UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem

Francine C. Siqueira César Carnevale

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): Francine C. Siqueira César
Carnevale

Orientador(a): Patrícia M. B. G. Maia
Campos

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 10/03/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2017

LOMBADA

CARNEVALE F.C.S.C.	Desenvolvimento de formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRPUSP 2017
-----------------------	---	---	--------------------------------------

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.

Carnevale, Francine Celise Siqueira César

Desenvolvimento de formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem. Ribeirão Preto, 2017

121f.; 30cm.

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

Orientadora: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves

1.cosméticos 2.hidroxitirosol 3.estabilidade 4.reologia 5.textura
6.eficácia clínica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Francine Celise Siqueira César Carnevale

Título do trabalho: Desenvolvimento de formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador(a): Patrícia M. B. G. Maia
Campos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Antônio e Fátima, ao meu amor e companheiro Fausto, ao meu irmão Bruno, à minha cunhada Ariel e à minha afilhada Luiza.

AGRADECIMENTOS

À Deus

À minha querida mãe, Fátima Aparecida da Silva Siqueira César e ao meu querido pai Antônio José Siqueira César por todo amor, carinho, apoio, incentivo e educação que me deram.

Ao meu companheiro Fausto Carnevale Neto, pelo amor, pelo incentivo, pelo apoio e pela compreensão.

À minha sogra Maria Lúcia de Medeiros Carnevale, pelo incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia M. B. G. Maia Campos pela oportunidade de conhecer a pesquisa na área da cosmetologia e por todos os ensinamentos.

À todos os colegas do NEATEC, pelo apoio e pela colaboração.

Às pós-graduandas Wan, Carla, Livia, Raíssa, Marina, Maísa e Júlia, pelo apoio, colaboração, amizade e pelos momentos de risadas e descontração.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pela indicação à Profa. Dra. Patrícia M. B. G. Maia Campos e por todo apoio.

Ao Prof. Dr. Oswaldo de Freitas, pela concessão do Reômetro e às técnicas Maria Paula e a Maíra, pela atenção e pelo suporte para a execução das análises reológicas.

À todas voluntárias que participaram deste estudo e possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, à todos os funcionários da FCFRP.

À CAPES pelo suporte financeiro concedido.

*"O fim de toda a exploração
É chegar onde tudo começou
E compreender o lugar pela primeira vez."*

T. S. Eliot

RESUMO

CARNEVALE, F.C.S.C. **Desenvolvimento de formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem** 2017. 117f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A aplicação de formulações cosméticas possibilita a proteção da pele contra os fatores externos causadores do envelhecimento cutâneo. Atualmente observa-se um aumento na demanda por cosméticos naturais, definidos como produtos que não contêm substâncias de origem sintética, exceto conservantes e algumas substâncias, como os filtros solares. No entanto, existem poucos relatos na literatura de estudos clínicos que demonstrem a eficácia desses produtos, uma vez que, esses compreendem uma mistura complexa de compostos com potencial atividade biológica e, portanto, podem apresentar resultados dependendo da sinergia ou antagonismo entre os ingredientes. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver formulações cosméticas contendo matérias-primas de origem vegetal, bem como avaliar sua estabilidade por determinação da reologia, perfil de textura e a eficácia clínica. Para tal, inicialmente foi realizada pesquisa em banco de dados de patentes para identificar as tendências relacionadas aos produtos cosméticos contendo matérias-primas de origem vegetal. A partir dos resultados obtidos na pesquisa de patentes e na literatura científica, foram escolhidas as matérias-primas para o desenvolvimento das formulações. Foram elaboradas formulações contendo óleo de macadâmia (*Macadamia ternifolia*) - F02, óleo de oliva (*Olea europae*) - F03 ou óleo de girassol (*Helianthus annuus*) - F04, as quais foram submetidas à análise de textura em texturômetro e análise sensorial aplicando o questionário "Check-all-that-apply" em 48 voluntárias. A formulação F04 apresentou o melhor sensorial, corroborando com os resultados obtidos na análise de textura, onde a formulação com óleo de girassol (F04) indicou o melhor perfil de textura. Assim, esta formulação foi acrescida de filtros solares ou extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol (HT) e analisada quanto à textura e estabilidade. A formulação FF07, contendo filtros solares, e a formulação FH1, contendo 0,2% de HT foram consideradas estáveis e portanto selecionadas para estudos de eficácia clínica imediata e em longo prazo, com a formulação F04. Na avaliação dos efeitos imediatos foi feita a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo e de sebo e perda transepidérmica de água (TEWL) em 40 voluntárias. Os efeitos em longo prazo foram avaliados em 30 voluntárias quanto ao conteúdo aquoso do estrato córneo, TEWL, oleosidade, viscoelasticidade e características estruturais e morfológicas da epiderme e derme, após 56 dias de tratamento. Após 2 horas de aplicação das formulações F04, FF07 e FH1 observou-se diminuição da TEWL. Para as formulações F04 e FH1 foi observado apenas aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo. Por fim, os resultados do estudo da eficácia em longo prazo mostraram que as formulações F04 e FH1 aumentaram o conteúdo aquoso do estrato córneo após 56 dias de aplicação. A formulação FH1 aumentou o conteúdo aquoso do estrato córneo após 28 dias de tratamento e melhorou a viscoelasticidade da pele de acordo com o parâmetro R7 (retração imediata/distensão total da pele). Não houve alteração nas características morfológicas e estruturais da pele com o uso das formulações em estudo. Em síntese, as formulações desenvolvidas no presente estudo foram estáveis e com perfil de textura e sensorial adequado às finalidades propostas. Além disso, a formulação que continha óleo de girassol com HT (FH1) mostrou efeito hidratante imediato e melhora na viscoelasticidade cutânea.

Palavras-chave: cosméticos, hidroxitirosol, estabilidade, reologia, textura, eficácia clínica.

ABSTRACT

CARNEVALE, F.C.S.C. **Development of natural-based formulations for skin protection: evaluation of physical mechanical properties and clinical efficacy through image analysis** 2017. 117f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Topical application of cosmetics provides skin protection and prevention against external factors that cause skin aging. Currently, there is an increased demand for natural cosmetics, defined as products without substances obtained by chemical synthesis, excepted preservatives and solar filters. Few clinical trials have shown the efficacy of this complex mixture of compounds with potential biological that could act in synergy or antagonism. In this context, the objective of this study was to develop cosmetic formulations with raw materials from vegetable sources as well as to evaluate its stability by rheology, texture profile and clinical efficacy. First, a patent database research was conducted in order to identify trends related to cosmetics containing raw materials from vegetable sources and based on the results obtained in the patent research and in the scientific literature, the row materials were chosen for the development of formulations. Formulations containing macadamia oil F02 (*Macadamia ternifolia*), olive oil, F03 (*Olea europae*) or sunflower oil, F04 (*Helianthus annus*) were prepared. These formulations were submitted to texture analysis and sensorial analysis by “Check-all-taht-apply” questionnaire in 48 panels. The formulation F04 showed the best sensorial, supporting the results obtained in the texture analysis. Thus, sunscreens or olive extract (*Olea europae*) standardized on hydroxytyrosol were added to formulation F04 and texture and stability studies were conducted. The formulation FF07, containing sunscreens and the formulation FH1, with 0.2% of olive extract (*Olea europae*) standardized on hydroxytyrosol (HT), were considered stables and selected for the immediate and long-term clinical trials with formulation F04. In the evaluation of immediate effects, the parameters stratum corneum water content, transepidermal water loss (TEWL) and oiliness were evaluated in 40 panels. The log-term effects were evaluated in 30 panels concerning stratum corneum water content, transepidermal water loss, oiliness, viscoelasticity, and structural and morphological characteristics of epidermis and dermis after 56 days of treatment. After two hours of application of the formulations F04, FF07 and FH1 was observed a reduction of the TEWL. Finally, the results obtained in long-term study showed that the formulations F04 and FH1 increased the stratum corneum water content after 56 days of treatment. The formulation FH1 performed it, after 28 days of treatment. and have improved the skin viscoelasticity according to the parameter R7 (immediate retraction/total distention of the skin). Structural and morphological characteristics of the skin didn't showed alterations. In summary, formulations developed in this study were stable with texture and sensorial properties suitable for the proposed purposes. In addition, the formulation containing sunflower oil with HT showed immediate moisturizing effect and improvement in the skin viscoelasticity .

Keywords: cosmetics, hydroxytyrosol, stability, rheology, texture, clinical efficacy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das camadas da epiderme.....	05
Figura 2. Representação esquemática simplificada da biossíntese da melanina.....	09
Figura 3. Comportamento de fluidos não newtonianos.....	13
Figura 4. Representação esquemática da análise <i>back extrusion</i>	15
Figura 5. Representação esquemática do gráfico obtido por meio da análise de <i>back extrusion</i>	16
Figura 6. Representação esquemática da análise de espalhabilidade.....	16
Figura 7. Representação esquemática do gráfico obtido por meio da análise de espalhabilidade.....	17
Figura 8. Fluxograma do desenvolvimento das formulações.....	26
Figura 9. Percentual anual do depósito de patentes classificadas como cosméticos contendo ingredientes de origem vegetal.....	40
Figura 10. Distribuição das patentes cosméticas para tratamento da pele, de origem vegetal, de acordo com sua finalidade.....	41
Figura 11. Depósito ao ano de patentes cosméticas para tratamento da pele, de origem vegetal, de acordo com sua finalidade.....	42
Figura 12. Resultados obtidos por meio da análise do trabalho de cisalhamento das formulações após adição de óleos vegetais.....	45
Figura 13. Resultados obtidos por meio da análise da textura das formulações após a adição de óleos vegetais.....	46
Figura 14. Resultados obtidos por meio da análise do trabalho de cisalhamento das formulações após a adição de filtros solares e extrato de oliva padronizado.....	47
Figura 15. Resultados obtidos por meio da análise da textura das formulações após a adição de filtros solares e extrato de oliva padronizado.....	47
Figura 16. Viscosidade aparente da formulação contendo filtros solares em função do tempo e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).....	48
Figura 17. Viscosidade aparente das formulações contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol em função do tempo e da temperatura de armazenamento. (A) Temperatura ambiente, (B) 37° C e (C) 45° C durante 28 dias.....	49
Figura 18. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para a formulação FF07 (contendo filtros solares) armazenadas a temperatura ambiente (A), a 37° C (B) e 45° C (C) durante 28 dias.....	53
Figura 19. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as	54

formulações conteúdo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, armazenadas a temperatura ambiente (A) FH1 (B) FH2 e (C) FH3 durante 28 dias.....

Figura 20. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações conteúdo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, armazenadas a temperatura de 37 °C, (A) FH1 (B) FH2 e (C) FH3 durante 28 dias.....	55
Figura 21. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações conteúdo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, armazenadas a temperatura de 45 °C, (A) FH1 (B) FH2 e (C) FH3 durante 28 dias.....	56
Figura 22 - Distribuição de cada parâmetro avaliado imediatamente após a aplicação das formulações (A) e 10 minutos após a aplicação (B).....	58
Figura 23. Conteúdo aquoso do estrato córneo na região malar (média +- DP) antes e 2 h após aplicação das formulações.....	59
Figura 24. Perda de água transepidermica na região malar antes da aplicação das formulações e 2 horas após.....	60
Figura 25. Comparação entre os tratamentos em relação a perda de água transepidermica na região malar 2 horas após a aplicação das formulações.....	61
Figura 26. Quantidade de sebo na região malar antes da aplicação das formulações e 2 horas após.....	62
Figura 27. Avaliação da quantidade de sebo do estudo de eficácia imediata das formulações. Comparação os tratamento 2 horas após a aplicação das formulações.....	63
Figura 28. Avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	64
Figura 29. Avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, na região dos antebraços, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	65
Figura 30. Avaliação da perda de água transepidermica, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	66
Figura 31. Avaliação da perda de água transepidermica, na região dos antebraços, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	66
Figura 32. Avaliação da quantidade de sebo, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 56 dias de tratamento.....	67
Figura 33. Avaliação da quantidade de luz refletida, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	68
Figura 34. Avaliação da Intensidade da pigmentação, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	68

Figura 35. Representação de imagem em alta resolução obtida para a avaliação de manchas no UV.....	69
Figura 36. Avaliação da relação de ecogenicidade, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	69
Figura 37. Avaliação da relação de ecogenicidade, na região dos antebraços, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.....	70
Figura 38. Representação de uma imagem obtida da região malar (A) antes da aplicação das formulações e (B) após 56 dias por ultrassom de alta frequência.....	70
Figura 39. Ur/Uf (elasticidade biológica da pele) na região malar das voluntárias antes da aplicação das formulações F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e após 56 dias de tratamento.....	71
Figura 40. Ur/Uf (elasticidade biológica da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação F04 (veículo) e após 56 dias de tratamento.....	72
Figura 41. Ur/Uf (elasticidade biológica da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e após 56 dias de tratamento.....	72
Figura 42. R1=R (Deformação residual da pele) na região malar das voluntárias antes da aplicação das formulações F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e após 56 dias de tratamento.....	73
Figura 43. R1=R (Deformação residual da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação F04 (veículo) e após 56 dias de tratamento.....	74
Figura 44. R1=R (Deformação residual da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e após 56 dias de tratamento.....	74
Figura 45. Intensidade do brilho papilar nas regiões perilesional e hiperpigmentada da malar das voluntárias (média +- DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.....	75
Figura 46: Espessura do estrato córneo na região malar das voluntárias (média +- DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.....	76
Figura 47: Espessura da epiderme viável na região malar das voluntárias (média +- DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.....	77
Figura 48: Profundidade das papilas dérmicas na região malar das voluntárias (média +- DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.....	77
Figura 49 - Imagens obtidas pela técnica de microscopia de refletância confocal.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos da subclasse A61Q de acordo com CIP.....	25
Tabela 2 - Subgrupos do grupo A61Q-019/00, de acordo com CIP.....	25
Tabela 3 - Formulações Desenvolvidas sem filtros solares (Veículo).....	27
Tabela 4 - Formulações Desenvolvidas contendo filtros solares.....	28
Tabela 5 - Formulações Desenvolvidas contendo extrato de oliva.....	29
Tabela 6 - Valores de pH obtidos a partir das formulações estudadas.....	44
Tabela 7 - Valores de viscosidade aparente obtidos a partir a formulação FF07.....	48
Tabela 8 - Valores de viscosidade aparente obtidos a partir as formulações FH1, FH2 e FH3.....	50
Tabela 9 - Valores de índice de fluxo obtidos a partir a formulação FF07.....	50
Tabela 10 - Valores de índice de fluxo obtidos a partir das formulações FH1, FH2 e FH3.....	51
Tabela 11 - Valores do índice de consistência obtidos a partir a formulação FF07	51
Tabela 12 - Valores do índice de consistência obtidos a partir das formulações FH1, FH2 e FH3.....	52
Tabela 13 - Análise sensorial das formulações.....	58

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
1.INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 A pele e o envelhecimento cutâneo.....	05
2.1.1 Melanogênese.....	08
2.2 Desenvolvimento de formulações.....	10
2.3 Formulações com antioxidantes.....	10
2.4 Caracterização e avaliação da estabilidade.....	12
2.4.1 Estabilidade física e reologia.....	12
2.4.2 Textura.....	14
2.5 Técnicas de biofísica e análise de imagem na avaliação da eficácia de produtos cosméticos.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Matérias-primas.....	23
4.2 Equipamentos e acessórios.....	23
4.3 Análise no banco de dados de patentes.....	24
4.4 Desenvolvimento das formulações.....	25
4.5 Testes preliminares de estabilidade.....	30
4.5.1 Centrifugação.....	30
4.5.2 Determinação do pH.....	30
4.5.3 Avaliação visual.....	30
4.6 Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico.....	30
4.7 Determinação do perfil de textura das formulações.....	31
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
5.1 Triagem de voluntários.....	33
5.2 Protocolo do estudo de eficácia.....	33
5.2.1 Avaliação dos efeitos imediatos.....	33
5.2.2 Avaliação dos efeitos em longo prazo.....	34
5.3 Avaliação sensorial.....	35
5.4 Técnicas de biofísica e análise de imagem.....	35
5.4.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo.....	35

5.4.2 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL).....	36
5.4.3 Determinação da quantidade de sebo.....	36
5.4.4 Determinação das propriedades visco-elásticas da pele.....	36
5.4.5 Avaliação da coloração da pele - Quantidade de luz refletida (L^*).....	36
5.4.4 Avaliação da pele por análise de imagem de alta resolução.....	37
5.4.6 Avaliação ecogenicidade da derme por ultrassom de alta frequência...	37
5.4.7 Avaliação das características estruturais e morfológicas da epiderme por microscopia confocal de reflectância.....	37
5.5 Análise estatística.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1 Análise de patentes.....	40
6.2 Desenvolvimento de formulações.....	42
6.3 Testes preliminares de estabilidade.....	43
6.3.1 Centrifugação.....	43
6.3.2 Determinação do pH.....	44
6.3.3 Avaliação visual.....	44
6.4 Análise das propriedades físico-mecânicas.....	45
6.5 Estabilidade física por determinação do comportamento reológico.....	48
6.6 Análise sensorial.....	57
6.7 Avaliação dos efeitos imediatos.....	59
6.7.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo.....	59
6.7.2 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL).....	60
6.7.3 Determinação da quantidade de sebo.....	62
6.8 Avaliação dos efeitos em longo prazo.....	63
6.8.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo.....	62
6.8.2 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL).....	65
6.8.3 Quantidade de sebo.....	67
6.8.4 <i>Coloração da pele - Quantidade de luz refletida (L^*)</i>	67
6.8.5 Avaliação da pele por análise de imagem de alta resolução.....	68
6.8.6 Avaliação da ecogenicidade da derme.....	69
6.8.7 Determinação das propriedades mecânicas da pele.....	71
6.8.7.1 <i>Ur/Uf - Elasticidade biológica</i>	71
6.8.7.2 <i>R1=R (Deformação residual da pele)</i>	73
6.8.8 Avaliação das características estruturais e morfológicas da pele por microscopia confocal de reflectância.....	75
6.8.8.1 Pigmentação das papilas dérmicas.....	75
6.8.8.2 Espessura do estrato córneo.....	76
6.8.8.3 Espessura da epiderme viável.....	76
6.8.8.4 Profundidade das papilas dérmicas.....	77

7. DISCUSSÃO.....	79
8. CONCLUSÃO.....	87
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
10. ANEXOS.....	94
Anexo A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética.....	99
Anexo B. Especificações técnicas do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol.....	103

1. INTRODUÇÃO

A exposição da pele à fatores externos, como radiação ultravioleta e tabagismo, bem como à fatores intrínsecos, como mudanças hormonais, podem alterar suas propriedades morfológicas e fisiológicas, resultando em atrofia, ressecamento, flacidez, pigmentação irregular e redução da espessura (KAMMEYER; LUITEN, 2015; MERCÚRIO; MAIA CAMPOS, 2015).

A radiação ultravioleta (UV) aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) que induzem o dano oxidativo à componentes celulares (GIANETI; MERCÚRIO; MAIA CAMPOS, 2013; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICO, 2007) e estimulam a atividade de enzimas de degradação da matriz extracelular, como collagenase, hialuronidase e elastase, podendo causar a diminuição da elasticidade cutânea e favorecendo o envelhecimento (GIANETI; MERCÚRIO; MAIA CAMPOS, 2013; MUKHERJEE et al., 2011; TUNDIS et al., 2015).

Além dos efeitos oxidativos e de degradação, a radiação UV pode estimular a hiperpigmentação, um fenômeno fisiológico regulado pela tirosinase. Esta enzima multifuncional está envolvida na biossíntese de melanina, na catálise da orto-hidroxilação da tirosina a 3,4-dihidroxi-*l*-fenilalanina (DOPA) e na oxidação da DOPA a dopaquinona (TUNDIS et al., 2015).

A aplicação tópica de formulações cosméticas possibilita a proteção da pele e a prevenção contra os fatores externos causadores do envelhecimento cutâneo ao atenuar seus principais sinais, como rugas, perda da elasticidade e pigmentação irregular da pele (MUKHERJEE et al., 2011; TUNDIS et al., 2015).

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na procura por cosméticos elaborados com ingredientes obtidos de fontes naturais como óleos, extratos e ceras vegetais. Tal observação se deve ao reconhecido potencial biológico dos fitocompostos presentes nessas matérias primas, na prevenção e minimização dos sinais do envelhecimento da pele e, também, pela mudança de comportamento dos consumidores que buscam produtos sustentáveis e menos agressivos ao meio ambiente (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

Contudo, a elaboração de formulações cosméticas efetivas e que sejam compatíveis com as características da pele, utilizando matérias-primas obtidas de fontes naturais, ainda é um desafio. Questões sobre a bioatividade, as propriedades sensoriais e a estabilidade física são fundamentais para a aceitação de um

cosmético (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015; WAGEMAKER, et al. 2013).

O extrato de oliva, *Olea europae*, apresenta em sua composição tirosol e hidroxitirosol. Estes compostos fenólicos apresentam grande potencial para a aplicação cosmética devido às suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimelanogênica e de proteção contra a radiação UV, comprovadas por testes *in vitro* e *in vivo* (CHIBA, 2004; RODRIGUES; PIMENTEL; OLIVEIRA, 2015). No entanto, a avaliação da eficácia através de estudos clínicos também se faz necessária para confirmar seu efeito em reais condições de uso (MUKHERJEE et al. 2011; TUNDIS et al., 2015).

Apesar do amplo conhecimento sobre o potencial biológico de extratos vegetais isolados, existem poucos estudos clínicos que avaliem a eficácia de formulações cosméticas contendo esses ingredientes combinados.

Essa avaliação pode ser realizada a partir de técnicas não invasivas como as técnicas de biofísica e análise de imagem da pele, as quais utilizam equipamentos com diferentes princípios físicos (MERCURIO, et al. 2013).

Nesse contexto, o presente trabalho apresenta contribuição relevante para o conhecimento da estabilidade física, textura e eficácia clínica de formulações cosméticas elaboradas à base de ingredientes de origem natural, contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A PELE E O ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

A pele é o maior órgão do corpo humano, cuja principal função é a proteção do organismo contra a radiação ultravioleta e agressões mecânicas, químicas e térmicas, além de impedir a desidratação e proteger o organismo contra a invasão de microrganismos externos (NIKOLAKIS; MAKRANTONAKI; ZAUBOULIS, 2016). É constituída por uma porção de origem ectodérmica, que origina a epiderme, e outra porção mesodérmica, que origina a derme. Abaixo da derme está localizado o tecido subcutâneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A epiderme é formada pelas camadas córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal, conforme observados na Figura 1 (BARONI et al., 2012). O estrato córneo é composto por células anucleadas e achatadas com filamentos de queratina, envoltos por ligações cruzadas com proteínas (filagrinas), ligadas covalentemente a um envelope lipídico e interligadas pelos desmoscorneossomos e *tight junctions* (PROKCH; BRADNER; JENSEN, 2008). Os lipídeos presentes no estrato córneo são sintetizados por corpos lamelares do complexo de Golgi dos queratinócitos, que protegem a pele contra a desidratação e impedem a entrada de substâncias hidrossolúveis. Seus principais constituintes são as ceramidas, os ácidos graxos livres e o colesterol (CHOI, 2016).

Figura 1: Representação esquemática das camadas da epiderme.

Fonte: Adaptado de BARONI et al., 2012

Os ácidos graxos livres, saturados ou monoinsaturados, apresentam cadeias com comprimento variando entre 12 e 24 carbonos e alguns deles são sintetizados na epiderme, enquanto outros são obtidos por meio da alimentação (BARONI *et al.*, 2012; CORRÊA, 2012). A carência dos ácidos graxos essenciais pode levar ao surgimento de eritema, descamação e aspereza da pele além de causar distúrbios na permeabilidade da função de barreira (CORRÊA, 2012; PROKSH; BRADNER; JENSEN, 2008). A principal função do colesterol na barreira epidérmica é proporcionar fluidez e flexibilidade ao estrato córneo sem o qual se tornaria uma estrutura rígida e frágil (BARONI *et al.*, 2012).

A camada granulosa, situada entre o estrato córneo e o espinhoso, tem células com formato poligonal achatado, com núcleo central e a presença de grânulos de querato-hialina em seu citoplasma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O estrato espinhoso ou camada espinhosa é formado por células com núcleo central e citoplasma contendo filamentos de queratina. Também apresenta células-tronco, mas com atividade mitótica reduzida em relação à camada basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Por fim, a camada basal é constituída por células cúbicas com intensa atividade mitótica. Esta camada e o estrato espinhoso são responsáveis pelo processo contínuo de renovação celular que ocorre, em média, a cada 28 dias (BARONI *et al.*, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Além dos queratinócitos, também estão presentes na epiderme, as células de *Langerhans*, que desempenham um papel de defesa imunológica da pele, as células de Merkel, localizadas na camada basal junto aos queratinócitos, que interagem com as fibras nervosas aferentes e estão relacionadas à sensibilidade cutânea, além dos melanócitos, responsáveis pela síntese da melanina, descritos em mais detalhes no item seguinte (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A derme é o tecido conjuntivo que separa a epiderme do tecido subcutâneo e apresenta uma superfície externa irregular, com saliências denominadas papilas dérmicas e cuja função é reforçar o contato entre a epiderme e a derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A derme também é subdividida nas camadas: derme papilar, fina e constituída por tecido conjuntivo frouxo e, derme reticular, espessa e constituída por tecido conjuntivo denso. Ambas apresentam fibras de

colágeno e elastina, que proporcionam elasticidade à pele, e vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Com o envelhecimento cutâneo, a pele diminui sua capacidade de renovação celular e os mecanismos de reparo e proteção ficam comprometidos (NIKOLAKIS; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS; 2016). Surgem, então, sinais clínicos do envelhecimento cutâneo como sulcos, flacidez, ressecamento, telangiectasia, hiperpigmentação e lesões benignas (POON; KANG; CHIEN, 2015). Em termos microscópicos, são observadas alterações na espessura da epiderme, padrão irregular no formato dos queratinócitos, aumento do acúmulo de melanina na camada basal, achatamento da junção dermoepidérmica e desorganização, encurtamento e perda dos feixes de fibras de colágeno (LONGO et al., 2011; POON; KANG; CHIEN, 2015).

O envelhecimento cutâneo está relacionadas à fatores intrínsecos (genéticos, metabólicos e hormonais) e à fatores extrínsecos, como exposição à radiação UV, tabagismo e exposição à poluição por exemplo (TUNDIS; *et al.*, 2015). A exposição à radiação UV é o principal fator associado ao envelhecimento extrínseco, e é denominado de fotoenvelhecimento. A radiação UV induz o aumento de EROs que promovem um dano oxidativo aos componentes celulares (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICO, 2007), além de estimular a atividade de enzimas de degradação da matriz extracelular, como collagenase, hialuronidase e elastase, e da enzima tirosinase, envolvida na produção de melanina, podendo levar à hiperpigmentação da pele (BERNEBURG; PLETTENBERG; KRUTMANN, 2000).

A radiação UV é classificada de acordo com sua capacidade de absorção da energia em comprimentos de ondas específicos. Os comprimentos de onda capazes de causar danos à pele, em situações cotidianas, são a radiação ultravioleta A (UVA) e a radiação ultravioleta B (UVB). A radiação UVA absorve comprimentos de onda entre 320 e 400 nm e tem a capacidade de penetrar mais profundamente na pele, até a derme, interagindo com os queratinócitos e fibroblastos. A radiação UVA induz, portanto, a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs) que, por sua vez, aumentam a expressão das metaloproteinases de matriz (MPMs) e induzem mutações no DNA por mecanismos que ainda não foram completamente elucidados (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007; GIANETE; MERCÚRIO; MAIA CAMPOS, 2013; TUNDIS, et al., 2015). Já a radiação UVB absorve no comprimento de onda

entre 290 e 320 nm (POON; KANG; CHIEN, 2015) e é absorvida apenas pela epiderme. É a principal responsável pelo eritema, inflamação, queda na imunidade e danos diretos ao DNA, por meio da interação com citocinas e formação de dímeros de ciclobutano, sendo completamente carcinogênico após exposição prolongada (POON; KANG; CHIEN, 2015).

2.1.1 Melanogênese

A melanina, pigmento produzido pelos melanócitos, tem papel na proteção das células contra a radiação UV e contribui na manutenção da homeostase oxidativa da pele (D'ISCHIA *et al.*, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os melanócitos são células dendríticas localizadas na camada basal da epiderme e apresentam vesículas em seu interior denominadas melanossomos (GILLBRO; OLSSON, 2011; WICKETT; VISSCHER, 2006). Dentro dos melanossomos ocorre a produção e o depósito de grânulos de melanina, que sofrem um processo de maturação dentro dessas vesículas até serem transferidos para a porção dendrítica do melanócito. Posteriormente, a melanina é depositada nos queratinócitos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RAPOSO; MARKS, 2007). Cada melanócito é capaz de interagir com 36 queratinócitos nesse processo de transferência de melanina (KAI-DI *et al.*, 2016; OHBAYASHI; FUKUDA, 2012).

Os mecanismos biológicos envolvidos na produção da melanina ainda não foram completamente elucidados, dada sua complexidade. Resumidamente, este processo está relacionado à atividade catalítica da enzima tirosinase, localizada na membrana dos melanossomos e que pode ser ativada, dentre outros fatores, por EROs e pela radiação UV (GILLBRO; OLSSON, 2011; HANDOG; DATUIN; SINGZON, 2016). A tirosinase cataliza a hidroxilação da L-tirosina à 3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), seguida pela sua oxidação à dopaquinona, a partir da qual, ocorre a formação de eumelanina, pigmento preto à marrom, ou feomelanina, vermelho à amarelo. Tal diferenciação depende da disponibilidade de tirosina, cisteína e glutatona nos melanossomos, conforme ilustrado na Figura 2 (D'ISCHIA *et al.*, 2015; SOLANO *et al.*, 2006). Logo, qualquer alteração no processo de melanogênese pode promover um processo de hiperpigmentação ou hipopigmentação da pele e, no caso do envelhecimento cutâneo, as desordens de

pigmentação mais frequentes são o lentigo solar e as hipomelanoses (RABE et al., 2006).

Figura 2: Representação esquemática simplificada da biossíntese da melanina

2.2 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES

O desenvolvimento de formulações cosméticas envolve a escolha criteriosa das matérias-primas a fim de alcançar produtos estáveis e com sensorial aceitável.

A escolha das matérias primas é pautada pela pesquisa bibliográfica que disponibiliza informações sobre as características físico-químicas e microbiologias acerca dos ingredientes bem como suas concentrações de uso e incompatibilidades.

É importante ressaltar que o conhecimento sobre as tendências de mercado contribuem para o desenvolvimento de produtos que atendam às necessidades dos consumidores devendo ser levado em conta nas etapas iniciais de desenvolvimento (CORRÊA, 2012).

Nesse contexto, a pesquisa em banco de dados de patentes possibilita a obtenção de informações sobre tendências tecnológicas e também evita a duplicação em pesquisas de inovação. Estimativas indicam que 70% das

informações contidas em patentes não estão disponíveis em livros, artigos científicos ou outros meios de comunicação (PEREIRA; DA SILVA; PORTO, 2015). Assim, torna-se uma fonte de pesquisa complementar para o desenvolvimento de produtos cosméticos inovadores.

2.3 FORMULAÇÕES COM ANTIOXIDANTES

O uso de antioxidantes em formulações de uso tópico atuam reduzindo o dano causado pelos radicais livres em nível molecular e celular. Entre eles, destacam-se o ácido alfa-lipóico, ácido ascórbico, niacinamida, alfa-tocoferol e ubiquinona, entre outros (RAMOS-E-SILVA et. al., 2013). Os antioxidantes também vêm sendo associados a preparações para o tratamento das hiperpigmentações cutâneas, uma vez que o estresse oxidativo gerado pela radiação UV contribui na ativação da melanogênese. Desta forma, tais substâncias atuam diretamente reduzindo a foto-oxidação da melanina pré-existente (GILLBRO; OLSSON, 2011). Neste contexto, vários estudos têm demonstrado o potencial uso de produtos naturais para a prevenção aos sinais do envelhecimento cutâneo devido à comprovada atividade antioxidante de compostos como flavonóides, antocianidinas e compostos fenólicos (GIANETI; MERCÚRIO; MAIA CAMPOS, 2013; SAEWAN; JIMTAISONG, 2015; TUNDIS et al., 2015).

A oliveira, *Olea europaea*, árvore da família oleácea, é nativa da região oriental do mar mediterrâneo e suas folhas e frutos são ricos em compostos fenólicos como a oleopeina, o tirosol e o hidroxitirosol.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o potencial dos compostos fenólicos presentes no óleo de oliva na redução do desenvolvimento de doenças crônicas, como aterosclerose, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (CICERALE et al., 2009; TASIOULA-MARGARI; TSABOLATIDOU, 2015). Em relação ao seu potencial para a aplicação cosmética, estudos de Owen et al. (2000), demonstraram que o hidroxitirosol foi capaz de inibir a peroxidação lipídica *in vitro*. Seu potencial antioxidante também foi observado por McDonald et al. (2001) e O'Dowd et al. (2004). Sarsour et al. (2011) demonstraram a capacidade do hidroxitirosol em aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase e diminuir o envelhecimento mitocondrial devido ao acúmulo de EROs .

A atividade anti-inflamatória *in vitro* do óleo de oliva foi observada por Puerta et al.(2000), que atribuiu esta atividade aos componentes fenólicos presentes no óleo de oliva. Outros estudos também observaram o mesmo efeito para o composto e sugeriram seu uso para desordens dermatológicas (ABURJAI; NATSHEN, 2003; BAUMANN; WEISBERG, 2010; MARTÍNEZ-DOMINGUEZ et al., 2001). Estudos mais recentes sugeriram que o tirosol e o hidroxitirosol tem um papel importante na proteção das células contra a radiação UVB e morte apoptótica e, portanto, seu uso tem sido encorajado em preparações tópicas para prevenir danos causados pela radiação solar (SALUCCI et al., 2014; SMERIGLIO; GIOVINAZZO; TROMBETA, 2015). Além disso, o hidroxitirosol tem a capacidade de aumentar o nível de glutathione dentro das células, o que leva à produção de feomelanina e à um efeito clareador da pele, devido à redução da produção de eumelanina (CHIBA, 2004). Diante destes estudos, verifica-se o potencial do hidroxitirosol para a prevenção do fotoenvelhecimento em produtos cosméticos. No entanto, torna-se necessário a avaliação de sua eficácia clínica para comprovação destes efeitos *in vivo*, após incorporação em uma formulação cosmética.

2.4 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

2.4.1 Estabilidade física e reologia

A avaliação da estabilidade de cosméticos tem como finalidade orientar o seu desenvolvimento por meio da exposição dos produtos à condições que acelerem seu processo de degradação (ANVISA, 2004). Um dos métodos para acelerar possíveis instabilidades de um produto é submetê-lo ao estresse térmico por meio de seu armazenamento em temperaturas extremas e analisar alterações como cor, odor, uniformidade, pH e viscosidade (ANVISA, 2004).

Além disso, a concentração de ingredientes ativos incorporadas às formulações cosméticas pode influenciar na viscosidade de um produto e a análise destas alterações físicas também pode ser mensurada por meio da avaliação de seu comportamento reológico (GARBOSSA; MAIA CAMPOS, 2016). O comportamento reológico é definido como o estudo do comportamento de fluxo e

deformação da matéria (MARRIOTT, 2008). À partir da relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento, os fluidos podem ser classificados em newtonianos e não newtonianos (MARRIOTT, 2008). Fluidos newtonianos apresentam deformação diretamente proporcional à tensão de cisalhamento aplicada, sem alterações em sua viscosidade; enquanto fluidos não newtonianos, não apresentam relação constante entre tensão e taxa de cisalhamento e apresentam viscosidade dependente da tensão de cisalhamento (MAIA CAMPOS, et. al., 2012; MARRIOTT, 2008).

Os fluidos não newtonianos são classificados de acordo com seu fluxo em plástico, pseudoplástico e dilatante e, de acordo com o tempo, em reopéticos e tixotrópicos (MARRIOTT, 2008). Materiais plásticos são aqueles que necessitam de uma tensão inicial para começarem a fluir e apresentam curva de fluxo com início em um ponto diferente da origem, denominado valor de cedência (MARRIOTT, 2008), representado na Figura 3A. Já os materiais pseudoplásticos não necessitam de uma tensão inicial para fluírem e apresentam a curva de fluxo passando pela origem e, portanto, não há ponto de cedência, conforme representado na figura 3B. Tanto materiais plásticos como pseudoplásticos demonstram queda na viscosidade quando a eles é aplicada uma tensão (MAIA CAMPOS et. al., 2012; MARRIOTT, 2008). Os materiais dilatantes apresentam curva de fluxo oposta à curva dos pseudoplásticos e ganho de viscosidade em função da tensão (MARRIOTT, 2008), conforme representado na figura 3C.

Figura 3: Comportamento de fluidos não newtonianos.

A- Reograma de fluido plástico, B - Reograma de fluido pseudoplástico e C - Reograma de fluido dilatante. Fonte: Adaptado de MARRIOTT, 2008

Materiais tixotrópicos e reopéticos apresentam a capacidade de alterar sua viscosidade em função do tempo de cisalhamento sendo que os materiais tixotrópicos demonstram diminuição de viscosidade, enquanto os reopéticos ganham viscosidade com o tempo de cisalhamento (MARRIOTT, 2008; SHIROMA, 2012).

A descrição do comportamento reológico é feita por meio de modelos matemáticos que relacionam as alterações nas tensões de cisalhamento de um material em função das taxas de cisalhamento a ele aplicada. O modelo mais comum para este tipo de fluido é o de Ostwald de Walle ou *Power Law*, representado pela **Equação 1**:

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq. 1})$$

onde K é o índice de consistência, relacionado ao grau de resistência do fluido ao escoamento; n é o índice de fluxo, que representa a curvatura gerada entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento e indica se um fluido é newtoniano ou não newtoniano; τ é a tensão de cisalhamento e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (SHIROMA, 2012).

2.4.2 Textura

De acordo com Bourne (2002) a textura é definida como a resposta tátil a um estímulo físico gerado por meio do contato entre a pele e um determinado produto. Segundo o autor, o tato é a sensação primária, mas além dele, a sensação de movimento, o aspecto visual e até mesmo o som são considerados na avaliação da textura (TAI; BIANCHINI; JACHOWICZ, 2014).

As análises de textura são aplicadas para a avaliação de produtos farmacêuticos e cosméticos (GILBERT; SAVARY; PICARD, 2013) e permitem avaliar parâmetros como consistência, firmeza, espalhabilidade, entre outros, relacionados ao sensorial. O sensorial de uma formulação cosmética é um parâmetro que deve ser levado em consideração durante a fase de desenvolvimento de um produto, a fim de se obter um produto que atenda às necessidades dos consumidores. Sabe-se que a sensação que um cosmético provoca quando em contato com a pele é um fator que influencia na continuidade de uso do produto pelo consumidor (PARENTE; GAMBARO; ARES, 2008; PENSÉ-LHÉRITIER, 2015).

Neste sentido, a análise *back extrusion* consiste na aplicação de uma força determinada sobre o produto, de forma que este escorra entre os espaços do pistão e da célula de extrusão, conforme ilustrado na Figura 4. A força máxima de compressão da amostra indica o grau de firmeza do produto e a área sob a curva dessa compressão expressa seu índice de consistência. Quando o pistão faz o movimento inverso, a força que ele executa para romper a força de coesão entre a amostra e o fundo da célula de extrusão indica a coesividade do produto e a área sob essa curva o índice de viscosidade, ilustrado na Figura 5 (TAI; BIANCHINI; JACHOWICZ, 2014).

Figura 4: Representação esquemática da análise *back extrusion*

Fonte: Adaptação de BOURNE, 2002

Figura 5: Representação esquemática do gráfico obtido por meio da análise de *back extrusion*

A análise de espalhabilidade segue o mesmo princípio da análise por *back extrusion*, com a diferença de que o formato da extremidade do pistão, ao invés de ser um disco plano, é cônico com ângulo de 45° . Ainda, a célula de extrusão tem o mesmo formato, afim de permitir o perfeito encaixe do pistão cônico, conforme

ilustrado na Figura 6. Desta forma, os valores de espalhabilidade são calculados por meio do trabalho de cisalhamento durante a deformação do material, Figura 7, sendo que o trabalho de cisalhamento é inversamente proporcional à sua espalhabilidade (BOURNE, 2002).

Figura 6: Representação esquemática da análise de espalhabilidade

Figura 7: Representação esquemática do gráfico obtido por meio da análise de espalhabilidade

2.5 TÉCNICAS DE BIOFÍSICA E ANÁLISE DE IMAGEM NA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE PRODUTOS COSMÉTICOS

As técnicas de biofísica e análise de imagem da pele são consideradas um avanço na área dermatológica. Tais técnicas possibilitam avaliar as características biológicas, mecânicas e funcionais da pele de forma não invasiva e em tempo real, baseado em fundamentos físico-químicos da pele. Tais equipamentos medem diferentes parâmetros que indicam o estado da epiderme e da derme (ELSNER *et al.*, 2011; GIANETI; MERCURIO; MAIA CAMPOS; 2013; GONÇALVES; MAIA CAMPOS, 2009). Por meio desta técnica, é possível avaliar o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidérmica de água, o padrão de pigmentação, a quantidade de sebo e as propriedades mecânicas da pele, utilizando os equipamentos Corneometer[®], Tewameter[®], SkinColorimeter[®], Sebumeter[®] e Cutometer[®], respectivamente (GONÇALVES; MAIA CAMPOS, 2009).

O Corneometer[®] (Courage Kashaka, Alemanha) utiliza o princípio da capacitância, o qual baseia-se na diferença entre a constante dielétrica da água e de outras substâncias. O capacitor acusa os valores de medida, em unidades arbitrárias, de acordo com o conteúdo de umidade da pele. Este método apresenta como vantagem não sofrer interferência de sais ou produtos químicos (COURAGE; KHAZAKA, 2009).

O Tewameter[®] (Courage Kashaka, Alemanha) avalia a perda de água transepidérmica que ocorre por evaporação. A sonda do equipamento tem duas extremidades, uma delas entra em contato com a pele enquanto a outra fica em contato com o meio ambiente. A taxa de evaporação é medida pela diferença de pressão de vapor entre as extremidades da sonda e reflete a integridade da barreira cutânea, de forma que quanto maior o valor medido, pior a integridade da barreira (COURAGE; KHAZAKA, 2009).

A coloração da pele pode ser mensurada pelo princípio da espectroscopia de refletância difusa utilizado no equipamento Skin-Colorimeter[®] (Courage Kashaka, Alemanha). É composto por uma sonda que emite um feixe de luz de LED que é refletido pela pele e expresso em valores tridimensionais XYZ, calculados em valores $L^*a^*b^*$. Segundo a Comissão Internacional d'Eclairge, L corresponde à quantidade total de luz refletida ou brilho da pele, descrito como claro e escuro.

Valores próximos a 0 indicam escuro e próximos a 100, claro. O parâmetro a^* representa ranques de cores que vão do vermelho ao verde, e b^* , cores que variam do azul ao amarelo (BRENNER et al., 2002). Além desta metodologia, o padrão de pigmentação da pele pode ser avaliado pelo Visioface[®], que produz imagens em alta resolução da face. O software Quick Visioface, fornece uma imagem que representa uma visão geral da distribuição de melanina na pele por meio do aumento do contraste de cor produzido pelo software que filtra as tonalidades de cinza (PIERARD; PIERARD-FRANCHIMONT; QUATRESOOZ, 2012).

O equipamento Sebumeter[®] (Courage Kashaka, Alemanha) é amplamente utilizado para medir a quantidade de sebo na pele. É baseado na alteração de cor de uma fita plástica opaca após contato com a pele, que torna-se transparente de acordo com a quantidade de lipídeos na superfície cutânea. As leituras da quantidade de sebo são feitas por técnicas fotométricas (CROWTHER, 2015).

As propriedades mecânicas da pele podem ser avaliadas pelo equipamento Cutometer[®] SEM 57 (Courage Kashaka, Alemanha). A pele apresenta características visco-elásticas que são afetadas pelo envelhecimento. Uma pele jovem apresenta uma retração retardada ao seu estado original após sofrer uma distensão e, com o passar dos anos, essa retração torna cada vez mais atrasada (DOBREV, 2000; GERHARDT et al., 2009; OSHIMA et al., 2012). Assim, a sonda do Cutometer efetua a sucção da pele por um orifício e avalia sua deformação plástica e elástica. Os valores são fornecidos na forma de gráficos da distensão e retração da pele que relacionam parâmetros associados à elasticidade cutânea (OSHIMA et al., 2012).

As técnicas de análise de imagem para a avaliação da pele, como a microscopia confocal de reflectância a laser (Vivascope 1500[®], Lucid) e o ultrassom de 20 MHz (DermaScan[®] C, Cortex, Hadsund, Dinamarca) complementam as técnicas de biofísica (JASAITIENE, et al. 2011). A ultrassonografia (20MHz) é considerada uma técnica rápida e não invasiva para ser aplicada na avaliação da ecogenicidade da derme (CAETANO et al., 2015). O DermaScan[®] C é um ultrassom de alta frequência utilizado na área cosmética para avaliação das características da pele. Sua onda emitida é refletida pelas estruturas da pele resultando em ecos de amplitudes diferentes. O software do equipamento traduz as amplitudes desses ecos em cores diferentes: branco>vermelho>amarelo>verde>azul>preto, sendo as maiores amplitudes relacionadas a interação entre pele e água, pele e tecido

adiposo e tecido adiposo e musculatura. Assim, a ecogenicidade é calculada pela relação entre os pixels de baixa ecogenicidade e o número de pixels totais. Menores valores de ecogenicidade indicam que existe uma maior quantidade de componentes na derme e portanto uma derme com características mais jovens (ULRICH et. al, 2014; UNHOLZER; KORTING, 2002).

Por fim, a microscopia confocal de refletância (MCR) é um instrumento que possibilita a identificação de células e tecidos com resolução próxima à histológica, de forma segura, não invasiva e podendo ser utilizado em regiões sensíveis sem causar desconforto ao paciente (LONGO et al. 2011; 2012). Uma das aplicações da microscopia confocal é na determinação das estruturas celulares da epiderme após a aplicação de cosméticos (KANG; BAHADORAN; ORTONNE, 2010) e também na quantificação da pigmentação epidérmica (LAGARRIGUE et al., 2012). O princípio básico da metodologia consiste na emissão de um feixe de luz infravermelho sobre a pele e a captação seletiva dessa luz, que é refletida por estruturas cutâneas que apresentam diferentes índices de refração, resultando em imagens em preto e branco. A queratina, melanina e fibras de colágeno da derme são estruturas hiper-refrativas e são visualizadas em coloração mais clara (BIELFELDT; BÖHLING; WILHERLM, 2011; KANG; BAHADORAN; ORTONNE, 2010; MAJDZADEH et al., 2015).

3. *OBJETIVOS*

3.1 Objetivo geral

Desenvolver formulações cosméticas contendo matérias-primas de origem vegetal, bem como avaliar sua estabilidade por comportamento reológico, perfil de textura e a eficácia clínica.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar tendências relacionadas aos cosméticos elaborados com ingredientes de origem vegetal.
- Desenvolver formulações cosméticas contendo óleos de macadâmia, oliva ou girassol.
- Desenvolver formulações cosméticas contendo 0,2%, 0,5% e 1,0% de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol.
- Avaliar a estabilidade acelerada das formulações por centrifugação, avaliação do pH e das características organolépticas.
- Avaliar a estabilidade das formulações por meio da determinação do comportamento reológico e definir a mais estável.
- Determinar o perfil de textura das formulações.
- Realizar análise sensorial das formulações.
- Avaliar a eficácia clínica imediata das formulações.
- Avaliar a eficácia clínica das formulações em longo prazo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias primas utilizadas neste estudo estão descritas de acordo com o *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI), nome comercial e fornecedor:

- Glycerin, *Glicerina vegetal* / Mapric
- *Helianthus annuus* seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, *Euphorbia cerifera* Wax, Sodium Hydroxide, *Emulfeel SGP®* / Chemyunion
- *Sclerotium gum*, *Amigel®* / Galena
- *Macadamia ternifolia* oil seed, óleo de macadâmia / Mapric
- *Olea europaea* fruit oil, óleo de oliva / Mapric
- *Helianthus annuus* seed oil, óleo de girassol / Mapric
- Butylated hydroxytoluene, *BHT* / Mapric
- Metildibromoglutaronitrila, Phenoxiethanol, *Cosmoguard®* / Galena
- Propylene Glycol, *Propilenoglicol* / Mapric
- Bis - Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine, *Tinosorb S®* Basf
- Ethylhexyl Metoxycinnamate, *Metoxicinamato de octila* / Mapric
- Titanium Dioxide, *dióxido de titânio ultrafino*, *Kemira M111®* / Kemira
- Disodium EDTA, *ácido etilenodiaminotetracético* / Mapric
- *Olea europaea* fruit extract, Glycerin, Water, *Hydroliv®* / Galena

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Agitador mecânico, Heidolph, RZR 2021;
- Balança eletrônica Marte, modelo AS 2000C;
- Balança analítica Ohaus, modelo AS 200;
- Centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440W;
- Chapa de aquecimento;
- Embalagens plásticas PVC opacas, com capacidade para 15 gramas;
- Peagâmetro Digimed® DM20;
- Vidrarias em geral;
- Texturômetro TAXT Plus (Extralab Brasil, Jarinu, Brasil);
- Rêometro Discovery Hybrid Rheometer I (TA Instruments, New Castle, USA)

- Corneometer[®] CM825 (Courage-Khazaka, Alemanha);
- Cutometer[®] SEM 575 (Courage Kashaka, Alemanha);
- Tewameter[®] TM 210(Courage Kashaka, Alemanha);
- Sebumeter SM 810(Courage Kashaka, Alemanha);
- Skin-Colorimeter[®] CL 400 (Courage-Khazaka, Alemanha);
- Visioface[®] (Courage-Khazaka, Alemanha);
- Termômetro;
- Vivascope[®] 1500 (Lucid, Estados Unidos);
- DermaScan[®] C (Cortex Technology, Dinamarca).

4.3 ANÁLISE NO BANCO DE DADOS DE PATENTES

Inicialmente foi feito um levantamento de dados sobre as tecnologias patenteadas na área da cosmetologia a fim de se identificar as tendências em inovação nessa área.

A pesquisa de prospecção patentária consistiu na avaliação quantitativa das patentes depositadas na plataforma de dados *Derwent Innovation Index* (Thomson Reuters Scientific, EUA) licenciada pela Universidade de São Paulo. Os dados foram analisados no período de 1995 a 2015 e a busca considerou a Classificação Internacional de Patentes (CIP), sendo utilizadas as subclasses A61Q (Uso Específico de Cosméticos ou Preparações Similares para Higiene Pessoal, observada na Tabela 1), A61Q-019/00 (Preparações para tratamento da pele, disposta na Tabela 2) e A61K-008/97 (pertencente ao grupo cosméticos ou preparações similares para higiene pessoal, contendo materiais ou partes destes, de origem vegetal).

Adicionalmente foi realizada uma busca combinando a palavra hidroxitirosol e a subclasse referente aos cosméticos (A61Q) pelo mesmo período avaliado anteriormente.

Tabela 1 - Grupos da subclasse A61Q de acordo com CIP

Código CIP	Significado da CIP
A61Q-001/00	Preparações para maquiagem; Pós para o corpo; Preparações para remover maquiagem.
A61Q-003/00	Preparações para manicure ou pedicure.
A61Q-005/00	Preparações para tratamento dos cabelos.
A61Q-007/00	Preparações que afetam o crescimento dos cabelos.
A61Q-009/00	Preparações para remover cabelo ou para auxiliar na remoção dos cabelos.
A61Q-011/00	Preparações para tratar os dentes, a cavidade oral ou dentaduras, p. ex. dentifrícios ou pastas de dente; enxaguatórios orais.
A61Q-013/00	Formulações ou aditivos para preparação de perfumes.
A61Q-015/00	Antitranspirante ou desodorante para o corpo.
A61Q-017/00	Preparações de barreira; Preparações para contato direto com a pele protegendo contra influências externas, p. ex. raios solares, raios X ou outras radiações perigosas, materiais corrosivos, bactérias ou picadas de insetos
A61Q-019/00	Preparações para tratamento da pele.

Classificação Internacional de patentes do grupo principal pertencente à subclasse A61Q

Tabela 2 - Subgrupos do grupo A61Q-019/00, de acordo com CIP.

Código CIP	Significado da CIP
A61Q-019/02	para descoloramento químico ou branqueamento da pele.
A61Q-019/04	para bronzeamento químico da pele.
A61Q-019/06	para combater a celulite.
A61Q-019/08	preparações antienvelhecimento.
A61Q-019/10	preparações para limpeza ou banho.

Classificação Internacional de patentes do subgrupo pertencente ao grupo principal A61Q-019/00

4.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

As matérias-primas selecionadas para o estudo foram escolhidas com base em pesquisa na literatura a fim de se identificar incompatibilidades entre os componentes e concentrações de uso permitidas. O fluxograma do desenvolvimento das formulações está representado na Figura 8.

Figura 8: Fluxograma do desenvolvimento das formulações

As formulações foram elaboradas pelo método de inversão de fases, usando agitador mecânico Heidolph, RZR 2021 à 1.000 rpm, durante 10 minutos. A fase aquosa foi vertida sob a fase oleosa à temperatura de 75 °C. Foi utilizada uma base autoemulsionante (Emulfeel® SGP) emolientes (óleo de girassol, macadâmia e oliva), umectantes (glicerina vegetal e propilenoglicol), conservante (Cosmoguard®), polímero hidrofílico (Amigel®), antioxidante (BHT), agente sequestrante (ácido etilenodiaminotetracético) e filtros solares (Tinosorb S®, metoxicinamato de octila e dióxido de titânio ultrafino). O planejamento das formulações contendo filtros solares foi realizado com auxílio do programa online *BASF® Sunscreen Simulator* (BASF, 2015) e visou atingir o Fator de Proteção Solar (FPS) 30. Os

filtros solares foram dispersos em óleo de girassol e adicionados à fase oleosa durante o processo de desenvolvimento das formulações.

As formulações contendo o extrato de oliva (Hydrolive®) foram obtidas a partir do veículo, acrescido de 0,2, 0,5 e 1,0% do extrato glicólico padronizado (contendo no mínimo 20% de hidroxitirosol), no final do processo de desenvolvimento à temperatura ambiente.

A composição de cada formulação estudada está indicada nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 - Formulações Desenvolvidas sem filtros solares (Veículo)

Matérias-primas ^a	Concentração das matérias-primas % (p/p)			
	F01	F02	F03	F04
Glycerin	5	5	5	5
Disodium EDTA	0,05	0,05	0,05	0,05
Sclerotium gum	-	-	-	0,5
Helianthus annuus Seed Oil, Polyacrylic Acid, Xylityl				
Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, <i>Euphorbia cerifera</i> Wax and Sodium Hydroxide	3	5	5	5
<i>Macadamia ternifolia</i> Oil Seed	3	3	-	-
<i>Olea europaea</i> Fruit Oil	-	-	3	-
<i>Helianthus annuus</i> Seed Oil	-	-	-	3
Butylated hydroxytoluene	0,05	0,05	0,05	0,05
Metildibromo glutaronitrilo and Phenoxyethanol	0,2	0,2	0,2	0,2
Propylene Glycol	2	2	2	2
<i>Olea europaea</i> Fruit Extract, Glycerin and Water	-	-	-	-
Água deionizada q.s.p	100	100	100	100

^a Apresentadas conforme INCI

Tabela 4 - Formulações Desenvolvidas contendo filtros solares

Matérias-primas ^a	Concentração das matérias-primas % (p/p)						
	FF01	FF02	FF03	FF04	FF05	FF06	FF07
Glycerin	5	5	5	5	5	5	5
Disodium EDTA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sclerotium Gum	-	-	-	-	0,2	0,3	0,5
<i>Helianthus annuus</i> Seed Oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, <i>Euphorbia Cerifera</i> Wax and Sodium Hydroxide	5	5	5	5	5	5	5
<i>Helianthus annuus</i> Seed Oil	3	3	3	3	3	3	3
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	7	7	-	7	7	7	7
Titanium Dioxide	3	3	3	3	3	3	3
Ethylhexyl Metoxyicinnamate	3	2	3	-	3	3	3
Butylated hydroxytoluene	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Metildibromo glutaronitrilo and Phenoxiethanol	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Propylene Glycol	2	2	2	2	2	2	2
Água deionizada q.s.p.	100	100	100	100	100	100	100

^a Apresentadas conforme INCI

Tabela 5 - Formulações Desenvolvidas contendo extrato de oliva

Matérias-primas ^a	Concentração das matérias-primas % (p/p)		
	FH1	FH2	FH3
Glycerin	5	5	5
Disodium EDTA	0,05	0,05	0,05
Sclerotium Gum	0,5	0,5	0,5
<i>Helianthus annuus</i> Seed Oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, <i>Euphorbia cerifera</i> Wax and Sodium Hydroxide	5	5	5
<i>Helianthus annuus</i> Seed Oil	3	3	3
Butylated hydroxytoluene	0,05	0,05	0,05
Metildibromo glutaronitrilo and Phenoxyethanol	0,2	0,2	0,2
Propylene Glycol	2	2	2
<i>Olea europaea</i> Fruit Extract, Glycerin and Water	0,2	0,5	1
Água deionizada q.s.p.	100	100	100

^a Apresentadas conforme INCI

4.5 TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE

4.5.1 Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado com 5 g de cada formulação, preparadas com 24 horas de antecedência, submetidos a 3.000 rpm por 30 minutos em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440 Kw (BRASIL, 2004).

4.5.2 Determinação do pH

A medida de pH foi realizada com peagâmetro Digimed[®], Modelo DM20. Foram realizadas medidas em triplicata, de 7 em 7 dias, pelo período de 28 dias. As amostras foram armazenadas em frasco de vidro com tampa, preenchidos de aproximadamente um terço de sua capacidade total para possíveis trocas gasosas, à temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), 37 e 45 $^{\circ}\text{C}$ (MAIA CAMPOS; SILVA, 2000).

4.5.3 Avaliação visual

As amostras foram observadas visualmente quanto às seguintes alterações: cor, separação de fases e homogeneidade, de 7 em 7 dias pelo período de 28 dias.

As amostras foram armazenadas em frasco de vidro com tampa, preenchidos de aproximadamente um terço de sua capacidade total para possíveis trocas gasosas, à temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), 37 e 45 $^{\circ}\text{C}$ (MAIA CAMPOS; SILVA, 2000).

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA POR DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

O estudo do comportamento reológico foi conduzido utilizando-se procedimento de fluxo na geometria cone-placa 40 mm 2.018, UHP Steel-998190 com Gap de 59 μm em reômetro Discovery Hybrid - TA Instruments. O tempo de cisalhamento para a amostra contendo filtro solar foi de 120 segundos com velocidade de rotação progressiva de 0,01 a 150 seg^{-1} para a curva ascendente e

no sentido inverso. Para as amostras contendo ativos o tempo de cisalhamento foi de 10 segundos com taxa de cisalhamento de 0,01 a 8,97 seg^{-1} para a curva ascendente e no sentido inverso. As amostras foram dispostas em frasco de vidro com tampa, preenchidos de aproximadamente um terço de sua capacidade total para possíveis trocas gasosas e armazenadas a temperatura ambiente e a 37 °C e 45 °C, em estufas, marca Eletrolab. Foram coletadas para o estudo reológico alíquotas de 0,5 g das amostras em intervalos de tempo de 7 em 7 dias, durante 28 dias (BRASIL, 2004; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA DAS FORMULAÇÕES

As análises de textura foram realizadas em texturômetro, modelo TAXT Plus (Extralab Brasil, Jarinu, Brasil), utilizando-se a sonda Back Extrusion Rig A/BE com disco de 35 mm de diâmetro, preenchido com 75% de sua capacidade com distância de retorno de 25 mm, velocidade de retorno de 20 mm s^{-1} e força de contato de 30 g e da espalhabilidade com sonda TTC Spreadability Rig HDP/SR e P/45C Perplex, com distância de retorno de 100 mm, velocidade de retorno de 20 mm s^{-1} e força de contato de 30 g. Na avaliação de textura foram observados os parâmetros coesividade e firmeza e no teste de espalhabilidade, o trabalho de cisalhamento das formulações (DELSIN; MAIA CAMPOS, 2015).

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 TRIAGEM DE VOLUNTÁRIOS

Antes de iniciar o estudo, todos os voluntários foram esclarecidos e orientados sobre os objetivos e métodos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, elaborado segundo a declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (1.418.673) (BRASIL, 2012).

Para a avaliação dos efeitos imediatos das formulações foram selecionadas 40 voluntárias do sexo feminino contendo desordens de pigmentação na região malar, com peles de fototipos II, III e IV de acordo com a escala de Fitzpatrick, com idade entre 38 a 50 anos. Para o estudo de eficácia em longo prazo, foram recrutadas 50 voluntárias com desordens de pigmentação na região malar, com os mesmos fototipos do estudo imediato, destas 40 foram incluídas no estudo e 30 voluntárias o finalizaram.

Na seleção de voluntárias foram considerados os seguintes critérios de exclusão: tabagismo; gravidez ou aleitamento; indivíduos com história anterior de reações adversas com o uso de produtos cosméticos; indivíduos em uso de medicamentos passíveis de produzir resposta cutânea anormal ou que tenham feito uso de cosméticos despigmentante duas semanas antes do início do estudo; indivíduos com doenças dermatológicas localizadas ou generalizadas e excesso de pelos nas regiões de estudo e doenças endócrinas (PANDYA et al., 2006).

5.2 PROTOCOLO DO ESTUDO DE EFICÁCIA

5.2.1 Avaliação dos efeitos imediatos

Nessa etapa, foram avaliados o efeito das formulações F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e FF07 (veículo acrescido de filtros solares) em relação a hidratação, a perda transepidérmica de água e a quantidade de sebo.

A aplicação das formulações foi randomizada, entre lado direito e esquerdo, na região malar das voluntárias e as medidas foram coletadas antes e 2 horas após a aplicação das emulsões.

5.2.2 Avaliação dos efeitos em longo prazo

Os efeitos em longo prazo foram avaliados por meio de um estudo duplo-cego, no qual 30 voluntárias, divididas em 2 grupos iguais, receberam formulações para serem aplicadas na face e na região anterior dos antebraços durante 56 dias (PANDYA et. al., 2006).

A região malar é uma área do corpo que está frequentemente exposta à radiação solar e é comumente utilizada para se avaliar os efeitos do fotoenvelhecimento. Já a região anterior dos antebraços, é menos exposta ao sol e é utilizada para a avaliação dos efeitos do envelhecimento cronológico (GNIADCKA; JEMEC, 1998; TAKEMA, 1994).

Assim, um dos grupos recebeu a formulação F04 (veículo) para ser aplicada na face e em um dos antebraços, no período da noite, e o segundo grupo a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) para ser utilizada da mesma forma. Ambos receberam a formulação FF07 (veículo acrescido de filtros solares) para ser aplicada somente na face, durante o dia. A aplicação das demais formulações nos antebraços foi randomizada entre antebraço direito e esquerdo.

Foram avaliados o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidérmica de água, quantidade de sebo, elasticidade, relação de ecogenicidade, hiperpigmentação e características estruturais da epiderme. As medidas foram coletadas no tempo inicial para a obtenção dos valores basais, após 28 dias de uso e ao final de 56 dias de aplicação.

Os testes foram realizados após 20 minutos de aclimação em ambiente com temperatura e umidade relativa do ar controlados, 20-22 °C e 45-55%, respectivamente (GIANETI; MERCÚRIO; MAIA CAMPOS, 2013).

5.3 AVALIAÇÃO SENSORIAL

Participaram da análise sensorial 48 mulheres com idades entre 19 e 59 anos.

Todas as voluntárias permaneceram durante 20 minutos em um ambiente com temperatura e umidade relativa do ar controlados, 20-22 °C e 45-55%, respectivamente (WAGEMAKER *et al.*, 2013).

Foram aplicados 2,0 mg/cm² das formulações F02 (óleo de macadâmia), F03 (óleo de oliva), F04 (óleo de girassol) e uma formulação, sem a adição de óleos, denominada FC no antebraço das voluntárias que espalharam a formulação com dez movimentos circulares e ordenados. (WAGEMAKER *et al.*, 2013)

Após a aplicação dos produtos, todas as voluntárias preencheram um questionário *Check All That Apply* (CATA) contendo uma lista com sete termos dos quais elas escolheram somente aqueles que consideraram que descreviam melhor cada amostra logo após a aplicação da amostra e após 5 minutos da aplicação (PARENTE; ARES; MANZONI, 2010).

Os termos avaliados foram: consistência, oleosidade, espalhabilidade, sensação de absorção rápida para a avaliação logo após a aplicação e sensação de hidratação, sensação de suavidade e deixa resíduo oleoso para a avaliação após 5 minutos da aplicação (PARENTE; ARES; MANZONI, 2010; WORTEL; WIECHERS, 2000).

5.4 TÉCNICAS DE BIOFÍSICA E ANÁLISE DE IMAGEM DA PELE

5.4.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

O conteúdo aquoso do estrato córneo foi determinado pelo equipamento Corneometer CM 825 (Courage-Khazaka, Alemanha) acoplado a um software, que mede o nível de hidratação do estrato córneo.

Foram realizadas 5 medidas na região malar e anterior dos antebraços e os resultados foram dados em unidades arbitrárias (UA) pelo próprio equipamento em função do conteúdo aquoso do estrato córneo (LEONARDI; GASPAR, 2002).

5.4.2 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

Para este estudo foi utilizado o equipamento Tewameter TM 210 (Courage-Khazaka, Alemanha). A sonda permaneceu por 2 minutos sobre a pele, na região malar e anterior dos antebraços, e a média de 5 medidas foi empregada nos cálculos posteriores (DAL'BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006).

5.4.3 Determinação da quantidade de sebo

Para a avaliação da quantidade de sebo na pele foram feitas medidas em triplicata da região malar das voluntárias e a média dos valores obtidos utilizadas nos cálculos posteriores.

A quantidade de sebo foi determinada por meio do equipamento *Sebumeter® SM 815*. (CROWTHER, 2015).

5.4.4 Determinação das propriedades viscoelásticas da pele

A determinação das propriedades viscoelásticas da pele foi determinada por meio do equipamento Cutometer SEM 575, o qual fornece os seguintes parâmetros relacionados à viscoelasticidade da pele: elasticidade biológica, R7 (retração imediata/ distensão total da pele) e deformação residual da pele, R (distensão total - retração total).

Foram obtidas 3 medidas das regiões malar e anterior dos antebraços das voluntárias e a média dos valores obtidos utilizadas nos cálculos posteriores

5.4.5 Avaliação da coloração da pele - Quantidade de luz refletida (L*)

A avaliação da coloração da pele foi realizada por meio de colorímetro tri-estímulo Skin-Colorimeter® CL 400 (Courage-Khazaka, Alemanha).

Foram feitas medidas em triplicata da região malar das voluntárias e a média dos valores obtidos da coordenada L* utilizadas nos cálculos posteriores (PARK; SUH; YOUN, 1999).

5.4.6 Avaliação da pele por análise de imagem de alta resolução

Para a detecção de regiões hiperpigmentadas foi utilizado o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha).

A quantificação das regiões hiperpigmentadas foi realizada por meio do software *Image J*, utilizando-se a ferramenta de seleção retangular (2 x 1,5 cm) na malar das voluntárias, e cálculo da intensidade de pixels da área selecionada (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAN, 2004).

5.4.7 Avaliação ecogenicidade da derme por ultrassom de alta frequência

A avaliação da ecogenicidade foi realizada por meio da análise de imagens produzidas por um ultrassom DermaScan® C (Cortex Technology, Dinamarca).

Foram obtidas imagens em triplicata da região malar e anterior dos antebraços das voluntárias e a média dos valores obtidos utilizadas nos cálculos posteriores

5.4.8 Avaliação das características estruturais e morfológicas da epiderme por microscopia confocal de reflectância

As imagens referentes às estruturas celulares da epiderme foram obtidas por meio de um microscópio confocal de reflectância a laser *Vivascope® 1500* com comprimento de onda do laser de 830 nm e objetiva de imersão com capacidade para detectar 20 imagens por segundo. O microscópio permite a obtenção de imagens da epiderme e derme papilar em nível celular (SAUERMAN, *et al.* 2002).

Foram obtidas imagens em triplicata na malar das voluntárias em uma região hiperpigmentada e em uma região sem hiperpigmentação (perilesional) de forma padronizada por meio do software acoplado Vivastack (Lucid). Foram obtidas imagens a cada 1,5 µm a partir do estrato córneo até a profundidade de 37,5 µm e a cada 3 µm até a profundidade de 132,5 µm (MERCÚRIO *et. al.*, 2016).

A quantificação da pigmentação epidérmica foi realizada por meio da avaliação do brilho ao redor de 3 papilas dérmicas com auxílio do software *image J* no modo de seleção *freehand* e intensidade de pixels foi dada a partir da área da imagem selecionada.

Além disso, foram analisados os parâmetros espessura do estrato córneo, espessura da epiderme viável e profundidade das papilas dérmicas, que foram calculados levando-se em consideração as características morfológicas de cada camada e sua profundidade. (MERCÚRIO et. al., 2016).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância para os parâmetros que apresentaram distribuição normal de acordo com teste de normalidade. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se a estatística não-paramétrica, aplicando o teste de Kruskal-Wallis para dados não vinculados e Wilcoxon para dados vinculados. Os resultados foram apresentados na forma de tabelas e figuras.

6. *RESULTADOS*

6.1 ANÁLISE DE PATENTES

A busca realizada pela Classificação Internacional de Patentes (CIP), Subclasse A61Q (Uso Específico de Cosméticos ou Preparações Similares para Higiene Pessoal) identificou 71.190 patentes depositadas nos últimos 20 anos. Destas, 32% foram classificadas no subgrupo A61K-008/97 referente aos cosméticos ou preparações similares para higiene pessoal contendo materiais de origem vegetal. Quando se analisou a tendência no depósito de patentes cosméticas classificadas no subgrupo A61K-008/97 ano a ano, nos últimos 10 anos (Figura 9), observou-se um aumento do depósito de patentes deste subgrupo. Somente no ano de 2015, contabilizou-se 49% de patentes cosméticas depositadas constituídas por materiais de origem vegetal.

Figura 9 - Percentual anual do depósito de patentes classificadas como cosméticos contendo ingredientes de origem vegetal

Verificou-se também um predomínio de produtos destinados ao tratamento da pele (CIP: A61Q-019/00), seguido por preparações para o tratamento de cabelos (CIP: A61Q-005/00) e maquiagem (CIP: A61Q-001/00) tanto para preparações cosméticas contendo ingredientes de origem vegetal quanto para as demais preparações.

Uma vez que o principal grupo de patentes cosméticas envolviam o tratamento da pele, procedeu-se nova busca no banco de dados por meio da combinação do

Grupo A61Q-019/00 (Preparações para tratamento da pele) com o Subgrupo A61K-008/97 (de origem vegetal). A busca resultou em 11.175 patentes, entre as quais 36% estavam classificadas dentro do subgrupo A61Q-019/08 referente às preparações antienvelhecimento, 32% no subgrupo A61Q-019/02, indicadas para o clareamento da pele, 27% no subgrupo A61Q-019/10, preparações para banho, 3% no subgrupo A61Q-019/06, preparações para o tratamento da celulite, e 2% no subgrupo A61Q-019/04, para o bronzeamento da pele, conforme Figura 10. Adicionalmente, a avaliação das patentes entre 2010 e 2015 (Figura 11), evidenciou que o depósito das preparações cosméticas para tratamento da pele de origem vegetal com a finalidade de clareamento superou as preparações com a finalidade de antienvelhecimento a partir de 2013.

Figura 10 - Distribuição das patentes cosméticas para tratamento da pele, de origem vegetal, de acordo com sua finalidade

Levantamento de dados realizado no período de 1995 a 2015

Figura 11 - Depósito ao ano de patentes cosméticas para tratamento da pele, de origem vegetal, de acordo com sua finalidade

Levantamento de dados realizado no período de 2010 a 2015

A pesquisa realizada pelo ingrediente ativo hidroxitirosol em formulações cosméticas resultou em 44 patentes depositadas nos últimos 20 anos. Destas, 11 eram relacionadas à composições cosméticas e as demais estavam distribuídas entre métodos de extração e síntese.

Todas as composições cosméticas envolviam a combinação de hidroxitirosol e outros extratos vegetais. Nenhuma delas combinava o hidroxitirosol e o óleo vegetal de girassol.

6.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

A partir dos critérios estabelecidos, foram desenvolvidas inicialmente 4 emulsões O/A a partir da base autoemulsionante Emulfeel SGP (*Helianthus annuus* Seed Oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, *Euphorbia cerifera* Wax and Sodium Hydroxide) que é rica em ingredientes de origem vegetal. A ela foram incorporados óleo de macadâmia, oliva e girassol com a finalidade de solubilizar os filtros solares que foram incorporados nas etapas posteriores. As porcentagens de cada ingrediente foram definidas a partir da literatura consultada sobre cada matéria-prima, visando à obtenção de formulações estáveis e com sensorial agradável.

A formulação F04, a base de óleo de girassol, que não demonstrou sinais de instabilidade frente aos testes de estabilidade preliminares e apresentou melhor perfil de textura, foi selecionada para a incorporação de filtros solares.

Assim, a partir da formulação F04, foram desenvolvidas 7 emulsões O/A contendo diferentes concentrações dos filtros solares Tinosorb S[®], metoxicinamato de octila e dióxido de titânio, planejadas a partir de um simulador de FPS online (BASF, 2015) visando à obtenção de formulações com FPS 30.

Para obter a estabilização destas formulações foi necessário a incorporação de um polímero hidrofílico em baixas concentrações como agente doador de viscosidade para retardar o movimento das gotículas na fase interna das emulsões.

Por fim, foram desenvolvidas mais 3 emulsões O/A a partir da incorporação de diferentes concentrações de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol.

6.3 TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE

6.3.1 Centrifugação

As formulações veículo F02, F03, F04, as formulações FH1, FH2 e FH3, contendo extrato padronizado de hidroxitirosol nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0% respectivamente, e as formulações FF04 e FF07, contendo filtros solares, não apresentaram sinais de instabilidade após centrifugação.

6.3.2 Determinação do pH

Os valores de pH das formulações estudadas estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de pH obtidos a partir das formulações estudadas

Tempo	24 horas	28 dias	90dias
<u>Temperatura ambiente</u>			
F04	6,02 +/- 0,02	5,93 +/- 0,01	5,97 +/- 0,01
FF07	5,87 +/-0,05	5,9 +/- 0,04	5,87 +/- 0,06
FH1 0,2%	5,75 +/- 0,01	5,74 +/- 0,01	5,87 +/- 0,06
FH2 0,5%	5,81 +/- 0,005	5,70 +/- 0,011	5,67 +/- 0,005
FH3 1,0%	5,78 +/- 0,005	5,58 +/- 0	5,53 +/- 0,015
<u>37°C</u>			
F04	6,02 +/- 0,02	5,97 +/- 0,01	5,97 +/- 0,01
FF07	5,87 +/-0,05	5,9 +/- 0	5,87 +/- 0,06
FH1 0,2%	5,75 +/- 0,01	5,74 +/- 0	5,87 +/- 0,06
FH2 0,5%	5,81 +/- 0,005	5,70 +/- 0,011	5,67 +/- 0,005
FH3 1,0%	5,78 +/- 0,005	5,58 +/- 0	5,53 +/- 0,015
<u>45°C</u>			
F04	6,02 +/- 0,02	5,93 +/- 0,005	5,94 +/- 0,005
FF07	5,87 +/-0,05	5,79 +/- 0,015	5,84 +/- 0,02
FH1 0,2%	5,75 +/- 0,01	5,50 +/- 0,0057	5,74 +/- 0,07
FH2 0,5%	5,81 +/- 0,005	5,46 +/-0,011	5,67 +/- 0,04
FH3 1,0%	5,78 +/- 0,005	5,25 +/- 0,0057	5,18 +/- 0,015

Valores da média e desvio padrão em negrito. F04 (veículo), FF07 (veículo acrescido de filtros solares), FH1 (veículo acrescido de 0,2% de extrato de oliva padronizado), FH2 (veículo acrescido de 0,5% de extrato de oliva padronizado) e FH3 (veículo acrescido de 1% de extrato de oliva padronizado)

6.3.3 Avaliação visual

Não foram observadas alterações de cor, odor e separação de fases nas formulações avaliadas durante todo o período de armazenamento à temperatura ambiente, 37 °C e 45 °C.

6.4 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-MECÂNICAS

6.4.1 Caracterização da textura das formulações

Foi observado que a adição de óleo vegetal às formulações promoveu melhora na espalhabilidade uma vez que todas as formulações apresentaram menores trabalhos de cisalhamento em relação ao controle (formulação elaborada sem a adição de óleos vegetais), conforme ilustrado na Figura 12. Observou-se ainda que a formulação F04 (óleo de girassol) apresentou o menor trabalho de cisalhamento entre todas.

Figura 12 - Resultados obtidos por meio da análise do trabalho de cisalhamento das formulações após adição de óleos vegetais

* Diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). A formulação controle foi elaborada sem a adição de óleos vegetais a F02 (óleo de macadâmia), F03 (óleo de oliva) e F04 (óleo de girassol). Nenhuma das formulações continha o polímero *Sclerotidium gum.*.

A formulação F02 (óleo de macadâmia) demonstrou uma redução estatisticamente significativa na firmeza, índice de consistência e coesividade em comparação ao controle; enquanto que a formulação F04 apresentou aumento em todos os parâmetros avaliados. Não foi verificada diferença estatística nos parâmetros firmeza e índice de viscosidade entre a formulação F03 (óleo de oliva) e o controle. Estes dados podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 - Resultados obtidos por meio da análise da textura das formulações após a adição de óleos vegetais.

* Diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). A formulação controle foi elaborada sem a adição de óleos vegetais a F02 (óleo de macadâmia), F03 (óleo de oliva) e F04 (óleo de girassol). Nenhuma das formulações continha o polímero *Sclerotium gum*.

A adição do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol e dos filtros solares promoveu um aumento no trabalho de cisalhamento das formulações. Além disso, foi observada a redução da firmeza e consistência em todas as formulações contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol. Apenas nas formulações FH2 (0,5%) e FH3 (1,0%) observou-se redução no índice de viscosidade e consistência. Os resultados estão ilustrados na Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Resultados obtidos por meio da análise do trabalho de cisalhamento das formulações após a adição de filtros solares e extrato de oliva padronizado.

* Diferença estatística significativa em relação a F04 (veículo) ($p < 0,05$). F04 (veículo), FF07 (veículo acrescido de filtros solares), FH1 (veículo acrescido de 0,2% de extrato de oliva), FH2 (veículo acrescido de 0,5% de extrato de oliva), FH3 (veículo acrescido de 1% de extrato de oliva)

Figura 15 - Resultados obtidos por meio da análise da textura das formulações após a adição de filtros solares e extrato de oliva padronizado.

* Diferença estatística significativa em relação a F04 (veículo) ($p < 0,05$). F04 (veículo), FF07 (veículo acrescido de filtros solares), FH1 (veículo acrescido de 0,2% de extrato de oliva), FH2 (veículo acrescido de 0,5% de extrato de oliva), FH3 (veículo acrescido de 1% de extrato de oliva)

6.5 ESTABILIDADE FÍSICA POR DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

A formulação FF07, contendo filtros solares, apresentou um aumento na viscosidade aparente a partir do 7º dia de armazenamento à temperatura ambiente. Porém, após esse aumento, não demonstrou diferença estatística significativa na viscosidade aparente ao longo dos 28 dias de estudo.

Não foram observadas diferenças estatísticas nas amostras armazenadas a 37 e 45 °C ao longo dos 28 dias de armazenamento, conforme verificado na Figura 16 e na Tabela 7.

Figura 16 - Viscosidade aparente da formulação contendo filtros solares em função do tempo e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições)

Tabela 7 - Valores de viscosidade aparente obtidos para a formulação FF07

VISCOSIDADE AP (cP)					
Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Temperatura ambiente	5246,00	5767,33*	5897,66*	5913,33*	5913,00*
37°C	5246,00	5307,33	5152,00	5390,00	5252,66
45°C	5246,00	4759,33	5097,00	5387,33	5699,00

* Diferença estatística significativa em relação aos valores iniciais ($p < 0,05$).

A formulação FH1, contendo 0,2% de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, armazenada à temperatura de 37 °C, demonstrou aumento

significativo na viscosidade aparente ao término dos 28 dias de estudo, conforme ilustrado na Figura 17 B.

Não foram observadas alterações significativas na viscosidade aparente da formulação FH1, armazenada na temperatura ambiente e na temperatura de 45 °C, conforme observado nas Figuras 17 A e 17 C.

A formulação FH3, contendo 1% de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, apresentou queda significativa em sua viscosidade aparente após 28 dias de armazenamento à temperatura de 45 °C, conforme disposto na Figura 18 C

Não foram observadas diferenças significativas na formulação FH2, contendo 0,5% de extrato de oliva, armazenada à temperatura ambiente, 37 e 45 ° C.

Os valores obtidos de viscosidade aparente para as formulações FH1, FH2 e FH3, em função do tempo e da temperatura de armazenamento, estão dispostos na Tabela 8.

Figura 17 - Viscosidade aparente das formulações contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol em função do tempo e da temperatura de armazenamento. (A) Temperatura ambiente, (B) 37° C e (C) 45° C durante 28 dias.

Tabela 8 - Valores de viscosidade aparente obtidos a partir as formulações FH1, FH2 e FH3

VISCOSIDADE AP (cP)					
Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Temperatura ambiente					
FH1 0,2%	31898	31223	32151	32862	32715
FH2 0,5%	32004	30045	29655	32711	33640
FH3 1%	31973	31072	29908	33135	32676
37°C					
FH1 0,2%	31898	28017*	32593	34576*	34590*
FH2 0,5%	32004	30253	34633	33672	34145
FH3 1%	31973	27485	33249	32101	34666*
45°C					
FH1 0,2%	31898	32520	32515	33004	31670
FH2 0,5%	32004	33416	33133	31428	31229
FH3 1%	31973	33341	33082	29398	26417*

* Diferença estatística significativa em relação aos valores iniciais ($p < 0,05$).

De acordo com as análises reológicas, todas as formulações apresentaram comportamento pseudoplástico com valores de índice de fluxo menores do que 1 ($n < 1$) e seu comportamento não foi afetado pelo estresse térmico ao longo dos 28 dias de estudo. Os dados estão disponíveis nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Valores de índice de fluxo obtidos a partir a formulação FF07

ÍNDICE DE FLUXO					
Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Temperatura ambiente	0,14	0,13	0,14	0,14	0,16
37°C	0,14	0,13	0,13	0,13	0,13
45°C	0,14	0,11	0,13	0,13	0,13

Tabela 10 - Valores de índice de fluxo obtidos a partir das formulações FH1, FH2 e FH3

ÍNDICE DE FLUXO					
Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Temperatura ambiente					
FH1 0,2%	0,15	0,15	0,15	0,17	0,17
FH2 0,5%	0,14	0,15	0,17	0,17	0,18
FH3 1%	0,14	0,15	0,17	0,18	0,17
37°C					
FH1 0,2%	0,15	0,25	0,24	0,19	0,18
FH2 0,5%	0,14	0,18	0,19	0,18	0,19
FH3 1%	0,14	0,14	0,18	0,18	0,19
45°C					
FH1 0,2%	0,15	0,15	0,17	0,18	0,19
FH2 0,5%	0,14	0,16	0,18	0,18	0,19
FH3 1%	0,14	0,18	0,19	0,17	0,2

Observou-se um aumento significativo no índice de consistência da formulação FF07, contendo filtros solares, ao final dos 28 dias de armazenamento a temperatura de 45°C, conforme disposto na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores do índice de consistência obtidos a partir a formulação FF07

ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA					
Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Temperatura ambiente	331,34	368,51	366,26	370,08	350,16
37°C	331,34	358,55	349,61	375,75	364,16 *
45°C	331,34	333,00	334,82	361,57	381,16 *

* Diferença estatística significativa em relação aos valores iniciais ($p < 0,05$).

Foi observada uma redução significativa no índice de consistência de todas as formulações contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol ao final dos 28 dias de armazenamento à temperatura de 45 °C, conforme apresentado na Tabelas 12.

Tabela 12 - Valores do índice de consistência obtidos a partir das formulações FH1, FH2 e FH3

ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA					
Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Temperatura ambiente					
FH1 0,2%	220,7	219,19	227,46	225,11	225,56
FH2 0,5%	225,5	215,85	204,08	221,42	223,3
FH3 1%	231,93	230,09	211,007	224,475	226,39
37°C					
FH1 0,2%	220,7	227,48	238,23	238,07	229,43
FH2 0,5%	225,5	202,76	228	233,035	217,52
FH3 1%	231,93	213,17	221,83	216,88	225,63
45°C					
FH1 0,2%	220,7	229,13	221,36	216,84	207,17 *
FH2 0,5%	225,5	234,19	222,56	208,76 *	201,41 *
FH3 1%	231,93	230,78	215,35	201,63 *	169,24 *

* Diferença estatística significativa em relação aos valores iniciais ($p < 0,05$).

O reograma da formulação FF07 mostrou uma oscilação no 7º dia de estudo para a amostra armazenada à temperatura ambiente. Não foram observadas oscilações bruscas nas amostras armazenadas à temperatura de 37°C e 45°C durante todo o período de estudo, conforme observados na Figura 18.

Figura 18 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para a formulação FF07 (contendo filtros solares) armazenadas a temperatura ambiente (A), a 37° C (B) e 45° C (C) durante 28 dias.

A formulação FH1 (0,2%) demonstrou menores alterações na relação tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento após os 28 dias de estudo em todas as temperaturas de armazenamento em relação às formulações FH2 (0,5%) e FH3 (1,0%). Esses dados podem ser visualizados nas Figuras 19, 20 e 21.

Figura 19 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, armazenadas a temperatura ambiente (A) FH1 (B) FH2 e (C) FH3 durante 28 dias.

Figura 20 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações conteúdo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, armazenadas a temperatura de 37 °C, (A) FH1 (B) FH2 e (C) FH3 durante 28 dias.

A formulação FH3 (1,0%) demonstrou as maiores alterações no reograma após os 28 dias de armazenamento à temperatura de 45°C, conforme visualizado na Figura 22 C.

Figura 21 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, armazenadas a temperatura de 45 °C, FH1 (B) FH2 e (C) FH3 durante 28 dias.

6.6 ANÁLISE SENSORIAL

De acordo com os resultados obtidos por meio da análise sensorial, a formulação FC (formulação sem adição de óleo vegetal) foi considerada com melhor espalhabilidade.

Em relação à oleosidade, as formulações F02 (óleo de macadâmia) e F03 (óleo de oliva), foram consideradas mais oleosas em relação às formulação FC e F04.

As formulações F03 (óleo de oliva) e F04 (óleo de girassol) foram mais frequentemente associadas ao termo sensação de absorção rápida em relação às demais e a formulação F04 foi considerada a mais consistente.

Após cinco minutos da aplicação das formulações, a formulação F04 (óleo de girassol) foi considerada a que deixa a pele mais macia sem deixar tanto resíduo oleoso como as formulações F02 (óleo de macadâmia) e F03 (óleo de oliva)

Ao final na análise as voluntárias foram questionadas quanto a sua preferência e a maior parte delas escolheu a formulação F04 (óleo de girassol).

Os resultados obtidos a partir da análise sensorial realizada podem ser observada na Figura 22 e na tabela 13.

Figura 22 - Distribuição de cada parâmetro avaliado imediatamente após a aplicação das formulações (A) e 10 minutos após a aplicação (B).

FC (formulação sem a adição de óleo vegetal), F02 (formulação contendo óleo de macadâmia), F03 (Formulação contendo óleo de oliva) e F04 (Formulação contendo óleo de girassol).

Tabela 13 - Frequência de cada parâmetro avaliado na análise sensorial das formulações estudadas

Frequência				
Sensação imediata após a aplicação	FC	F02	F03	F04
Oleoso	17	20	22	16
Sensação de absorção rápida	19	20	23	28
Espalha facilmente	44	40	38	41
Consistente	18	17	20	25
Sensação 5 minutos após a aplicação				
Deixa a pele macia	35	36	36	41
Deixa a pele hidratada	36	35	37	37
Deixa resíduo oleoso na pele	7	12	17	8
Preferência	8	4	6	14 ^{*F02; F03}

^{*}F02; F03 Diferença estatística significativa em relação a formulação F02 e F03 (p<0,05).

6.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMEDIATOS

6.7.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Os resultados obtidos por meio do equipamento corneometer demonstraram que, após duas horas da aplicação das formulações objeto de estudo, ocorreu aumento significativo no conteúdo aquoso no estrato córneo das voluntárias que receberam as formulações F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol). Estes resultados podem ser observados na Figura 23.

Figura 23 - Conteúdo aquoso do estrato córneo na região malar (média $\pm$ DP) antes e após 2 h.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais. F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares)

6.7.2 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

Após duas horas da aplicação houve uma redução na perda transepidérmica de água das voluntárias que receberam as formulações F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva) e FF07 (veículo acrescido de filtros solares), em relação a seus valores basais, conforme observados na Figura 24.

Figura 24: Perda de água transepidérmica na região malar antes da aplicação das formulações (Basal) e 2 horas após.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (Teste de Wilcoxon). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares)

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos F04, FH1 e FF07, conforme observado na Figura 25.

Figura 25: Comparação entre os tratamentos em relação a perda de água transepidermica na região malar 2 horas após a aplicação das formulações.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (teste de Mann-Whitney). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares), Controle (nenhum tratamento)

6.7.3 Determinação da quantidade de sebo

Foi observado um aumento na quantidade de sebo na pele das voluntárias após 2 horas da aplicação das três formulações em estudo F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva) e FF07 (veículo acrescido de filtros solares) e na região controle observado na Figura 26.

Figura 26 - Quantidade de sebo na região malar antes (Basal) e após 2 horas da aplicação das formulações.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (teste de Wilcoxon). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares).

Não foram observadas diferenças entre as três formulações estudadas após 2 horas da aplicação, conforme observado na Figura 27.

Figura 27 Avaliação da quantidade de sebo do estudo de eficácia imediata das formulações. Comparação os tratamento 2 horas após a aplicação das formulações.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (teste de Mann-Whitney). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares), Controle (nenhum tratamento)

6.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EM LONGO PRAZO

6.8.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Foi observado aumento significativo no conteúdo aquoso do estrato córneo na região malar do grupo que recebeu a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) após 28 dias de tratamento. O grupo que recebeu a formulação F04 (veículo) apresentou aumento no conteúdo aquoso do estrato córneo após 56 dias de tratamento. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos. Os valores do conteúdo aquoso do estrato córneo obtidos após a aplicação das formulações em estudo na região malar, estão dispostos na Figura 28.

Figura 28: Avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, na região malar, (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (Análise de variância). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

Em relação ao conteúdo aquoso do estrato córneo na região do antebraço, foi observado aumento após 56 dias de tratamento para os grupos que receberam a formulação F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol). Também foi observado aumento no conteúdo aquoso do estrato córneo na região controle do grupo que recebeu a formulação F04, após os 56 dias de tratamento. Os resultados estão representados na Figura 29.

Figura 29 - Avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, na região dos antebraços, (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações (Basais) e após 28 e 56 dias de tratamento.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (Análise de variância). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

6.8.2 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

O resultado mostrou uma redução significativa da perda transepidérmica de água, na região malar, do grupo que recebeu a formulação F04 (veículo) após 28 dias de tratamento, no entanto ao final dos 56 dias de tratamento essa redução não se manteve, conforme ilustrado na Figura 30.

Figura 30 - Avaliação da perda transepidérmica de água, na região malar, (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (Análise de variância). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

Em relação à perda transepidérmica de água na região dos antebraços, não foram identificadas diferenças significativas após 28 e 56 dias de tratamento com as formulações F04 e FH1 porém, foi observado aumento na perda de água transepidérmica na região controle do grupo que recebeu o tratamento com a formulação F04 após 56 dias de estudo, conforme observado na Figura 31

Figura 31: Avaliação da perda de água transepidérmica, na região dos antebraços, (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (Análise de variância). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

6.8.3 Determinação da quantidade de sebo

Não foram observadas alterações significativas na quantidade de sebo, na região malar das voluntárias, em ambos os grupos após 56 dias de tratamento, conforme observado na Figura 32.

Figura 32 - Avaliação da quantidade de sebo, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 56 dias de tratamento.

F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

6.8.4 Avaliação da coloração da pele - Quantidade de luz refletida (L*)

Não foram observadas alterações significativas na quantidade de luz refletida pela pele das voluntárias em ambos os grupos, após 56 dias de tratamento, conforme disposto na Figura 33.

Figura 33 - Avaliação da quantidade de luz refletida, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.

F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

6.8.5 Avaliação da pele por análise de imagem de alta resolução

Não foram identificadas alterações nos valores da intensidade de pixel, na região malar das voluntárias, após 56 dias de tratamento com a formulação F04 (veículo) e com a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol). Estes resultados podem ser observados na Figura 34 e a representação de imagem obtida para a análise de manchas no UV está disposta na Figura 35

Figura 34 - Avaliação da Intensidade da pigmentação, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.

F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

Figura 35 - Representação de imagem em alta resolução obtida para a avaliação de manchas no UV.

6.8.6 Avaliação ecogenicidade da derme por ultrassom de alta frequência

A avaliação dos dados referentes à relação de ecogenicidade não apontou alterações significativas na região malar e na região dos antebraços do grupo que recebeu o tratamento com a formulação F04 (veículo) nem do grupo tratado com a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) durante os 56 dias de estudo. Os dados estão dispostos nas Figuras 36 e 37.

Figura 36 - Avaliação da relação de ecogenicidade, na região malar, (média +- DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.

F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

Figura 37 - Avaliação da relação de ecogenicidade, na região dos antebraços, (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações e após 28 e 56 dias de tratamento.

F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol)

A Figura 38 representa a imagem de ultrassom obtida na região malar antes da aplicação das formulações e após 56 dias após da aplicação das formulações. Não foram observadas alterações na relação de ecogenicidade.

Figura 38 - Representação de uma imagem obtida da região malar (A) antes da aplicação das formulações e (B) após 56 dias por ultrassom de alta frequência.

Regiões de baixa ecogenicidade indicadas pela seta branca.

6.8.7 Determinação viscoelasticidade da pele

6.8.7.1 Elasticidade biológica – retração imediata/distensão total da pele

De acordo com os dados obtidos houve uma redução significativa no parâmetros R7 do Cutometer - Ur/Uf (retração imediata/distensão total da pele) na região malar após 56 dias de tratamento com a formulação F04 (veículo). Por outro lado, foi observado um aumento significativo nesta relação, na mesma região do estudo, após tratamento com a formulação FH1 (Figura 39).

Figura 39: R7 = Ur/Uf (elasticidade biológica da pele) na região malar da pele antes (Basal) e após 56 dias de tratamento de aplicação das formulações F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol).

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (teste de Wilcoxon). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares)

Na região da pele do antebraço, foi observada uma redução do parâmetro R7 (Ur/Uf) após 56 de tratamento com ambas as formulações estudadas e na região controle de ambos os grupos em relação aos valores basais, conforme ilustrado nas Figuras 40 e 41. Assim, não houve alteração neste parâmetro nesta região estudada.

Figura 40 - Ur/Uf (elasticidade biológica da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação F04 (veículo) e após 56 dias de tratamento.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (teste de Wilcoxon). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares)

Figura 41 - Ur/Uf (elasticidade biológica da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e após 56 dias de tratamento.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (teste de Wilcoxon). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares)

6.8.7.2 R1=R (Deformação residual da pele)

Foi observada uma redução significativa da deformação residual da pele na região malar do grupo que recebeu a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), conforme apresentado na Figura 42.

Figura 42 - R1=R (Deformação residual da pele) na região malar das voluntárias antes da aplicação das formulações F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e após 56 dias de tratamento.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores basais (teste de Wilcoxon). F04 (veículo), FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), FF07 (veículo acrescido de filtros solares)

Não foi observada diferença significativa da deformação residual da pele na região do antebraço para ambos os grupos, conforme apresentado nas Figuras 43 e 44.

Figura 43 - R1=R (Deformação residual da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação F04 (veículo) e após 56 dias de tratamento.

Figura 44 - R1=R (Deformação residual da pele) na região dos antebraços das voluntárias antes da aplicação da formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) e após 56 dias de tratamento.

6.8.8 Avaliação das características estruturais e morfológicas da pele por microscopia confocal de reflectância

6.8.8.1 Pigmentação das papilas dérmicas

Os resultados da análise da pigmentação das papilas dérmicas não demonstraram diferenças significativas após 56 dias de tratamento com as formulações F04 (veículo) e FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), tanto na região hiperpigmentada quanto na perilesional (Figura 45)

Figura 45 - Intensidade do brilho papilar nas regiões perilesional e hiperpigmentada da malar das voluntárias (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.

6.8.8.2 Espessura do estrato córneo

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas diferenças significativas na espessura do estrato córneo após 56 dias de tratamento, em relação aos valores basais, para ambos os grupos avaliados, conforme ilustrado na Figura 46.

Figura 46: Espessura do estrato córneo na região malar das voluntárias (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.

6.8.8.3 Espessura da epiderme viável

Não foram identificadas alterações significativas na espessura da epiderme viável, na região malar das voluntárias, após 56 dias de tratamento com a formulação F04 (veículo) e com a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol). Estes resultados podem ser observados na Figura 47.

Figura 47: Espessura da epiderme viável na região malar das voluntárias (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.

6.8.8.4 Profundidade das papilas dérmicas

Os resultados da análise da profundidade das papilas dérmicas não demonstraram diferenças significativas, na região malar das voluntárias de ambos os grupos avaliados, após 56 dias de tratamento em relação aos valores basais, conforme observado na Figura 48.

Figura 48: Profundidade das papilas dérmicas na região malar das voluntárias (média $\pm$ DP) antes da aplicação das formulações (Basal) e após 28 e 56 dias de tratamento.

As características estruturais e morfológicas da pele avaliadas neste trabalho podem ser observadas na Figura 49.

Figura 49 - Imagens obtidas da região malar de uma pele envelhecida pela técnica de microscopia confocal de reflectância

A) Estrato córneo, B) Camada granulosa, C) Camada espinhosa, D) Seta: Papila dérmica

7. DISCUSSÃO

Atualmente observa-se um aumento no interesse dos consumidores por cosméticos elaborados com ingredientes obtidos de fontes naturais como óleos, extratos e ceras vegetais, justificado pela preocupação no uso de produtos sustentáveis e menos agressivos ao meio ambiente (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

O presente estudo visou ao desenvolvimento de formulações cosméticas contendo matérias-primas de origem vegetal, bem como avaliar sua estabilidade por comportamento reológico e perfil de textura, além de investigar sua eficácia clínica.

A seleção das matérias-primas de origem vegetal foi realizada a partir dos resultados de pesquisa em bancos de dados de patentes. Esta abordagem contribui na identificação de tendências tecnológicas e na prevenção de duplicação em pesquisas inovadoras (PEREIRA; DA SILVA; PORTO, 2015). Em outras palavras, é uma fonte de pesquisa complementar ao conhecimento científico para o desenvolvimento de produtos cosméticos inovadores.

O levantamento no banco de dados de patentes confirmou que existe uma oportunidade para inovação em cosméticos contendo ingredientes de origem vegetal, uma vez que o depósito de patentes nessa categoria cresceu nos últimos 10 anos.

A pesquisa também evidenciou um maior depósito de patentes cosméticas para o tratamento da pele com ação clareadora e antienvelhecimento, o que pode estar relacionado ao aumento na idade média da população mundial e ao desejo da manutenção da aparência jovem (KAMMEYER; LUITEN, 2015).

Além da análise de patentes, o desenvolvimento das formulações foi pautado na pesquisa bibliográfica sobre as propriedades das possíveis matérias-primas. Tal pesquisa é fundamental para a escolha dos ingredientes utilizados, bem como para definir as quantidades relativas para a obtenção de formulações estáveis e com sensorial agradável, preferencialmente contendo a maior quantidade de ingredientes de origem vegetal, objetivo deste projeto.

Nesse trabalho, utilizou-se uma base autoemulsionante rica em ingredientes de origem vegetal (Emulfeel SGP - *Helianthus annuus* seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, *Euphorbia cerifera* Wax, Sodium Hydroxide), glicerina vegetal, óleos vegetais de macadâmia, oliva e girassol que

contribuíram para a obtenção das formulações contendo maiores quantidades de ingredientes de origem vegetal, objetivo deste estudo.

A incorporação do polímero hidrofílico (Amigel - *Sclerotidium gum*) foi importante na obtenção de formulações estáveis uma vez que o aumento na viscosidade da formulação proporcionou uma redução na movimentação das gotículas na fase interna das emulsões prevenindo sinais de instabilidade como a coalescência (BILLANY, 2008).

Definidas as formulações, determinou-se seu comportamento através das análises de textura. Nesta investigação, a adição de óleo vegetal conferiu uma melhora na espalhabilidade do produto final por meio da redução do trabalho de cisalhamento. A capacidade de emolientes, como os óleos vegetais, de influenciarem as características físicas de formulações cosméticas como a espalhabilidade já foi relatada em estudos anteriores (PARENTE; GAMBARO; ARES, 2008).

Observou-se também que a amostra F04, contendo óleo de girassol, demonstrou valores mais elevados de firmeza, índice de consistência, índice de viscosidade e coesividade, quando comparada às outras emulsões. Tal resultado poderia favorecer a estabilidade sem prejudicar o sensorial ao dificultar a movimentação das partículas dispersas na emulsão, conforme demonstrado pela análise de textura.

Os resultados de textura obtidos para a formulação FF07 mostraram que a adição de filtros solares não alterou os parâmetros firmeza, coesividade e os índices de consistência e viscosidade da formulação, prejudicando, no entanto, sua espalhabilidade. O aumento no trabalho de cisalhamento pode ser atribuído à presença do filtro dióxido de titânio, suspenso na emulsão como partícula insolúvel (NASU; OTSUBO, 2007).

Em relação à adição de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, os resultados desta análise mostraram uma redução na firmeza e na coesividade em todas as concentrações avaliadas. Em termos de índices de viscosidade e consistência, apenas a formulação FH1, contendo 0,2% do extrato de oliva, não demonstrou alteração frente a adição do extrato. Tal resultado sugere que esta concentração produz um sistema emulsionado mais estável em relação às

formulações FH2, contendo 0,5% de extrato de oliva e FH3, contendo 1,0% de extrato de oliva.

A influência de extratos vegetais na consistência de formulações cosméticas já foi observada em outro estudo e, possivelmente, ocorre pela interação entre o extrato e o agente doador de viscosidade (KARSHEVA; GEORGIEVA, 2010). Desta forma, sua utilização em associação com óleos vegetais pode, de fato, impactar no sensorial do produto final, como sugerido neste trabalho.

A despeito das técnicas de análise de textura indicarem de maneira satisfatória a percepção de uma amostra na pele, esses métodos não conseguem mimetizar completamente o sensorial humano. Dessa forma, faz-se necessária a análise sensorial para, em conjunto com a análise de textura, proporcionar amplo conhecimento sobre as características de um cosmético (PARENTE; GÁMBARO; ARES, 2008; SHIRATA; MAIA CAMPOS, 2016).

A análise sensorial da formulação contendo óleo de girassol (F04), apresentou maior aceitação entre as voluntárias que participaram do estudo, confirmando os resultados obtidos na análise da textura. Contudo os parâmetros trabalho de cisalhamento e consistência não mostraram diferenças significativas nesta avaliação.

Além da comprovação da eficácia, o sucesso no desenvolvimento de novas formulações cosméticas exige estabilidade, especialmente em emulsões contendo extratos vegetais de composição complexa. Nestes casos, estudos de avaliação de estabilidade acelerada permitem verificar a capacidade da emulsão em manter-se uniforme ao longo do tempo.

Nesse trabalho, o estudo de estabilidade acelerado foi feito para a triagem das formulações por meio da avaliação de características organolépticas, como alterações de cor e odor, e propriedades físico-químicas, como separação de fases, alterações no pH e viscosidade (BRASIL, 2004).

Todas as formulações desenvolvidas apresentaram oscilações nos valores de pH ao longo do período de armazenamento, no entanto mantiveram-se entre 5,18 - 5,20, compatível com o pH da pele levemente ácido (SCHMID-WENDTNER et. al, 2006). Além disso, o pH das formulações permaneceu dentro do pH de estabilidade para o extrato de oliva, entre 4,00 – 8,00. Entre as

formulações contendo o extrato de oliva, observou-se uma menor oscilação de pH na formulação contendo 0,2% do ingrediente (FH1), em relação às formulações contendo 0,5% (FH2) e 1,0% (FH3).

As análises reológicas mostraram uma queda brusca na viscosidade aparente da formulação FH3 (1%) armazenada a 45°C, a partir do 14º dia do estudo para a amostra armazenada a 45°C indicando perda da estabilidade.

Além disso, os reogramas da formulação FH3 demonstraram as maiores variações ao longo do tempo de armazenamento nas temperaturas avaliadas, confirmando a ocorrência de alteração mais intensas na estrutura desta formulação em relação às demais avaliadas.

Com base na avaliação dos reogramas e da análise da viscosidade aparente, índice de consistência e índice de fluxo, a formulação FH1, contendo 0,2% de extrato de oliva, foi aquela que apresentou as menores variações em função do tempo e das temperaturas de armazenamento e, portanto, foi considerada a formulação com melhor estabilidade, suportando as observações obtidas na análise de textura.

A formulação contendo filtros solares (FF07) não apresentou redução dos parâmetros viscosidade aparente, índice de consistência e índice de fluxo sendo, portanto, considerada estável.

Todas as amostras mantiveram o comportamento pseudoplástico, com índices de fluxo inferiores a 1, e tixotrópico, durante todo o estudo de estabilidade acelerado. O comportamento tixotrópico é interessante para formulações cosméticas uma vez que favorecem as etapas de processamento e envase durante sua produção, além de facilitar a aplicação do produto pela pele. Isso acontece porque apresentam redução de viscosidade com a aplicação de uma tensão de cisalhamento, e recuperação após cessada a tensão (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

O estudo clínico dos efeitos imediatos da aplicação das formulações possibilita observar a influência dos ingredientes utilizados na formulação sobre a hidratação, função barreira e oleosidade.

Os resultados demonstraram que tanto o veículo quanto a formulação contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol (FH1) aumentaram a umectação da pele após 2 hora da aplicação, sem contudo apresentar diferença

entre elas. Adicionalmente, não houve alteração na hidratação da formulação contendo filtros solares.

Foi observada uma redução significativa da TEWL após aplicação de todas as formulações, indicando a capacidade das emulsões de proteção à barreira dérmica, independentemente da presença do extrato de oliva e dos filtros solares.

Estes resultados sugerem que o veículo foi eficaz na hidratação imediata da pele e pode ser explicado pela presença de ingredientes como cera de candelila e o óleo de girassol que têm a capacidade de formação de filme hidrofóbico na pele.

Além disso, o óleo de girassol apresenta potencial protetor à barreira dérmica conhecido, uma vez que sua composição é rica em ácido linoleico que integra o manto lipídico do estrato córneo e pode contribuir na manutenção da eudermia (MSIKA; PICCARDI; CHOULOT, 2005; MAVER *et. al.*, 2015).

Além da investigação dos efeitos imediatos, a eficácia das formulações foi avaliada em estudo clínico de longo prazo.

Em relação à avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, foi observado aumento significativo do mesmo na região malar após 28 dias de tratamento com a formulação contendo extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol (FH1) e 56 dias após o início do tratamento com a formulação veículo.

Os resultados obtidos sugerem que o extrato de oliva promoveu um efeito persistente na hidratação da pele devida à possível presença de polissacarídeos pécticos, xiloglucanos e glucoroxilanas, compostos descritos em extratos polares de *Olea europae* e cuja estruturas são higroscópicas (Lama-Muñoz *et al.*, 2012; Rodriguez, Pimentel e Oliveira, 2015).

Também foi observada uma redução transitória significativa da perda de água transepidérmica na região malar após os 28 dias de tratamento no grupo que recebeu a formulação veículo. Já a avaliação na região anterior dos antebraços mostrou que ocorreu um aumento da perda transepidérmica na região controle do grupo que recebeu o tratamento com o veículo após 56 dias. O mesmo não foi observado na região dos antebraços tratada com o veículo.

Estes resultados indicam que a formulação veículo atuou na manutenção da integridade da barreira dérmica após 56 dias de tratamento.

Além dos parâmetros clínicos hidratação, função barreira e oleosidade, foi realizada a análise da eficácia das formulações por meio da microscopia confocal de

reflectância, que permite a avaliação detalhada do padrão de pigmentação da pele por meio da análise do brilho papilar emitido pelo acúmulo de melanina nessa região (LAGARRIGUE et al., 2012). Nas condições experimentais deste estudo não foi possível detectar melhora significativa do clareamento da pele.

A análise das imagens de alta resolução das regiões hiperpigmentadas na face das voluntárias, também não mostrou clareamento significativo.

De acordo com Pandya et al. (2006) o tempo mínimo para se observar o efeito de tratamentos com ingredientes despigmentantes é de 56 dias porém, dependendo da substância o tempo de tratamento pode se estender até 16 semanas (112 dias).

Assim, pode ser necessário um estudo com duração superior a 56 dias para se observar o efeito do extrato de oliva no clareamento da pele.

Haja vista que a pele envelhecida é caracterizada pela presença de uma epiderme fina e um achatamento das papilas dérmicas (LONGO, 2011) e que produtos contendo ingredientes ativos com atividade antioxidante poderiam atuar na epiderme, a aplicação das formulações em estudo não alterou a espessura do estrato córneo e da epiderme viável e não atuou na profundidade das papilas dérmicas.

Em relação à análise da relação de ecogenicidade da derme, não foram observadas diferenças significativas após a aplicação das formulações avaliadas, indicando que não houve alteração na quantidade de componentes na derme após o tratamento com as formulações (ULRICH et. al, 2014; UNHOLZER; KORTING, 2002).

De acordo com Dobrev (2014) a avaliação da elasticidade biológica (U_r/U_f) é um dos melhores parâmetros para a análise da elasticidade cutânea uma vez que leva em consideração também a porção viscoelástica da pele.

Tal parâmetro está relacionado à habilidade da pele em retornar a sua posição inicial após sofrer uma deformação e encontra-se reduzido tanto na pele foto envelhecida quanto na envelhecida por fatores cronológicos (DOBREV, 2014).

A análise da elasticidade biológica mostrou que a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol) melhorou o parâmetro avaliado na região malar das voluntárias ao final dos 56 dias tratamento, sugerindo melhora na propriedade viscoelástica da pele. Porém, o mesmo não foi observado com a formulação F04 (veículo).

A região controle, nos antebraços, também demonstrou uma redução significativa da elasticidade biológica, sugerindo que pode haver uma influência de fatores externos ou intrínsecos ao organismo das voluntárias nestes resultados.

A deformação residual da pele ($R1 = U_f - U_a$) é um parâmetro que aumenta com o avanço da idade (DOBREV, 2014) e a partir dos resultados obtidos é possível identificar uma redução significativa em seus valores no grupo que recebeu o tratamento com a formulação FH1 (veículo acrescido de extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol), na região malar após 56 dias de tratamento, confirmando os resultados observados na avaliação da elasticidade biológica.

Em síntese, a adição de óleo vegetal de girassol às formulações possibilitou o desenvolvimento de emulsões com sensorial e textura agradáveis. A adição do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol na concentração de 0,2% possibilitou o desenvolvimento de uma formulação cosmética estável. Os estudos clínicos mostraram que a formulação contendo a associação de óleo vegetal de girassol e extrato de oliva foi eficaz para a hidratação imediata e na melhora viscoelasticidade da pele na região malar.

Finalizando, o presente trabalho contribuiu para o desenvolvimento de formulações cosméticas à base de ingredientes de origem natural estáveis, com perfil de textura e sensorial diferenciado, bem como mostrou a importância da avaliação da eficácia clínica de tais formulações na melhora das condições da pele fotoenvelhecida.

8. CONCLUSÃO

Nos condições experimentais deste trabalho, foi possível concluir que:

Os resultados da análise de patentes mostraram que existem oportunidades para inovação no desenvolvimento de formulações cosméticas contendo ingredientes de origem vegetal, ressaltando a importância dessa área.

As análises sensorial e de textura mostraram que o óleo vegetal de girassol apresentou melhor perfil para o desenvolvimento de formulações tópicas.

Tendo em vista que ingredientes de origem vegetal podem impactar no sensorial de produtos cosméticos, o conhecimento de sua influência é fundamental para o desenvolvimento racional de formulações estáveis e com características favoráveis ao uso.

Por fim, os resultados obtidos no estudo clínico mostraram que as formulações desenvolvidas atuaram na manutenção da barreira dérmica. A adição de 0,2% de extrato de oliva à formulação hidratou a pele de forma significativa após 28 dias de tratamento e atuou na melhora da viscoelasticidade na região malar após 56 dias de tratamento. Estes dados ressaltam o potencial dos ingredientes de origem vegetal para a proteção da pele contra os sinais do fotoenvelhecimento.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P.J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v.11, n.7, p.36-42, 2004.

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants used in cosmetics. **Phytotherapy Research**, v.17, n.9, p.987-1000, 2003.

BADEA, G. et al. Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v.67, p.18-24, 2015.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in dermatology**, v.30, n.3, p.257-262, 2012.

BASF Sunscreen Simulator. Disponível em: <https://www.sunscreensimulator.basf.com/Sunscreen_Simulator/Login_show.action>. Acesso em: 18 jul. 2015.

BAUMANN, L.; WEISBERG, E. Olive oil in botanical cosmeceuticals. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. **Olives and olive oil in health and disease prevention**. 1 Ed. Elsevier Inc, 2010. cap.122, p.1117-1124.

BERDICK, M. The role of fats and oils in cosmetics. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v.49, n.7, p.406-408, 1972.

BERNEBURG, M.; PLETTENBERG, H.; KRUTMANN, J. Photoaging of human skin. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.16, n.6, p.239-244, 2000.

BIELFELDT, S.; BÖHLING, A.; WILHERLM, K. P. Bioengineering method to assess aging parameters in the deep of the skin. **SOFW Journal**, v 137, p.2-9, 2011.

BOURNE M. C. Texture, viscosity and food. In: BOURNE M. C. **Food texture and viscosity**. 2 Ed. Elsevier Inc, 2002. cap.1, p.1-32.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 jan. 2013. Seção 1, p.59-62.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília. v.1, 52p., 2004.

BRENNER, A. V. et al. Instrumental measurements of skin color and skin ultraviolet light sensitivity and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in an Italian population. **American Journal of Epidemiology**, v.156, n.4, p.353-362, 2002.

CAETANO, L. et al. Reliable assessment of forearm photoageing by high-frequency ultrasound: a cross-sectional study. **International Journal of Cosmetic Science**, v.38, n.2, p.170-177, 2015.

CASTRO, C. E. Marcas ecologicamente corretas. **Temática**, v.11, n.7, p.155-169, 2015.

CHIBA, T. Whitening effect of hydroxytyrosol containing Oleaceae plants. **Fragrance Journal**, v.32, n.8, p.41-48, 2004.

CHOI, E. H. Changes of skin barrier with aging. In: QUAN, T. **Molecular mechanisms of skin aging and age-related diseases**. 1 Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2016. cap.3, p.61-89.

CICERALE, S. et al. Chemistry and health of olive oil phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.49, n.3, p.218-236, 2008.

CORRÊA, M. A. Matérias-primas - Classificação e Escolha. In: CORRÊA, M. A. **Cosmetologia Ciência e Tecnologia**. 1 Ed. São Paulo: Medfarma, 2012. cap.2, p.134-160.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.73-78, 2005.

COURAGE, K.; KAZAKHA, G. **Information and operation instruction for multi probe MPA adapter and its probe**. 2009

CROWTHER, J. M. Method for quantification of oils and sebum levels on skin using the Sebumeter®. **International Journal of Cosmetic Science**, v.38, n.2, p.210-216, 2015.

D'ISCHIA, M. et al. Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. **Pigment Cell Melanoma Research**, v.28, n.5, p.520-544, 2015.

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 Research and Technology**, v.12, n.2, p. 241-246, 2006.

DE OLIVEIRA, L. et al. Informação de patentes: ferramenta indispensável para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico. **Química Nova** v. 28, p.36, 2005.

DELSIN, S. D.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Hair care formulations containing argan oil: development, stability and texture profile. **Biomedicine Biopharmaceutical**. v.12, n.2, p.233-242, 2015.

DOBREV, H. Skin Mechanics. In: Berardesca, E; Wilhelm, K. P.; Maibach, H. **Non invasive diagnostic techniques in clinical dermatology**. 1 Ed. Springer Berlin Heidelberg, 2014. cap.29, p.315-366.

DOBREV, H. Use of Cutometer to assess epidermal hydration. **Skin Research and Technology**, v.6, n.4, p.239-244, 2000.

ELSNER, P. et al. Anti-aging data and support claims—consensus statement. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.9, n.s3, p.S1-S32, 2011.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v.124, n.6, p.869-871, 1988.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.

FONSECA-SANTOS, B.; CORRÊA, M. A.; CHORILLI, M. S. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.51, n.1, p.17-26, 2015.

GARBOSSA, W. A. C.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. *Euterpe oleracea*, *Matricaria chamomilla*, and *Camellia sinensis* as promising ingredients for development of skin care formulations. **Industrial Crops and Products**, v.83, p.1-10, 2016.

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

GERHARDT, L. C. et al. Skin–textile friction and skin elasticity in young and aged persons. **Skin Research and Technology**, v.15, n.3, p.288-298, 2009.

GIAM, Y. C. et al. A review on the role of moisturizers for atopic dermatitis **Asia Pacific Allergy**, v.6, n.2, p.120-128, 2016.

GIANETI, M. D.; MERCURIO, D. G.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. The use of green tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient. **Dermatologic Therapy**, v.26, n.3, p.267-271, 2013.

GILBERT, L. et al. Predicting sensory texture properties of cosmetic emulsions by physical measurements. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.124, p.21-31, 2013.

GILLBRO, J. M.; OLSSON M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches. **International Journal of Cosmetic Science**, v.33, n.3, p.210-221, 2011.

GNIADECKA, M.; JEMEC, G. B. E. Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo: studies on skin echogenicity and thickness. **British Journal of Dermatology**, v.139, p.815-821, 1998.

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.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v.30, n.1, p.206-213, 2007.

HANDOG, E. B.; DATUIN, M. S. L.; SINGZON, I. A. An open-label, single-arm trial of the safety and efficacy of a novel preparation of glutathione as a skin-lightening agent in Filipino women. **International Journal of Dermatology**, v.55, n.2, p.153-157, 2016.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) - Guia da IPC - 2012. In: Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2012.

ISAAC, V. et al. Aplicação de Produtos Naturais Bioativos em Cosméticos: Avaliação de sua segurança e eficácia In: SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; AMORIN, M. R. **Produtos Naturais Bioativos**. 1 Ed. São Paulo: Cultura América, 2015 cap.10, p.355-476.

JASAITIENE, D. et al. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology, **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.25, p.375-382, 2011.

JUNQUEIRA I. C.; CARNEIRO J. Pele e anexos. In: JUNQUEIRA I. C.; CARNEIRO. **Histologia básica**, 12 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2013. cap.18, p.354-365.

KAI-DI, H et al. Extract of *Ganoderma formosanum* mycelium as a highly potent tyrosinase inhibitor. **Scientific Report**. v.6, article number 32854, 2016.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v.21, p.16-29, 2015.

KANG, H. Y.; BAHADORAN, P.; ORTONNE, J. Reflectance confocal microscopy for pigmentary disorders. **Experimental Dermatology**, v.19, n.3, p.233-239, 2010.

KARSHEVA, M.; GEORGIEVA, S. Flow properties of phytocosmetic formulations. Effect of plant extracts and thickeners. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v.63, n.12, p.1725-1732, 2010.

LAGARRIGUE, S. G. et al. In vivo quantification of epidermis pigmentation and dermis papilla density with reflectance confocal microscopy: variations with age and skin phototype. **Experimental Dermatology**, v.21, n.4, p.281-286, 2012.

LAMA-MUÑOZ, A. et al. Production, characterization and isolation of neutral and pectic oligosaccharides with low molecular weights from olive by-products thermally treated. **Food Hydrocolloids**, v.28, n.1, p.92-104, 2012.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R. Application of a non-invasive method to study the moisturizing effect of formulations containing vitamins A or D. **Journal of Cosmetic Science**, v.53, p.263-268, 2002.

LONGO, C. et al. New directions in dermatopathology: in vivo confocal microscopy in clinical practice. **Dermatologic Clinics**, v.30, n.4, p.799-814, 2011.

LONGO, C. et al. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.68, n.3, p.e73-e82, 2012.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G. et al. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, p.580-586, 2012.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; SILVA, M. G. Ascorbic acid and its derivatives in cosmetic formulations. **Cosmetics and Toiletries**, v.115, n.6, p.59-62, 2000.

MAJDZADEH, A. et al. Real-time visualization of melanin granules in normal human skin using combined multiphoton and reflectance confocal microscopy. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.31, n.3, p.141-148, 2015.

MARIOTTI, C., 2008, Reologia, in: AULTON, M. E., trad. ORTEGA, G. G., et al. 2 Ed. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Artmed. Porto Alegre. p. 56-73.

MARTÍNÍNEZ-DOMÍNGUEZ, E.; DE LA PUERTA, R.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V. Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. **Inflammation Research**, v.50, n.2, p.102-106, 2001.

MAVER, T. et al. A review of herbal medicines in wound healing. **International Journal of Dermatology**, v.54, n.7, p.740-751, 2015.

MCDONALD, S. et al. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, v.73, n.1, p.73-84, 2001.

MCFADDEN, J. P. et al. The cosmetic allergy conundrum: inference of an immunoregulatory response to cosmetic allergens. **Contact Dermatitis**, v.69, n.3, p.129-137, 2013.

MERCÚRIO, D. G. et al. Clinical scoring and instrumental analysis to evaluate skin types. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.38, p.302-309, 2013.

MERCURIO, D. G. et al. Morphological, structural and biophysical properties of French and Brazilian photoaged skin. **British Journal of Dermatology**, v.174, n.3, p.553-561, 2016.

MERCURIO, D. G.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Reflectance confocal microscopy as a support for the clinical evaluation of the changes caused by aging skin. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v.7, p.236-240, 2015.

MSIKA, P. et al. Washing oil: a new concept in the management of atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, n.3, p.75, 2005.

MUKHERJEE, P. K. et al. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v.19, n.1, p 64-73, 2011.

NASU, A; OTSUBO, Y. Rheology and UV-protecting properties of complex suspensions of titanium dioxides and zinc oxides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.310, n.2, p.617-623, 2007.

NIKOLAKIS, G.; MACRANTONAK, E.; ZOUBOULIS, C. C. Aging Skin: A window to the dody. In: QUAN, T. **Molecular mechanisms of skin aging and age-related diseases**. 1 Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2016. cap.11, p.200-227.

O'DOWD, Y. O. et al. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v.68, n.10, p.2003-2008, 2004.

OHBAYASHI, N.; FUKUDA, M. Role of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics. **Journal of Biochemistry**, v.151, n.4, p.343-351, 2012.

OHSHIMA, H. et al. Use of Cutometer area parameters in evaluating age-related changes in the skin elasticity of the cheek. **Skin Research and Technology**, v.19, n.1, p.e238-e242, 2013.

OMPI. Organização Mundial da Propriedade Intelectual, Intellectual Property Handbook: Policy, Law and Use. In: World Intellectual Property Organization, 2015.

OWEN, R. W. et al. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v.36, n.10, p.1235-1247, 2000.

PANAHI, Y. et al. Comparative trial of *Aloe vera*/olive oil combination cream versus phenytoin cream in the treatment of chronic wounds. **Journal of Wound Care**, v.24, n.10, p.459-465, 2015.

PANDYA, A. et al. Guidelines for clinical trials in melasma. **British Journal of Dermatology**, v.156, n.s1, p.21-28, 2006.

PARENTE, M. E.; ARES, G.; MANZONI, A. V. Application of two consumer profiling techniques to cosmetic emulsions. **Journal of Sensory Studies**, v.25, n.5, p.685-705, 2010.

PARENTE, M. E.; GAMBARO, A.; ARES, G. Sensory characterization of emollients. **Journal of Sensory Studies**, v.23, n.2, p.149-161, 2008.

PARK, S. B.; SUH, D. H.; YOUN, J. I. A long-term time course of colorimetric evaluation of ultraviolet light-induced skin reactions. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.24, p.315-320, 1999.

PATEL, N. et al. Newer trends in cosmetology. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.4, n.3, p.483-502, 2015.

PENSÉ-LHÉRITIER, A. M. Recent developments in the sensorial assessment of cosmetic products: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v.37, n.5, p.465-473, 2015.

PEREIRA, C. G. et al. The scientific information provided through patents and its limited use in scientific research at universities. **Brazilian Journal of Science and Technology**. v.2, n.1, p.1-11, 2015.

PIÉRARD, G. E.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; QUATRESOOZ, P. Field melanin mapping of the hairless scalp. **Skin Research and Technology**, v.18, n.4, p.431-435, 2012.

POON, F.; KANG, S.; CHIEN, A. L. Mechanisms and treatments of photoaging. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v.31, n.2, p.65-74, 2015.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, n.12, p.1063-1072, 2008.

PUERTA, R.; MARTINEZ-DOMÍNGUEZ, E.; RUÍZ-GUTIÉRREZ, V. Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.55, n.9-10, p.814-819, 2000.

RABE, J. H. et al. Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.55, n.1, p.1-19, 2006.

RAMOS-E-SILVA, M. et al. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v.31, n.6, p.750-758, 2013.

RAPOSO, G.; MARKS, M. S. Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, n.10, p.786-797, 2007.

RODRIGUES, F.; PIMENTEL, F. B.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Olive by-products: challenge application in cosmetic industry. **Industrial Crops and Products**, v.70, p.116-124, 2015.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.14, n.1, p.47-63, 2015.

SALUCCI, S. et al. Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.141, p.1-9, 2014.

SANTOS A. G. et al. Fitocósméticos. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. 1 Ed. Ouro Preto: UFOP, 2011. cap. 1, p.19-68.

SARSOUR, E. H. et al. MnSOD activity regulates hydroxytyrosol-induced extension of chronological lifespan. **Age**, v.34, n.1, p. 95-109, 2012.

SAUERMAN, K. et al. Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. **Skin Research and Technology**, v.8, n.1, p.52-56, 2002.

SCHMID-WENDTNER, M. H., et al. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology And Physiology**. v.19, p.296-302, 2006.

SHIRATA, M. M. F.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Importância do perfil de textura e sensorial no desenvolvimento de formulações cosméticas. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v.8, n.3, p.223-230, 2016.

SHIROMA, P. H. **Estudo do comportamento reológico de suspensões aquosas de bentonita e CMC: influência da concentração de NaCl**. 2012, 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SMERIGLIO, A.; GIOVINAZZO, C.; TROMBETTA, D. Development and validation of rp-hplc-dad method to quantify hydroxytyrosol content in a semi-solid pharmaceutical formulation. **Medicinal Chemistry**, v.5, p.442-446, 2015.

SOLANO, F. et al. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Research**, v.19, n.6, p.550-571, 2006.

TAI, A.; BIANCHINI, R.; JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. **International Journal Of Cosmetic Science**, v.36, n.4, p.291-304, 2014.

TAKEMA, Y. et al. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. **British Journal of Dermatology**, v.131, n.5, p.641-648, 1994.

TASIOULA-MARGARI, M.; TSABOLATIDOU, E. Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Antioxidants**, v.4, n.3, p 548-562, 2015.

TUNDIS, R. et al. Potential role of natural compounds against skin aging. **Current Medicinal Chemistry**, v.22, n.12, p.1515-1538, 2015.

ULRICH, J. et al. Sonographic diagnostics in dermatology. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.12, n.12, p.1083-1099, 2014.

UNHOLZER, A.; KORTING, H. C. High-frequency ultrasound in the evaluation of pharmacological effects on the skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.15, n.2, p.71-84, 2002.

VERDIER-SÉVRAIN, S.; BONTÉ, F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.6, n.2, p.75-82, 2007.

WAGEMAKER, T. A. L. et al. Evaluation of the sensory properties of a cosmetic formulation containing green coffee oil. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v.10, n.1, p.101-108, 2013.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal Of Infection Control**, v.34, n.10, p.S98-S110, 2006.

WORTEL, V. A. L.; WIRCHERS, J. W. Skin sensory performance of individual personal care ingredients and marketed personal care products. **Food Quality And Preference**, v.11, n.1, p.121-127, 2000.

10. ANEXOS

Anexo A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de Formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem.

Pesquisador: Francine Celise Siqueira César

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50813915.3.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.418.673

Apresentação do Projeto:

Não houve modificações.

Objetivo da Pesquisa:

Não houve modificações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve modificações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não houve modificações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi modificado, atendendo às solicitações do CEP.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Endereço: Avenida do café s/nº
 Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-903
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.418.673

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado "ad referendum" do CEP/FCFRP em 22/02/2016. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". Sugerimos que o TCLE seja apresentado ao sujeito da pesquisa em documento impresso frente e verso.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_604717.pdf	17/12/2015 00:02:39		Aceito
Outros	carta_reenvio.pdf	16/12/2015 23:59:42	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Outros	fichadeavaliacao.pdf	16/12/2015 23:51:19	Francine Celise Siqueira César	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/12/2015 23:21:09	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	27/10/2015 11:00:25	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Outros	declaracaodomedico.pdf	13/10/2015 14:19:59	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	13/10/2015 14:17:06	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Folha de Rosto	paginaderosto.pdf	13/10/2015 14:16:33	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodeciencia.pdf	13/10/2015 10:08:47	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	13/10/2015 10:07:16	Francine Celise Siqueira César	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	13/10/2015 10:06:51	Francine Celise Siqueira César	Aceito

Endereço: Avenida do café s/n°

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcfrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.418.673

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 22 de Fevereiro de 2016

Assinado por:

Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador)

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

Anexo B: Especificações técnicas do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol **PRODUCT SPECIFICATIONS**

FEBRUARY -14
REV -0

C20+ (Cobiolive)

Method	Description	MIN	MAXI
	ASPECT	Syrupy liquid	
	COLOR	Dark Brown	
	ODOR	Characteristic	
B001	MICROBIOLOGICAL CONTROL Total Germs	<50 CFU	
B002	MICROBIOLOGICAL CONTROL Pathogens	Absent	
L014	PH (pure product)	4,20	5,80
L170	DRY EXTRACT (5 gr. - 120 °C - 1h)	70,00	80,00 %
L025	DENSITY at 20 °C	1,180	1,122
L015	INFRA RED SPECTRUM (NaCl)	Conforms to standard	
L013	ULTRA-VIOLET SPECTRUM (water sol. at 0,01% at 280 (+/-2) nm)	Conforms to standard	
L726	HYDROXYTYROSOL CONTENT (HPLC)	>20%	

NI-C20+-00