabela 48. Espessura da derme do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.	130
Tabela 49. Espessura da derme do antebraço – Análise de Variância, n=6.	131
Tabela 50. Análise de Variância dos dados de conteúdo aquoso do estrato córneo após única aplicação, n=15.	132
Tabela 51. Análise de Variância dos dados de perda transepidermica de água após única aplicação, n=15.	133

Tabela 52. Análise de Variância dos dados de suavidade de pele (Sesm) após única aplicação, n=15.	133
Tabela 53. Análise de Variância dos dados de número e largura das rugas (Sew) após única aplicação, n=15.	133
Tabela 54. Análise de Variância dos dados de conteúdo aquoso do estrato córneo no estudo em longo prazo, n=15.	135
Tabela 55. Análise de Variância dos dados de perda transepidérmica de água no estudo em longo prazo, n=15.	135
Tabela 56. Análise de Variância dos dados de aspereza (Ser) no estudo em longo prazo, n=15.	135
Tabela 57. Análise de Variância dos dados de número e largura das rugas (Sew) no estudo em longo prazo, n=15.	135
Tabela 58. Análise de Variância dos dados da relação de viscoelasticidade/elasticidade (U_v/U_e) conteúdo aquoso do estrato córneo no estudo em longo prazo, n=15.	135
Tabela 59. Análise de Variância dos dados da anisotropia da pele (RRTMmáx./RRTMmín.) no estudo em longo prazo, n=15.	136
Tabela 60. Análise de Variância dos dados de luminosidade (L^*) no estudo em longo prazo, n=15.	136
Tabela 61. Análise de Variância dos dados de porcentagem de manchas faciais no estudo em longo prazo, n=15.	136
Tabela 62. Análise de Variância dos dados de porcentagem de rugas faciais no estudo em longo prazo, n=15.	137
Tabela 63. Análise de Variância dos dados de ecogenicidade no estudo em longo prazo, n=15.	137
Tabela 64. Análise de Variância dos dados de espessura do estrato córneo no estudo em longo prazo, n=15.	143
Tabela 65. Análise de Variância dos dados de espessura da camada espinhosa no estudo em longo prazo, n=15.	143
Tabela 66. Análise de Variância dos dados de espessura da camada granulosa no estudo em longo prazo, n=15.	143
Tabela 67. Análise de Variância dos dados de espessura da camada basal no estudo em longo prazo, n=15.	143

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Biologia da Pele.....	5
2.2. Formulações Multifuncionais.....	8
Fotoprotetores.....	8
Vitaminas.....	10
Ginkgo biloba.....	11
Extrato de algas marinhas vermelhas.....	14
2.3. Estabilidade de formulações cosméticas.....	15
Estabilidade Física – reologia.....	16
Estabilidade química – CLAE.....	18
2.4. Eficácia clínica de formulações cosméticas.....	20
Técnicas de biofísica e análise de imagem da pele.....	20
Conteúdo aquoso do estrato córneo.....	20
Perda transepidérmica de água (TEWL).....	22
Teor lipídico da pele.....	23
Propriedades mecânicas da pele.....	24
Microrrelevo cutâneo.....	27
Cor da pele.....	30
Sistema digital de imagens fotográficas para a avaliação da pele facial.....	32
Ultrassom de 20mHz.....	33
Microscopia confocal a laser	35
Limiar de percepção a uma corrente elétrica.....	37

3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivos geral.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. MATERIAIS	43
4.1.1. Matérias-primas e solventes.....	43
4.1.2 Soluções padrão.....	44
4.1.3 Equipamentos e acessórios.....	45
4.2 MÉTODOS.....	45
4.2.1 Desenvolvimento das formulações.....	45
4.3 TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE.....	49
4.3.1 Centrifugação.....	49
4.3.2 Avaliação visual.....	49
4.3.3 Determinação do pH.....	49
4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICA.....	49
4.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA.....	49
4.5.1 Estudo de estabilidade química das formulações frente ao stress térmico.....	50
4.5.1.1 Preparação das amostras das formulações.....	50
4.5.1.2 Precisão e exatidão.....	50
Cálculos de precisão.....	50
Cálculos de exatidão.....	51
4.5.1.3 Condições cromatográficas.....	51
4.5.1.4 Curvas analíticas.....	51
4.5.1.5 Determinação do prazo de validade.....	52
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	54
5.1 TESTE DE COMPATIBILIDADE CUTÂNEA.....	54
5.2 AVALIAÇÃO SENSORIAL.....	55
5.3 QUANTIFICAÇÃO DO LIMIAR DE PERCEPÇÃO A UMA CORRENTE ELÉTRICA.....	55
5.3.1 Determinação do conteúdo de sebo.....	56

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA PELE FRENTE A VARIAÇÃO DO CLIMA.....	56
5.5 ESTUDO PRELIMINAR DE AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES.....	57
5.5.1 Triagem das voluntárias.....	57
5.5.2 Instrumentação.....	58
5.5.2.1 Avaliação do ângulo tipológico individual.....	58
5.5.2.2 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo.....	58
5.5.2.3 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL).....	58
5.5.2.4 Determinação do micro – relevo cutâneo.....	58
5.5.2.5 Determinação das propriedades visco - elásticas da pele.....	59
5.5.2.6 Determinação da anisotropia da pele.....	59
5.5.2.7 Avaliação da espessura e ecogenicidade da derme por ultrassom.....	59
5.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA.....	60
5.6.1 Triagem das voluntárias.....	60
5.6.2 Avaliação da coloração da pele.....	61
5.6.3 Avaliação da homogeneidade facial.....	61
5.6.4 Microscopia confocal a laser.....	61
6. RESULTADOS	64
6.1 TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE.....	64
6.1.1 Centrifugação.....	64
6.1.2 Avaliação visual.....	64
6.1.3 Determinação do pH.....	65
6.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA.....	65
6.3 ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA.....	92
6.3.1 Procedimento de extração.....	92
6.3.2 Curvas analíticas.....	94
6.3.3 Precisão e exatidão.....	96
6.3.4 Determinação das porcentagens remanescentes de vitaminas e extratos presentes nas formulações em estudo.....	101
6.3.4.1 Determinação da concentração de vitamina A.....	102

6.3.4.2 Determinação da concentração de vitamina C.....	103
6.3.4.3 Determinação da concentração de vitamina E.....	104
6.3.4.4 Determinação da concentração de quercetina.....	105
6.3.4.5 Determinação da concentração de <i>Phorphyra-334</i>	106
6.3.5 Determinação do prazo de validade.....	107
6.4 TESTE DE COMPATIBILIDADE CUTÂNEA.....	112
6.5 AVALIAÇÃO SENSORIAL.....	112
6.6 QUANTIFICAÇÃO DO LIMIAR DE PERCEPÇÃO A UMA CORRENTE ELÉTRICA.....	114
6.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA PELE FRENTE A VARIAÇÃO DO CLIMA.....	115
6.8 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA EFICÁCIA.....	117
6.8.1 Avaliação do ângulo tipológico individual.....	117
6.8.2 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo.....	117
6.8.3 Determinação da perda transepidérmica de água.....	119
6.8.4 Determinação do micro- relevo cutâneo.....	121
6.8.5 Determinação das propriedades visco – elásticas da pele.....	125
6.8.6 Determinação da anisotropia da pele.....	128
6.8.7 Avaliação da espessura da derme por ultrassom.....	129
6.9 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA.....	131
7. DISCUSSÃO.....	145
8. CONCLUSÕES.....	161
9. REFERÊNCIAS.....	164
APÊNDICE(S).....	181
ANEXO(S).....	184

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os produtos dermocosméticos são de fundamental importância para a manutenção da saúde da pele, principalmente com o aumento da expectativa de vida com qualidade. Esses produtos vêm sendo formulados utilizando-se a associação de várias substâncias ativas para diferentes finalidades, principalmente em termos de hidratação, proteção e melhora das condições e aparência da pele, levando ao surgimento de produtos multifuncionais. Neste contexto, destaca-se a associação filtros solares com substâncias antioxidantes, tais como as vitaminas, as quais podem oferecer benefícios únicos na proteção da pele, atuando sinergicamente contra os radicais livres produzidos pela exposição à radiação ultravioleta (UV), o que leva à prevenção dos danos biológicos e até mesmo a uma possível reversão do envelhecimento cutâneo. Além disto, alguns extratos vegetais também têm tido grande interesse para a utilização em produtos com finalidade antienvhecimento, pois, de acordo com algumas investigações científicas, estes têm apresentado efeitos antioxidantes devido à presença de bioflavonóides (GIANETI, MAIA CAMPOS, 2012; GIANETI, MERCURIO, MAIA CAMPOS, 2012; KIM et al., 2002; AQUINO et al., 2002, CHIU et al., 2005; F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; BONINA et al., 2000).

Dentre estes extratos destaca-se o extrato de *Ginkgo biloba* que tem sido proposto em produtos cosméticos com finalidade antienvhecimento (DRAELOS, 2001) devido a sua rica composição em flavonóides (rutina, quercetina, canferol), biflavonas e lactonas terpênicas, relacionada com suas propriedades antioxidante e antiinflamatória. Estudos mostraram que o extrato de *Ginkgo biloba* protegeu a pele de camundongos sem pelo contra os danos na função barreira da pele e contra a formação de eritema induzidos pela radiação ultravioleta (D'AL BELO et al., 2009). Consequentemente, um grande número de produtos para os cuidados da pele tem incluído este extrato em sua composição (CHIU; KIMBALL, 2003; DRAELOS, 2001).

A associação do extrato de *Ginkgo biloba* com derivados das vitaminas A, C e E em formulações cosméticas também apresentou atividade antioxidante *in vitro* e proteção contra os danos induzidos pela radiação ultravioleta, tais como proteção contra a formação de células de queimadura solar (MAIA CAMPOS et al., 2006).

Além de extratos vegetais com propriedades antioxidantes, extratos vegetais ricos em aminoácidos, semelhantes à micosporina, têm sido propostos pela comunidade científica por apresentarem potencial proteção contra a radiação UV (CONDE, CHURIO, PREVITALI, 2000, SHICK et al., 2002, CARDOZO et al., 2007, 2008), os quais, quando utilizados em associação com filtros solares sintéticos, podem proporcionar maior proteção da pele, ou seja aumento do fator de proteção solar (FPS). Além disso, estudos realizados em humanos mostraram que, após quatro semanas de uso de uma formulação contendo extratos ricos em aminoácidos semelhantes à micosporina, ocorreram melhora na firmeza e suavidade da pele e, ainda, diminuição de rugas (DANIEL et al., 2004). Dentre esses extratos destaca-se o extrato obtido das algas marinhas vermelhas

(*Porphyra umbilicalis*) que tem sido proposto por apresentar alta concentração de substâncias ativas responsáveis pelo efeito protetor contra a radiação solar (CARDOZO et al., 2007, 2008).

As vitaminas A, C e E, e seus derivados, vêm sendo muito utilizadas em produtos cosméticos, isoladamente ou em associação com outras substâncias ativas como os extratos vegetais, devido às suas propriedades umectantes, antioxidantes e antienvhecimento (MAIA CAMPOS et al., 2012 A; GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS et al., 2006; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2007; CIMINO et al., 2007).

A forma éster das vitaminas A, C e E (palmitato de retinila, tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila, respectivamente) têm sido muito utilizadas em função de sua maior estabilidade (MAIA CAMPOS et al., 2012 A; MAIA CAMPOS et al., 2012 B; DAL' BELO, MAIA CAMPOS, 2001, GUARATINI, GIANETI, MAIA CAMPOS, 2006; OCHIAI et al., 2006; GIANETI et al., 2006). Assim sendo, estudos vêm sendo realizados para demonstrar a eficácia dos derivados lipossolúveis destas vitaminas.

Além disso, considerando que vários antioxidantes endógenos sofrem redução brusca após a exposição à radiação UV (SHINDO, WITT, PACKER, 1993), a associação de antioxidantes e filtros solares vem sendo muito empregada devido aos efeitos sinérgicos na proteção da pele contra os radicais livres produzidos pela exposição à radiação ultravioleta, o que leva à prevenção dos danos e até mesmo a uma possível reversão do foto-envelhecimento (DAMIANI et al., 2006; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

Desta maneira, sugerimos a associação de derivados lipossolúveis das vitaminas A, C e E, e ainda extratos vegetais como o *Ginkgo biloba* e o de algas marinhas vermelhas no desenvolvimento de uma formulação multifuncional com a proposta de prevenir os danos causados à pele pela exposição solar e melhorar a aparência da pele envelhecida.

No entanto, no desenvolvimento de uma formulação multifuncional estável, segura e eficaz, é obrigatória a escolha adequada das matérias-primas que farão parte da sua composição, ou seja, estas devem ser compatíveis entre si e com as substâncias ativas selecionadas para atender a indicação de uso do produto. Assim na Pesquisa & Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo a associação de filtro solares, vitaminas lipossolúveis e extratos vegetais descritos acima, vários estudos devem ser realizados visando a obtenção de produtos estáveis, seguros e eficazes, considerando que na literatura ainda não há nenhum trabalho que comprove a eficácia de tal associação, nas reais condições de uso, existe apenas comprovação de sua eficácia *in vitro* e em animais de experimentação (MAIA CAMPOS et al., 2006).

Assim, é de extrema importância um estudo criterioso de formulações fotoprotetoras que contenham associações de vitaminas A, C, E e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas, no que se refere à estabilidade física e química, para garantir que as características do produto sejam mantidas durante todo seu tempo de prateleira, bem como a eficácia de tais formulações.

Para a comprovação da eficácia proposta para a formulação objeto de estudo é imprescindível a avaliação clínica dos efeitos benéficos da associação das substâncias ativas, por métodos inovadores e não invasivos na pele humana, para a obtenção de produtos cosméticos que contemplem todos os requisitos de qualidade exigidos, com comprovação científica, garantindo a eficácia dos mesmos para o consumidor.

Além disso, a comprovação científica dos efeitos propostos para as formulações objeto de estudo, por meio de métodos não invasivos, os quais têm sido recomendados por agências regulatórias (ANVISA, FDA e COLIPA) para o registro de tais produtos, contribui para aumentar ainda mais a credibilidade e a utilização dos produtos cosméticos.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com o aumento da expectativa de vida, observa-se um aumento cada vez maior por parte da população na utilização de produtos capazes de retardar e até mesmo reverter os sinais de envelhecimento da pele. Neste contexto, muitos estudos tem sido desenvolvidos visando a obtenção de formulações cosméticas estáveis, seguras e eficazes e que proporcionem vários benefícios aos usuários, seguindo assim o conceito de produtos multifuncionais.

Neste sentido, destaca-se o uso de formulações fotoprotetoras com ativos antioxidantes e capazes de melhorar as condições da pele.

Assim, este trabalho tratará do desenvolvimento de formulações dermocosméticas multifuncionais bem como da avaliação da estabilidade, compatibilidade cutânea e eficácia das mesmas por técnicas inovadoras de biofísica e imagem da pele.

Para tal, inicialmente foi elaborada uma revisão bibliográfica abordando os temas relevantes para o presente estudo, tais como, biologia da pele, formulações multifuncionais e as vitaminas e extratos vegetais objeto de estudo, as técnicas mais utilizadas para a avaliação da estabilidade física e química de formulações cosméticas, bem como as técnicas de biofísica e imagem da pele empregadas na avaliação da eficácia clínica.

2.1. Biologia da Pele

A pele é um órgão complexo e heterogêneo que reveste o corpo humano, com uma área de superfície no indivíduo adulto de aproximadamente $1,7\text{m}^2$, o que corresponde a aproximadamente 5,5% da massa corporal, sendo assim considerado o maior órgão do corpo humano. Além disto, a espessura, a cor e a presença de pêlos, glândulas e unhas variam nas suas diferentes regiões, mas apesar dessas variações todos os tipos de pele possuem um padrão estrutural básico (LONGO et al., 2011; GILCHREST, KRUTMANN, 2006).

As principais funções que a pele exerce em nosso corpo são proteger os órgãos internos contra a luz ultravioleta e agressões mecânicas, químicas e térmicas; evitar a desidratação excessiva e a invasão de microorganismos; conferir sensibilidade por possuir uma variedade de receptores para tato, temperatura, dor e pressão; tem ação termorreguladora devido à presença de pelos e tecido adiposo subcutâneo; bem como funções metabólicas, uma vez que o tecido subcutâneo constitui uma importante reserva de energia e, ainda, é responsável pela síntese de vitamina D na epiderme, suplementando a oriunda das fontes alimentares (BECELLI, CURBAN, 1975; HALLER, 1989).

Do ponto de vista da Cosmetologia, a pele está diretamente ligada à qualidade de vida do ser humano, suas relações interpessoais e, também, sua auto-estima (SCOTTI, VELASCO, 2003).

A pele é formada por um epitélio pavimentoso estratificado denominado epiderme, que é sustentada e nutrida por uma camada espessa de tecido conjuntivo denso e fibroelástico denominado derme (Figura 1). A derme é ricamente vascularizada e possui numeroso receptores sensoriais, sendo

ligada aos tecidos subjacentes por uma camada de tecido conjuntivo frouxo denominada hipoderme ou camada subcutânea, que contém quantidade variável de tecido adiposo (LEONARDI, 2004).

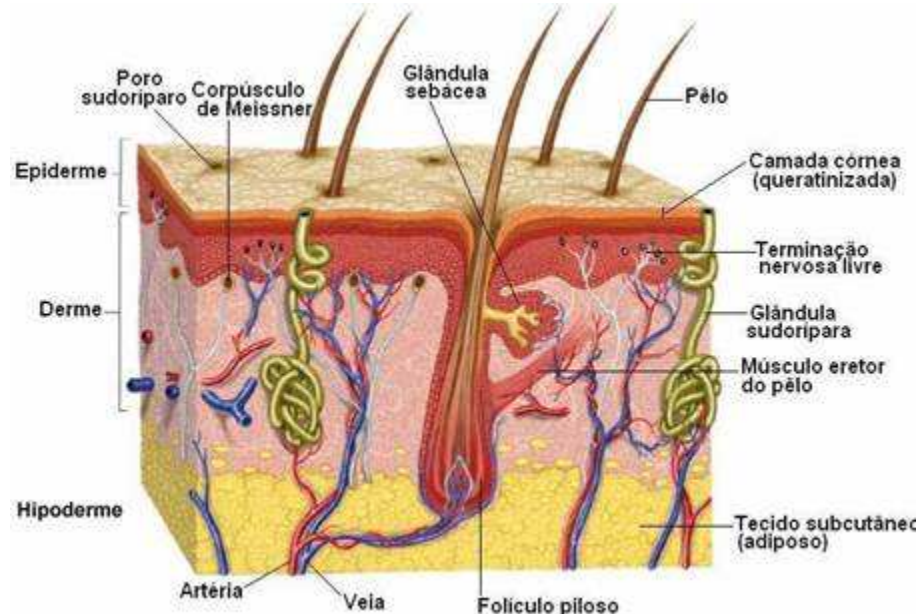


Figura 1. Camadas e estruturas da pele (<http://naturavendas.wordpress.com> - 03/03/2010).

Os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas e unhas são estruturas epiteliais denominadas anexos cutâneos em virtude de sua origem embrionária a partir de brotamentos que, originando-se na epiderme, penetram na derme e hipoderme (WHEATER et al., 1982).

A epiderme está estruturada por um grupo de células vivas, denominada epiderme viável e por um conjunto de células mortas que formam o estrato córneo. A epiderme viável é constituída de células metabolicamente ativas que formam outras três camadas distintas: granulosa, espinhosa e basal. A camada basal é mais interna e consiste de uma fileira única de células cúbicas que possuem uma alta atividade reprodutiva, tendo por função garantir a renovação da epiderme, uma vez que as células recém-produzidas migram em direção às camadas superiores, num processo em que ocorrem modificações graduais na sua forma e composição química. A camada espinhosa é formada por células volumosas e poliédricas que se encontram em fase de crescimento e no início da síntese de queratina.

A camada granulosa, por sua vez, é constituída por células em seu último estágio de diferenciação, que ao serem totalmente queratinizadas, tornam-se anucleadas e perdem sua capacidade metabólica, passando a formar o estrato córneo, onde sofrem um processo de esfoliação. O estrato córneo é então formado por camadas extremamente coesas de corpos de células epidérmicas, os corneócitos, que desempenham o papel fundamental de proteger os tecidos vivos da perda de água, mantendo-os adequadamente hidratados. Na periferia dos corneócitos existem os desmossomas, estruturas que garantem a coesão entre as células adjacentes e entre a membrana celular e a superfície central dessas células, os lipídeos intercelulares interagem de forma covalente com a proteína presente.

Dentre esses lipídeos estão as ceramidas que participam na retenção de água por se ligarem as proteínas formando uma estrutura lamelar (GILCHREST, KRUTMANN, 2006).

Dessa forma, as principais funções desempenhadas pelo estrato córneo são de funcionar como uma barreira que garante a homeostase cutânea, manter a eudermia, a hidratação e a flexibilidade da pele (LONGO et al., 2011; TSAI, MAIBACH, 2000).

Existe na epiderme, portanto, um processo denominado renovação epidérmica que consiste no deslocamento permanente e repetido de células que da camada basal atingem a superfície da epiderme, de onde se desprendem já mortas. Esse processo se completa aproximadamente em duas semanas em pessoas jovens e em torno de 37 dias em pessoas com idade superior a 50 anos, resultando em uma eliminação diária de cerca de seis a quatorze gramas de células mortas (EDWARDS, MARKS, 1995).

A derme é uma camada vascularizada de tecido conjuntivo denso e fibroelástico, possuindo arteríolas e vênulas por onde circula o sangue. Há também a presença de vasos linfáticos na derme que são responsáveis pelo transporte de substâncias formadas durante os processos metabólicos realizados na pele (HOLBOOK, WOLF, 1993). O processo de envelhecimento cutâneo é acompanhado por uma diminuição da circulação na derme, devido ao estreitamento dos vasos sanguíneos e linfáticos, o que prejudica o fornecimento de substâncias importantes para a sobrevivência das células bem como a drenagem linfática do tecido.

O envelhecimento cutâneo é resultado da influência de uma série de fatores e pode ser dividido em intrínseco (cronológico) e extrínseco (envelhecimento precoce, fotoenvelhecimento). O envelhecimento intrínseco é resultante do declínio “geneticamente programado” das funções vitais que garantem o bom funcionamento do organismo. Enquanto que o denominado envelhecimento extrínseco é aquele causado por vários fatores externos ao organismo principalmente pela radiação UV (GILCHREST, KRUTMANN, 2006).

Existem claras diferenças entre a pele crono e fotoenvelhecida, principalmente no que diz respeito as características moleculares, deve-se notar que várias alterações observadas nos dois tipos de envelhecimento são consistentes. Alterações típicas do cronoenvelhecimento, como diminuição da expectativa de vida celular, resposta diminuída aos fatores de crescimento, interrupção na síntese da matriz extracelular e elevação da atividade proteolítica também são observadas no fotoenvelhecimento, contudo neste caso essas alterações são mais pronunciadas. O fotoenvelhecimento apresenta-se como uma intensificação do envelhecimento cronológico, além do aparecimento de características diferentes do envelhecimento comum. Assim, esse é o motivo pelo qual áreas expostas e não expostas à radiação UV costumam apresentar aspectos de envelhecimento muito mais pronunciados que as áreas não expostas (GILCHREST, KRUTMANN, 2006). Durante o processo de envelhecimento, além das alterações visuais, observa-se também uma série de alterações histológicas e funcionais da pele.

Os sinais clínicos do envelhecimento incluem a perda da firmeza e elasticidade cutânea, bem como o aprofundamento das linhas de expressão, observando-se também a diminuição da capacidade

de retenção de água e, conseqüentemente, um aumento na rugosidade e na perda da maciez, homogeneidade e viço da pele (GILCHREST, KRUTMANN, 2006).

Ainda, com o envelhecimento ocorrem mudanças na acuidade tátil como, por exemplo, a diminuição da densidade de certos receptores (LONGO et al., 2011; STEVENS, CHOO, 1999; STEVENS, PATTERSON, 1995), uma possível deterioração do sistema nervoso central e/ou uma degeneração da micro circulação (STEVENS, PATTERSON, 1995), no entanto outros estudos propõem que a diminuição da acuidade tátil se da epiderme deve a danos ao estrato córneo (VERRILLO et al., 1998; WOODWARD, 1993). Assim, as características físicas da pele em si provavelmente são importantes determinantes de modificações sensoriais devido a idade (VERRILLO et al., 1998).

Neste contexto, a Ciência Cosmética tem evoluído em direção à busca de novos métodos de estudo e novas matérias primas ou associação destas, com o objetivo de desenvolver formulações capazes de melhorar e/ou reverter os sinais de envelhecimento, com comprovada segurança de uso, estabilidade e eficácia, proporcionando maior bem estar aos consumidores.

2.2. Formulações multifuncionais

O desenvolvimento de formulações cosméticas multifuncionais tem sido cada vez mais crescente na indústria cosmética atual. A busca por produtos que podem conferir diferentes benefícios ao usuário levou a indústria cosmética a desenvolver formulações que agregassem diferentes benefícios destacando-se a proteção solar, atividade antioxidante, proteção da barreira da pele, hidratação e diminuição das rugas.

Seguindo o conceito de prevenção, aliado ao conhecimento dos males que a radiação solar pode causar, os cosméticos passam a conter agentes auxiliares na proteção solar, fatores antirradicais livres, hidratantes e regeneradores celulares. Os filtros solares passam a ter muita importância e torna-se praticamente inconcebível a idéia de um hidratante sem proteção solar.

Neste contexto, vem se destacando a associação de protetores solares com extratos vegetais com propriedades antioxidantes e protetoras, bem como o uso de vitaminas e seus derivados, com o uso consagrado na cosmetologia, propostas por melhorar a aparência da pele envelhecida.

Fotoprotetores

Atualmente, tem-se o conhecimento de que embora a exposição à radiação ultravioleta promova alguns efeitos benéficos como: aquecimento corpóreo; síntese de vitamina D, que promove a retenção de cálcio nos ossos; e em doses moderadas estimula a síntese de melanina, a exposição à radiação solar também provoca inúmeros efeitos danosos como: queimaduras, fotoenvelhecimento e cânceres de pele. Portanto, a aplicação de protetores solares se torna necessária como um meio de proteger a pele contra estes efeitos nocivos.

A proteção efetiva contra os raios UV pode ser encontrada em formulações para aplicação tópica, conhecidas como filtros solares. O primeiro relato de utilização de um filtro solar no mundo foi em 1928, nos EUA. Mas a disseminação do uso de fotoprotetores deu-se principalmente nas últimas duas décadas, após a classificação destes como droga pelo FDA (*Food and Drug Administration*), e pelo aumento da conscientização da população dos riscos da exposição solar, através de campanhas educativas e mídia (SHAATH, 1990). Desde então, o uso de protetores solares, a descoberta e produção de substâncias capazes de proteger o homem dos perigos da radiação solar, tem sido de interesse principal na área cosmética / dermatológica. Hoje, uma ampla faixa de filtros, absorvedores de luz ultravioleta estão disponíveis para formulações de protetores solares (TREFFEL, GABARD, 1996) e a ênfase é a combinação de filtros UVA e UVB para maior eficácia e segurança dos mesmos.

Os ativos utilizados em protetores solares são geralmente classificados como filtros inorgânicos (físicos) e orgânicos (químicos). Os filtros inorgânicos compreendem partículas que atuam por difusão, refletindo a passagem de radiação (barreira física). Os orgânicos atuam absorvendo a radiação UV incidente, e então as dissipam com uma energia de comprimento de onda maior e desta maneira, protegem a pele dos danos potenciais da radiação UV. A eficácia dos protetores solares contra as radiações UVA e UVB têm permitido o desenvolvimento de preparações solares contendo combinações diferenciadas de filtros orgânicos (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2007).

A eficácia de uma formulação fotoprotetora é comumente determinada *in vivo* por meio da maior ou menor proteção proporcionada contra a queimadura solar (eritema). A técnica mais amplamente utilizada envolve a determinação do fator de proteção solar. O FPS é definido como a razão entre a quantidade de energia necessária para produzir um grau de eritema mínimo na pele protegida com o filtro solar, sobre a quantidade de energia que leva ao mesmo grau de eritema na pele não protegida (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2007).

Filtros UV não somente protegem contra a queimadura solar, mas também, à longo prazo, contra danos crônicos a pele, incluindo danos ao DNA celular, supressão imune fotoinduzida e em extensão, câncer de pele. Diminuem também a imunossupressão causada pela radiação UVB (NOHYNEK, 2001).

Sendo assim, um protetor solar eficiente deve prevenir não apenas uma possível queimadura, mas também reduzir as lesões induzidas pela radiação UV, protegendo a pele humana contra efeitos adversos, agudos e crônicos da radiação solar (OZER *et al.*, 2001; NOHYNEK, SCHAEFER, 2001; MAIER *et al.*, 2001).

Uma proteção completa em todo o intervalo de radiação UVA e UVB é raramente possível com um único filtro UV. Portanto, os protetores solares mais modernos utilizam uma combinação de vários filtros orgânicos e inorgânicos para cobrir todo o espectro UV (NOHYNEK, SCHAEFER, 2001).

Ainda, os filtros UV devem ser não irritantes, não sensibilizantes e não fototóxicos (FLOR *et al.*, 2007). Além de absorver a radiação ultravioleta incidente, um produto para proteção solar deve

ainda ser estável na pele humana e ao calor, e ser fotoestável sob a luz solar para permitir proteção durante várias horas, evitando o contato com produtos de degradação (MARTI-MESTRES *et al.*, 2007; NOHYNEK, SCHAEFER, 2001; JOHNCOCK, 2000).

Assim, deve-se levar em consideração a estabilidade da associação de filtros orgânicos utilizados não somente para aumentar o “tempo de prateleira” das formulações, mas também para a segurança de uso destes produtos, uma vez que os produtos de degradação dos filtros entram em contato direto com a pele e podem tornar-se foto oxidante, ou promover fototoxicidade ou dermatite de contato foto alérgica. A interação de produtos de fotodegradação com os demais excipientes ou com componentes da pele pode levar à formação de moléculas até então desconhecidas, com fortes propriedades toxicológicas (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006).

É também sabido que os radicais livres estão envolvidos em mecanismos de danos cutâneos, como o envelhecimento precoce, desordens inflamatórias e cânceres de pele. Desta maneira, a adição de ativos antioxidantes em formulações fotoprotetoras também contribui para a proteção solar, pois a pele naturalmente já os utiliza para sua auto proteção contra os efeitos danosos da radiação solar. Na última década, os antioxidantes têm sido propostos como ingredientes funcionais para prevenir e modular danos oxidativos na pele (DAL'BELO, GASPAR, MAIA CAMPOS, 2009).

Vitaminas

As vitaminas são utilizadas em diversos setores como em produtos cosméticos, dermatológicos, alimentares, farmacêuticos e até veterinários e, por este motivo, vêm sendo amplamente estudadas (GIANETI *et al.*, 2012B; MAIA CAMPOS *et al.*, 2012 A, B; LUQUE-GARCIA, CASTRO, 2001). Devido à sua polaridade, as vitaminas são divididas em dois grandes grupos: as hidrofílicas (B e C) e as lipofílicas (A, D, E e K) (GIANETI *et al.*, 2012B; NEVES, 2009). Estas últimas são compostos sintetizados a partir da condensação de isoprenóides (NELSON, COX, 2000).

Na área cosmética, os profissionais tem demonstrado interesse especial pelas vitaminas A, C e E devido a estas vitaminas terem apresentado alguns resultados satisfatórios na melhora da aparência da pele envelhecida (MAIA CAMPOS *et al.*, 2012 A, B GIMENO, *et al.*, 2004; SILVA, MAIA CAMPOS, 2000). Além disto, a forma éster das vitaminas A, C e E (palmitato de retinila, tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila, respectivamente) vem sendo mais utilizadas para a aplicação tópica em função de sua maior estabilidade em formulações cosméticas (MAIA CAMPOS *et al.*, 2012 A, B VALQUIST, 1999; IDSON, 1993; DAL' BEL, MAIA CAMPOS, 2001).

O palmitato de retinila (éster da vitamina A), quando aplicado topicamente, pode estimular a divisão celular mantendo a pele em bom estado, melhorando a renovação celular e a função barreira da pele (GIANETI *et al.*, 2012B; MAIA CAMPOS *et al.*, 1999, 2005)

O tetraisoplmitato de ascorbila (éster da vitamina C) é um precursor da vitamina C na pele e reduz os danos celulares desencadeados pela radiação UVB e também é eficaz na supressão da

pigmentação induzida por esta radiação (MAIA CAMPOS et al., 2012 A, B; OCHIAI, et al., 2006). Gaspar e colaboradores (2008) mostraram um significativo efeito de um derivado de vitamina C na melhoria da hidratação da pele, que é muito importante para o metabolismo normal e também para evitar alterações na pele e, conseqüentemente o envelhecimento precoce.

O acetato de tocoferila (éster da vitamina E) é um antirradical livre que pode reduzir danos causados ao DNA e morte de queratinócitos. Gaspar e Maia Campos (2003) observaram que a aplicação tópica de uma formulação fotoprotetora contendo 5% de acetato de α -tocoferila reduziu o número de células de queimadura solar após a radiação UVB em camundongos sem pelo, além disto, este derivado da vitamina E pode aumentar a hidratação do estrato córneo e reduzir rugas (GEHRING et al., 1998).

Levando em consideração o conceito da multifuncionalidade de cosméticos, essas vitaminas também podem agir sinergicamente quando utilizados em associação. Alguns estudos sugerem a importância de combinar topicamente vitaminas C e E para proteger a pele contra a radiação UV e para maximizar a fotoproteção (LIN et al, 2003; DARR et al., 1996). Seité (2005) mostrou também que a aplicação tópica de uma combinação de vitamina A e C é capaz de reverter, pelo menos em parte, alterações cutâneas induzidas pelo envelhecimento cronológico e o fotonvelhecimento.

Darr e colaboradores (1996) estudaram a combinação de dois antioxidantes, as vitaminas C e E, com um filtro solar comercial UV (oxibenzona) e encontraram uma proteção maior contra os danos fototóxicos. Estes resultados enfatizam a importância da combinação destas vitaminas com filtros solares comuns, para maximizar a fotoproteção.

Segundo Hanson e Clegg (2003), a adição de antioxidantes como o acetato de tocoferol e ascorbil fosfato de sódio aumentaram a fotoproteção, por se converterem em vitaminas E e C, respectivamente, na pele. Ainda, Lin e colaboradores (2003), reportaram a combinação de L-ácido ascórbico e α -tocoferol para efeitos fotoprotetores e demonstraram que esta combinação é superior a cada antioxidante quando utilizado isoladamente. A combinação promove uma proteção quatro vezes maior contra a produção de eritema produzido pela radiação solar simulada, quando comparada ao veículo e inibe a geração ou acúmulo de dímeros de timina na pele.

No desenvolvimento de produtos cosméticos que contêm vitaminas, além da eficácia proposta, deve-se selecionar criteriosamente os veículos, pois estes devem contribuir ou não interferir na estabilidade da formulação e dos seus componentes (LEONARD, MAIA CAMPOS, 2001; GALLARETE et al., 1999). Desta maneira, a associação de substâncias com funções semelhantes ou complementares pode resultar não só em uma maior eficácia ou efeito sinérgico, mas também em uma melhor estabilidade das formulações (GIANETI et al., 2006).

Ginkgo biloba

O uso de produtos vegetais para fins de embelezamento tem referências de 5000 anos atrás (VALFRÉ, 1990). As primeiras farmacopéias e formulários de produtos naturais surgiram no Egito,

destacando-se entre elas o *Papyrus Ebers* que continha centenas de formulas e remédios populares à base de plantas para cuidados de saúde, higiene e beleza (DE POLO, 1998). Mais recentemente, o uso de extratos e óleos vegetais em produtos cosméticos industrializados teve início a partir do desenvolvimento de técnicas de extração que permitem o uso de tais derivados sem que haja comprometimento da qualidade do produto final (ABURJAI, NATSHEH, 2003).

Assim, as matérias-primas de origem vegetal foram inicialmente utilizadas, principalmente, em xampus, tinturas e pomadas, e posteriormente sua aplicação estendeu-se também para cremes, loções, géis e produtos para banho em geral (GIANETI, MERCURIO, MAIA CAMPOS, 2012; ABURJAI, NATSHEH, 2003; CORAZZA et al., 1995), sendo que o objetivo principal era atrair a atenção do consumidor, utilizando um apelo de marketing natural. Além disto, em função do alto custo, tais matérias-primas eram utilizadas em baixas concentrações e não havia uma preocupação específica com a comprovação de seus efeitos.

Embora tenha ocorrido um grande empenho científico e tecnológico para aumentar a credibilidade na utilização de produtos de origem vegetal, existem ainda muitas questões a serem esclarecidas referentes à comprovação científica dos efeitos que tem sido atribuídos aos diferentes extratos. Ainda assim, a obtenção de matérias-primas de origem vegetal e a aplicação destas em produtos cosméticos tem tido um grande crescimento em função do sucesso destas formulações junto ao mercado consumidor que busca cada vez mais produtos que aproveitem os benefícios que a natureza proporciona.

Dentre estes extratos vem se destacando para o uso em produtos cosméticos o extrato de *Ginkgo biloba* (Linné) que é uma árvore de origem chinesa sendo a única planta vivente da família Ginkgoaceae. Alguns fósseis da espécie possuem idade aproximada de 250 milhões de anos, sendo, por esse motivo, referida por Darwin como um fóssil vivo (MAJOR, 1967). Curiosamente, possui forte resistência a uma grande quantidade de pragas e fungos, o que contribui para sua longevidade (GOLD et al., 2002). A *Ginkgo biloba* foi descrita pela primeira vez pelo médico alemão Engelbert Kaelpter por volta de 1690, mas apenas despertou o interesse de pesquisadores após a Segunda Guerra Mundial, quando perceberam que a planta tinha sobrevivido à radiação em Hiroshima, brotando no solo da cidade devastada (DIAMOND et al., 2000).

Atualmente o extrato de *Ginkgo biloba* tem sido usado tradicionalmente como fitoterápico para a prevenção e tratamento de arteriosclerose, problemas de memória, demência, doença de Alzheimer, vertigens e cefaléia (MAHADY, 2001), devido a sua rica composição em flavonóides (24%), proantocianidinas (7%), terpenóides (6%), ácidos carboxílicos (13%) e catequinas (2%).

Os efeitos propostos estão relacionados à alta atividade antioxidante de seus flavonóides e de suas lactonas diterpênicas (ginkgolídeos), sendo que estas últimas atuam mais em regiões hidrofóbicas, como por exemplo em membranas celulares (SCHOLTYSSSEK et al., 1997).

Seus componentes antioxidantes atuam bloqueando a ação de radicais livres como o ânion superóxido, o radical hidroxil (GARDÉS-ALBERT et al., 1993), o radical peróxido (MAITRA et al.,

1995) e o radical óxido nítrico (MARCOCCI et al., 1994). Atuam também indiretamente via diminuição da formação de radicais livres ao inibir a atividade ou expressão de enzimas que catalisam a geração desses radicais ou então pelo aumento da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a heme-oxigenase, a superóxido dismutase mitocondrial e a glutatona peroxidase (GOHIL et al., 2000; RIMBACH et al., 2001; CHEN et al., 2001).

Recentemente o extrato de *Ginkgo biloba* tem sido proposto em diferentes produtos cosméticos, principalmente em produtos antienvhecimento (CHIU, KIMBALL, 2003; DRAELOS, 2001, DAL'BELO et al., 2009) e solares, devido a sua rica composição em flavonóides. No entanto, os efeitos protetores contra a radiação UV deste extrato tem sido demonstrados apenas após sua ingestão oral (PIETSCHMANN, KUKLINSKI, OTTERSTEIN, 1992; OZUR et al., 2002), por estudos *in vitro* (KIM, 2001; PINCEMAIL et al., 1989) ou com animais de laboratório (DAL'BELO et al., 2009).

Alguns estudos destacam que a ação antioxidante do *Ginkgo biloba* pode ser empregada na tentativa de proteger a pele contra danos causados pela radiação UV. O primeiro desses trabalhos foi realizado por Pietschmann e colaboradores (1992) que avaliaram os efeitos da ingestão oral do extrato de *Ginkgo biloba* em comparação com beta caroteno e alfa tocoferol, após indução do estresse oxidativo por radiação UV em voluntários humanos. Verificou-se que após 14 dias de ingestão do extrato, houve redução do estresse oxidativo após a segunda exposição UV, e ainda, o *Ginkgo biloba* foi mais efetivo que os outros antioxidantes estudados.

Outros estudos também demonstraram que a ingestão do extrato de *Ginkgo biloba* proporcionou a proteção da enzima superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica (ARICIOGLU et al., 2001).

Um dos componentes do extrato de *Ginkgo biloba* é a genisteína, uma isoflavona (4,5,7-triidróxi-isoflavona) que tem sido relatada por possuir efeitos antioxidantes e anticarcinogênicos na pele (WEI et al., 1993; WEI et al., 1998; MILLER,HALE,PENTLAND, 1994). Esta isoflavona também vem sendo proposta como antiinflamatório tópico, uma vez que foi capaz de reduzir o edema inflamatório induzido pela radiação UV (WIDYARINI et al., 2001). Outros estudos também destacaram a atividade antiinflamatória do extrato de *Ginkgo biloba* devido a presença de ginkgetina e isoginkgetina (bioflavonas) que inibem a produção de prostaglandinas E2, mediada em parte pela redução da expressão da enzima ciclooxigenase (COX-2) (LIM et al., 2006; KWAK et al., 2002).

Outra possível aplicação do extrato de *Ginkgo biloba* em produtos para o uso tópico com finalidade anti envelhecimento seria devido ao fato de que este extrato estimula a síntese de colágeno. Kim e colaboradores (1997) demonstraram efeitos *in vitro* deste extrato e de seus flavonóides isolados (quercetina, canferol, sciadopitisina, ginkgetina e isoginkgetina) na proliferação de fibroblastos e na produção de colágeno e fibronectina.

Ainda, Dal'Belo e colaboradores (2009) mostraram o efeito protetor deste extrato na proteção contra a formação de eritema, a da função barreira e a formação de células de queimadura solar da pele, em camundongos sem pelo.

Desta maneira, levando-se em consideração todos os estudos apresentados e a rica composição química do extrato de *Ginkgo biloba*, podemos sugerir que este extrato pode ser proposto para ser utilizado em formulações cosméticas para os cuidados da pele.

Extrato de algas marinhas vermelhas

Para sobreviver a um ambiente desfavorável e competitivo, alguns organismos marinhos como as algas tem desenvolvidos estratégias de defesa que resultam na produção de metabólitos com alto nível de diversidade química e estrutural (PUGLISI et al., 2004).

Nas últimas quatro décadas uma série de compostos solúveis em água capazes de absorver a radiação UV foram identificados em um grande número de organismos marinhos e terrestres (SINHA, et al., 1998; BANDARANAYAKE, 1998). Estes compostos têm em comum uma unidade cíclica de aminociclohexanona ou aminociclohexanimina, suas diferentes variam essencialmente de acordo com os substituintes 2-OMe (micosporina) ou 2 OH-(não micosporina), e na função aminoácido (CARDOZO, et al., 2007; CONDE et al. 2000).

Desta maneira, vem se destacando os aminoácidos semelhantes à micosporinas (Mycosporine-like amino acids - MAA) que são considerados candidatos interessantes como ativos de proteção solar devido à sua excelente absorção de raios UV, juntamente com uma fotoestabilidade elevada (FERRONI et al., 2010).

O nome genérico micosporina é dado devido a semelhante absorção a metabólitos de fungos em 310 ou 320 nm, formado por um anel cyclohexenona conjugado com o substituinte no nitrogênio de um aminoácido ou amino álcool. Por outro lado, os metabólitos capazes de absorver a radiação UV presentes em organismos marinhos e, geralmente nomeados como aminoácidos semelhantes à micosporinas, consistem geralmente de um derivado de imino de micosporinas, contendo um cromóforo aminocyclohexenimina com absorção máxima entre 310 e 360 nm (CARDOZO, et al., 2007).

A indução da síntese de MAAs de fitoplânctons e algas como uma resposta à radiação UV levou ao estudo destas substâncias como agentes fotoprotetores UV (DUNLAP et al., 1986; BANASZAK et al., 1998; KARSTEN et al., 1998; WHITEHEAD, HEDGES, 2002) e ao longo das últimas duas décadas, as pesquisas envolvendo aminoácidos semelhantes à micosporinas aumentou devido a esse potencial fotoprotetor (BANDARANAYAKE, 1998; DUNLAP, SHICK, 1998; SINHA et al., 1998; XIONG et al., 1999) para ser aplicado principalmente em formulações dermocosméticas em associação ou não com outros filtros orgânicos.

Aminoácidos semelhantes à micosporinas são compostos pequenos, solúveis em água com importante função biológica. Estes compostos são normalmente caracterizados e quantificados baseados no tempo de retenção durante uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e pelas suas características de absorção UV (pico máximo de absorção ente 310 e 360nm) (WHITEHEAD, HEDGES, 2002; FERRONI et al., 2010).

Atualmente, os extratos de algas ricos em MAAs são comercializados por várias empresas como matérias-primas de produtos cosméticos para a proteção da pele contra a radiação UV, sendo considerada uma alternativa segura para proteção solar em relação aos filtros sintéticos, aumentando a segurança de produtos fotoprotetores (FERRONI et al., 2010).

Os experimentos de fotodegradação e fotossensibilização com vários MAAs demonstraram o papel de compostos estáveis e eficazes como protetores solares *in vitro* (WHITEHEAD, HEDGES, 2002; CARDOZO, et al., 2007).

Além da proteção UV, tem sido sugerido que os MAAs também podem ter funções osmóticas, principalmente nas comunidades de cianobactérias de ambientes hiper salinos (OREN, 1997), atividade antioxidante (DUNLAP, YAMAMOTO, 1995), e papel regulador na reprodução destes organismos (CARDOZO, et al., 2007; DEHORTER, BERNILLON, 1993; BANDARANAYAKE, DES ROCHER, 1999). Além disto, MAAs podem agir sobre a proliferação de células de fibroblastos de pele humana *in vitro* (OYAMADA et al., 2008)

Estudos realizados em humanos mostraram também a atuação destes ativos na melhora da aparência da pele uma vez que, após quatro semanas de uso de uma formulação contendo aminoácidos semelhantes à micosporinas, ocorreram melhora na firmeza e suavidade da pele e, ainda, diminuição de rugas (DANIEL et al., 2004).

Neste contexto, dentre os diversos organismos marinhos produtores de MAAs, destacam-se as algas marinhas vermelhas (*Porphyra umbilicalis*) que tem sido proposto por apresentar atividade protetora semelhante a filtros sintéticos. Este extrato contém as micosporinas *Porphyra-334* e *Shinorine*, na concentração total de 1,4% o que é consideravelmente superior a concentrações obtidas em outros organismos como cianobactérias, dinoflagelados, corais e muitos invertebrados marinhos (COCKELL, KNOWLAND, 1999; DANIEL et al., 2004; SHICK et al., 2002). Assim, este extrato tem potencial para ser utilizado em formulações cosméticas para melhorar a proteção da pele contra danos causados pela radiação UV e ainda, proteger e melhorar os sinais de fotoenvelhecimento.

2.3. Estabilidade de formulações cosméticas

Em função das exigências dos órgãos governamentais de saúde, é imprescindível que sejam estabelecidos protocolos, por parte dos grupos de pesquisa e indústrias, de testes específicos, com o objetivo de garantir e controlar a qualidade dos produtos cosméticos.

Desta maneira, para a área cosmética, quando um novo produto é desenvolvido, é exigido que se realize o controle de qualidade, a fim de garantir ao consumidor, além da estabilidade, a segurança e eficácia do produto, durante todo seu tempo de prateleira (ANVISA; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012).

O prazo de validade, no caso de medicamentos, é definido como o período máximo em que, após a sua preparação, e quando mantido em determinadas condições de armazenamento, este não apresenta uma degradação de suas substâncias ativas superior a 10 ou 15% (ANSEL et al., 2000). Os

produtos cosméticos, por sua vez, além da necessidade de manter a estabilidade química, necessitam manter outras características para a aceitação do produto. Assim, devem-se realizar também testes de estabilidade física, a fim de avaliar a aparência, textura, uniformidade, cor, odor entre outros.

A estabilidade física e química de formulações cosméticas, de maneira geral, podem ser determinadas após submetê-las a condições de estresse, com altas temperaturas, por exemplo (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; PRISTA et al., 1981; LACHMAN et al., 1986). Dentre os métodos utilizados nestes estudos destacam-se a reologia e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por fornecerem dados precisos em relação à natureza do sistema e à concentração das substâncias ativas, respectivamente.

Estabilidade física – reologia

Os produtos cosméticos devem apresentar estudos de estabilidade física para garantir que suas características iniciais como aparência, textura e viscosidade, sejam mantidas durante todo o prazo de validade. Neste contexto, a avaliação da estabilidade física vem sendo mais detalhadamente realizada, principalmente através do estudo do comportamento reológico, uma vez que a instabilidade nem sempre pode ser detectada por uma simples mudança na aparência (cor ou textura) (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; ANSEL et al., 2000; GUARATINI; GIANETI; MAIA CAMPOS, 2006; GIANTEI et al., 2006).

Além disto, o estudo reológico é de fundamental importância para a indústria cosmética uma vez que a adição de substâncias ativas em formulações cosméticas pode causar instabilidade a estas, tais como a diminuição da viscosidade e alteração das características reológicas, e ainda, a consistência e o espalhamento dos produtos devem ser reproduzidos de lote a lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto final (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; LEONARDI, 2004; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001).

O estudo do comportamento reológico visa obter informações sobre as propriedades de escoamento e deformação de materiais sob influência de forças externas, as quais podem influenciar na estabilidade, no processo de fabricação e na aceitação da formulação pelo consumidor (CALLEGOS; FRANCO, 1999; MARTIN et al., 1993).

A análise reológica consiste na aplicação de uma força rotacional (tensão de cisalhamento) progressivamente maior e depois progressivamente menor, num determinado período de tempo, para a obtenção de duas curvas (ascendente e descendente, respectivamente). Após a análise, obtêm-se um gráfico relacionando os valores de gradiente de cisalhamento ($s/1$) com os de tensão de cisalhamento (D/cm^3) chamado de reograma (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; BRUMMER, 2006; CALLEGOS; FRANCO, 1999).

Os materiais em geral, podem apresentar dois diferentes tipos de comportamento de acordo com as características de fluido: Newtonianos ou Não-Newtonianos. Os fluidos Newtonianos apresentam valores constantes de viscosidade, independente da força externa aplicada. Os fluidos Não-

Newtonianos apresentam diminuição ou aumento nos valores de viscosidade em relação à força externa aplicada, ou seja, com o aumento da tensão de cisalhamento (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; BRUMMER, 2006; MARTIN; BUSTAMANTE;CHUN. 1993).

Os fluidos Não-Newtonianos apresentam ainda outra classificação dependendo de seu comportamento após a aplicação de uma força, podendo ser pseudoplástico, plástico ou dilatante, em função da taxa de cisalhamento, e tixotrópico ou reopético, em função do tempo de cisalhamento (PRISTA et al., 1992; BRUMMER, 2006).

Se uma substância apresenta comportamento do fluxo dilatante, sua viscosidade de cisalhamento é aumentada com a aplicação da tensão de cisalhamento, com o tempo. Como resultado, a taxa de cisalhamento aumenta mais lentamente que a tensão de cisalhamento. Isto é devido às interações entre partículas pouco solvatadas, bem como a imobilidade do meio de dispersão (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; DAHMS, 1996; MARTIN; BUSTAMANTE;CHUN. 1993; BRUMMER, 2006).

Uma substância é pseudoplástica se o aumento na tensão de cisalhamento provoca um aumento desproporcional da taxa de cisalhamento. Com o aumento da força aplicada a viscosidade diminui (BRUMMER, 2006; CALLEGOS; FRANCO, 1999).

Para as formulações dermocosméticas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum. Esses materiais têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento e, portanto sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor. A viscosidade aparente pode ser obtida pela tangente em cada ponto da curva, obtida a partir de valores crescentes da tensão de cisalhamento, ou no ponto máximo de cisalhamento (viscosidade aparente mínima). Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; BRUMMER, 2006; GUARATINI, GIANETI; MAIA CAMPOS, 2006).

Além disto, o comportamento do fluxo também pode ser classificado em relação ao tempo de cisalhamento, neste caso como tixotrópico ou reopético. Na taxa de cisalhamento constante, a viscosidade de cisalhamento de um material tixotrópico diminui com o tempo. Isso ocorre porque durante o tempo de cisalhamento as forças de ligação entre moléculas ou partículas diminui. Após cessar a força, ou seja, o estado de repouso subsequente, as ligações são regeneradas devido à energia de interação, e a viscosidade original é então restaurada (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; BRUMMER, 2006; CALLEGOS; FRANCO, 1999).

Assim, alguns parâmetros podem ser determinados com o estudo reológico, dentre eles a viscosidade aparente mínima, índice de fluxo, índice de consistência e tixotropia.

O índice de fluxo nos mostra o quão pseudoplástica é a formulação, o índice de consistência nos mostra quão consistente/ viscosa é a formulação, e a tixotropia, obtida a partir da integração das curvas ascendente e descendente do reograma, nos mostra o comportamento da formulação estudada

após a aplicação de uma força, e a capacidade de retornar as características originais após cessar a força (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; BRUMMER, 2006; CALLEGOS; FRANCO, 1999).

Na análise de um reograma, obtido a partir da integração entre valores de gradiente pela tensão de cisalhamento, o aspecto de interesse primordial para projeções de estabilidade é a não alteração deste reograma em condições comparáveis de temperatura e tensão de cisalhamento (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; MARTIN et al., 1993).

Portanto, a avaliação do comportamento reológico assume cada vez mais importância no desenvolvimento e avaliação de estabilidade de formulações cosméticas, pois, permite compreender melhor a natureza físico-química do veículo na fase de desenvolvimento, controlar a qualidade de matérias primas e produtos acabados, e ainda, verificar o efeito da consistência do produto na liberação e penetração cutânea de substâncias ativas, permitindo também detectar possíveis instabilidades que possam ocorrer na formulação durante o período de estocagem, podendo assim contribuir na previsão do prazo de validade da mesma (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; GUARATINI; GIANETI; MAIA CAMPOS, 2006; MARTIN, BUSTAMANTE, CHUN, 1993).

Estabilidade química – CLAE

Além da estabilidade física, os produtos cosméticos devem apresentar ainda estudos de estabilidade química, principalmente os produtos multifuncionais que contém diferentes matérias-primas sujeitas à degradação.

A comprovação da estabilidade química é imprescindível para o desenvolvimento de um produto seguro e eficaz. Uma vez que as formulações têm sido elaboradas com matérias-primas e substâncias ativas passíveis de oxidação, como é o caso dos extratos vegetais e vitaminas objetos deste estudo, é necessário traçar um perfil de degradação destas substâncias ativas além de estabelecer um prazo de validade para as formulações, para assegurar que o teor de substâncias ativas presentes na formulação seja mantido durante todo o seu tempo de prateleira (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012 A; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; GUARATINI; GIANETI; MAIA CAMPOS; 2006; ALMEIDA; BAHIA, 2003).

Pode-se classificar os teste de estabilidade de acordo com sua duração, como estudos de curto e longo prazo. Os estudos de longo prazo, realizados em condições ambiente, são imprescindíveis para a obtenção de um prazo de validade real. Os estudos acelerados (de curto prazo), por sua vez, permitem prever um valor para o período de vida útil, que pode ser utilizado para o registro de um produto farmacêutico, sendo necessária a sua confirmação posterior mediante a apresentação do estudo à longo prazo (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012 A; ANSEL et al., 2000).

No caso de testes acelerados, o produto analisado é armazenado em condições de estresse, a fim de acelerar reações que poderiam acontecer com o tempo. Esse estresse pode ser gerado de

diversas maneiras para formulações cosméticas, como com altas temperaturas (estresse térmico), ou pela incidência de luz na formulação (radiação), ou ainda com choques vibracionais (estresse mecânico), sendo o mais utilizado o estresse térmico (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012 A; SARKA *et al.*, 2006; GUARATINI, GIANETI, MAIA CAMPOS, 2006).

Para prever o prazo de validade das formulações e a cinética química de degradação das substâncias ativas, os dados podem ser tratados matematicamente usando a equação Arrhenius, quando se considera a cinética química de degradação das substâncias ativas. Ou seja, com formulações que contem substâncias susceptíveis a alterações por vários processos químicos como hidrólise, oxido-redução, fotólise, racemização, etc. A determinação do prazo de validade por este método baseia-se no fato de que, em temperaturas elevadas, a velocidade de degradação aumenta em consequência da energia de ativação da reação ocorrente (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012 A; GUARATINI; GIANETI; MAIA CAMPOS, 2006; KIM *et al.*, 2000).

Nos estudos químicos, a escolha do método analítico é fator preponderante. Para isso, deve-se primeiramente definir o objetivo da análise e conhecer detalhadamente a matriz, bem como as complicações do analito, como, por exemplo, fotossensibilidade. O método utilizado deve permitir a determinação da quantidade remanescente sem sofrer interferências dos produtos de degradação e dos constituintes do veículo da formulação (RUPÉREZ et al., 2001).

Os métodos cromatográficos associados a metodologia analítica quantitativa são considerados valiosos para a separação e identificação das substâncias ativas e seus produtos de degradação. No desenvolvimento de cosméticos, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido o método de escolha por permitir, após um processo de extração eficiente, uma boa separação dos constituintes da formulação e das substâncias ativas, sem interferência de seus produtos de degradação (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS et al., 1993; SANTORO et al., 1993).

A cromatografia é definida como um processo de separação dos componentes de uma mistura, realizado através da distribuição destes entre as fases estacionária e móvel. Durante a eluição, os componentes da amostra são distribuídos entre estas fases, sendo cada um deles diferentemente retido na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais e separação (LOUGH; WAINER, 1996; SCOTT, 1994).

Para produzir resultados que se enquadrem às necessidades requeridas, qualquer método a ser utilizado deve passar por uma validação prévia. A validação é o processo que demonstra se um método analítico é aceitável para seu propósito intencional, garantindo assim a sua confiabilidade. Os resultados da validação são geralmente apresentados como repetibilidade e reprodutibilidade, com os respectivos desvios padrão (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012 A; GUARATINI, GIANETI, MAIA CAMPOS, 2006. ALMEIDA, BAHIA, 2003).

Desta maneira, utilizando-se de um método de extração preciso, onde a recuperação do analito seja satisfatória, e de uma metodologia validada que obedeça aos limites de detecção, precisão e

exatidão, as análises por CLAE são uma opção confiável para a determinação do prazo de validade de produtos dermocosméticos.

2.4. Eficácia clínica de formulações cosméticas

Técnicas de biofísica e análise de imagem da pele

Além de estudos de estabilidade, é de fundamental importância a avaliação da eficácia das formulações cosméticas, nas reais condições de uso, ou seja, na pele humana por métodos não invasivos, através de técnicas de biofísica e análise de imagem da pele (GIANETI, MERCURIO, MAIA CAMPOS, 2012; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009; REUTHER et al., 2007).

No contexto da Dermatologia e Cosmética, as técnicas de biofísica e análise de imagem permitem o estudo das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele através de medidas objetivas de determinadas variáveis, por métodos cientificamente comprovados e não-invasivos (RODRIGUES, 1995; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009).

Estas técnicas tem possibilitado o estudo das características da pele e a avaliação da eficácia de cosméticos (RODRIGUES, 1995; SERUP, 2001; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009). Neste contexto, vale salientar que a legislação referente aos produtos cosméticos e de higiene corporal, atualmente em vigor, exige aos responsáveis pelo desenvolvimento de produtos cosméticos, e quando estes forem lançados no mercado, que possuam provas dos efeitos propostos para os produtos (ANVISA, 2011).

A avaliação da eficácia de produtos cosméticos por tais métodos é mais exata e precisa quando comparada com a análise dos efeitos dos produtos pelos próprios consumidores ou por avaliação clínica meramente visual (GIANETI, MERCURIO, MAIA CAMPOS, 2012; SERUP, 2001; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009), os quais também não devem ser descartados, principalmente no que se refere ao sensorial dos produtos.

O emprego constante de metodologias não invasivas para a avaliação dos efeitos de formulações cosméticas tem proporcionado o desenvolvimento de inúmeros equipamentos para leitura dos diferentes parâmetros.

A seguir, serão apresentados os métodos biofísicos mais utilizados pela comunidade científica para avaliar a hidratação cutânea, a perda transepidermica de água, o conteúdo de sebo, as propriedades mecânicas, o relevo e a cor da pele, bem como métodos inovadores como microscopia confocal, ultrassom de baixa frequência e luz de LED UV para detecção de manchas visíveis e invisíveis, ao olho nu, da pele.

Conteúdo aquoso do estrato córneo

Uma das principais funções da pele, em que o estrato córneo (EC) assume um papel fundamental, é a proteção contra o meio externo – “função de barreira” (RODRIGUES, 1995). É esta

propriedade que permite evitar perdas de água e, assim, a manutenção do conteúdo hídrico dos tecidos vivos. Para que o EC possa desempenhar adequadamente esta função, o seu conteúdo em água deve manter-se acima dos 10%, ou seja, conteúdos hídricos inferiores elevam ao risco de lesão por agentes externos. A hidratação cutânea é afetada por fatores endógenos, pela perda de água transepidermica, pelo filme hidro-lipídico do EC e por fatores exógenos, como a umidade do ambiente.

O filme hidro-lipídico do EC é composto por água, constituintes higroscópicos designados por fatores de umectação naturais (NMF) (que têm a capacidade de fixar água) e por constituintes lipídicos (que exercem um efeito oclusivo). Encontram-se disponíveis diversos métodos que permitem a avaliação da hidratação cutânea (GIANETI, MERCURIO, MAIA CAMPOS, 2012; RODRIGUES, 1995; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009). Os métodos eletrométricos são os que apresentam maior sucesso, devido à sua fiabilidade e facilidade de operação. Dentro deste grupo, a avaliação da capacitância, através da sonda *Corneometer*[®] (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), constitui atualmente o método biofísico mais utilizado para aferir o grau de hidratação da superfície cutânea (Figura 2).

A medida da capacitância baseia-se na diferença entre a constante dielétrica da água (que é igual a 81) e a de outras substâncias (cujo valor de constante dielétrica é, na maioria dos casos, inferior a 7) (RODRIGUES, 1995; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009). A medida é realizada colocando-se uma sonda encostada na superfície da pele, onde se encontram dois circuitos paralelos (condensador), num plano paralelo à superfície cutânea (RODRIGUES, 1995; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009). Durante a medida, um campo elétrico penetra na pele e permite a determinação da diferença entre constantes dielétricas. A modificação da capacitância registrada pelo equipamento em contato com o EC é função do conteúdo de água deste último (GIANETI, MERCURIO, MAIA CAMPOS, 2012; DAL'BELO, GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006). Os valores de hidratação do estrato córneo por este equipamento são expressos em unidades arbitrárias (UA).

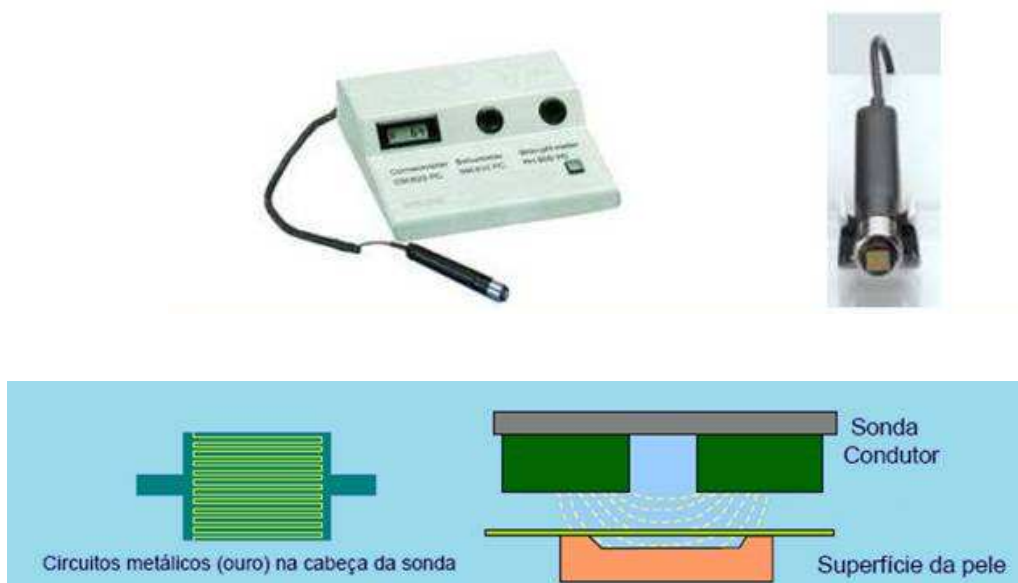


Figura 2. Sonda para determinação da hidratação cutânea (Cornemometer[®]).

Perda transepidérmica de água (TEWL)

O conteúdo hídrico das camadas profundas da epiderme é muito elevado comparativamente ao do EC, o que resulta num gradiente difusional que se estabelece entre os tecidos normalmente hidratados e o EC em contato com o meio ambiente (RODRIGUES, 1995; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009; GIOIA; CELLENO, 2002; NANGIA, 1998). O grau de perda de água pela epiderme é função das condições ambientais e da integridade da barreira cutânea. Assim, a medida da perda transepidérmica (TEWL) de água constitui um importante indicador das funções de barreira do EC.

A avaliação da TEWL pode ser realizada através da medida do fluxo de vapor à superfície da pele com, por exemplo, o aparelho *Tewameter*® (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha) (Figura 3) (GIOIA; CELLENO, 2002; NANGIA, 1998).

O princípio de medida deste equipamento baseia-se na lei de difusão de Fick, que define a massa de água transportada por unidade de superfície cutânea, num determinado período de tempo. Onde, dm/dt é o fluxo de difusão, A é a área, dp/dx é a alteração de concentração por distância e D é o coeficiente de difusão do vapor de água no ar (GIOIA; CELLENO, 2002; NANGIA, 1998).

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

Assim, o fluxo de vapor à superfície cutânea pode ser determinado através de uma sonda colocada à superfície da pele, que consiste num cilindro oco contendo dois pares de sensores de temperatura e umidade. O gradiente resultante é analisado por um microprocessador e os resultados são expressos em $g/m^2/h$ (PINNAGODA et al., 1990).

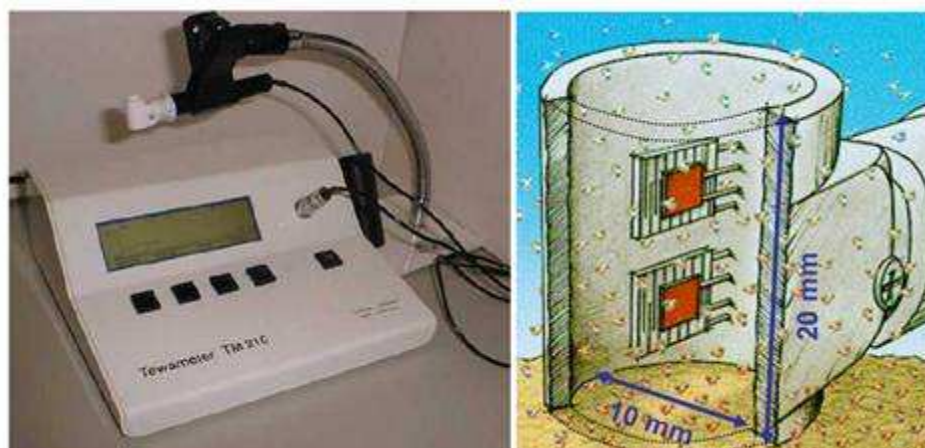


Figura 3. Sonda para determinação da TEWL (*Tewameter*®).

Os produtos dermocosméticos podem melhorar, manter ou prejudicar o estado da barreira cutânea, o que se traduz em valores de perda de água transepidérmica menores, iguais ou maiores, respectivamente (RODRIGUES, 1995; GONÇALVES, MAIA CAMPOS, 2009). Assim, a medida da

TEWL permite determinar os efeitos destes produtos sobre a barreira cutânea, quanto maior for o valor obtido, pior será a função barreira da pele (LODEN, 2003; CURDY et al. 2004).

Diversos estudos que ilustram a elevada aplicabilidade desta metodologia vem sendo realizados pela comunidade científica (RUDOLPH, KOWNATZKI, 2001; LÓDEN et al., 2001; LODEN, ANDERSSON, LINDBERG, 1999; BURACZEWSKA et al., 2007). Estes estudos comprovam a função protetora de alguns cosméticos e, ainda, a medida da perda transepidérmica de água constitui o método de escolha também nos ensaios de avaliação da irritação cutânea, provocada, geralmente por tensoativos (ARAMAKI et al., 2001; TUPKER et al., 1997) uma vez que a irritação da pele provoca uma interrupção da barreira cutânea que leva ao aumento da TEWL (DE PAEPE et al., 2000; LODEN, ANDERSSON, LINDBERG, 1999; BURACZEWSKA et al., 2007; KATSAROU et al., 2000; DE PAEPE, ROSEEUW, ROGIERS, 2002). Desta maneira, este é um parâmetro imprescindível para ser avaliado, após a aplicação de uma formulação cosmética, em um estudo de avaliação da eficácia.

Teor lipídico da pele

Como explicitado anteriormente, o filme hidrolipídico cutâneo é constituído por água e por lipídios, que resultam, na sua maioria, da produção de sebo pelas glândulas sebáceas (RODRIGUES, 1995). Na espécie humana, as glândulas sebáceas localizam-se, sobretudo na face, couro cabeludo e nas porções superiores do tórax e do dorso (RODRIGUES, 1995).

Os lipídios desempenham um papel fundamental na retenção de água do EC, influenciando na hidratação, na elasticidade, na plasticidade e nas funções de barreira da pele (RODRIGUES, 1995 B).

Com o objetivo de determinar quantitativamente os lipídios cutâneos foram desenvolvidos vários métodos, nos quais se incluem o de extração por solventes, o método gravimérico, o *Seb-U-Tape*®, entre outros (RODRIGUES, 1995 A). O método mais utilizado atualmente para análise do conteúdo de sebo da superfície cutânea utiliza o equipamento *Sebumeter*® (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha) e baseia-se no método do vidro opalescente, desenvolvido por Schaefer (Figura 4) (RODRIGUES, 1995 A).

O princípio deste método consiste no aumento da transparência de um vidro opaco por aplicação de uma substância oleosa. No *Sebumeter*® a placa de vidro foi substituída por uma fita de plástico opaca especialmente desenvolvida para tal efeito, a qual se torna progressivamente mais transparente à medida que absorve lipídios durante cerca de 30 segundos. A variação da transparência e, portanto, o doseamento lipídico, é avaliado por fotometria e o valor respectivo é expresso em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele analisada. Têm sido publicados diversos estudos que avaliam os efeitos de produtos aplicados sobre a pele no conteúdo de sebo cutâneo, utilizando este método, comprovando a boa aplicabilidade do mesmo (COMACCHI, HERCOGOVA, 2004; RUDOLPH, KOWNATZKI, 2004; CARABELLI et al., 1998).

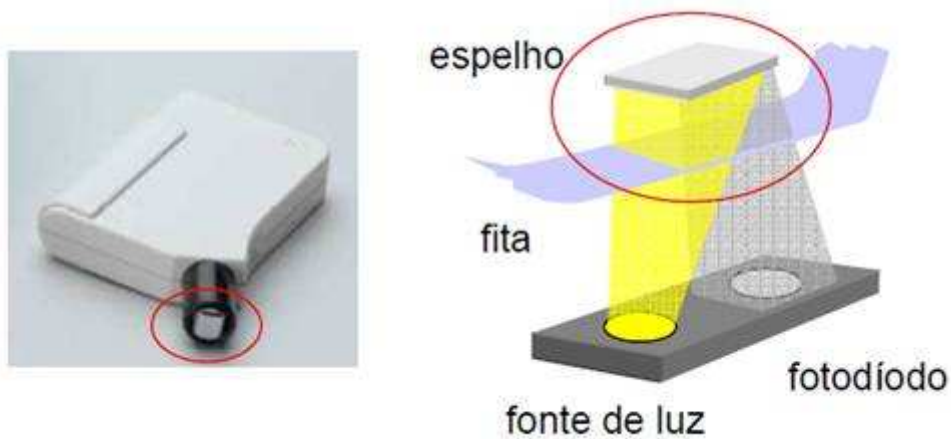


Figura 4. Sonda para determinação do sebo cutâneo (Sebumeter®).

Propriedades mecânicas da pele

As propriedades mecânicas da pele têm sido amplamente estudadas, principalmente quando relacionados à eficácia de produtos dermocosméticos (DOBREV, 2000, 2002). Devido a sua estrutura organizacional, a pele é visco-elástica, ou seja, possui propriedades plásticas e elásticas, as quais são alteradas com o envelhecimento cutâneo (MAIA CAMPOS, GONÇALVES, GASPAR, 2008).

Devido aos seus constituintes e à sua ultra-estrutura organizacional, a pele tende a não retornar ao seu estado original de maneira imediata, quando submetida a uma deformação temporária, por aplicação de forças externas. Esse fenômeno ocorre na pele jovem, tendendo a se acentuar na pele envelhecida (OBA et al., 2002).

São vários os fatores que provocam alterações na elasticidade cutânea, dentre eles o envelhecimento cronológico e o fotoenvelhecimento. A radiação UVA, principalmente, penetra até a derme e pode danificar a elastina e as fibras de colágeno, causando o envelhecimento precoce. O estilo de vida, as condições ambientais e o uso de produtos cosméticos também podem alterar as características mecânicas da pele (MAIA CAMPOS, GONÇALVES, GASPAR, 2008).

As propriedades mecânicas da pele quer no que se refere à sua elasticidade, quer no que respeita à sua plasticidade, são determinadas pela hipoderme, pela derme e pela epiderme (RODRIGUES, 1995 A e B). Nesta última camada da pele, o EC assume um papel importante, que é conferido pelo seu teor em lipídios, água, substâncias hidrossolúveis e queratina.

Têm sido desenvolvidos variados métodos com o objetivo de avaliar as propriedades mecânicas da pele, que incluem testes de tensão, torção, elevação, endentação, vibração e sucção (RODRIGUES, 1995 B).

Nos testes de tensão e nos testes de torção é aplicada uma força paralela à superfície cutânea, que, no primeiro caso, provoca a sua extensão e, no segundo caso, a sua rotação (RODRIGUES, 1995 B). Dentro dos testes torcionais, inclui-se a sonda *Frictiometer*® (Courage-Khazaka, Köln,

Alemanha). Esta sonda permite determinar o grau de suavidade da pele, já que, quanto mais suave for a superfície de medida, menor é a força necessária para induzir a sua rotação (RODRIGUES, 1995 A).

Nos testes de elevação e nos testes de endentação é aplicada uma força vertical na superfície cutânea, que, no primeiro caso, provoca a sua elevação e, no segundo caso, a sua depressão (RODRIGUES, 1995 B). A amplitude destas deformações é, posteriormente, avaliada, permitindo caracterizar as propriedades mecânicas da pele.

Os testes de vibração consistem na transmissão de vibrações à superfície cutânea, cuja propagação é transformada em sinais elétricos e, em seguida, quantificadas (RODRIGUES, 1995 B). Dentro estes testes, inclui-se o *Reviscometer*® (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), que se baseia na determinação do tempo decorrido entre a transmissão e a recepção de uma vibração, que é função das propriedades elásticas da pele (Figura 5) (HERMANS-LÊ et al., 2001, RUVOLO et al., 2006).



Figura 5. Sonda para determinação das propriedades mecânicas da pele por vibração (*Reviscometer*®).

Baseado nos valores de RRTM (*Ressonancing running time measurements*) o equipamento *Reviscometer*® é um dispositivo utilizado para avaliação do comportamento mecânico da pele (elasticidade), por meio da propagação de ondas de ultrassom. O equipamento possui uma sonda que contém dois sensores que são colocados sobre a pele, um deles emite ondas de ultrassom e o outro serve como receptor. O tempo que a onda necessita para percorrer do sensor emissor até o receptor é o parâmetro a ser medido pelo equipamento. Este tempo depende na maior parte se a medida está sendo feita em direção favorável ou contra as fibras, por este motivo a sonda é colocada em diferentes posições, sendo que os sensores são alinhados em diferentes ângulos: $0^\circ / 180^\circ$, $30^\circ / 210^\circ$, $70^\circ / 250^\circ$, $90^\circ / 270^\circ$, $120^\circ / 300^\circ$, $150^\circ / 330^\circ$ para avaliação da anisotropia, ou seja, condição de variabilidade das propriedades físicas da pele segundo direções diferentes. As ondas de ultrassom se propagam na pele de forma diferente, dependendo das condições das fibras elásticas e da hidratação (HERMANS-LÊ et al., 2001, RUVOLO et al., 2006).

Com este equipamento, é possível determinar as propriedades de mecânicas da pele por meio do cálculo da anisotropia, ou seja, pela razão $RRTM_{Max} / RRTM_{min}$, esta razão é sempre maior que 1 exceto no caso de uma pele isotrópica, sendo que, quando mais próximo de 1 esta razão, menor será

a anisotropia, ou seja, menor será a desorganização das fibras elásticas, o que reflete no aumento da firmeza da pele (RUVOLO et al., 2006; VEXLER; POLYANKY; GORODETSKY, 1999).

Nos testes de sucção, em que se inclui o *Cutometer*® (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), que possui uma sonda com um orifício, a pele é aspirada para o interior da sonda e depois libertada (RUVOLO et al., 2007; VEXLER; POLYANKY; GORODETSKY, 1999). Assim, o comportamento da pele em relação à penetração no orifício ocorre de maneira coerente às suas propriedades mecânicas, e é determinada por um sistema ótico (Figura 6).

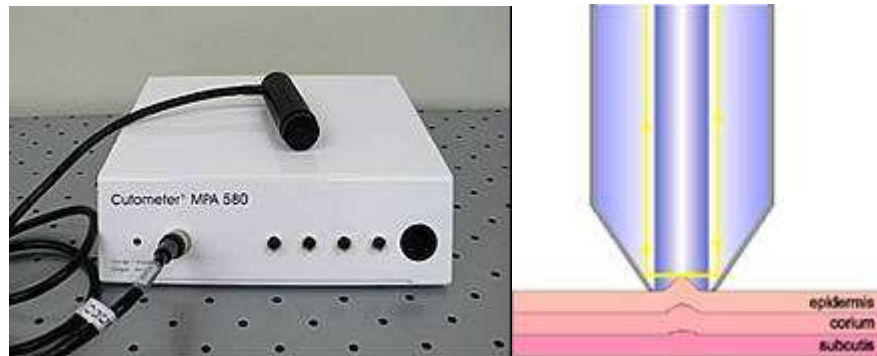


Figura 6. Sonda para determinação das propriedades mecânicas da pele por sucção (*Cutometer*®).

Este equipamento permite obter curvas de deformação da pele, que podem ser sujeitas a uma extensa interpretação matemática, originando variáveis como a deformação total, elástica e plástica, o retorno elástico, como apresentados na Figura 7 e Tabela 1.

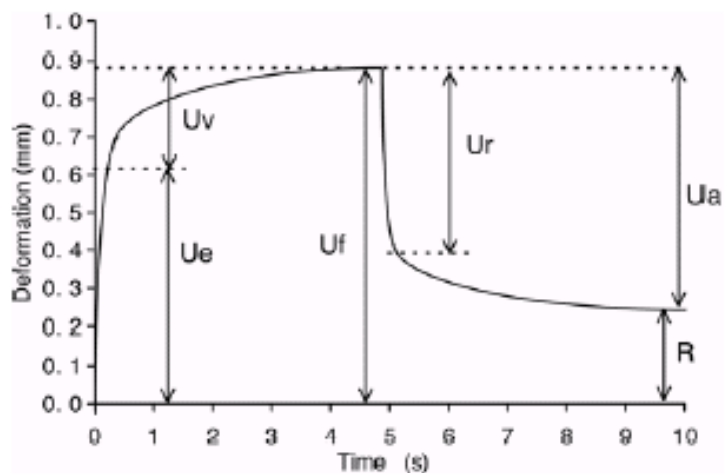


Figura 7. Curva de deformação da pele obtida pelo equipamento *Cutometer*® SEM 575, onde U_e : distensão imediata, U_v : distensão retardada, U_r : retração imediata, U_a : retração total, U_f : distensão final (distensibilidade da pele) e R : deformação residual no fim do ciclo de medida

Tabela 1. Variáveis fornecidas pelo equipamento *Cutometer® SEM 575*.

Variáveis	Significado
R0 = Uf	Distensibilidade da pele.
R1 = R	Deformação residual da pele.
R2= Ua/Uf	Elasticidade bruta da pele, incluindo deformação viscosa.
R3	Última amplitude máxima.
R4	Última amplitude mínima.
R5=Ur/Ue	Elasticidade líquida da pele, sem considerar a deformação viscosa.
R6=Uv/Ue	Viscoelasticidade da pele.
R7=Ur/Uf	Elasticidade biológica: habilidade da pele em retornar à sua posição inicial, após uma deformação.
R8	Área acima da curva, dada por Uf e pelo tempo de sucção.

Encontram-se publicadas *guidelines* para a medida das propriedades mecânicas da pele, estabelecidas pelo EEMCO (*European Group on Efficacy Measurement of Cosmetic and other Topical Products*) (RODRIGUES, 2001; PIÉRARD, 1999).

Paye e colaboradores (2007) realizaram um estudo com o objetivo de comparar a eficácia dos métodos *Cutometer®* e *Reviscometer®* na avaliação da pele desidratada pelo uso continuado de um sabão alcalino e, posteriormente, irritada com lauril éter sulfato de sódio (SLS), ou hidratada com uma loção. Ambos os métodos permitiram detectar diferenças estatisticamente significativas na pele desidratada pelo uso continuado de um sabão alcalino. Na pele posteriormente irritada com SLS ou hidratada com uma loção quer o *Reviscometer®*, quer o *Cutometer®*, permitiram observar diferenças antes e após estes tratamentos, mas estas foram estatisticamente significativas apenas com a primeira sonda.

Este estudo, junto com outros estudos publicados utilizando-se estas técnicas, permitem concluir que as propriedades mecânicas da pele parecem estar intimamente relacionadas com o seu grau de hidratação (GASPAR et al., 2008; MAIA CAMPOS, GONÇALVES, GASPAR, 2008; PAYE et al., 2007). Assim, além de permitirem avaliar as propriedades mecânicas da pele, estes equipamentos, quando aplicado com associação com outros métodos analíticos, permitem avaliar a eficácia de produtos cosméticos.

Microrrelevo cutâneo

A superfície cutânea apresenta um relevo característico, que resulta da organização tridimensional da epiderme, derme e hipoderme (LÉVÊQUE, 1999). O relevo da pele engloba o microrrelevo (rede de pequenas linhas, visíveis a olho nu em algumas zonas da pele) e as rugas.

A análise da topografia cutânea, isto é, a possibilidade de quantificar a presença de rugas ou de outras deformações à superfície da pele, apresenta papel relevante na avaliação objetiva da eficácia dos produtos cosméticos, em especial, dos produtos anti-idade (RODRIGUES, 1995 B).

Têm sido desenvolvidos vários métodos biofísicos para analisar o relevo da pele (LÉVÊQUE, 1999; RODRIGUES, 1995 B). Alguns destes métodos baseiam-se na análise de réplicas da pele, obtidas a partir da aplicação de substâncias adesivas (resinas do tipo epoxi/silicones) sobre a superfície cutânea. As réplicas da pele (ou as correspondentes contra-réplicas) podem depois ser avaliadas por profilometria mecânica, profilometria óptica ou por métodos *shadow casting* (que se baseiam na avaliação de sombras formadas pelo relevo) (LÉVÊQUE, 1999). No entanto estes métodos sofrem muita influencia do operador, principalmente no preparo da réplica, o que dificulta a avaliação dos resultados (BAE, JUNG, 2008).

Outros métodos permitem a análise da topografia cutânea efetuada diretamente sobre a pele. Dentre eles incluem-se os que utilizam macro fotografias, obtidas com câmaras em condições de luz especialmente adaptadas para tal efeito (LÉVÊQUE, 1999; BAE, JUNG, 2008). A densitometria de varredura permite uma avaliação detalhada de macro fotografias, através da análise de diferentes densidades de grão contidas nas fotografias a preto e branco, as quais se relacionam diretamente com as diferenças de reflexão de luz à superfície da pele (LÉVÊQUE, 1999; BAE, JUNG, 2008).

Dentro dos métodos mais recentemente desenvolvidos que permitem avaliar o relevo da pele opticamente, através da digitalização de imagens da superfície cutânea, encontra-se o método designado por *Surface Evaluation of the Living Skin* (SELS) (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha) (LONGO et al., 2011; LÉVÊQUE, 1999; RODRIGUES, 1995 B).

Este método baseia-se na descrição gráfica da pele sob iluminação especial e posterior tratamento e avaliação da imagem, obtendo-se vários parâmetros que permitem uma descrição do relevo cutâneo. A imagem é obtida com o equipamento *Visioscan® VC 98* (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), que é constituído por um sensor especial com alta resolução, uma objetiva, uma lâmpada UVA e duas lâmpadas especiais de halogéneo, dispostas de lados opostos, que iluminam a pele uniformemente. Desta maneira, o método SELS permite determinar os parâmetros descritos na Tabela 2.

O equipamento permite a avaliação quali e quantitativa da superfície da pele nas condições fisiológicas, utilizando um processo de digitalização de imagem obtida por uma câmara de vídeo equipada com uma unidade que emite luz ultravioleta e capta uma imagem da pele digitalizada em 256 níveis de cinza, ponto a ponto, onde 0 equivale ao preto e 256 ao branco (Figura 8). O programa fornece um histograma que apresenta uma distribuição de diferentes níveis de cinza, quantificando os pontos escuros, que correspondem à rugosidade e pontos claros correspondentes aos platôs do micro relevo cutâneo. Com este método podem ser avaliados os parâmetros apresentados na Tabela 2 como os parâmetros relacionados à superfície da pele: rugosidade (Ser) - porção de pontos escuros que representam a aspereza da pele; Sew - número e largura das rugas, sendo que quanto maior número de

rugos maior é este valor; *Sesm* refere-se à forma e largura das rugas, sendo que quanto maior o valor dessa variável melhor a textura e maciez da pele (Figura 9). Avalia-se ainda o parâmetro *Rt* (rugosidade) (Figura 10), relacionado à profundidade das rugas.

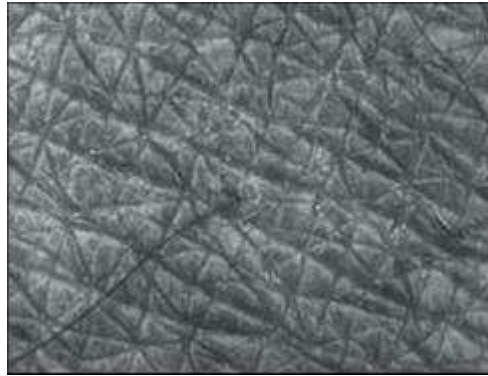


Figura 8. Imagem digitalizada da pele obtida por uma câmera de vídeo - *Visioscan*[®] VC 98

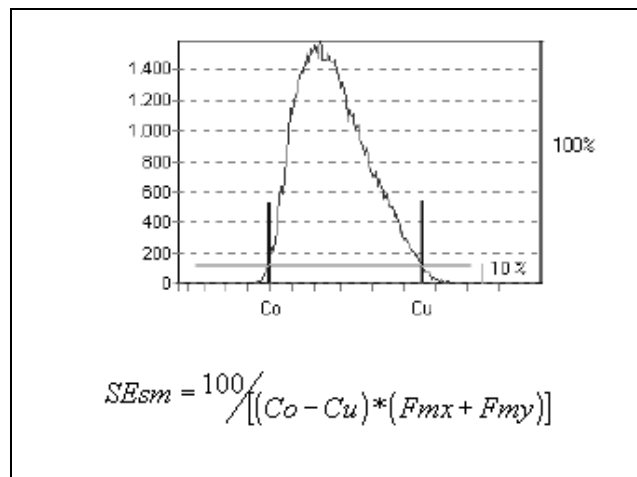


Figura 9. Cálculo do parâmetro *Sesm* (média da largura da rugas), onde *Co - Cu* = limites de *Sesm* como a porcentagem do máximo do histograma e *Fm* = média da largura das rugas nas direções vertical e horizontal.

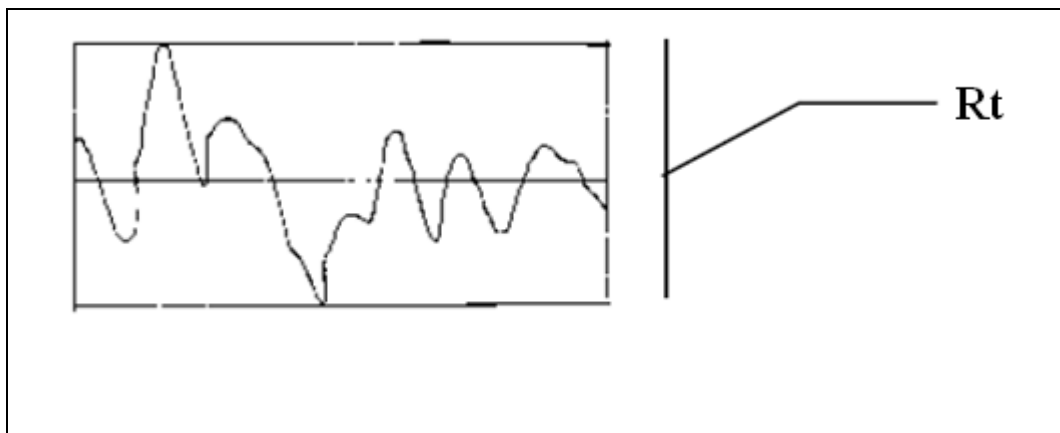


Figura 10. Cálculo do parâmetro *Rt*, distância entre o valor mais alto (pico) e o mais baixo (vale).

Encontram-se publicadas *guidelines* para a avaliação da topografia da superfície cutânea, estabelecidas pelo EEMCO (LÉVÊQUE, 1999).

Tabela 2. Principais parâmetros topográficos da superfície cutânea, obtidos através do método SELS (LÉVÊQUE, 1999).

<i>Superfície</i>		Representa a extensão da zona da pele ondulada – topografia real – em comparação com a mesma superfície, tornada lisa por estiramento.
<i>Volume</i>		Representa a quantidade de líquido necessária para preencher a área até a altura média de todos os picos da ondulação da superfície cutânea.
<i>Energia</i>		É um indicador da homogeneidade da imagem, calculado através do número de repetições de combinações de cores de pixels vizinhos.
<i>Parâmetros SELS</i>	SEsc (descamação)	É um indicador do nível de secura do EC, obtido através da quantidade de pixels claros.
	SEr (aspereza)	É obtida através da quantidade de pixels escuros.
	SEw (rugosidade)	É calculada através da quantidade de rugas horizontais e verticais e é proporcional ao número e largura das rugas.
	SEsm (suavidade)	É calculada através da média da largura e da profundidade das rugas e é proporcional à largura e à forma das rugas.
<i>Parâmetros do micro-relevo</i>	R1 (amplitude)	É a distância entre o pico superior e o inferior.
	R2 (amplitude máxima)	É a maior amplitude do segmento analisado.
	R3 (amplitude média)	É a média das amplitudes de 5 segmentos sucessivos com a mesma largura.
	R4 (distância média)	É a distância média entre o perfil real e o perfil de referência (linha desenhada no pico mais elevado).
	R5 (desvio médio)	É calculado pela divisão da área entre o perfil real e o perfil médio pela altura média.

Cor da pele

A cor da pele resulta da absorção e da reflexão seletiva de radiações com comprimentos de onda específicos (PIÉRARD, 1998). Esta característica é determinada pela presença de diferentes cromóforos na pele, principalmente, pela melanina (que confere as tonalidades amarela a castanha), presente na epiderme, e pela hemoglobina (responsável pelas tonalidades azul e vermelha), presente na derme (PIÉRARD, 1998; FULLERTON et al.; 1996).

A determinação da cor da pele é importante para a sua caracterização, como para definir o fototipo, mas também para avaliar os efeitos de produtos cosméticos, como os despigmentantes, protetores solares e autobronzeadores (PIÉRARD, 1998). Além disso, esta determinação pode ainda ser útil para avaliar quantitativamente o grau de eritema nos ensaios de avaliação da irritação cutânea, permitindo avaliar a eficácia de produtos anti-irritantes (PIÉRARD, 1998; FULLERTON et al.; 1996).

Encontram-se descritos vários métodos para a determinação da cor da pele (PIÉRARD, 1998; FULLERTON et al.; 1996). Dentro destes métodos destacam-se os que se baseiam na reflectometria e na colorimetria.

Os métodos que utilizam a reflectometria subdividem-se em dois grupos principais. No primeiro grupo incluem-se os equipamentos *Minolta® spectrophotometer* (Minolta, Osaka, Japão), *Zeiss® spectrophotometer* (Carl Zeiss, Inc., New York, Estados Unidos da América) e *SkinColorimeter®* (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), que utilizam uma gama de radiações ampla (com comprimentos de onda do espectro do visível desde 350 nm a 800 nm. No segundo grupo incluem-se os equipamentos *Dermaspectometer®* (Cortex Technology, Hadsund, Dinamarca) e *Mexameter® MX16* (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), que utilizam apenas radiações com comprimentos de onda específicos, que correspondem aos cromóforos principais da pele.

A hemoglobina apresenta um máximo de absorção específico, na zona verde (520-580 nm), e um mínimo de absorção, na zona vermelha, acima de 600 nm. Assim, devido ao aumento da quantidade de sangue no eritema, maior quantidade de luz verde é absorvida e menor quantidade refletida. A melanina absorve em todo o espectro de absorção, não apresentando qualquer pico, mas, acima de 400 nm, mostra uma absorção descendente à medida que aumenta o comprimento de onda. Estes métodos permitem calcular o índice de eritema (E) e o índice de melanina, através da quantidade de luz vermelha e de luz verde refletidas.

O *Dermaspectometer®* emite luz com dois comprimentos de onda diferentes (feixe de luz verde: $\lambda = 568$ nm, feixe de luz vermelha: $\lambda = 655$ nm) e o *Mexameter®* com três comprimentos de onda (PIÉRARD, 1998) (feixe de luz verde: $\lambda = 568$ nm, feixe de luz vermelha: $\lambda = 660$ nm, feixe de luz infra vermelha: $\lambda = 870$ nm).

Os colorímetros, por exemplo o *SkinColorimeter®* (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), emitem uma luz de LED branca que corresponde a todas as bandas do espectro do visível. Este aparelho permite a determinação exata e precisa da cor da pele através da descrição espacial deste parâmetro segundo, por exemplo, o espaço de cor CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) 1976 $L^*a^*b^*$ (Figura 11) (PIÉRARD, 1998; FULLERTON et al.; 1996). O eixo L representa a claridade, o eixo b a escala cromática entre o azul e o amarelo e o eixo a a escala cromática entre o verde e o vermelho (PIÉRARD, 1998).

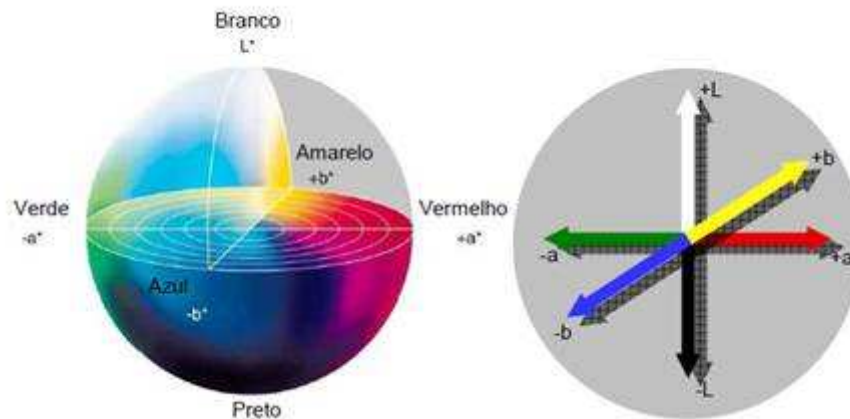


Figura 11. Descrição espacial da cor segundo o espaço de cor $L^*a^*b^*$.

Além disto, este equipamento permite avaliar o ângulo tipológico individual (individual typology angle - ITA°) valor quantitativo e objetivo que permite a classificação da cor da pele individual. Neste caso a pele pode ser classificada, segundo *Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis* (COLIPA, 2007) como:

- $ITA^\circ > 55^\circ$ = pele muito clara (Very-Light)
- $55^\circ \geq ITA^\circ > 41^\circ$ = pele clara (Light)
- $41^\circ \geq ITA^\circ > 28^\circ$ = pele intermediária (Intermediate)
- $28^\circ \geq ITA^\circ > 10^\circ$ = pele mate (Tan / Matt)

Desta maneira, este método permite classificar os diferentes tipos de pele e com isso auxilia na triagem dos voluntários durante um estudo de eficácia clínica de cosméticos, e ainda, permite avaliar os efeitos destes na alteração da coloração cutânea.

Sistema digital de imagens fotográficas para a avaliação da pele facial

Diversos equipamentos de medidas não invasiva contendo dispositivos ópticos tem sido desenvolvidos para a análise quantitativa da pele facial (BAE, JUNG, 2008; MARGHOOB et al., 2003). Dentre estes destaca-se o *VisioFace Quick®* (Courage-Khazaka, Köln, Alemanha), equipamento que consiste de uma cabine acoplada a uma câmera digital de alta resolução (10 MegaPixels) e 200 LEDs de diodos brancos, permitindo a avaliação da face frontal ou lateralmente (Figura 12). O equipamento é acoplado a um Software de Investigação (*Multi skin test center*) que permite a avaliação de manchas visíveis (na imagem colorida), poros, rugas e diferenças de cor em uma área de interesse escolhida, selecionada manualmente.

A imagem obtida com as luzes de LED são fortemente absorvidas pela melanina presente na epiderme, resultando em uma imagem com os pontos contendo melanina exacerbados

(ASAWANONDA, TAYLOR, 1999), emitindo assim a avaliação de manchas invisíveis ao olho nu, as quais poderão se tornar visíveis com o envelhecimento cutâneo e exposição solar. Em contraste, a pele desprovida de melanina parece mais clara e menos iluminada por causa do colágeno que reflete a luz de LED e autofluoresce (CHWIROT et al., 1998; ASHFAQ et al., 2003).



Figura 12. Sistema digital de imagens fotográficas para a avaliação da pele facial e imagem real e de luz de LED obtida com o equipamento (VisioFace Qick®).

Ultrassom de 20MHz

Em 1987 a introdução de dois sistemas de ultrassom de 20MHz tornou possível a análise dermatológica sonográfica. Desde então a avaliação cutânea por ultrassom nesta área tem aumentado muito, principalmente para a avaliação dos efeitos de medicamentos na pele (UNHOLZER, KORTING, 2001).

A resolução do ultrassom de 20 MHz é importante para estudos patológicos e mudanças ocorridas por efeitos farmacológicos de medicamentos na derme e camada subcutânea (adiposa). Este comprimento de onda permite avaliar apenas a espessura da epiderme, sendo que os comprimentos de 50 e 100 MHz podem ser mais eficazes para avaliar alterações celulares e morfológicas na epiderme. Isto porque quanto menor o comprimento de onda utilizado no ultrassom, mais profunda a análise e quanto maior esse comprimento mais superficial (UNHOLZER, KORTING, 2001; MARKS, HILL, BARTON, 1990).

Assim, o ultrassom de 20 MHz é um método seguro e não invasivo de avaliação de alterações e da espessura da derme (DYKES, MARKS, 1977; UNHOLZER, KORTING, 2001). Dentre os equipamentos que utilizam este método destacam-se os sistemas *Dermascan C*® e *DUB 20*, conhecidos por serem os primeiros a serem utilizados rotineiramente para a avaliação do tamanho e profundidade de melanomas malignos. Estes equipamentos são importantes no prognóstico de tumores cutâneos, uma vez que auxiliam de maneira decisiva no planejamento cirúrgico (UNHOLZER, KORTING, 2001).

A sonda de ultrassom de 20MHz *Dermascan C®*, (Cortex, Hadsund, Dinamarca) possui um transdutor de focalização acentuada utilizado para obter imagens bidimensionais transversais, representadas no software no modo-B (FULLERTON, SERUP, 1997; AGNER, SERUP, 1989). A onda ultrassônica (velocidade de 1580 / s) é parcialmente refletida nas estruturas da pele e gera ecos de diferentes amplitudes, a intensidade dos ecos refletidos (ecogenicidade) é avaliada por um microprocessador e visualizada como uma imagem colorida de duas dimensões. A escala de cores da ecogenicidade vai do branco > vermelho > amarelo verde > azul ao preto, sendo o branco a cor mais ecogênica e o preto menos ecogênico (GNIADÉCKA 1998, UNHOLZER, KORTING, 2001).

Para calcular a ecogenicidade, o número de pixels de baixa ecogenicidade é medido com software de análise de imagem (Cortex Tecnologia, Houdsund, Dinamarca) e relacionado com o número total de pixels. Os pixels de baixa ecogenicidade são definidos como aqueles de ecogenicidade de 0 a 30 (no intervalo de ecogenicidade 0-255) (AGNER, SERUP, 1990; GNIADÉCKA 1998). A espessura da pele é determinada como a distância entre a interface epiderme (alta ecogenicidade) e derme, e a interface entre a derme e subcutâneo. Por causa da elevada precisão deste equipamento, geralmente é realizada apenas uma medida por região (AGNER, SERUP, 1990; GNIADÉCKA 1998).

Dentre as aplicações deste método está a avaliação de dermatites de contato alérgicas avaliando-se a formação de edema e infiltração, aparecendo como uma zona pouco ecogênica na imagem da derme. No entanto, não é possível distinguir entre edema e infiltração com ultrassom de 20MHz (UNHOLZER, KORTING, 2001).

Além disto, estudos tem utilizado os equipamentos de ultrassom de 20MHz para determinar a espessura da derme antes e depois do tratamento com medicamentos e hormônios. Estes estudos demonstraram que este método é válido e reproduzível, sendo considerado apropriado para a avaliação do efeito de produtos na pele (KERSCHER, KORTING, 1995).

Em um estudo que avaliou a pele fotoenvelhecida, Hoffman e colaboradores (1990) demonstraram que a pele exposta ao sol apresenta uma zona escura de baixa ecogenicidade, comparada com peles com pouca exposição solar (HOFFMANN et al., 1994). Esta área pouco ecogênica está relacionada a regiões com fibras de colágeno destruídas, acúmulo de fibras de elastina e glicosaminoglicanas e, portanto, aumento de água na derme (HOFFMANN et al., 1994; GNIADÉCKA et al.;1994). Além disto, uma região mais profunda com alta ecogenicidade (colorida) corresponde a áreas de elastose actínica, confirmadas após comparação com cortes histológicos, o que o autor correlacionou com a penetração da radiação UV (HOFFMANN et al., 1994; GNIADÉCKA et al.;1994).

A espessura e a ecogenicidade subdérmica tem sido discutidos para correlacionar aos danos causados pela radiação UV e o envelhecimento cutâneo, as mudanças tem sido utilizadas para medir a eficácia de formulações anti-idade (TACKE et al., 1995; GNIADÉCKA 1998). A origem da região pouco ecogênica encontrada na derme está sendo relacionada a foto danos no colágeno e elastina, acúmulo de água e glicosaminoglicanas na derme (GNIADÉCKA 1998).

Assim, o ultrassom de 20MHz apresenta-se um método eficaz para avaliar as mudanças ocorridas na pele humana após a exposição solar e com o envelhecimento sendo portanto sugerida para avaliar a eficácia de formulações multifuncionais anti envelhecimento.

Microscopia confocal a laser

A microscopia confocal foi utilizada inicialmente na área farmacêutica com o objetivo de avaliar compostos fluorescentes das formulações e formas farmacêuticas (PYGALL et al., 2007). Com o desenvolvimento da técnica de microscopia confocal a laser por reflectância foi possível aplicar o método para a avaliação não invasiva da pele (LONGO et al., 2011; GONZALEZ et al., 2008).

Atualmente, a microscopia confocal a laser *in vivo* tem uma vasta gama de aplicações, permitindo a obtenção de imagens microscópicas em tempo real, com uma resolução próxima a histologia convencional, podendo explorar estruturas cutâneas entre o estrato córneo e a derme reticular (SCHMID-WENDTNER, BURGDORF, 2005; JASAITIENE et al. 2010).

A microscopia confocal a laser por refletância baseia-se na obtenção de imagens de luz refletida por um tecido vivo (LONGO et al., 2011; WEBB, 1999). Em 1995, Rajadhyaksha e colaboradore (1999) relataram pela primeira vez as bases deste método, desde então, melhorias no projeto e otimização de parâmetros ópticos tem permitido uma melhor qualidade de imagem, redução do tamanho e ergonomia melhorada dos dispositivos de imagem. Desta maneira, com as melhoras no método analítico, observa-se um aumento na aplicação do mesmo em dermatologia, avaliação de doenças de pele e lesões cancerígenas e caracterização da pele (GONZALEZ et al., 2008).

Um microscópio confocal consiste de uma fonte de luz, um condensador, uma objetiva e um detector. A fonte de luz ilumina uma pequena área tridimensional dentro de uma amostra como, por exemplo, a pele. Este ponto iluminado é então digitalizado para o detector através de uma pequena abertura. A pequena abertura permite apenas a entrada da luz que se origina a partir do ponto de iluminação focado, a luz que se origina fora do local é refletida (RAJADHYAKSHA, GONZALEZ, ZAVISLAN, 2004). A fonte de luz, o local iluminado e a abertura de detecção estão opticamente conjugados e este arranjo é chamado de confocal (LONGO et al., 2011; JASAITIENE et al. 2010; GONZALEZ et al., 2008).

A região focada é digitalizada horizontalmente ao longo de uma grade bi dimensional, obtendo-se uma secção microscópica horizontal da pele (WEBB, 1999). Também é possível obter uma série de imagens de planos horizontais empilhadas verticalmente, ou seja, imagens de profundidade da pele. Desta maneira, com a microscopia confocal a laser é possível obter imagens horizontais das diferentes camadas da pele, do estrato córneo até a derme papilar (LONGO et al., 2011; JASAITIENE et al. 2010; GONZALEZ et al., 2008).

As imagens confocal são obtidas em escala de cinza, sendo que branco representa a luz total refletida e preto representa região sem reflexão. Mais luz é refletida quando o tecido contém estruturas de tamanho similar ao comprimento de onda da fonte de luz (SCHMID-WENDTNE, DILL-MLLER,

2008) e sistemas de microscopia confocal de reflectância usam um laser como fonte de luz. A obtenção das imagens baseia-se na presença de contraste endógeno (RAJADHYAKSHA, GONZALEZ, ZAVISLAN, 2004), que é fornecido por microestruturas, tais como a melanina ou organelas celulares como hemoglobina (AGACHE, HUMBERT, 2005). As melhores qualidades de imagem são obtidas com lasers de baixa potência (cerca de 40 mW) e comprimento de onda ao infravermelho (800-1064 nm) (LONGO et al., 2011; JASAITIENE et al. 2010).

Como condutor do laser é utilizado água (imersão em água ou gel aquoso de ultrassom) que possui índice de refração (1,33) próximo ao da epiderme (1,34) e, portanto não interfere nas imagens obtidas. A presença de circulação sanguínea na região da pele estudada pode ser um problema durante a obtenção da imagem. Para superar isso, um anel de contato é utilizado para reduzir alterações de movimento e para conter o meio de imersão para a lente objetiva durante a obtenção da imagem (LONGO et al., 2011; JASAITIENE et al. 2010).

O estrato córneo produz a primeira imagem da superfície superior da pele referente ao espalhamento de luz da água presente na camada córnea. Os corneócitos são visualizadas como formas poligonais brilhantes e agrupadas em ilhas separadas por dobras cutâneas, que aparecem muito escuras. A camada seguinte é a camada granulosa, distribuída regularmente em uma profundidade de 15-20 μm . Nesta camada os queratinócitos e seus núcleos aparecem como estruturas escuras ovais rodeadas por um citoplasma granulado brilhante (JASAITIENE et al. 2010; GONZALEZ et al., 2008).

Abaixo encontra-se a camada espinhosa, localizado a 20 a 100 μm de profundidade. É constituída por uma estrutura parecida com um apertado favo de mel, com célula de bordas bem demarcadas (JASAITIENE et al. 2010; GONZALEZ et al., 2008).

Mais profundamente podemos encontrar a junção dermo epidérmica com queratinócitos basais bem pequenos e muito brilhantes (SCHMID-WENDTNER, BURGDORF, 2005), devido principalmente à presença de melanina no interior da célula. A melanina nos queratinócitos basais é tipicamente arranjada em uma posição supranuclear. Os melanócitos nesta região podem ser vistos como estruturas ovais bem brilhantes, com formas fusiformes e células dendríticas (WILSON, ZAGZEBSKI, VARGHESE, 2006). Diferentes brilhos correspondem à variação endógena entre os fototipos de pele e localização anatômica (LONGO et al., 2011; JASAITIENE et al., 2010).

Já na derma pode-se observar a derme papilar como um a área arredondada escura, envolvida por anéis brilhantes e bem arredondados que são as células basais contendo granulos de melanina com grande reflectância. Abaixo encontram-se as fibras de colágeno que podem ser identificadas facilmente. As glândulas écrinas aparecem também como estruturas arredondadas ocas com um brilho central passando da epiderme para a derme. Os folículos pilo sebáceos podem ser identificados como estruturas ocas com células elípticas alongadas com uma estrutura central branca correspondente ao cabelo (GONZALEZ et al., 2008).

Na prática, a microscopia confocal a laser tem sido muito utilizada para a identificação de lesões cancerígenas, inflamação, dermatite atópica, dentre outras patologias dermatológicas. Na área cosmética, esta técnica tem potencial para ser aplicada na classificação dos diferentes tipos de pele e avaliação da eficácia de formulações cosméticas, substituindo os consagrados métodos histológicos e histométricos, diminuindo o uso de animais de laboratório, e avaliando alterações nas reais condições de uso dos produtos (PYGALL et al., 2007; JASAITIENE et al. 2010; GONZALEZ et al., 2008).

Limiar de percepção a uma corrente elétrica

Além de função protetora e reguladora a pele é também um órgão sensorial, uma vez que é ricamente dotado de terminações nervosas e receptores sensoriais (HILLIGES et al., 1995; REILLY et al., 1997)

Desta maneira, a pele conta com ferramentas para manipular e explorar a sensação ao toque, sua forma e função, importantes também para nos comunicar uns com os outros através de uma gama de interações sociais, como a sensação tátil ou o carinho. O toque, neste contexto, também pode ser visto como uma ferramenta interreceptiva, fornecendo informações sobre o estado do corpo em função do seu "bem-estar" e "mal-estar", frequentemente associado a recompensa ou a aversão (MCGLONE, VALLBO, OLAUSSON, 2007).

As modalidades sensoriais primárias dos sentidos são descritas convencionalmente como parte do sistema somatossensorial e compreendem todas as fibras nervosas aferentes periféricas e receptores proprioceptivos especializados, que permitem a sensibilidade cutânea. A sensação cutânea é fornecida ao sistema nervoso central como informações de uma variedade de receptores sensoriais multimodais cutâneos que são classicamente classificados em quatro principais modalidades: toque, temperatura, coceira e dor, e dentro de cada um destes, existem canais de fibras separados (MCGLONE, VALLBO, OLAUSSON, 2007).

O grau de mielinização destas fibras determina a rapidez com que o impulso nervoso é conduzido. As maiores e mais rápidas fibras nervosas são chamadas A δ e incluem alguns dos neurônios proprioceptivos, tais como receptores de alongamento muscular. O segundo maior grupo, é denominado A β e inclui todos os receptores da sensação tátil discriminativa. Já a dor, coceira e temperatura incluem o terceiro e quarto grupos, fibras A δ e C (MCGLONE, VALLBO, OLAUSSON, 2007).

Além das fibras nervosas a pele apresenta quatro tipos de receptores sensoriais: 1) corpúsculos de Meissner, 2) corpúsculos de Pacinian, 3) discos de Merkel, e 4) terminações de Ruffini, coletivamente conhecidos como mecanorreceptores de baixo limiar (MBLs). Receptores de Meissner e Pacinian são conhecidos por adaptarem-se facilmente, respondendo a estímulos mecânicos rápidos sobre a pele. Receptores de Merkel e Ruffini são conhecidos por adaptarem-se lentamente, respondendo a um contínuo estímulo mecânico (MCGLONE, VALLBO, OLAUSSON, 2007).

Hoje sabe-se que a sensação ao toque é mediada por fibras A β , uma vez que esta sensação não pode ser experimentada pelos pacientes que perderam suas fibras nervosas de grande diâmetro, devido a uma neuropatia (COLE et al., 2006).

As fibras C desmielinizadas existem na pele humana que contém pelos, no braço e na perna, mas nunca na pele glabra como as palmas das mãos ou solas dos pés do (EDIN, 2001; MCGLONE, VALLBO, OLAUSSON, 2007). Estímulos mecânicos percorrem seus campos receptivos lentamente. Estas fibras nervosas foram classificadas como C-tátil aferente (CT- aferentes) e foram reportadas pela primeira vez em humanos por Johansson, Trulsson, Olsson, e Westberg (1988) (TRULSSON, 2001). Por muito tempo foi aceita a hipótese de que as fibras CT- aferentes tivessem a função sensorial responsável pela sensação de cócegas, até que a elas foi atribuída a função de toque afetivo ou límbico (VALLBO, OLAUSSON, WESSBERG, 1999), o que implica que o papel essencial do sistema de fibras CT- aferentes é prestar apoio emocional ou hormonal às respostas comportamentais e ao contato com a pele.

Já as fibras A β parecem estar ligadas a estímulos táteis agradáveis na palma da mão, onde as fibras C são escassas (FRANCIS et al., 1999).

Portanto, a combinação de fibras CT- aferentes e A β são responsáveis pela sensação ao toque na pele e até mesmo pela qualidade da resposta emocional evocada por um determinado estímulo (LÉVQUE et al., 2000, MCGLONE, VALLBO, OLAUSSON, 2007).

Assim, como os produtos cosméticos são aplicados diretamente sobre a pele, a pesquisa em Tecnologia de Cosméticos deve englobar o desenvolvimento e a avaliação da estabilidade física e química das formulações, a avaliação da segurança e compatibilidade destas com a pele, a avaliação da eficácia clínica, bem como a avaliação da sensibilidade e percepção tátil. No entanto, poucos são os estudos que avaliem, de forma objetiva, a percepção tátil e as alterações na sensibilidade dos consumidores, após a aplicação de produtos cosméticos.

Recentemente, estudos de neuropatias comumente utilizam o método de quantificação de limiar de percepção a uma corrente elétrica (current perception thresholds - CPT) das três diferentes tipos de fibras nervosas: A β , A δ e C, utilizando-se o equipamento *Neurometer® CPT/C* (Neurotron Inc., Baltimore, USA) (STEVENS, CHOO, 1999). Sabendo-se que a sensação tátil é percebida pela pele por receptores táteis, e transmitida pelas fibras mielinizadas (A β e A δ) e desmielinizadas (C) para o sistema nervoso central, sugerimos que mudanças na percepção tátil, observadas na pele sadia, podem ser estudadas utilizando-se o método de quantificação de limiar atual de percepção a uma corrente elétrica (STEVENS, CHOO, 1999, PORCHERON et al., 2008).

Estudos experimentais demonstram que muitos fatores podem afetar profundamente sensações táteis. Inúmeras hipóteses foram propostas para explicar mudanças na acuidade tátil relacionadas com a idade, por exemplo a diminuição da densidade de certos receptores (STEVENS, CHOO, 1999; STEVENS, PATTERSON, 1995), uma possível deterioração do sistema nervoso central e/ou uma

degeneração da micro circulação (STEVENS, PATTERSON, 1995), no entanto outros estudos propõem que a diminuição da acuidade tátil se deve a danos ao estrato córneo e consequente perda das funções táteis da epiderme (PORCHERON et al, 2011; VERRILLO et al., 1998; WOODWARD, 1993). Assim, as características físicas da pele em si provavelmente são importantes determinantes de modificações sensoriais devido a idade (VERRILLO et al.,1998).

Alguns autores sugerem que alterações no CPT deve-se a alterações nos receptores sensoriais devido ao envelhecimento, ou seja, que a sensibilidade e a percepção tátil diminui com a idade de forma altamente significativa em todas as partes do corpo (PORCHERON et al, 2011; STEVENS, PATTERSON, 1995; WOODWARD, 1993). Ainda, estudos sugerem que os mecanoreceptores da pele podem ser afetados por mudanças nas propriedades biofísicas da pele como, por exemplo, na hidratação do estrato córneo (VERRILLO et al. 1998).

Desta maneira, alguns estudos têm demonstrado que a hidratação da pele pode melhorar a discriminação tátil espacial, alterando a transferência do estímulo sensorial em direção a receptores sensoriais (PORCHERON et al, 2011; LÉVQUE et al., 2000; PORCHERON et al., 2008). O ligeiro aumento significativo na hidratação da pele observado em alguns estudos sugere que o aumento da sensibilidade de fibras A β pode não ser unicamente devido a uma melhoria da hidratação do estrato córneo, mas que a aplicação do hidratante contribui para mudanças no limiar percepção (CPT) das fibras A β . Os resultados sugerem ainda que a aplicação diária de um hidratante poderia ajudar a manter / restaurar a sensibilidade tátil conhecida por diminuir com a idade (PORCHERON et al, 2011; PORCHERON et al., 2008).

Assim, a avaliação do limiar percepção a uma corrente elétrica utilizando-se o equipamento *Neurometer® CPT/C* é um método inovador, seguro e não invasivo para avaliar como o envelhecimento, as patologias e os produtos cosméticos alteram a sensibilidade tátil da pele, sendo complementar aos estudos de biofísica e análise de imagem da pele, normalmente utilizados para este fim.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente projeto foi a avaliação da estabilidade física e química e da eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo filtros solares, vitaminas lipossolúveis, extrato de *Ginkgo biloba* e extrato de algas marinhas vermelhas.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Desenvolver uma formulação fotoprotetora multifuncional com propriedades anti-envelhecimento;
- Realizar um estudo de estabilidade física das formulações por determinação do comportamento reológico;
- Elaborar e padronizar um método analítico eficiente para posterior análise das formulações por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Determinar o prazo de validade das formulações em estudo;
- Avaliar a compatibilidade cutânea destas formulações por meio do teste de irritação cutânea primária;
- Realizar um estudo de avaliação sensorial por métodos subjetivos;
- Determinar as alterações táteis e sensoriais da pele com a aplicação das formulações, por determinação do limiar de percepção a uma corrente elétrica e como estes parâmetros são alterados por alterações no clima;
- Determinar um protocolo para avaliar a eficácia clínica das formulações estudadas por métodos de biofísica e análise de imagem da pele.

Materiais e Método

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas e solventes

As matérias-primas descritas, a seguir, estão de acordo com a nomenclatura utilizada por Brandão (2000) e, quando necessário, também está descrito o nome comercial e o fabricante e ou fornecedor.

- Acetato de DL- α -tocoferila, DSM
- Água destilada e deionizada, FCFRP-USP
- Isopropanol, grau HPLC, J. T. Baker
- Metanol, grau HPLC, J. T. Baker
- NaOH (sol 10%)
- Palmitato de retinila, DSM, contendo 1.000.000 UI de palmitato de retinila /g.
- Papel de filtro quantitativo faixa preta, J. Prolab
- Tetraisopalmitato de ascorbila, VCIP[®], Nikko Chemicals
- Extrato de algas marinhas vermelhas, Helioguard 365[®], Mibelle
- Associação de vitaminas lipossolúveis (4,0 % de palmitato de retinila, 4,0 % de acetato de tocoferila e 0,6% de tetraisopalmitato de ascorbila) e *Ginkgo biloba*, Radizen A[®], Galena
- Extrato de *Ginkgo biloba*, Alban Muller
- pentaestearato de poliglicerila-10 e estearoil lactilato de sódio, Nikkomulse[®] 41, Nikko Chemicals
- Álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato de cetet-10, Crodafos CES[®], Croda
- Poliacrilamida e C13-14 isoparafina e lauret-7, Sepigel 305[®], PharmaSpecial
- Manteiga de Karité, sorbitan sesquioleato, polisorbato 20, carbômero e celulose, Nanocolloidyl 2022[®], Nikko Chemicals
- Hidroxietilcelulose, Natrosol[®], Galena
- Copolímero de amônio acriloldimetilaurato/VP, Aristoflex AVC[®], PharmaSpecial
- Polissacarídeo obtido de *Sclerotium gum*, Amigel[®], PharmaSpecial
- Microemulsão de silicone - NET FS[®], Nikko Chemicals
- Ciclometicone- SF 1204[®], DownCorning
- Propilenoglicol, LabSinthy
- Glicerina, LabSinthy
- Fenoxietanol e parabenos, Phenonip[®]
- BHT
- EDTA-Na2

4.1.2. Soluções padrão

A seguir serão descritas as soluções utilizadas para a avaliação da estabilidade química das formulações objeto de estudo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

- Solução stock de benzofenona-3, (Neo heliopan BB) Symrise, na concentração de 2000 µg/ml, em álcool isopropílico, Labsynth, e solução de uso na concentração de 200 µg/ml preparadas a partir desta solução stock.
- Solução stock de octocrileno, (Neo heliopan 303) Symrise, na concentração de 2000 µg/ml, em álcool isopropílico, e solução de uso na concentração de 200µg/ml preparadas a partir desta solução stock.
- Solução stock de metoxicinamto de etilexila, (Neo heliopan AV) Symrise, na concentração de 2000 µg/ml, em álcool isopropílico, Labsynth e solução de uso na concentração de 200µg/ml preparadas a partir desta solução stock.
- Solução stock de palmitato de retinila (derivado da vitamina A) 1.000.000 U.I./g, DSM, na concentração de 2000 µg/ml, em álcool isopropílico, Labsynth, e soluções de uso nas concentrações de 20, 30, 40, 60 e 80 µg/ml preparadas a partir desta solução stock.
- Solução stock de acetato de α -tocoferila (derivado da vitamina E), DSM, na concentração de 2000 µg/ml, em álcool isopropílico, Labsynth, e soluções de uso nas concentrações de 20, 30, 40, 60 e 80 µg/ml preparadas a partir desta solução stock.
- Solução stock de tetraisopalmitato de ascorbila (derivado da vitamina C), Nikkol, na concentração de 2000 µg/ml, em álcool isopropílico, Labsynth, e soluções de uso nas concentrações de 4, 6, 8, 12 e 16µg/ml preparadas a partir desta solução stock.
- Solução stock de extrato de *Ginkgo biloba*, Alban Muller, na concentração de 2000 µg/ml, em álcool isopropílico, Labsynth, e soluções de uso nas concentrações de 8, 10, 15, 20 e 30µg/ml preparadas a partir desta solução stock.
- Solução stock de extrato de algas marinhas vermelhas (Helioguard 365), Mibelle, na concentração de 4000 µg/ml, em álcool isopropílico, Labsynth, e soluções de uso nas concentrações de 900, 1000, 1100, 1200 e 1400µg/ml preparadas a partir desta solução stock.

4.1.3. Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico, Heidolph®, RZR 2021
- Balança eletrônica Marte, modelo AS 2000
- Centrífuga Excelsa Baby II, Fanem, modelo 206-R, potência 0,0440 kw
- Chapa de aquecimento
- *Corneometer CM 825* (Courage & Kazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha).
- Cromatógrafo líquido DAD, marca Shimatzu modelo LC-6AD equipado com detector de UV-DAD modelo SPD-M10Avp acoplado a um injetor automático modelo Sil-10AF e software CLASS-VP6.14*Cutometer SEM 57* (Courage & Kazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha).
- *DermaScan C* (Cortex Technology, Dinamarca)
- Embalagens plásticas de PVC opacas, com capacidade para 15 e 30 gramas
- Estufas termostatizadas com controle de umidade e fotoperíodo Eletrolab, modelo 111FC de 37°C e 45°C
- *Neurometer® CPT/C* (Neurotron Inc., Baltimore, USA)
- Peagômetro, Digimed®, modelo DM 20
- Reômetro modelo DV-III (tipo Cone &Placa), marca Brookfield, acoplado ao Software Rheocalc versão V1.01, Brookfield e um spindle CP 52
- *Reviscometer RV600* (Courage & Kazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha).
- *Skin Colorimeter* (Courage & Kazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha).
- *Tewameter MX16* (Courage & Kazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha).
- Vidrarias em geral
- *Visioscan VC 98* (Courage & Kazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Desenvolvimento das formulações

As formulações foram elaboradas levando-se em consideração o pH de estabilidade das vitaminas e extratos em estudo, a concentração de uso e as características sensoriais e a interação com as matérias-primas empregadas como veículo nas formulações dermocosméticas.

Foram preparadas em agitador Heidolph, RPZ 2021 formulações com diferentes bases auto-emulsificantes, tais como, pentaestearato de poliglicerila-10 e estearoil lactilato de sódio (Nikkomulse® 41) e álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato de cetet-10 (Crodafos CES®), manteiga de Karité, sorbitan sesquioleato, polisorbato 20, carbômero e celulose (Nanocolloidyl 2022®) e de diferentes polímeros hidrofílicos, (poliacrilamida e C13-14 isoparafina e lauret-7 Sepigel 305® hidroxietilcelulose - Natrosol®, copolímero de amônio acriloldimetiltaurato/VP - Aristoflex AVC®, e polissacarídeo obtido de Sclerotium gum - Amigel®) silicones (microemulsão de silicone -

NET FS®, ciclometicone- SF 1204®), umectantes (propilenoglicol e glicerina) preservantes (fenoxietanol e parabenos), antioxidantes (BHT) e água destilada e deionizada, variando a base e/ou os polímeros (Tabelas 3 e 4). Essas formulações foram acrescidas de uma associação de filtros solares químicos, considerada fotoestável e com FPS 15 comprovado em estudos anteriores (7% de Metoxicinamato de etilexila, 4% de Benzofenona-3, 5% de Octocrileno) (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; GASPAR et al., 2006) e de 4% Dióxido de Titânio rutilo micronizado, e, ainda dos extratos de *Ginkgo biloba* (FG), de algas vermelhas marinhas (FA), de uma associação de vitaminas lipossolúveis (FV) e desta associação com os extratos (FVG e FVGA), conforme apresentado na Tabela 5.

O extrato de *Ginkgo biloba* (Alban Muller International) é um extrato glicólico padronizado em quercetina (seu marcador químico) obtido das folhas do vegetal.

O extrato de algas marinhas vermelhas (Helioguar 365®) é um extrato aquoso rico em *Phorphyra- 334* e *Shinorine*, principais componentes responsáveis pela atividade protetora contra os raios UVA, os quais foram concentrados e incorporados em lipossomas para melhorar a performance da substância ativa.

A formulação considerada mais estável nos testes preliminares de estabilidade foi elaborada também sem a associação de filtros solares e com as vitaminas e extratos objeto de estudo, uma vez que essas formulações serão de uso noturno durante a realização dos estudos de avaliação da eficácia clínica.

Tabela 3. Formulações estudadas.

Composição	F 1	F2	F3	F4	F5	F6
Hidroxietilcelulose	0,50	-	-	-	0,20	-
Copolímero de amônio acriloidimetiltaurato/VP	-	0,50	-	-	-	-
Polissacarídeo obtido de <i>Sclerotium gum</i>	-	-	0,50	-	-	-
Pentaestearato de poliglicerila-10 e estearoil lactilato de sódio	-	-	-	-	2,00	5,00
Cera autoemulsificante base fosfato	3,50	3,50	3,50	5,00	-	-
Microemulsão de silicone	4,00	4,00	4,00	4,00	-	-
Octanoato de octila	3,00	3,00	3,00	3,00	-	-
Óleo de rícino hidrogenado e etoxilado	-	-	-	-	2,00	2,00
Monoestearato de glicerila	-	-	-	-	2,00	2,00
Glicerina	3,00	3,00	3,00	3,00	-	-
Propilenoglicol	3,00	3,00	3,00	3,00	5,00	3,00
Fenoxietanol e parabenos	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
EDTA dissódico	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Benzoato de alquila C12-C15	6,00	6,00	6,00	6,00	10,00	10,00
Ciclometicone	2,00	2,00	2,00	2,00	-	-
Água	qsp.	100	100	100	100	100

Tabela 4. Formulações estudadas.

Composição	F 7	F 8	F 9	F 10	F 11
Manteiga de Karité, sorbitan sesquioleato, polisorbato 20, carbômero e celulose	4,00	-	-	-	-
Poliacrilamida e C13-14 isoparafina e lauret-7	-	2,00	1,00	1,50	2,00
Pentaestearato de poliglicerila-10 e estearoil lactilato de sódio	-	2,00	2,00	3,00	3,00
Microemulsão de silicone	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Ciclometicone	1,50	-	-	-	-
Proprilenoglicol	2,50	2,00	2,00	2,00	2,00
Glicerina	2,50	3,00	3,00	3,00	3,00
Base de absorção de lanolina	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Octanoato de octila	3,00	-	-	-	-
Fenoxietanol e parabenos	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
EDTA dissódico	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Água qsp.	100	100	100	100	100

Tabela 5. Concentração de substâncias ativas presentes nas formulações objeto de estudo.

Substâncias ativas	F	FG	FA	FV	FVG	FVGA
	Concentração (%)					
Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	-	1,5	-	-	-	-
Extrato de algas vermelhas marinhas	-	-	5,0	-	-	5,0
Associação de vitaminas lipossolúveis	-	-	-	5,0	-	-
Associação de vitaminas lipossolúveis e extrato de <i>Ginkgo biloba</i> (Radizen A ®)	-	-	-	-	5,0	5,0

4.3. TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE

4.3.1. Centrifugação

Neste teste preliminar de estabilidade, 5 gramas de cada formulação elaborada foram centrifugados em 3 ciclos a 3000rpm, por 30 minutos em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440, Fanem (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI, MAIA CAMPOS, 2006; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012).

4.3.2. Avaliação visual

As amostras foram observadas visualmente quanto às seguintes alterações: cor, separação de fases, homogeneidade, diariamente no período de 30 dias às temperaturas ambiente e 45°C.

4.3.3. Determinação do pH

A medida de pH foi realizada em peagômetro Analion, utilizando-se amostras diluídas em água destilada (10%) (GIANETI, MAIA CAMPOS, 2006; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012).

4.4. ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA

As formulações que, acrescidas dos extratos e vitaminas em estudo, foram consideradas estáveis nos testes preliminares de estabilidade, foram submetidas ao estudo do comportamento reológico, realizado em reômetro modelo DV-III, marca Brookfield, tipo cone e placa. Para tal, amostras das formulações objeto de estudo foram mantidas em estufas termostatizadas com controle de umidade (75% de UR) às temperaturas de 25, 37 e 45°C, sendo que o rígido controle de umidade e de temperatura foram fundamentais para a obtenção de resultados confiáveis. Durante um período de 28 dias, alíquotas de 0,5g das amostras foram coletadas em intervalos de tempo de 7 dias e as medidas foram realizadas em velocidades de rotação progressivamente maiores para se obter a curva ascendente (0,10 a 0,70 rpm), e o procedimento foi então repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente menores (0,70 a 0,10 rpm), para a obtenção da curva descendente. A integração numérica das curvas foi realizada por meio do software Microcal Origin e a área sob a curva obtida para o cálculo da área de histerese (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012).

4.5. ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA

A formulação considerada mais estável nos testes preliminares de estabilidade e no estudo de estabilidade física, acrescida ou não dos extratos e vitaminas objeto de estudo, foi avaliada frente a estabilidade química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.1. Estudo de estabilidade química das formulações frente ao stress térmico

Neste estudo as formulações foram mantidas à temperatura ambiente e submetidas ao stress térmico, às temperaturas de 25, 37 e 45°C em estufas termostatizadas com controle de umidade (75%).

Alíquotas das amostras foram analisadas no tempo 0 (inicial), 7, 15, 30, 60 e 90 dias quanto à concentração remanescente de vitamina A, C e E, do extrato de algas marinhas vermelhas bem como de quercetina, marcador do extrato de *Ginkgo biloba*, por CLAE (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012A; GUARATINI, GIANETI, MAIA CAMPOS., 2006; ANVISA, 2011; IFSCC, 1992; HOWITZ, 1989).

4.5.1.1. Preparação das amostras das formulações

Amostras de 0,5g de todas as formulações objeto de estudo foram pesadas em balança analítica, Ohaus, modelo AS200. As extrações dos ingredientes ativos das formulações, para posterior análise em CLAE, foram realizadas utilizando balão volumétrico e 25 ml de álcool isopropílico, resultando numa concentração final teórica de 40ug/ml para as vitaminas A e E, 6ug/mL para a vitamina C, 1000ug/ml de extrato de algas marinhas e 30ug/ml de extrato de *Ginkgo biloba*. Todas as soluções foram filtradas em papel de filtro quantitativo (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006).

4.5.1.2. Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e a exatidão do método analítico, foram utilizadas 0,5g de amostra da formulação F11VGA, e submetidas ao procedimento de extração descrito no item 4.5.4.3.

Para a determinação da precisão e exatidão intra-ensaio, foram avaliadas, em quintuplicata, num mesmo dia, amostras das formulações F11VGA e para a determinação da precisão e exatidão inter-ensaio, foram avaliadas, em quintuplicata, em 5 dias consecutivos (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012A).

- Cálculos da precisão

A precisão de um método de análise está relacionada com a proximidade entre as medidas individuais obtidas ao redor de seu valor médio. Ele depende, entre outros fatores, do equipamento utilizado na determinação quantitativa e do procedimento de extração (WERKEMA, 1996).

Assim, as concentrações dos extratos e vitaminas nas amostras obtidas a partir das curvas analíticas, foram utilizadas para o cálculo do coeficiente de variação entre as medidas, de acordo com a fórmula abaixo:

$$CV = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

Fórmula 1. Cálculo da precisão.

Onde, S é a estimativa do desvio padrão e \bar{X} é a média dos valores obtidos.

- Cálculos da exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em estudo em relação ao valor verdadeiro, sendo normalmente expressa como o desvio percentual das concentrações calculadas em relação às concentrações reais (ANVISA, 2011).

Para este cálculo foram utilizadas as médias das concentrações obtidas nos estudos intra e inter-ensaio e a concentração teórica presente na amostra, segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100$$

Fórmula 2. Cálculo da exatidão.

Onde: CME é a concentração média experimental e CT é concentração teórica.

4.5.1.3. Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo líquido DAD, marca Shimatzu modelo LC-6AD equipado com detector de UV-DAD modelo SPD-M10Avp acoplado a um injetor automático modelo Sil-10AF e software CLASS-VP6.14 . As condições estabelecidas foram as seguintes:

- Fase móvel (eluição por gradiente): iniciou-se com uma concentração de 3 % de uma mistura de metano:isopropanol (55:45 v/v) e 97% de água, o gradiente foi linear até 17 minutos atingindo 84% de metano:isopropanol; esta concentração foi mantida até 20 minutos atingindo 100% de metanol:isopropanol; o gradiente foi mantido isocrático até 40 minutos; em seguida foi desenvolvido um gradiente linear por 5 minutos atingindo 3% de metanol:isopropanol e mantido isocrático até completar 55 minutos.

- Fluxo da fase móvel: 0,8 mL/min;
- Comprimento de onda: 325nm para detecção da vitamina A, 235nm para detecção das vitaminas C e E, 370nm para a detecção de quercetina e 334nm para a detecção do extrato de algas marinhas vermelhas;
- Coluna: Shim-pack C18 (5µm) 40 mm x 4 mm, (LiChrospher® 100 RP-18, 5µm, Merck®);
- Volume de injeção: 20 µl.

4.5.1.4. Curvas analíticas

Para a determinação das curvas analíticas foram utilizados os cromatogramas, em triplicata, das soluções de uso de todas as substâncias ativas em estudo, em álcool isopropílico, nas concentrações descritas no item 4.1.2, preparadas a partir da solução stock.

4.5.1.5. Determinação do prazo de validade

Após verificar-se, matematicamente, que os extratos e vitaminas em estudo seguem cinética de degradação de primeira ordem, as equações utilizadas foram (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012A; MARTIN *et al.*, 1993; PRISTA *et al.*, 1992):

$$\log \frac{C}{C_0} = \frac{-K}{2,303} xt(\text{dias})$$

Fórmula 3. Determinação da constante de degradação (K).

$$\Delta Ha = 2,303R \frac{T_1 T_2}{T_1 - T_2} x \log \frac{K_1}{K_2}$$

Fórmula 4. Energia de activação.

$$\log K = \log A - \frac{\Delta Ha}{2,303xR} x \frac{1}{T}$$

Fórmula 5. Equação de Arrhenius.

$$tm = \frac{2,303}{K} x \log \frac{x_0}{x}$$

Fórmula 6. Equação para determinar o prazo de validade de ativos que tenham degradação de cinética de primeira ordem.

Onde:

C = concentração no tempo t (dias)

C₀ = Concentração inicial (100%)

R = Constante de gases perfeitos (1,987 cal⁻¹ K⁻¹)

T = temperatura absoluta (Kelvin)

tm = tempo de vida útil do ativo na concentração estipulada para o prazo de validade (90 ou 85%)

x = Concentração do ativo após o término do prazo de validade (90 ou 85%)

x₀ = Concentração inicial

K₁ = Constante de degradação da substância na temperatura T₁

K₂ = Constante de degradação da substância na temperatura T₂

ΔHa = Energia de ativação

Casística e Métodos

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. TESTE DE COMPATIBILIDADE CUTÂNEA

Este estudo foi realizado em colaboração com o Instituto de Bioengenharia da Pele Evic Brasil Ltda, São Paulo - SP. Os voluntários foram esclarecidos e orientados sobre os objetivos e métodos da pesquisa e, concordando em participar da mesma, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido elaborado segundo a declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

O objetivo do estudo foi avaliar a irritabilidade cutânea, ou seja, a compatibilidade cutânea, primária das formulações objeto de estudo, bem como um controle dos riscos previsíveis incorridos pelos voluntários participantes. Houve uma adequação entre o objetivo do estudo e os possíveis riscos relacionados às modalidades planejadas no protocolo.

Este estudo foi realizado em concordância com a Legislação Brasileira, baseada na “Resolução Normativa 196/96, CNS/MS” e aprovação do pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos Hospital Leonor Mendes de Barros.

Para tal, foram selecionados 25 voluntários do sexo feminino e masculino, sendo que o teste foi realizado com apenas 23 uma vez que um voluntário desistiu do estudo e outro apresentou reações ao propósito de estudo, de fototipo I a IV (PATHAK; FITZPATRICK, 1993), com idades entre 18 e 60 anos. Para a seleção desses voluntários, foram considerados os seguintes critérios de exclusão: marcas cutâneas na área experimental que pudessem interferir na avaliação das reações cutâneas (problemas de pigmentação, elementos de cicatrizes, pilosidade super desenvolvida, queimaduras solares, etc.); reação eczematosa ainda visível, cicatriz ou sequela de pigmentação sobre a área experimental referentes a estudos anteriores; alergia ao níquel; alergia ou reatividade para a categoria do produto estudado; dermatografismo; hiper-reatividade cutânea; atopia; alergia a esparadrapo; exposição intensiva ao sol nos meses precedentes ao início do estudo; previsão de exposição intensiva ao sol ou exposição UVA (lâmpadas UV) durante o período do estudo; previsão de banho de piscina, mar ou banheira e sessões de sauna ou bronzamento durante a realização do estudo; tratamento com vitamina A ácida e/ou seus derivados nos três meses antecedentes ao início do estudo; tratamento tópico com corticóides na área experimental ate oito dias antes do início do estudo; tratamento com radiação UVA ou UVB até um mês antes do início do estudo; gravidez ou lactação; previsão de vacinação durante a realização do estudo ou vacinação até três semanas antes do estudo; tratamento com medicamentos anti-inflamatórios ou antialérgicos há 15 dias antes do estudo.

A pesquisa foi realizada utilizando-se o teste de irritação cutânea primária, ou seja, o teste de contato (*patc test*) que consiste na aplicação do produto na forma oclusiva. Neste teste, 20µL das 6 formulações em estudo foram aplicadas de maneira randomizada sobre cúpulas de alumínio com área de 50 mm² (FINN CHAMBER®) colados por um adesivo hipoalergênico (*Scampor*®), que foi fixada

na área dorsal dos voluntários. Foi reservada uma outra área experimental em que não foi aplicado o produto, para ser utilizada como controle. Além disso, um apósito controle, correspondente ao tipo de apósito utilizado no estudo, contendo soro fisiológico foi aplicado concomitantemente aos apósitos com o produto teste.

Após aproximadamente 48 horas, o teste de contato foi removido da pele e a avaliação visual do resultado foi efetuada após regressão do eritema ocasionado pela retirada da fita adesiva, ou seja, após aproximadamente 15 minutos da remoção do apósito. A avaliação foi realizada de acordo com a Tabela 6 que estabelece a escala definida pelo ICDRG (International Contact Dermatitis Reserch Group) (GASPAR et al., 2008 A).

Tabela 6. Critérios de avaliação de teste de contacto propostos pelo ICDRG.

Reação	Resultado
0 - Ausente	Negativo (-)
1 - Eritema leve	Duvidoso (?)
2 - Eritema nítido	Positivo (+)
3 - Eritema + edema + pápulas	Positivo (++)
4 - Eritema + edema + pápulas + vesículas	Positivo (+++)

5.2. AVALIAÇÃO SENSORIAL

Neste estudo, 20 voluntárias foram orientadas a aplicar uma quantidade padronizada ($100\text{mg}/\text{cm}^2$) das formulações objeto de estudo, em regiões distintas na porção inferior média dos antebraços, e em seguida receberam um questionário de avaliação sensorial no qual constavam perguntas relacionadas ao toque, espalhabilidade, textura, sensação na aplicação, hidratação e sensação da pele após 5 minutos da aplicação (GASPAR et al., 2008A; WORTEL; WIECHERS, 2000; CHENG et al., 2009).

5.3. QUANTIFICAÇÃO DO LIMAR DE PERCEPÇÃO A UMA CORRENTE ELÉTRICA

A quantificação do limiar de percepção a uma corrente elétrica (CPT) das fibras nervosas sensoriais foi realizada utilizando-se um estimulador elétrico de onda senoidal (*Neurometer*® CPT/C, Neurotron Inc. Baltimore, USA). A CPT representa o estímulo elétrico transcutâneo requerido para provocar a menor sensação neuroseletiva. As frequências de 5, 250 e 2000 Hz, produzidas pelo *Neurometer*®, são conhecidas por quantificar, seletivamente, as fibras nervosas presentes na pele A β , A δ e C, respectivamente (PORCHERON et al., 2011; KOGA, FURUE, RASHID, 2005; PROCHERON et al., 2008). Todas as medidas foram realizadas na bochecha (PROCHERON et al., 2008) de 20 voluntárias, antes e após 2 horas de aplicação da formulação F11XVGA, sendo que de um lado da face foi aplicada a formulação (região teste) e do outro lado não foi aplicada nenhuma

formulação (região controle). Este estudo foi realizado com o apoio do Centro de Pesquisa e Investigações Epidérmicas da Chanel (CE.R.I.E.S.), Paris (França).

Para auxiliar na interpretação dos resultados, em paralelo ao limiar de percepção a uma corrente elétrica neste estudo foram avaliados os parâmetros conteúdo aquoso do estrato córneo, perda transepidérmica de água (descritos nos itens 5.4.2 e 5.4.3, respectivamente) e conteúdo de sebo da pele, descrito a seguir.

5.3.1. Determinação do conteúdo de sebo

O conteúdo de sebo foi avaliado na testa das voluntárias utilizando-se o equipamento *Sebumeter*® SM810. Para tal, uma fita especial opaca de 64mm² foi pressionada sobre a pele por 30s com uma ligeira pressão para recolher o sebo. O consequente aumento da transparência da fita foi medido pelo equipamento pelo método fotométrico, e os valores apresentados correspondem à quantidade de sebo na superfície da pele em µg de sebo/cm² (DOBREV, 2007; CHENG et al. 2009). Foram realizadas duas medidas em cada região da testa das voluntárias (teste e controle).

5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA PELE FRENTE VARIAÇÃO DO CLIMA

As variações no clima são os principais causadores de alterações cutâneas podendo alterar as propriedades biofísicas e também o sistema nervoso da pele. Essas alterações podem explicar o aparecimento de sintomas de pele sensível. Neste contexto, para melhor entender estes sintomas, foram avaliados os efeitos da variação da temperatura ambiente na sensibilidade cutânea, na função das fibras nervosas e nas propriedades biofísicas da pele, bem como a ação de uma formulação cosméticas contendo extratos vegetais e vitaminas sobre a pele submetida a mudanças de temperatura. Este estudo foi realizado com o apoio do Centro de Pesquisa e Investigações Epidérmicas da Chanel (CE.R.I.E.S.), Paris (França).

Após a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da AFSSAPS (França), 45 mulheres brancas com idade entre 25-35 anos de idade foram convidadas a participar do estudo, que foi realizado no Laboratório de Imagens e Neurociências Cognitivas da Universidade de Strasbourg (France) em parceria com o CE.R.I.E.S. – Chanel.

Durante o estudo, as voluntárias foram expostas a duas câmaras climatizadas, com temperatura estável e controlada de 21°C e de 5°C, respectivamente. Após 30 min. de aclimação à 21°C, as voluntárias mudavam para a câmara à 5°C onde permaneciam por 60 min., e depois voltavam para a câmara de 21°C onde permaneciam por mais 85 min., como protocolo experimental abaixo:

20°C+/-2°C, 50% +/-5% UR		5°C, 20% UR		20°C+/-2°C, 50% +/-5% UR			
8h30 – 9h	9h – 9h15	9h15 – 10h	10h – 10h15	10h15 – 10h30	10h30 – 10h45	10h45 – 11h30	11h30 – 11h45
	T1		T2		T3		T4
Aclimação	Medidas 1		Medidas 2		Medidas 3		Medidas 4
Avaliação do conforto térmico e das sensações subjetivas da pele (escala analógica)							

Dentre as 45 voluntárias participantes do estudo, 15 foram orientadas a aplicar a formulação cosmética multifuncional objeto de estudo (F11XVGA) contendo a associação de derivados lipossolúveis das vitaminas A, C e E, e os extratos de Ginkgo biloba e de algas marinhas vermelhas (*Porphyra umbilicalis*).

O limiar de percepção a uma corrente elétrica (CPT) das fibras C, A δ e A β , bem como os parâmetros de hidratação (conteúdo aquoso do estrato córneo e perda transepidérmica de água) foram medidas usando o equipamento Corneometer® (Coragem & Khazaka GmbH eletrônica, Colônia, Alemanha) e Tewameter® (Coragem & Khazaka GmbH eletrônica, Colônia, Alemanha), respectivamente. A temperatura da pele, pH e a resposta das fibras nervosas (CPT) foram medidos utilizando-se um termômetro com uma sonda (Testo 945, Testo GmbH & Co, Alemanha), pHmetro (Coragem & Khazaka GmbH eletrônica Colônia, Alemanha) e o Neurometer®, respectivamente. As medidas foram realizadas na face (fronte) antes de passar pela câmara fria, em ambiente controlado (21°C + / - 2 °C, 50% + / - 5% UR), após 45 minutos de exposição à câmara à 5°C, e após o retorno a câmara de 21°C (após 15 min e 1h15 min) (PORCHERON et al., 2011).

Em paralelo, o conforto térmico e as sensações subjetivas de pele foram avaliados usando uma escala analógica de avaliação visual onde foram feitas perguntas relacionadas ao conforto térmico, estado térmico global, estado térmico da face, hidratação da pele e sensações desagradáveis na pele.

5.5. ESTUDO PRELIMINAR DE AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES

5.5.1. Triagem das voluntárias

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Anexo 1) foram selecionadas 21 voluntárias com idades entre 25 e 55 anos e pele tipo II a III e IV, para a realização de um estudo preliminar para avaliar a eficácia das formulações em estudo. As voluntárias foram orientadas sobre os objetivos e métodos da pesquisa e, concordando em participar da mesma, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2 e 3).

As formulações (contendo ou não as substâncias ativas objeto de estudo descritas na Tabela 4 e 5 do item 4.2) foram aplicadas na região anterior média dos antebraços das voluntárias, sendo que um grupo de voluntárias não aplicou nenhuma formulação em um dos antebraços (grupo controle), por

um período de 30 dias. Antes da realização das medidas, as voluntárias permaneceram durante 30 minutos em ambiente com temperatura e umidade relativa do ar controlados, 20-22°C e 45 - 55%, respectivamente, para a aclimação (DAL' BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). Foram realizadas medidas antes (valores basais) e após 30 dias de uso das formulações (efeito à longo prazo).

5.5.2. Instrumentação

A avaliação clínica da eficácia das formulações objeto de estudo foi avaliada pelas técnicas de biofísica e de análise de imagem da pele descritas a seguir.

5.5.2.1. Avaliação do Ângulo tipológico individual

O ângulo tipológico individual, conhecido por ser um valor objetivo e quantitativo para avaliar a coloração da pele, foi avaliado utilizando-se o equipamento *SkinColorimeter*®, um analisador de cor que mede a reflexão das cores na superfície da pele. Este equipamento vem sendo utilizado por obter medidas objetivas de mudanças de eritema e pigmentação da pele (LIM et al., 2008; PARK et al., 2008; RUIZ et al., 2008).

Para tal, foram efetuadas 3 medidas em cada região do antebraço das voluntárias, sendo calculada o ITA° (ângulo tipológico individual) para classificar a pele das voluntárias (LIM et al., 2008; PARK et al., 2008; RUIZ et al., 2008).

5.5.2.2. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento *Corneometer*® CM 825, baseado no princípio da medida da capacitância elétrica, ou seja, na variação da constante dielétrica da água. Os resultados foram fornecidos em unidades arbitrárias (UA) onde se estima que 1 UA corresponda a 0,2 - 0,9 mg de água por grama de estrato córneo. Foram efetuadas 10 medições em cada região dos antebraços das voluntárias, sendo calculada a média dos valores obtidos (DAL' BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, CURDY et al., 2004).

5.5.2.3. Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento *Tewameter*® TM 210, acoplado a um software, cuja função é medir a perda transepidérmica de água, baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick. Os valores são dados em $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. A sonda do aparelho permaneceu por 2 minutos sobre a pele nas regiões dos antebraços, e o valor médio das 12 medidas obtidas neste intervalo de tempo será empregado nos cálculos posteriores (GIOIA; CELLENO, 2002).

5.5.2.4. Determinação do micro-relevo cutâneo

Neste estudo foi utilizado o equipamento *Visioscan*® VC 98 o qual permite a avaliação quali e quantitativa da superfície da pele nas condições fisiológicas, por meio de técnicas de profilometria

óptica. Com este método foram avaliados os seguintes parâmetros relacionados à superfície da pele (SELS - *Surface Evaluation of Living Skin*): Ser - porção de pontos escuros que representam a aspereza da pele (picos); Sew - número e largura das rugas (vales), sendo que quanto maior número de rugas maior é este valor; Sesm refere-se à forma e largura das rugas, sendo que quanto maior o valor dessa variável melhor a suavidade e maciez da pele. Será avaliado ainda o parâmetro R_t (rugosidade), relacionado à profundidade das rugas (picos + vales) (FISCHER; WIGGER-ALBERTI; ELSNER, 1999; LEVY et al., 2004).

5.5.2.5. Determinação das propriedades visco-elásticas da pele

Para tal avaliação foram realizadas medidas utilizando o equipamento *Cutometer SEM 575*, acoplado a um software. Este aparelho possui uma sonda com um orifício de 2 mm de diâmetro contendo um sistema de leitura óptico. Essa sonda exerce uma pressão negativa sobre a pele, sendo que a intensidade de luminosidade captada é proporcional à penetração da pele no dispositivo (DOBREV, 2000).

5.5.2.6. Determinação da anisotropia da pele

Para tal avaliação foi utilizado o equipamento *Reviscometer® RV600*, o qual determina o tempo necessário para uma onda de ultrassom percorrer uma determinada distância através da pele (RRTM - *Resonance running time measurements*). A sonda do ultrassom foi colocada sobre a pele das voluntárias, em diferentes posições. Com este equipamento, foi determinada anisotropia da pele ($RRTM_{máx} / RRTM_{min}$). Quanto mais próximo de 1 a anisotropia da pele, menor a desorganização das fibras de colágeno e elastina, o que reflete no aumento da firmeza da pele (HERMANNNS-LÊ et al., 2001; RUVOLO; STAMATAS; KOLLIAS, 2007).

5.5.2.7. Avaliação da espessura e ecogenicidade da derme por ultrassom

O ultrassom de 20 MHz é um método seguro e não invasivo de avaliação de alterações e da espessura da derme (DYKES, MARKS, 1977; UNHOLZER, KORTING, 2001). Esse equipamento é importante no prognóstico de tumores cutâneos, uma vez que auxilia de maneira decisiva no planejamento cirúrgico (UNHOLZER, KORTING, 2001).

Para a avaliação da espessura da derme foi utilizado um equipamento de ultrassom de 20MHz *DermaScan C®* (Cortex, Dinamarca). A espessura da derme foi determinada por um analisador de imagem. A sonda do equipamento possui um transdutor de focalização acentuada utilizado para obter imagens bidimensionais transversais, representadas no software no modo-B (FULLERTON, SERUP, 1997; AGNER, SERUP, 1989). A onda ultrassônica (velocidade de 1580 / s) é parcialmente refletida nas estruturas da pele e produz ecos de diferentes amplitudes, a intensidade dos ecos refletidos (ecogenicidade) é avaliada por um microprocessador e visualizada como uma imagem colorida de duas dimensões. A escala de cores da ecogenicidade vai do branco > vermelho > amarelo verde > azul

ao preto, sendo o branco a cor mais ecogênica e o preto menos ecogênico (GNIADÉCKA et al., 1998, UNHOLZER, KORTING, 2001).

Este equipamento permite ainda a determinação da ecogenicidade, por unidade de área, determinada em pixels, com o auxílio de um software, que está relacionada com retenção de água entre as fibras de colágeno e com o envelhecimento e fotoenvelhecimento (GNIADÉCKA; JEMEC, 1998).

5.6. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA

Após o estudo preliminar e definição do método a serem utilizados foi realizado um estudo de eficácia clínica das formulações em estudo por um período de 90 dias de aplicação diária, como descrito a seguir.

5.6.1. Triagem das voluntárias

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Anexo 1) foram selecionadas 45 voluntárias com idades entre 30 e 55 anos e pele tipo II a III e IV, para a realização do estudo de avaliação da eficácia das formulações em estudo. As voluntárias foram orientadas sobre os objetivos e métodos da pesquisa e, concordando em participar da mesma, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

No estudo de cinética de eficácia (efeito imediato após uma única aplicação) a região anterior média dos antebraços de 15 voluntárias foram divididos em 3 regiões totalizando 6 regiões de estudo, onde foram aplicadas randomicamente as formulações objeto de estudo e uma região onde não foi aplicada nenhuma formulação (controle). Foram realizadas medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo, perda transepidermica e micro relevo cutâneo utilizando-se os equipamentos *Corneometer CM 825*, *Tewameter MX16* e *Visioscan VC 98*, respectivamente. Foram realizadas medidas antes e após 2, 4, 6, 8 e 24h de aplicação das formulações em estudo para a obtenção da cinética de eficácia destas após uma única aplicação.

Para o estudo de eficácia em longo prazo, as formulações contendo as substâncias ativas objeto de estudo foram aplicadas randomicamente região anterior média dos antebraços e apenas a formulação contendo a associação de ativos e o veículo foram aplicados randomicamente na face das voluntárias, sendo que um grupo de voluntárias não aplicou nenhuma formulação em um dos antebraços (grupo controle). Foram realizadas medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo, perda transepidermica, do micro relevo cutâneo, das propriedades mecânicas da pele dos antebraços utilizando-se os equipamentos *Corneometer CM 825*, *Tewameter MX16*, *Visioscan VC 98*, *Cutometer SEM 575* e *Reviscometer RV600*, respectivamente como descritos nos itens 5.4.3.

Na face foram realizadas medidas da coloração da pele (item 5.5.2), da ecogenicidade e espessura da derme (item 5.4.3.7), da homogeneidade da pele facial (item 5.5.3) e uma avaliação

microscópica da epiderme (item 5.5.4) utilizando-se os equipamentos *Skin Colorimeter*, *DermaScan C*, *VisioFace Quick* e *VivaScope 1500*, respectivamente, como metodologia descrita a seguir.

Foram realizadas medidas antes (tempo 0) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações em estudo.

5.6.2. Avaliação da coloração da pele

A avaliação da coloração da pele foi realizada com o objetivo de determinar um possível efeito clareador das formulações em estudo. Para tal, os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e ITA° (ângulo tipológico individual), foram medidos utilizando-se o equipamento *SkinColorimeter®*, um analisador de cor que mede a reflexão das cores na superfície da pele. Este equipamento vem sendo utilizado por obter medidas objetivas de mudanças de eritema e pigmentação da pele (LIM et al., 2008; PARK et al., 2008; RUIZ et al., 2008).

Para tal, foram efetuadas 3 medidas em cada região do antebraço das voluntárias, sendo calculada a média dos valores para avaliar a coloração da pele das voluntárias (LIM et al., 2008; PARK et al., 2008; RUIZ et al., 2008).

5.6.3. Avaliação da homogeneidade facial

Diversos equipamentos de medidas não invasiva contendo dispositivos ópticos tem sido desenvolvidos para a análise quantitativa da pele facial (BAE, JUNG, 2008; MARGHOOB et al., 2003). Dentre esses se destaca o equipamento que consiste de uma cabine acoplada a uma câmera digital de alta resolução (10 Mega Pixels) e 200 LEDs de diodos brancos, permitindo a avaliação da face frontal ou lateralmente. O equipamento é acoplado a um software de investigação que permite a avaliação de manchas visíveis (na imagem colorida), poros, rugas e diferenças de cor em uma área de interesse escolhida, selecionada manualmente.

A imagem obtida com as luzes de LED são fortemente absorvidas pela melanina presente na epiderme, resultando em uma imagem com os pontos contendo melanina exacerbados (ASAWANONDA, TAYLOR, 1999), permitindo assim a avaliação de manchas invisíveis ao olho nu, as quais poderão se tornar visíveis com o envelhecimento cutâneo e exposição solar. Em contraste, a pele desprovida de melanina parece mais clara e menos iluminada por causa do colágeno que reflete a luz de LED e autofluoresce (CHWIROT et al., 1998).

5.6.4. Microscopia confocal a laser

A microscopia confocal a laser por refletância baseia-se na obtenção de imagens de luz refletida por um tecido vivo (WEBB, 1999, GONZALEZ et al., 2008).

Um microscópio confocal consiste de uma fonte de luz, um condensador, uma objetiva e um detector. A fonte de luz ilumina uma pequena área tridimensional dentro de uma amostra como, por exemplo, a pele. Este ponto iluminado é então digitalizado para o detector através de uma pequena

abertura. A pequena abertura permite apenas a entrada da luz que se origina a partir do ponto de iluminação focado, à luz que se origina fora do local é refletida (RAJADHYAKSHA, GONZALEZ, ZAVISLAN, 2004). A fonte de luz, o local iluminado e a abertura de detecção estão opticamente conjugados e este arranjo é chamado de confocal (JASAITIENE et al. 2011; GONZALEZ et al., 2008).

A região focada é digitalizada horizontalmente ao longo de uma grade bi dimensional, obtendo-se uma secção microscópica horizontal da pele (WEBB, 1999). Também é possível obter uma série de imagens de planos horizontais empilhadas verticalmente, ou seja, imagens de profundidade da pele. Desta maneira, com a microscopia confocal a laser é possível obter imagens horizontais das diferentes camadas da pele, do estrato córneo até a derme papilar (JASAITIENE et al. 2011; GONZALEZ et al., 2008).

As imagens confocal são obtidas em escala de cinza, sendo que branco representa a luz total refletida e preto representa região sem reflexão. Mais luz é refletida quando o tecido contém estruturas de tamanho similar ao comprimento de onda da fonte de luz (LONGO et al., 2011; SCHMID-WENDTNE, DILL-MLLER, 2008) e sistemas de microscopia confocal de reflectância usam um laser como fonte de luz. A obtenção das imagens baseia-se na presença de contraste endógeno (RAJADHYAKSHA, GONZALEZ, ZAVISLAN, 2004), que é fornecido por microestruturas, tais como a melanina ou organelas celulares como hemoglobina (LONGO et al., 2011; AGACHE, HUMBERT, 2005).

Como condutor do laser é utilizado água (imersão em água ou gel aquoso de ultrassom) que possui índice de refração (1,33) próximo ao da epiderme (1,34) e, portanto não interfere nas imagens obtidas. A presença de circulação sanguínea na região da pele estudada pode ser um problema durante a obtenção da imagem. Para superar isso, um anel de contato é utilizado para reduzir alterações de movimento e para conter o meio de imersão para a lente objetiva durante a obtenção da imagem (JASAITIENE et al. 2011).

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE

Todas as formulações desenvolvidas apresentaram perda de viscosidade após a adição das vitaminas e/ou dos extratos objeto de estudo.

As formulações F2, F3 e F7 apresentaram floculação seguida de separação de fases logo após a emulsificação, demonstrando que os polímeros de consistência (Copolímero de amônio acriloldimetiltaurato/VP e Polissacarídeo obtido de *Sclerotium gum*, respectivamente) e a base auto-emulsificante (manteiga de Karité, sorbitan sesquioleato, polisorbato 20, carbômero e celulose) empregados nestas formulações não são compatíveis com a associação de filtros solares utilizados.

A formulação F4, contendo as vitaminas e/ou dos extratos objeto de estudo, apresentou separação de fases logo após o preparo, indicando uma incompatibilidade desta formulação com as substâncias ativas objeto de estudo.

6.1.1. Centrifugação

As formulações F1, F5, F6, F8, F9, F10 e F11, não apresentaram separação de fases após 3 ciclos de 30 minutos de centrifugação à 3000rpm.

6.1.2. Avaliação visual

A formulação F1, contendo ou não as substâncias ativas objeto de estudo, apresentou gotas de óleo na superfície após 7 dias à 45°C, levando a uma completa separação de fases após 30 dias, indicando instabilidade da formulação.

A formulação F5, contendo as vitaminas e/ou dos extratos objeto de estudo, apresentou grande perda de viscosidade após 7 dias de estocagem a temperatura de 45°C e uma completa separação de fases após 10 dias nas temperaturas ambiente e a 45°C.

Após 7 dias à temperatura de 45°C a formulação F6, contendo a associação de vitaminas lipossolúveis e/ou o extrato da algas marinhas vermelhas, apresentou um forte escurecimento.

As formulações F8, F9 e F10 apresentaram grande perda de viscosidade após 10 dias à temperatura de 45°C e completa separação de fases após 30 dias.

A formulação F11 não apresentou sinais de instabilidade após 30 dias de estocagem às temperaturas ambiente e 45°C.

Os sinais de instabilidade observados com as formulações citadas anteriormente pode ser devido ao balanço inadequado de agentes de consistência, agentes emulsionantes e substâncias ativas empregadas na formulação (MAIA CAMPOS, 1994; RIEGER, 2000).

6.1.3. Determinação do pH

Os valores de pH obtidos para as formulações estudadas encontram-se na Tabela 7. As formulações objeto de estudo não apresentaram modificações no pH após 30 dias de estocagem nas temperaturas ambiente e de 45°C.

O pH de uma formulação cosmética é importante para a estabilidade, eficácia e para a compatibilidade da mesma com o manto ácido da pele (RODRIGUES, 1997). As formulações estudadas apresentaram pH adequado para o uso tópico uma vez que foram obtidos valores compatíveis com o da pele, ou seja, valores levemente ácidos (MAIA CAMPOS, 1994).

Tabela 7. Valores de pH obtidos para as formulações estudadas.

Formulação estudada	pH	Formulação estudada	pH
F1	6,2	F9	6,2
F1G	5,9	F9G	6,3
F1V	6,0	F9V	5,9
F1VG	6,2	F9VG	6,0
F1A	6,1	F9A	6,1
F1VGA	6,0	F9VGA	6,2
F5	5,8	F10	6,2
F5G	5,9	F10G	6,0
F5V	6,0	F10V	6,0
F5VG	6,3	F10VG	6,1
F5A	6,2	F10A	5,9
F5VGA	6,0	F10VGA	6,0
F6	6,0	F11	5,9
F6G	5,9	F11G	6,2
F6V	5,8	F11V	6,1
F6VG	6,2	F11VG	6,3
F6A	6,1	F11A	5,9
F6VGA	5,9	F11VGA	5,9
F8	6,1		
F8G	6,1		
F8V	6,2		
F8VG	5,9		
F8A	6,0		
F8VGA	6,0		

6.2. ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA

O estudo da estabilidade física foi realizado com a formulação F11 uma vez que esta não apresentou alterações de cor, odor ou separação de fases durante o experimento nos testes preliminares de estabilidade, o que pode ser indicativo de que esta formulação provavelmente não apresentará problemas futuros de estabilidade (KLEIN, 1999), bem como apresentou pH adequado para aplicação na pele.

A análise do comportamento reológico é importante uma vez que este fornece informações relacionadas à estabilidade física da formulação durante sua vida de prateleira, assim como sua performance no momento da aplicação (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003).

A fim de se determinar o melhor método de preparo das formulações contendo filtro solar físico (dióxido de titânio) foram padronizados dois diferentes métodos de preparo:

- adicionando-se o dióxido de titânio na fase oleosa, antes do aquecimento e da emulsificação (F11);

- adicionando-se o dióxido de titânio disperso na base de absorção de lanolina, imediatamente após a emulsificação (F11X).

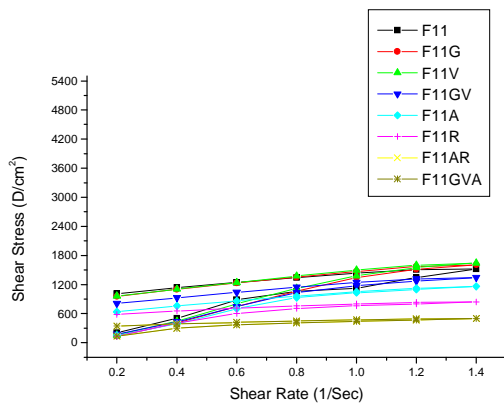
Ainda, foram avaliadas formulações, contendo ou não as substâncias ativas objeto de estudo, mas sem a associação de filtros solares (F11N) as quais serão de uso noturno nos estudos de avaliação da eficácia na pele humana.

O programa utilizado para a análise reológica apresentou baixa rotação (0,7 rpm) pois acima deste valor as formulações estudadas apresentaram torque maior que 100% o que causou erros no equipamento. Os valores de rpm foram baixos comparados com os utilizados normalmente em estudos reológicos (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003), no entanto, o mesmo comportamento foi observado por outros autores que utilizaram a mesma base auto-emulsificante utilizada na formulação F11, F11X e F11N (poliacrilamida, C13-14 isoparafina e lauret-7) (GUARATINI et al., 2006; QUINALIA, 2002).

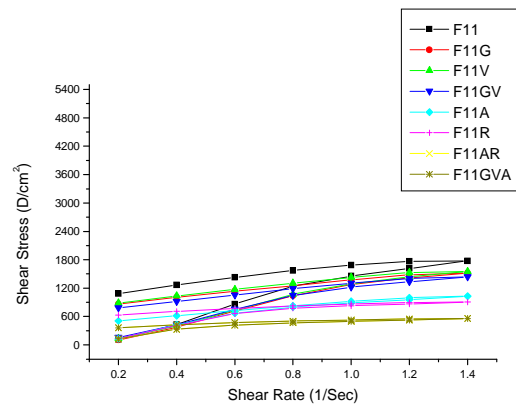
O comportamento reológico das formulações estudadas foi avaliado por meio dos reogramas (Figuras 13-21), do valor de viscosidade aparente mínima (Tabela 8 e Figuras 22-24), do índice de fluxo (Tabela 9 e Figuras 25-27), do índice de consistência (Tabela 10 e Figuras 28-30) e da área de histerese (tixotropia) (Tabela 11 e Figuras 31-33), obtidos ao longo do período de 28 dias.

Avaliando-se o conjunto de variáveis que fazem parte do estudo reológico podemos observar que a formulação F11X (adicionando-se o dióxido de titânio disperso na base de absorção de lanolina, imediatamente após a emulsificação), contendo ou não as substâncias ativas objeto de estudo, foram consideradas mais estáveis, pois, apresentou menores variações nos parâmetros analisados e, portanto, será utilizada nos estudos posteriores.

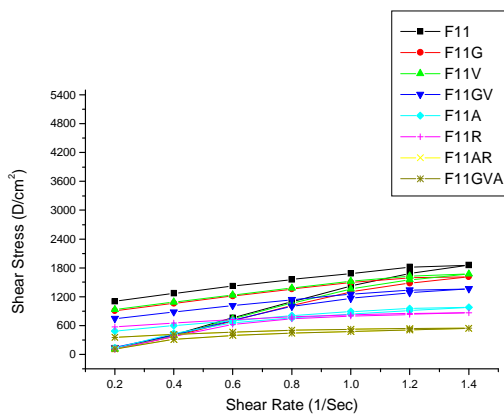
A



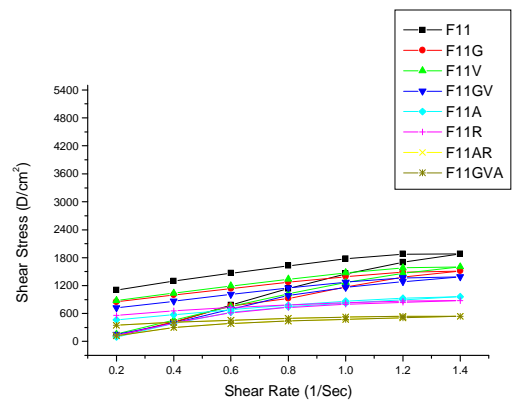
B



C



D



E

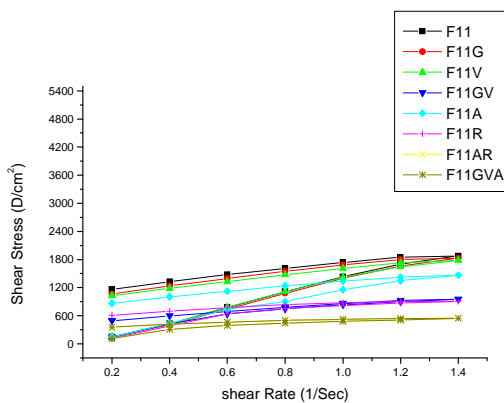
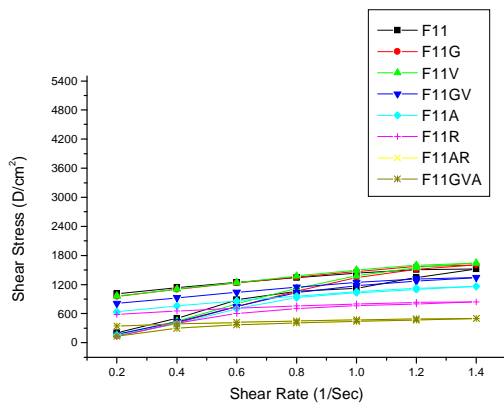
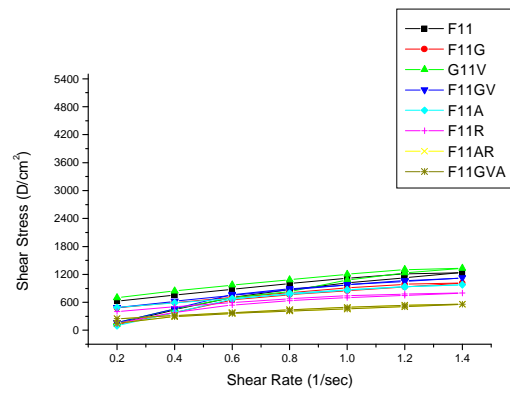


Figura 13: Reogramas das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura ambiente, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

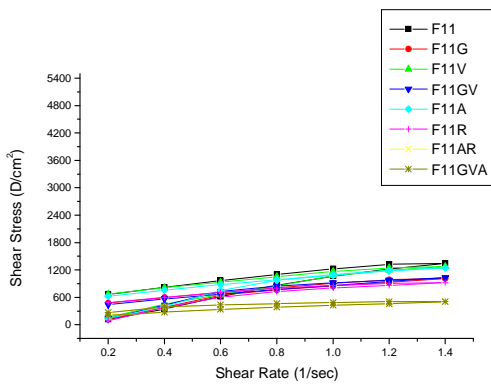
A



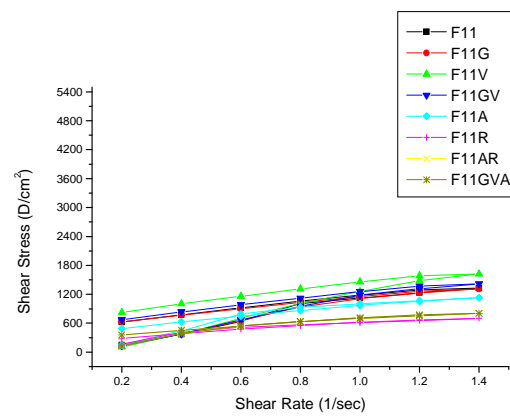
B



C



D



E

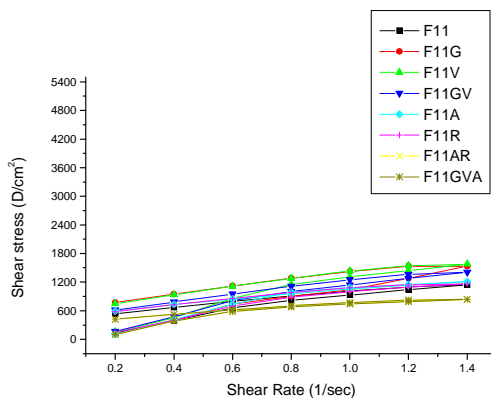
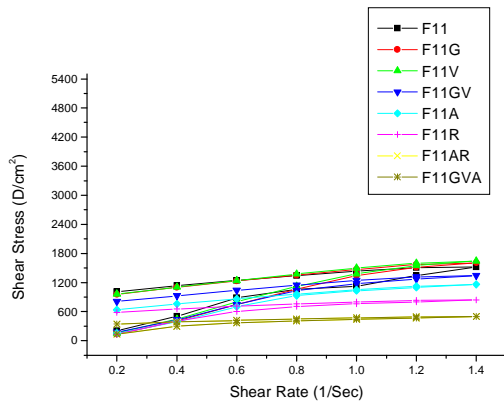
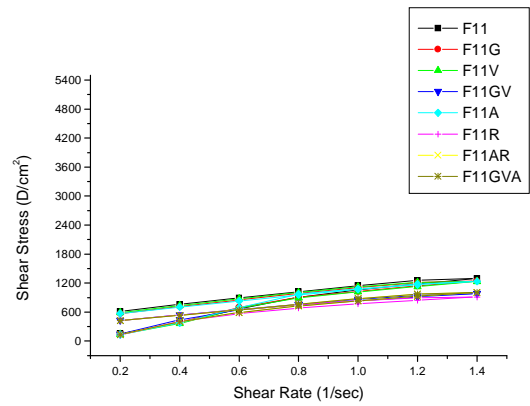


Figura 14: Reogramas das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 37°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

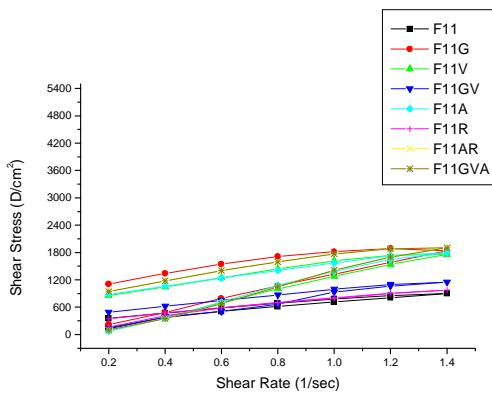
A



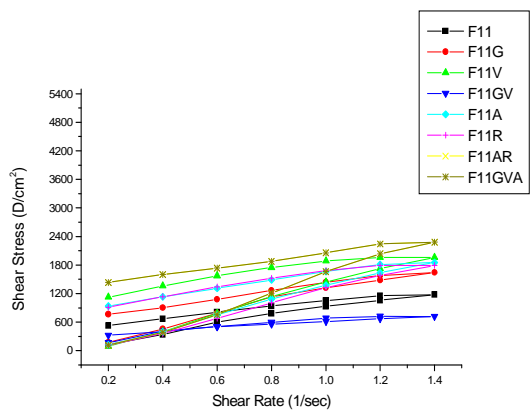
B



C



D



E

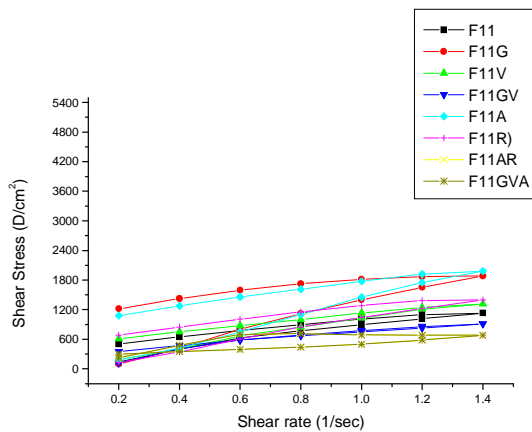
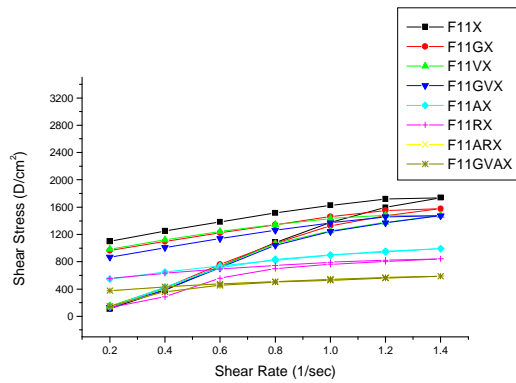
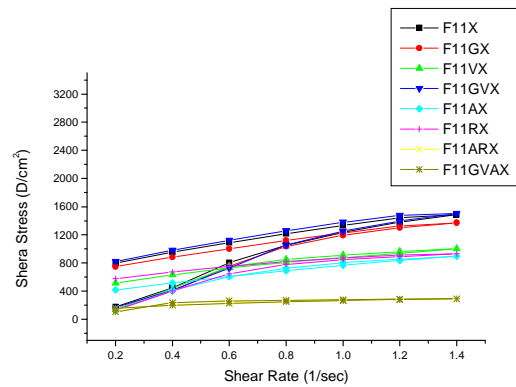


Figura 15: Reogramas das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 45°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

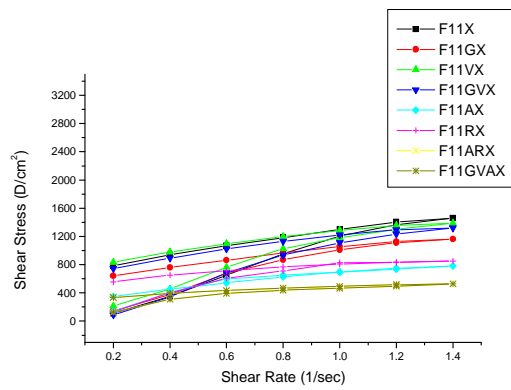
A



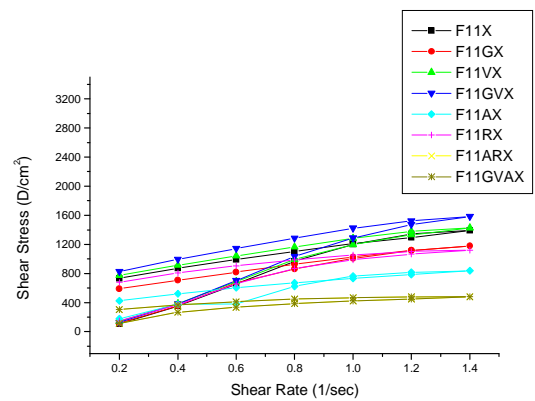
B



C



D



E

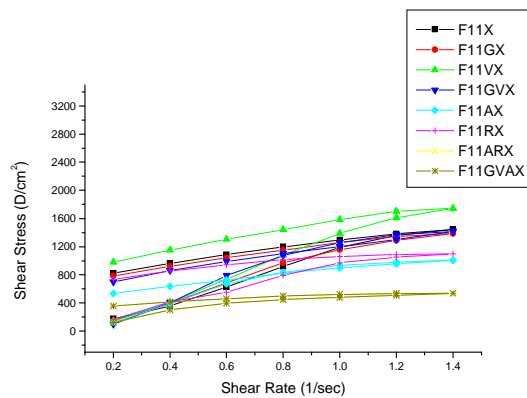
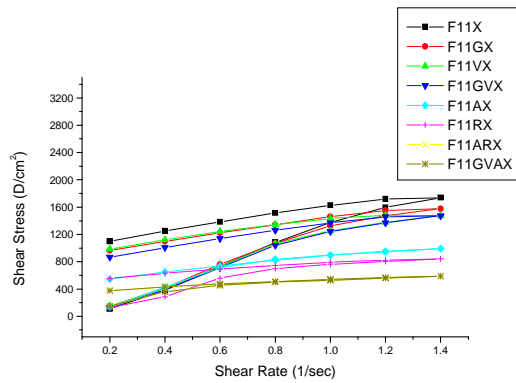
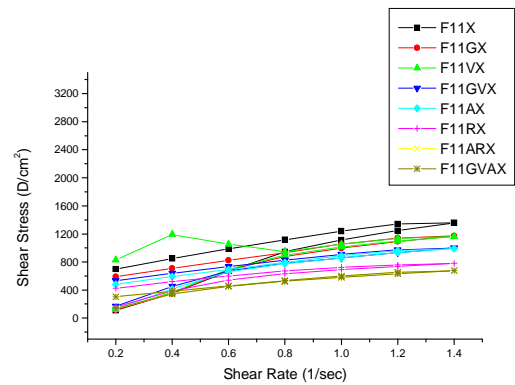


Figura 16: Reogramas das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura ambiente, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

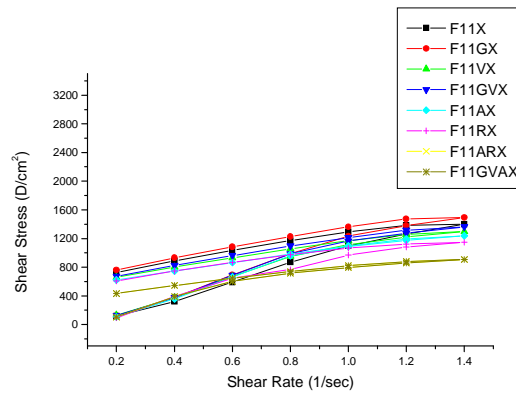
A



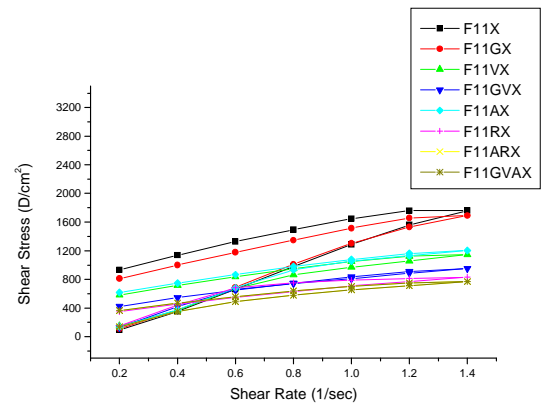
B



C



D



E

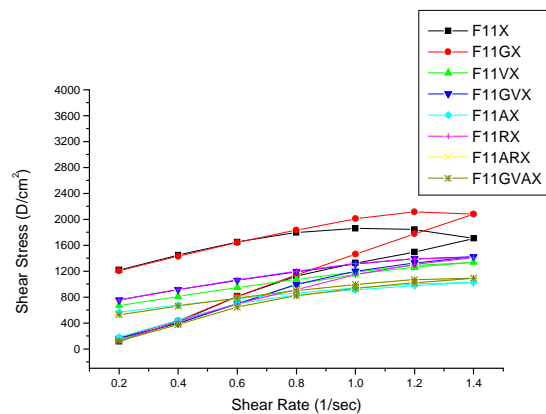
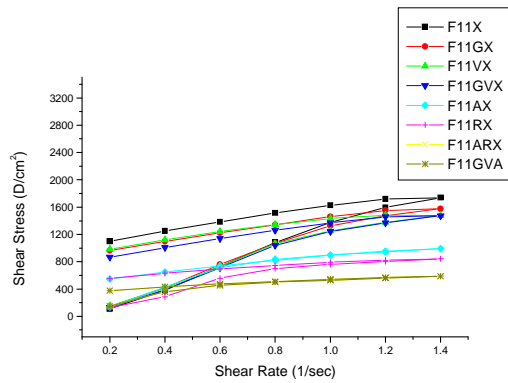
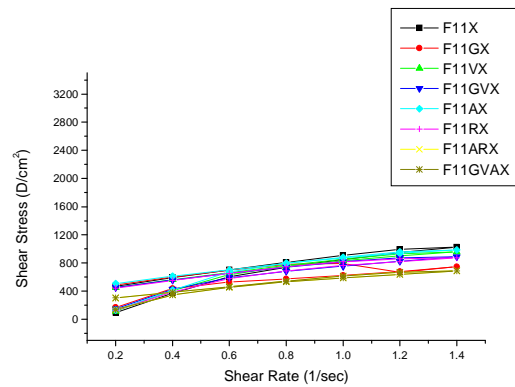


Figura 17: Reogramas das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 37°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

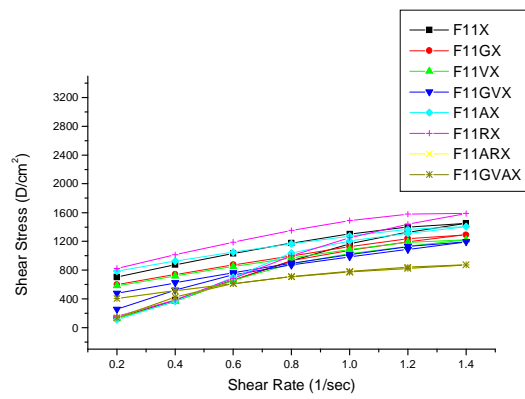
A



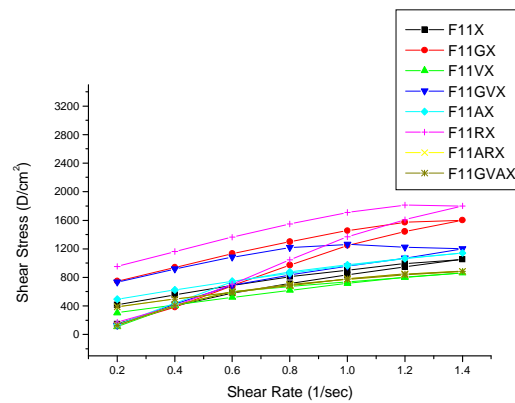
B



C



D



E

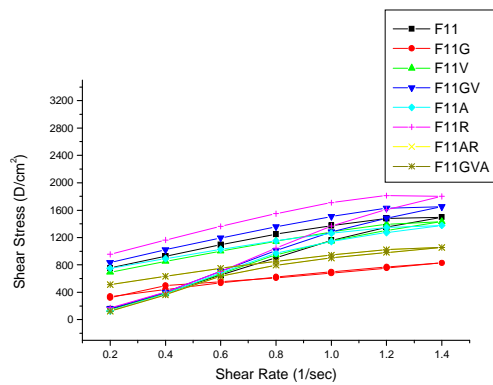
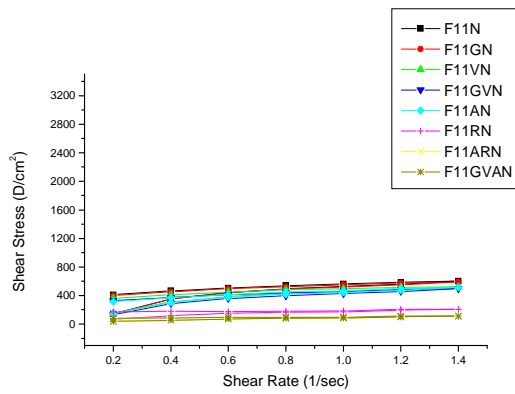
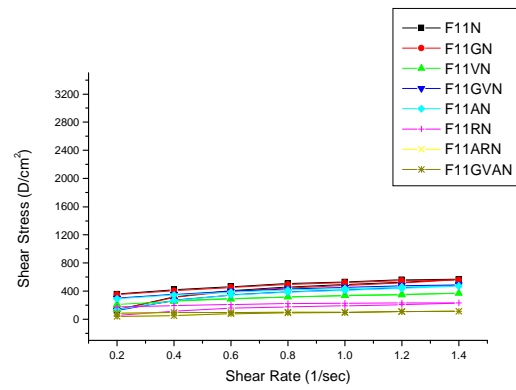


Figura 18: Reogramas das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 45°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

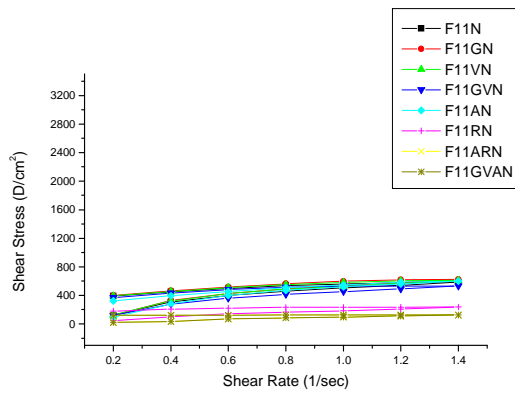
A



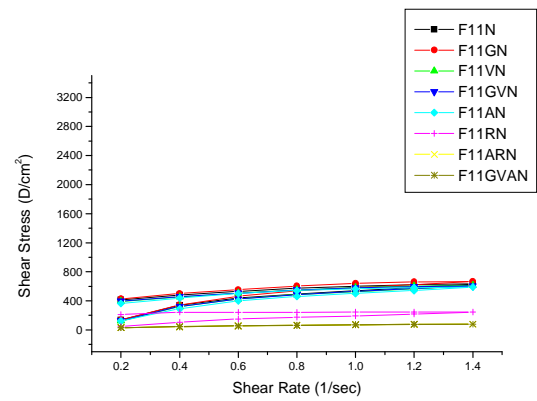
B



C



D



E

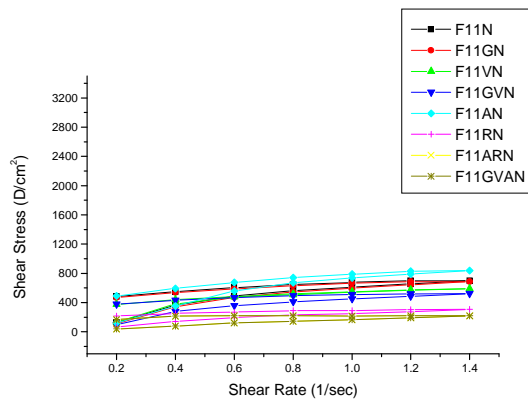
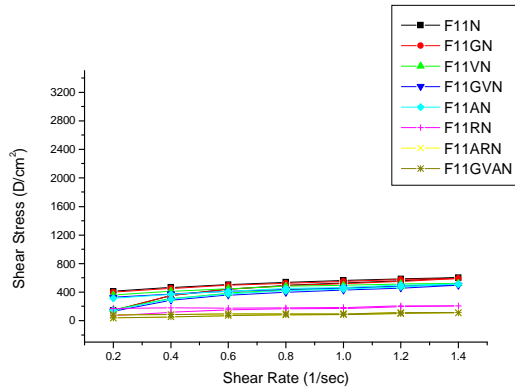
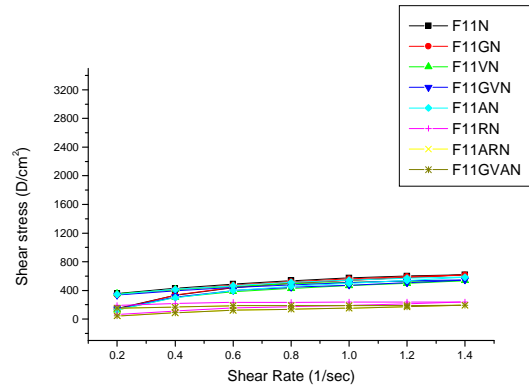


Figura 19: Reogramas das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura ambiente, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

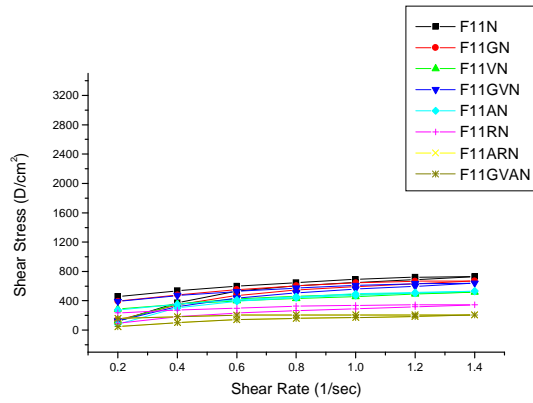
A



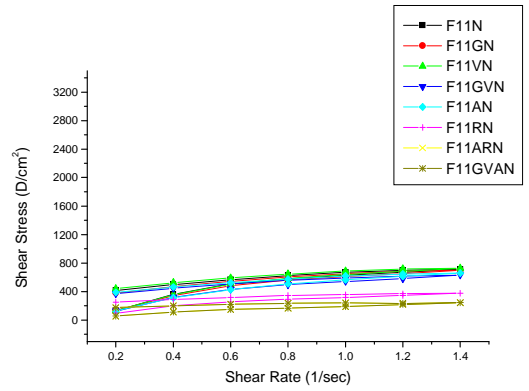
B



C



D



E

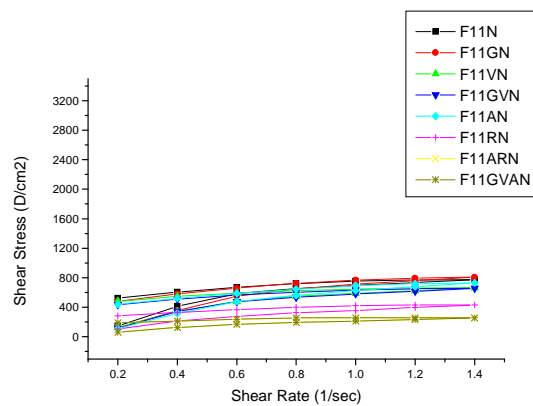
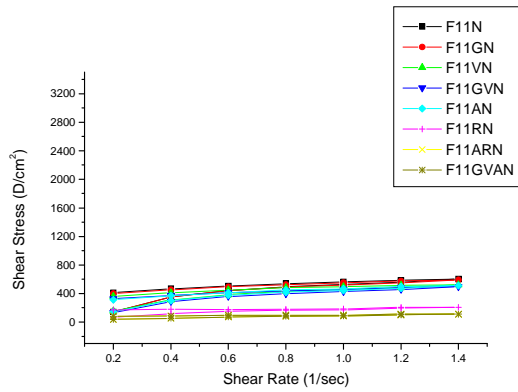
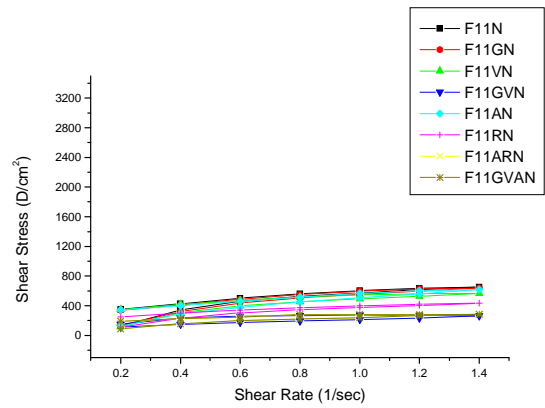


Figura 20: Reogramas das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 37°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

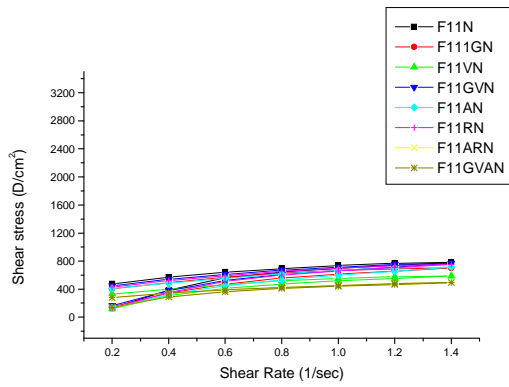
A



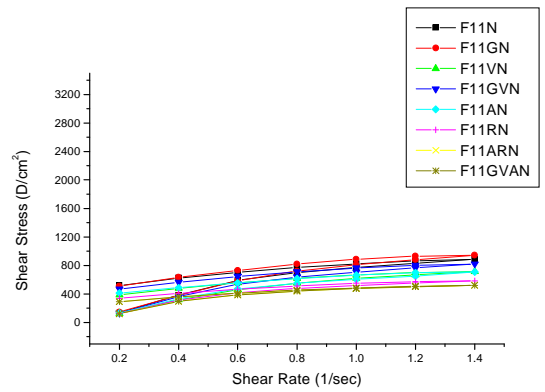
B



C



D



E

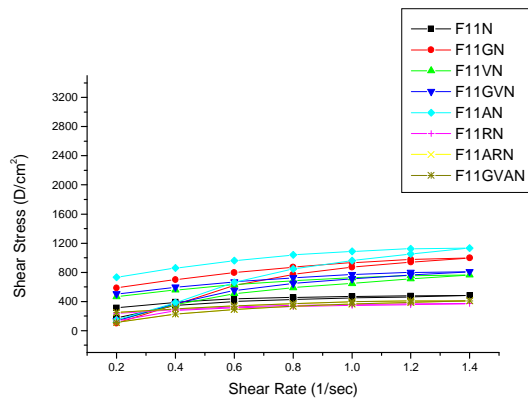
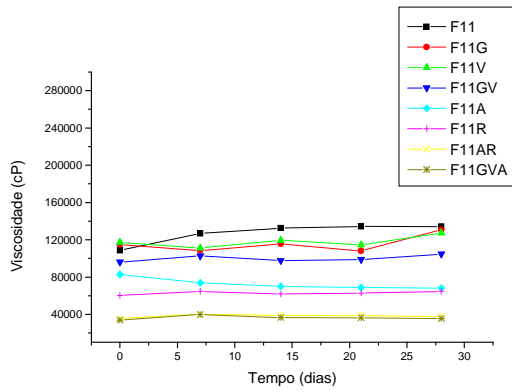


Figura 21: Reogramas das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, estocadas à temperatura de 45°C, nos tempos inicial (A) e após 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias de estudo.

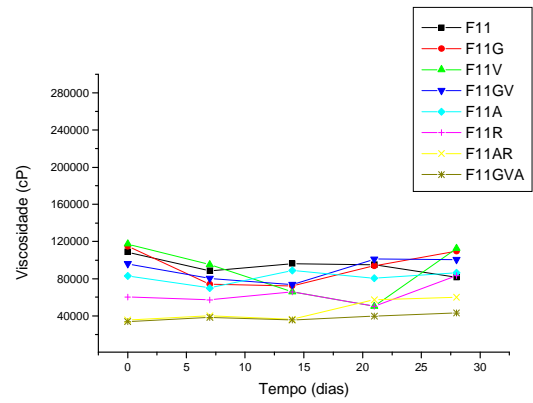
Tabela 8. Valores de viscosidade aparente mínima (cP) obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.

		Viscosidade aparente mínima (cP)											
		Temperatura ambiente				37°C				45°C			
Formulação	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
		F11	108692	126807	132565	134390	134109	88470	96194	95070	81589	92402	64176
F11G	114871	108411	115432	108130	130739	73945	72321	93806	109534	88751	131160	117539	134531
F11V	117398	111079	119505	114590	127369	95211	65861	50273	112624	65299	125403	140007	99704
F11VG	96053	102653	97598	98862	104619	80325	73585	101109	100547	70214	82151	51537	65018
F11A	82853	73725	69933	68810	68248	69933	88891	80606	86364	88330	128211	132565	141412
F11VGA	33754	39876	36544	36214	35422	38218	35642	39655	43098	73220	134873	154322	46328
F11X	124139	106164	104338	99423	103215	97036	99985	125824	121611	73444	103496	75129	107007
F11XG	112624	98019	82993	113045	99002	83695	106726	120769	148433	53222	92262	114309	59120
F11XV	105462	71619	99143	101951	124560	82993	92683	81870	95351	68389	87206	61789	102232
F11XVG	105181	107287	94228	113045	101249	71338	97317	67967	101389	63333	85100	85661	117820
F11XA	70916	64035	55891	59823	71899	70776	88470	85942	73304	70495	100406	81589	98300
F11XVGA	40921	18932	37944	33216	36544	47382	62983	53987	75843	48983	62983	62183	74328
F11N	42971	40584	41848	45218	49993	44235	52099	50976	55329	46482	56031	63333	34545
F11NG	42269	40022	44516	47605	49010	43954	47746	49993	57716	45639	50133	67406	71197
F11NV	37354	26541	43673	42316	42269	38197	36933	51818	47465	40443	53644	51116	54486
F11NGV	35528	34826	37916	43112	37354	38899	45639	45078	47044	18677	54767	58559	57857
F11NA	36652	33843	42831	42129	59823	41707	37916	47184	52239	44095	51116	50554	80887
F11NVGA	7653	8076	8874	5499	14629	12345	13245	25898	26098	19782	34678	36721	28934

A



B



C

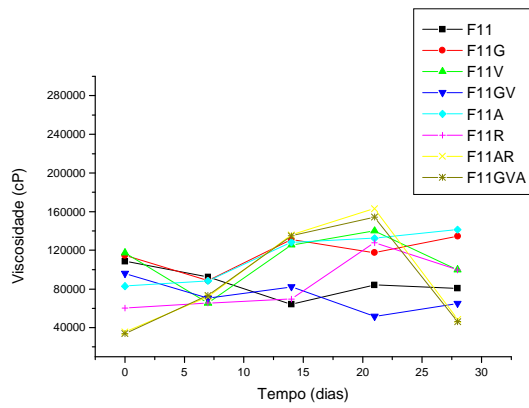
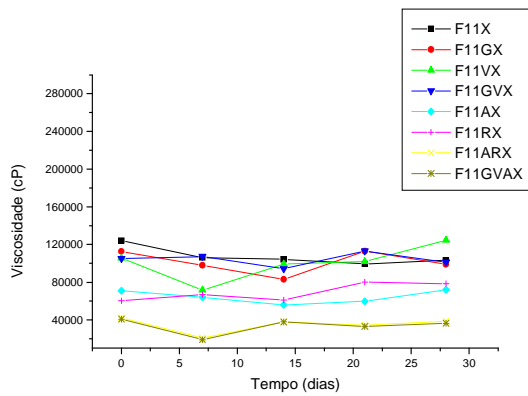
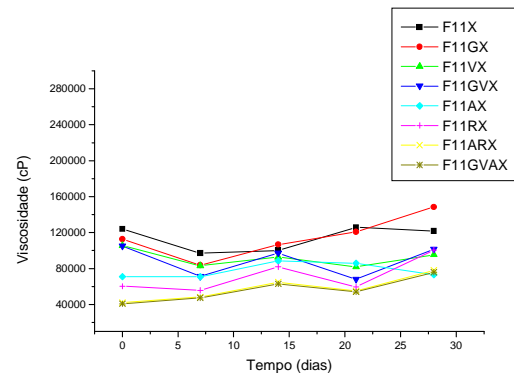


Figura 22: Valores de viscosidade aparente mínima das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

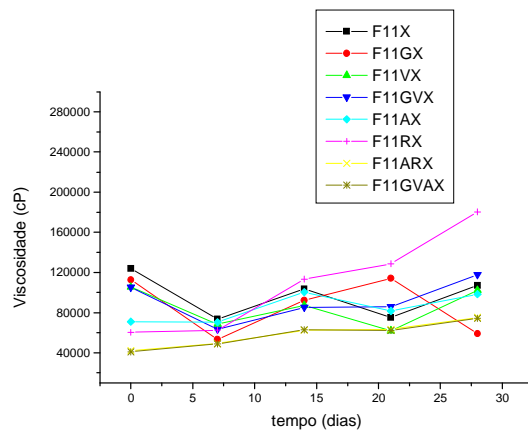
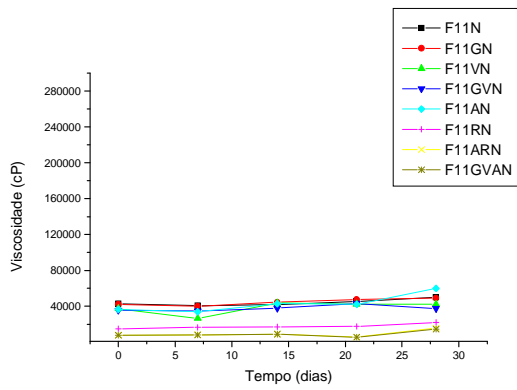
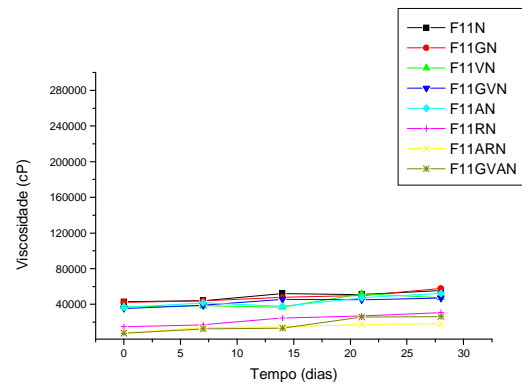


Figura 23: Valores de viscosidade aparente mínima das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

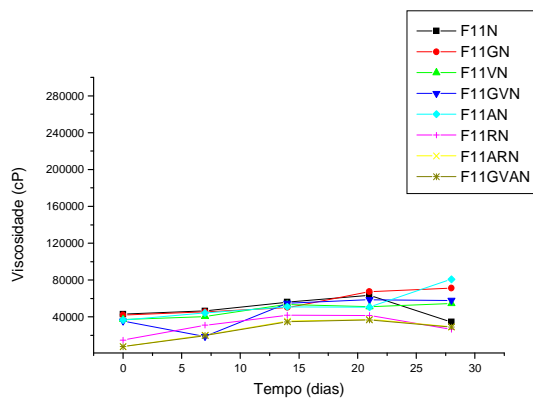
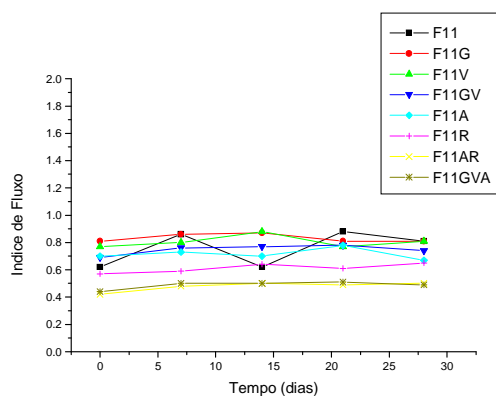


Figura 24: Valores de viscosidade aparente mínima das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

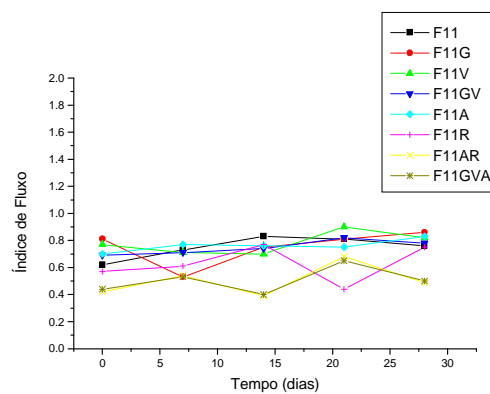
Tabela 9. Valores de índice de fluxo obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.

Índice de Fluxo													
Formulação	Temperatura ambiente					37°C				45°C			
	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
F11	0.62	0.86	0.62	0.88	0.81	0.73	0.83	0.81	0.76	0.77	0.70	0.79	0.76
F11G	0.81	0.86	0.87	0.81	0.81	0.53	0.75	0.81	0.86	0.78	0.70	0.80	0.89
F11V	0.77	0.80	0.88	0.77	0.81	0.71	0.70	0.90	0.82	0.78	0.92	0.94	0.71
F11VG	0.69	0.76	0.77	0.78	0.74	0.71	0.74	0.82	0.78	0.71	0.79	0.58	0.75
F11A	0.70	0.73	0.70	0.78	0.67	0.77	0.76	0.75	0.83	0.81	0.83	0.89	0.80
F11VGA	0.44	0.50	0.50	0.51	0.49	0.53	0.40	0.65	0.50	0.68	0.97	0.89	0.47
F11X	0.86	0.73	0.85	0.85	0.73	0.85	0.84	0.94	0.82	0.82	0.83	0.74	0.79
F11XG	0.77	0.79	0.71	0.80	0.75	0.80	0.85	0.92	0.82	0.47	0.81	0.85	0.46
F11XV	0.72	0.67	0.64	0.78	0.82	0.65	0.80	0.73	0.78	0.74	0.80	0.79	0.80
F11XVG	0.79	0.75	0.87	0.85	0.89	0.62	0.83	0.72	0.76	0.64	0.64	0.71	0.81
F11XA	0.67	0.69	0.64	0.59	0.72	0.71	0.84	0.76	0.62	0.50	0.84	0.77	0.80
F11XVGA	0.44	0.39	0.45	0.50	0.51	0.63	0.72	0.65	0.75	0.66	0.69	0.73	0.79
F11N	0.46	0.48	0.50	0.49	0.52	0.51	0.58	0.57	0.53	0.58	0.59	0.63	0.53
F11NG	0.45	0.48	0.54	0.52	0.56	0.53	0.55	0.58	0.63	0.57	0.55	0.65	0.73
F11NV	0.40	0.39	0.51	0.50	0.51	0.47	0.50	0.57	0.51	0.53	0.60	0.61	0.57
F11NVG	0.43	0.47	0.48	0.50	0.50	0.47	0.54	0.55	0.54	0.35	0.54	0.62	0.59
F11NA	0.44	0.44	0.63	0.52	0.65	0.51	0.64	0.56	0.62	0.56	0.58	0.57	0.62
F11NVGA	0.37	0.35	0.49	0.51	0.50	0.44	0.47	0.45	0.42	0.40	0.49	0.51	0.45

A



B



C

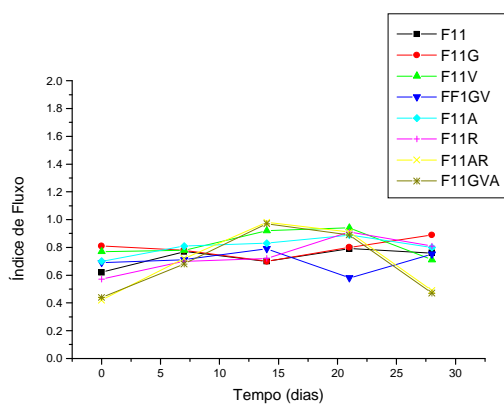
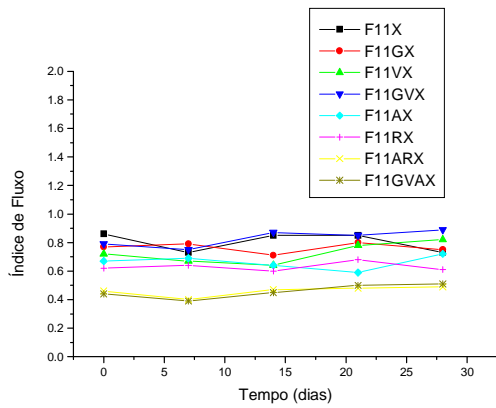
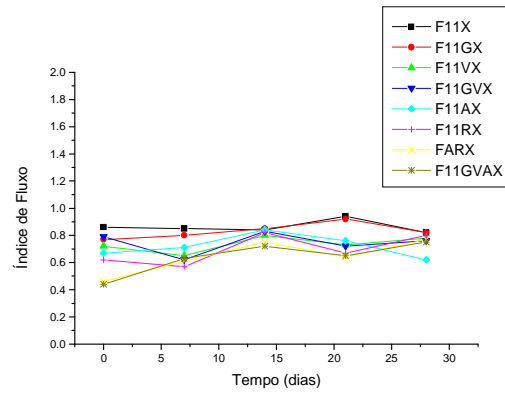


Figura 25: Valores de índice de fluxo das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

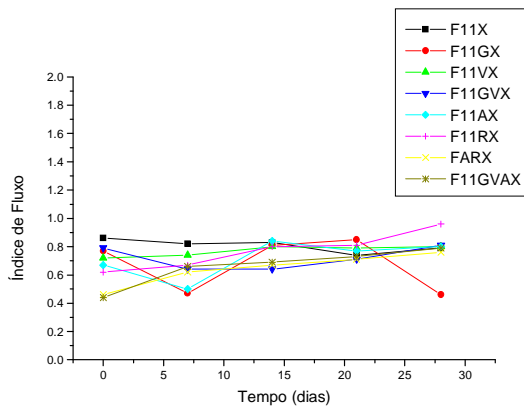
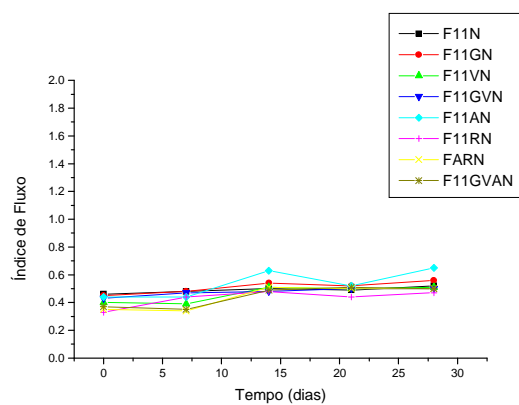
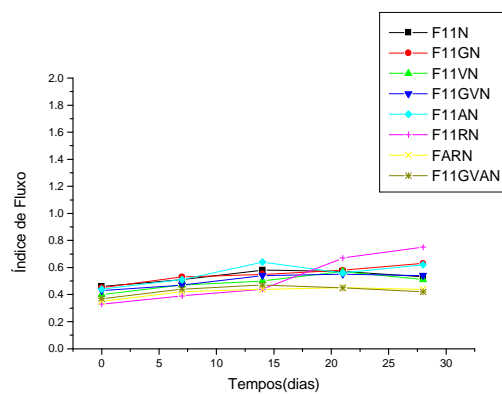


Figura 26: Valores de índice de fluxo das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

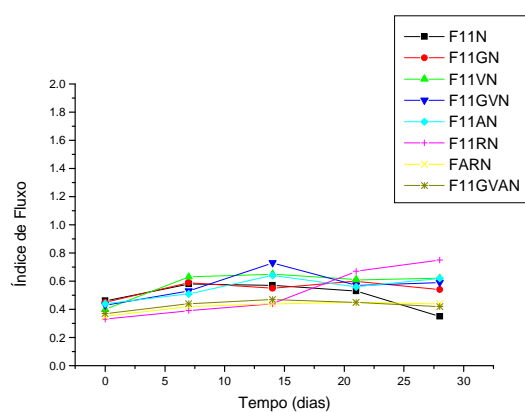
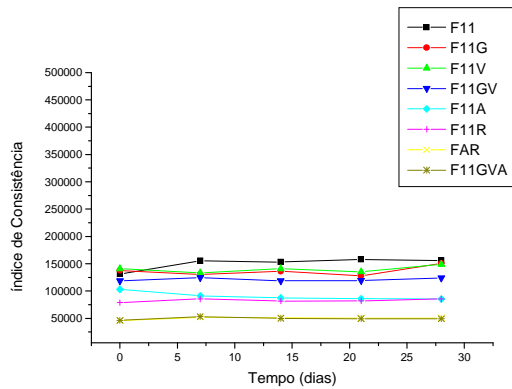


Figura 27: Valores de índice de fluxo das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

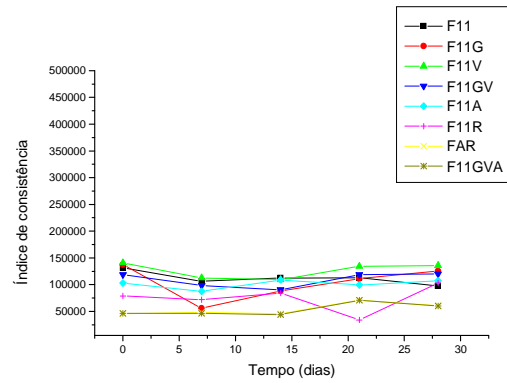
Tabela 10. Valores de índice de consistência obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.

		Índice de Consistência											
		Temperatura ambiente				37°C				45°C			
Formulação	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
		F11	131293	155207	153035	157709	155763	106431	112378	113122	97584	108900	74840
F11G	137363	130175	136039	128069	150518	55752	88582	111258	125413	106346	153770	135672	159940
F11V	140854	133152	140805	134959	148464	112792	109471	134349	135721	105873	141919	164088	107339
F11VG	118757	124209	118648	118921	123886	98273	90255	118777	119763	85555	93280	64627	77721
F11A	102991	91158	87339	85633	85164	87597	108815	99473	107151	106573	146753	149834	157368
F11VGA	46320	53278	49857	49362	49036	46135	44146	70780	59911	74998	149773	180103	58970
F11X	140973	127420	122744	117907	119979	116141	116191	143729	155193	88817	120771	87487	123543
F11XG	135810	119862	102178	101293	118642	101754	126623	137976	168982	69615	108863	131331	69455
F1XV	130882	90739	121580	121345	144976	105101	112022	100078	114864	85167	104668	74070	119164
F11XVG	127686	128543	115857	132327	122902	88965	116704	83900	121707	79242	100222	109616	135801
F11XA	90438	79092	70565	71696	90954	87970	107724	105200	92497	88545	122003	98315	118330
F11XVGA	53987	25976	47163	44078	49765	59021	80987	65986	94532	59760	77943	76234	90865
F11N	55452	52048	53683	57857	65112	56177	67984	65431	73411	59350	72530	80440	73411
F11NG	54587	50889	57212	61485	63705	55752	62114	63540	74501	57613	64045	84567	90397
F11NV	48342	34043	56069	58469	62536	49480	48355	66825	62536	52423	68305	64279	69482
F11NVG	45156	44268	49392	55882	48587	48758	58649	57183	61536	24265	69462	73894	74521
F11NA	46552	43027	53957	53968	76669	52613	49305	59244	66241	53763	63361	63695	66241
F11NVGA	9562	10023	10987	6098	18765	17087	18643	20976	22134	24987	44312	47098	36543

A



B



C

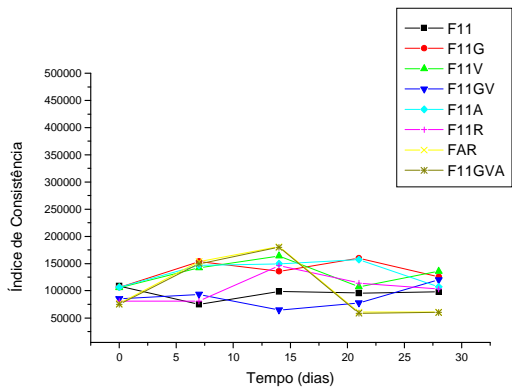
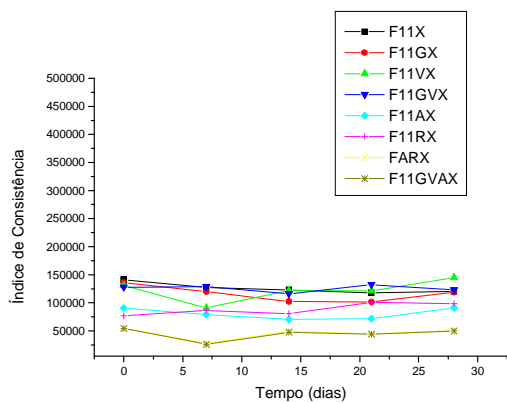
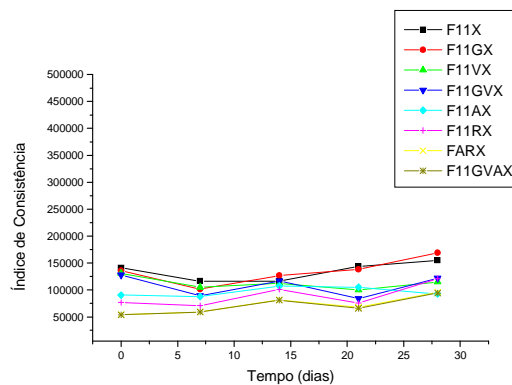


Figura 28: Valores de índice de consistência das formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

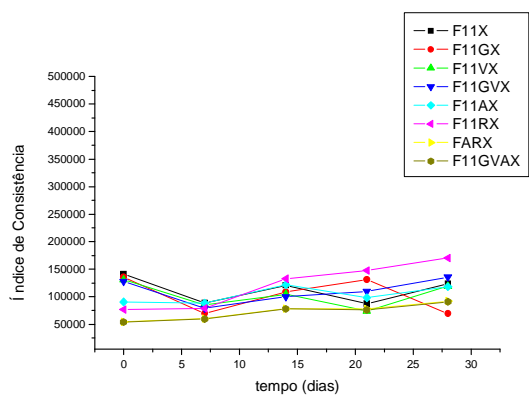
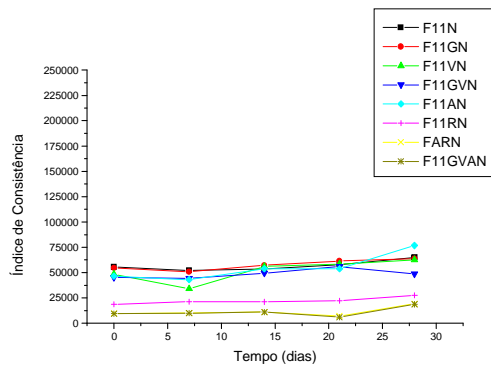
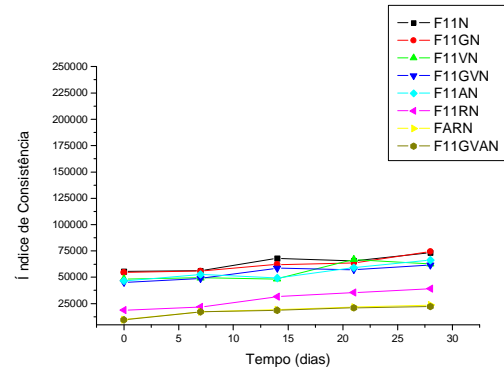


Figura 29: Valores de índice de consistência das formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

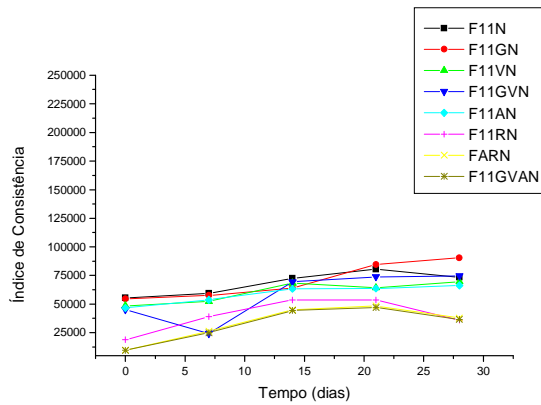
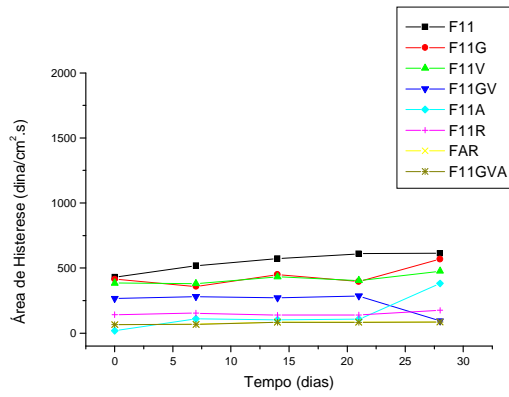


Figura 30: Valores de índice de consistência das formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

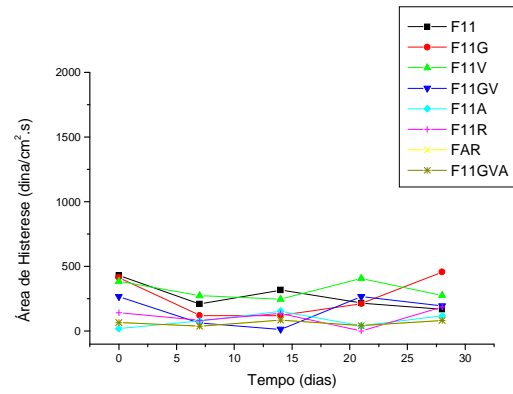
Tabela 11. Valores de área de histerese (dina/cm²) obtidos para as formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das vitaminas lipossolúveis e/ou extratos vegetais objetos de estudo, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, quando mantidas no ambiente, ou submetidas as temperaturas de 37 e 45 °C.

		Área de histerese (dina / cm ²)											
		Temperatura ambiente				37°C				45°C			
Formulação	Inicial	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
		dias	dias	dias	dias	dias	dias	dias	dias	dias	dias	dias	dias
F11	431	519	572	610	613	210	318	217	169	223	91	221	182
F11G	415	359	450	398	569	121	121	212	457	183	699	276	719
F11V	385	381	432	405	476	273	246	408	276	220	515	712	212
F11VG	267	280	272	286	95	62	13	267	196	64	191	47	50
F11A	20	109	104	107	382	79	153	41	118	134	446	515	606
F11VGA	66	68	84	84	85	39	85	42	83	89	610	831	192
F11X	565	286	341	253	360	299	386	589	794	138	321	120	393
F11XG	408	235	196	164	308	180	345	429	784	172	195	395	5
F11XV	439	52	299	300	476	332	229	192	213	83	193	9	300
F11XVG	369	339	316	368	172	114	238	62	309	104	67	405	433
F11XA	89	31	17	96	87	93	179	179	118	88	299	67	308
F11XVGA	44	20	65	80	81	33	84	88	165	40	52	44	142
F11N	83	77	109	110	134	68	102	92	126	64	112	140	42
F11NG	74	76	109	111	137	54	97	85	136	72	107	161	193
F11NV	76	6	100	100	40	87	5	110	132	89	71	107	141
F11NVG	66	66	123	97	116	64	105	93	115	73	107	129	140
F11NA	54	56	73	110	141	84	41	107	134	94	122	111	290
F11NVGA	23	25	56	2	88	63	61	72	70	58	39	40	55

A



B



C

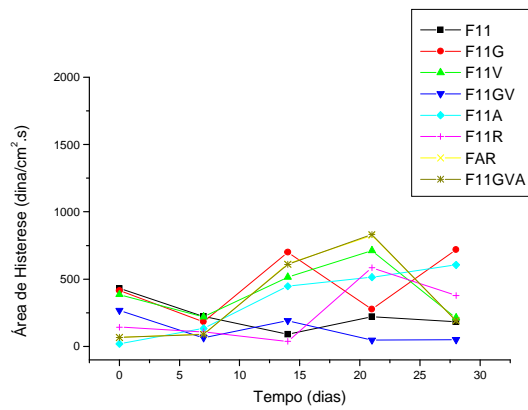
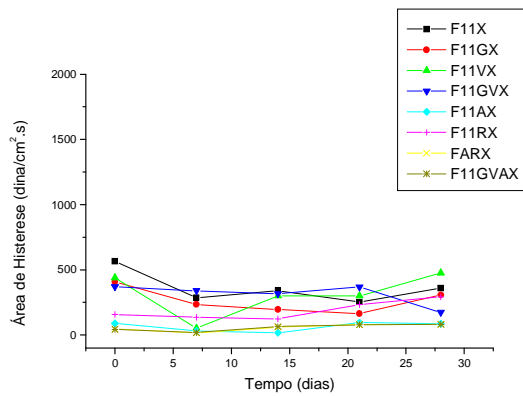
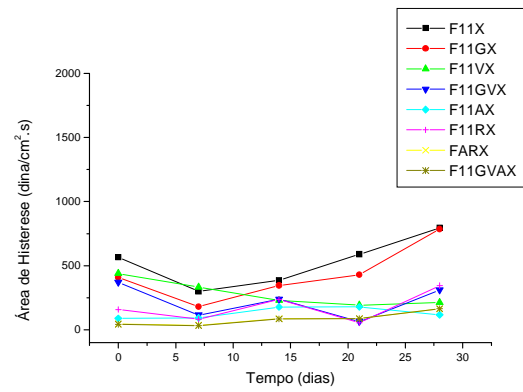


Figura 31: Valores de área de histerese obtidos para as formulações F11, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

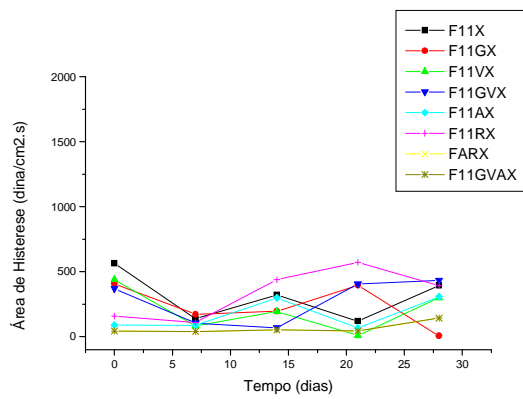
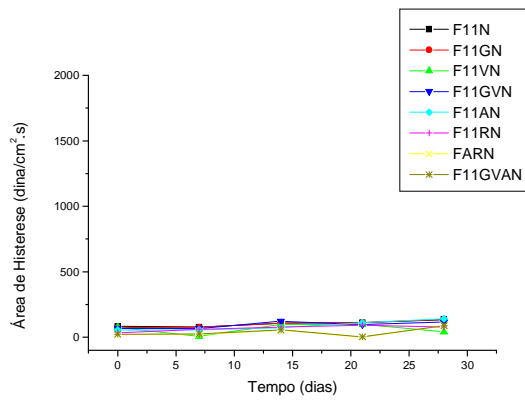
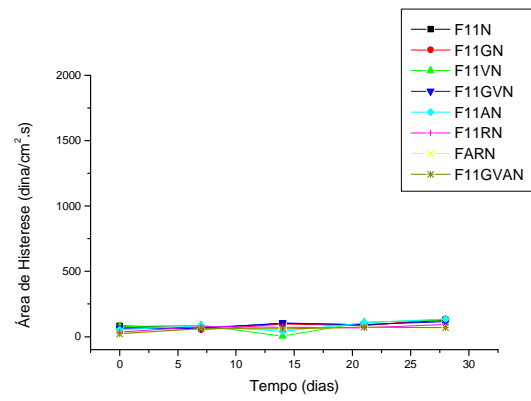


Figura 32: Valores de área de histerese obtidos para as formulações F11X, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

A



B



C

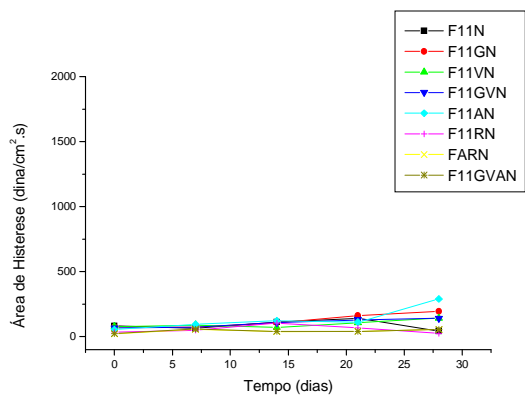


Figura 33: Valores de área de histerese obtidos para as formulações F11N, acrescidas ou não das vitaminas e/ou extratos vegetais objeto de estudo, nos tempos inicial e após 7, 14, 21 e 28 dias de estudo, quando estocadas à temperatura ambiente (A), de 37°C (B) ou de 45°C (C).

6.3. ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA

6.3.1. Procedimento de extração

As Figuras 34 a 38 representam os cromatogramas referentes às extrações de vitaminas e extratos e da formulação F11X sem a adição destas substâncias ativas, contendo apenas os filtros solares.

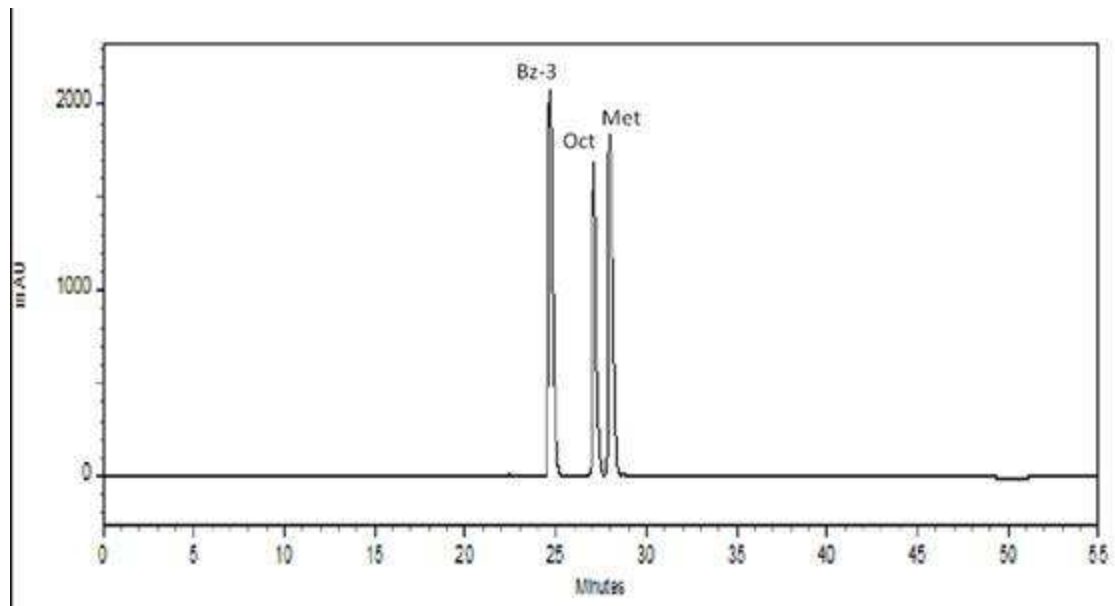


Figura 34. Cromatograma da formulação F11X contendo apenas os filtros solares benzofenona-3 (Bz-3 – 24,69 min), octocrileno (Oct – 27,11 min) e metoxicinamato de etilexila (Met – 27,79 min), sem a adição dos extratos e vitaminas objeto de estudo, analisada a 325 nm nas condições cromatográficas estabelecidas.

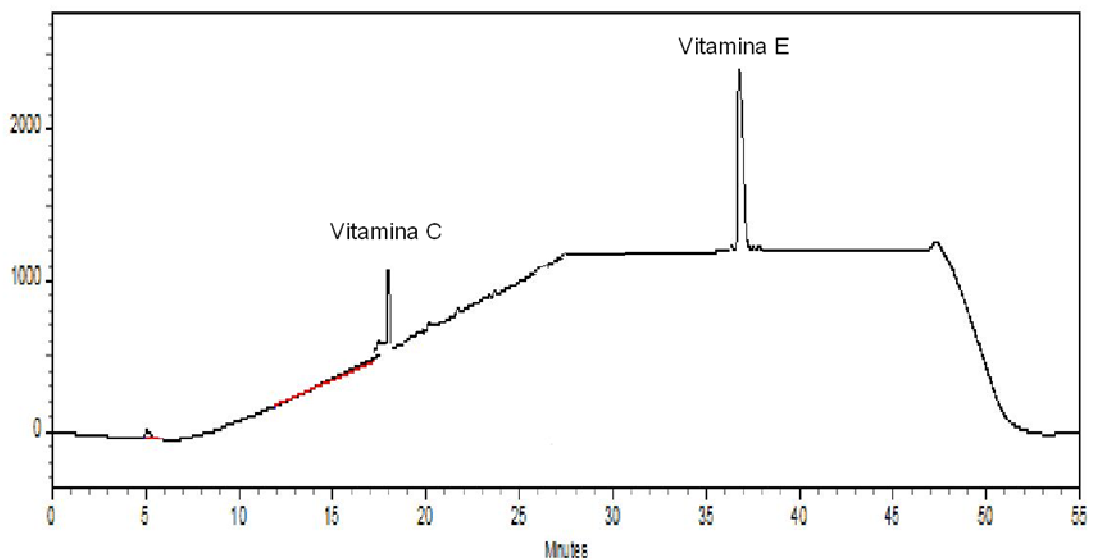


Figura 35. Cromatograma da formulação F11XV, analisada à 235nm, contendo as vitaminas C (19,75 min) e E (36,87 min), nas condições cromatográficas estabelecidas.

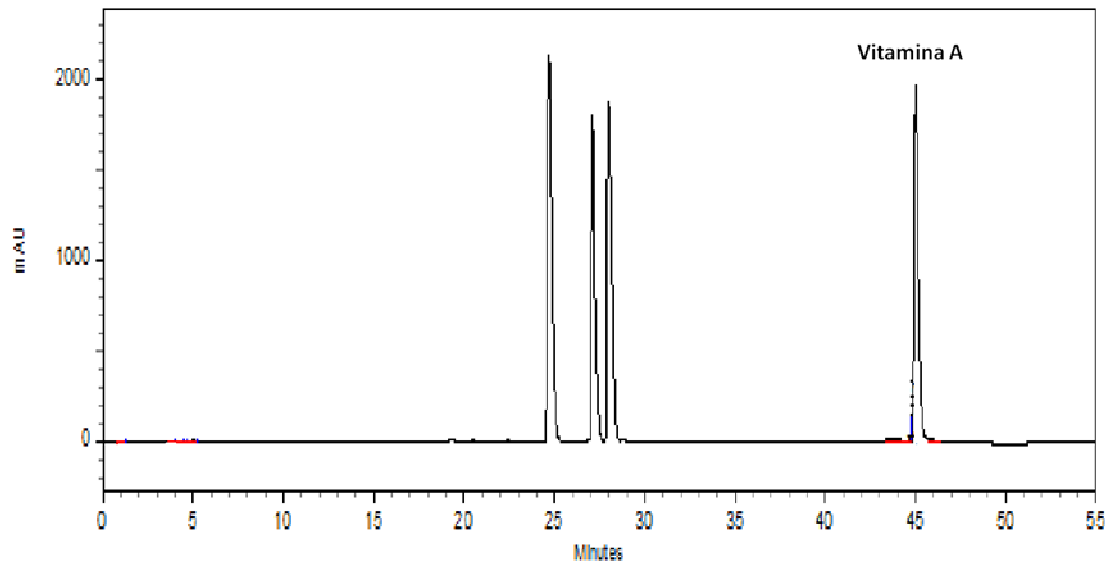


Figura 36. Cromatograma da formulação F11XV, analisada à 325 nm, contendo a vitamina A (45,76 min), nas condições cromatográficas estabelecidas.

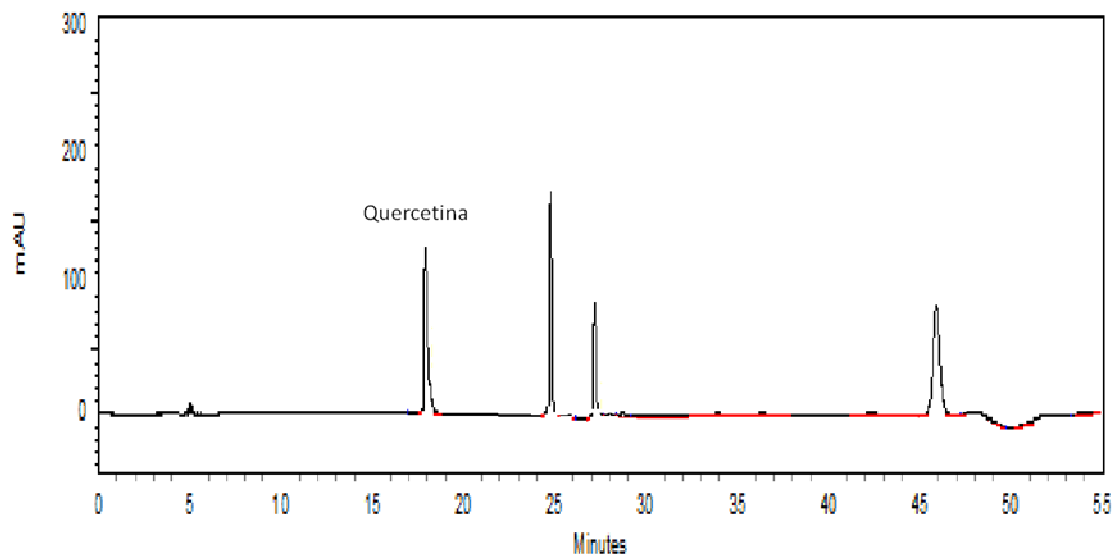


Figura 37. Cromatograma da formulação F11XG, analisada à 370 nm, contendo o marcador químico do extrato de *Ginkgo biloba*, quercetina (18,06 min), nas condições cromatográficas estabelecidas.

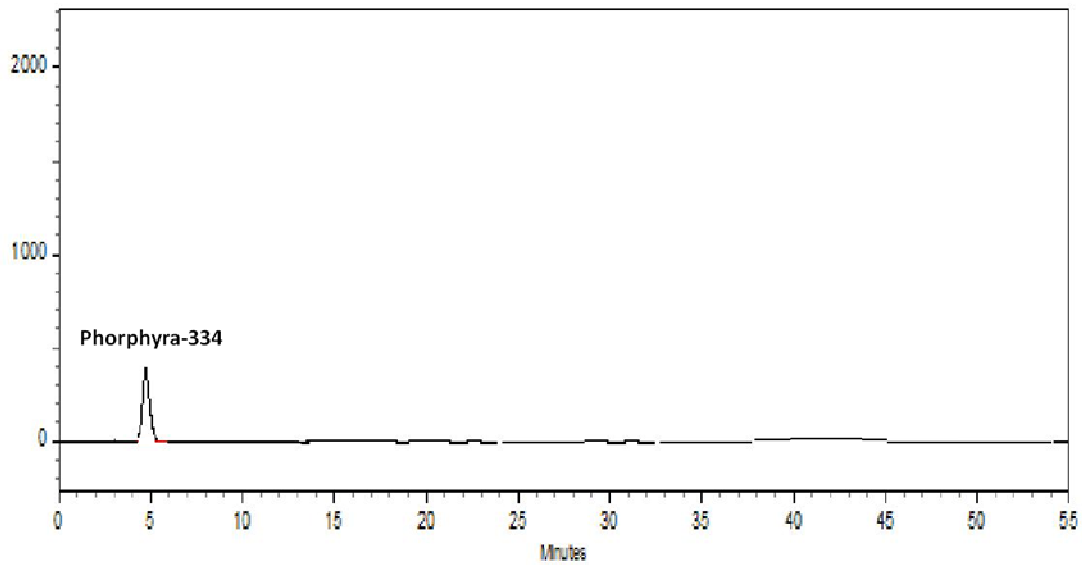


Figura 38. Cromatograma da formulação F11XA, analisada à 334 nm, contendo o extrato de algas marinhas vermelhas padronizado com seu marcador químico *Phorphyra-334* (4,92 min), nas condições cromatográficas estabelecidas.

6.3.2. Curvas analíticas

As curvas analíticas, apresentadas a seguir foram elaboradas a partir dos dados obtidos pela análise das soluções dos extratos e vitaminas. As diluições foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos permitiram a elaboração das curvas analíticas que estão representadas nas Figuras 40 a 44.

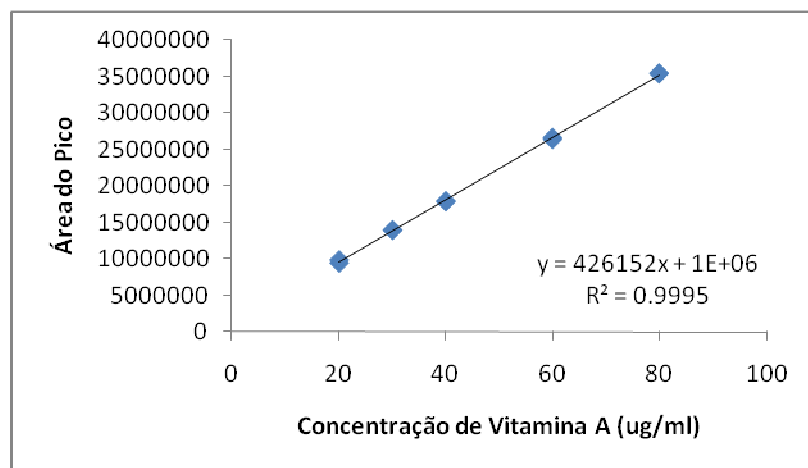


Figura 39. Curva analítica da vitamina A ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

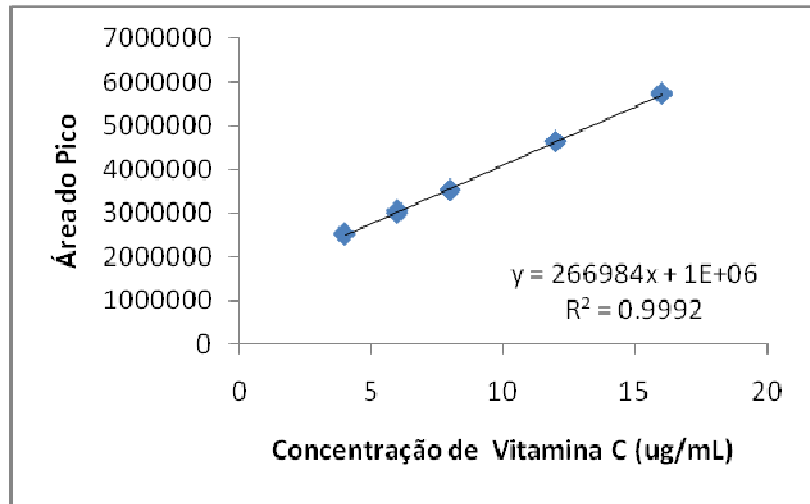


Figura 40. Curva analítica da vitamina C ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

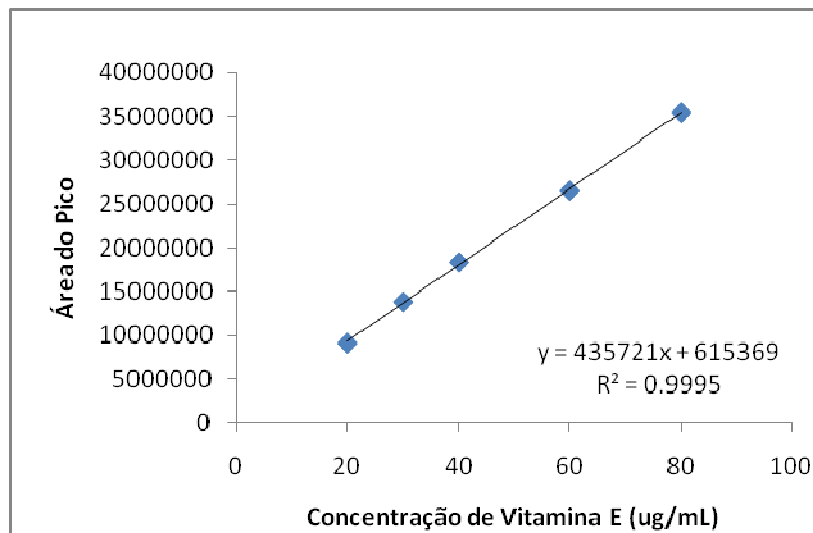


Figura 41. Curva analítica da vitamina E ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

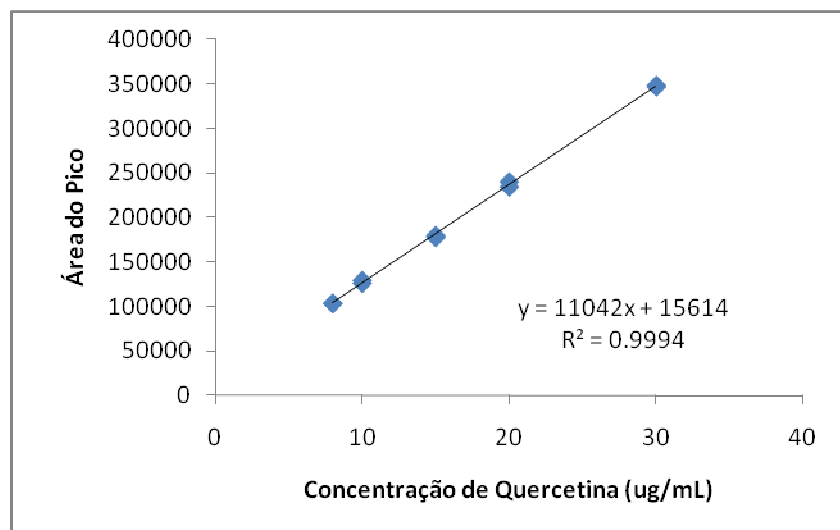


Figura 42. Curva analítica da quercetina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

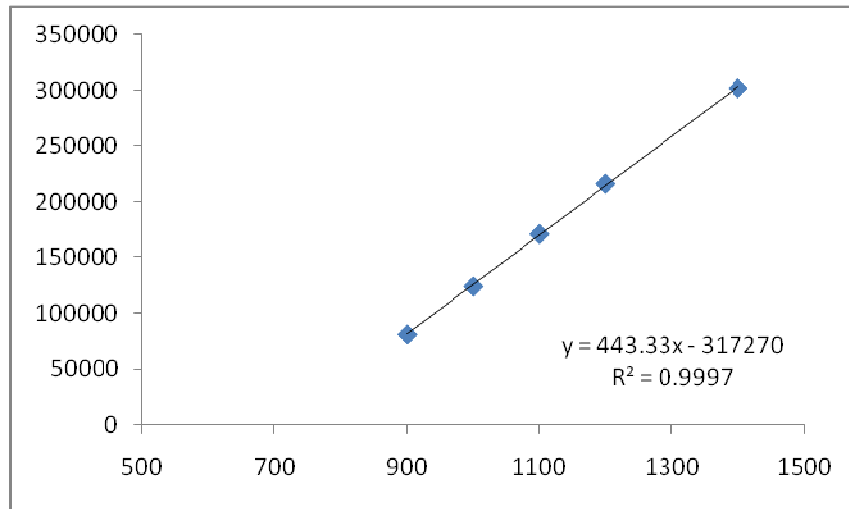


Figura 43. Curva analítica do extrato de *Phorphyra-334* ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

6.3.3. Precisão e exatidão

Os valores de precisão e exatidão intra-ensaio estão apresentados na Tabela 12 a seguir, onde se pode observar que, o método pode ser considerado preciso (0,63 a 4,87) e com exatidão aceitável para métodos analíticos (91,91 a 117,15).

Tabela 12. Precisão e exatidão intra-ensaio das substâncias ativas.

Substância ativa	Concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Média ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Vitamina A	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	37,56 38,36 39,12 39,64 39,15	38,76	2,10	96,91
Vitamina C	6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6,66 6,11 6,70 6,33 6,02	6,36	4,87	106,07
Vitamina E	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	37,38 37,39 35,63 37,50 35,91	36,76	2,48	91,91
Quercetina	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35,22 35,37 34,85 34,98 35,30	35,14	0,63	117,15
<i>Phorphyra-334</i>	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1001,64 997,83 1006,49 985,89 1004,34	999,23	0,81	99,92

Os valores de precisão e exatidão inter-ensaio estão apresentados nas Tabelas 13 a 17 onde se observa que o método pode ser considerado preciso (1,05 a 4,37) e com exatidão aceitável para métodos analíticos (94,35 a 117,68).

Tabela 13. Precisão e exatidão inter-ensaio da vitamina A.

Substância ativa	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Dia	Concentração obtida ($\mu\text{g/ml}$)	Média ($\mu\text{g/ml}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Vitamina A	40 $\mu\text{g/ml}$	1	37,56 38,36 39,12 39,64 39,15	38,76	3,20	99,76
		2	40,11 39,12 39,12 41,73 39,04	39,83		
		3	39,38 39,12 39,38 40,12 41,73	39,95		
		4	41,60 41,73 41,99 39,12 39,02	40,69		
		5	39,66 41,73 41,82 39,12 39,12	40,29		

Tabela 14. Precisão e exatidão inter-ensaio da vitamina C.

Substância ativa	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Dia	Concentração obtida ($\mu\text{g/ml}$)	Média ($\mu\text{g/ml}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Vitamina C	6 $\mu\text{g/ml}$	1	6,66 6,11 6,70 6,33 6,02	6,36	4,37	110,01
		2	6,70 6,14 6,70 6,68 6,33	6,51		
		3	6,68 6,70 6,33 6,76 6,70	6,63		
		4	7,08 6,68 6,68 6,61 6,70	6,75		
		5	7,08 6,70 6,29 6,50 7,15	6,74		

Tabela 15. Precisão e exatidão inter-ensaio da vitamina E.

Substância ativa	Concentração teórica (µg/ml)	Dia	Concentração obtida (µg/ml)	Média (µg/ml)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Vitamina E	40µg/ml	1	37,38 37,39 35,63 37,50 35,91	36,76	3,97	94,36
		2	37,38 38,09 35,80 37,51 34,19	36,60		
		3	39,80 37,38 39,80 37,51 37,51	38,40		
		4	37,38 39,93 39,80 37,60 37,92	38,53		
		5	37,38 37,38 40,18 39,93 37,28	38,43		

Tabela 16. Precisão e exatidão inter-ensaio da quercetina.

Substância ativa	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Dia	Concentração obtida ($\mu\text{g/ml}$)	Média ($\mu\text{g/ml}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Quercetina	30 $\mu\text{g/ml}$	1	35,22 35,37 34,85 34,98 35,30	35,14	1,72	117,68
		2	35,36 34,73 35,73 34,83 35,01	35,13		
		3	35,67 35,18 35,67 34,70 36,68	35,58		
		4	34,70 35,69 35,68 35,73 34,68	35,30		
		5	35,67 34,68 34,11 35,73 36,66	35,37		

Tabela 17. Precisão e exatidão inter-ensaio do *Phorphyra-334*.

Substância ativa	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Dia	Concentração obtida ($\mu\text{g/ml}$)	Média ($\mu\text{g/ml}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
<i>Phorphyra-334</i>	1000 $\mu\text{g/ml}$	1	1001,64 997,83 1006,49 985,89 1004,34	999,24	1,05	100,61
		2	1006,47 1010,90 1011,11 1006,41 1006,48	1008,28		
		3	1029,06 1008,50 1025,32 1006,48 995,11	1012,89		
		4	1011,11 1001,53 1031,04 1006,39 1004,14	1010,84		
		5	1003,01 995,23 1004,00 1006,48 988,44	999,43		

6.3.4. Determinação das percentagens remanescentes de vitaminas e extratos presentes nas formulações em estudo.

Para o cálculo das percentagens remanescentes de vitaminas e extratos presentes nas formulações submetidas ao estudo de estabilidade química por stress térmico, foram utilizadas as curvas analíticas apresentadas nas Figuras 39 a 43.

As concentrações remanescentes estão expressas em percentagem e logaritmo dessas concentrações, indicadas nas Tabelas de 18 a 22. As Figuras 44 a 48 mostram as representações gráficas destes valores.

6.3.4.1. Determinação da concentração de vitamina A

Tabela 18 - Concentrações remanescentes de vitamina A presentes nas formulações, armazenadas à temperatura ambiente, a 37 e a 45°C.

Formulação	Tempo	Temperatura					
		Ambiente		37°C		45°C	
		%	Log %	%	Log %	%	Log %
F11XV	0	99,12	2,00	99,12	2,00	99,12	2,00
	7	99,08	2,00	98,45	1,99	98,78	1,99
	14	98,76	1,99	97,59	1,99	97,54	1,99
	21	97,89	1,99	96,32	1,98	96,09	1,98
	28	96,65	1,99	95,35	1,98	92,19	1,96
	60	95,09	1,98	94,96	1,98	88,68	1,95
	90	94,53	1,98	92,95	1,97	86,61	1,94
F11XVG	0	99,94	2,00	99,94	2,00	99,94	2,00
	7	99,9	2,00	99,27	2,00	99,6	2,00
	14	99,58	2,00	98,41	1,99	98,36	1,99
	21	98,71	1,99	97,14	1,99	96,91	1,99
	28	97,47	1,99	96,17	1,98	93,01	1,97
	60	95,91	1,98	95,78	1,98	89,5	1,95
	90	95,355	1,98	93,77	1,97	87,43	1,94
F11XVGA	0	98,22	1,99	98,22	1,99	98,22	1,99
	7	98,18	1,99	97,55	1,99	97,88	1,99
	14	97,86	1,99	96,69	1,99	96,64	1,99
	21	96,99	1,99	95,42	1,98	95,19	1,98
	28	95,75	1,98	94,45	1,98	91,29	1,96
	60	94,19	1,97	94,06	1,97	87,78	1,94
	90	93,64	1,97	92,05	1,96	85,71	1,93

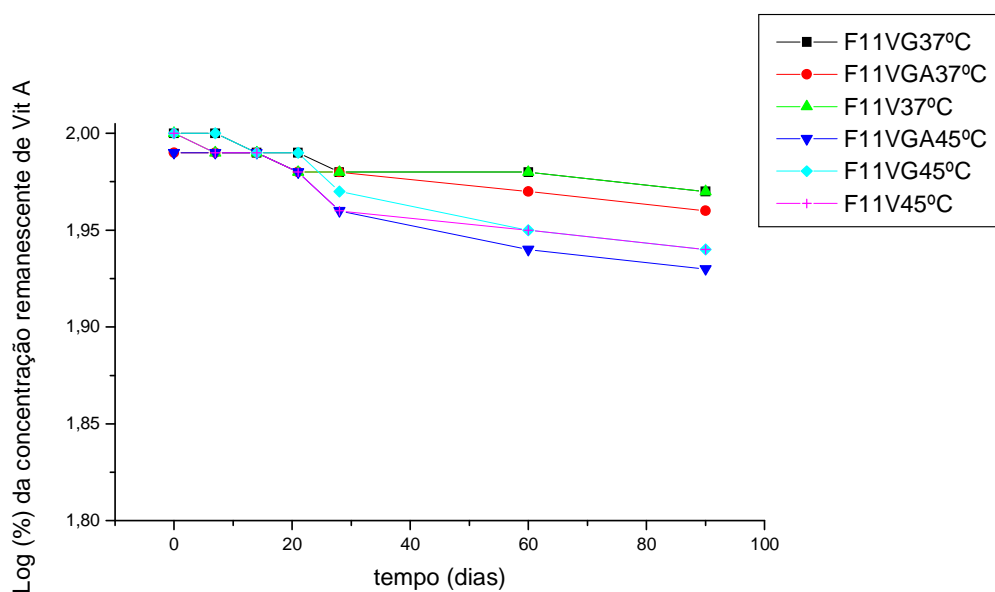


Figura 44. Log da concentração remanescente de vitamina A nas formulações F11XV, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.

6.3.4.2. Determinação da concentração de vitamina C

Tabela 19. Concentração remanescente de vitamina C.

Formulação	Tempo	Temperatura					
		Ambiente		37°C		45°C	
		%	Log %	%	Log %	%	Log %
F11XV	0	101,01	2,00	101,01	2,00	101,01	2,00
	7	99,98	2,00	99,32	2,00	99,76	2,00
	14	99,08	2,00	98,26	1,99	98,76	1,99
	21	98,76	1,99	98,07	1,99	97,73	1,99
	28	98,06	1,99	97,24	1,99	94,43	1,98
	60	97,72	1,99	96,83	1,99	91,51	1,96
	90	97,09	1,99	95,71	1,98	87,68	1,94
F11XVG	0	101,83	2,01	101,83	2,01	101,83	2,01
	7	100,80	2,00	100,14	2,00	100,58	2,00
	14	99,90	2,00	99,08	2,00	99,58	2,00
	21	99,58	2,00	98,89	2,00	98,55	1,99
	28	98,88	2,00	98,06	1,99	95,25	1,98
	60	98,54	1,99	97,65	1,99	92,33	1,97
	90	97,91	1,99	96,53	1,98	88,50	1,95
F11XVGA	0	100,11	2,00	100,11	2,00	100,11	2,00
	7	99,08	2,00	98,42	1,99	98,86	2,00
	14	98,18	1,99	97,36	1,99	97,86	1,99
	21	97,86	1,99	97,17	1,99	96,83	1,99
	28	97,16	1,99	96,34	1,98	93,53	1,97
	60	96,82	1,99	95,93	1,98	90,61	1,96
	90	96,19	1,98	94,81	1,98	86,78	1,94

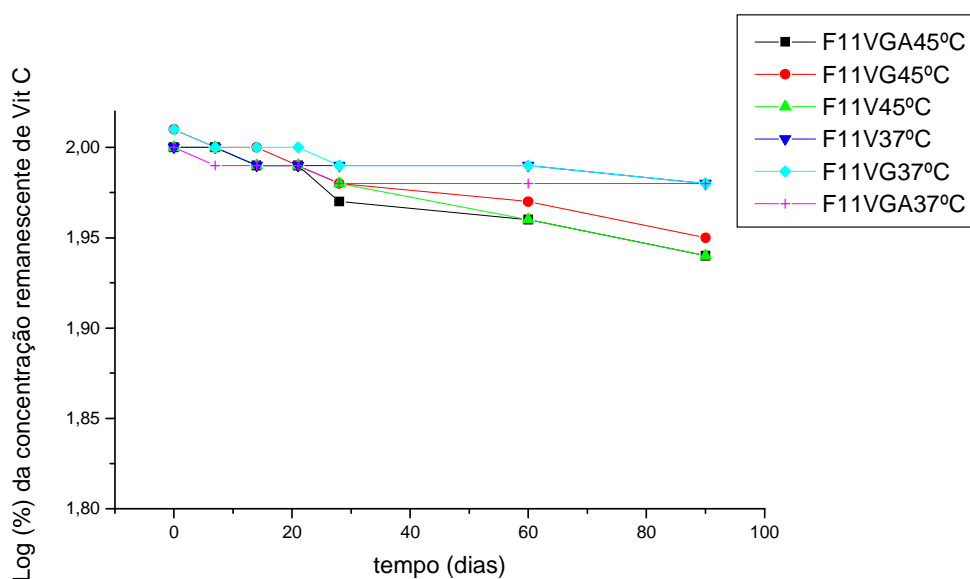


Figura 45. Log da concentração remanescente de vitamina C nas formulações F11XV, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.

6.3.4.3. Determinação da concentração de vitamina E

Tabela 20. Concentração remanescente de vitamina E.

Formulação	Tempo	Temperatura					
		Ambiente		37°C		45°C	
		%	Log %	%	Log %	%	Log %
F11XV	0	107,03	2,03	107,03	2,03	107,03	2,03
	7	100,76	2,00	100,32	2,00	99,65	2,00
	14	99,87	2,00	99,30	2,00	98,32	1,99
	21	98,98	2,00	98,65	1,99	97,33	1,99
	28	98,04	1,99	97,99	1,99	94,49	1,98
	60	97,85	1,99	97,20	1,99	91,56	1,96
	90	97,28	1,99	96,67	1,99	90,25	1,96
F11XVG	0	107,85	2,03	107,85	2,03	107,85	2,03
	7	101,58	2,01	101,14	2,00	100,47	2,00
	14	100,69	2,00	100,12	2,00	99,14	2,00
	21	99,80	2,00	99,47	2,00	98,15	1,99
	28	98,86	2,00	98,81	1,99	95,31	1,98
	60	98,67	1,99	98,02	1,99	92,38	1,97
	90	98,10	1,99	97,49	1,99	91,07	1,96
F11XVGA	0	106,13	2,03	106,13	2,03	106,13	2,03
	7	99,86	2,00	99,42	2,00	98,75	1,99
	14	98,97	2,00	98,40	1,99	97,42	1,99
	21	98,08	1,99	97,75	1,99	96,43	1,98
	28	97,14	1,99	97,09	1,99	93,59	1,97
	60	96,95	1,99	96,30	1,98	90,66	1,96
	90	96,38	1,98	95,77	1,98	89,35	1,95

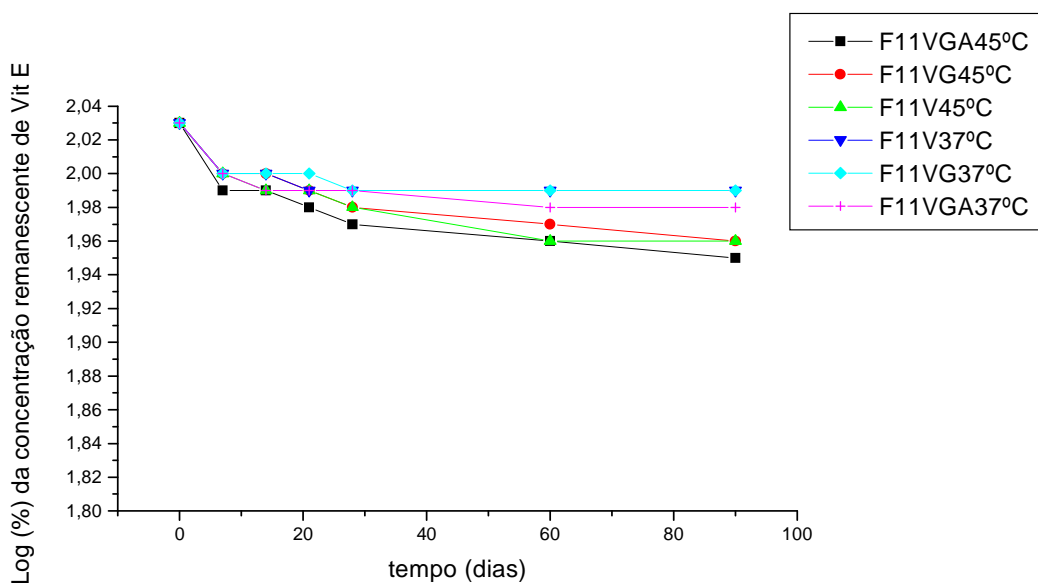


Figura 46. Log da concentração remanescente de vitamina E nas formulações F11XV, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.

6.3.4.4. Determinação da concentração de quercetina

Tabela 21. Concentração remanescente de quercetina.

Formulação	Tempo	Temperatura					
		Ambiente		37°C		45°C	
		%	Log %	%	Log %	%	Log %
F11XG	0	99,80	2,00	99,80	2,00	99,80	2,00
	7	99,03	2,00	98,43	1,99	98,06	1,99
	14	98,78	1,99	97,95	1,99	97,54	1,99
	21	98,04	1,99	97,08	1,99	96,65	1,99
	28	97,90	1,99	96,89	1,99	95,32	1,98
	60	97,06	1,99	96,08	1,98	93,87	1,97
	90	96,42	1,98	95,89	1,98	89,76	1,95
F11XVG	0	100,62	2,00	100,62	2,00	100,62	2,00
	7	99,85	2,00	99,25	2,00	98,88	2,00
	14	99,60	2,00	98,77	1,99	98,36	1,99
	21	98,86	2,00	97,90	1,99	97,47	1,99
	28	98,72	1,99	97,71	1,99	96,14	1,98
	60	97,88	1,99	96,90	1,99	94,69	1,98
	90	97,24	1,99	96,71	1,99	90,58	1,96
F11XVGA	0	98,90	2,00	98,90	2,00	98,90	2,00
	7	98,13	1,99	97,53	1,99	97,16	1,99
	14	97,88	1,99	97,05	1,99	96,64	1,99
	21	97,14	1,99	96,18	1,98	95,75	1,98
	28	97,00	1,99	95,99	1,98	94,42	1,98
	60	96,16	1,98	95,18	1,98	92,97	1,97
	90	95,52	1,98	94,99	1,98	88,86	1,95

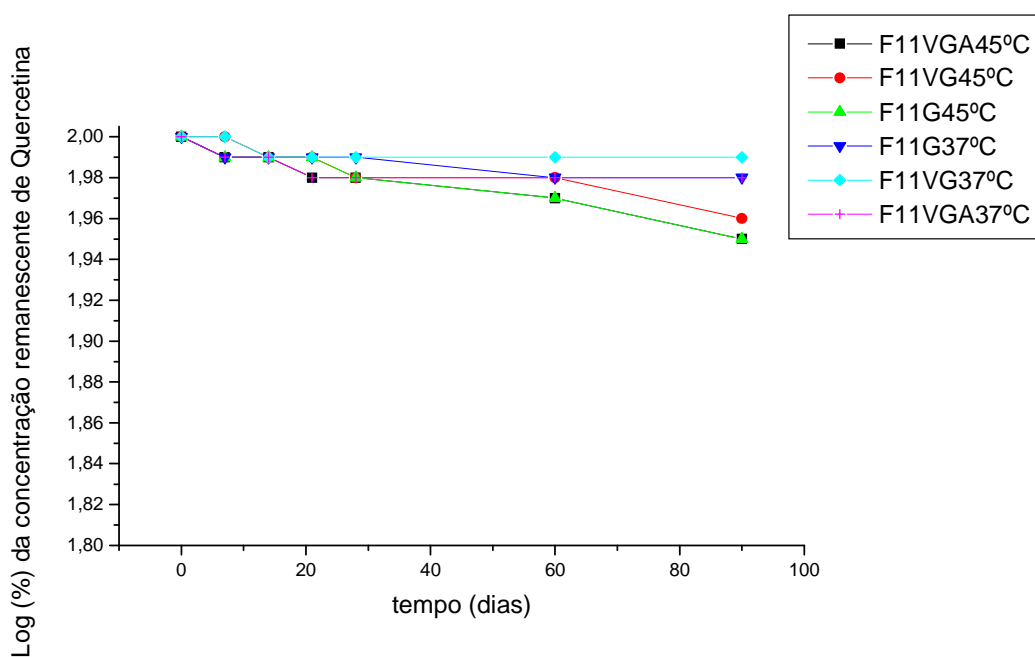


Figura 47. Log da concentração remanescente de quercetina nas formulações F11XG, F11XVG e F11XVGA, armazenadas às temperaturas ambiente, 37 e 45°C.

6.3.4.5. Determinação da concentração de *Phorphyra-334*

Tabela 22. Concentração remanescente de *Phorphyra-334*.

Formulação	Tempo	Temperatura					
		Ambiente		37°C		45°C	
		%	Log %	%	Log %	%	Log %
F11XA	0	102,30	2,01	102,30	2,01	102,30	2,01
	7	100,78	2,00	100,08	2,00	99,43	2,00
	14	99,89	2,00	99,72	2,00	98,56	1,99
	21	99,09	2,00	99,01	2,00	97,43	1,99
	28	98,98	2,00	98,78	1,99	95,54	1,98
	60	98,17	1,99	98,21	1,99	91,65	1,96
	90	98,06	1,99	97,72	1,99	90,75	1,96
F11XVGA	0	101,40	2,01	101,40	2,01	101,40	2,01
	7	99,88	2,00	99,18	2,00	98,53	1,99
	14	98,99	2,00	98,82	1,99	97,66	1,99
	21	98,19	1,99	98,11	1,99	96,53	1,98
	28	98,08	1,99	97,88	1,99	94,64	1,98
	60	97,27	1,99	97,31	1,99	90,75	1,96
	90	97,16	1,99	96,82	1,99	89,85	1,95

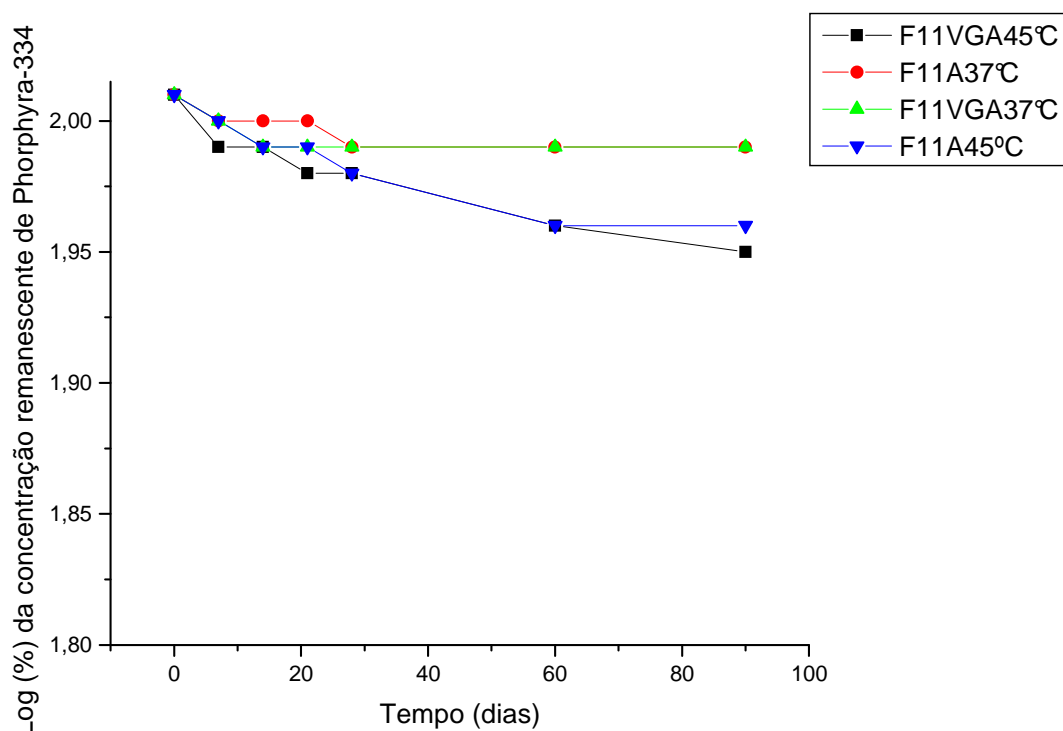


Figura 48. Log da concentração remanescente de *Phorphyra-334* nas formulações F11XA e F11XVGA armazenadas às temperaturas 37 e 45°C.

6.3.5. Determinação do prazo de validade

A partir dos resultados obtidos na determinação da estabilidade química das formulações, foi possível determinar o prazo de validade das mesmas utilizando-se a equação de Arrhenius.

Os valores da constante de velocidade “K” para as substâncias ativas nos diferentes tempos de estocagem foram praticamente constantes, indicando que a reação de degradação das vitaminas e extratos nas formulações em estudo seguem a cinética de primeira ordem.

As Tabelas de 23 a 27 mostram os valores das constantes de velocidade “K”, segundo a reação de degradação de primeira ordem, para as formulações estudadas, nas temperaturas de 37 e 45°C, respectivamente.

Os valores do prazo de validade estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 23. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XG.

Substancia ativa	Tempo (dias)	F11XG	
		37°C	45°C
Quercetina	07	0.00016	0.00020
	14	0.00021	0.00025
	21	0.00030	0.00034
	28	0.00032	0.00048
	60	0.00040	0.00063
	90	0.00042	0.00108
	média	0.00030	0.00032

Tabela 24. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XA.

Substancia ativa	Tempo (dias)	F11XA	
		37°C	45°C
<i>Phorphyra-334</i>	07	0.00001	0.00006
	14	0.00003	0.00015
	21	0.00010	0.00026
	28	0.00012	0.00046
	60	0.00018	0.00087
	90	0.00023	0.00097
	média	0.00011	0.00023

Tabela 25. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XV.

Substancia ativa	Tempo (dias)	F11XV	
		37°C	45°C
Vitamina A	07	0.00223	0.00175
	14	0.00174	0.00178
	21	0.00179	0.00190
	28	0.00170	0.00290
	60	0.00086	0.00200
	90	0.00081	0.00160
	média	0.00152	0.00208
Vitamina C	07	0.00007	0.00002
	14	0.00018	0.00012
	21	0.00019	0.00023
	28	0.00028	0.00057
	60	0.00032	0.00089
	90	0.00044	0.00132
	média	0.00025	0.00024
Vitamina E	07	0.00003	0.00004
	14	0.00007	0.00017
	21	0.00014	0.00027
	28	0.00020	0.00057
	60	0.00028	0.00088
	90	0.00034	0.00103
	média	0.00017	0.00026

Tabela 26. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XVG.

Substancia ativa	Tempo (dias)	F11XVG	
		37°C	45°C
Vitamina A	07	0.00105	0.00057
	14	0.00115	0.00118
	21	0.00138	0.00149
	28	0.00139	0.00259
	60	0.00072	0.00185
	90	0.00071	0.00149
	média	0.00107	0.00146
Vitamina C	07	0.00001	0.00006
	14	0.00009	0.00004
	21	0.00011	0.00015
	28	0.00020	0.00049
	60	0.00024	0.00080
	90	0.00035	0.00122
	média	0.00016	0.00015
Vitamina E	07	0.00011	0.00005
	14	0.00001	0.00009
	21	0.00005	0.00019
	28	0.00012	0.00048
	60	0.00020	0.00079
	90	0.00025	0.00094
	média	0.00008	0.00018
Quercetina	07	0.00008	0.00011
	14	0.00012	0.00017
	21	0.00021	0.00026
	28	0.00023	0.00039
	60	0.00031	0.00055
	90	0.00033	0.00099
	média	0.00022	0.00023

Tabela 27. Valores referentes às constantes de velocidade (K) segundo reação de degradação de cinética de primeira ordem, para as substâncias ativas em estudo, presentes na formulação F11XGVA.

Substancia ativa	Tempo (dias)	F11XGVA	
		37°C	45°C
Vitamina A	07	0.00354	0.00306
	14	0.00240	0.00244
	21	0.00223	0.00235
	28	0.00204	0.00326
	60	0.00102	0.00217
	90	0.00092	0.00171
	média	0.00203	0.00278
Vitamina C	07	0.00016	0.00011
	14	0.00027	0.00022
	21	0.00029	0.00032
	28	0.00037	0.00067
	60	0.00042	0.00099
	90	0.00053	0.00142
	média	0.00034	0.00033
Vitamina E	07	0.00006	0.00013
	14	0.00016	0.00026
	21	0.00023	0.00036
	28	0.00030	0.00066
	60	0.00038	0.00098
	90	0.00043	0.00113
	média	0.00026	0.00035
Quercetina	07	0.00025	0.00029
	14	0.00030	0.00034
	21	0.00039	0.00043
	28	0.00041	0.00057
	60	0.00049	0.00073
	90	0.00051	0.00118
	média	0.00039	0.00041
<i>Phorphyra-334</i>	07	0.00008	0.00015
	14	0.00012	0.00024
	21	0.00019	0.00035
	28	0.00021	0.00055
	60	0.00027	0.00097
	90	0.00032	0.00107
	média	0.00020	0.00032

Tabela 28. Prazos de validade das formulações em estudo.

Formulação	Substância Ativa	Prazo de validade (dias)
F11XG	<i>Ginkgo biloba</i>	456,01
F11XA	Algas marinhas vermelhas	242,80
F11XV	Vitamina A	165,65
	Vitamina C	451,23
	Vitamina E	1290,67
F11XVG	<i>Ginkgo biloba</i>	621,32
	Vitamina A	228,30
	Vitamina C	602,13
	Vitamina E	2678,32
F11XVGA	<i>Ginkgo biloba</i>	847,53
	Algas marinhas vermelhas	822,93
	Vitamina A	322,13
	Vitamina C	887,29
	Vitamina E	1082,32

6.4. TESTE DE COMPATIBILIDADE CUTÂNEA

As formulações avaliadas no teste de compatibilidade cutânea foram as formulações F11X, uma vez que esta apresentou menores variações nos parâmetros avaliados no estudo de estabilidade física, bem como esta contendo a associação de substâncias ativas (F11XVGA), para verificar se estas podem apresentar alguma reação primária após a aplicação.

Os resultados obtidos no estudo estão apresentados no Anexo 4, relatório emitido pelo Instituto de Bioengenharia da Pele Evic Brasil Ltda, São Paulo – SP, onde as formulações F11X e F11XVGA correspondem as formulações F11 e F14, respectivamente.

Durante o estudo nenhum sinal clínico foi observado e nenhuma sensação de desconforto foi relatada. Desta maneira, as formulações foram consideradas compatíveis com a pele podendo então ser utilizadas na avaliação da eficácia na pele humana.

6.5. AVALIAÇÃO SENSORIAL

Os resultados obtidos na avaliação sensorial das formulações objeto de estudo estão apresentados na Figura 49, onde se pode observar que não houve diferenças sensoriais entre as formulações que continham ou não os extratos vegetais e vitaminas em estudo.

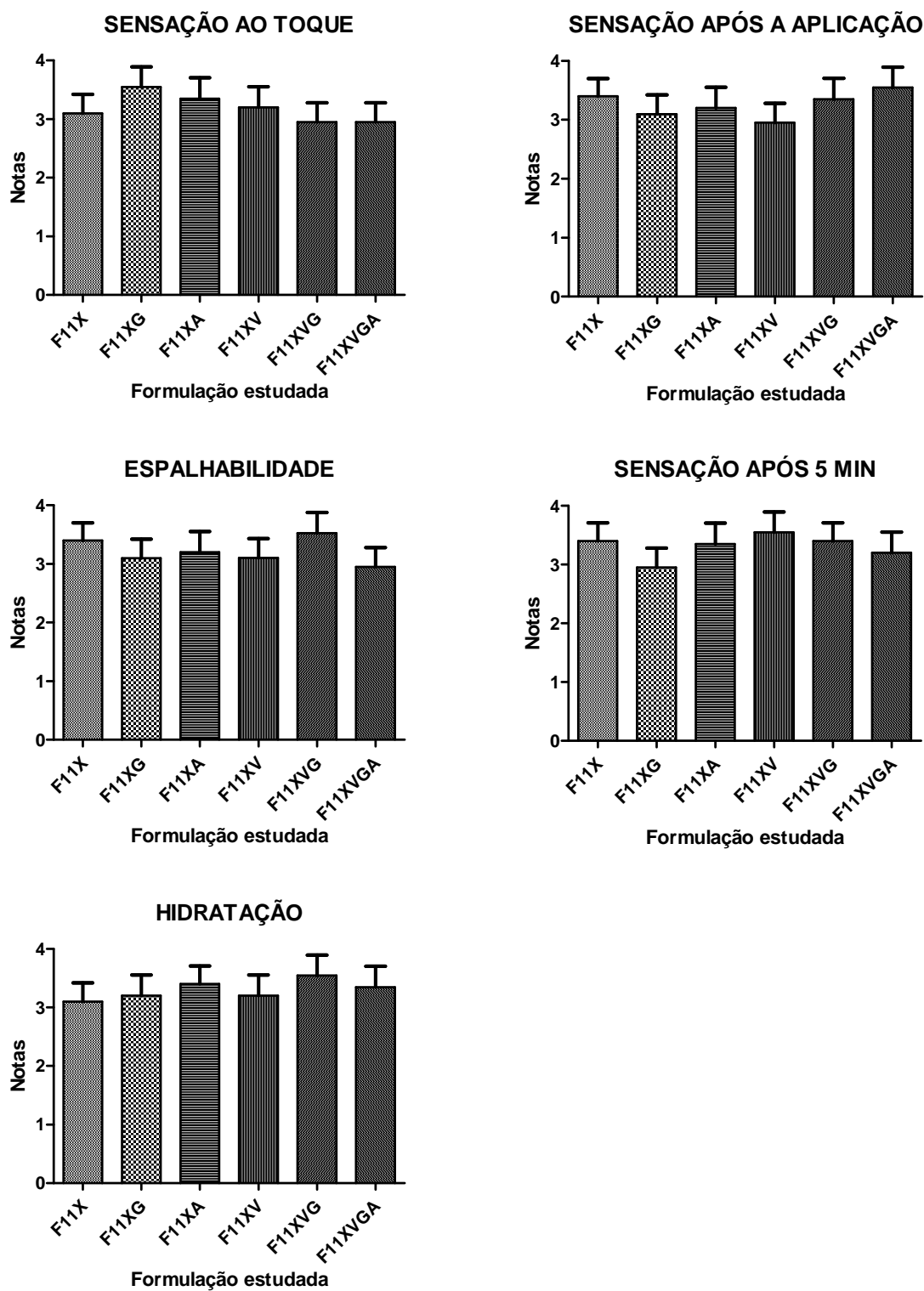


Figura 49. Valores de avaliação sensorial das formulações em estudo em relação aos parâmetros: sensação ao toque (A), espalhabilidade (B), sensação da pele imediatamente após a aplicação (C), sensação da pele após 5 minutos da aplicação (D) e sensação de hidratação da pele (E).

6.6. QUANTIFICAÇÃO DO LIMIAR DE PERCEPÇÃO A UMA CORRENTE ELÉTRICA (CPT)

Os resultados obtidos no estudo de análise do limiar de percepção a uma corrente elétrica, realizados com a formulação F11XVGA, na face das voluntárias estão apresentados na Figura 50.

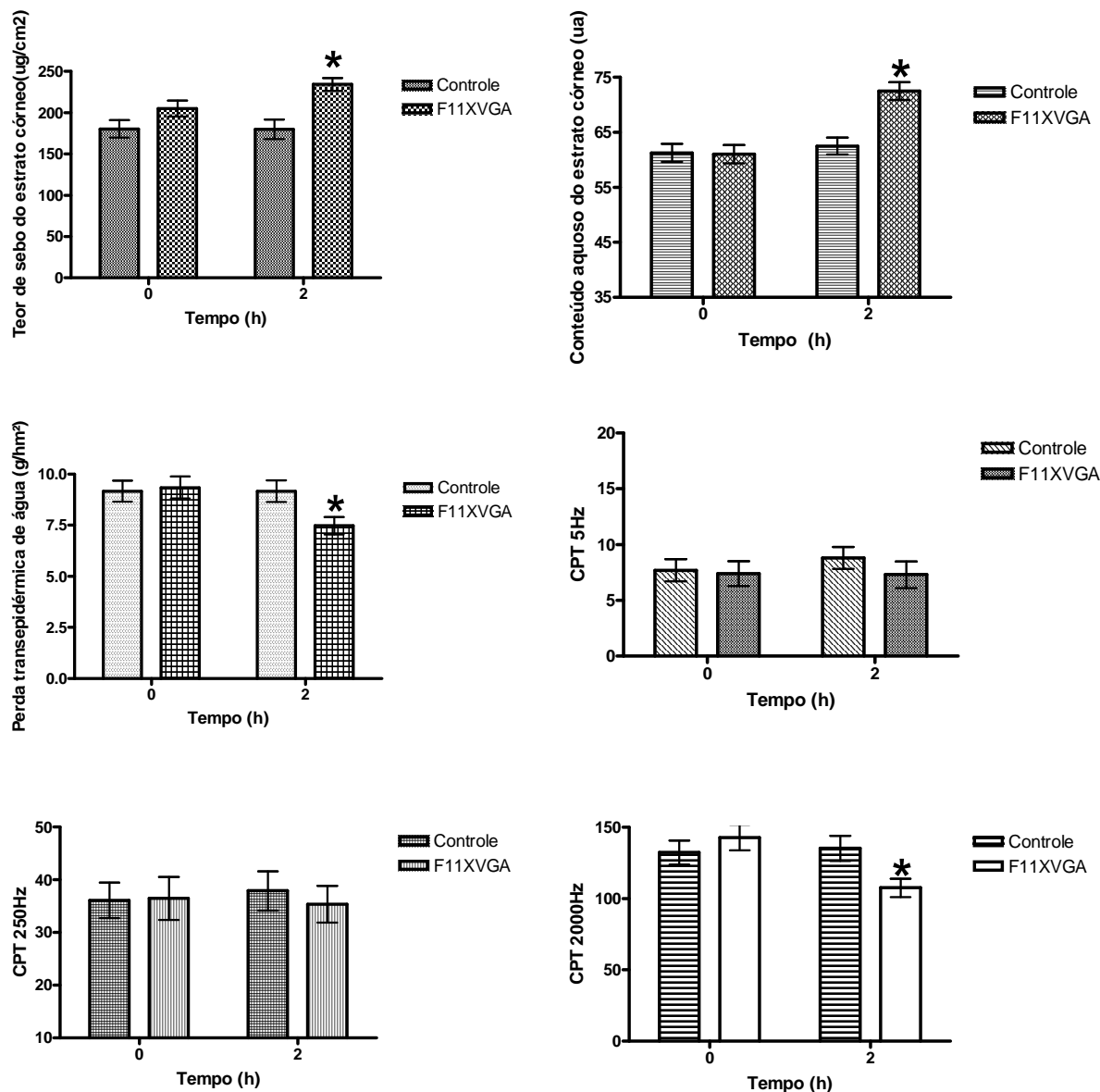


Figura 50: Conteúdo de sebo (A), conteúdo aquoso do estrato córneo (B), perda transepidermica de água (TEWL) (C), CPT 5Hz (D), CPT 250Hz (E) e CPT 2000Hz (F) antes (valores basais) e depois de 2 horas da aplicação da formulação F11XGVA e da região controle, na face das voluntárias (Teste de Friedman).

*: estatisticamente diferente dos valores basais (p < 0.001).

6.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA PELE FRENTE A VARIAÇÃO DO CLIMA

Os resultados obtidos na avaliação do efeito protetor da pele frente a variação do climas estão apresentados nas figuras de 51 a 53.

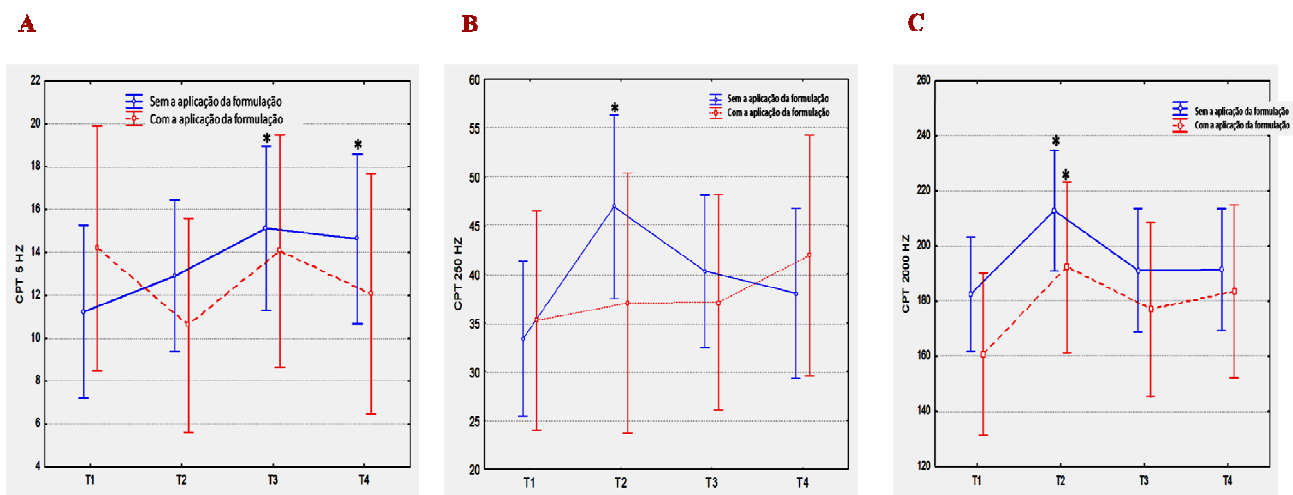


Figura 51: Média dos valores de CPT 5 Hz (A), 250Hz (B) e 2000Hz (C) obtidos na face das voluntárias com e sem a aplicação da formulação objeto de estudo, nos tempos T1, T2, T3 e T4.

* Médias estatisticamente diferentes.

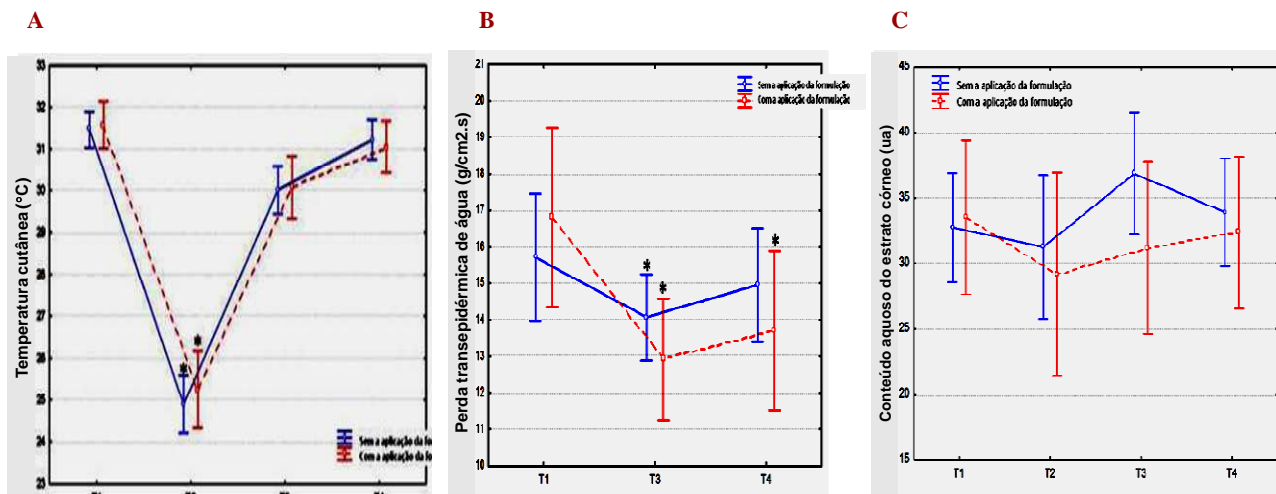


Figura 52: Média dos valores de temperatura da pele, (A), Perda transepidérmica de água (B) e conteúdo aquoso do estrato córneo (C) obtidos na face das voluntárias com e sem a aplicação da formulação objeto de estudo, nos tempos T1, T2, T3 e T4. * Médias estatisticamente diferentes.

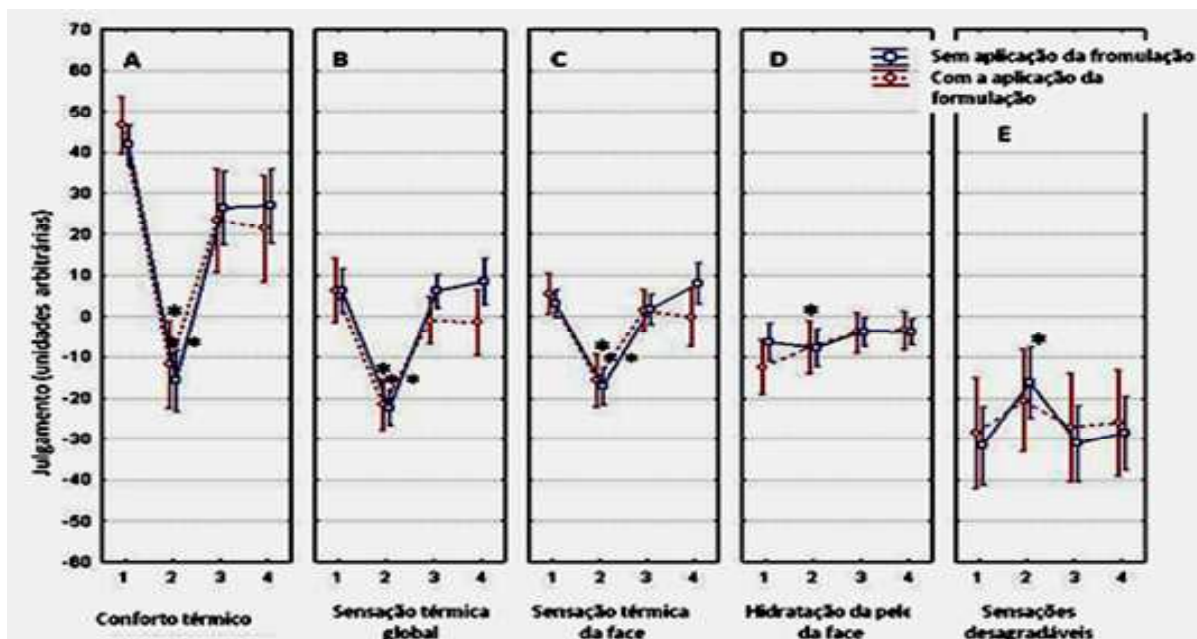


Figura 53: Média dos valores do julgamento do conforto térmico (A), da sensação térmica global (B), da sensação térmica da face (C), da hidratação da pele (D) e de sensações desagradáveis (E), obtidos na escala analógica pelas voluntárias, com e sem a aplicação da formulação objeto de estudo nos tempos T1, T2, T3 e T4.* Médias estatisticamente diferentes.

A temperatura da pele variou de $31,5^{\circ}$ a $24,9^{\circ}$ durante a exposição na sala fria (Figura 52). A sensibilidade das fibras C aumentou significativamente apenas após a exposição a câmara fria enquanto que o CPT das fibras A δ e A β aumentou significativamente durante a exposição, e foi totalmente recuperado para A β 15 minutos após a interrupção da exposição à temperatura fria (Figura 51).

O conforto térmico diminuiu muito na câmara fria e só foi parcialmente recuperado uma hora após a exposição. A sensação térmica (global e cutânea) diminuiu na câmara climática e quase foi recuperada após 15 minutos. A sensação de hidratação da pele facial diminuiu ligeiramente após a exposição a câmara fria (Figura 53). Observou-se uma diminuição significativa na TEWL após 15min na câmara fria, o que retornou ao normal após 1h. A mudança de temperatura não alterou o conteúdo aquoso do estrato córneo. A taxa de sebo e o pH aumentaram após a exposição a câmara fria e voltaram ao normal 1h15 e 15 min. a 21°C , respectivamente (Figura 52).

Com a aplicação da formulação observou-se uma diminuição do TEWL e pH, e aumento da taxa de sebo o que deve ser devido a composição da mesma, e não relacionada a mudança de temperatura ambiente (Figura 52). Em relação ao CPT das fibras C observou-se uma diminuição, após a passagem pela câmara fria, no entanto esses resultados não foram estatisticamente diferentes dos voluntários que não aplicaram o creme (Figura 51).

Em relação a sensibilidade subjetivas dos voluntários, quando utilizada a formulação objeto de estudo observou-se uma leve mas significativa melhora da sensação de hidratação da face, 15

minutos após a passagem na câmara fria, e apenas uma tendência no aumento das sensações desagradáveis, comparado com o grupo que não aplicou a formulação (Figura 53).

6.8. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA EFICÁCIA

Os dados experimentais obtidos na avaliação de cada parâmetro consistiram em 84 valores para os antebraços, correspondentes ao cruzamento dos valores obtidos das 6 formulações (F11X, F11XG, F11XA, F11XV, F11XVG, F11XVGA) e do controle X 2 tempos (inicial e 30 dias) x 6 repetições, dando o produto fatorial $7 \times 2 \times 6 = 84$.

Os testes preliminares para verificação da normalidade da amostra obtida nestes estudos revelaram que a maioria das distribuições era normal, sendo assim, na análise estatística selecionado o teste paramétrico Análise de Variância.

6.8.1. Avaliação do ângulo tipológico individual

Os valores do de ângulo tipológico individual, obtidos com a aplicação das formulações em estudo nos antebraços estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Ângulo tipológico individual do antebraço das voluntárias selecionadas para o estudo.

Ângulo tipológico individual							Média
56	58.3	64.3	63.7	48.3	43	45	51,68
32.9	35	63.7	61.6	48	46	47.3	
49	47	49.3	56.3	44.7	52	49.1	
58.3	56.7	43.3	63	59.7	45	50.3	
55.3	47.3	53	52.8	51.2	55.2	62	
48.9	48.3	51.2	57.3	52.4	53.4	45.7	

Podemos observar que as voluntárias selecionadas para este estudo apresentaram um valor médio de ângulo tipológico individual de 51,68, ou seja, as voluntárias apresentavam pele considerada clara (PIÉRARD, 1998; FULLERTON et al.; 1996; COLIPA, 2007).

6.8.2. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Os valores do conteúdo aquoso do estrato córneo obtidos com a aplicação das formulações em estudo nos antebraços estão apresentados na Tabela 30 e Figura 54.

Tabela 30. Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	37.8	36.1	36.8	33.6	36.7	37.8	38.2
	40.1	43.9	45	38.2	39.3	39.9	40.1
	51.2	42.4	44.6	38.3	31.6	34	36.7
	47.8	39.7	42.3	44.9	40.3	44.4	45.5
	53.3	41.3	33.1	36.1	40.9	35.5	39.8
	37.3	36.4	39.7	39.6	41	37.5	36.1
	50	51.7	51.06	59.7	55.4	53.8	40.1
30 dias	51.9	50.34	49.14	56.3	58.9	52.3	39.8
	59.2	57.7	55.4	51.7	57.3	49.24	36.2
	52.2	48.4	56.9	57.9	59.2	52.1	46.1
	59.9	53.4	52.1	47.3	57.5	52.4	39.8
	44.2	54.8	55.5	74.1	79.6	55.7	37.5

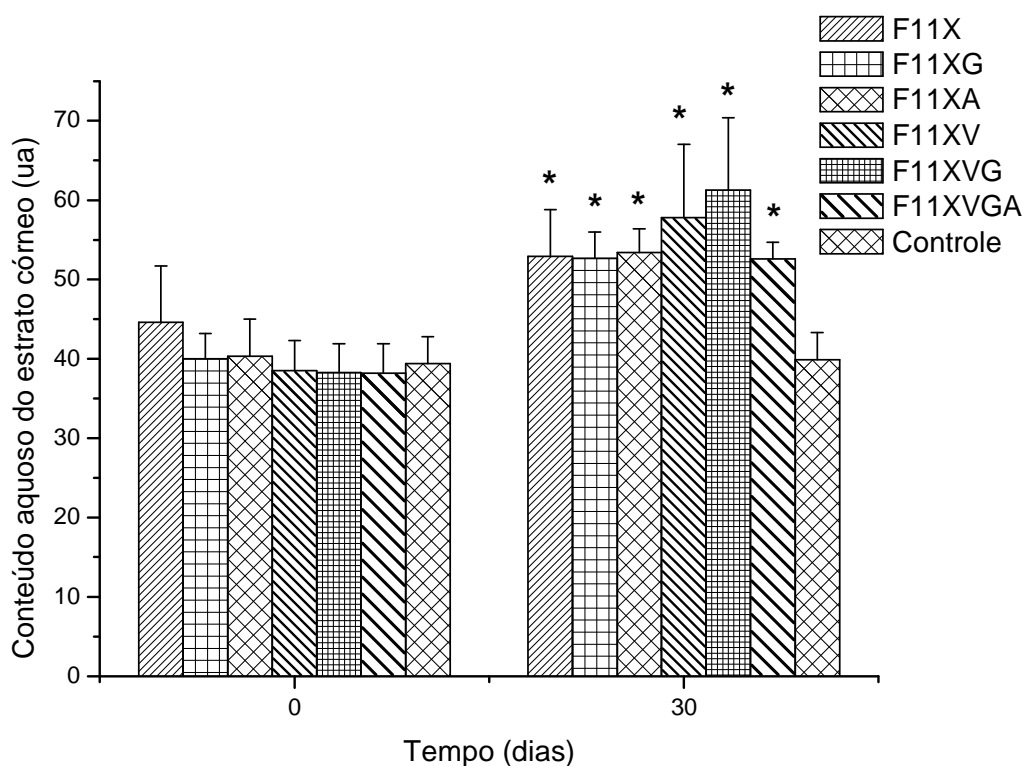


Figura 54. Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

*: estatisticamente diferente dos valores basais ($P < 0,001$)

Os resultados da Análise de Variância obtidos para os valores de conteúdo aquoso do estrato córneo estão apresentados na Tabela 31. Podemos observar que todas as formulações em estudo proporcionaram um aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo após 30 dias de estudo, em relação aos valores basais obtidos no tempo inicial ($p < 0,001$). Observou-se ainda que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as formulações analisadas, ou seja, a adição das substâncias em estudo não alterou os valores de umectação cutânea quando comparados com o veículo (Figura 54).

Tabela 31. Conteúdo aquoso do estrato córneo do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	5330,1	444,2	17,95	0,0000%
Erro	65	1608,1	24,7		
Total	77	6938,2			

6.8.3. Determinação da perda transepidérmica de água

Os valores de perda transepidérmica de água obtidos com a aplicação das formulações em estudo nos antebraços estão apresentados na Tabela 32 e Figura 55.

Tabela 32. Perda transepidérmica de água do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						Controle
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	
T0	11.6	11.2	10.9	11.2	10.8	11.6	12.1
	3.9	9.1	7.1	5.6	7.5	7.9	8.3
	4.2	4.2	6.6	3.6	4.1	4.4	5.1
	5.6	5.1	6.1	3.7	3.5	3.9	4.1
	7.2	7.2	7.1	4.5	5	5.1	4.9
	5.7	5.8	5.9	5.4	5.4	6.8	5.6
	9.9	2.4	2.4	10.5	6	7.6	10.3
30 dias	3.9	2.5	2.6	6.1	3.7	5.7	7.6
	4	1.9	2.1	4	3.6	5.7	5.2
	5.3	2.5	3.2	4.3	3	2.1	4.3
	7	2.1	2.9	5.3	3.9	2.3	4.1
	5.9	2.5	2.0	6.2	4.9	3.5	6.1

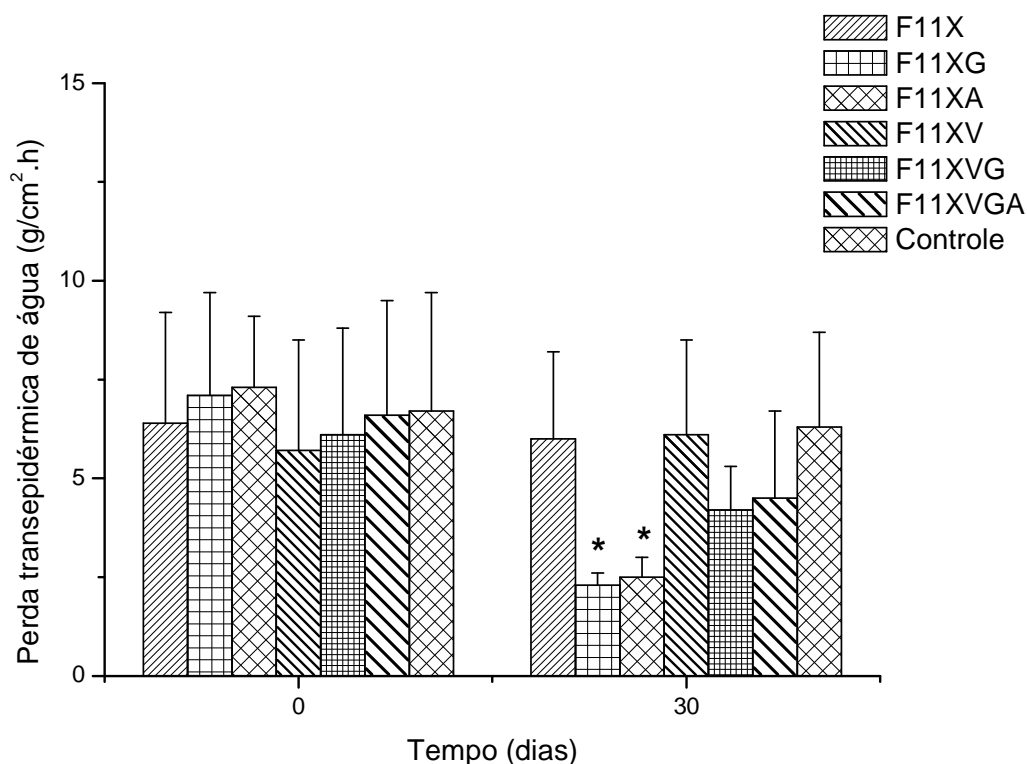


Figura 55. Perda transepidermica de água do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

*: estatisticamente diferente dos valores basais ($P < 0,001$).

Os resultados da Análise de Variância obtidos para os valores de perda de água transepidermica de água estão apresentados na Tabela 33, onde podemos observar que apenas as formulações acrescidas do extrato de *Ginkgo biloba* (F11XG) e de algas marinhas vermelhas (F11XA) provocaram uma redução nesta perda estatisticamente significativa ($P < 0,001$) quando comparadas aos valores basais e ao controle, ou seja, apenas a adição *Ginkgo biloba* e das algas marinhas vermelhas protegeu a função barreira da pele após 30 dias de estudo (Figura 55).

Tabela 33. Perda transepidermica de água do antebraço – Análise de Variância, $n=6$.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	193,82	14,91	2,84	0,002
Erro	65	366,93	5,24		
Total	77	560,75			

6.8.4. Determinação do micro-relevo cutâneo

Os parâmetros estudados para avaliar o micro-relevo cutâneo foram: Sesm (suavidade da pele), Ser (aspereza da pele), Sew (número e largura das rugas) e Rt (rugosidade de pele). Os valores obtidos para estes parâmetros estão apresentados nas Tabelas de 34 a 37 e nas Figuras de 56 a 59.

Tabela 34. Suavidade da pele (Sesm) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	32.320	34.290	36.780	36.590	29.350	33.120	32.800
	37.820	27.100	27.540	31.090	25.780	24.890	28.220
	43.240	23.800	28.350	28.340	29.940	32.320	29.310
	32.800	33.410	36.780	25.920	22.520	24.460	32.660
	22.340	27.100	27.540	24.130	25.780	33.120	25.780
	33.120	23.800	28.350	28.340	29.940	32.320	33.120
30 dias	37.820	30.950	30.750	30.660	25.140	29.940	28.220
	42.800	28.340	25.560	28.520	25.260	29.310	28.870
	32.360	48.270	21.630	33.540	27.980	25.450	32.660
	22.780	30.380	30.750	24.320	22.340	43.240	26.220
	33.120	28.340	25.560	21.380	27.980	25.450	33.560
	33.313	30.950	21.630	24.320	25.140	29.940	30.608

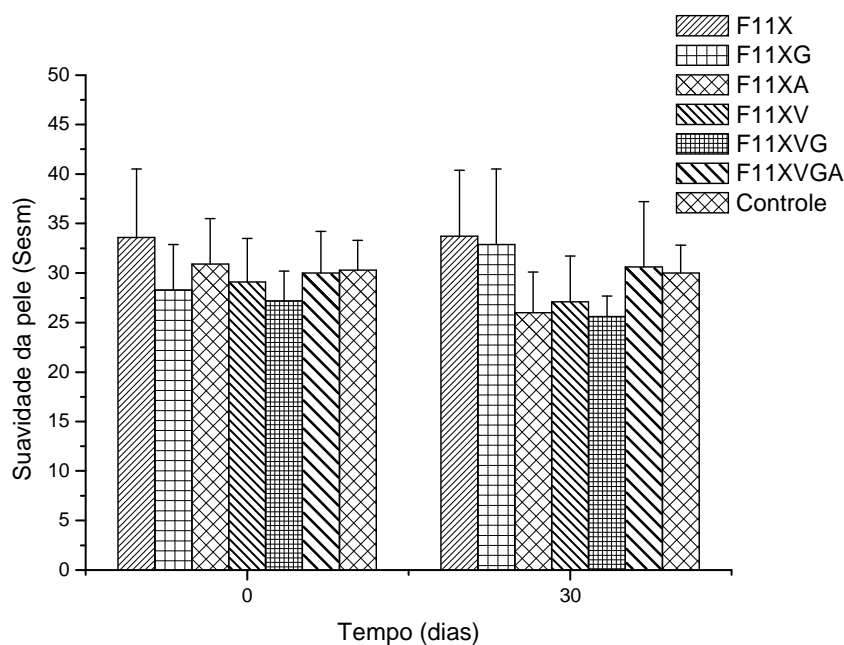


Figura 56. Suavidade da pele (Sesm) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tabela 35. Aspereza da pele (Ser) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	1.410	0.500	0.480	0.640	0.520	0.660	0.920
	1.190	0.460	1.350	0.370	0.960	0.860	0.760
	0.940	0.230	0.220	0.570	0.290	1.410	0.660
	0.920	0.370	0.480	0.580	0.210	0.320	0.740
	0.680	0.460	1.350	1.210	0.960	0.660	0.960
	0.660	0.230	0.220	0.570	0.290	1.410	0.660
30 dias	1.190	0.530	0.740	1.420	0.280	0.660	0.760
	0.500	0.340	0.590	0.250	1.620	0.600	0.660
	0.920	2.010	0.380	0.990	0.500	0.940	0.740
	1.120	0.340	0.740	0.270	0.680	0.940	1.400
	1.100	0.340	0.590	0.190	0.500	0.940	1.100
	1.260	0.530	0.380	0.270	0.280	0.660	1.077

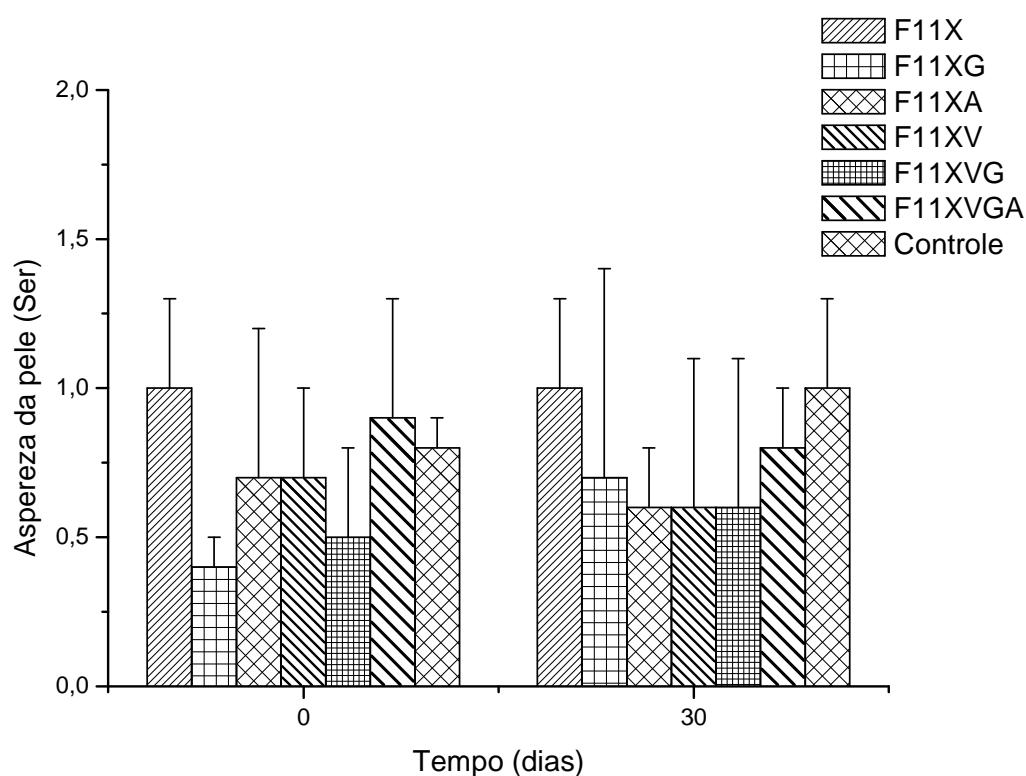


Figura 57. Aspereza da pele (Ser) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tabela 36. Número e largura das rugas (Sew) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						Controle
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	
T0	53.070	42.870	44.200	42.350	53.270	48.000	46.000
	46.920	51.920	60.000	53.600	52.280	61.450	49.510
	39.710	65.390	56.250	45.700	49.890	53.070	40.370
	46.000	50.620	44.200	48.000	57.460	60.400	45.800
	49.660	51.920	60.000	57.460	52.280	48.000	52.280
	48.000	65.390	56.250	45.700	49.890	53.070	48.000
30 dias	47.500	45.380	40.520	43.550	56.120	49.890	49.510
	40.290	45.700	45.800	46.000	40.290	40.370	39.930
	46.520	45.800	53.270	37.940	36.330	49.890	45.800
	50.680	48.210	40.520	52.410	49.660	39.710	52.720
	48.580	45.700	45.800	60.920	36.330	49.890	48.440
	47.953	45.380	53.270	52.410	56.120	49.890	47.287

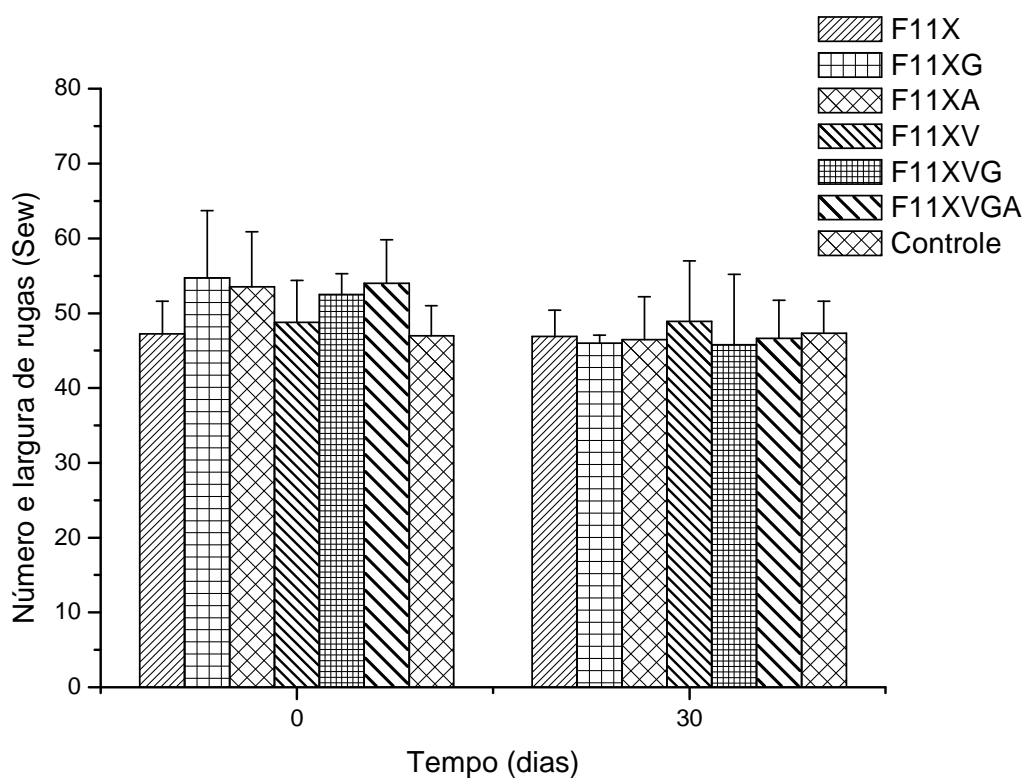


Figura 58. Número e largura de rugas da pele (Sew) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tabela 37. Rugosidade da pele (Rt) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	45.000	46.000	43.000	46.000	44.000	41.000	35.000
	47.000	37.000	39.000	37.000	34.000	34.000	40.000
	54.000	32.000	40.000	45.000	41.000	45.000	38.000
	35.000	39.000	43.000	37.000	34.000	37.000	42.000
	32.000	37.000	39.000	33.000	34.000	41.000	34.000
	41.000	32.000	40.000	45.000	41.000	45.000	41.000
30 dias	47.000	40.000	40.000	41.000	35.000	39.000	40.000
	53.560	42.000	33.000	35.000	34.000	36.000	37.560
	35.000	58.000	35.000	44.000	43.000	34.000	42.000
	32.440	40.000	40.000	33.000	32.000	54.000	34.440
	41.440	42.000	33.000	28.000	43.000	34.000	41.440
	42.627	40.000	35.000	33.000	35.000	39.000	38.627

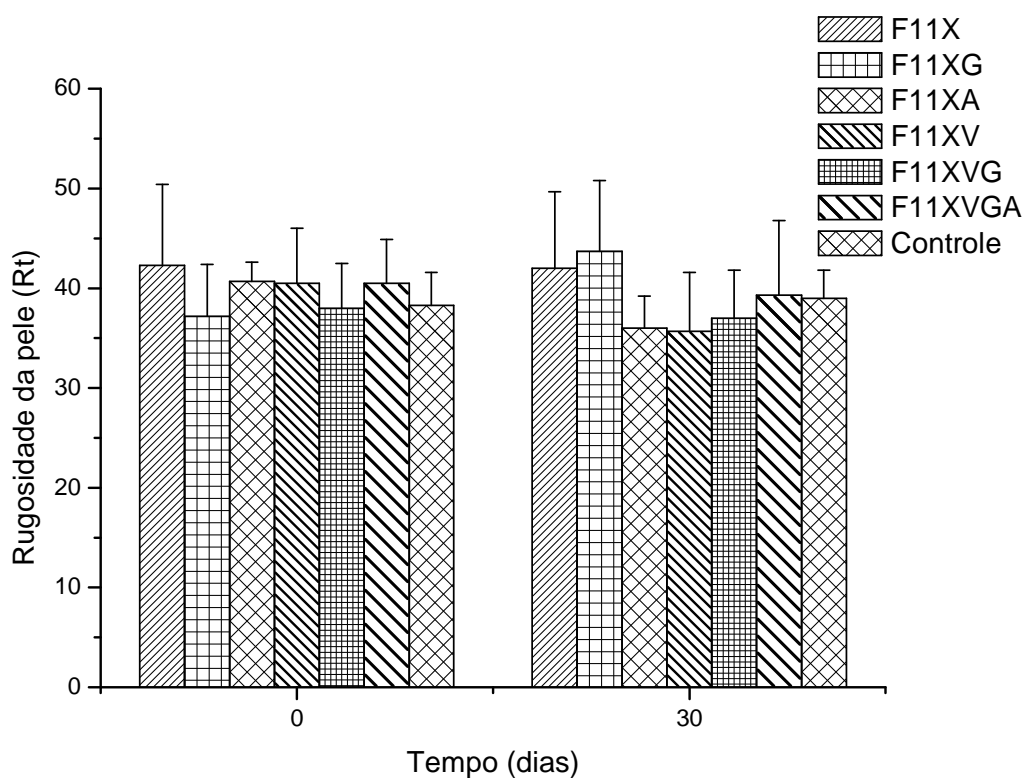


Figura 59. Rugosidade da pele (Rt) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Os resultados da Análise de Variância obtidos para os parâmetros de micro-relevo cutâneo estão apresentados nas Tabelas de 38 a 41. Podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as formulações analisadas, ou seja, a adição das substâncias ativas em estudo não alterou o micro-relevo cutâneo após 30 dias de estudo (Figuras de 56 a 59), apenas as formulações que continham os extratos de algas ou *Ginkgo biloba* ou quando estes estavam associados as vitaminas mostraram uma tendência na redução do parâmetro Sew.

Tabela 38. Suavidade da pele (Sesm) do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	437,4	36,5	1,62	0,108
Erro	65	1462,0	22,5		
Total	77	1899,5			

Tabela 39. Aspereza da pele (Ser) do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	2,323	0,194	1,35	0,214
Erro	65	9,328	0,144		
Total	77	11,651			

Tabela 40. Número e largura das rugas (Sew) do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	790,6	65,9	1,83	0,062
Erro	65	2341,4	36,0		
Total	77	3132,0			

Tabela 41. Rugosidade da pele (Rt) do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	402,6	33,5	1,24	0,279
Erro	65	1765,2	27,2		
Total	77	2167,8			

6.8.5. Determinação das propriedades visco-elásticas da pele

Os parâmetros estudados para avaliar as propriedades visco-elásticas da pele foram: relação entre visco-elasticidade/elasticidade da pele (U_v/U_e) e elasticidade biológica (U_r/U_f). Os valores obtidos para estes parâmetros estão apresentados nas Tabelas 42 e 43, e nas Figuras 60 e 61.

Tabela 42. Relação visco-elasticidade/elasticidade (U_v/U_e) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	0.219	0.212	0.308	0.154	0.182	0.346	0.152
	0.161	0.219	0.194	0.194	0.138	0.185	0.189
	0.194	0.136	0.161	0.136	0.161	0.259	0.205
	0.136	0.187	0.162	0.269	0.208	0.143	0.132
	0.179	0.179	0.162	0.333	0.161	0.150	0.235
	0.194	0.171	0.194	0.136	0.152	0.152	0.166
30 dias	0.196	0.171	0.182	0.154	0.162	0.128	0.161
	0.159	0.163	0.163	0.146	0.152	0.152	0.179
	0.135	0.185	0.171	0.280	0.171	0.240	0.202
	0.139	0.125	0.240	0.206	0.200	0.212	0.139
	0.180	0.176	0.161	0.250	0.139	0.171	0.199
	0.189	0.176	0.919	0.146	0.146	0.186	0.135

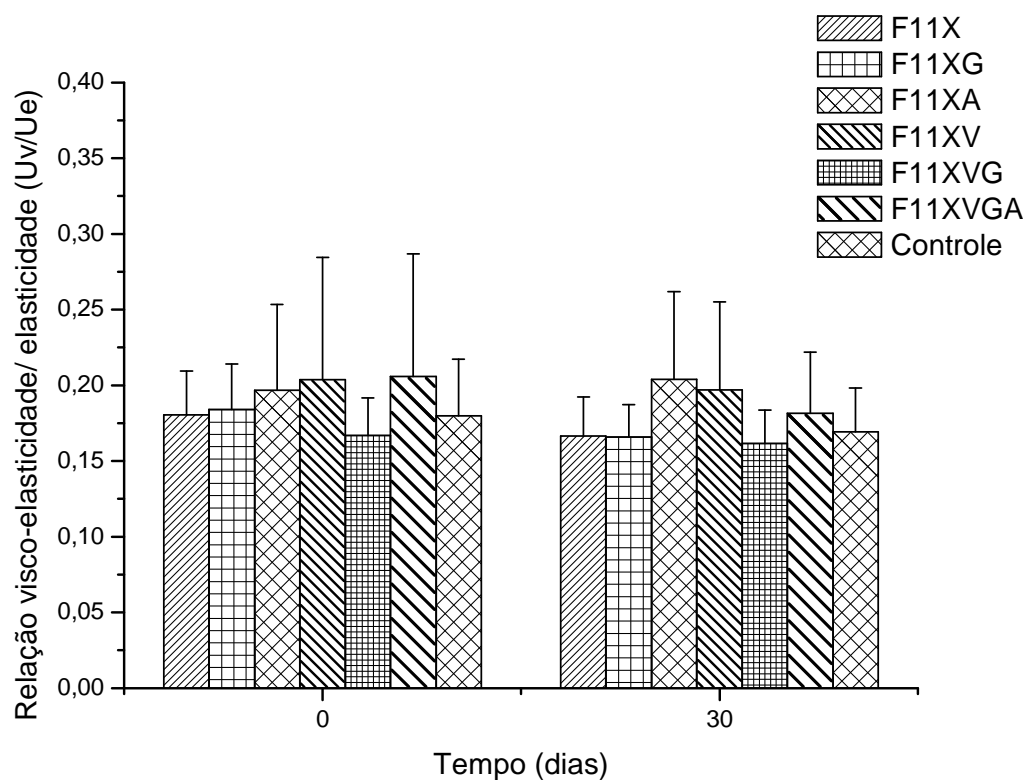


Figura 60. Relação visco-elasticidade/ elasticidade (U_v/U_e) da pele do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tabela 43. Elasticidade biológica da pele (Ur/Uf) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	0.633	0.625	0.676	0.615	0.641	0.800	0.641
	0.699	0.692	0.703	0.757	0.818	0.719	0.618
	0.781	0.680	0.722	0.760	0.694	0.647	0.694
	0.722	0.763	0.698	0.606	0.724	0.543	0.624
	0.633	0.717	0.699	0.714	0.677	0.621	0.677
	0.678	0.692	0.721	0.775	0.621	0.677	0.721
30 dias	0.687	0.659	0.692	0.711	0.721	0.660	0.621
	0.699	0.660	0.700	0.727	0.658	0.789	0.658
	0.699	0.719	0.756	0.719	0.780	0.677	0.680
	0.701	0.733	0.677	0.634	0.750	0.650	0.650
	0.655	0.600	0.777	0.629	0.623	0.610	0.623
	0.689	0.700	0.856	0.627	0.612	0.599	0.712

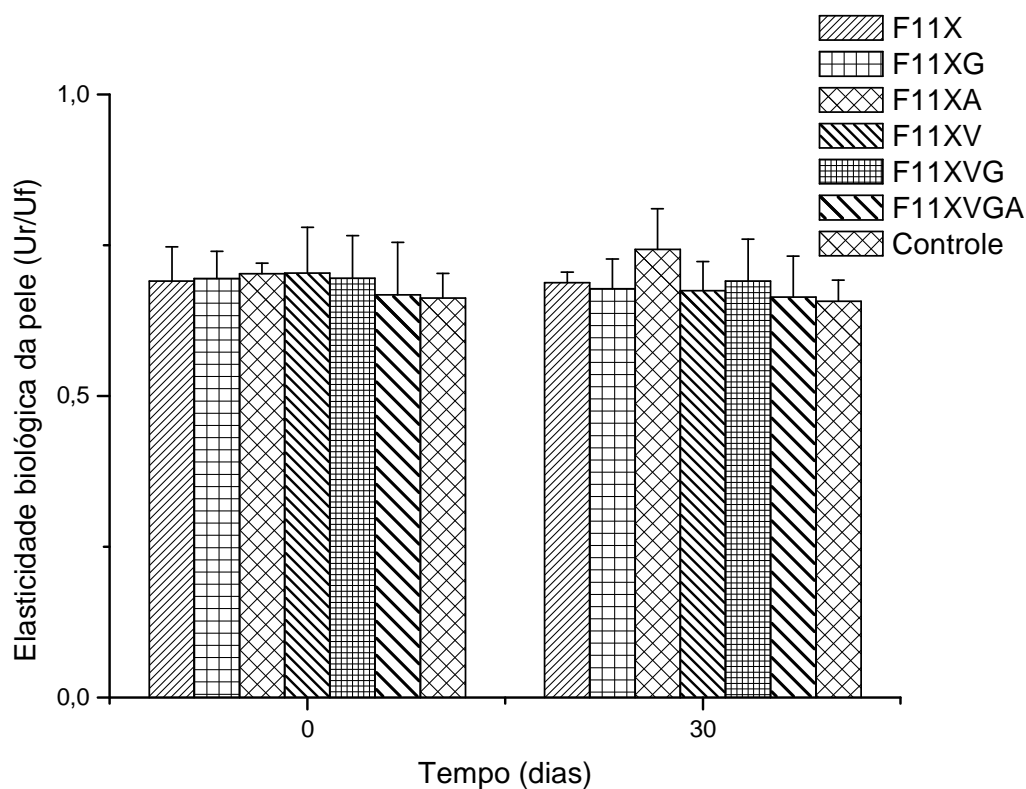


Figura 61. Elasticidade biológica da pele (Ur/Uf) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Os resultados da Análise de Variância obtidos para as propriedades visco-elásticas da pele estão apresentados na Tabelas 44 e 45. Podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as formulações analisadas, ou seja, a adição das substâncias ativas em estudo não alterou as propriedades visco-elásticas da pele após 30 dias de estudo (Figuras 60 e 61).

Tabela 44. Relação visco-elasticidade/elasticidade (Uv/Ue) da pele do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	0,10251	0,00854	0,94	0,511
Erro	65	0,58875	0,00906		
Total	77	0,69126			

Tabela 45. Elasticidade biológica da pele (Ur/Uf) da pele do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	0,03872	0,00323	0,98	0,476
Erro	65	0,21378	0,00329		
Total	77	0,25250			

6.8.6. Determinação da anisotropia da pele

Os valores do de anisotropia da pele, razão de RRTMMax/RRTMMin, obtidos com a aplicação das formulações em estudo nos antebraços estão apresentados na Tabela 46 e Figura 62.

Tabela 46. Anisotropia da pele (RRTMMax/RRTMMin) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	1.036	1.049	1.052	1.047	1.054	1.028	1.034
	1.024	1.032	1.024	1.017	1.259	1.058	1.052
	1.012	1.043	1.030	1.012	1.069	1.038	1.084
	1.052	1.036	1.033	1.042	1.158	1.084	1.058
	1.199	1.024	1.030	1.301	1.069	1.058	1.109
	1.089	1.032	1.033	1.047	1.158	1.028	1.031
30 dias	1.036	1.036	1.032	1.056	1.066	1.109	1.034
	1.024	1.051	1.070	1.033	1.021	1.031	1.052
	1.012	1.031	1.084	1.089	1.022	1.130	1.083
	1.053	1.172	1.115	1.026	1.124	1.077	1.058
	1.089	1.027	1.084	1.535	1.021	1.130	1.031
	1.089	1.172	1.115	1.089	1.124	1.077	1.031

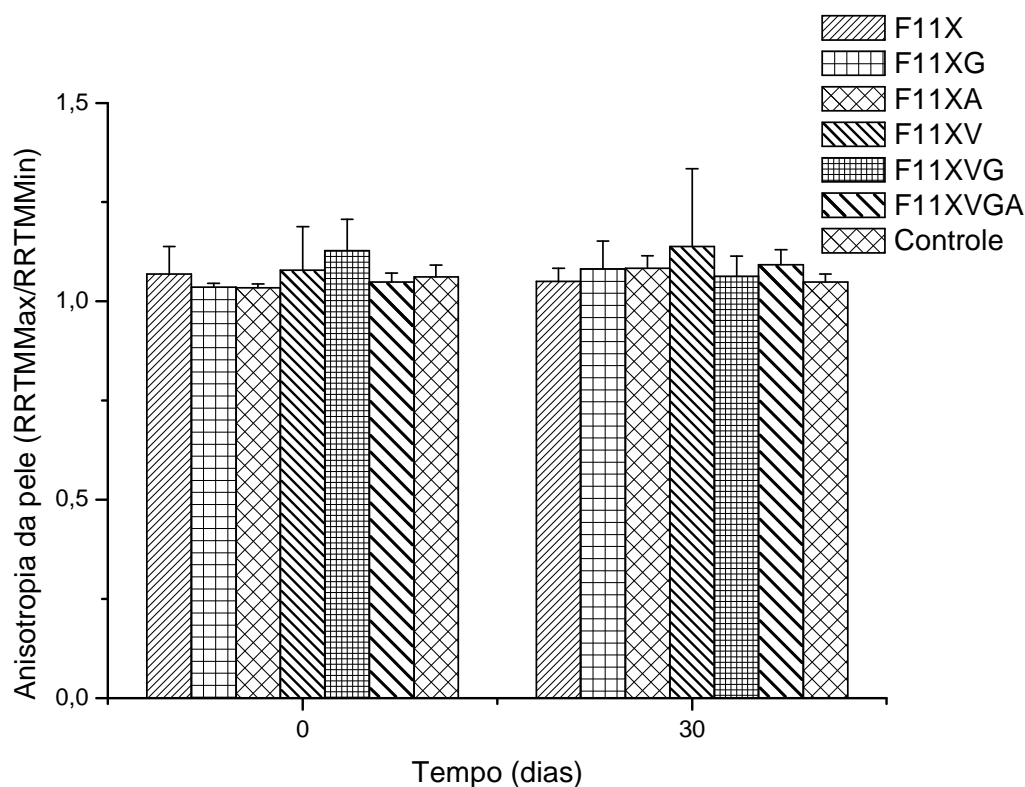


Figura 62. Anisotropia da pele (RRTMMax/RRTMMin) do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Os resultados da Análise de Variância obtidos para os valores de anisotropia da pele estão apresentados na Tabela 47. Podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as formulações analisadas, ou seja, a adição das substâncias em estudo não alterou a razão RRTMMax/RRTMMin da pele após 30 dias de estudo (Figura 62).

Tabela 47. Anisotropia da pele (RRTMMax/RRTMMin) do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	0,07592	0,00633	1,17	0,320
Erro	65	0,35013	0,00539		
Total	77	0,42605			

6.8.7. Avaliação da espessura da derme por ultrassom

Os valores da espessura da derme obtidos com a aplicação das formulações em estudo nos antebraços das voluntárias estão apresentados na Tabela 48 e Figura 63.

Tabela 48. Espessura da derme do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Tempo	Formulações						
	F11X	F11XG	F11XA	F11XV	F11XVG	F11XVGA	Controle
T0	0.888	1.207	1.174	1.099	1.072	0.969	0.969
	0.985	0.937	0.987	0.932	1.174	1.067	1.067
	0.969	0.937	1.174	0.932	0.984	0.985	0.969
	1.067	0.926	1.069	0.926	0.748	0.888	0.888
	0.900	0.894	0.995	1.088	0.900	1.153	1.153
	0.932	1.098	0.995	0.836	0.900	0.969	1.091
30 dias	1.079	1.135	1.131	1.066	1.061	1.040	1.009
	1.187	0.877	0.990	0.962	1.141	1.044	0.878
	1.010	1.000	1.146	1.006	0.851	1.044	1.173
	1.052	0.960	0.993	0.990	0.928	1.150	1.131
	1.107	1.045	1.066	0.761	1.006	1.045	1.043
	0.990	1.131	0.962	0.877	0.990	1.131	0.990

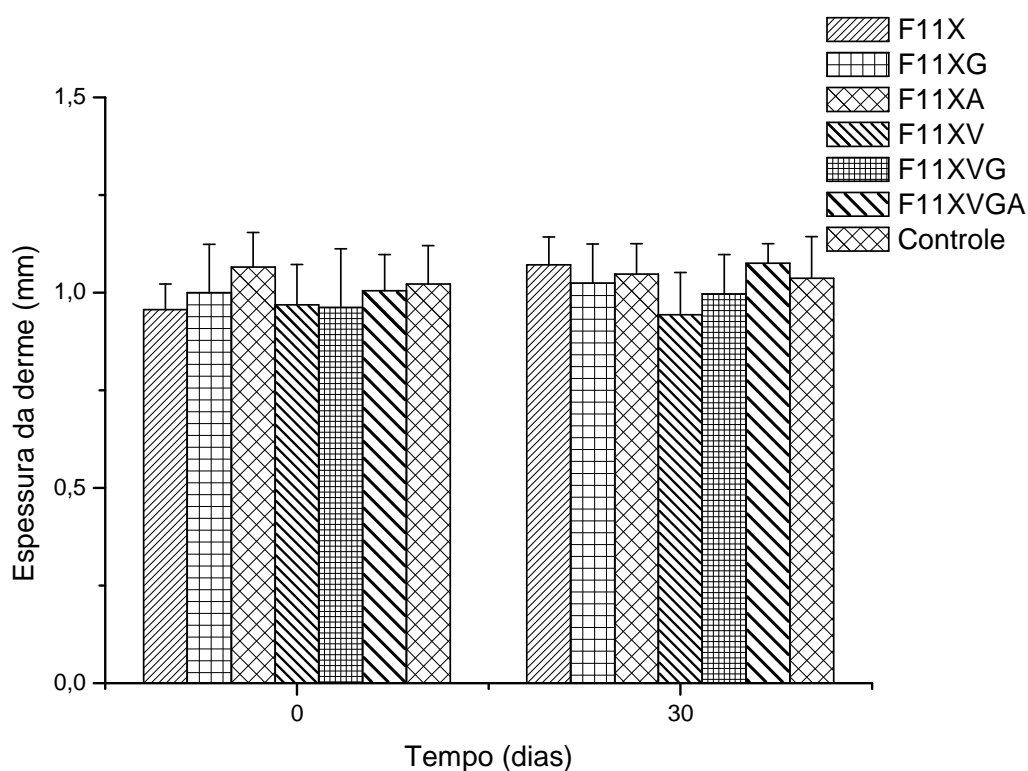


Figura 63. Espessura da derme do antebraço das voluntárias antes e após 30 dias de aplicação das formulações em estudo.

Os resultados da Análise de Variância obtidos para os valores de espessura da derme estão apresentados na Tabela 49. Podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as formulações analisadas, ou seja, a adição das substâncias em estudo não alterou a espessura da derme medida pelo ultrassom, após 30 dias de estudo (Figura 63).

Tabela 49. Espessura da derme do antebraço – Análise de Variância, n=6.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	12	0,1299	0,0108	1,07	0,397
Erro	65	0,6562	0,0101		
Total	77	0,7862			

6.9. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA

Para o estudo de eficácia em longo prazo, as formulações F11x, F11xV, F11xG, F11xA, F11xVGA foram aplicadas na região anterior média dos antebraços, e as formulações F11x e F11xVGA foram aplicadas na face das voluntárias, sendo que um grupo de voluntárias não aplicou nenhuma formulação em um dos antebraços (grupo controle).

Os resultados obtidos no estudo de eficácia em curto prazo (efeitos imediatos) das formulações estão apresentados na Figura 65 e os obtidos no estudo de eficácia em longo prazo estão apresentados nas Figuras 65, 66 e 70. Os resultados das análises estatísticas dos dados estão apresentados nas Tabelas 50 a 68. Os Apêndices de A e B apresentam os resultados complementares obtidos no estudo de eficácia em curto e em longo prazo.

Podemos observar que todas as formulações estudadas alteraram significativamente o conteúdo aquoso de estrato córneo (Figura 64A e Tabela 50), o parâmetro Sesm (Figura 64C e Tabela 52) e o parâmetro Sew (Figura 64D e Tabela 53) após 2h de uma única aplicação o que se manteve até 8h de estudo.

Além disto, o veículo e as formulações contendo o extrato de *Ginkgo biloba* e a associação de substâncias ativas em estudo, proporcionaram uma diminuição da perda transepidérmica de água (TEWL) após 2h da aplicação, sendo que este efeito foi mantido após 4 e 8h de aplicação da formulação contendo todas as substâncias ativas associadas (Figura 64B e Tabela 51).

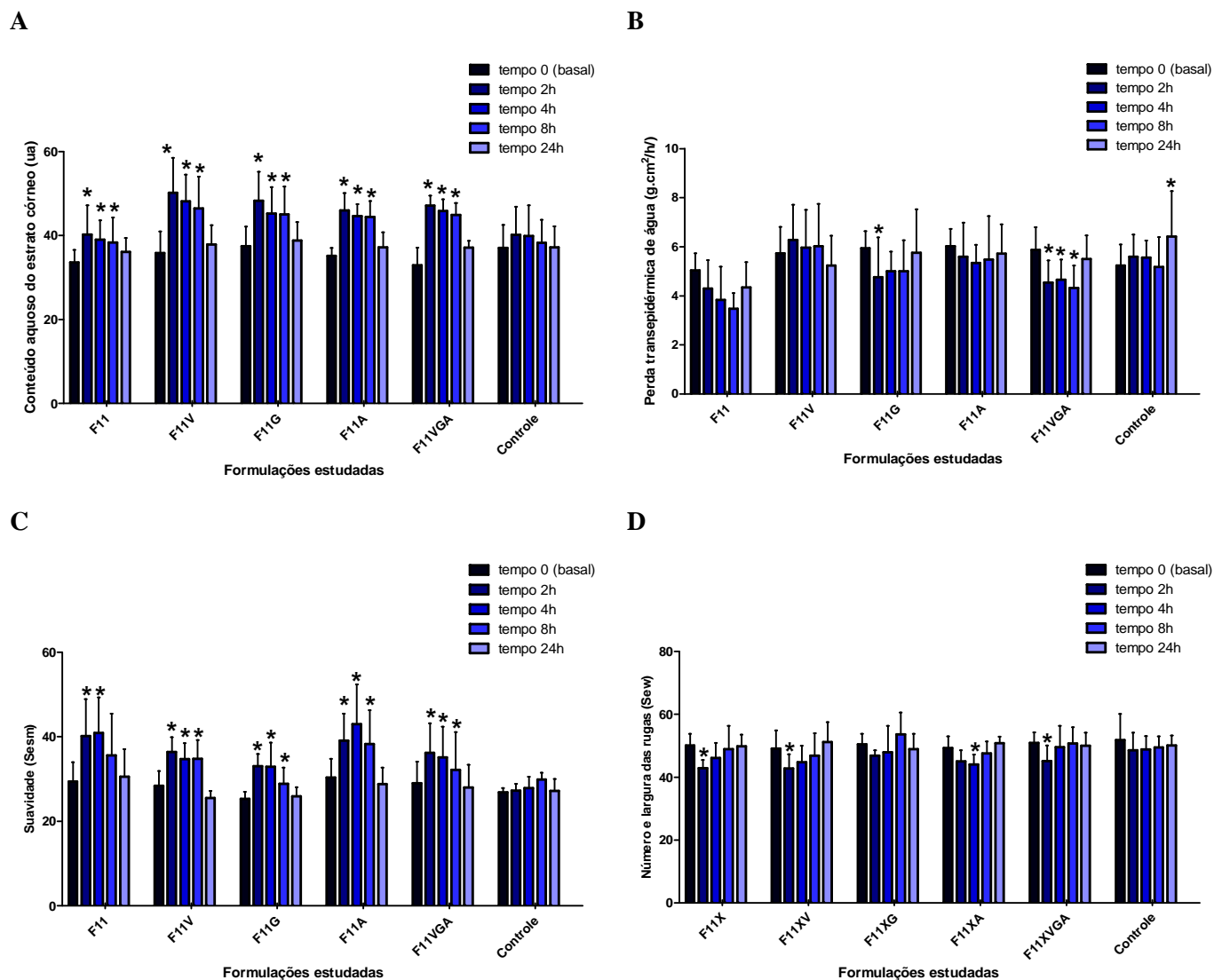


Figura 64: Valores obtidos no estudo de eficácia em curto prazo das formulações em estudo em relação aos parâmetros: conteúdo aquoso do estrato córneo (A), perda transepidérmica de água (B), suavidade da pele (C) e número e largura das rugas (D), avaliados nos antebraços das voluntárias. *: estatisticamente diferente dos valores basais.

Tabela 50. Análise de Variância dos dados de conteúdo aquoso do estrato córneo após única aplicação, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	1026,33	205,26	5,50	2,48603E-4
Erro	70	2609,97	37,28		
Total	75	3636,31			

Tabela 51. Análise de Variância dos dados de perda transepidermica de água após única aplicação, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	27,18	6,79	8,23	1,68252E-5
Erro	70	57,78	0,82		
Total	74	84,96			

Tabela 52. Análise de Variância dos dados de suavidade de pele (Sesm) após única aplicação, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	791,00	197,75	4,19	0,00422
Erro	70	3301,68	47,16		
Total	74	4092,68			

Tabela 53. Análise de Variância dos dados de número e largura das rugas (Sew) após única aplicação, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	1244,31	138,25	4,85	1,18611E-5
Erro	140	3989,42	28,49		
Total	149	5233,74			

Em relação ao estudo de eficácia em longo prazo, todas as formulações em estudo apresentam um aumento significativo do conteúdo aquoso do estrato córneo (Figura 65A e Tabela 54).

Na avaliação da perda transepidermica de água (TEWL) observou-se uma diminuição deste parâmetro após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações contendo os extratos de algas marinhas vermelhas e *Ginkgo biloba*, bem como da formulação que continha a associação de substâncias ativas em estudo (Figura 65B e Tabela 55).

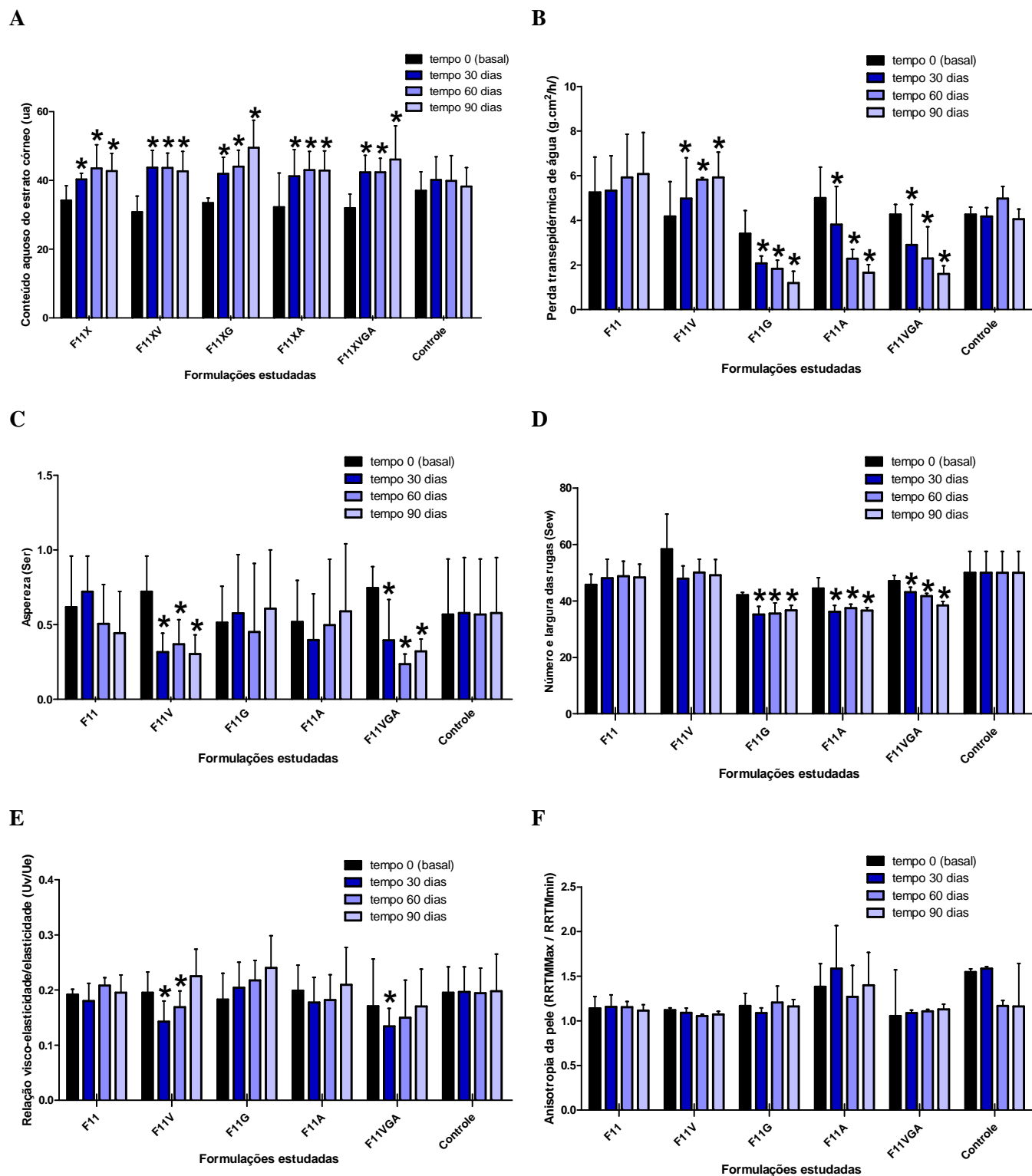


Figura 65: Valores de: conteúdo aquoso do estrato córneo (A), perda transepidermica de água (B), aspereza (C), número e largura das rugas (D), relação viscoelasticidade/elasticidade (E) e anisotropia da pele (F) antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo nos antebraços das voluntárias.

*: estatisticamente diferente dos valores basais.

Tabela 54. Análise de Variância dos dados de conteúdo aquoso do estrato córneo no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	1026,33	205,26	5,50	2,48603E-4
Erro	70	2609,97	37,28		
Total	75	3636,31			

Tabela 55. Análise de Variância dos dados de perda transepidérmica de água no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	27,18	6,79	8,23	1,68252E-5
Erro	70	57,78	0,82		
Total	74	84,96			

Tabela 56. Análise de Variância dos dados de aspereza (Ser) no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	791,00	197,75	15	791,00
Erro	70	3301,68	47,16	70	3301,68
Total	74	4092,68		74	4092,68

Tabela 57. Análise de Variância dos dados de número e largura das rugas (Sew) no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	1244,31	138,25	4,85	1,18611E-5
Erro	140	3989,42	28,49		
Total	149	5233,74			

Tabela 58. Análise de Variância dos dados da relação de viscoelasticidade/elasticidade (Uv/Ue) conteúdo aquoso do estrato córneo no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	831,70	92,41	16,64	6,09933E-11
Erro	40	222,14	5,55		
Total	49	1053,84			

Tabela 59. Análise de Variância dos dados da anisotropia da pele (RRTMmáx./RRTMmín.) no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	666,3	95,18	0,86	0,541
Erro	32	3504,8	109,52		
Total	39	4171,1			

Na avaliação do microrrelevo cutâneo observou-se uma diminuição significativa da aspereza da pele (Ser) com a aplicação da formulação que continha a associação de vitaminas A, C e E bem como da formulação que continha todas as substâncias ativas em estudo (Figura 65C e Tabela 56). Além disto, observou-se uma diminuição significativa do número e largura das rugas (Sew) com a aplicação das formulações contendo os extratos vegetais objeto de estudo e da formulação que continha a associação destes com as vitaminas A, C e E (Figura 65D e Tabela 57).

Quando se avaliou as propriedades mecânicas da pele, observou-se uma diminuição significativa da relação viscoelasticidade/elasticidade ($R6 = Uv/Ue$) após 30 dias de aplicação da formulação F11V e F11VGA (Figura 65E e Tabela 58). O mesmo efeito não foi observado quando foi avaliada a anisotropia da pele (Figura 65F e Tabela 59).

Em relação à coloração da pele não foram observadas alterações significativas nos parâmetros avaliados (Figura 66A,B e Tabelas 60 e 62).

Tabela 60. Análise de Variância dos dados de luminosidade (L*) no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	663,4	347,8	1,32	0,2341
Erro	56	783,98	439,2		
Total	62	1345,23			

Tabela 61. Análise de Variância dos dados de porcentagem de manchas faciais no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	441,35	63,05	1,713	0,14098
Erro	32	1177,18	36,78		
Total	39	1618,54			

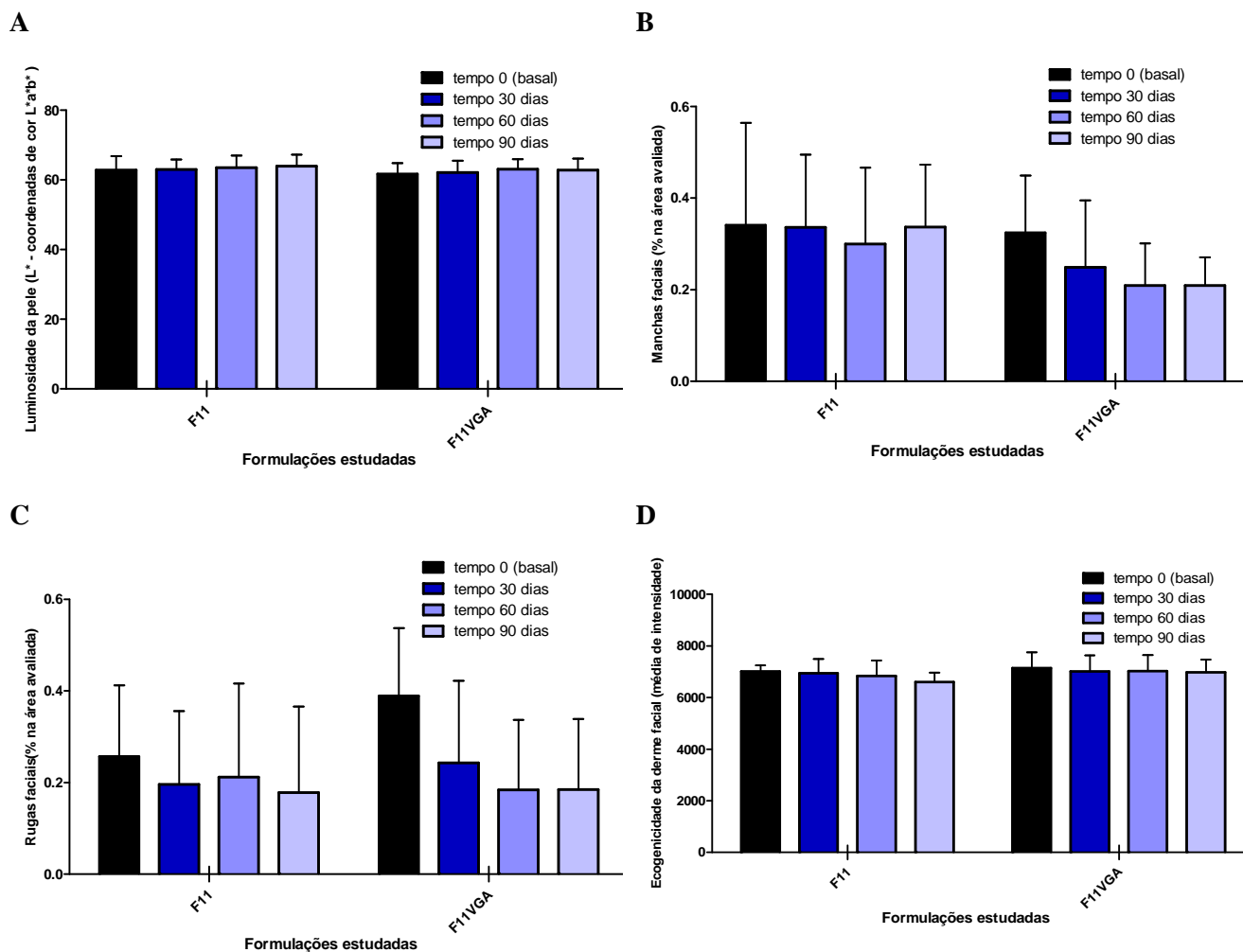


Figura 66: Valores de: luminosidade da pele (A), % de manchas faciais (B), % de rugas faciais (C) e ecogenicidade da derme (D) da pele antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo na face das voluntárias.

Tabela 62. Análise de Variância dos dados de porcentagem de rugas faciais no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	666,3	295,18	0,86	0,54106
Erro	32	3504,8	409,52		
Total	39	4171,1			

Tabela 63. Análise de Variância dos dados de ecogenicidade no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	344,3	342,34	0,95	0,3245
Erro	27	268,98	554,38		
Total	30	1234,34			

Além disto, com o equipamento *Visioface Quick* não foi observada nenhuma diminuição significativa na porcentagem de rugas das voluntárias (Figura 66B e Tabela 62), porcentagem de manchas visíveis apenas com a luz UV (Figura 67C e Tabela 61), após a aplicação das formulações F11 e F11VGA. Uma figura representativa (Figura 67) apresenta os parâmetros avaliados com este equipamento

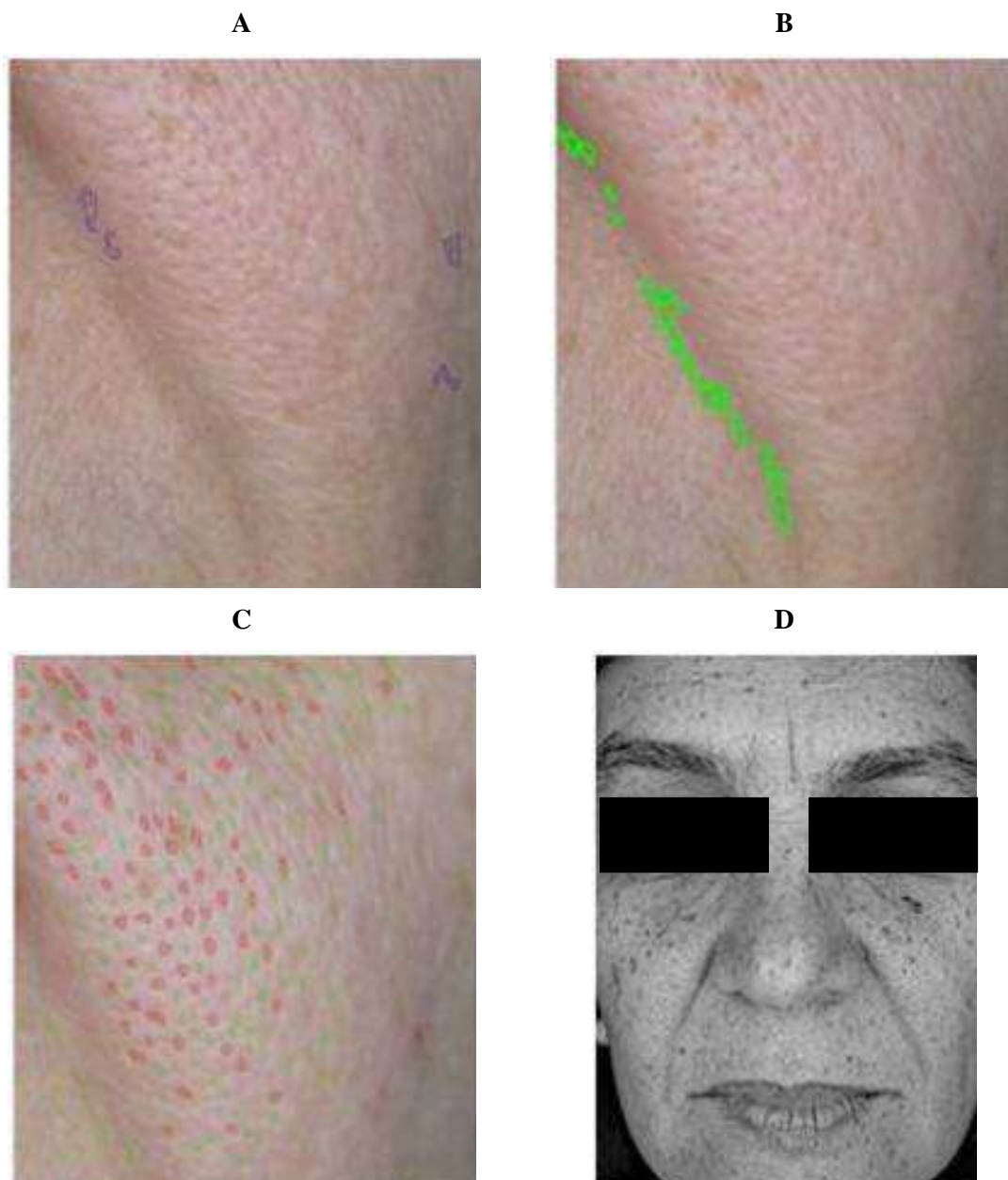


Figura 67: Imagens representativas dos parâmetros obtidos com o equipametro Visioface Quick: manchas visíveis (A), rugas (B), poros (C) e manchas visíveis apenas com a luz UV (D).

Não foram observadas diferenças significativas na ecogenicidade da derme após a aplicação das formulações em estudo (Figura 66D e Tabela 59) no entanto foram observados sinais de fotoenvelhecimento destacados em vermelho na Figura representativa 68.

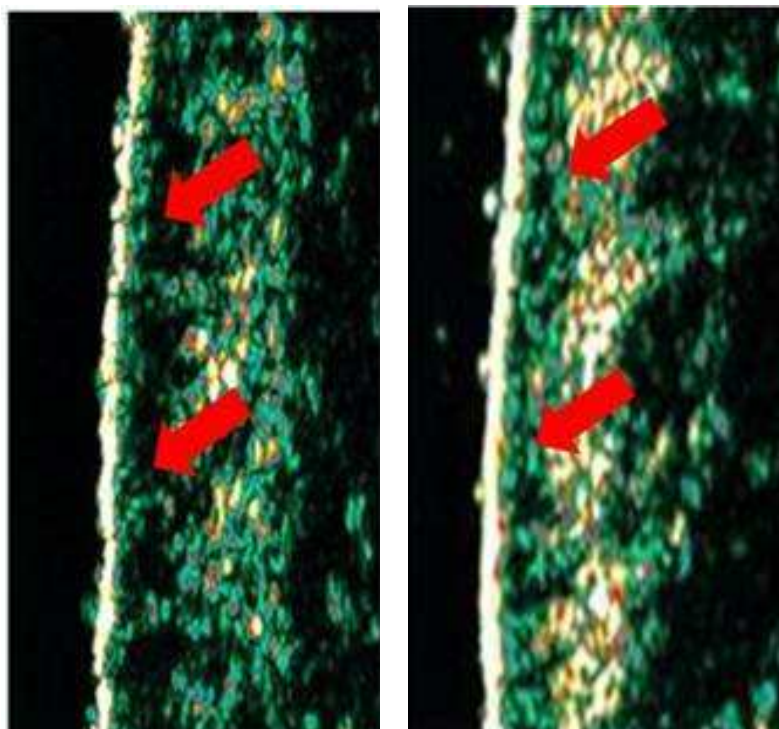
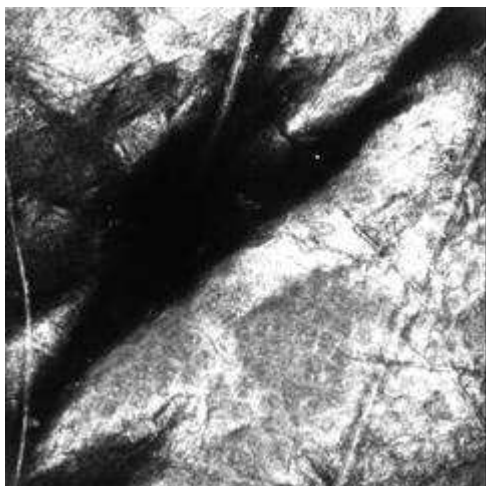


Figura 68: Figura demonstrativa obtida no ultrassom de 20MHz (Dermascan) da face de duas voluntárias, destacando-se a área de baixa ecogenicidade característica de fotoenvelhecimento.

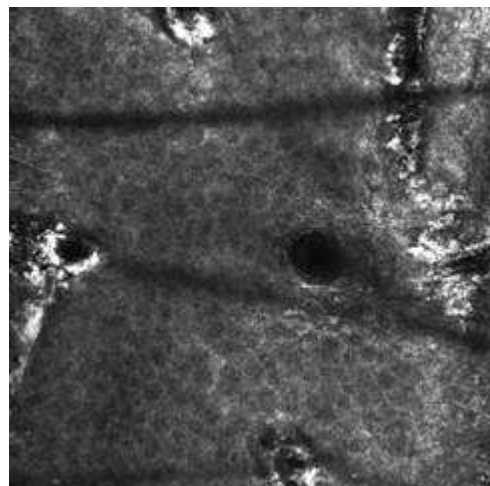
Com a técnica de microscopia confocal a laser é possível avaliar vários parâmetros cutâneos, do estrato córneo a derme reticular. Dentre eles destacamos a espessura das diferentes camadas da epiderme e as características de seus queratinócitos, a rugosidade da superfície do estrato córneo, a distribuição e organização das fibras da junção dermo-epidérmica bem como a medida das papilas dérmicas. As imagens obtidas utilizando-se o equipamento *Vivascope 1500*® para avaliar tais parâmetros estão apresentadas nas Figuras de 69 a 72.

A Figura 73 e Tabelas de 64 a 67 apresentam os resultados obtidos na medida da espessura das diferentes camadas da epiderme antes e após 90 dias de uso das formulações objeto de estudo. A formulação F11XVGA proporcionou um aumento significativo da espessura da camada granulosa.

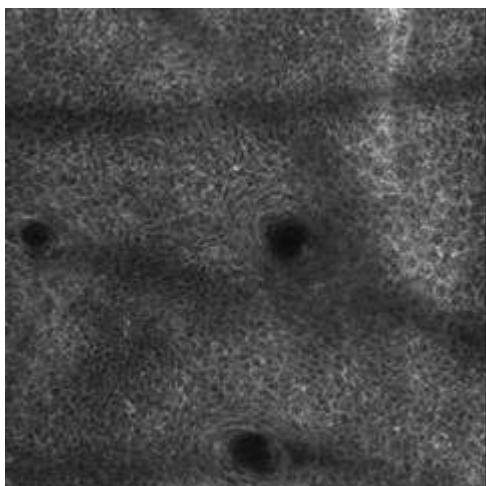
A



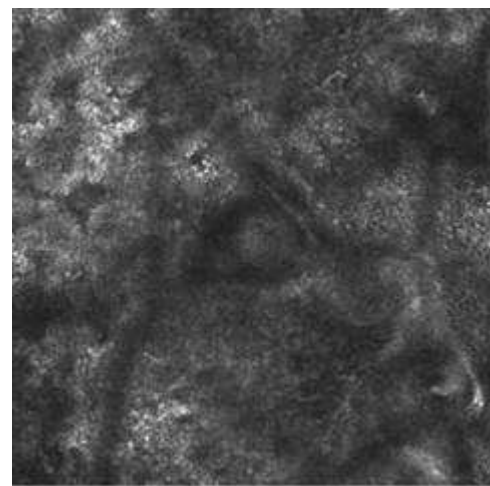
B



C



D



E

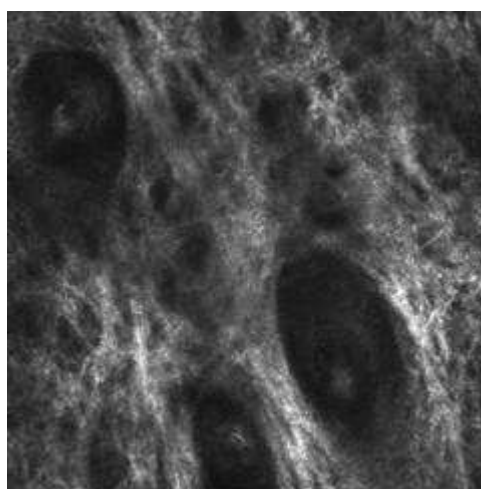


Figura 69: Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância das diferentes camadas da pele: (A) Estrato córneo, (B) Camada granulosa, (C) Camada espinhosa, (D) Camada basal e junção dermo epidérmica, e fibras dérmicas (E).

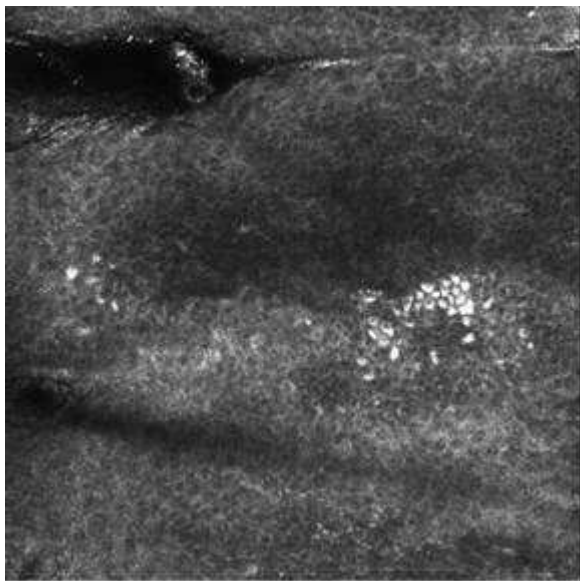
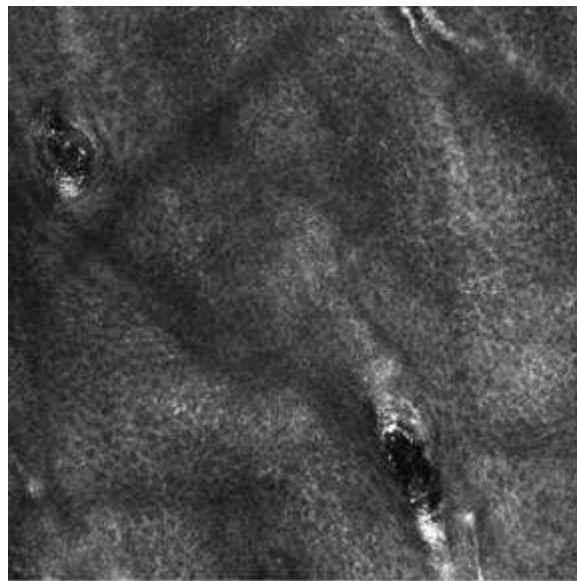
A**B**

Figura 70: Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância da camada espinhosa apresentando queratinócitos irregulares e com áreas de pigmentação desigual característicos de uma pele envelhecida (**A**) comparado com uma imagem de pele jovem com queratinócitos regulares e sem área de pigmentação (**B**).

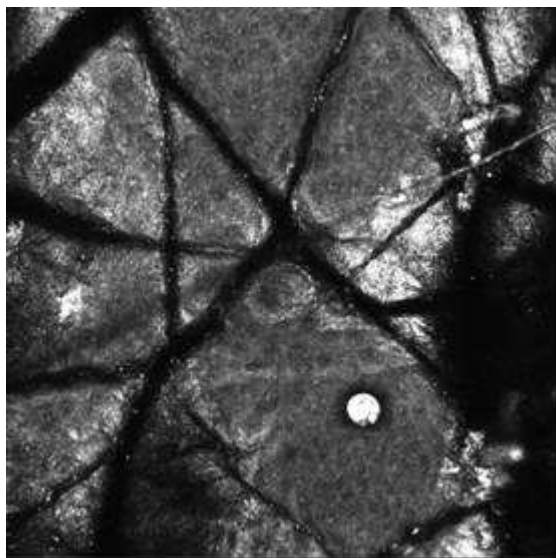
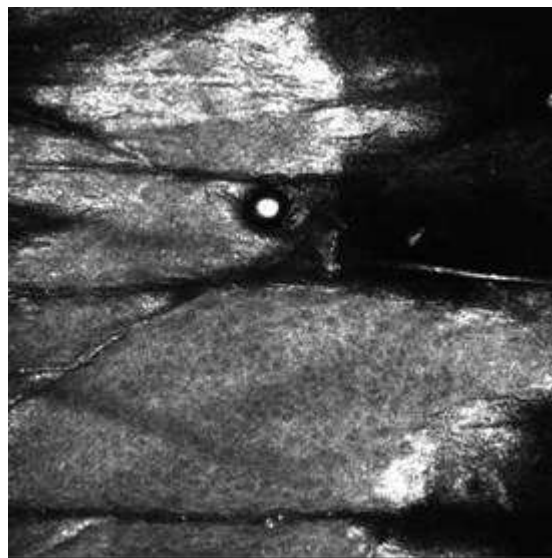
A**B**

Figura 71: Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância da camada córnea apresentando rugosidade no formato romboidal característicos da pele jovem (**A**) e linear característico da pele envelhecida (**B**).

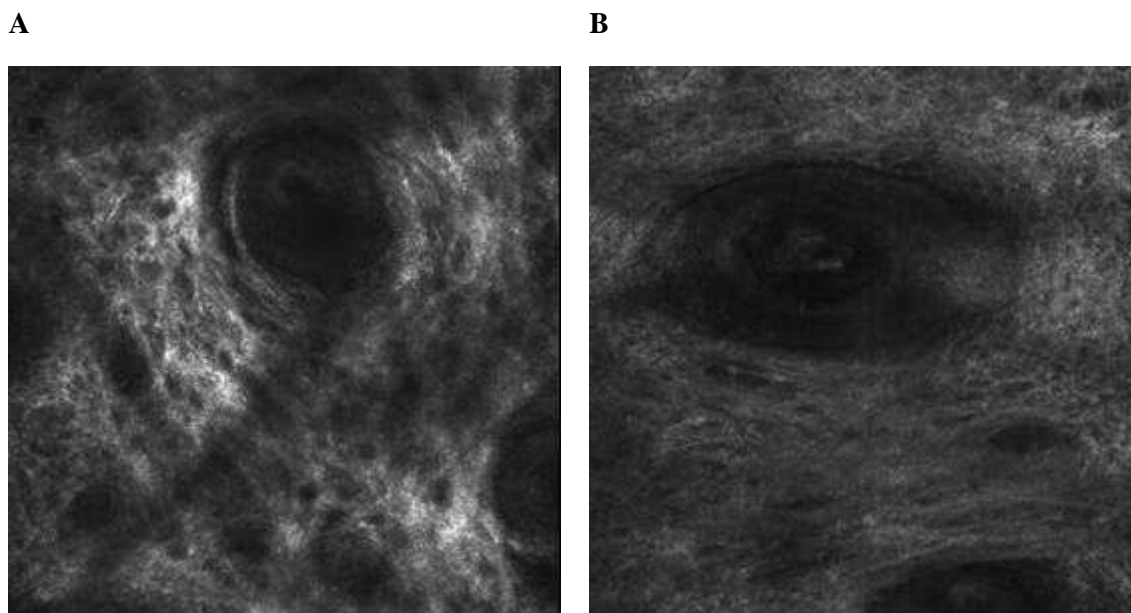


Figura 72: Imagens obtidas por microscopia confocal de reflectância da junção dermo epidérmica apresentando uma distribuição mais regular na pele jovem (A) comparada com a pele envelhecida (B).

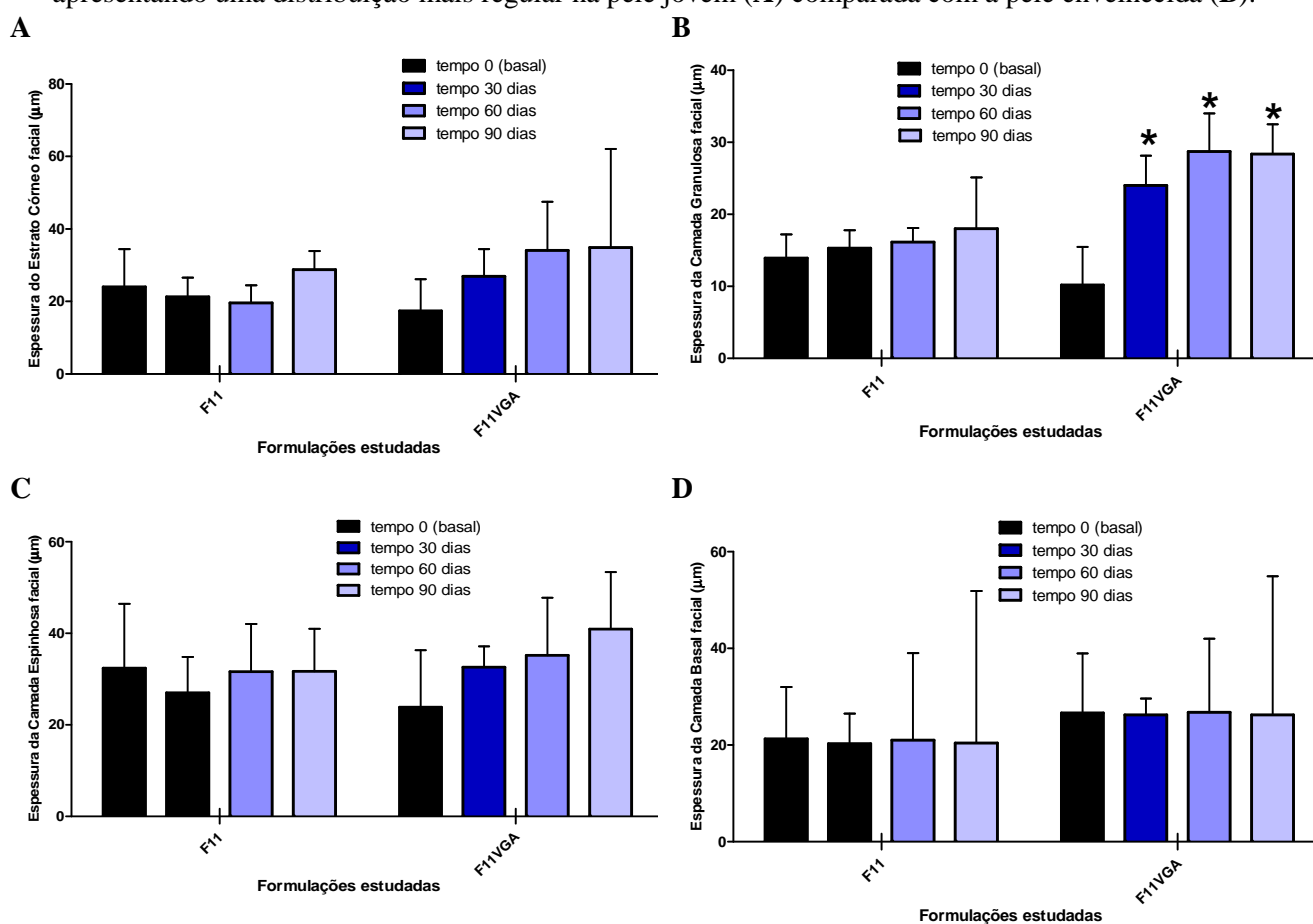


Figura 73: Valores de: espessura do estrato córneo (A), espessura da camada espinhosa (B), espessura da camada granulosa (C), número de células da camada granulosa (D) e espessura da camada basal (E) antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo na face das voluntárias. *: estatisticamente diferente dos valores basais.

Tabela 64. Análise de Variância dos dados de espessura do estrato córneo no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	441,35	63,05	1,713	0,14098
Erro	32	1177,18	36,78		
Total	39	1618,54			

Tabela 65. Análise de Variância dos dados de espessura da camada espinhosa no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	144,06	20,58	0,30	0,94533
Erro	32	2142,48	66,95		
Total	39	2286,54			

Tabela 66. Análise de Variância dos dados de espessura da camada granulosa no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	507,45	72,49	3,05	0,0014
Erro	32	760,19	23,75		
Total	39	1267,65			

Tabela 67. Análise de Variância dos dados de espessura da camada basal no estudo em longo prazo, n=15.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadr.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Fator de variação	15	666,3	95,18	0,86	0,54106
Erro	32	3504,8	109,52		
Total	39	4171,1			

Discussão

7. DISCUSSÃO

O presente estudo consistiu da Pesquisa & Desenvolvimento de formulações multifuncionais fotoprotetoras contendo vitaminas e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas, bem como a avaliação de estabilidade e eficácia de tais formulações.

Na etapa inicial desta pesquisa foram desenvolvidas 11 formulações compostas de matérias primas selecionadas para conferirem boa compatibilidade com a pele e com as substâncias ativas objeto de estudo, visando a obtenção de formulações estáveis e com sensorial adequado às finalidades propostas. Após a realização dos testes preliminares de estabilidade, apenas uma das formulações, a F11, atendeu aos critérios de seleção, que foi a manutenção da homogeneidade (não separação de fases), consistência e características organolépticas, o que sinaliza que esta formulação poderá manter a sua estabilidade durante o período de estocagem e uso (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; KLEIN, 1999). Assim, esta formulação, acrescida ou não das vitaminas e/ou extratos, foi selecionada para a realização dos testes propostos de estabilidade e eficácia clínica.

Uma vez que o estudo de eficácia clínica proposto envolve aplicação das formulações em estudo durante o dia e a noite, a formulação F11 foi também elaborada sem os filtros solares (F11N) para uso noturno durante o período de aplicação. Além disto, sabendo-se que o modo de preparo pode influenciar nas características físicas das formulações cosméticas, durante o estudo reológico também foram avaliadas diferentes maneiras de preparo levando-se em consideração a adição do filtro inorgânico (dióxido de titânio), fator determinante na estabilidade de fotoprotetores. Desta maneira, de acordo com a experiência do nosso grupo de pesquisa, o dióxido de titânio foi acrescido de duas maneiras nas formulações, diretamente na fase oleosa (F11) ou disperso em base de absorção de lanolina (base líquida) imediatamente após a emulsificação (F11X).

Assim, foi realizado um estudo de estabilidade física para garantir que a formulação desenvolvida possuísse características físico-químicas, funcionais e organolépticas adequadas para a aplicação cosmética e com estabilidade adequada para a comercialização.

O estudo de estabilidade física por determinação da reologia foi realizado portanto, com as formulações F11, F11X e F11N.

O estudo da reologia tem mostrado grande aplicação na avaliação da estabilidade de formulações cosméticas (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; ALMEIDA, BAHIA, 2006; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006). Durante o período do estudo reológico, os reogramas das formulações F11, F11X e F11N, acrescidas ou não das substâncias ativas objeto de estudo, praticamente não apresentaram alterações, tais como picos de instabilidade e alterações no comportamento de fluxo, o que indica estabilidade.

Dentre as variáveis reológicas, a viscosidade aparente mínima é considerada a medida da resistência de um material ao fluxo, sendo que, quanto maior a viscosidade maior é a resistência (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; MARTIN, BUSTAMANTE, CHU; 1993). A formulação F11N, contendo ou não as vitaminas e/ou extratos vegetais objetos de estudo, apresentou os menores valores

de viscosidade aparente mínima (calculados a partir do ponto máximo de cisalhamento), no entanto, não apresentou variações neste parâmetro durante todo o período de estudo.

As formulações F11 e F11X apresentaram perda de viscosidade quando acrescidas das substâncias ativas objeto de estudo, principalmente quando acrescidas da associação de vitaminas e *Ginkgo biloba* (F11VG e F11XVG) e quando acrescidas da associação de vitaminas, *Ginkgo biloba* e algas marinhas (F11VGA e F11XVGA), o que pode ter ocorrido em função da presença dos extratos.

Quando submetidas à temperatura de 45°C, as formulações F11, acrescida das substâncias ativas objeto de estudo apresentou grandes variações nos valores de viscosidade, sendo que nas formulações contendo associação de todas as substâncias ativas (F11VGA) esta variação foi mais pronunciada, com um aumento na viscosidade nos tempos 14 e 21 dias. Já a formulação F11X apresentou um aumento de viscosidade nos tempos 21 e 28 dias, quando acrescida da associação de vitaminas lipossolúveis e extrato de *Ginkgo biloba* (F11XVG). Estas alterações devem-se provavelmente em função da natureza do polímero e matérias primas e este associadas, o que poderia levar a formulação a uma perda de água quando submetida a temperaturas mais altas (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GIANETI et al., 2012 A; DRAELOS, 2001; LEONARDI, 2001).

Todas as formulações estudadas apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, índice de fluxo menor que 1 o que é muito interessante em produtos cosméticos por facilitar sua aplicação e espalhamento e, assim, conferir um sensorial agradável (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; MARTIN, BUSTAMANTE, CHU; 1993). As formulações estudadas não apresentaram grandes variações nos valores de índice de fluxo.

Em formulações pseudoplásticas, um valor de viscosidade aparente pode ser obtido em função de qualquer um dos pontos de cisalhamento, com isso, o valor de índice de consistência, obtido pelo gráfico de gradiente de cisalhamento x tensão de cisalhamento, é o mais indicado para representar este tipo de formulação (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; MARTIN, BUSTAMANTE, CHU; 1993).

Em relação ao índice de consistência, a formulação F11, acrescida das substâncias ativas objeto de estudo, foi a que apresentou maiores variações durante o período de estudo sendo que a formulação F11N apresentou os menores valores de índice de consistência.

Outro parâmetro avaliado foi a área de histerese que fornece informações relacionadas com a capacidade de uma formulação de reconstruir sua estrutura após a aplicação de uma força. Se uma formulação apresenta área de histerese elevada, isto indica que esta requer um tempo maior para reconstituir sua estrutura inicial. Existe um tempo ideal para o restabelecimento da formulação, o qual não deve ser longo para evitar que a mesma escorra durante a aplicação. O escoamento sobre a pele está sempre acompanhado da redução da interação entre o filme formado pela formulação e a pele (MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; DAHMS, 1996; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003).

Nos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que todas as formulações estudadas apresentaram baixos valores de área de histerese (tixotropia), o que é característico do comportamento reológico dos polímeros empregados (LABA, 1993) e, portanto, esperado. A formulação F11,

contendo ou não as vitaminas e extratos objeto de estudo, apresentou maiores valores e maiores variações nestes valores durante o estudo, quando submetidas as temperaturas de 37 e 45°C, quando comparada com as formulações F11X. A formulação F11N não apresentou variações nos valores de área de histerese.

Os parâmetros reológicos evidenciam alguma instabilidade para F11, uma vez que esta formulação sofreu alterações mais pronunciadas após a adição das substâncias ativas em associação ou isoladas (Figuras 13 a 15). O índice de consistência e viscosidade aparente de F11 aumentaram após a armazenagem a 45 ° C, o que pode estar relacionado com um fenômeno que envolve a solvatação, atração entre a água presente na emulsão e as partículas de TiO₂. Estes resultados demonstram que a estrutura da emulsão desestabiliza após a adição do filtro UV inorgânico para F11 pelo método 1 [11].

Assim, quando se avaliou o conjunto de variáveis que fazem parte do estudo reológico, a formulação F11X (adicionando-se o dióxido de titânio disperso na base de absorção de lanolina, imediatamente após a emulsificação), contendo ou não as substâncias ativas objeto de estudo, foi considerada mais estável, pois, apresentou menores variações nos parâmetros analisados e, portanto, foi utilizada nos estudos posteriores. A formulação F11N, contendo ou não as substâncias ativas objeto de estudo, também foi considerada estável, pois apresentou poucas variações nos parâmetros analisados.

Em paralelo ao estudo reológico foi realizado o estudo de estabilidade química para a obtenção de um perfil completo e necessário para prever o comportamento das formulações durante todo o seu prazo de validade. Inicialmente foram realizadas análises espectrofotométricas das vitaminas A, C e E, da quercetina (marcador químico do extrato de *Ginkgo biloba*) e do extrato de algas marinhas vermelhas (padronizado com seu marcador químico *Phorphyra-334*) para a determinação do comprimento de onda a ser empregado no estudo da estabilidade química. Para tal, foram realizadas leituras de soluções destas substâncias em espectrofotômetro variando-se o comprimento de onda de 200 a 400 nm. Após a varredura observou-se que as vitaminas A, C e E, a quercetina e o extrato de algas marinhas vermelhas apresentavam boa absorção a 325, 235, 235, 370 e 334, respectivamente. Além disto, estes comprimentos de onda são recomendados para a análise destas substâncias ativas (GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006; MAIA CAMPOS, 1992; GUARATINI et al., 2006; GASPAR et al., 2008;). Desta maneira, utilizando-se estes comprimentos de onda durante o ensaio da estabilidade química foi possível quantificar simultaneamente todas as substâncias em estudo.

O estudo da estabilidade química das formulações iniciou-se pela escolha do método analítico a ser utilizado. Optou-se pela CLAE por ser um método que permite uma avaliação tanto quantitativa quanto qualitativa dos compostos e também por ser o método analítico mais comumente utilizado para a análise de substâncias ativas em cosméticos (GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; HARTMANN et al., 2001; BOODTS, MAIA CAMPOS, 1999; ALVAREZ, MAZANCOURT, 2001; GIMENO et al., 2001).

Após uma série de experiências preliminares, concluímos que as melhores separações foram conseguidas com análise por gradiente de metanol : isopropanol : água, com fluxo de 0,8 mL min⁻¹.

Para a determinação da curva analítica foram eluídas soluções padrão preparadas a partir de uma solução estoque da associação das substâncias objeto de estudo. Estas soluções foram analisadas em triplicata em várias concentrações, dependendo da substância analisada, obtendo-se baixos coeficientes de variação. Em seguida, foi necessária a padronização do método de extração das vitaminas e extratos da formulação selecionada. A extração foi realizada com a dissolução das formulações em álcool isopropílico, pois este solvente orgânico tem se mostrado eficaz como extrator de formulações contendo substâncias lipossolúveis, como as vitaminas estudadas (GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; MAIA CAMPOS, SANTORO, 1993; GUARATINI, GIANETI, MAIA CAMPOS, 2006) e fazia parte da fase móvel escolhida. Assim, ao utilizar uma extração eficaz e uma metodologia devidamente validada foi possível separar e quantificar as substâncias adicionadas nas formulações em estudo.

Após a padronização do processo de extração, foi importante avaliar a eficiência do mesmo. O processo de extração escolhido mostrou-se adequado e eficiente, já que a recuperação das vitaminas e filtros solares ficou acima de 90%.

Dando sequência à validação da metodologia, foram realizados ensaios de precisão e exatidão intra e inter-ensaio, para garantir a validação do estudo. Estas análises foram realizadas em quintuplicata num mesmo dia e durante cinco dias consecutivos, para a avaliação intra e inter-ensaio, respectivamente (GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; SARKA et al., 2006). Os resultados obtidos indicaram que o método de análise foi preciso (valores entre 1,05 a 4,37) e com exatidão dentro do aceitável em métodos analíticos (valores entre 94,35 a 117,68), considerando que a metodologia inclui etapas de extração, filtração e diluição, e que as substâncias em estudo são sensíveis à oxidação por ação do oxigênio e da luz (ANVISA, 2011).

Para a determinação do prazo de validade das formulações, foi analisada a cinética de degradação das substâncias ativas em estudo. Observando-se os valores da constante de velocidade “K” nos diferentes tempos de armazenagem concluiu-se que a reação de degradação destas substâncias nas formulações em estudo seguiu a cinética de primeira ordem. Sendo assim, para a determinação do prazo de validade, foram aplicadas as equações de cinética de primeira ordem, considerando-se uma concentração remanescente de 85%. Estudos anteriores também mostraram que a degradação dos derivados das vitaminas A, C e E seguem cinética de primeira ordem, mostrando que os resultados obtidos neste estudo estão em coerência com a literatura (GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GUARATINI, GIANETI, MAIA CAMPOS, 2006; KIM et al., 2000).

As formulações estudadas, contendo ou não as vitaminas e extratos em estudo, apresentaram diferentes velocidades de degradação, sendo que, quando estas substâncias ativas estavam em associação, o prazo de validade foi considerado maior para todas elas. Assim, as formulações que continham a associação dos extratos e vitaminas em estudo apresentaram menores velocidades de

degradação e, conseqüentemente, um maior tempo de “vida de prateleira”, ou seja, o seu prazo de validade estimado foi maior.

Desta maneira, podemos sugerir que nas condições experimentais deste estudo a associação de extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas e vitaminas A, C e E atuou aumentando a estabilidade da formulação, demonstrando a vantagem da associação de substâncias ativas em formulações cosméticas, o que pode refletir também na eficácia da mesma (GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012).

O estudo de estabilidade acelerado foi realizado às temperaturas de 37 e 45°C, uma vez que, embora a utilização de temperaturas mais elevadas possa acelerar o processo de degradação de determinadas substâncias ativas (MAGARI, 2004), estas poderiam ocasionar alterações na formulação e provocar reações químicas que não ocorreriam nas condições normais de armazenamento. Os prazos de validade obtidos neste estudo foram considerados altos, para a comercialização de produtos cosméticos, ou seja, maior que 12 meses (PRISTA et al., 1992), com exceção da vitamina A, que apresentou um prazo de validade médio, entre 6 e 12 meses.

Apesar da importância do desenvolvimento de produtos com o maior prazo de validade possível, é sabido que a estabilidade das substâncias está ligada aos componentes do veículo, sendo que estudos já demonstraram que o veículo pode alterar a velocidade em que as reações de oxidação ocorreriam, proporcionando a uma mesma substância diferentes mecanismos de decomposição (GIANETI et al., 2012 A; MAIA CAMPOS, GIANETI, 2012; GALLARETE et al., 1999; CARLOTTI, 2004). Desta maneira, no desenvolvimento de fotoprotetores multifuncionais, ou seja, formulações com FPS e às quais são atribuídos outros benefícios para a pele, como por exemplo, ação antienvhecimento, antirradicais livres e hidratante, deve-se ter em consideração os componentes do veículo para o desenvolvimento de produtos eficazes, seguros e com prazo de validade adequado para o uso.

Assim, podemos sugerir que as formulações desenvolvidas no presente estudo são compatíveis para uso tópico, no que diz respeito à estabilidade química de suas substâncias ativas.

A qualidade de um produto cosmético engloba a sua estabilidade e segurança de uso bem como a comprovação dos seus efeitos. Assim, além da determinação da estabilidade, quando a um produto é atribuído um benefício, este deve ser comprovado, para fins de registro nas agências regulatórias e garantir a obtenção dos efeitos propostos.

Sabe-se que a estabilidade de uma formulação cosmética está correlacionada com a sua segurança de uso, pois a decomposição das substâncias ativas acrescidas a estas formulações leva a uma mistura complexa de produtos, os quais podem causar reações tóxicas na pele (FU et al., 2003). Por este motivo, devem-se realizar testes de irritação com formulações cosméticas, principalmente as formulações multifuncionais, que contém associação de substâncias ativas, para comprovação de que as mesmas podem ser aplicadas na pele humana.

As formulações estudadas foram submetidas a um teste de irritação cutânea primária para avaliar a compatibilidade cutânea e se a aplicação das mesmas poderia causar alguma reação inicial após contato com a pele humana. No entanto, nenhuma das formulações causou reações primárias de irritação nos voluntários humanos que participaram no estudo, apresentando compatibilidade cutânea muito boa e ausência de potencial alergênico.

Dando continuidade aos estudos propostos, foram realizados estudos de eficácia clínica das formulações para a avaliação da eficácia dos extratos e vitaminas objeto de estudo, na prevenção do fotoenvelhecimento, proteção e hidratação da pele por técnicas de biofísica e análise de imagem.

Para tal, inicialmente foi realizado um estudo de avaliação sensorial para verificar a aceitação das formulações em estudo pelas voluntárias. Não foram observadas diferenças significativas entre as formulações, ou seja, de acordo com a avaliação das voluntárias, a adição das substâncias ativas não alterou o sensorial das formulações, no entanto foi possível observar que houve uma aceitação de uso das formulações por parte das voluntárias uma vez que a média das notas dadas aos parâmetros avaliados foram acima de 3, ou seja, valor considerado bom.

Em seguida, com o apoio do CE.R.I.E.S.- Chanel (França) foram realizados 2 estudos de avaliação da sensibilidade tátil e efeito protetor na variação do clima da formulação que contém a associação de todas as substâncias em estudo (F11XVGA) utilizando-se a quantificação do limiar de percepção a uma corrente elétrica. Este método é inovador e eficaz para avaliar as alterações causadas nas fibras táteis da pele após a aplicação de formulações cosméticas (PORCHERON et al., 2011; PORCHERON et al., 2008).

Alguns estudos têm mostrado que muitos fatores podem afetar a sensibilidade tátil da pele. Os mecanorreceptores cutâneos podem ser afetados por mudanças nas propriedades biofísicas da pele como, por exemplo, a hidratação (LEVÊQUE et al. 2000). Para avaliar essas mudanças na pele foram desenvolvidos métodos não invasivos como a medida do limiar de percepção a uma corrente elétrica (Current Perception Threshold – CPT) para avaliação seletiva das fibras C, A δ e A β (PORCHERON et al., 2011; MVGLOVE, VALBO, OLAUSSON, 2007; PORCHERON et al, 2008). Ainda, como as mudanças ocasionadas na sensibilidade tátil estão correlacionadas com mudanças nas propriedades biofísicas da pele, é importante que se avalie estas propriedades da pele em conjunto para a obtenção de resultados conclusivos (WOODWARD, 1993, LEVÊQUE et al., 2000).

No estudo da quantificação do limiar de percepção a uma corrente elétrica observou-se um aumento significativo no conteúdo aquoso e de sebo do estrato córneo após a aplicação da formulação objeto de estudo, quando comparado com os valores basais. Além disto, foi observada uma diminuição significativa na TEWL e CPT de 2000Hz frequência seletiva para ativação das fibras A β .

Considerando o aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo e diminuição da TEWL podemos sugerir que a formulação apresentou efeito hidratante após uma única aplicação (DAL'BELO, GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006). Alguns estudos mostraram que a hidratação da pele pode melhorar a sensibilidade tátil conhecida por diminuir com a idade (LEVÊQUE et al., 2000;

MVGLOVE, VALBO, OLAUSSON, 2007), desta maneira, nossos resultados sugerem que a aplicação de uma formulação contendo associação de vitaminas e extratos vegetais de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas aumenta a sensibilidade das fibras A β devido a um aumento da hidratação, o que é essencial para manter as condições de percepção da pele (PORCHERON et al., 2011; MVGLOVE, VALBO, OLAUSSON, 2007; PORCHERON et al., 2008; WOODWARD, 1993, LEVÊQUE et al., 2000).

Em seguida, sabendo-se que as variações no clima são os principais causadores de alterações cutâneas podendo alterar as propriedades biofísicas e também o sistema nervoso da pele e que essas alterações podem explicar o aparecimento de sintomas de pele sensível e, para melhor entender estes sintomas, foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da variação da temperatura ambiente na sensibilidade cutânea, na função das fibras nervosas e nas propriedades biofísicas da pele, bem como a ação da formulação multifuncional desenvolvida no presente trabalho sobre a pele submetida a mudanças de temperatura.

Foi observado aumento significativo dos valores de CPT 15min. após a saída da câmara fria, quando comparado com os valores iniciais, sem recuperação significativa 1h15min depois da permanência no ambiente de 21°C (Figura 61A). Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo que aplicou e o grupo que não aplicou a formulação objeto de estudo F11xVGA, no entanto, podemos observar uma diminuição dos valores de CPT 5 Hz após 45min. dentro da câmara fria e o retorno aos valores iniciais 15min. após ter saído da câmara fria, o que pode sugerir que, com a aplicação da formulação contendo extratos vegetais e vitaminas, ocorre uma proteção da pele com diminuição dos efeitos danosos da exposição a ambientes extremos, evitando assim os sintomas de pele sensível (PORCHERON et al., 2011; MVGLOVE, VALBO, OLAUSSON, 2007; PORCHERON et al., 2008).

O CPT de 250 Hz estimula seletivamente as fibras A δ , responsáveis junto com as fibras C pela sensação de dor, coceira e temperatura. Na figura 61B pode-se observar um aumento significativo dos valores deste parâmetro entre o T1 (antes da passagem na câmara fria) e T2 (45min. após permanência dentro da câmara fria), com uma recuperação significativa após 1h15min em ambiente de 21°C. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo que aplicou ou não a formulação em estudo, no entanto pode-se observar que no grupo que aplicou a formulação, as mudanças nos valores de CPT 250 Hz foram menores, indicando mais uma vez que a formulação em estudo pode ser sugerida para a proteção da pele contra mudanças de temperatura ambiente (MVGLOVE, VALBO, OLAUSSON, 2007; PORCHERON et al., 2008).

O CPT de 2000 Hz estimula seletivamente as fibras A β , responsáveis pela sensação ao toque. Na figura 61C observa-se um aumento significativo dos valores entre T1 (antes da passagem na câmara fria) e T2 (45min após permanência dentro da câmara fria), com uma recuperação significativa após 15min. em ambiente de 21°C. Não foram observadas diferenças significativas

entre o grupo que aplicou ou não a formulação em estudo (MVGLOVE, VALBO, OLAUSSON, 2007; PORCHERON et al, 2008).

A figura 62A representa as médias dos valores de temperatura da pele obtidos na face das voluntárias, durante o período de estudo. Uma diminuição significativa da temperatura da pele foi observada após 45min. dentro da câmara fria, com um retorno aos valores iniciais após 1h15min em ambiente à 21°C, para os dois grupos (com e sem a aplicação da formulação em estudo), sem diferença significativa entre eles. Demonstrando que a temperatura da pele não sofre influência da aplicação do produto.

A figura 62B apresenta as médias dos valores de TEWL obtidos na face das voluntárias, durante o período de estudo. Como este parâmetro é muito influenciado pelas condições ambientais, não foram realizadas medidas dentro da câmara climática com temperatura de 5°C. Uma diminuição significativa da TEWL da pele foi observada após 15min. após a saída da câmara fria, com um retorno aos valores iniciais após 1h em ambiente à 21°C, apenas para o grupo de voluntárias que não aplicou a formulação em estudo. Esta diferença de comportamento entre os grupos que aplicaram ou não a formulação deve-se, provavelmente aos componentes da formulação que podem promover uma melhora da função barreira da pele, proporcionando uma diminuição dos valores de TEWL, o que não foi influenciado pela mudança das condições do ambiente.

A figura 62B apresenta as médias dos valores do conteúdo aquoso do estrato córneo obtidos na face das voluntárias, durante o período de estudo. Nenhuma mudança significativa no conteúdo aquoso do estrato córneo pôde ser demonstrada entre os intervalos de tempo diferentes ou entre os dois grupos de voluntárias avaliadas (com ou sem a aplicação da formulação em estudo). Esse resultado sugere que nas condições de uso a formulação F11XVGA não proporcionou um efeito hidratante da pele, no entanto este foi observado em outros testes utilizando a mesma formulação. Assim, provavelmente as alterações de umidade e temperatura afetam o conteúdo hídrico da pele.

Podemos notar uma diferença significativa entre os dois grupos (com e sem a aplicação da formulação) no parâmetro de pH, a partir do T2, ou seja, logo após a exposição ao clima frio (Figura 62C). Para o grupo sem a aplicação da formulação, observa-se um aumento nos valores de pH, com o retorno ao normal 15 min. após a saída da câmara fria. Para o grupo que aplicou a formulação em estudo, observou-se uma diminuição significativa dos valores de pH 15min. após a saída da câmara fria. Esta diferença entre os dois grupos (com e sem a aplicação da formulação) deve-se provavelmente aos componentes da formulação e não a um efeito protetor contra as mudanças ambientais.

Além da análise objetiva da sensibilidade das fibras nervosas e das propriedades biofísicas da pele, também foram avaliados o conforto térmico e a sensação subjetiva das voluntárias durante todo o estudo, para podermos comparar com os resultados objetivos e relatar se as alterações observadas nos parâmetros avaliados foram percebidos pelas voluntárias.

Assim, as mesmas foram orientadas a responder uma escala de avaliação analógica com os seguintes parâmetros: conforto térmico, estado térmico, estado térmico da face, hidratação da pele da face e sensações desagradáveis.

Podemos observar que, para o grupo que não aplicou a formulação, o conforto térmico diminuiu muito na câmara fria e só foi parcialmente recuperado uma hora após a exposição. A sensação térmica (global e cutânea) diminuiu na câmara climática e quase foi recuperada 10 minutos após o retorno a 21°C. A sensação de hidratação da pele facial diminuiu ligeiramente após a exposição à câmara fria (Figura 63).

Para as voluntárias que aplicaram a formulação em estudo, observou-se uma leve, mas significativa melhora da sensação de hidratação da face, 15 minutos após a passagem na câmara fria, e apenas uma tendência no aumento das sensações desagradáveis, comparado com o grupo que não aplicou a formulação. Estes resultados estão de acordo com o observado na análise do CPT de 5 e de 250 Hz seletivos para as fibra C e A δ , respectivamente, demonstrando uma boa correlação entre as medidas instrumentais e as medidas subjetivas (MVGLOVE, VALBO, OLAUSSON, 2007; PORCHERON et al, 2008).

Os resultados do presente estudo mostraram uma modificação da percepção das fibras nervosas da pele após a passagem de ambientes com temperaturas diferentes e, ainda, respostas diferentes pelos três tipos de fibras nervosas estudadas. Observou-se também modificações na temperatura da pele, na perda transepidermica de água e no pH cutâneo, bem como variações no conforto térmico e nas sensações subjetivas. Além disso, constatou-se um efeito significativo benéfico da formulação objeto de estudo, que continha uma associação de extratos vegetais e vitaminas, na sensação de hidratação da pele e uma tendência em melhorar a sensibilidade das fibras nervosas C e A δ .

Cumprе salientar mais uma inovação da formulação F11XVGA na comprovação de sua multifuncionalidade uma vez que foi comprovado o efeito protetor da formulação não apenas aos danos causados pela radiação UV, mas também a proteção contra a sensibilidade cutânea provocada por um clima frio e seco e alterações de temperatura ambiente.

A seguir, com o objetivo de padronização das técnicas de biofísica e análise de imagem, principalmente em função dos novos métodos propostos para a avaliação da eficácia clínica das formulações em estudo, foi realizado um estudo preliminar com um número reduzido de voluntárias para avaliar os efeitos das formulações na pele, considerando a variabilidade do método, bem como a variação interindividual e o tempo de aplicação, visando a redução dos fatores interferentes para a obtenção de resultados conclusivos e proposta de um método válido de avaliação objetiva da eficácia clínica de formulações dermocosméticas, com o emprego de métodos não invasivos, os quais possibilitam a referida avaliação nas condições e em tempo real de uso do produto.

Assim, após a obtenção das medidas basais as formulações foram aplicadas diariamente na pele dos antebraços das voluntárias por um período de 30 dias, conforme descrito nos métodos. A

região interna dos antebraços das voluntárias foi selecionada para a realização desse estudo, uma vez que esta tem sido amplamente empregada e se mostrado adequada para a avaliação da eficácia de produtos cosméticos (FUJIMURA et al., 2002; VERTUANI et al., 2003; LEONARDI et al., 2002).

Após o período de aplicação, foram feitas medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo, perda transepidérmica de água, micro-relevo e propriedades visco-elásticas da pele, da anisotropia, do ângulo tipológico individual e da espessura da derme.

Com os resultados obtidos neste estudo preliminar, podemos observar que as todas as formulações estudadas alteraram significativamente o conteúdo aquoso de estrato córneo, ou seja, atuaram como hidratantes da pele após 30 dias de estudo. Esses resultados são coincidentes com os obtidos por DAL`BELO et al. (2006), em um estudo de avaliação do efeito hidratante do extrato de Aloe vera veiculado em formulações cosméticas, ou seja, com a aplicação das técnicas de biofísica e imagem da pele, vem sendo possível avaliar a eficácia dos produtos cosméticos contendo extratos vegetais com propriedades hidratantes e/ou protetoras da pele.

Em relação à função barreira da pele, observou-se uma redução do TEWL com a aplicação das formulações contendo os extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas, o que está relacionado a uma melhora na função barreira da pele (NANGIA, 1998; DAL`BELO et al. 2006).

Em relação aos demais parâmetros avaliados no estudo de eficácia, microrrelevo, viscoelasticidade e anisotropia da pele, estes não foram alterados significativamente após a aplicação das formulações contendo os extratos e vitaminas em estudo. No entanto podemos observar uma tendência das formulações que continham os extratos de algas marinhas vermelhas ou *Ginkgo biloba* ou quando estes estavam associados às vitaminas, na melhora do micro-relevo cutâneo, pela redução do parâmetro Sew, após 30 dias de estudo, o que poderia estar relacionado ao efeito hidratante, suavizante e protetor das formulações (MAIA CAMPOS et al., 1999; HEINRICH et al., 2006; PRIMAVERA, BERARDESCA, 2005; MAIA CAMPOS et al., 2006).

Assim, de acordo com os resultados obtidos no estudo preliminar realizado, foi determinado o protocolo de estudo de eficácia clínica das formulações objeto de estudo. O estudo final foi realizado em duas etapas para avaliar os efeitos imediatos das formulações após uma única aplicação e após 90 dias de uso diário das mesmas.

Com os resultados obtidos no estudo de eficácia após uma única aplicação das formulações estudadas (efeitos imediatos), podemos observar que todas as formulações alteraram significativamente o conteúdo aquoso de estrato córneo, ou seja, atuaram como hidratantes da pele após 2h de uma única aplicação (DAL`BELO et al., 2006) o que se manteve até 8h de estudo. Após 24h o efeito hidratante não foi mais observado (Figura 64A).

O mesmo resultado foi observado no parâmetro suavidade da pele (Sesm) onde se observa um aumento significativo deste parâmetro com a aplicação de todas as formulações estudada (Figura 64C). Este parâmetro refere-se à largura das rugas, sendo que quanto maior o valor dessa variável melhor a textura e maciez da pele (LÉVÊQUE, 1999; BAE, JUNG, 2008).

Além disto, a aplicação da formulação veículo (F11X) e este acrescido da associação de vitaminas A, C e E (F11XV), associação de todas as substâncias em estudo (F11XVGA) e contendo o extrato de algas marinhas vermelhas (F11A) diminuiu o parâmetro Sew relacionado ao número e largura das rugas (LÉVÊQUE, 1999; BAE, JUNG, 2008), após 2h ou 4h de aplicação (Figura 64D).

As alterações nos parâmetros de microrrelevo cutâneo observados após uma única aplicação das formulações estão relacionadas ao efeito hidratante das mesmas, ou seja, a hidratação pode proporcionar uma melhora imediata na aparência da pele principalmente com a diminuição da largura e número de rugas (DRAELOS, 2000; LIPOZENCIC´ et al., 2006; GASPAR et al., 2008; MAIA CAMPOS et al., 2010).

Desta maneira, com os resultados obtidos nesse estudo, podemos dizer que as formulações estudadas possuem um efeito hidratante que proporciona uma melhora da aparência da pele com duração aproximada de 8h, sendo necessária a reaplicação após este período para que o efeito seja mantido. Este efeito foi mais pronunciado quando as formulações continham a associação de vitaminas A, C e E, o extrato de algas marinhas vermelhas ou a associação de todas as substâncias ativas em estudo.

Além disto, o veículo e as formulações contendo o extrato de *Ginkgo biloba* e a associação de substâncias ativas em estudo, proporcionaram uma diminuição da perda transepidérmica de água (TEWL) após 2h da aplicação, sendo que este efeito foi mantido após 4 e 8h de aplicação da formulação contendo todas as substâncias ativas associadas (Figura 64B). Este resultado está relacionado a uma melhora na função barreira da pele (NANGIA, 1998; DAL`BELO et al. 2006) que neste caso pode ter ocorrido devido a rica composição do extrato de *Ginkgo biloba* a qual pode proporcionar a formação de um filme protetor sobre a pele (ABURJAI, NATSHEH, 2003; GIANETI, MAIA CAMPOS, 2011).

Em relação ao estudo de eficácia em longo prazo foi observado mais uma vez que todas as formulações em estudo apresentam efeito hidratante uma vez que todas proporcionaram um aumento significativo do conteúdo aquoso do estrato córneo (Figura 65A) durante todo o período de estudo (DAL`BELO et al. 2006, GIANETI, MAIA CAMPOS, 2011)

Na avaliação da perda transepidérmica de água (TEWL) observou-se uma diminuição deste parâmetro após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações contendo os extratos de algas marinhas vermelhas e *Ginkgo biloba*, bem como da formulação que continha a associação de substâncias ativas em estudo (Figura 65B). Este efeito se deve principalmente a rica composição destes extratos que pode conferir uma melhora na função barreira cutânea (NANGIA, 1998; DAL`BELO et al. 2006).

Além disto, podemos observar que a formulação que continha a associação de vitaminas A, C e E proporcionou um aumento significativo da TEWL durante o período de estudo (Figura 65B) o que pode estar ligado ao aumento da renovação celular da epiderme, provavelmente causado pela aplicação do derivado de vitamina A que após penetração e metabolização na epiderme leva a um estímulo na renovação celular (SILVA, BARBOSA, 2008). O mesmo efeito não foi observado na

formulação que continha a associação de todas as substâncias em estudo, provavelmente devido ao efeito protetor dos extratos vegetais. Assim, a associação das substâncias ativas objeto de estudo conferiu a formulação efeitos sinérgicos na melhoria das condições da pele, ou seja, estimulou a renovação celular e protegeu a função barreira da pele, efeitos tão almejados para uma formulação cosmética com finalidades antienvhecimento.

Na avaliação do microrrelevo cutâneo observou-se uma diminuição significativa da aspereza da pele (Ser) com a aplicação da formulação que continha a associação de vitaminas A, C e E bem como da formulação que continha todas as substâncias ativas em estudo (Figura 65C). Mais uma vez, o efeito obtido pode estar ligado a ação da vitamina A que vem sendo sugerida por apresentar, dentre outros, efeito normalização da queratinização e, conseqüentemente, diminuição da espessura do estrato córneo e melhora da aparência da pele (SILVA, BARBOSA, 2008).

Além disto, observou-se uma diminuição significativa do número e largura das rugas (Sew) com a aplicação das formulações contendo os extratos vegetais objeto de estudo e da formulação que continha a associação destes com as vitaminas A, C e E (Figura 65D). Considerando que a pele seca e caracterizada pelos altos valores de Ser e Swe (FISCHER et al, 2001), podemos sugerir que as formulações contendo os extratos em estudo possuem efeito hidratante, proporcionando um aumento do conteúdo hídrico das camadas mais profundas da epiderme (CABRERA et al., 2006; DRAELOS, 2000; LIPOZENCIĆ et al., 2006) e melhora da aparência da pele (FISCHER et al, 2001, PRIMAVERA, BERARDESCA, 2005; MAIA CAMPOS et al., 2006).

Quando se avaliou as propriedades mecânicas da pele, observou-se uma diminuição significativa da relação viscoelasticidade/elasticidade ($R_6 = U_v/U_e$) após 30 dias de aplicação da formulação F11V e F11VGA (Figura 65E). Segundo Ryu et al. (2008), em regiões do corpo sujeitas a exposição solar moderada, o envelhecimento cutâneo leva a alterações dos parâmetros de elasticidade da pele com um aumento da relação viscolasticidade / elasticidade. Desta maneira, podemos sugerir que a associação de vitaminas em estudo proporcionou uma melhora na elasticidade cutânea após 30 dias de aplicação (DOBREV, 2005a,b). No entanto, o mesmo efeito não foi observado quando foi avaliada a anisotropia da pele (Figura 65F), parâmetro ligado a densidade dos tecidos e organização das fibras de colágeno e elastina (RUVOLO et al, 2007).

Em relação à coloração da pele foram realizadas medidas das coordenadas de cor $L^*a^*b^*$ e da % de manchas na pele facial utilizando-se os equipamentos *SkinColoremeter* e *Visioface Qick* (Figura 66A), respectivamente. Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros avaliados (Figura 66A,B), porém, observa-se uma diminuição da porcentagem de manchas na pele com o uso da formulação F11VGA, porém não significativa devido a variação inter individual, o que sugere que a associação de substâncias ativas proposta pode melhorar a aparência da pele, tornando-a mais homogênea em relação a coloração.

Além disto, com o equipamento *Visioface Qick* é possível avaliar também a porcentagem de rugas presente na face (Figura 66B). Não foi observada uma diminuição significativa na porcentagem

de rugas das voluntárias após a aplicação das formulações F11 e F11VGA, no entanto observa-se uma tendência da formulação contendo a associação de vitaminas e extratos vegetais na redução das rugas, o que está de acordo com os resultados obtidos no parâmetro de micro relevo cutâneo Sew. Desta maneira, podemos sugerir mais uma vez que a formulação estudada possui um efeito hidratante não apenas superficial, mas também nas camadas mais profundas da epiderme (FISCHER et al, 2001, PRIMAVERA, BERARDESCA, 2005; MAIA CAMPOS et al., 2006), melhorando assim a aparência da pele.

Em relação aos outros parâmetros avaliados pelo equipamento *Visioface Quick* como porcentagem de poros e manchas visíveis apenas com a luz UV (Figura 67C,D), também não foram observadas alterações significativas com a aplicação das formulações. No entanto, cumpre salientar que este equipamento fornece parâmetros muito importantes para estudos de avaliação de eficácia de cosméticos antienvhecimento, anti acne, clareadores, dentre outros (BAE, JUNG, 2008; MARGHOOB et al., 2003).

O equipamento *Dermascan*, um ultrassom de 2mHz, é um equipamento inovador que possibilita a avaliação da ecogenicidade da derme, avaliando-se desta maneira os efeitos da formulação na melhora dos danos do fotoenvelhecimento na derme (HOFFMANN et al., 1994; GNIADOCKA et al.;1994).

Não foram observadas diferenças significativas na ecogenicidade da derme após a aplicação das formulações em estudo (Figura 66D), no entanto foi possível observar na pele das voluntárias características do fotoenvelhecimento cutânea pela formação de uma faixa de baixa ecogenicidade, muito escura, logo abaixo da epiderme (GNIADOCKA 1998) (Figura 68). Assim, o ultrassom de 20MHz apresenta-se um método eficaz para avaliar as mudanças ocorridas na pele humana após a exposição solar e com o envelhecimento sendo portanto sugerida para avaliar a eficácia de formulações anti envelhecimento.

Atualmente, a microscopia confocal a laser *in vivo* tem uma vasta gama de aplicações, permitindo a obtenção de imagens microscópicas em tempo real, com uma resolução próxima à histologia convencional, podendo explorar estruturas cutâneas entre o estrato córneo e a derme reticular (Figura 69) (SCHMID-WENDTNER, BURGDORF, 2005; JASAITIENE et al. 2010).

Na prática, a microscopia confocal a laser tem sido muito utilizada para a identificação de lesões cancerígenas, inflamação, dermatite atópica, dentre outras patologias dermatológicas. Na área cosmética, esta técnica tem potencial para ser aplicada na classificação dos diferentes tipos de pele e avaliação da eficácia de formulações cosméticas, substituindo os consagrados métodos histológicos e histométricos, diminuindo o uso de animais de laboratório, e avaliando alterações nas reais condições de uso dos produtos (PYGALL et al., 2007; JASAITIENE et al. 2010; GONZALEZ et al., 2008).

Para a avaliação a eficácia de produtos antienvhecimento vários parâmetros podem ser estudados por meio da técnica de microscopia confocal a laser por reflectância. Inicialmente é possível avaliar a espessura das diferentes camadas da epiderme, produtos capazes de aumentar a renovação

celular, por exemplo, podem proporcionar uma diminuição da espessura das camadas da epiderme (SILVA, MAIA CAMPOS, 2000).

Além disto, a pele envelhecida apresenta uma epiderme fina, portanto, com a aplicação de uma formulação antienvelhecimento pode-se observar um aumento na espessura da epiderme ou alguma de suas camadas (CERIMELE; CELLENO; SERRI, 1990; RAMOS E SILVA; SILVA CARNEIRO, 2007).

No presente estudo a microscopia confocal a laser foi proposta para avaliar a eficácia de formulações cosméticas antienvelhecimento por meio da avaliação das alterações epidérmicas proporcionadas pela formulação contendo a associação de vitaminas e extratos vegetais em estudo. Cumpre salientar que poucos são os estudos utilizados para avaliar a eficácia de cosméticos utilizando-se esta tecnologia inovadora e, ainda, este é o primeiro realizado no Brasil.

Os valores médios da espessura das diferentes camadas da epiderme estão apresentados na Figura 73. Valores semelhantes foram obtidos nos estudos de Sauermaann et al. (2002) e Branzan et al (2007), o que indica que as condições de estudo utilizados no presente projeto estão de acordo com estudos da comunidade científica mundial.

Dentre os inúmeros parâmetros que esta técnica nos permite avaliar, podemos destacar que a formulação F11VGA provocou um aumento significativo na espessura da camada granulosa (Figura 69B), além de um aumento não significativo no estrato córneo e na camada espinhosa, o que não foi observado com o veículo (F11) (Figura 69A, C,D).

Kligman et al. (1993) também observaram um aumento da espessura da epiderme viável com a aplicação de uma formulação contendo tretinoína. Este efeito deve estar ligado ao efeito hidratante da formulação estudada, comprovando que a associação de substâncias ativa proposta no presente estudo proporcionam um aumento do conteúdo hídrico na superfície (estrato córneo) e nas camadas mais profundas da epiderme (MAIA CAMPOS et al., 1999; SILVA, MAIA CAMPOS, 2000), o que proporciona uma melhora da aparência da pele com a diminuição das rugas (FISCHER et al., 2001, PRIMAVERA, BERARDESCA, 2005; MAIA CAMPOS et al., 2006) e ainda, a hidratação é de fundamental importância para que seja mantida a homeostase da pele, diminuindo a ocorrência de doenças cutâneas e prevenindo o aparecimento dos sinais do envelhecimento.

Com esta técnica também é possível contar o número de células de uma específica camada de epiderme, em uma região selecionada, possibilitando a conclusão mais exata de um possível efeito no aumento da espessura. Se o número de células manteve-se igual com o aumento da espessura, provavelmente o efeito foi hidratante. Se o número de células foi maior, o efeito provável foi na renovação celular. No presente estudo não foram observadas alterações significativas no número de células contados nas diferentes camadas da epiderme sugerindo mai uma vez o efeito hidratante da formulação.

Outra característica que pode ser avaliada por esta técnica é o formato e distribuição dos queratinócitos. A pele jovem é caracterizada por queratinócitos poligonais regulares (Figura 70B) e

colágeno reticulado fibras finas. Com o envelhecimento, os queratinócitos se tronam mais irregulares, com áreas com pigmentação desigual (manchas) (Figura 70A) e fibras de colágeno mais compactado (LONGO et al., 2011).

Assim, uma formulação antienvelhecimento com propriedade hidratante deve alterar estes parâmetros, ou seja, a hidratação uniformiza a rugosidade e, desta forma, melhora a aparência da pele. A formulação estudada F11xVGA não proporcionou alterações nos queratinócitos, o que pode ser caracterizado como um bom resultados uma vez que alterações nos queratinócitos também são observadas com substâncias tóxicas e reações alérgicas.

Na junção dermo epidérmica também é possível observar alterações com o envelhecimento, mas apenas na superfície da derme, uma vez que ocorre uma perda de nitidez das imagens com a profundidade. Nesta localização é possível observar uma distribuição mais regular na pele jovem (Figura 71A) comparada com a pele envelhecida (Figura 71B). Desta maneira, uma formulação antienvelhecimento com efeitos nas fibras de colágeno deve melhorar a homogeneidade das fibras na junção dermo epidérmica. A formulação multifuncional F11xVGA não proporcionou efeitos antienvelhecimento na junção dermo epidérmica observadas pela microscopia confocal.

Cumprе salientar que a utilização de diferentes técnicas de biofísica e análise de imagem da pele, principalmente com o uso de tecnologia inovadora como a microscopia confocal a laser, é de fundamental importância em estudos de eficácia clínica de cosméticos para a obtenção de resultados conclusivos.

Com os resultados obtidos no presente estudo demonstramos que, a formulação multifuncional proposta contendo uma associação de vitaminas lipossolúveis A, C e E e extratos vegetais de *Ginkgo biloba* e *Phorphyra umbilicalis* proporciona uma melhora na função barreira da pele e uma hidratação que atinge até as camadas mais profundas da epiderme, levando a uma melhora na aparência da pele pela diminuição de rugas e da aspereza, observado após 30, 60 e 90 dias de aplicação diária.

Em síntese, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a formulação multifuncional proposta contendo uma associação de vitaminas lipossolúveis A, C e E e extratos vegetais de *Ginkgo biloba* e *Phorphyra umbilicalis* proporciona uma melhora clínica significativa na função barreira da pele e uma hidratação que atinge até as camadas mais profundas da epiderme, levando a uma melhora na aparência da pele pela diminuição de rugas e da aspereza, observado após 30, 60 e 90 dias de aplicação diária.

Finalizando, o presente trabalho apresenta como contribuição o desenvolvimento de uma formulação cosmética multifuncional estável, compatível com a pele e eficaz na fotoproteção e na melhora das condições da pele envelhecida contendo a inédita associação dos extratos vegetais e vitaminas acima mencionadas (protocolado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - I.N.P.I./S.P. com o número o nº. BR 10 2012 032989-1 – Anexo 5). Além disso, abre perspectivas para a avaliação da eficácia clínica de cosméticos por técnicas não invasivas de biofísica e imagem da pele padronizadas para este estudo.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste trabalho, foi possível concluir que:

- Nos estudos preliminares de estabilidade, a formulação F11, a base de Poliacrilamida e C13-14 isoparafina e lauret-7 e Pentaestearato de poliglicerila-10 e estearoil lactilato de sódio, acrescida ou não das substâncias objeto de estudo foi considerada a mais estável uma vez que não foram observados sinais de instabilidade como modificações na cor, odor, pH e separação de fases. Dessa maneira, essa formulação foi selecionada para a realização dos testes propostos de estabilidade e eficácia.

- No estudo da estabilidade física por determinação do comportamento reológico, as formulações avaliadas, F11X e F11N, foram consideradas estáveis, pois não apresentaram variações consideráveis nos parâmetros analisados e, portanto, foram utilizadas nos estudos posteriores.

- No estudo de estabilidade química o método foi preciso e com exatidão dentro dos valores aceitáveis em métodos analíticos.

- As formulações contendo as diferentes substâncias ativas apresentaram diferentes prazos de validade, sendo que para a formulação que continha a associação de extratos e vitaminas (F11XVGA), o prazo de validade foi considerado maior quando comparado com as formulações que continham estas substâncias isoladas;

- Na avaliação da compatibilidade cutânea nenhum sinal clínico ou sensação de desconforto foi observado, portanto, as formulações contendo as vitaminas e extratos vegetais objetos de estudo podem ser aplicadas na pele humana.

- No estudo de quantificação do limiar de percepção a uma corrente elétrica a formulação contendo associação de vitaminas e extratos vegetais de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas proporcionou um aumento a sensibilidade das fibras A β devido a um aumento da hidratação, o que é essencial para manter as condições de percepção da pele.

- Na avaliação do efeito protetor contra as variações do clima a formulação F1XVGA apresentou efeito significativo benéfico na sensação de hidratação da pele e uma tendência em melhorar a sensibilidade das fibras nervosas C e Ad.

- Na avaliação sensorial as formulações foram classificadas de boas a muito boas;

- As formulações estudadas aumentaram o conteúdo aquoso do estrato córneo, mostrando, portanto, efeito hidratante na pele. Por outro lado, somente as que continham os extratos de *Ginkgo biloba* ou algas marinhas vermelhas, reduziram a TEWL, ou seja, protegeram a função barreira da pele.

- Na avaliação dos efeitos imediatos a formulações estudadas proporcionaram um efeito hidratante que levam a uma melhora da aparência da pele com duração aproximada de 8h, sendo necessária a reaplicação após este período para que o efeito seja mantido. Além disto, a formulação

contendo a associação de substâncias ativas objeto de estudo foi eficaz na melhora da função barreira da pele.

- No estudo de eficácia clínica em longo prazo a formulação fotoprotetora desenvolvida, contendo a associação de vitaminas e os extratos vegetais objeto de estudo, proporcionou uma melhora significativa na função barreira da pele e uma hidratação até as camadas mais profundas da epiderme, levando a uma melhora na aparência da pele pela diminuição de rugas e da aspereza sendo, portanto, proposta para prevenir e melhorar as condições da pele foto envelhecida.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURJAI, T.; NATSHEH, F. Plants used in cosmetics. **Phyther Res.**, v.17, p.987-1000, 2003.
- AGACHE, P.; HUMBERT, P. **Measuring the Skin**. Springer-Verlag, Berlin, p.206–214, 2004.
- AGNER, T.; SERUP, J. Individual and instrumental variations in irritant patch-test reactions: Clinical valuation and quantification by bioengineering methods. **Clin Exp Dermatol.**, v.15, p.29–33, 1990.
- AGNER, T.; SERUP, J. Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods. **Contact Dermatitis.**, v.20, p.352–359, 1989.
- ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Evaluation of the physical stability of two oleogels. **Int. J. Pharm.** v.327, n.1-2, p.73-77, 2006.
- ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. reologia: interesse e aplicações da área cosmético-farmacêutica. **Cosm. Toil.** (edição em português), v.15, n.3, p.96-100, 2003.
- ALVAREZ, J.C., MAZANCOURT, P. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of retinol, α -tocopherol 25-hydroxyvitamin D3 and D2 in human plasma with photodiode-array ultraviolet detection. **J Chromatogr B**; v.755, p.129–35, 2001.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr, L.V. Desenvolvimento farmacotécnico. In: **Farmacotécnica – formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. Cap.4, p.126-141.
- ANVISA – Disponível em: <[http://: www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 20 de abril de 2011.
- AQUINO, R.; MORELLI, S.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.; SAIJA, A.; GRUMETTO, L.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; BONINA, F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. **J. Ethnopharmacol.** v.79, n.2, p.183-189, 2002.
- ARAMAKI, J.; EFFENDY, I.; HAPPLE, R.; KAWANA, S.; LÖFFLER, C.; LÖFFLER, H. Which bioengineering assay is appropriate for irritant patch testing with sodium lauryl sulfate? **Contact Dermatitis**, v. 45, p.286-290, 2001.
- ARICIOGLU, A.; BOZKURT, M.; BALABANLI, B.; KILINC, M.; NAZAROGLU, N.K.; TURKOZKAN, N. Change sin zinc levels and superoxide dismutase activities in the skin of acute, ultraviolet-B-irradiated mice after treatment with *Ginkgo biloba* extract. **Biol Trace Elem Res.**, v.80, n.2, p.175-179, 2001.
- ASAWANONDA, P.; TAYLOR, C.R.; Wood's light in dermatology. **Int J Dermatol.**, v.38, p.801-807, 1999.
- BAE, Y.; JUNG, B. Digital Photographic Imaging System for the Evaluation of Various Facial Skin Lesions. **30th Annual International IEEE EMBS Conference**, Vancouver, British Columbia, Canada, August 20-24, 2008.

BANASZAK, A.T.; LESSER, M.P.; KUFFNER, I.B.; ONDRUSEK, M.. Relationship between ultraviolet (UV) radiation and mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. **Bull Mar Sci**, v.63, p.617–628, 1998.

BANDARANAYAKE, W.M. Mycosporines: are they nature's sunscreens? **Nat Prod Rep.**, v.15, p.159–172, 1998.

BANDARANAYAKE, W.M.; DES ROCHER, A. Role of secondary metabolites and pigments in epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*, **Mar. Biol.**, v.133, p. 163–169, 1999.

BECHELLI, L.M.; CURBAN, G.V. **Compêndio de dermatologia**. São Paulo, Atheneu, 1975, p. 1-19.

BONINA, F.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; AQUINO, R.; TORTORA, S.; SACCHI, A.; SAIJA, A.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.L.; DE CAPRARIIS, P. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L buds. **J. Cosmet. Sci.** v.53, n.6, p.321-335, 2002.

BOODTS J.B.; MAIA CAMPOS P.M.B.G. Influence of glycolic acid in the chemical stability of vitamins A and E in a gel cream formulation. **Bolletino Quimico Farmaceutico**; v.138, n.2, p.CCVII, 1999.

BRUMMER, R. **Rheology essentials of cosmetic and food emulsions**. 1.ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, 180p.

BURACZEWSKA, I.; BERNE, B.; LINDBERG, M.; TÖRMÄ, H.; LODÉN, M. Changes in skin barrier function following long-term treatment with moisturizers, a randomized controlled trial. **Br J Dermatol.**, v.156, p. 492-498, 2007.

CALLEGOS, C.; FRANCO, J.M. Rheology of food, cosmetics and pharmaceutical. **Current Opinions in Colloids & Interface Science.**, v.4, p.288-293, 1999.

CARABELLI, A.; VALSERRA, G.; VALSERRA, M.; TRIPODI, S.; BELLOTTI, E.; POZZI, R.; CAMPIGLIA, C.; ARCANGELI, P. Effetti dell'uso di un fango termale su cute normale, secca e seborroica. **Clin Ter.**, v.149, p.271-275, 1998.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Review: Metabolites from algae with economical impact. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, Part C, v.146, p.60-78, 2007.

CARDOZO, K.H.M.; VESSECHI, R.; CARVALHO, V.M.; PINTO, E. GATES, P.J.; COLEPICOLO P.; GALEMBECK, S.E.; LOPES, N.P.; A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. **Int J Mass Spectrom.**, v. 273, p.11-19, 2008.

CARLOTTI, M.E.; ROSSATTO, V.; GALLARATE, M.; TROTTA, M.; DEBERNARDI, F. Vitamin A palmitate photostability and stability over time. **J Cosmet Sci.** v.55, n.3, p.233-52, 2004.

CHEN, J.X.; ZENG, H.; CHEN, X.; SU, C.Y.; LAI, C.C. Induction of heme oxygenase-1 by *Ginkgo biloba* extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysiphsphatidylcholine-induced damage. **Pharmacol Res.**, v.43, p.63-69, 2001.

CHENG, Y.; DONG, Y.; WANG, J.; DONG, M.; ZOU, Y.; REN, D.; YANG, X.; LI, M.; SCHRADER, A.; ROHR, M.; LIU, W. Moisturizing and anti-sebum secretion effects of cosmetic application on human facial skin. **J Cosmet Sci.** v.60, n.1, p.7-14, 2009.

CHIU, A.E.; CHAN, J.L.; KERN, D.G.; KOHLER, S.; REHMUS, W.E.; KIMBALL, A.B. Double-blinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. **Dermatol. Surg.** v.31, n.7, p.855-60, 2005.

CHIU, A.E.; KIMBAL, A.B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. **Br J Dermatol.**, v.149, p.681-691, 2003.

CHWIROT, B.W.; CHWIROT, S.; REZINSKI, J.; MICHNIEWICZ, Z. Detector of melanoma by digital imaging of spectrally resolved ultraviolet light-induced autofluorescence of human skin. **Eur J Cancer.**, v.34, p.1730-1734, 1998.

CIMINO, F.; CRISTANI, M.; SAIJA, A.; BONINA, F.P.; VIRGILI, F. Protective effects of a red orange extract on UVB-induced damage in human keratinocytes. **Biofactors.** v.30, n.2, p.129-138, 2007.

COCKELL, C.S.; KNOWLAND, J. Ultraviolet radiation screening compounds. **Biol Rev Camb Philos Soc.**, v.74, n.3, p.311-345, 1999.

COLE, J.; BUSHNELL, M.C.; MCGLONE, F.; ELAM, M.; LAMARRE, Y.; VALLBO, A. Unmyelinated tactile afferents underpin detection of low-force monofilaments. **Muscle e Nerve**, 2006, 34:105-107, 2006.

COLIPA GUIDELINE: Guideline for the Colorimetric Determination of Skin Colour Typing and Prediction of the Minimal Erythral Dose (Med) Without UV Exposure. Edition of 2007.

COMACCHI, C.; HERCOGOVA, J. A single mud treatment induces normalization of stratumcorneum hydration, transepidermal water loss, skin surface pH and sebum content in patientswith seborrhoeic dermatitis. **JEADV**, v.18, p.372-374, 2004.

CONDE, F.R.; CHURIO, M.S.; PREVITALI, C.M. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. **J Photochem Photobiol B.**, v.56, n.2-3, p.139-144, 2000.

CORAZZA, S.; BARRETO, D.W.; GOUVEA, M.C., BARRETO, R.C.R. Algas marinhas em sabonates. **CosmToil.** (edição em português), v.7, p.56-60, 1995.

CURDY, C.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; ALBERTI, I., GUY, R.H. Non-invasive assessment of the effect of formulation excipients on stratum corneum barrier function *in vivo*. . **Int J Pharm.**, v.271, n.1-2, p.251-256, 2004.

DAL' BELO, S. E., CAMPOS, P. M. B. G. M. Avaliação da Estabilidade do ácido ascórbico livre ou encapsulado e seus derivados em formulações cosméticas In: 15º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2001, São Paulo. **Anais**, 2001. p.517 – 524.

DAL BELO, S.E.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.; MARTY, J.P. Skin penetration of epigallocatechin-3-gallate and quercetin from green tea and *Ginkgo biloba* extracts vehiculated in cosmetic formulations. **Skin Pharmacol Physiol.**, v.22, n.6, p.299-304, 2009.

DAL' BELO, S. E.; GASPAR, L. R; MAIA CAMPOS, P. M. B.G. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing *Aloe vera* extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Res Technol.**, v.12, p.241-246, 2006.

DAMHS, G.H. Rheology effect on physical SPFs. **Soap Perfum Cosm.**, p.23-25, 1996.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **J Photochem Photobiol B.**, v.82, n.3, p.204-213, 2006.

DANIEL, S.; CORNELIA, A.; FRED, Z. UV-A sunscreen from red algae for protection against premature skin aging, **Cosmet Toil**, 2004, p.139–143.

DARR, D.; DUNSTON, S.; FAUST, H.; PINNELL, S. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. **Acta Dermato-Venereologica (Stockh)**, v.76, p.264-268, 1996.

DE PAEPE, K.; DERDE, M.-P.; ROSEEUW, D.; ROGIERS, V. Claim substantiation and efficiency of hydrating body lotions and protective creams. **Contact Dermatitis.**, v.42, p.227-234, 2000.

DE PAEPE, K.; ROSEEUW, D.; ROGIERS, V. Repair of acetone- and sodium lauryl sulphatedamaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. **JEADV**, v.16, n.6, p.587-594, 2002.

DE POLO, K.F. A short textbook of cosmetology. ed. 1, Verlag Fur Chemische Industrie, p.335-423, 1998.

DEHORTER B.; BERNILLON J. Photoinduction des Pe´rithe`ces du *Nectriagalligena*: production et activite´ photomorphoge`ne des myco- sporines, **Can J Bot.**, v.61, p. 1435–1442, 1983.

DIAMOND, B.J.; SHIFLETT, S.C.; FEIWEL, N.; MATHEIS, R.J.; NOSKIN, O.; RICHARDS, J.A.; SCHOENBERGER, N.E. *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. **Amh Phys Mad Reahabil.** v.18, p.668-678, 2000.

DOBREV, H. A study of human skin mechanical properties by means of Cutometer. **Folia Medica (Plovdiv)**, Sofia, v.44, n.3, p.5-10, 2002.

DOBREV, H. Clinical and instrumental study of the efficacy of a new sebum control cream. **J. Cosmet Dermatol.**, v.6, p.113–118, 2007.

DOBREV, H. Use of cutometer to assess epidermal hydration. **Skin Res. Tecnol.**, Copenhagen, v.6, p.239-244, 2000.

- DRAELOS, Z.D. Botanicals as topical agents. **Clin Dermatol.**, v. 19, p. 474-477, 2001.
- DUNLAP, W.C.; CHALKER, B.E.; OLIVER, J.K. Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia: III. UV-B absorbing compounds. **J Exp Mar Biol Ecol.**, v.104, p.239– 248, 1986.
- DUNLAP, W.C.; SHICK, M.J. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. **J Phycol.**, v.34, p.418–430, 1998.
- DUNLAP, W.C.; YAMAMOTO, Y. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine, **Com. Biochem Physiol.**, v.112B, p. 105–114, 1995.
- DYKES, P.J.; MARKS, R. Measurement of dermal thickness: A comparison of two non-invasive techniques with a conventional histometric method. **J Invest Dermatol.**,v.69, p.275– 278, 1977.
- EDIN, B. Cutaneous afferents provide information about knee joint movements in humans. **J Physio.**, v. 531, p.289-297, 2001.
- EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clin Dermatol.**, v.13, n.4, p.375-389, 1995.
- FERRONI, L.; KLISCH, M.; PANCALDI, S.; HÄDER, D.P. Complementary UV-Absorption of Mycosporine-like Amino Acids and Scytonemin is Responsible for the UV-insensitivity of Photosynthesis in *Nostoc flagelliforme*. **Mar Drugs.**, v.8, p.106-121, 2010.
- F'GUYER, S.; AFA, Q.F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photoderm Photoimm Photomed.**, v.19, n.2, p.56-72, 2003.
- FISCHER, T.W.; WIGGER-ALBERTI, W.; ELSNER, P. Direct and non-direct measurement techniques for analysis of skin surface topography. **Skin Pharmacol Appl SkinPhysiol.**, v.12, n.1-2, p.1-11, 1999.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M.A. Protetores Solares. **Quím Nova.** v.30, n.1, p.153-58, 2007.
- FRANCIS, S.T.; ROLLS, E.T.; BOWTELL, R.; MCGLONE, F.; O'DHOERT, J.O.; BROWNING, A. The representation of pleasant touch in the brain and its relationship with taste and olfactory areas. **Neuroreport.** v. 10, p. 453-459, 1999.
- FULLERTON, A.; FISCHER, T.; LAHTI, A.; WILHELM, K.-P.; TAKIWAKI, H.; SERUP, J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of theEuropean Society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis.**, v.35,p.1-10, 1996.
- FULLERTON, A.; SERUP, J. Topical Dvitamins: Multiparametric comparison of the irritant potential of calcipotriol, tacalcitol and calcitriol in a hairless guinea pig model. **Contact Dermatitis.**,v.36, p.184–190, 1997.
- GALLARATE, M.; CARLOTTI, M.E.; TROTTA, M.; BOVO, S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. **Int J Pharm.**, v. 188, p.233-241, 1999.

GARDÉS-ALBERT, M. FERRADINI, C.; SEKAKI, A.; DROY-LEFAIX, M.T. Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202, In: FERRADINI, C.; DROY-LEAFIX, M.T.; CHRISTEN, Y. **Advances in Ginkgo biloba extract research**, v.2 *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) as a free-radical scavenger, Paris: Elsevier, p.1-11, 1993.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Inter J Pharma.**, v.250, n.1, p.35-44, 2003.

GASPAR, L.R., CAMARGO JUNIOR, F.B., GIANETI, M.D., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins. **Food Chem Toxicol**; v.46, n.11, p.493-500, 2008 (A).

GASPAR, L.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **Int J Pharm**; v.307, n.2, p.123-38, 2006.

GASPAR, L.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **Int J Pharm.** v.343, n.1-2, p.181-189, 2007.

GASPAR, L.R.; GIANETI, M.D.; CAMARGO JUNIOR, F.B.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Avaliação da estabilidade e eficácia de formulações cosméticas contendo tetraisopalmitato de ascorbila. In: 22º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2008, São Paulo, **Anais**, p.110 – 111, 2008 (B).

GEHRING, W.; FLUHR, J.; GLOOR, M. Influence of vitamin E acetate on stratum corneum hydration. **Arzneimittelforschung.** v.48, n.7, p.772-775, 1998.

GIANETI, M.D., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de formulações cosméticas contendo extratos protéicos de trigo e/ou soja. In: 20º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2006, São Paulo. **Anais**, 2006. p.52.

GIANETI, M.D.; MERCÚRIO, D.G.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.M. The use of Green Tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient. **Dermatol Therapy.**, v. 1, p. 1, 2012.

GIANETI, M.D.; GASPAR, L.R.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. HPLC assay to assess chemical stability of cosmetic formulations containing vitamins A, C and E, alone or in combination. In: 2º SINPOSPq, 2006, Ribeirão Preto. **Anais**, 2006.

GIANETI, M.D.; GASPAR, L.R.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.M. Benefits of Combinations of Vitamin A, C and E Derivatives in the Stability of Cosmetic Formulations. **Molecules**, v. 17, p. 2219-2230, 2012 A.

GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.M. Efficacy of cosmetic formulations containing wheat and soy protein extracts assessed by skin biophysics techniques and confocal microscopy. **Revista Brasileira de Medicina.**, v. 69, p. 12-18, 2012.

GIANETI, M.D.; WAGEMAKER, T.A.L.; SEIXAS, V.C.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.M. The Use of Nanotechnology in Cosmetic Formulations: The Influence of Vehicle in the Vitamin A Skin Penetration. **Current Nanoscience**, v. 8, p. 1, 2012 B.

GILCHREST, B.A.; KRITMANN, J. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1 ed. p. 198, 2006.

GIMENO, A.; ZARAGOZÁ, R.; VIVÓ-SESÉ, I.; VINÃ, J. R.; MIRALLES, V. J. Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. **Exp Dermatol**, v.13, 45-54, 2004.

GIMENO, E., CASTELLOTE, A.I., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Rapid high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in human plasma and low-density lipoproteins. **J Chromatogr B.**, v.758, p.315-22, 2001.

GIOIA, F.; CELLENO, L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. **Skin Res Technol.** v.8, n.3, p.178-186, 2002.

GNIADACKA, M.; GNIADACKI, R.; SERUP, J.; SONDERGAARD, J. Ultrasound structure and digital image analysis of the subepidermal low echogenic band in aged human skin: Diurnal changes and interindividual variability. **J Invest Dermatol.**, v.102, p.362–365, 1994.

GNIADACKA, M.; JEMEC, G.B. Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo: studies on skin echogenicity and thickness. **Br J Dermatol.** v.139, n.5, p.815-821, 1998.

GOHIL, K.; MOY, R.K.; FARZIN, S.; MAGUIRE, J.J.; PACKER, L. mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to *Ginkgo biloba* extract: introduction of antioxidant response and Golgi system. **Free Radic Res.**, v.33, p.831-849, 2000.

GOLD, P.E.; CAHILL, L.; WENK, G.L. *Ginkgo biloba*: a cognitive enhancer? **Psychological Science in the public interest.** v.3, n.1, p.2-11, 2002.

GONÇALVES, G.M.S.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p.1-10, 2009.

GONZALEZ, S.; GILABERTE-CALZADA, Y. *In vivo* reflectance-mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology. **Int J Cosmet Sci.**, v.30, p.1–17, 2008.

GUARATINI, T.; GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Stability of cosmetic formulations containing esters of vitamins E and A: chemical and physical aspects. **Int J Pharm.**, v.327, n.1-2, p.12-16, 2006.

HALLER, P.H. Aplicação de lipídeos e fosfolipídeos em cosméticos. **Cosm Toil.**, v.1, n.4, p.33-40, 1989.

HANSON, K.M.; CLEGG, R.M. Bioconvertible vitamin antioxidants improve sunscreen photoprotection against UV-induced reactive oxygen species. **J Cosmet Sci.**, v.54, n.6, p.589-598, 2003.

HARTMANN, S., FROESCHEIS, O., RINGENBACH, F., WYSS, R., BUCHELI, F., BISCHOF, S. Determination of retinol and retinyl esters in human plasma by high performance liquid chromatography with automated column switching and Ultraviolet detection. **J Chromatogr B.**, v.751, p.265-75, 2001.

HERMANNNS-LÊ, T.; JONLET, F.; SCHEEN, A.; PIÉRARD G.E. Age and body mass index-related changes in cutaneous shear wave velocity. **Exp Gerontol**, v.36, p.363-372, 2001.

- HILLIGES, M.; WANG, L.; JOHANSON, O. Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the humans epidermis. **J Invest Dermatol.** v. 104, p. 134-137, 1995.
- HOFFMANN, K.; DIRSCHKA, T.P.; STÜCKER, M.; EL GAMMAL, S.; ALTMAYER, P. Assessment of actinic skin damage by 20-MHz sonography. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**,v.10, p.97-101, 1994.
- HOFFMANN, K.; EL GAMMAL, S.; ALTMAYER, P. B-scan-Sonographie in Dermatologie. **Hautarzt.**, v.41, p.W7-W16, 1990.
- HOLBROOK, K.A.; WOLF, K. The structure and development of skin. In: FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLF, K. et al. (eds). **Dermatology in general medicina**, 4ed., New York, McGraw-Hill, 1993. Cap. 16, p.241-253.
- HOWITZ, W. Appendix: guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. **J Assoc Off Anal Chem**, v.71, p.161-71, 1989
- IDSON, B. Vitamins and the skin. **Cosm Toil.**, v. 108, n.2, p. 79-94, 1993.
- IFSCC: International Federation of the Societies of Cosmetic Chemists. Monograph, No. 2: The Fundamentals of Stability Testing, Michelle Press, 1992.
- JASAITIENE, D.; VALIUKEVICIENE, S.; LINKEVICIUTE, G.; RAISUTIS, R.; JASIUNIENE,E.; KAZYS, R. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. **JEADV**, , v.25, p.375-382, 2011.
- JOHNCOCK, W. Interação de formulações com filtro solar. **Cosmet Toil.**, (edição em português). v.12, p.40-50, 2000.
- KARSTEN, U.; FRANKLIN, L.A.; LUNING, K.; WIENCKE, C. Natural ultraviolet and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). **Planta**, v.205, p.257- 262, 1998.
- KATSAROU, A.; DAVOY, E.; XENOS, K.; ARMENAKA, M.; THEOHARIDES, T.C. Effect of an antioxidant (quercetin) on sodium-lauryl-sulfate-induced skin irritation. **Contact Dermatitis.**, v.42, p.85-89, 2000.
- KERSCHER, M.J.; KORTING, H.C. Topical glucocorticoids of the non-fluorinated double-ester type: Lack of atrophogenicity in normal skin as assessed by high-frequency ultrasound. **Acta Derm Venereol.**, v.72, p.214-216, 1992.
- KIM, S.J. Effect of biflavones of *Ginkgo biloba* against UVB-induced cytotoxicity *in vitro*. **J Dermatol.**, v.28, p.193-199, 2001.
- KIM, S.J.; LIM, M.H.; CHUN, I.K.; WON, Y.H. Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast. **Skin Pharmacol.**, v.10, n.4, p.200-205, 1997.
- KIM, T.J., ZHANG, Y.H., KIM, Y., LEE, C.K., LEE, M.K., HONG, J.T., YUN, Y.P. Effects of apigenin on the serum- and platelet derived growth factor-BB-induced proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells. **Planta Med.** v.68, n.7, p.605-609, 2002.

KIM, Y.S.; STRAND, E.; DICKMANN, R.; WARTHESEN, J. Degradation of vitamin A palmitate in corn flakes during storage. **J Food Sci.**, v.65, p.1216-1219, 2000.

KLEIN, K. Formulators forum. **Cosmet Toil.**, New York, v.114, n.15, p.42-45, 1999.

KOGA, K.; FURUE, H.; RASHID, H. Selective activation of primary afferent fibers evaluated by sine-wave electrical stimulation. **Molecular Pain.**, v. 1, n.13, 2005.

KWAK, W.J.; HAN, C.K.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S.; PARK, B.K.; KIM, H.P. Effects of Ginkgetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and *in vivo* skin inflammation. **Plant Med.**, v.68, n.4, p.316-321, 2002.

LABA, D. Rheological properties of cosmetics and toiletries. **Marcel Dekker Inc.** New York, 1st ed., 426p., 1993.

LACHMAN, L.; LUCA, P.; AKERS, M. Kinetic principles and stability testing In: **The theory and practice of industrial pharmacy**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. Cap.26, p.760-803.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. Medfarma, 1^oed., p.92-93, 2004.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de Formulações Cosméticas. **Inter J Pharma Compounding.**, Editora Brasileira, v.3, n.4, jul/ago., p.154-156, 2001.

LÉVÊQUE, J.L. EEMCO guidance for the assessment of skin topography. **JEADV**, v.12, p.103-114, 1999.

LÉVÊQUE, J.L.; DRESLER, J.; RIBOT-CISCAR, E. ; ROLL, J.P. ; POELMAN, C. Changes in tactile spatial discrimination and cutaneous coding properties by skin hydration in the elderly. **The society of Investigative Dermatology**. v. 115, n. 3, p. 454-458, 2000.

LEVY, J.L.; TRELLES. M.; SERVANT, J.J.; AGOPIAN, L. Non-ablative skin remodeling: an 8-month clinical and 3D *in vivo* profilometric study with an 810 nm diode laser. **J Cosmet Laser Ther.**, v.6, n.1, p.11-5, 2004.

LIM, S. H.; KIM, S. M.; LEE, Y. W.; AHN, K. J.; CHOE, Y. B.. Change of biophysical properties of the skin caused by ultraviolet radiation-induced photodamage in Koreans. **Skin Res Technol.**, v.14, p.93-102, 2008.

LIM, S.H.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S.; KIM, H.P. Effects of anti-inflammatory bioflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. **Biol Pharm Bull.**, v.29, p.1046-1049, 2006.

LIN, J.Y.; SELIM, M.A.; SHEA, C.R.; GRICHNIK, J.M.; OMAR, M.M.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; PINNELL, S.R. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. **J Am Acad Dermatol.**, v.48, n.6, p.866-874, 2003.

LODÉN, M. J. Do moisturizers work? **Cosmet Dermatol.**, v.2, n.3-4, p.141-9, 2003.

LODÉN, M.; ANDERSSON, A.-C.; ANDERSSON, C.; FRÖDIN, T.; ÖMAN, H.; LINDBERG, M. Instrumental and dermatologist evaluation of the effect of glycerin and urea on dry skin in atopic dermatitis. **Skin Res Technol.**, v.7, p.209-213, 2001.

LODEN, M.; ANDERSSON, A.-C.; LINDBERG, M. Improvement in skin barrier function in patients with atopic dermatitis after treatment with a moisturizing cream (Canoderm®). **Br J Dermatol.**, v.140, p.264-267, 1999.

LONGO, C.; CASARI, A.; BERETTI, F.; CESINARO, A.M.; PELLACANI, G. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. **J Am Acad Dermatol.**, 2011, *in press*.

LOUGH, W.J.; WAINER, I.W. **High performance liquid chromatography** – Fundamentals Principles and Practice. Glasgow: Blackie academic & Professional, 1996.

LUQUE-GARCIA, J.L.; CASTRO, L. Extraction of fat-soluble vitamins. **J Chromatog B.** v.935, p.3-11, 2001.

MAGARI, R.T.; MUNOZ-ANTONI, I.; BAKER, J.; FLAGLER, D.J. Determining shelf life by comparing degradations at elevated temperatures. **J.Clin.Lab.Anal.** v.18, n.3, p.159-164, 2004.

MAHADY, G.B. **Ginkgo biloba**: A review of quality, safety and efficacy. Nutritional in Clinical Care, Washington, v.4, ed.3, p.140, 2001.

MAIA CAMPOS PMBG, SANTORO M I R M. Determining Vitamins A, D3 And e In Creams: High Performance Liquid Chromatography. **Cosmet Toil.**, v.108, n.6, p.71-74, 1993.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; GIANETI, M.D. **Bases Físicas e Químicas dos Cosmecêuticos**. In: Adilson Costa. (editor). Tratado Internacional de Cosmecêuticos. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2012, v. 1, p. 68-75.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Bases dermocosméticas. **Revista de Cosmiatria e Medicina Estética**, v.2, n.3, p.332-335, 1994.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BADRA, M.V.L. Estudo da estabilidade física das bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol Cosmet.**, v.79, p.8-11, 1992.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; DE ANDRADE, J.P.; GASPAR, L.R. Efficacy of cosmetic formulations containing dispersion of liposome with magnesium ascorbyl phosphate, alpha-lipoic acid and kinetin. **Photochem Photobio.**, v. 20, p. 12-18, 2012 A.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; GIANETI, M.D.; KANASHIRO, A.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; GASPAR, L.R. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. **Photochem Photobiol.** v.82, n.3, p.683-688, 2006.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; GONÇALVES, G. M. S. ; GASPAR, L.R. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* efficacy of topical formulations containing vitamin C and its derivatives studied by non-invasive methods. **Skin Res Technol.**, v.14, 376-380, 2008

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; GONÇALVES, G.M.S; GIANETI, M.D; GASPAR, L.R Assessment of *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-ageing effects of cosmetic products containing vitamin C and its derivatives on human skin. **In: IFSCC International Conference, 2005, Florença, 2005.**

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; RICCI, G.; SEMPRINI, M.; LOPES, R. A. Histopathological, morphometric and stereological studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin a and/or glycolic acid. **J Cosme. Sci.**, v. 50, n. M/J, p. 159-170, 1999.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.M.; GIANETI, M.D.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; GASPAR, L.R. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: stability studies and in vivo efficacy. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 1, p. 1-10, 2012 B.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. **J Invest Dermatol.** v.117, n.2, p.256-62, 2001.

MAITRA, I.; MARCOCCI, L.; DROY-LEFAIX, M.T.; PCKER, L. Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. **Biochem Pharmacol.**, v.49, p.1649-1655, 1995.

MAJOR, R.T. The ginkgo, the most ancient living tree. The resistance of *Ginkgo biloba* L. to pest accounts in part for the longevity of this species. **Science**, v.157, p.1270-1273, 1967.

MARCOCCI, L.; MAGUIRE, J.J.; DROY-LEFAIX, M.T.; PACKER, L. The nitric oxid-scangeninh properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. **Biochem Pharmacol.**, v.201, p.748-755, 1994.

MARGHOOB, A. A.; WSINDLE, L.D.; MORICZ, C.Z.; SANCHEZ NEGRON, F.A.; SLUE, B.; HALPERN, A.C.; KOPF, A.W. Instruments and new technologies for the *in vivo* diagnosis of melanoma, **J Am Acad Dermatol.**, v. 49, n. 5, p. 777-797, 2003.

MARKS, R.; HILL, S.; BARTON, S.P. The effects of an abrasive agent on normal skin and on photoaged skin in comparison with topical tretinoin. **Br J Dermatol.**, v123, p.457-466, 1990.

MARTI-MESTRES, G.; FERNANDEZ, C.; PARSOTAM, N. Stability of UV filters in different vehicles: solvents and emulsions. **Drug Devel Ind Pharm.** v.23, n.7, p.647-655, 1997.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A.H.C. **Physical Pharmacy**. Philadelphia, Lea & Febiger, 4ed., p. 153 – 476, 1993.

MCGLONE, F.; VALLBO, A.B.; OLAUSSON, H. Discriminative touch and emotional touch. **Can J Exp Psychol.** v.61, n.3, p. 173-183, 2007.

MILLER, C.C.; HALE, P.; PENTLAND, A.P. Ultraviolet B injury increases prostaglandin syntheses through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation. **J Biol Chem.**, v.269, p.3529-3533, 1994.

NANGIA, A. et al. *In vivo* measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier functions. **Inter J Pharma.**, v.170, n.1, p.31-40, 1998.

NELSON, D.L.; COX, MM. **Lehninger principles of biochemistry**. 3thed. New York: Worth Publishers, 2000.

NEVES, K. Vitaminas e Cosméticos. **Cosmet Toil.**, (edição em português). v.21, n.5, p.20-24, 2009.

NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regul Toxicol Pharm.**, v.33, p.285-299, 2001.

OBA, A. et al. A non-invasive method for measuring invisible subcutaneous UV damage. In: 22th IFSCC Congress, 2002, Edinburgh. Cosmetic Science for a Global Marketplace, **CD-ROM**, 2002.

OCHIAI, Y., KABURAGI, S., OBAYASHI, K., UJIIE, N., HASHIMOTO, S., OKANO, Y., MASAKI, H., ICHIHASHI, M., SAKURAI, H. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. **J Dermatol Sci.** v.44, n.1, p.37-44, 2006.

OREN, A. Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria, **Geomicrobiol J.**, v.14, p. 231–240, 1997.

OYAMADA, C.; KANENIWA, M.; EBITANI, K.; MURATA, M.; ISHIHARA, K. Mycosporine-Like Amino Acids Extracted from Scallop (*Patinopecten yessoensis*) Ovaries: UV Protection and Growth Stimulation Activities on Human Cells. **Mar Biotechnol.**, v.10,p.141–150, 2008.

OZER, O.; MENEMENLIOGLU, D.; ERTAN, G. Photostability of menthyl anthranilate in different formulations. **Cosmet Toil.** v.116, p.67-72, 2001.

OZKUR, M.K.; BOZKURT, M.S.; BALABANLI, B.; ARICIOGLU, A.; ILTER, N., GURER,M.A.; INALUZ, H.S. The effects of EGb761 on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in sunburn. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, v.18, n.3, p.117, 2002.

PARK S. B., SUH D. H.; YOUN J. I. A long-term time course of colorimetric evaluation of ultraviolet light-induced skin reactions. **Clin Exp Dermatol.**, v.24, p.315–320, 2008.

PATHAK, M.A.; FITZPATRICK, T.B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T.B., EILSEN, A.Z.; WOLF, K.; FREEDBERG, I.M.; AUSTEN, K.F. 4th ed. **Dermatology in General Medicine**, 4th ed., New York:McGraw-Hill, 1993, cap.137, p.1689-1716.

PAYE, M.; MAC-MARY, S.; ELKHYAT, A.; TARRIT, C.; MERMET, P.; HUMBERT, P.H. Use of the *Reviscometer*® for measuring cosmetics-induced skin surface effects. **Skin Res Technol.**, v.13, p. 343-349, 2007.

PIÉRARD, G.E. EEMCO guidance for the assessment of skin colour. **JEADV**, v.10,p.1-11, 1998.

PIÉRARD, G.E. EEMCO Guidance to the *in vivo* Assessment of Tensile Functional Properties of the Skin. Part 1: Relevance to the Structures and Ageing of the Skin and Subcutaneous Tissues. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.**, v.12, p.352-362, 1999.

PIÉRARD, G.E. Instrumental non-invasive assessments of cosmetic efficacy. **J Cosm Dermatol.**, v.1, p.57-58, 2002.

PIETSCHMANN, A.; KUKLINSKI, B.; OTTERSTEIN, A. Protection frm uv-light-induced oxidative stress by nutritional radical scavengers. **Z. Gesante In Med.**, v.47, n.11, p.518-522, 1992.

PINCEMAIL, J.; DUPUIS, M.; NASR, C.; HANS, P.; HAAG-BERRURIE, M.; ANTON, R.; DEBY, C. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. **Experientia**, v.45, p.708-712, 1989.

PINNAGODA, J.; TUPKER, R.A.; AGNER, M.; SERUP, J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.22, p.164-178, 1990.

PORCHERON, A.; GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; MORIZOT, F.; DUFOUR, A.; TSCHACLER, E. Impact of cold environment on sensory perception. **J Invest Dermatol.**, v. 131, p. 60-60, 2011.

PORCHERON, A.; MORIZOT, F.; Daily use of skin moisturizer increases tactile perception mediated by A β fibers. In: 25th IFSCC Congress, 2008, Barcelona. Building cosmetics: Research, Technology and Culture, **CD-ROM**, 2008.

PRIMAVERA, G.; BERARDESCA, E. Clinical and instrumental evaluation of a food supplement in improving skin hydration. **Int J Cosmet Sci**, v.27, p.199–204, 2005.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Estabilidade de medicamentos. In: **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. Cap.15, p.2465-2509.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 4^a ed. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, 1992.

PUGLISI, M.P.; TAN, L.T.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindera thalassiae*. **Tetrahedron**, v.60, n.33, p.7035-7039, 2004

PYGALL, S.R.; WHETSTONE, J.; TIMMINS, P.; MELIA, C.D. Pharmaceutical applications of confocal laser scanning microscopy: The physical characterization of pharmaceutical systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.1434–1452, 2007.

QUINALIA, E.B.S. **Estudo da estabilidade de formulações dermocosméticas contendo substâncias antiacneicas/anti-seborréicas, avaliação sensorial e efeitos destas formulações nas condições hidrolipídicas da pele**. 2002. 144f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

RAJADHYAKSHA, M.; GONZALEZ, S.; ZAVISLAN, J.; ANDERSON, R.R.; WEBB, R.H. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison to histology. **J Invest Dermatol.**, v.113, p.293–303, 1999.

RAJADHYAKSHA, M.; GONZALEZ, S.; ZAVISLAN, J.M. Detectability of contrast agents for confocal reflectance imaging of skin and microcirculation. **J Biomed Opt.**, v.9, p.323–331, 2004.

RANGARAJAN, M.; ZATZ, J.L. Skin delivery of vitamin E. **Journal of Cosmetic Science**, v.50, Jul/Aug, p.249-279, 1999.

REILLY, D.M.; FERDINANDO, D.; JONHSTON, C.; SHAW, C.; BUCHANAN, K.D.; GREEN, M.R. The epidermal nerve fiber network: characterization of nerve fibers in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variation. **Br J Dermatol**. v. 137, p.1630-170, 1997.

REUTHER, T.; BAYRHAMMER, J.; KERSCHER, M. Use of biophysical techniques to evaluate the physiologic effects of injected hyaluronic acid. **Hautarzt**, v.58, n.12, p.1046-1050, 2007.

RIEGER, M.M. Skin. In: **Harry's Cosmeticology**, 8^{ed.}, New York: Chemical Publishing Co., cap.1, p.3-38, 2000.

RIMBACH, G.; GOHIL, K.; MATSUGO, S et al. Induction of glutathione synthesis in human keratinocytes by *Ginkgo biloba* extract (EGb761). **Biofactors**, v.15, p.39-52, 2001.

RODRIGUES L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: Indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Rev Port Farm**, v. XLV, n.1, p.16-23, 1995 (A).

RODRIGUES L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: princípios e metodologias. **Ver Port Farm**, v.XLV, n.2, p.48-59, 1995 (B).

RODRIGUES L. EEMCO Guidance to the *in vivo* Assessment of Tensile Functional Properties of the Skin Part 2: Instrumentation and Test Modes. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.**, v.14, p.52-67, 2001.

RUDOLPH, R.; KOWNATZKI, E. Corneometric, sebumetric and TEWL measurements following the cleaning of atopic skin with urea emulsion versus a detergent cleanser. **Contact Dermatitis.**, v.50, p.354-358, 2004.

RUIZ D., REICH M., BUREAU S., RENARD, C.M.G.C.; AUDERGON, J.M.. Application of Reflectance Colorimeter Measurements and Infrared Spectroscopy Methods to Rapid and Nondestructive Evaluation of Carotenoids Content in Apricot (*Prunus armeniaca* L.). **J. Agric. Food Chem.** v.56, p. 4916–4922, 2008.

RUPÉREZ, F.J.; MARTIN, D., HERRERA, E., BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. **Journal of Chromatography A.** v. 935, p.45-69, 2001.

RUVOLO, E.; KOLLIAS, N.; COLE, C. Method of measuring of skin anisotropy. **United States Patent 20060052719**, 03 Set, 2006.

RUVOLO, E.C.JR.; STAMATAS, G.N.; KOLLIAS, N. Skin viscoelasticity displays site- and age-dependent angular anisotropy. **Skin Pharmacol Physiol.**, v.20, n.6, p.313-321, 2007.

SANTORO, M.I.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G., HACKMANN, E.R.M. Determining vitamins A, D3, E in creams: high performance liquid chromatography. **Cosm Toil.**, v. 108, n.6, p.71-74, 1993.

SARKA, M.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms. **J Chromatog B.**, v.830, n.2, p.349-54, 2006.

SCHMID-WENDTNER, M.H.; BURGDORF, W. Ultrasound scanning in dermatology. **Arch Dermatol.**, v.141, p. 217–224, 2005.

SCHMID-WENDTNER, M.H.; DILL-MULLER, D. Ultrasound technology in dermatology. **Semin Cutan Med Surg.**, v.27, p. 44–51, 2008.

SCHOLTYSSSEK, H. DAMERAU, W.; WESSEL, R.; SCHIMKE, I. Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. **Chem Biol Interact.**, v.106, n.3, p.183-190, 1997.

SCOTT, R.P.W. **Liquid Chromatography for the Analyst**. New York: Marcel Dekker, 1994. Chromatographic Science Series.

SCOTTI, L.; VELASCO, M.V.R. Envelhecimento cutâneo á luz da cosmetologia – estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas na prevenção. 2003, 113p. São Paulo, **Tecnopress**.

SEITÉ, S.; BREDOUX, C.; COMPAN, D.; ZUCCHI, H.; LOMBARD, D.; MEDAISKO, C.; FOURTANIER, A. Histological evaluation of a topically applied retinol-vitamin C combination. **Skin.Pharmacol.Physiol.**, v.18, n.2, p.81-87, 2005.

SERUP, J. Efficacy testing of cosmetic products. **Skin Res Technol.**, v.7, p.141-151,2001.

SHAATH, N.A. Evolution of moderns sunscreen Chemicals. In: Lowe NJ, Shaath MA, Pathak M A. **Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects**. New York: Marcel Dekker 1997, p. 589-600.

SHICK J.M.; DUNLAP, W.C.; PEARSE, J.S.; PEARSE, V.B. Mycosporine-like amino acid content in four species of sea anemones in the genus *anthopleura* reflects phylogenetic but not environmental or symbiotic relationships. **Biol Bull.**, v.203, p.315-330,2002.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **J Invest Dermatol.**, v.100, n.3, p.260-265, 1993.

SILVA, G.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skincare formulation. **Intern J Cosm Science.**, v. 22, p. 169-179, 2000.

SINHA, R.P.; KLISCH, M.; GRONINGER, A.; HADER, D.P. Ultraviolet-absorbing I screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. **J Photochem Photobiol B: Biol.**, v.47, p.83-94, 1998.

STEVENS, J.C.; CHOO,K.K. Spatial acuity of the body surface over the life span. **Somatosens Mot Res.** v. 13, p. 153-166, 1999.

STEVENS, J.C.; PATTERSON, M.Q. Dimensions of spatial acuity in the touch sense: changes over the life span. **Somatosens Mot Res.** v. 12, p. 29-47, 1995.

TACKE, J.; HAAGEN, G.; HORNSTEIN, O.P.; HUETTINGER, G.;KIESEWETTER, F.; SCHELL, H.; DIEPGEN, T.L. Clinical relevanceof sonometry-derived tumour thickness in malignant melanoma: A statistical analysis. **Br J Dermatol.**, v.132, p.209–214, 1995.

TREFFEL, P.; GABARD, B. Skin penetration and sun protection factors of ultraviolet filters from two vehicles. **Pharm Res.** v.13, p.770-774, 1996.

- TRULSSON, M. Mechanoreceptive afferents in the human sural nerve. **Experimental Brain Research**. v. 137, p.111-116, 2001.
- TSAI, T.F.; MAIBACH, H.I. Water: a possible skin irritant. **Cosm Toil.**, v.115, n.2, p.35-37, 2000.
- TUPKER, R.A.; WILLIS, C.; BERARDESCA, E.; LEE, C.H.; FARTASCH, M.; AGNER, T.; SERUP, J. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report form the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis.**, v.37, p.53-69, 1997.
- UNHOLZER, A.; KORTING, H.C. High-Frequency Ultrasound in the Evaluation of Pharmacological Effects on the Skin. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.**, v.15, p.71–84, 2002.
- VALFRÉ, H. Fitocosmética. **Cosm Toil.** (edição em português), v.2, p.9-14, 1990.
- VALLBO, A.B.; OLAUSSON, H.; WESSBERG, K.G. Unmyelinated afferents constitute a second system coding tactile stimuli of the human hair skin. **J Neurophysi.** v. 81, p. 2753-2763, 1999.
- VALQUIST, A. What are natural retinoids? **Dermatology.** v.199, n.1-2, p.3-11,1999.
- VERRILLO, R.T. BOLANOWSKI, S.J.; CHECKOSKY, C.M.; GLONEFP, M.C. Effects of hydration on tactile sensations. **Somatosens Mot Res.** v. 15, p. 93-108, 1998.
- VERTUANI, S.; ZIOSI, P.; SOLAROLI, N.; BUZZONI, V.; CARLI, M.; LUCCHI, E.; VALGIMIGLI, L.; BARATTO, G.; MANFREDINI, S. Determination of antioxidant efficacy of cosmetic formulations by non-invasive measurements. **Skin Res Technol.**, v.9, n.3, p.245-253, 2003.
- VEXLER, A.; POLYANSKI, I.; GORODETSKY, R. Evaluation of skin viscoelasticity and anisotropy by measurement of speed of shear propagation with viscoelasticity skin analyzer. **J Invest Dermatol.**, v.13, n.5, p.32-739, 1999.
- WEBB, R.H. Theoretical Basis of confocal microscopy. **Methods Enzymol.**, v.307, p.3–20, 1999.
- WEI, H.; BOWEN, R.; ZHANG, X.; LEBWOHL, M. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. **Carcinogenesis**, v.19, n.8, p.1509-1514, 1998.
- WEI, H.; WEI, L.; FRENKEL, K.; BOWEN, R.; BARNES, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. **Nutr Cancer.**, v.20, n.2, p.1-12, 1993.
- WERKEMA, MCC. Avaliação da qualidade das medidas. 1ed. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1996.
- WHEATER, P.R.; BURKITT, H;G; DANIELS, V.G. **Histologia Funcional** – texto e atlas, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara koogan, 1982, p.49-63.
- WHITEHEAD, K.; HEDGES, J.I. Analysis of mycosporine-like amino acids in plankton by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. **Mari Chem.**,v 80, p. 27– 39, 2002.
- WIDYARINI, S.; SPINKS, N.; HUSBAND, A.J. Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation immune suppression induced UV radiation. **Photochem Photobiol.**, v.74, p.465-470, 2001.

WILSON, T.; ZAGZEBSKI, J.; VARGHESE, T. The ultrasonix 500RP: a commercial ultrasound research interface. **IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.**, v.53, p.1772–1782, 2006.

WOODWARD, K.L. The relationship between skin compliance, age, gender and tactile discriminative thresholds in humans. **Somatosensory and motor research.** v.10, n.1, p.63-67, 1993.

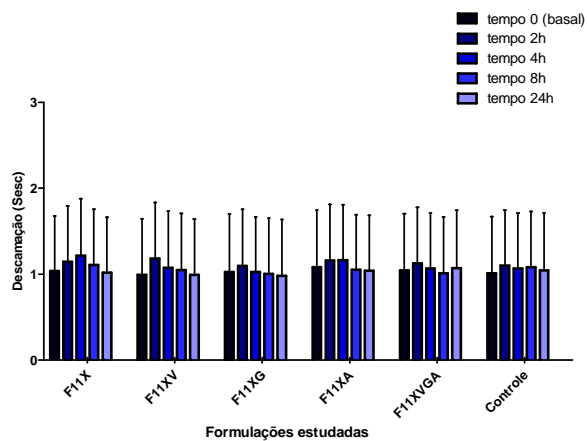
WORTEL, V.A.L.; WIECHERS, J. Skin sensory performance of individual personal care ingredients and market personal care products. **Food Quality Preference.** v.11, p.121-127, 2000.

XIONG, F.S.; KOPECKY, J.; NEDBAL, L. The occurrence of UV-B absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae (Chlorophyta). **Aquat Bot.**, v.63, p.37– 49, 1999.

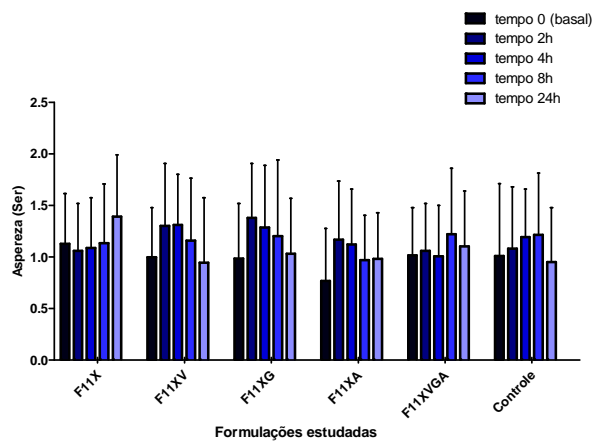
APÊNDICES

APÊNDICE A: Valores complementares da avaliação da eficácia clínica das formulações estudadas obtidos no estudo de eficácia em curto prazo, após uma única aplicação.

A



B



C

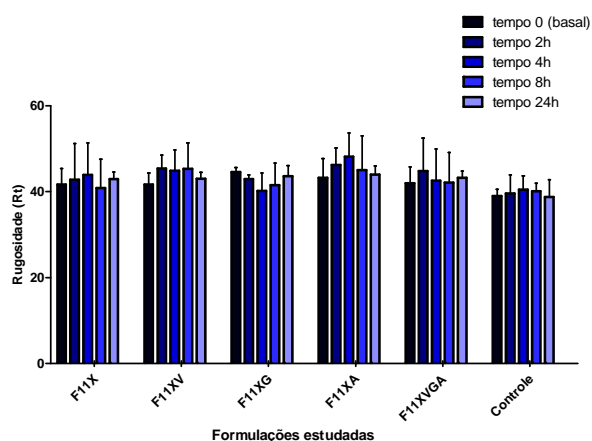


Figura. Valores obtidos no estudo de eficácia em curto prazo das formulações em estudo em relação aos parâmetros: Descamação - Sec (A), aspereza - Ser (B) e rugosidade - Rt (C), avaliados nos antebraços das voluntárias.

APÊNDICE B: Valores complementares da avaliação da eficácia clínica das formulações estudadas em longo prazo.

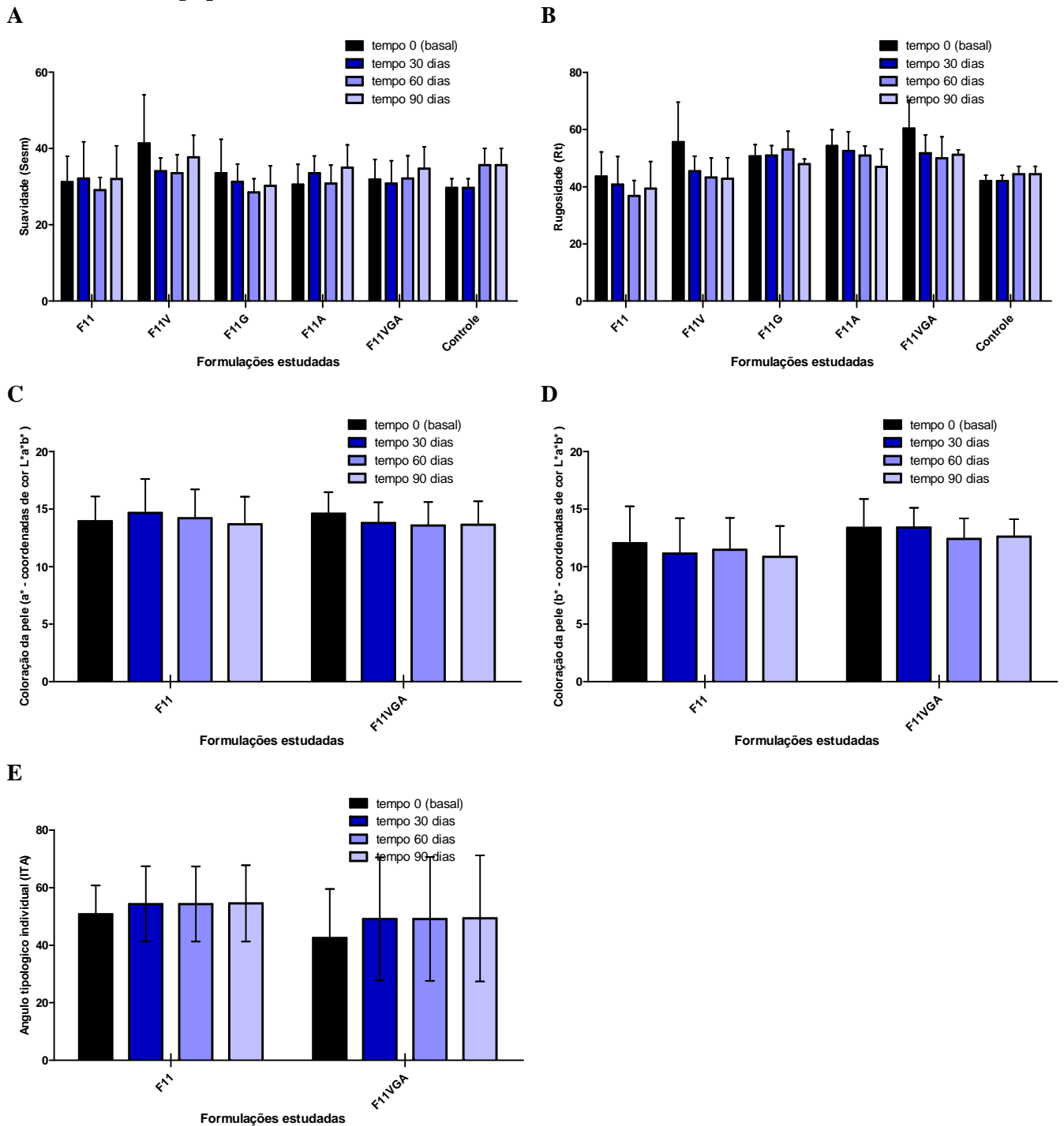


Figura. Valores de: suavidade - Sesm (A), rugosidade – Rt (B), coordenada de cor a* (C), coordenada de cor b* (D) e ângulo tipológico individual (E), antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo nos antebraços das voluntárias.

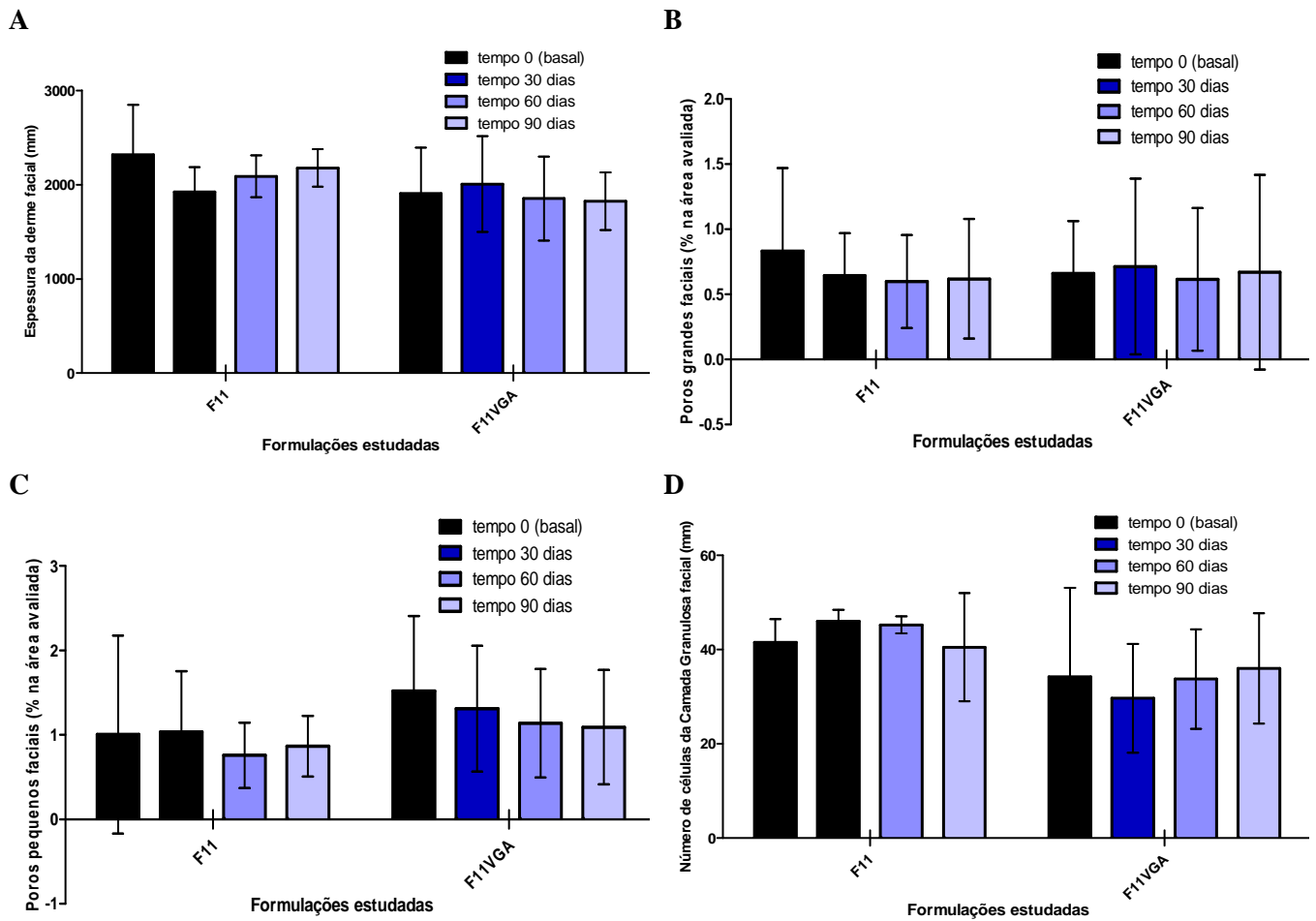


Figura. Valores de: espessura da derme facial (A), porcentagem de poros grandes (B), porcentagem de poros pequenos (C) e número de células da camada granulosa (D), antes (basal) e após 30, 60 e 90 dias de aplicação das formulações objeto de estudo nos antebraços das voluntárias.

ANEXOS**Anexo 1**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Ofício CEP/FCFRP nº. 39/2008
kms

Ribeirão Preto, 22 de dezembro de 2008.

Ilma. Sra.

PROF^a. DR^a. PATRÍCIA M. B. G. MAIA CAMPOS

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Assunto: Aprovação de protocolo de pesquisa.

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP, em sua 68ª Sessão Ordinária, realizada em 17/12/2008, aprovou o projeto de pesquisa intitulado "DESENVOLVIMENTO, ESTABILIDADE E EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA E CLÍNICA DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS CONTENDO VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS E EXTRATOS DE GINKGO BILOBA E ALGAS MARINHAS VERMELHAS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 138.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI TOLOI
Coordenadora do CEP - FCFRP/USP

Anexo 2

Termo de consentimento (frente)

Pesquisadora responsável: Profa Dra Patrícia M. B. G. Maia Campos (CRF: 11922)

Médica responsável: Dra. Maria Rita O. Rocha (CRM: 29452)

Pesquisadora principal: Mirela Donato Gianeti

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Mirela Donato Gianeti, sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e estou desenvolvendo a pesquisa **“Desenvolvimento, estabilidade e eficácia pré-clínica e clínica de formulações fotoprotetoras contendo vitaminas lipossolúveis e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas”**, onde serão avaliados a estabilidade e os efeitos da aplicação de formulações cosméticas contendo uma associação de filtros solares, com FPS 15 (Fator de Proteção Solar 15), acrescida ou não de 1,5% de extrato glicólico de *Ginkgo biloba* ou 5% de extrato algas vermelhas marinhas, os quais serão acrescidos ou não 5% de uma associação de vitaminas lipossolúveis (4,0 % de palmitato de retinila, 4,0 % de acetato de tocoferila e 0,6% de tetraisopalmitato de ascorbila) e ainda uma associação de vitaminas lipossolúveis e extrato de *Ginkgo biloba* (4,0 % de palmitato de retinila, 4,0 % de acetato de tocoferila, 0,6% de tetraisopalmitato de ascorbila e 1,5% de extrato de *Ginkgo biloba* – Radizen A®) na pele de 96 voluntárias, por métodos não invasivos (métodos biofísicos e de análise de imagem).

Para tal, serão realizadas medidas no tempo inicial para a obtenção dos valores basais e após 2 horas (efeitos imediatos) e após 15 e 30 dias de aplicação das formulações, determinando-se o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidermica de água, o micro-relevo cutâneo, as propriedades mecânicas da pele, a espessura da epiderme e da derme e a presença de manchas na pele, utilizando-se equipamentos que avaliam a pele de maneira não invasiva, ou seja, sem causar corte ou dor, pois possuem sondas especiais, que são somente encostadas na pele durante a leitura.

As formulações serão aplicadas na face e na anterior média dos antebraços, sendo que em um dos antebraços não será aplicada nenhuma formulação (controle).

O principal efeito esperado com o uso destas formulações é o aumento da hidratação, melhora da textura e aparência da pele e a proteção contra a radiação solar. Porém, as formulações poderão eventualmente causar vermelhidão e/ou coceira, o que pode ocorrer com o uso de qualquer formulação cosmética, mas para a sua segurança haverá acompanhamento da pesquisa pela pesquisadora e pela médica, responsáveis pela mesma, sendo que, caso você venha a apresentar o menor sinal de alguma reação indesejável, você será imediatamente excluída da pesquisa e serão tomadas todas as providências necessárias para a recuperação do estado normal da sua pele e para que não fiquem seqüelas, estando nós pesquisadores obrigados a arcar com as despesas necessárias para isto.

Se você está de acordo em participar da pesquisa, posso garantir-lhe que as informações fornecidas serão confidenciais e somente serão utilizadas neste trabalho, e se houver interesse de sua parte, os resultados lhes serão fornecidos.

Se tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, poderá entrar em contato comigo por meio dos telefones: (16) 3602-4307 ou (16) 81732535 ou no endereço: Avenida caramuru, nº2730, apto.54, Ribeirão Preto - SP.

Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Anexo 3

Termo de consentimento (verso)

EU: _____,

R.G. nº: _____, abaixo assinado, acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) sobre a pesquisa **“Desenvolvimento, estabilidade e eficácia pré-clínica e clínica de formulações fotoprotetoras contendo vitaminas lipossolúveis e extratos de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas”** e tendo recebido as informações contidas neste termo de consentimento, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar como voluntário da pesquisa citada.

- 1 – A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 2 – A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar do estudo sem que isso me traga alguma penalidade ou prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- 3 – A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
- 4 – O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
- 5 – A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
- 6 – Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.
- 7 – Que se ocorrerem reações adversas na pele (como alergia, irritações e outras), decorrente da aplicação local das formulações, os voluntários deverão interromper imediatamente o uso destas.

Tenho ciência do exposto acima e desejo colaborar com a pesquisa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Anexo 4



Estudo/Ref. Produto: EBI1068 a 1077 e 1089 a 1093/08.1397 a 08.1406 e 08.1413 a 08.1417

**AVALIAÇÃO EM HUMANOS DA COMPATIBILIDADE CUTÂNEA DE QUINZE
PRODUTOS COSMÉTICOS APÓS APLICAÇÃO ÚNICA SOB APOSITOS**

PT ÚNICO

FAC. DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**FORMULAÇÃO 1, FORMULAÇÃO 2, FORMULAÇÃO 3, FORMULAÇÃO 4,
FORMULAÇÃO 5, FORMULAÇÃO 6, FORMULAÇÃO 7, FORMULAÇÃO 8,
FORMULAÇÃO 9, FORMULAÇÃO 10, FORMULAÇÃO 11, FORMULAÇÃO 12,
FORMULAÇÃO 13, FORMULAÇÃO 14 e FORMULAÇÃO 15**

RELATÓRIO DE ESTUDO

São Paulo, 15 de Dezembro de 2008.

Este relatório contém 10 páginas e 5 anexos

LB.P – Instituto de Bioengenharia da Pele EYIC Brasil Ltda.
Av. Indianópolis, 1455 - Planalto Paulista - São Paulo - SP - CEP 04063-002 - Brasil
Tel.: (11) 5581-4949 - Fax: (11) 5071-6731 – E-mail: evicbrasil@evicbrasil.com.br

Estudo/Ref. Produto: EBI1068 a 1077 e 1089 a 1093/08.1397 a 08.1406 e 08.1413 a 08.1417
Revisão 0

1 OBJETIVO E PRINCÍPIO DO ESTUDO

Este estudo teve como objetivo a verificação da compatibilidade cutânea dos produtos **FORMULAÇÃO 1, FORMULAÇÃO 2, FORMULAÇÃO 3, FORMULAÇÃO 4, FORMULAÇÃO 5, FORMULAÇÃO 6, FORMULAÇÃO 7, FORMULAÇÃO 8, FORMULAÇÃO 9, FORMULAÇÃO 10, FORMULAÇÃO 11, FORMULAÇÃO 12, FORMULAÇÃO 13, FORMULAÇÃO 14 e FORMULAÇÃO 15** após aplicação única sobre a pele em condições experimentais maximizadas.

A compatibilidade cutânea foi:

- Verificada visualmente após remoção do apósito pelo Investigador ou pelo Pesquisador Responsável.

A compatibilidade cutânea dos produtos teste, após aplicação nas condições normais de uso, foi verificada por extrapolação dos resultados obtidos sob as condições experimentais adotadas neste Protocolo.

2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2.1 Ética

O estudo teve como objetivo um melhor conhecimento da compatibilidade cutânea dos produtos testados e uma minimização e controle dos riscos previsíveis incorridos pelos voluntários participantes. Há uma adequação entre o objetivo do estudo e os possíveis riscos relacionados às modalidades planejadas no Protocolo.

Este estudo foi realizado em concordância com a Legislação Brasileira, baseada na "Resolução Normativa 196/96, CNS/MS¹⁰".

2.2 Consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Protocolo do Estudo Clínico para avaliar os possíveis riscos incorridos pelos voluntários que participam do estudo.

Após a análise destes documentos o Comitê emitiu seu consentimento para a realização do estudo, de acordo com as condições descritas neste relatório.

2.3 Princípio Metodológico

As condições experimentais causam uma certa oclusão cutânea que favorece o contato dos componentes do produto com a pele. Caso algum componente venha a desenvolver um potencial alérgico, o mesmo poderá ser facilmente comprovado por este método.

O material de apósito, as condições de uso do produto, a área experimental escolhida (região dorsal) e a aleatorização do produto, encontram-se especificados no Item 9.

O sítio de aplicação dos produtos foi determinado aleatoriamente devido à variabilidade da reatividade cutânea de acordo com a área.

Uma outra área experimental (ausência de aplicação do produto em estudo) serve como controle para se evitar um possível efeito intercorrente não diretamente relacionado ao produto estudado.

2.4 Painel

Por se tratar de um primeiro método de avaliação da compatibilidade cutânea e como a aplicação e exames são perfeitamente controlados, o número de voluntários definido no Protocolo de Estudo é suficiente para avaliar a tolerância cutânea e possíveis irritações.

Estudo/Ref. Produto: EBI1068 a 1077 e 1089 a 1093/08.1397 a 08.1406 e 08.1413 a 08.1417
Revisão 0

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados individuais do exame cutâneo e da entrevista dos voluntários encontram-se nos Anexos C e D.

Em resumo:

Tabela 1 – Resumo dos dados dos voluntários apresentados nos Anexos C e D.

Tempo Experimental	Número de Voluntários Reativos	Tipos de Reação	Medida da Irritação Diária Média	Porcentagem de Voluntários Reativos
D3	0	Nenhuma	0	0%
D5	0	Nenhuma	0	0%
Medida Máxima da Irritação Média			0	

Discussão:

Durante o estudo, no qual 23 voluntários participaram da avaliação da compatibilidade cutânea dos produtos após única aplicação, nenhum sinal clínico foi observado e nenhuma sensação de desconforto foi relatada.

11 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e as avaliações descritas no Protocolo do Estudo, os produtos **FORMULAÇÃO 1, FORMULAÇÃO 2, FORMULAÇÃO 3, FORMULAÇÃO 4, FORMULAÇÃO 5, FORMULAÇÃO 6, FORMULAÇÃO 7, FORMULAÇÃO 8, FORMULAÇÃO 9, FORMULAÇÃO 10, FORMULAÇÃO 11, FORMULAÇÃO 12, FORMULAÇÃO 13, FORMULAÇÃO 14 e FORMULAÇÃO 15** foram avaliados sob apósito FINN CHAMBER[®], e apresentaram **compatibilidade cutânea muito boa**.

12 NOTAS

- 1 – Os resultados apresentados neste Relatório de Estudo têm significação restrita e se aplicam somente ao produto fornecido para o ensaio sob total responsabilidade do Patrocinador quanto à veracidade das informações dadas ao Instituto de Pesquisa.
- 2 – Este Relatório de Estudo não dá o direito de uso do nome ou da marca EVIC Brasil para quaisquer fins, sob pena de indenização.
- 3 – A reprodução deste Relatório de Estudo só poderá ser realizada integralmente, sem nenhuma alteração. A reprodução integral ou parcial requer autorização da EVIC Brasil e/ou do Patrocinador.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINISTÉRIO DA SAÚDE/CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, Resolução Nº 196, de 10 de Outubro de 1996 – Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.
2. DRAIZE, J. H. Appraisal of the safety of chemicals in Food, Drugs and Cosmetics, FDA (Ed), USA, 1959, pg 46-48.

Estudo/Ref. Produto: EBI1068 a 1077 e 1089 a 1093/08.1397 a 08.1406 e 08.1413 a 08.1417
Revisão 0

- 3 FROSCHE, P. J. & KLIGMANN A. M. The Duhring Chamber: an improved technique for epicutaneous testing of irritant and allergic reactions, *Contact Dermatitis*, 1979, 5, pg 73-81.
- 4 MATTHIES, W. Test strategies for development of cosmetic products using dermatological test models, *Seifen-Öle-Fette-Wachse*, 1991, 117, pg 42-43.
- 5 MIKULOWSKA, A. Reactive changes in human epidermis following simple occlusion with water, *Contact Dermatitis*, 1992, 26, pg 224-227.
- 6 FITZPATRICK, T. B.; PATHAK, M.; PARRISH, J. A. Protection of human skin against the effects of the sunburn ultraviolet (290-320nm). In *Sunlight and Man, normal and abnormal photobiological responses*, by Fitzpatrick T. B. & al. (editors). University of Tokyo Press, Tokyo, 1994, pg. 751.

14 ASSINATURAS E DATAS

Investigadora:

Eu abaixo assinado, **Dra. Adriana Vilarim Fernandes Epiácio (Médica Dermatologista – CRM 123577)**, declaro que toda a condução do estudo foi feita sob minha responsabilidade e de acordo com os princípios das Boas Práticas Clínicas e a Resolução N° 196, de 10 de outubro de 1996, do Ministério da Saúde/Conselho Nacional de Saúde.

Garantia de Qualidade:

Eu abaixo assinado, **Almir Storck Nunes (CRF 17814)**, declaro que:
- Os resultados do estudo foram relatados conforme os requisitos da Norma NBR ISO/IEC 17025 e monitorados de acordo com os procedimentos do Sistema da Qualidade.

Diretora Científica:

Eu abaixo assinado, **Dra. Idalina M. N. Selgado R. dos Santos (CRF 110636)**, declaro ter designado **Dra. Adriana Vilarim Fernandes Epiácio** como Investigadora e asseguro que ela aprovou o Protocolo de Estudo com total conhecimento dos fatos e os tornou disponíveis para o responsável de Garantia de Qualidade.

Anexo 5



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF. AG. USP Inovação / 0007 / 2013]

São Paulo, 06 de janeiro de 2013.

REF.: DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO "COMPOSIÇÃO DE ATIVOS MULTIFUNCIONAIS, FORMULAÇÃO FOTOPROTETORA MULTIFUNCIONAL, FORMULAÇÃO MULTIFUNCIONAL ANTIENVELHECIMENTO E PROCESSOS DE PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÃO FOTOPROTETORA MULTIFUNCIONAL E DE FORMULAÇÃO MULTIFUNCIONAL ANTIENVELHECIMENTO".

Senhor(a) Professor(a),

Informamos a V.Sa. que em 21.12.12 foi protocolado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - I.N.P.I./S.P. o depósito do pedido de patente de invenção em referência, o qual recebeu o nº. **BR 10 2012 032989-1**, conforme cópia anexa.

Colocamo-nos à inteira disposição para eventuais esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Jussara S. Ferreira
Ch. Sec. Apoio a Inovação

Ilm^o(^a). Sr^o(^a).
Prof^o(^a). Dr^o(^a). PATRICIA MARIA BERARDO G. MAIA CAMPOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA DE RIBEIRÃO PRETO - FCFRP
DEPTO: Ciências Farmacêuticas