UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Estudo da correlação instrumental e sensorial de uma
composição aromática aplicada na pele em função do ciclo
menstrual**

Claudia Silva Cortez Pereira da Costa

Defesa de Tese para obtenção do
grau de DOUTOR

Orientador:
Prof^a Dr^a Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pereira, Claudia Silva Cortez

P436es Estudo da correlação instrumental e sensorial de uma composição
aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual / Claudia
Silva Cortez Pereira. -- São Paulo, 2013.
190p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

1. Perfume : Análise sensorial : Cosmetologia 2. Ciclo menstrual :
Fisiologia humana 3. Hormônio sexual : Fisiologia humana
4. Espectrometria de massa : Química analítica I. T. II. Velasco,
Maria Valéria Robles, orientador.

668.54 CDD

Estudo da correlação instrumental e sensorial de uma composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual

Comissão Julgadora da
Defesa de tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Dr^a Maria Valéria Robles Velasco
Orientador/Presidente

1º. examinador – Presidente

4º examinador

2º. examinador

5º examinador

3º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Dedico este trabalho,

À **Deus** pelo conhecimento e por me iluminar a cada decisão da minha vida

Ao meu esposo **Sérgio**, amor da minha vida, pela paciência, pela cumplicidade e por estar ao meu lado em todos os momentos

Ao meu filho **Guilherme**, maior realização da minha vida, que me acompanhou durante todas as etapas deste projeto

Aos meus pais **Jairo e Claudete** por tudo que me ensinaram, por todas as emoções que passamos juntos, tristezas, alegrias e por estarem ao meu lado na realização deste sonho

Ao meu irmão **Kleber**, que mesmo longe, guardo as lembranças dos bons momentos que passamos juntos, obrigada pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Assoc Maria Valéria Robles Velasco, pela oportunidade, pela orientação, pelo apoio durante todo o desenvolvimento do Mestrado e Doutorado em todas as etapas do projeto ao longo desses anos buscando o melhor delineamento para o estudo.

Ao Prof^o Dr^o Paulo H. Moreno, meu co-orientador, que trouxe o seu conhecimento e destreza na área analítica, que me suportou trazendo a coerência e a realização na transformação dos dados do trabalho com o talento do Prof^o Dr^o Marcus Tullius Scotti.

A minha amiga Maria Helena Van Kampen, pela paciência e comprometimento, pelo seu conhecimento na área cromatográfica de fragrâncias, que possibilitou as análises e transformação dos dados.

A Givaudan do Brasil pelo patrocínio de todos os testes realizados e por permitir o desenvolvimento do mestrado e doutorado durante esses anos.

A Medcin Clínica da Pele, pelo estudo clínico realizado, pelo gerenciamento das voluntárias participantes

À Claudinéia e ao Edgar pela amizade e ajuda nas questões burocráticas e no suporte nas monitorias de aula.

A Dra Flávia Addor e a Christiane Agelune da Medcin Clínica da Pele, pelo empenho e dedicação durante a realização de todo o estudo clínico.

A todos os meus colegas de trabalho, da empresa e amigos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho

“Pensar é esforço e inconformismo, pensar é duvidar e criticar...pensar é ter tempo de poder fazê-lo. Pensar não é repetir ou reproduzir. Pensar é ativar o que há de nobre no ser humano, porque pensar é também sentir e intuir...Pensar é viver. Viver é encontrar seu próprio caminho e evitar permanentemente a tentação do fácil...”
(Píndaro)

RESUMO

A área de perfumaria no mundo vem se desenvolvendo a cada dia buscando maior conhecimento das matérias-primas aromáticas, desde suas reações, estabilidade até suas interações com o substrato onde é aplicado, sempre em busca do conhecimento de todas as variáveis que possam influenciar a relação perfume-substrato e a aceitação dos consumidores, medida por meio da avaliação sensorial. Apesar de muitos estudos sobre a relação perfume-pele, poucos envolveram a relação com ciclo menstrual. Neste estudo o objetivo foi correlacionar às análises sensorial e instrumental (medidas biomecânicas e cromatográficas), estudar as matérias-primas aromáticas em função do ciclo menstrual. O estudo envolveu indivíduos com idade entre 18-40 anos: 29 mulheres e 3 homens, estes usados como grupo controle. Cada voluntária teve 40 µl da composição aromática Ciclo 1910 aplicado no antebraço, onde foram feitas as medidas biomecânicas (corneometria, sebumetria e TEWL) nos tempos inicial e 6h. Nos tempos inicial, 1.5h, 3h, 4,5h e 6h se auto-avaliaram sensorialmente a intensidade de perfume por meio de escala sensorial de magnitude rotulada (LMS) e foram coletados os compostos aromáticos liberados pela técnica de *headspace* e analisados por espectrometria com cromatografia a gás e detetor de massa (CGMS). Realizou-se também medidas biomecânicas de corneometria, sebumetria e TEWL interescapulares em 5 voluntárias nos tempos inicial e 6h para comparação. Os resultados obtidos foram que as fases do ciclo não interferiram nas variáveis biomecânicas ($p>0,05$) quando analisadas isoladamente. Para as medidas realizadas no antebraço, os índices de Corneometria ($p<0,001$) e TEWL ($p: 0,011$) na região tratada apresentou média maior que a do controle. A média dos índices de Corneometria e Sebumetria da região do antebraço tratada foi menor ($p<0,001$) que da região interescapular. Na análise cromatográfica não houve um padrão de resposta em diferentes fases do ciclo. As correlações entre a avaliação sensorial e instrumental (cromatografia e propriedades biomecânicas) não observaram nenhum nível de correlação ($p>0,05$). A Cromatografia (dados cromatográficos) foi maior na fase Folicular que nas fases Menstrual e Ovulatória ($p=0,003$), ao considerar como variável resposta em função do ciclo menstrual e da avaliação sensorial. Houve uma forte correlação positiva entre a análise sensorial e a avaliação na pele do homem ($p<0,001$). No entanto, o fator intrínseco do indivíduo Mulher influenciou na resposta, ocasionando grande variabilidade, porém percebeu-se claramente que os hormônios sexuais interferiram na resposta sensorial, cromatográfica e biomecânica da pele.

Palavras-Chave: análise sensorial, propriedades biomecânicas, *headspace*, ciclo menstrual, perfume.

ABSTRACT

The perfumery in the world has been developed everyday bringing more knowledge about aromatic raw-materials, as from chemistry reactions, stability until their interactions with substrate where is applied, always looking for variables could influence in the relation perfume-substrate and consumer acceptability, measured by sensory evaluation. Despite a lot of studies were done on this subject, few involved effects as function of menstrual cycle. The aim of this study was to correlate sensory and instrumental analysis (biomechanical and chromatographic measurements), to study the olfactory profile of raw materials in function of menstrual cycle. The study involved people with 18-40 years old: 29 volunteers, three men, who were used as control group. Each volunteer had 40 μ l of perfume applied on forearm, where were done Biomechanical measurements (Corneometer, Sebumeter and TEWL) at initial and 6h, At time initial, 1.5h, 3h, 4.5h and 6h; they did self-sensory assessment in perfume intensity in own forearm using labeled magnitude scale (LMS) and also where aromatic compounds released were collected by headspace technique spectrometry and gas chromatography with mass detector (CGMS). In addition, it was done biomechanical measurements (Corneometer, Sebumeter and TEWL) on interscapular region at initial and 6h for comparing. Resulting that the phases of the cycle did not affect the biomechanical variables ($p > 0.05$) when analyzed individually. For measurements in the forearm, Corneometry index ($p < 0.001$) and TEWL ($p=0.011$) in the treated area were higher than the control. The average of the Sebumetry, Corneometry indexes of the forearm treated was lower ($p < 0.001$) than the interscapular region. In the analysis of chromatographic, there was a standard response at different stages of the menstrual cycle, however the analysis by individual had no a pattern response to the release of aromatic compounds. The correlations between sensory and instrumental (chromatography and biomechanical properties) did not observe any correlation ($p > 0.05$). But when considering chromatography as the response variable as a function of the menstrual cycle and the sensory evaluation, the follicular phase was higher than the Menstrual and Ovulatory phase ($p=0.003$). There was a strong positive correlation between sensory analysis and evaluation on men skin ($p < 0.001$). However, the intrinsic factor of the individual woman influenced the response, leading to large response variability; however, see clearly that sex hormones interfere in the sensory response, chromatographic and biomechanics of the skin.

Keywords: Sensory Analysis, Biomechanical properties, *headspace*, menstrual cycle, perfume.

OBJETIVOS DO ESTUDO

- Correlacionar as análises sensorial e instrumental (medidas biomecânicas e cromatográficas),
- Estudar o perfil olfativo das matérias-primas em função do ciclo menstrual
- Identificar os ingredientes da composição aromática suscetíveis às oscilações hormonais
- Analisar e comparar as avaliações sensoriais masculinas e femininas na pele da mulher em função do ciclo menstrual
- Avaliar se a alteração olfativa na mulher é predominante àquela de origem fisiológica ocasionada pelos hormônios sexuais na pele

SUMÁRIO

Capítulo 1: Avaliação das Medidas Biomecânicas e do Desempenho da Composição Aromática em Função do Ciclo Menstrual.....	1
Resumo	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. Efeitos dos hormônios na pele	7
3. Medidas biomecânicas para investigação dos efeitos hormonais na pele	9
4. Comparação dos métodos de biometria cutânea	11
5. OBJETIVOS	13
6. MATERIAL, SUJEITOS E MÉTODOS.....	14
6.1 Material.....	14
6.1.1 Solvente	14
6.1.2. Matérias-primas e estudo crítico.....	14
6.2. Sujeitos e Métodos.....	15
6.2.1 Desenho do estudo	15
6.2.2 Tipo de estudo.....	16
6.2.3 Aspectos éticos	17
6.2.4 Tamanho amostral.....	18
6.2.5 Seleção dos sujeitos.....	18
6.2.5.1 Critérios específicos de inclusão	18
6.2.5.2 Critérios específicos de não-inclusão	19
6.2.5.3 Critérios específicos de exclusão	19
6.2.5.4 Exigências requeridas pelo estudo	20
6.2.6 Normas IFRA para a composição aromática	20
6.2.7 Condições experimentais	20
6.2.7.1 Experimento	21
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
7.1 Análises descritivas e exploratórias dos dados	22
7.1.1 Análise descritiva das medidas biomecânicas entre os antebraços controle e tratado	22
7.1.2 Modelos para avaliação dos dados biomecânicos entre os antebraços controle e tratado.	25
7.1.3 Análise descritiva das medidas biomecânicas entre os antebraços e interescapular tratados.	35
7.1.4 Modelos para avaliação dos dados biomecânicos entre os antebraços e interescapular tratados..	38

8. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

Capítulo 2: Emprego da análise de *headspace* e cromatografia a gás /espectrometria de massa de uma composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual

Resumo	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. Análise cromatográfica a gás para caracterização de componentes voláteis	52
2.1 Cromatografia em fase gasosa/ Espectrometria de massa	52
2.2 Análise de <i>Headspace</i>	53
2.3 Avaliação da composição aromática	55
3. OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo Geral	58
3.2 Objetivos Específicos	58
4. MATERIAL, SUJEITOS E MÉTODOS.....	58
4.1 Materiais e Equipamentos	59
4.1.1 Solvente	59
4.1.2 Matérias-primas.....	59
4.1.3 Padrões	60
4.1.4 Equipamentos.....	60
4.1.5 Acessórios.....	60
4.2 Sujeitos.....	61
4.3 Normas IFRA para a composição aromática.....	62
4.4 MÉTODOS	62
4.4.1 Análise de <i>Headspace</i> e por cromatografia a gás.....	62
4.4.1.1 Condições Cromatográficas	65
4.4.1.2 Índice de Kovats	65
4.4.1.3 Análise multivariada dos dados cromatográficos.....	66
4.4.2 Análise das medidas biomecânicas.....	70
4.4.3 Condições experimentais	71
4.4.3.1 Experimento	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 Fórmula CICLO 1910®	74
5.2 Cromatogramas dos componentes voláteis das voluntárias em função do ciclo menstrual.....	77
5.2.1 Componentes voláteis para a composição aromática	78
5.2.2 Componentes voláteis em função do ciclo menstrual	

para as 29 voluntárias.	80
5.2.3 Componentes voláteis em função do ciclo menstrual (voluntárias nº1, 19 e 20).....	81
5.2.4 Tentativa de correlação dos dados cromatográficos com as medidas biomecânicas.....	92
6. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	94

Capítulo 3: Estudo da correlação instrumental e sensorial de uma composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual	98
Resumo	99
1. INTRODUÇÃO	100
2. Efeito da oscilação hormonal, composição aromática e percepção olfativa	101
3. Correlação instrumental e sensorial para avaliação da composição aromática	104
4. OBJETIVOS	106
4.1 Objetivo Geral	106
4.2 Objetivos Específicos	107
5. MATERIAL, SUJEITOS E MÉTODOS.....	107
5.1 Materiais e Equipamentos	108
5.1.1 Solvente	108
5.1.2 Matérias-primas.....	108
5.1.3 Padrões	109
5.1.4 Equipamentos.....	109
5.1.5 Acessórios	109
5.2 MÉTODOS	110
5.2.1 Desenho do estudo	110
5.2.2 Tipo de estudo.....	111
5.2.3 Aspectos éticos	111
5.2.4 Tamanho amostral.....	112
5.2.5 Seleção dos sujeitos.....	113
5.2.5.1 Critérios específicos de inclusão	113
5.2.5.2 Critérios específicos de não-inclusão	113
5.2.5.3 Critérios específicos de exclusão	114
5.2.5.4 Exigências requeridas pelo estudo	114
5.2.6 Normas IFRA para a composição aromática	115
5.2.7 Avaliação Sensorial	115
5.2.8 Análise de <i>Headspace</i> por cromatografia em fase gasosa	116
5.2.9 Análise das medidas biomecânicas.....	117
5.2.10 Correlação da Análise Sensorial e Instrumental.....	117

5.2.11 Modelo Linear Generalizado.....	117
5.2.11.1 Terminologia e Tipos de dados	118
5.2.12 Condições Experimentais.....	119
5.2.13 Experimento	119
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
6.1 Análise descritiva dos dados	123
6.2 Construção do modelo de correlação para a avaliação sensorial em função dos dados cromatográficos.....	130
6.2.1 Análise de correlação instrumental e avaliação sensorial	132
7. CONCLUSÕES	145
REFERÊNCIAS.....	148
ANEXOS	153

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS BIOMECÂNICAS E DO DESEMPENHO DA COMPOSIÇÃO AROMÁTICA EM FUNÇÃO DO CICLO MENSTRUAL EM VOLUNTÁRIOS

Resumo

Recentes estudos têm revelado que os hormônios sexuais estrógeno e progesterona manifestam inúmeros efeitos fisiológicos na pele feminina, como aumento da perda de água transepidermal, do fluxo sanguíneo e do colesterol na pele no pico ovulatório, quando comparado com os outros dias do ciclo. Adicionalmente, existem oscilações na intensidade de percepção do perfume durante as fases do ciclo menstrual, principalmente no pico ovulatório. Nesta pesquisa, avaliaram-se as propriedades biomecânicas por meio de Corneometria (medida de hidratação a pele), Sebumetria (medida da oleosidade da pele) e TEWL (medida da perda de água transepidermal da pele) do antebraço onde foi aplicado 40µl de perfume e da região interescapular, medidos nos tempos inicial e após 6h de aplicação do perfume em 29 voluntárias, nas 4 fases estabelecidas do ciclo menstrual (folicular, ovulatória, lútea e menstrual), com a finalidade de detectar se ocorreriam alterações nas propriedades biomecânicas em função do ciclo menstrual. Nos resultados obtidos, as fases do ciclo não interferiram nas variáveis biomecânicas ($p > 0,05$) quando analisadas isoladamente e a variabilidade da mulher influenciou nas medidas das propriedades biomecânicas ($p < 0,001$). Para as medidas realizadas no antebraço, os **índices de Corneometria** ($p < 0,001$) e **TEWL** ($p: 0,011$) foram superiores na região tratada (perfume aplicado) em relação a controle (antebraço e interescapular sem perfume), onde, demonstrando que pode afetar o desempenho do perfume aplicado na pele. A comparação da região interescapular com a região do antebraço tratada revelou que a média dos **índices de Corneometria e de TEWL** da região do antebraço tratada foi significativamente menor ($p < 0,001$) que da região interescapular ao longo do ciclo menstrual. Nota-se que existiram variações das medidas, entretanto não conclusivas em função do ciclo, mas podem ser significativas ao analisar individualmente. A variabilidade da mulher influenciou na resposta não possibilitando fazer inferências para a população.

Palavras-chave: medidas biomecânicas, fragrância, ciclo menstrual

1. INTRODUÇÃO

A pele não pode ser tratada como um elemento meramente estético ou um simples revestimento do esqueleto e dos órgãos. Ela faz a ponte entre o corpo e o meio ambiente. Por isso, absorve fatores externos, como a luz ultravioleta e centenas de tóxicos da natureza química e orgânica, o controle de homeostase e muitos processos, entre eles, a ação através dos hormônios sexuais na pele podem afetar a permeabilidade, e, a proliferação celular e, isto pode impactar no desempenho de um perfume ao ser aplicado na pele (MACEDO, 1998).

A pele não pode ser tratada como um elemento meramente estético ou um simples revestimento do esqueleto e dos órgãos. Ela faz a ponte entre o corpo e o meio ambiente. Por isso, absorve fatores externos, como a luz ultravioleta e centenas de compostos tóxicos de natureza química e orgânica, até de exercer o controle de homeostase e muitos processos, entre eles, a ação através dos hormônios sexuais na pele, que pode afetar a permeabilidade e a proliferação celular, impactando no desempenho de um perfume ao ser aplicado na pele (MACEDO, 1998).

Os hormônios sexuais são sintetizados pelo ovário e pela placenta e, em pequena quantidade, pelos testículos e pelo córtex da supra-renal. A progesterona e o estrogênio originados nos ovários estimulam o crescimento do endométrio (tecido que reveste o útero), como preparação para a fertilização. O estrogênio age no crescimento desse tecido endométrico, enquanto que a progesterona facilita a secreção endométrica nesse revestimento do útero, a fim de que o óvulo fertilizado (agora chamada de ovo) possa ser implantado com sucesso. A progesterona em quantidade adequada é, portanto, o hormônio mais essencial à sobrevivência do óvulo fertilizado e do feto. Os níveis dos hormônios sexuais são responsáveis pela regulação do ciclo menstrual, assim como pela avaliação do ciclo menstrual tem-se o conhecimento das oscilações desses hormônios e seus efeitos, sem a necessidade de realizar dosagens hormonais (PEREIRA, 2009).

O ciclo menstrual é o termo científico para as alterações fisiológicas que ocorrem nas mulheres férteis que têm como finalidade a reprodução sexual e fecundação. O ciclo menstrual, regulado pelo sistema endócrino, é fundamental para a reprodução. O ciclo menstrual pode ser dividido em diferentes fases (**Tabela 1**).

As primeiras três estão relacionadas com alterações no revestimento uterino, enquanto que as três últimas estão relacionadas com processos que decorrem nos ovários. É frequentemente dividido em três fases: a fase folicular, a ovulação e a fase luteínica, ou podem ser consideradas a menstruação, a fase proliferativa e a fase secretora. Os ciclos menstruais contam-se a partir do primeiro dia de hemorragia menstrual (GREENBERG, 2007).

Tabela 1. Fases do ciclo menstrual (GREENBER, 2007)

Fase	Dia médio de início assumindo um ciclo de 28 dias	Dia médio do término
Menstruação	1	4
Fase proliferativa (Alguns autores incluem a menstruação nesta fase)	5	13
Ovulação	13	16
Fase luteínica (também designada por fase secretora)	16	28
Fase isquêmica	27	28
Fase folicular	1	13

Figura 1. Fases do ciclo menstrual e a oscilação hormonal (GREENBERG, 2007)

É sabido que os hormônios sexuais podem causar efeitos na pele e, consequentemente, podem interferir no desempenho de substâncias aplicadas neste substrato, como no caso o perfume, que é denominado o produto acabado que contém uma fragrância ou composição aromática disperso em solução hidroalcolica (SCHUDEL&QUELLET, 2004).

Os componentes da fragrância podem ter comportamentos diferentes na pele, além disso, sua durabilidade e a alteração de suas características decorrem pela mistura dos inúmeros compostos que contêm grupos funcionais, como acetonas, aldeídos, ésteres, amidas e alquenos que podem ser afetados quando ocorre alguma alteração no substrato onde são aplicados, a pele, por exemplo (SCHUELLER & ROMANOWSKI, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010).

Alguns fenômenos alteram a fisiologia da pele e impactam no desempenho do perfume, como a oscilação hormonal no ciclo menstrual, que é caracterizada por diferenças cíclicas na concentração dos hormônios luteinizante, folículo estimulante, estrogênio e progesterona. O aumento da secreção de estradiol no plasma na fase pré-ovulatória resulta em vasodilatação. Similarmente, a elevação da secreção do

hormônio termogênico progesterona na fase pós-ovulatória aumenta a temperatura basal corpórea acima dos níveis da fase pré-ovulatória (SHAH *et al.*, 1984; HUMMEL *et al.*, 1991).

Foram encontrados também, conforme citado em PEREIRA (2009), que estrogênios estão envolvidos com o aumento da vascularização, assim com o aumento no fluxo sanguíneo e elevação da temperatura basal corpórea da fase pré-ovulatória para a pós-ovulatória. A perda de água *transepidermal* (TEWL) é significativamente maior no dia de secreção mínima de progesterona e de estrógeno em relação ao de secreção máxima (HARVELL *et al.*, 1992; SHAH & MAIBACH, 2001).

2. Efeitos dos hormônios na pele

São inúmeros os efeitos dos hormônios na pele, principalmente do estrógeno, o qual previne a diminuição de colágeno, aumenta a retenção de água, aumenta a hidratação na pele, causando a elevação do ácido mucopolissacarídeo relacionado ao NMF (Fator de Hidratação Natural), constatado por meio de teste de corneometria (SHAH & MAIBACH, 2001; PEREIRA, 2009)..

Outros efeitos podem ser encontrados no **Tabela 2** o que demonstra que é importante verificar a influência dos parâmetros de oleosidade, hidratação e perda de água transepidermal (TEWL) no desempenho do perfume, aspectos relacionados com a deposição do componente aromático na pele (SCHUDEL & QUELLET, 2004). Qualquer mudança na constituição desse substrato (pele) poderá causar alguma resposta diferenciada no estudo.

Tabela 2. Efeito dos hormônios estrogênicos nas propriedades biomecânicas em função das fases do ciclo menstrual

Propriedade biomecânica afetada	Efeito no ciclo menstrual	Referências
Perda de água transepidermal maior (TEWL). Aumento do fluxo sanguíneo	Ocorre no dia de menor secreção de progesterona	HARVELL <i>et al.</i> , 1992; PEREIRA, 2009
Elevação da temperatura corpórea basal	Ocorre na passagem da fase pré-ovulatória para a pós ovulatória, na presença do pico máximo de secreção de progesterona	
Nível de colesterol e triglicérides aumenta	Colesterol no meio do ciclo e de triglicérides durante todo o ciclo, atingindo o valor máximo aos 28 dias.	MACDONALD AND CLARKE, 1970
Vasodilatação	Ocorre na fase pré-ovulatória	
Aumento da temperatura basal corpórea	Ocorre na fase pós-ovulatória, acima dos níveis da pré-ovulatória	SHAH <i>et al.</i> , 1984

3. Medidas biomecânicas para investigação dos efeitos hormonais na pele

A importância do desenvolvimento tecnológico de equipamentos biomédicos aplicados às técnicas e métodos capazes de investigar a pele de uma forma mais precisa e detalhada, de forma não invasiva e com conforto para o voluntário, faz com que as medidas biomecânicas da pele envolvam um campo extenso para a investigação das suas características (BERARDESCA *et al.*, 1995).

A descrição dos métodos e suas características estão no **Tabela 3**, segundo BERARDESCA *et al.*, 1995.

Tabela 3. Descrição dos métodos para avaliação das medidas biomecânicas da pele (BERARDESCA *et al.*, 1995; MEDCIN INSTITUTO DA PELE, 2007, BAREL & CLARYS, 1995, SCHÄEFER & KUHN-BUSSIUS, 1970)

Método	Descrição	Fundamento	Equipamento
<i>Corneometria</i>	Determinação “in vivo” do grau de hidratação do estrato córneo está relacionada à área médica, como a identificação de patologias e avaliação do envelhecimento.	Baseia-se no princípio de um capacitor comum, formado por duas placas metálicas eletricamente isoladas por vácuo, ar, vidro ou plástico (dielétrico). Determina a variação do conteúdo de água no estrato córneo .	Corneometer® CM 825 acoplado ao Cutometer® MPA 580 (Courage & Khazaka). As medidas são fornecidas em valores arbitrários de 0 a 120 unidades corneométricas
<i>Perda de Água transepidermal (TEWL)</i>	Uma das funções da pele é evitar ou minimizar a perda de água do organismo para o ambiente, assim, a análise desta característica é importante na avaliação de patologias, fenômenos fisiológicos e eficácia de tratamentos dermatológicos e cosméticos	Análise da pele que não permite uma avaliação contínua, pois, uma vez que é realizada em ambiente fechado, a saturação do ar faz com que a perda de água pela pele seja interrompida.	O Tewameter®TM 300, que mede o coeficiente de difusão da água evaporada por meio de dois pares de sensores de umidade presentes num probe cilíndrico, baseado no método da câmara fechada. Os valores são expressos em g/m ² /h.
<i>Sebumetria</i>	A superfície da pele lipídica é derivada principalmente do sebo, mistura de lipídios, queratina e estruturas de membrana celular excretadas pelas glândulas sebáceas.	É uma fita adesiva usada para a quantificação do sebo de forma não-invasiva: a fita é pressionada sobre a pele, tornando-se mais translúcido, dependendo da quantidade de sebo da área.	Sebumeter® SM 810 da Courage&Khazaka mede a quantidade de sebo por meio de um microprocessador que a calcula na fita sintética adesiva do equipamento. Os valores são apresentados em µg sebo/cm ²

4. Comparação dos métodos de biometria cutânea

Alguns métodos não-invasivos, como pHmetria, corneometria, sebumetria, evaporimetria, colorimetria e elastometria são usados amplamente na cosmetologia para caracterizar a funcionalidade de diferentes tipos de pele além de, relacionar com modificações possíveis em diferentes faixas etárias. Esses métodos são, também, usados para avaliar efeitos de cosméticos e fármacos em condições normais ou patológicas. O **Tabela 4** apresenta resumidamente alguns métodos não-invasivos com suas vantagens e desvantagens.

Tabela 4. Descrição de métodos não invasivos com suas vantagens e desvantagens (ANDREASSI and ANDREASSI, 2007).

Método	Principais características	Desvantagens
<i>Corneometria</i>	Medida da capacitância do estrato córneo como parâmetro de hidratação	Baixa reprodutibilidade
<i>Perda de Água Transepidermal (TEWL)</i>	Sensor conectado ao computador com processador especializado	Dificuldade de padronização e controle das condições climáticas
<i>Sebumetria</i>	Dispositivo conectado a um leitor ótico	Baixa reprodutibilidade

O desenvolvimento tecnológico de equipamentos biomecânicos aplicados às técnicas e metodologias proporcionou a investigação da pele de forma mais precisa, detalhada e não invasiva, com conforto para o voluntário (BERARDESCA *et al.*, 1995).

O monitoramento da homeostase da superfície de pele é, particularmente, importante em condições caracterizadas por xerose ou alterações da função barreira, como atopia ou condições atópicas, pois a hidratação exerce importante papel na manutenção da homeostase da superfície da pele, pois quando hidratada é macia, suave e flexível e se desidratada é seca, com rugas e sinais. O índice de corneometria e a avaliação de perda de água transepidermal (TEWL) são importantes neste controle além de servir para o controle de efeito de produtos tópicos, chamados comumente de “hidratantes” (ANDREASSI& ANDREASSI, 2007).

A cobertura lipídica da superfície da pele, relacionada à atividade de glândula sebácea, pode ser avaliada com instrumentos que medem o nível de sebo. A prática confiável da sebumetria consiste de uma fita adesiva que é pressionada contra a pele. Uma vez em contato com a pele, a fita impregnada com sebo, torna-se transparente em proporção com a quantidade de sebo. O grau de transparência é convertido em valores de gravimetria por um microprocessador (ANDREASSI & ANDREASSI, 2007).

A sebumetria pode ser útil na avaliação fisiológica dos efeitos de fármacos que podem reduzir a secreção sebácea e hipertrofias, assim como para avaliar cosméticos que tem a função de reduzir lipídios na superfície da pele

A semiótica instrumental entrou no campo da dermatologia, mas suas aplicações estão em completa evolução. Entretanto, alguns métodos estão consolidados e são comumente usados nas avaliações. Em geral, os instrumentos para medir alterações fisiológicas na pele oferecem inúmeras vantagens nas avaliações clínicas, pois permitem a comparação de dados coletados em diferentes tempos e/ou em diferentes lugares, que são particularmente importantes nos estudos multicêntricos. O uso de instrumentos permite reconhecer sinais que nem sempre são perceptíveis pela avaliação sensorial (ANDREASSI & ANDREASSI, 2007).

De acordo com AGNER *et al* (1991) testou a hipótese do efeito do ciclo menstrual e a reatividade cutânea no estímulo irritante na pele e 29 mulheres com ciclo menstrual regular, submetidas a irritação na pele com lauril sulfato de sódio. A pele foi avaliada visualmente e por meio de evaporimetria com a finalidade de medir a perda de água *transepidermal*, formação de edema e o fluxo sanguíneo na pele. Foram encontradas diferenças significativas entre o primeiro em comparação aos dias 9º a 11º dias do ciclo menstrual ($p < 0.05$). Esse estudo demonstrou indicativos de reatividade de pele em função ciclo.

Em um de estudo de PEREIRA (2009) avaliou-se a substantividade de um composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual, relacionando a análise sensorial e as medidas biomecânicas (Índice de Corneometria, de Sebumetria e TEWL) analisadas no antebraço da mulher, mas essas medidas não apresentaram significância no modelo. No entanto, por meio da análise sensorial, a

intensidade de perfume percebida em função das fases do ciclo menstrual constatou que a mulher percebe maior intensidade de perfume na fase lútea em relação às outras fases. O estudo também verificou que na mesma fase, avaliando o mesmo perfume, a mulher detecta menor intensidade de perfume na sua pele comparada com a do homem.

A oscilação hormonal e os efeitos decorrentes na percepção do odor demonstraram que a substantividade da composição aromática na pele foi resultante, praticamente, da avaliação olfativa, ou seja, da sensibilidade/percepção da julgadora, influenciada pela oscilação hormonal principalmente na fase lútea. A fase lútea apresentou maior percepção do perfume do que na fase ovulatória ($p < 0,05$) e na folicular e menstrual ($p < 0,01$). A avaliação da intensidade de perfume aplicado na pele masculina representou uma variável que exerceu influência estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Provavelmente, os aspectos fisiológicos da pele masculina, que não foram considerados neste estudo, interferiram na percepção do odor, pois a mulher na fase lútea apresentou percepção menor de intensidade de perfume na pele do homem ($p < 0,0002$) (PEREIRA, 2009).

As medidas biomecânicas coletadas no antebraço das mulheres não foram significativas para o modelo utilizado em PEREIRA (2009), porém algumas referências citam a influência dos hormônios nas propriedades biomecânicas da pele. O local de medição pode interferir na quantidade e na atividade de algumas glândulas, como citado em MACDONALD AND CLARKE (1970), que observaram que as medições realizadas nas costas dos voluntários apresentavam maior produção de sebo comparada com a face e com o antebraço.

Portanto, foi proposta a análise dessas medidas na área interescapular de 10 voluntárias, em função do ciclo menstrual para checar se, realmente, não existia diferença de hidratação ou de oleosidade em função do ciclo menstrual.

5. OBJETIVOS

- Avaliar a influência da oscilação dos hormônios sexuais na fisiologia da pele que podem afetar a intensidade e/ou percepção do perfume aplicado na mulher por meio da avaliação das propriedades biomecânicas da pele (Corneometria, Sebumetria e TEWL);

- Avaliar se existem diferenças nos parâmetros analisados (corneometria, sebumetria e TEWL), em relação à região avaliada (antebraço e interescapular).

6. MATERIAL, SUJEITOS E MÉTODOS

PEREIRA (2009) realizou um estudo com objetivo de avaliar a substantividade de uma composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual, relacionando a análise sensorial e as medidas biomecânicas (Índice de Corneometria, de Sebumetria e TEWL). Neste presente estudo, teve-se o objetivo de complementar a análise feita anteriormente por meio do estudo de correlação instrumental e sensorial da composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual. No entanto, como se trata de uma complementação do estudo, o Material, Sujeitos e Métodos são exatamente os mesmos descritos em PEREIRA (2009), porém com um número de avaliadores maiores, 29 voluntárias, que seguiram um protocolo sensorial de teste, no qual foram treinadas na avaliação na escala sensorial LMS (escala de magnitude de rótulos) (GUERRA, 2002), por meio de uma referência (matéria-prima: cis-3-hexenol) que permitiu que as voluntárias se familiarizassem com a escala e com avaliação de intensidade de perfume em função do tempo. Para que desta forma desse maior representatividade e confiabilidade nos dados gerados para avaliação da correlação instrumental e sensorial.

6.1. MATERIAL

6.1.1 Solvente

- Álcool etílico desodorizado e neutro 80°GL, grau de pureza analítico, produto comercializado pela Usina Ester.

6.1.2 Matérias-primas e estudo crítico

A formulação teste foi uma composição aromática: componente aromático, produto comercializado pela Givaudan: Ciclo[®] 1910 (Floral Verde Amadeirado), composta principalmente por notas olfativas de fundo, menos difusivas que entregam maior substantividade de perfume na pele. As frações florais e verdes estão em menor proporção, mas representam o frescor e a identidade da fragrância.

As notas verdes correspondem às de topo e são as mais voláteis e a floral, o corpo da fragrância.

- Irgasan® DP 300 (Triclosan): conservante da formulação, grau de pureza farmacêutico, produto comercializado pela Ciba®.

Componentes	% p/p
Composição aromática Ciclo 1910®	12,0
Irgasan® DP 300 (INCI: Triclosan)	0,1-0,3
Álcool etílico desodorizado e neutro 80°GL	q.s.p. 100,0

Modo de preparo: Aproximadamente 200,0 g de produto. Inicialmente, num béquer de vidro de 650 mL, pesou-se a composição e, em seguida, o Irgasan® DP 300 que foi adicionado à preparação aromática e homogeneizou-se, por meio do agitador mecânico IKA. Esta pré-mistura foi adicionada ao álcool etílico desodorizado e neutro 80° GL e completou-se a massa da formulação até 200,0 g com o mesmo solvente. Foram acondicionados 15 mL (aproximadamente 3/4 da capacidade do frasco) da formulação em frasco de vidro inerte de capacidade de 20 mL e com tampa de rosca plástica.

6.2 SUJEITO E MÉTODOS

6.2.1 Desenho do estudo

O estudo avaliou a intensidade de perfume em função do ciclo menstrual com **29 voluntárias, grupo de estudo**, com ciclo menstrual normal, não usuárias de medicamentos contraceptivos ou de reposição hormonal, no mínimo 6 meses e de 3 indivíduos do sexo masculino, grupo controle, que foram controle de pele e olfativo, ambos os grupos com idade entre 18 a 40 anos,. Os riscos previsíveis intercorridos pelos voluntários que fizeram parte do estudo foram mínimos, porém ocorreu uma alta taxa de desistência devido a dificuldade de encontrar a voluntária próximo ao pico ovulatório, que dura cerca de 2 a 3 dias apenas, era identificado por meio de um *swab* da vagina, para avaliação do muco cérvico, em que se observava a formação de cristais em formato de “samambaia”, característico do pico ovulatório, como já foi descrito em PEREIRA (2009). Ao ser identificado, cada voluntária fazia 4

visitas ao instituto, totalizando 1 mês de teste para cada voluntária, portanto foi conduzida apenas uma replicata, mas existia um acompanhamento do ciclo das voluntárias por aproximadamente 3 meses antes do teste. Realizava-se a avaliação sensorial e coleta de *headspace* de todas as fases do ciclo, na seguinte sequência: ovulatória, lútea, menstrual e folicular, pois existia um grande risco de não conseguir a avaliação do pico ovulatório. Nos **Anexos 1 e 2**, encontram-se o protocolo de teste e o acompanhamento e intercorrências, respectivamente ao longo dos 2 anos de estudo, em que participaram 41 voluntárias, mas que concluíram o estudo apenas 29.

Os riscos durante a aplicação do perfume e da coleta de *headspace* do perfume na pele foram mínimos para os voluntários. Todos os procedimentos de aplicação de perfume, assim como as medidas biomecânicas como a avaliação sensorial não foram invasivos, não causando efeitos adversos para o voluntário.

6.2.2 Tipo de estudo

Este estudo foi elaborado de acordo com as “Condições gerais para a realização de um teste em humano”, documento que o Instituto de Pesquisa Clínica forneceu.

Estudo monocêntrico, em que foi avaliado a influência do ciclo menstrual da mulher na intensidade do perfume na pele. Foram realizadas avaliações instrumentais da hidratação, quantidade de sebu e perda de água transepidermal da área de aplicação do produto durante as 4 fases do ciclo menstrual. Foram realizadas também coletas dos componentes voláteis do perfume para análise cromatográfica. Em cada visita as 29 voluntárias responderam questionário de auto-avaliação olfativa tendo como comparativo um voluntário do sexo masculino como controle de pele e dois voluntários como controle olfativo, que avaliavam sensorialmente a pele das últimas 5 mulheres do grupo de voluntárias em função do ciclo menstrual.

No homem não existem as oscilações hormonais ou ciclo menstrual e ocorre menor influência hormonal (NAVARRETE-PALACIOS *et al.*, 2003). Desta forma, puderam ser observados os efeitos decorrentes da oscilação hormonal na

sensibilidade olfativa da mulher, sem ter a presença de alterações na fisiologia da pele, que pudessem interferir na intensidade do perfume.

6.2.3 Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada de acordo com a legislação brasileira baseada na Resolução Normativa 196/96, “CNS/MS”, normas da International Conference Harmonization (ICH), Good Clinical Practice (GCP) e a Declaração de Helsinque, após a obtenção da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, com o protocolo CEP nº 400 (**Anexo 3**).

Para cada voluntária que participou desta pesquisa no grupo de estudo e para o voluntário controle, foram dadas as informações e esclarecimentos necessários, fornecendo o seu consentimento, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme o **Anexo 4** e **Anexo 5**, respectivamente.

A pesquisa manteve o anonimato do voluntário e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer tempo. Todos foram esclarecidos dos possíveis riscos mais frequentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa / alérgica.

Outros documentos necessários para o prosseguimento da pesquisa estão descritos como:

Anexo 1: Protocolo de teste

Anexo 2: Ficha de acompanhamento e intercorrências

Anexo 3: Carta de aprovação do CEP do Instituto Medcin

Anexo 4: Carta de aprovação do CEP da Fac. de C. Farmacêuticas - USP

Anexo 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do grupo de estudo

Anexo 6: TCLE do grupo controle

6.2.4 Tamanho amostral

O valor amostral estudado foi de 29 voluntárias, acima do obtido estatisticamente calculado por meio das variâncias ocorridas em estudos preliminares com a escala LMS escolhida para o teste e o mínimo de diferença entre dois pontos da escala, para que ocorresse diferença significativa no nível de 95% de intervalo de confiança, conforme recomendado por GUERRA (2008) e PEREIRA *et al* (2009). Entretanto, considerando a perda de voluntários ou intercorrências durante o estudo, para obter uma margem de segurança para as análises, foram recrutados do sexo feminino, inicialmente, aproximadamente, 40 voluntários e com expectativa de 30 a 35 voluntários completassem o estudo, no entanto concluíram o estudo 29 voluntárias.

6.2.5 Seleção dos sujeitos

Foram selecionadas, por meio de banco de voluntárias do Instituto de Pesquisa, 30-35 mulheres de 18 a 40 anos, não usuárias de anticoncepcionais orais, com período de ciclo menstrual variando entre 28 e 30 dias e que não estavam usando nenhum medicamento contraceptivo ou de reposição hormonal de estrogênio e progesterona ou que afetem o ciclo menstrual até seis meses antes do teste. O painel correspondeu aos critérios de inclusão estabelecidos para a realização do estudo.

O controle de pele e olfativo foi realizado no total por 3 voluntários do sexo masculino, adulto de 18 a 40 anos, que foram selecionados segundo os critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão pertinentes, considerados controles de pele e olfativo neste estudo.

6.2.5.1 Critérios específicos de inclusão

Os critérios específicos de inclusão, definidos no protocolo, foram os seguintes:

- idade: de 18 a 40 anos;
- sexo feminino; masculino;
- usuários ocasionais ou regulares de produtos cosméticos;
- mulheres com período de ciclo menstrual de 28 a 30 dias.

6.2.5.2 Critérios específicos de não-inclusão

Os critérios específicos de não-inclusão, definidos no protocolo, foram:

- uso de medicamentos contraceptivos orais ou de reposição hormonal menos de 6 meses e durante os testes;
- marcas cutâneas na área experimental que pudessem interferir nas avaliações das reações cutâneas (problemas de pigmentação, cicatrizes, pilosidade super desenvolvida, efélides, tatuagem e nevus em grande quantidade e queimadura solar dentre outras);
- alergia ou reatividade à categoria de produtos testada;
- tratamento hormonal (anticoncepcionais orais ou reposição hormonal de estrogênio e progesterona);
- previsão de alteração dos métodos contraceptivos orais durante o estudo;
- dismenorréia *;
- amenorréia;
- obesidade, com IMC considerado >30 que tenham comprovado clinicamente irregularidade no ciclo menstrual
- anorexia, com IMC considerado < 18 que tenham comprovado clinicamente irregularidade no ciclo menstrual
- mulheres em período de gestação ou amamentando;

* Forte cólica menstrual relatada pelo voluntário ou suspeita médica, sem comprovação laboratorial.

6.2.5.3 Critérios de exclusão

Foram definidos os seguintes critérios de exclusão:

- Não atendimento às exigências do estudo;
- gravidez detectada durante o estudo;
- fatores ocorridos independentemente, mas com potencialidade de impedir a continuidade do voluntário no estudo, como exemplo, fraturas ósseas;
- Outros, a critério médico.

6.2.5.4 Exigências requeridas pelo estudo

As exigências impostas aos voluntários durante o período de estudo foram as seguintes:

- não se expor à radiação intensa (solar ou câmara de bronzamento);
- não alterar hábitos de higiene;
- não utilizar medicamentos como tranqüilizantes, antidepressivos, diuréticos, laxantes ou psicotrópicos;
- não realizar esfoliação de pele com esfoliantes químicos ou mecânicos, na área experimental;
- não alterar hábitos de consumo de café, álcool e tabaco;
- comparecer ao Instituto sempre nos mesmos horários, em todas as visitas;
- comunicar qualquer desvio ao investigador.

6.2.6 Normas IFRA para a composição aromática

A composição aromática que foi utilizada estava em conformidade com as normas da Associação Internacional de Fragrâncias (IFRA – 39ª atualização/ abril 2005) sendo permitido o seu uso em 100% em perfume.

As normas IFRA referentes à restrição de uso foram baseadas na avaliação de segurança do Conselho de Especialistas do Instituto de Pesquisa de Materiais para Fragrâncias (RIFM) e foram revistas pelo Comitê Científico da IFRA.

A avaliação dos ingredientes da composição aromática foi feita de acordo com os padrões de segurança mencionados no Anexo I do Código de Prática da IFRA.

6.2.7. Condições experimentais

Na primeira avaliação, os voluntários, que preencheram os critérios de inclusão e aceitaram voluntariamente participar deste estudo, após serem esclarecidos e assinarem o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, Anexos 4 e 5, responderam ao questionário fornecido pelo Instituto de Pesquisa, a respeito dos critérios mencionados nos **itens 6.2.5.1 a 6.2.5.4**. Em seguida, foram submetidos à avaliação cuidadosa pelo co-investigador, na qualidade de médico, nas instalações do centro monitor e investigador, Instituto de Pesquisa Clínica. Este,

em todos os tempos experimentais determinados, realizou o acompanhamento clínico do estudo, anotando qualquer reação não esperada do produto, em documento apropriado para esta finalidade.

Os dados iniciais do voluntário, referentes às medidas consideradas para os estudos, como: peso, altura, avaliação do ciclo menstrual nos últimos 6 meses, foram tomados por técnicos e médicos para a avaliação clínica das medidas de temperatura basal e de característica do muco cérvico, sendo-lhes atribuída a responsabilidade de avaliar este parâmetro em cada fase do ciclo menstrual.

6.2.7.1 Experimento

Foi formada uma equipe sensorial para a avaliação do perfume. Para toda análise tomou-se o cuidado para que não houvesse saturação do perfume no ambiente. Cada voluntária fazia a avaliação separadamente uma da outra para que não houvesse influência na resposta. O perfume era aplicado em local diferente do avaliado, sendo que os julgadores foram previamente orientados e treinados no procedimento.

O local de realização dos testes foi no Instituto de Pesquisa Clínica Medcin – Instituto da Pele, seguindo as condições de acordo com as necessidades do teste: temperatura 22,0 – 25,0 °C e umidade relativa de 45-55%.

O teste avaliou o desempenho do perfume, assim como a percepção olfativa das mulheres em diferentes fases do ciclo. Antes da aplicação do perfume, todas as vezes que as julgadoras visitaram o Instituto, foram realizadas medidas instrumentais da pele do antebraço das 29 julgadoras e das últimas dez foi realizada também da pele da região interescapular (Sebumetria, Corneometria e TEWL).

Próximo ao período ovulatório, que compreendeu os dias (12º a 16º do ciclo menstrual), foi realizada uma coleta do muco cérvico por uma profissional treinada, que utilizou espéculo e coletor com escova, descartáveis, o material coletado foi analisado por microscopia para identificar a fase ovulatória.

As avaliações sensoriais ocorreram em todas as julgadoras e em uma área delimitada na superfície da pele do antebraço, onde foi aplicado o perfume que permaneceu na pele das voluntárias durante 6 horas.

Imediatamente após a aplicação do perfume e a cada 90 minutos, a julgadora fez a avaliação em escala LMS (*Labeled Magnitude Scale*) (**Anexo 1**) do perfume em sua pele e no pulso de um único voluntário homem, e, este mesmo voluntário e outro do sexo masculino acrescentado no teste, avaliaram a pele das mulheres em função do ciclo menstrual, considerados controles de pele e olfativo neste estudo. Esta etapa se repetiu cinco vezes em cada visita e os voluntários permaneceram no Instituto pelo período de 6 horas.

Sendo assim, cada julgadora visitou o Instituto quatro vezes durante um mês, considerando quatro fases do ciclo menstrual para a avaliação. Os voluntários que atuaram como controle (homem) estavam disponíveis para participar do teste todas as vezes que ocorreu a avaliação das voluntárias em função do ciclo menstrual. O detalhamento do desenho do teste está descrito no Protocolo de teste (Anexo 1).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme citado no **item 6.2.4.**, a pesquisa foi realizada com **29 voluntárias**, segundo o experimento descrito no **item 6.2.7.1**. Foram coletadas medidas biomecânicas: índice de Corneometria e Sebumetria e TEWL. Essas três variáveis biomecânicas foram coletadas em triplicata, imediatamente, e após 6 horas da aplicação do perfume (tempo inicial) nas quatro fases do ciclo menstrual determinadas (folicular, ovulatória, lútea e menstrual). Para as dez últimas mulheres do grupo em estudo, também, foram realizadas avaliações na região interescapular.

7.1 Análises descritivas e exploratórias dos dados

7.1.1 Análise descritiva das medidas biomecânicas entre os antebraços controle e tratado

Foi realizada uma análise descritiva das medidas biomecânicas (perda de água transepidermal, índice de corneometria e sebumetria) por meio de gráficos do tipo “boxplot” (gráficos em forma de caixa que indicaram a variabilidade, mediana, média, “outliers” do tratamento dos dados).

Para a avaliação das variáveis biomecânicas, coletadas em triplicatas, foi utilizada a média de três medidas sempre coletadas na mesma região do antebraço.

Analísaram-se, de forma descritiva, os dados coletados na avaliação do antebraço direito, visualizados por meio de gráficos “boxplot”.

Nas **Figuras 1 e 2** podem-se comparar, para cada uma das variáveis, as fases do ciclo em cada tempo experimental e identificar os dados atípicos. As variáveis biomecânicas foram analisadas descritivamente com as fases do ciclo (Folicular, Ovulatória, Menstrual e Lútea) e os tempos experimentais (Inicial e 6h). As observações atípicas foram retiradas das análises para não influenciarem nos resultados das etapas posteriores.

A **Figura 1** exibe a análise “boxplot” comparando as medidas do índice **corneometria** obtidas em unidades arbitrárias nas quatro fases do ciclo menstrual para os dois tempos experimentais (inicial e 6,0h).

Figura 1. Análise “boxplot” da medida de corneometria no antebraço (medida arbitrária que varia de 0 a 120,0) das julgadoras/voluntárias, no tempo inicial e após 6h de aplicação do produto, em cada fase do ciclo menstrual. *Legenda:* (*) - observação atípica, “outlier” (valores encontrados entre 1,5 e 3 intervalos interquartil acima do terceiro quartil ou abaixo do primeiro).

A partir dos resultados apresentados no índice de corneometria, as diferenças entre as fases e os tempos experimentais foram pequenas, pois os valores das medianas estavam próximos (“**barra preta**” horizontal do gráfico) entre as fases do ciclo menstrual. Adicionalmente, o tamanho das “caixas” está semelhante e a linha

que corta as “caixas” na vertical, que apresenta a variabilidade dos dados, apresentou-se semelhante entre as fases do ciclo também.

Na Figura 2 tem-se os “boxplot” comparando a **medida de TEWL** (perda de água transepidérmica) nas quatro fases do ciclo menstrual, para os dois tempos experimentais (inicial e após 6h).

Figura 2. Análise “boxplot” da medida de perda de água transepidérmica – TEWL no antebraço (valores expressos em $\text{g/m}^2/\text{h}$) das julgadoras/voluntárias no tempo inicial e após 6h de aplicação do produto em cada fase do ciclo menstrual. *Legenda:* (*) - observação atípica, “outlier” (valores encontrados entre 1,5 e 3 intervalos interquartil acima do terceiro quartil ou abaixo do primeiro)

Verificou-se que para cada medida de perda de água transepidérmica (TEWL) as diferenças entre as fases e os tempos experimentais foram pequenas. Da mesma forma, como explicado para a corneometria, os dados foram semelhantes entre uma fase e outra do ciclo menstrual (tamanho das “caixas”, medianas próximas e a variabilidade dos dados semelhante). Os asteriscos simples (*) foram observações consideradas atípicas “outliers” (valores encontrados entre 1,5 e 3 intervalos interquartil acima do terceiro quartil ou abaixo do primeiro), decorrentes, provavelmente de situação intrínseca de algumas voluntárias (aumento do fluxo sanguíneo durante o experimento, metabolismo, etc).

No “boxplot” da Figura 3 comparava a **medida de sebumetria** nas quatro fases do ciclo menstrual para os dois tempos experimentais:

Figura 3. Análise “boxplot” da medida de sebumetria (valores expressos em $\mu\text{g sebo}/\text{cm}^2$) das julgadoras/voluntárias no tempo inicial e após 6h de aplicação do produto em cada fase do ciclo menstrual. *Legenda:* (*) - observação atípica, “outlier” (valores encontrados entre 1,5 e 3 intervalos interquartil acima do terceiro quartil ou abaixo do primeiro).

Na **Figura 3**, a partir dos dados apresentados, observou-se que para a medida de sebumetria, as distribuições foram semelhantes e notou-se grande número de observações atípicas. Este fato se justifica, provavelmente, devido à característica de oleosidade ser intrínseca de cada voluntária, sendo consequência da alimentação, metabolismo e das oscilações hormonais (BERARDESCA *et al.*, 1995).

7.1.2 Modelos para avaliação dos dados biomecânicos entre os antebraços controle e tratado.

Para verificar se houve alterações nas variáveis biomecânicas (Índice de Corneometria, Sebumetria e TEWL) em função da fase do ciclo menstrual, foi elaborado um modelo linear generalizado com a variável biomecânica como variável

resposta e a fase do ciclo menstrual (ρ) e o tempo experimental (α) como fatores fixos; e as mulheres (β) como fatores aleatórios (**Equação 1**).

$$y_{ijk}^p = \mu.... + \rho_i + \lambda_l + \alpha_j + \beta_k + \rho_i * \beta_k + \varepsilon_{ijk}$$

Equação 1

Onde: o índice p representa a variável biomecânica avaliada (será feito um modelo para cada variável biomecânica), i é referente às fases do ciclo (1 representa a fase menstrual, 2 a folicular, 3 a lútea e 4 a ovulatória), l a região avaliada (1 representa antebraço tratado, 2 refere-se ao antebraço controle), j aos tempos experimentais (1 representa T0, 2 refere-se a T6) e k as mulheres (1, 2, 3, ..., 29). A média geral é representada por $\mu....$ e o erro aleatório é representado por ε .

A **Tabela 1** nos permite avaliar se os efeitos de cada fator no índice de **Corneometria** são significativos, de acordo com o modelo linear generalizado entre o antebraço controle e tratado.

Tabela 1. Efeitos de cada fator significativo ao modelo do índice de **Corneometria** entre os antebraços controle e tratado

FATOR	GRAUS DE LIBERDADE	ESTATÍSTICA F	VALOR_p	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	0,49	0,693	Não rejeita a hipótese.
Região Avaliada	1	53,19	<0,001	Rejeita a hipótese.
Tempo Experimental	1	0,50	0,479	Não rejeita a hipótese.
Mulher	28	5,13	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher*Fase	84	4,55	<0,001	Rejeita a hipótese.
R ² -Ajustado = 67,91%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_p ≤ 0,05, existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de significância: 5%

** Hipótese: não houve diferenças entre as médias do fator avaliado.

Pelos resultados obtidos, observou-se que houve diferenças significativas entre as médias do **índice de Corneometria** da área tratada e da controle do antebraço (Fator Região Avaliada) e entre as médias das mulheres (Fator Mulher). Além disso, o efeito da interação dos fatores Fase do Ciclo e da Mulher é significativo no modelo, indicando que houve diferença entre as médias do **índice de Corneometria** das mulheres de acordo com a fase do ciclo.

A **Figura 4** indicou os efeitos principais que permitiram avaliar as diferenças entre as médias das mulheres e entre as regiões avaliadas.

Figura 4. Avaliação gráfica dos efeitos principais do modelo para o Índice de Corneometria (valores arbitrários de 0 a 120 unidades corneométricas). Para os fatores Mulher de 1 a 29; Fases 1-Folicular, 2-Ovulatória, 3-Menstrual e 4-Lútea; Região: Controle e Tratada; tempo: T₀ e T₆.

Na **Figura 4**, notou-se que houve grande variabilidade entre as médias do **Índice de Corneometria** para o fator Mulher e que para o Fator Região, a média da região tratada foi ligeiramente maior que a da região controle. Em relação aos tempos inicial e 6 horas, praticamente, não houve diferença entre as fases do ciclo. A **Figura 5** permitiu avaliar o efeito da interação entre a fase do ciclo e as mulheres no **Índice de Corneometria**.

Figura 5. Interação das médias do índice de Corneometria no antebraço nas mulheres nas fases do ciclo menstrual (valores arbitrários de 0 a 120 unidades corneométricas).

Na **Figura 5**, verificou-se que a influência da fase do ciclo no **Índice de Corneometria** variou de uma mulher para outra.

Pode-se concluir que a grande variabilidade entre as mulheres influenciou na obtenção de um padrão de resposta em função do ciclo menstrual. Segundo SHAH & MAIBACH (2001), como o estrógeno tem a capacidade de prevenir o declínio do conteúdo de colágeno e aumentar a retenção de água, esperávamos ter maiores Índices de Corneometria, principalmente na fase ovulatória, porém devido a variabilidade elevada entre as mulheres não foi possível obter um padrão de resposta. Observou-se apenas uma ligeira tendência de aumento do índice na fase Lútea, porém não foi conclusiva.

Tabela 2 permitiu avaliar se os efeitos de cada fator no **Índice de TEWL** são significantes, de acordo com o modelo linear generalizado:

Tabela 2. Efeitos de cada fator significativo ao modelo do **Índice de TEWL** entre os antebraços controle e tratado

FATOR	GRAUS DE LIBERDADE	ESTATÍSTICA F	VALOR_P	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	0,92	0,437	Não rejeita a hipótese.
Região Avaliada	1	6,5	0,011	Rejeita a hipótese.
Tempo Experimental	1	1,51	0,219	Não rejeita a hipótese.
Mulher	28	3,66	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher*Fase	84	2,52	<0,001	Rejeita a hipótese.
R ² -Ajustado = 44,28%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_P $\leq$ 0,05, existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de significância: 5%

** Hipótese: Não houve diferenças entre as médias do fator avaliado.

Observou-se que existem diferenças significativas entre as médias do **Índice de TEWL no fator Região avaliada**, da área tratada e do controle e do fator Mulher. A diferença encontrada entre as regiões mostra que o índice de TEWL foi significativamente maior na região tratada, o que não se poderia justificar pela aplicação da composição aromática, pois esta é hidro alcóolica, não se tem evidenciado nenhum caso na literatura que possa demonstrar que esta formulação alteraria o índice, informação que poderá ser considerada um fator para investigação futuramente, e esta resposta não pode ser atribuída aos hormônios neste caso, pois não houve diferença significativa entre as fases do ciclo menstrual ou por ser tão sutil não pode ser detectada, mas interferiu na fisiologia da pele e influenciou no índice de TEWL.

Além disso, o efeito da interação da fase do ciclo e da mulher foi significativo no modelo, indicando que ocorreu diferença entre as médias do **índice de TEWL** das mulheres de acordo com a fase do ciclo. Ou seja, a variabilidade do índice entre as mulheres influenciou nas fases do ciclo menstrual. Estudos realizados por HARVEL et al (1992) indicaram que a perda de água *transepidermal* foi significativamente maior no dia de secreção mínima de progesterona e de estrogênio, que corresponderia a fase lútea e menstrual, em relação ao de secreção máxima, que corresponderia à fase ovulatória. Porém, durante o experimento, observou-se apenas que a variabilidade entre as mulheres foi muito alta e que influenciou o ciclo

menstrual delas, entretanto, não se encontra um padrão de resposta no ciclo menstrual propriamente dito para o índice de TEWL.

O gráfico de efeitos principais na **Figura 6** permitiu avaliar as diferenças entre as médias das mulheres e entre as regiões avaliadas.

Figura 6. Avaliação gráfica dos efeitos principais do modelo para o Índice de TEWL no antebraço (os valores são expressos em $\text{g/m}^2/\text{h}$). Para os fatores Mulher de 1 a 29; Fases 1-Folicular, 2-Ovulatória, 3-Menstrual e 4-Lútea; Região: Controle e Tratada; tempo: T_0 e T_6 .

Na **Figura 6**, verificou-se que a maioria das mulheres apresentou médias do **Índice de TEWL** em torno de 9, porém cinco delas apresentaram valores mais altos e permitiu avaliar o efeito da interação entre os fatores Fase do Ciclo e Mulher no **índice de TEWL**. O gráfico de comparação das médias para as regiões indicou que a média da região tratada foi maior que a da região controle. Em relação aos tempos inicial e 6h não houve diferença e existiu apenas uma variação entre fases do ciclo menstrual devido a influência da variabilidade alta intrínseca da mulher que afetou o modelo, principalmente nas fases folicular e menstrual como se pode observar na **Figura 7**.

Figura 7. Interação das médias do índice de TEWL nas mulheres nas fases do ciclo menstrual. Os valores são expressos em $\text{g/m}^2/\text{h}$.

Na **Figura 7**, a maioria das mulheres apresentou pequenas variações na média do **índice de TEWL** durante as fases do ciclo, porém houve um grupo de mulheres que apresentou grandes oscilações, principalmente nas fases folicular e menstrual, que pode-se considerar até *outliers* para o modelo.

A **Tabela 3** permitiu avaliar se os efeitos de cada fator no **índice de Sebumetria** foram significativos de acordo com o modelo linear generalizado.

Tabela 3. Efeitos de cada fator significativo ao modelo do **índice de Sebumetria** entre os antebraços controle e tratado

Fator	Graus de Liberdade	Estatística F	Valor_P	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	0,35	0,789	Não rejeita a hipótese.
Região Avaliada	1	2,95	0,087	Não rejeita a hipótese.
Tempo Experimental	1	0,10	0,751	Não rejeita a hipótese.
Mulher	28	9,43	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher*Fase	84	2,12	<0,001	Rejeita a hipótese.
R2-Ajustado = 57,48%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_P $\leq 0,05$, existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de Significância: 5% / ** Hipótese: Não houve diferenças entre as médias do fator avaliado.

Na **Tabela 3**, notou-se que existiram diferenças significativas entre as médias do **índice de sebumetria** das mulheres. Além disso, o efeito da interação dos fatores Fase do Ciclo e Mulher foi significativo no modelo, indicando que houve uma influência do fator aleatório Mulher nas fases do ciclo e pelo fato de observar diferença significativa somente para o fator Mulher que comprova que este é o responsável por encontrar diferenças significativas para o **índice de sebumetria**. Novamente, a variabilidade intrínseca da mulher afetou as fases do ciclo menstrual para cada uma delas, porém não sendo possível encontrar um padrão de resposta significativo das fases do ciclo para o modelo.

A diferença de oleosidade foi influenciada apenas pelo voluntário e não pela fase do ciclo ou pela região avaliada, no caso antebraço ou pelo tempo experimental.

Na **Figura 8**, o gráfico de efeitos principais permite avaliar as diferenças entre as médias das mulheres para o **índice de sebumetria**.

Figura 8. Gráfico de Efeitos Principais do modelo para o **Índice de sebumetria** no antebraço. Os valores são apresentados em $\mu\text{g sebo}/\text{cm}^2$. Para os fatores Mulher de 1 a 29; Fases 1-Folicular, 2-Ovulatória, 3-Menstrual e 4-Lútea; Região: Controle e Tratada; tempo: T_0 e T_6 .

Na **Figura 8**, observou-se que para o fator Mulher, as médias ficaram abaixo ou próximas a 2, porém, cinco mulheres apresentaram médias maiores. Este decorreu, provavelmente pela área do antebraço não ser uma região em que os **índices de sebumetria** são considerados elevados e que sejam possíveis detectar facilmente diferenças, segundo citado em PEREIRA (2009). Observou-se também poucas diferenças ou quase não detectáveis para o efeito Região Avaliada e Tempo.

Na **Figura 9**, pode-se avaliar o efeito da interação entre os Efeitos Fase do ciclo e Mulher no **índice de sebumetria**.

Segundo MACDONALD & CLARKE (1970), pesquisas demonstraram que a quantidade de lipídios na superfície da pele está relacionada com o ciclo menstrual, que o nível de colesterol eleva no meio do ciclo e o de triglicerídeos aumenta, continuamente, durante todo o ciclo, atingindo valor máximo em 28 dias, porém esses efeitos não foram observados durante o experimento provavelmente devido a variabilidade intrínseca do fator Mulher.

Figura 9. Interação das médias do **Índice de sebumetria** no antebraço das mulheres nas fases do ciclo menstrual. Os valores são apresentados em $\mu\text{g sebo}/\text{cm}^2$.

Na **Figura 9**, observou-se que a maioria das mulheres apresentou **índice de sebumetria** constante em todas as fases do ciclo, porém, houve um pequeno grupo

que apresentou variações significativas, que influenciou na resposta encontrada na **Tabela 3**.

Para as três propriedades biomecânicas realizadas no antebraço das voluntárias, notaram-se pequenas oscilações em função do ciclo menstrual, porém foram suficientes para encontrar evidências de alterações de hidratação superficial (índice de Corneometria) e de Perda de Água *Transepidermal* (TEWL) na pele das voluntárias em função do ciclo menstrual, reafirmando, porém, de forma intrínseca às mulheres os efeitos dos hormônios sexuais demonstrados pela literatura, mas não como um padrão de resposta para ciclo menstrual propriamente dito, principalmente ocasionado pelo estrógeno e progesterona (SHAH *et al.*, 1984, MACDONALD & CLARKE, 1970; HARVELL *et al.*, 1992).

Deve-se levar em consideração que o experimento teve a intenção de detectar apenas alterações fisiológicas, sem o objetivo de avaliar se a aplicação de produto (Composição Aromática) promoveria na pele alterações de hidratação, oleosidade ou perda de água *transepidermal*. Os resultados apresentados demonstraram que, realmente, existem evidências de alterações na pele em função do ciclo menstrual, mas que não existe um padrão de resposta e, pois cada mulher se comporta de forma diferente. O Efeito Mulher significativo ($p < 0,001$) e Mulher*Fase significativo ($p < 0,001$), ou seja, a mulher influenciou na resposta de cada fase do ciclo.

O fato de demonstrar que existe diferença entre a região tratada e não tratada para o índice de corneometria e TEWL ($p < 0,001$), comprovou-se a hipótese que os efeitos fisiológicos na pele podem afetar o desempenho do perfume (região tratada) ou vice-versa, pois se verificou maiores índices de corneometria e de TEWL. No índice de sebumetria, devido aos valores serem muito baixos e a alta variabilidade entre as mulheres não foi possível obter resultados mais conclusivos.

Esses resultados demonstrados no antebraço justificaram as avaliações em outras regiões do corpo que permita detectar maiores alterações fisiológicas, como a região interescapular. A partir dessas observações realizadas possibilitou-se entendimento maior dos efeitos ocasionados pelos hormônios sexuais na pele, conforme citado em PEREIRA, 2009; sendo que o local de medição pode interferir na quantidade e na atividade de algumas glândulas e as medições realizadas nas

costas dos voluntários apresentaram maior produção de oleosidade comparada com a face e com o antebraço.

7.1.3 Análise descritiva das medidas biomecânicas entre os antebraços e interescapular tratados

Foi realizada uma análise descritiva das medidas biomecânicas (perda de água transepidermal e índices de corneometria e de sebumetria) por meio de gráficos do tipo “boxplot” (gráficos em forma de caixa que mostram a variabilidade, mediana, média, “outliers” do tratamento dos dados).

Para a avaliação das variáveis biomecânicas, coletadas em triplicatas, foi utilizada a média de três medidas realizadas sempre no mesmo local. Analisaram-se, de forma descritiva, os dados obtidos na avaliação do antebraço direito tratado e da região interescapular, visualizados por meio de gráficos “boxplot”.

Nas **Figuras 10 a 12** podem-se comparar, para cada uma das variáveis, as fases do ciclo em cada tempo experimental. As variáveis biomecânicas foram analisadas descritivamente com as fases do ciclo (folicular, ovulatória, menstrual e lútea) no tempo inicial. As observações atípicas ou “Outliers” foram retiradas das análises para não influenciarem nos resultados das etapas posteriores.

A **Figura 10** segue a análise “boxplot” comparando as medidas do índice de **corneometria** obtidas em unidades arbitrárias de 0 a 120, nas quatro fases do ciclo menstrual no tempo inicial.

Na **Figura 10**, verificou-se que para o índice de **corneometria** as médias da região interescapular foram maiores que da área tratada para todas as fases do ciclo (PEREIRA, 2009); o local de medição pode interferir na quantidade e na atividade de algumas glândulas.

Figura 10. Análise “boxplot” do índice de corneometria (valores arbitrários de 0 a 120) das julgadoras/voluntárias no tempo inicial em cada fase do ciclo menstrual da região antebraço tratada e a região interescapular.

A **Figura 11** segue a análise “boxplot” comparando as medidas de TEWL do antebraço tratado e região interescapular, valores expressos em $\text{g/m}^2/\text{h}$, nas quatro fases do ciclo menstrual no tempo inicial.

Figura 11. Análise “boxplot” da medida de TEWL (valores expressos em $\text{g/m}^2/\text{h}$) das julgadoras/voluntárias no tempo inicial em cada fase do ciclo menstrual da região antebraço tratada e a região interescapular.

Na **Figura 11**, verificou-se que para a **TEWL** as diferenças entre as distribuições da região tratada e a interescapular são pequenas. Ou seja, a variabilidade foi pequena e praticamente não há diferença da TEWL entre as regiões do antebraço e interescapular.

A **Figura 12** segue a análise “boxplot” comparando as medidas do índice de **Sebumetria** entre o antebraço tratado e Interscapular, valores expressos em $\mu\text{g sebo}/\text{cm}^2$, nas quatro fases do ciclo menstrual no tempo inicial.

Figura 12. Análise “boxplot” da medida de sebumetria (valores expressos em $\mu\text{g sebo}/\text{cm}^2$) das julgadoras/voluntárias no tempo inicial em cada fase do ciclo menstrual. *Legenda:* (*) - observação atípica, “outlier” (valores encontrados entre 1,5 e 3 intervalos interquartil acima do terceiro quartil ou abaixo do primeiro)

Na **Figura 12**, notou-se que para o índice de **Sebumetria** os valores para a região interescapular foram maiores que da região tratada para todos os tempos experimentais, conforme citado em PEREIRA (2009); o local de medição pode interferir na quantidade e na atividade de algumas glândulas, que observaram que as medições realizadas nas costas dos voluntários apresentavam maior produção de oleosidade comparada com a face e antebraço. Esta medida foi utilizada com o intuito de se ter um parâmetro para detectar as diferenças fisiológicas na pele que somente com as medidas do antebraço não estavam sendo possível, desta forma

acreditava-se ser possível detectar se as diferenças fisiológicas na pele poderiam afetar no desempenho do perfume.

7.1.4 Modelos para avaliação dos dados biomecânicos entre os antebraços e interescapular tratados.

Para verificar se ocorreram alterações nas variáveis biomecânicas em relação à região avaliada (antebraço e interescapular tratados) foram elaborados modelos lineares generalizados com a variável biomecânica em t_0 como variável resposta; a fase do ciclo menstrual (ρ) e a região avaliada (λ) como fatores fixos; e as mulheres (β) como fatores aleatórios. Resultando na Equação 2.

$$y_{ilk}^p = \mu... + \rho_i + \lambda_l + \beta_k + \rho_i * \beta_k + \varepsilon_{ilk}$$

Equação 2

Onde: o índice p representa a variável biomecânica avaliada (será feito um modelo para cada variável biomecânica em t_0), i é referente às fases do ciclo (1 representa a fase menstrual, 2 a folicular, 3 a lútea e 4 a ovulatória), J a região avaliada (1 representa antebraço tratado, 2 refere-se a região interescapular) e k as mulheres (1, 2, 3, ..., 29). A média geral é representada por $\mu...$ e o erro aleatório é representado por ε .

A **Tabela 4** permitiu avaliar se na medida interescapular em t_0 se ocorreram efeitos significativos no **índice de Corneometria**, de acordo com o modelo linear generalizado.

Tabela 4. Efeitos de cada fator significativo ao modelo do **índice de Corneometria** entre o antebraço tratado e a região interescapular.

Fator	Graus de Liberdade	Estatística F	Valor_p	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	2,17	0,115	Não rejeita a hipótese.
Região Avaliada	1	87,36	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher	9	18,77	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher*Fase	27	0,45	0,983	Não rejeita a hipótese.
R2-Ajustado = 63,77%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_p $\leq 0,05$, existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de Significância: 5% / ** Hipótese: Não houve diferenças entre as médias do fator avaliado.

Na **Tabela 4**, observou-se que houve diferenças significativas entre as médias do **índice de Corneometria** entre área tratada e interescapular no tempo inicial e entre as médias das mulheres. Ou seja, a hidratação superficial foi

influenciada pelo local de avaliação, conforme MACDONALD & CLARKE (1970) e pelo fator intrínseco da mulher, cada mulher tem uma dieta, metabolismo que alteram as secreções das glândulas e aspectos fisiológicos da pele.

Na **Figura 13**, permitiu avaliar as diferenças entre as médias das mulheres e entre as regiões avaliadas (área tratada e interescapular) no tempo inicial.

Figura 13. Análise Gráfica dos Efeitos Principais do modelo para o índice de corneometria entre a área tratada e interescapular (valores arbitrários de 0 a 120). Para os fatores Mulher de 1 a 29; Fases 1-Folicular, 2-Ovulatória, 3-Menstrual e 4-Lútea; Região: Antebraco tratado e Interescapular; tempo: T_0 .

Na **Figura 13**, notou-se que existiu grande variabilidade na média do **índice de corneometria** para o Fator Mulher, ou seja a variabilidade entre as mulheres foi muito alta devido às diferenças de dieta e do metabolismo que afetam fisiologicamente a pele. O gráfico de comparação das médias para as regiões indicou que a da região tratada foi significativamente menor que a da região interescapular, concordante com a literatura, como demonstrado em MACDONALD AND CLARKE, 1970.

Na **Tabela 5**, avaliou-se quando considerada a avaliação interescapular em t_0 houve efeitos significativos no **TEWL** de acordo com o modelo linear generalizado.

Tabela 5. Efeitos de cada fator significativo ao modelo da **TEWL** entre o antebraço tratado e a região interescapular

<i>Fator</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Estatística F</i>	<i>Valor_p</i>	<i>CONCLUSÃO *</i>
Fase do Ciclo	3	0,37	0,775	Não rejeita a hipótese.
Região Avaliada	1	0,55	0,463	Não rejeita a hipótese.
Mulher	9	5,64	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher*Fase	27	1,31	<0,217	Não rejeita a hipótese.
R2-Ajustado = 44,70%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_P $\leq$ 0,05, existe diferença significativa entre os fatores
 * Nível de Significância: 5% / ** Hipótese: Não há diferenças entre as médias do fator avaliado.

Na **Tabela 5**, notou-se que houve diferenças significativas entre as médias da **TEWL** das mulheres, mas não houve diferença significativa da região avaliada conforme analisado descritivamente nos gráficos “Box Plot” da **Figura 11**, a variabilidade foi pequena e sem nenhuma tendência. O fator mulher foi o mais preponderante, devido a variabilidade grande entre as mulheres, fatores intrínsecos entre elas que não permitiu encontrar nenhum padrão de resposta significativo para o modelo em função do ciclo menstrual.

Na **Figura 14**, os efeitos principais permitem avaliar as diferenças entre as médias das mulheres para **TEWL**.

Figura 14. Gráfico de Efeitos Principais do modelo para o índice de TEWL (valores expressos em g/m²/h). Para os fatores Mulher de 1 a 29; Fases 1-Folicular, 2-Ovulatória, 3-Menstrual e 4-Lútea; Região: Antebraço tratado e Interescapular; tempo: T₀.

Na **Figura 14**, observou-se que ocorreu grande variabilidade na média a **TEWL** entre as mulheres, demonstrando que o efeito mulher foi significativo ($p < 0,001$) para o experimento, porém observam-se poucas diferenças de valores entre as regiões aplicadas e a fase do ciclo. A variabilidade elevada entre as mulheres interferiu nos efeitos entre as regiões e entre as fases do ciclo, que provavelmente, se fizéssemos uma avaliação individual poderíamos encontrar algum padrão de resposta em função do ciclo menstrual.

Na **Tabela 6**, permitiu avaliar se quando considerada a avaliação interescapular em t_0 houve efeitos significativos no **índice de Sebumetria**, de acordo com o modelo linear generalizado (Equação 2).

Tabela 6. Efeitos de cada fator significativo ao modelo do **índice de sebumetria** entre o antebraço tratado e a região interescapular.

Fator	Graus de Liberdade	Estatística F	Valor_p	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	0,91	0,449	Não rejeita a hipótese.
Região Avaliada	1	58,24	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher	9	10,01	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher*Fase	27	0,38	0,995	Não rejeita a hipótese.
R2-Ajustado = 44,59%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_p $\leq 0,05$, existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de Significância: 5% / ** Hipótese: Não há diferenças entre as médias do fator avaliado.

Na **Tabela 6**, verificou-se que houve diferenças significativas entre as médias do **índice de sebumetria para o Fator Região avaliada**, entre a área tratada e interescapular ($p < 0,001$) e para o Fator Mulher ($p < 0,001$), mais uma vez o fator mulher foi preponderante no modelo, com uma alta variabilidade entre mulheres, que não permitiu verificar um padrão de resposta significativo para as fases do ciclo. Entretanto, evidenciou-se a diferença entre as regiões avaliadas, concordante com a literatura, conforme demonstrado por MACDONALD & CLARKE, (1970).

Na **Figura 15**, avaliaram-se as diferenças entre as médias das mulheres e entre as regiões avaliadas para o índice de Sebumetria.

Figura 15. Gráfico de Efeitos Principais do modelo para o índice de Sebumetria (valores expressos em $\mu\text{g sebo/cm}^2$). Para os fatores Mulher de 1 a 29; Fases 1-Follicular, 2-Ovulatória, 3-Menstrual e 4-Lútea; Região: Antebraço tratado e Interecapular; tempo: T_0 .

Na **Figura 15**, observou-se que houve grande variabilidade na média do **índice de Sebumetria** entre as mulheres, demonstrando que o Efeito Mulher foi significativo ($p < 0,001$) para o experimento e que afetou provavelmente, um padrão de resposta significativo em função do ciclo, observando-se apenas leve tendência de valores mais altos de índice de Sebumetria nas fases folicular e lútea em relação às outras fases, porém não foram conclusivos. Talvez exista algum padrão resposta

individual para cada mulher, mas que não foi verificado neste estudo. O gráfico de comparação das médias para as regiões demonstrou que a média da região tratada foi menor que a da interescapular, efeito significativo da região avaliada ($p < 0,001$), concordantes com as informações da literatura (MACDONALD & CLARKE, 1970).

Novamente, para as três propriedades biomecânicas realizadas entre antebraço tratado e região interescapular das voluntárias, notaram-se pequenas oscilações em função do ciclo menstrual, porém suficientes para encontrar evidências em todas as medidas, ou pelo menos em duas, na pele das voluntárias nas propriedades biomecânicas da pele que foram realizadas em função do ciclo menstrual, reafirmando a influência dos hormônios sexuais demonstrados pela literatura, principalmente o estrógeno e a progesterona (SHAH *et al.*, 1984, MACDONALD AND CLARKE, 1970; HARVELL *et al.*, 1992).

Quando se comparam as áreas tratadas (região interescapular e antebraço), os resultados apresentados demonstraram que, realmente, houveram evidências de alterações na pele em função do ciclo menstrual, mas não existiu um padrão de resposta e que para cada mulher apresentou-se de uma forma diferente, efeito mulher significativo ($p < 0,001$).

Os resultados encontrados demonstraram que as alterações detectadas foram intrínsecas ao indivíduo. Este fato se justifica, provavelmente, devido aos hábitos de alimentação, metabolismo e das próprias oscilações hormonais que podem afetar a oleosidade, hidratação e perda de água *transepidermal* e, portanto, são intrínsecas de cada voluntária (BERARDESCA *et al.*, 1995). A reatividade da pele a vários estímulos apresenta diferenças por regiões do corpo, que são atribuídas principalmente a dois fatores: o primeiro envolve as diferenças anatômicas da estrutura da pele e o segundo engloba as propriedades biofísicas da pele, como a função de barreira, permeabilidade da pele e resposta vascular e às substâncias aplicadas topicamente (DISTANTE *et al.*, 2003).

Os dados interescapulares realizados com apenas 10 voluntárias comparados aos do antebraço tratado não foram representativos, como evidenciados no antebraço tratado e não tratado que foi realizado com 29 voluntárias, mas demonstraram que, realmente, existem diferenças de medidas biomecânicas dependendo da área onde se realiza o experimento.

8. CONCLUSÕES

- As fases do ciclo não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas variáveis biomecânicas da pele (Índices de Corneometria, Sebumetria e Perda de Água *Transepidermal*–TEWL) quando analisadas isoladamente, isto é, considerando somente o efeito desse fator.

- A interação dos fatores Fase do Ciclo e Mulher (mulher*fases) nos resultados do **índice de Corneometria, Sebumetria e a TEWL** ($p < 0,001$), ou seja, o efeito da fase do ciclo nos índices mencionados variou de uma mulher para outra (intrínseco ao indivíduo), fato que pode ser justificado pela dieta e metabolismo distintos que afetam fisiologicamente a pele de cada uma delas, porém o número de voluntários foi crítico (**29**) para obter alguma inferência a população, mas foi possível avaliar tendências para elaboração de um estudo representativo para a população.

- Considerando as medidas realizadas no antebraço, o **índice de Corneometria** ($p < 0,001$) e **TEWL** ($p: 0,011$) apresentaram diferenças nas médias da região tratada e do controle, sendo que, a região tratada apresentou média maior que a do controle, demonstrando que estas características podem afetar o desempenho do perfume aplicado na pele (região tratada); ou que podem ter sido ocasionadas pela solução hidro alcoólica do perfume aplicada no local que afetou o substrato e, conseqüentemente, os índices.

- A comparação da região interescapular com a região do antebraço tratada revelou que para a média dos **índices de Corneometria e de Sebumetria** da região do antebraço tratada foi significativamente menor ($p < 0,001$) que da interescapular em concordância com a literatura. O fator Mulher foi significativo para todos **os índices** ($p < 0,001$) preponderante para o modelo, pois não se obteve um padrão resposta em função do ciclo menstrual, que novamente se justifica pela alta variabilidade entre as mulheres, por fatores intrínsecos ao indivíduo que são difíceis de controlar como o próprio metabolismo e dieta que afetam fisiologicamente a pele. Acredita-se que talvez tenha algum padrão analisando de forma individual as voluntárias em função do ciclo menstrual, porém não foi verificado neste estudo.

- Mesmo com o aumento no número de voluntárias, não ocorreram diferenças significativas, pois acarretou no aumento da variabilidade entre as mulheres, ou seja, o Fator Mulher foi mais expressivo o que influenciou em todos os

Índices. Notaram-se algumas diferenças no local onde a composição aromática foi aplicada que ressalta a possibilidade de avaliar interações da formulação com a pele e verificar alterações que essa pode causar.

- Outro ponto que deve ressaltar é a possibilidade de verificar outros meios de identificar alterações fisiológicas na pele, talvez a sensibilidade dos métodos utilizados neste estudo não seja o suficiente para detectar alterações tão sutis ocasionadas por hormônios na pele.

REFERÊNCIAS

- AGNER, T; DAMM, P.; SKOUBY, S. O. Menstrual cycle and skin reactivity. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 24, n. 4, p. 566-570, 1991.
- ANDREASSI, M.; ANDREASSI, L. Utility and limits of noninvasive methods in dermatology. **Expert Review Dermatology**, v. 2, n. 3, p. 249-255, 2007.
- BARDIN, C. W., THAU, R. B. **Physiological basis of Medical Practice**, Ed. J. B. West. Williams and Wilkins, Baltimore, 11.ed., 1985, 921p.
- BAREL A.O., CLARYS P. Measurement of epidermal capacitance. In: Serup J, Jemec GBE, editors. **Handbook of non-invasive methods and the skin**. Boca Raton, London: CRC Press; 1995. p. 165-170.
- BERARDESCA E, ELSNER P, WILHELM, K. P., MAIBACH, H.I., editors. **Bioengineering of the skin: methods and instrumentation**. Boca Raton, London: CRC Press (CRC series in dermatology); 1995. 141p.
- DISTANTE, F; RIGANO, L.; D'AGOSTINO, R.; BONFIGLI A.; BERARDESCA, E. Diferenças Intra e Inter-Indivíduos em Pele Sensível. **Cosmetic & Toiletries** (português), v. 15, n. 2, p. 60, 2003.
- GREENBERG, J. S.; BRUESS, C. B.; CONKLIN, S. C. Exploring the dimensions of human sexuality. 3rd ed. [S.l.]: Jones & Bartlett. p.136–137, 2007.
- GUERRA, E. C. **Proposta e análise de uma metodologia para avaliação do desempenho técnico de perfumes**.Campinas,2002.81p.[Dissertação de Mestrado- Fac. de Engenharia Mecânica]- Universidade Estadual de Campinas.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- HARVELL, J.; HUSSONA-SABED, I.; MAIBACH, H.I. Changes in transepidermal water loss and cutaneous blood flow during the menstrual cycle. **Contact Dermatitis**, v. 27, n. 5, p. 294-301, 1992.
- HUMMEL, T.; GOLLISCH, R.; WILDT, G.; KOBAL, G. Changes in olfactory perception during the menstrual cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 47, n. 7, p. 712-715, 1991.
- MACDONALD, R.R. Cyclic changes in cervical mucus. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 76, p. 1090-1099, 1969.
- MACDONALD, I; CLARKE, G. Variations in the levels of cholesterol and triglyceride in the skin surface fat during the menstrual cycle. **British Journal of Dermatology**, v. 4, n. 83, p. 473-476, 1970.
- MACEDO, O.R. **Segredos da boa pele: preservação e correção**. Ed. São Paulo: Senac, 1998. p.14.
- MEDCIN INSTITUTO DA PELE. **Protocolo de estudo**: estudo da substantividade de perfume na pele em função do ciclo menstrual. Osasco, 2007. v. 4, n. 54-07 [Documento interno].
- MENÁRGUEZ, M.; PASTOR, L.M.; ODEBLAD, E. Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. **Human Reproduction**, v. 19, n. 9, p. 1782-1789, 2003.
- NAVARRETE-PALACIOS, E.; HUDSON, R.; REYES-GUERRERO, M. S.; GUEVARA-GUZMA'N, R. Lower olfactory threshold during the ovulatory phase of the menstrual cycle. **Biological Psychology**, v. 63,n. 3, p. 269-279, 2003.
- PAPANICOLAOU, G.N. A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 51, p. 317, 1946.
- PEREIRA, C. S. **Estudo da substantividade de uma composição aromática na pele em função do ciclo menstrual**. São Paulo. 150p. [Dissertação de Mestrado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2009.
- PEREIRA, C. S., BABY, A. R., KANEKO, T. M; VELASCO, M. V. R. Sensory Approach to Measure Fragrance Intensity on the Skin. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, p. 871–901, 2009.

- PEREIRA, C. S.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Review Article: Fragrance technology for the dermatologist – a review and practical application. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 9, p. 230–241, 2010.
- RYDBERG, E. Fern phenomenon arborization test. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.28, p.172, 1948.
- ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia**: texto e atlas. 2.ed. Rio de Janeiro: Panamericana, 1998. p.347-377.
- SCHÄEFER, H.; KUHN-BUSSIUS, H. Methodik zur quantitativen Bestimmung der menschlichen Talgsekretion. **Archives of Dermatological Research**, v. 238, n. 4, p. 429-435, 1970.
- SCHUDEL, M.; QUELLET, C. **Givaudan Memorandum Perfume Substantivity**. Dubendorf, 2004. [Documento Interno].
- SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. A essência das composições aromáticas. **Cosmetics & Toiletries** (português), v. 17, n. 6, p. 50-55, 2005.
- SHAH, M.G.; MAIBACH, H.I. Estrogen and skin: an overview. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 2, n. 3, p. 143-150, 2001.
- SHAH, A.; SATHYANARAYANA, K.H.; RUEDI, B.; MAGRINI, G. Determination of fertility interval with ovulation time estimation using differential skin surface temperature (DST) measurement. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 41, n. 5, p. 771-774, 1984.

Capítulo 2

**Emprego da técnica de *headspace* e cromatografia a gás
/espectrometria de massa avaliação de uma composição aromática
aplicada na pele em função do ciclo menstrual**

Resumo

Os componentes da composição aromática podem ter comportamentos diferentes na pele. Além disso, sua durabilidade e a alteração de suas características decorrem pela mistura dos inúmeros compostos que contém grupos funcionais, como acetonas, aldeídos, ésteres, amidas e alcenos que podem ser afetados quando ocorre alguma modificação no substrato onde são aplicados (pele). O presente trabalho teve como objetivo analisar a variação dos compostos aromáticos liberados pela pele de um grupo distinto de mulheres durante as fases do ciclo menstrual. O estudo envolveu 29 voluntárias, com idade entre 18-40 anos e 2 homens, que foram usados como grupo controle. A cada voluntário aplicou-se 40 µl de perfume aplicado na pele nos tempos inicial (t_0), 1,5; 3; 4,5 e 6h, sendo que os compostos aromáticos liberados foram adsorvidos em tubo Tenax[®], utilizando a técnica de coleta de *headspace* dinâmico. Após a coleta, o tubo foi acoplado num dessorçor térmico e os componentes foram analisados por cromatografia a gás associada a espectrometria de massa (GC-MS). Os dados de íons cromatográficos, mais precisamente, a abundância de diferentes fragmentos (m/z) em função do tempo de retenção foi exportada em formato ASCII. Os dados foram compilados no software estatístico MATLAB 6.5 e foram gerados gráficos de contorno dos cromatogramas e realizada análise de componentes principais (ACP) usando Uncrambler 9.5. O estudo por indivíduo gerou um padrão de resposta para a liberação dos compostos aromáticos. Pode-se concluir que existe um padrão de liberação de compostos por indivíduo associado ao ciclo menstrual.

Palavras-Chave: *headspace* , quimiometria, composição aromática, ciclo menstrual

1. INTRODUÇÃO

Quando se fala de perfume, o mercado é muito competitivo, pois a cada dia são lançados vários perfumes diferentes. Os odores desempenham papel fundamental na indústria de cuidado pessoal. É esse o motivo da existência multi-bilionária de composição aromática. A composição aromática é tipicamente o ingrediente mais caro de uma fórmula de cosmético. Apesar da inquestionável importância da composição aromática, nosso conhecimento do sentido do olfato ainda é, surpreendentemente, incipiente. A preocupação em se ter um perfume que apresente a melhor aceitação pelo consumidor, principalmente na pele da mulher, direciona as pesquisas para um estudo mais elaborado dos fatores que afetam o desempenho quando aplicado.

Na pele ocorrem desequilíbrios biológicos (envelhecimento e disfunções psicológicas, como psoríase) ou que podem ser induzidos pelo contato com produtos irritantes. Segundo CHILCOTT (2000); SEKIGUCHI *et al.* (2001) essas condições podem acelerar a multiplicação dos queratinócitos basais e podem influenciar o processo de diferenciação para corneócitos, afetando a camada do extrato córneo. Ou seja, muitos processos, entre eles, a oscilação dos hormônios sexuais, podem afetar a permeabilidade, a proliferação de células e isto podem impactar na desempenho de um perfume, por exemplo, aplicado na pele.

Os componentes da composição aromática podem ter comportamentos diferentes na pele. Além disso, sua durabilidade e a alteração de suas características decorrem pela mistura dos inúmeros compostos que contém grupos funcionais, como acetonas, aldeídos, ésteres, amidas e alcenos que podem ser afetados quando ocorre alguma alteração no substrato onde são aplicados, como a pele, por exemplo (PEREIRA, 2009).

A oscilação hormonal no ciclo menstrual é caracterizada por diferenças cíclicas na concentração dos hormônios luteinizante, folículo estimulante, estrogênio e progesterona. O aumento da secreção de estradiol no plasma na fase pré-ovulatória resulta numa vasodilatação. Similarmente, a elevação da secreção do hormônio termogênico progesterona na fase pós-ovulatória aumenta a temperatura basal corpórea acima dos níveis da fase pré-ovulatória. Essas mudanças afetam a fisiologia da pele e podem afetar a duração do perfume na pele segundo SHAH *et al.* (1984).

Outro fato que deve ser considerado é a questão da percepção do odor pela mulher alterar durante o ciclo menstrual. Estudos realizados em 1950 e 1960 registraram a elevação na sensibilidade do odor próximo ao período de ovulação, entretanto, esses não foram estatisticamente rigorosos, nem foram avaliados os níveis hormonais, indicadores do tempo de ovulação. Posteriormente, um estudo subsequente encontrou um pico de sensibilidade ao odor na fase lútea do ciclo menstrual (HUMMEL *et al.*, 1991).

Os efeitos dos estrogênios na pele envolvem o aumento da vascularização, o que eleva a irrigação superficial da pele, fato não observado nos homens. Estudos indicaram que a perda transepidérmica de água (TEWL) é significativamente maior no dia de secreção mínima de progesterona e de estrógeno em relação ao de secreção máxima. Também ocorre aumento no fluxo sanguíneo e elevação da temperatura basal corpórea da fase pré-ovulatória para a pós-ovulatória, quando se está no pico máximo de secreção de progesterona, comparado com as outras fases do ciclo (HARVELL *et al.*, 1992).

Duas metodologias que podem ser empregadas para avaliar esses fenômenos são a avaliação sensorial e instrumental, que são ferramentas para quantificar e qualificar as mudanças ocorridas na característica olfativa e de intensidade de perfume durante o tempo de aplicação na pele.

Métodos científicos específicos têm sido desenvolvidos para medir com precisão e reprodutibilidade adequada, de uma forma objetiva, a resposta humana ao estímulo. Gostar ou desgostar não são somente questões que são respondidas pela análise sensorial. A percepção do consumidor associada à sua resposta emocional tem sido investigada também, bem como o impacto do armazenamento e a variabilidade do processo e da embalagem, que podem ser determinados. Relações entre a análise instrumental e a percepção sensorial podem ser estabelecidas também. Muitos testes sensoriais podem ser elaborados, mas todo método deve ser selecionado antes dos dados serem coletados (DRAKE, 2007).

A avaliação analítica ou instrumental neste segmento envolve a determinação quantitativa por meio da Cromatografia a Gás e da Análise de *Headspace* dos inúmeros componentes da composição aromática. “Esta técnica quantifica a partição individual dos componentes da composição aromática da pele para o ar. As informações obtidas são traduzidas para um perfil de percepção

olfativa” (BAYDAR *et al.*, 1995). Na cromatografia a gás as características de sensibilidade, quantidade mínima detectável e quantificável, linearidade e seletividade são levadas em consideração assim como nos outros métodos cromatográficos e a análise de *headspace* consiste na atmosfera gasosa que circunda uma amostra, envolvendo a avaliação de componentes voláteis.

As técnicas que empregam o *headspace* coletam os compostos presentes nesta atmosfera, o que pode ser realizado de modo estático ou dinâmico, este último utiliza um gás inerte que tem como função o arraste dos componentes voláteis, em geral por um material adsorvente, cujo material coletado deverá ser liberado pelo emprego de solvente ou de temperatura elevada.

2. Análise Cromatográfica a gás para caracterização de componentes voláteis

2.1 Cromatografia em fase gasosa/ Espectrometria de massa

A cromatografia é um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária e a outra é móvel. Esta técnica é resultado de processos repetidos de adsorção e dessorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária. A distinção entre os principais métodos cromatográficos ocorre em termos das propriedades físico-químicas da fase móvel. Na cromatografia em fase gasosa (CG), a fase móvel é um gás inerte, normalmente nitrogênio, hélio ou hidrogênio. Diferentes detectores de ionização podem ser acoplados à CG e suas características (sensibilidade, quantidade mínima detectável, linearidade e seletividade) diferem significativamente (ROUESSAC & ROUESSAC, 2004).

Há diferentes detectores acoplados à cromatografia em fase gasosa. A razão por ser mais do que um tipo de detector acoplado à cromatografia em fase gasosa é obter uma detecção mais seletiva e/ou altamente sensível de compostos específicos. Certos detectores são universais, sensíveis a praticamente todos os compostos eluídos; outros são mais sensíveis a um tipo particular de moléculas (ROUESSAC & ROUESSAC, 2004).

Espectroscopia de Massa (MS) se baseia no princípio que misturas orgânicas de compostos voláteis, que são separados por cromatografia em fase gasosa através de uma coluna capilar, são levados a uma fonte de íons por um gás

de arraste (hélio) para obter seu espectro de massa, que em conjunto com o índice de retenção dos gases fornecem dados suficientes para elucidar a estrutura de compostos com grupos funcionais e de baixa massa molecular (BELITZ, 1999). Na sequência é realizada a comparação do espectro da amostra injetada, com espectros de referências de uma biblioteca (compostos definidos).

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica utilizada para a medida da massa molecular de substâncias químicas (que devem estar eletricamente carregadas). Permite também identificar, quantificar e elucidar as propriedades estruturais de moléculas e atualmente é uma técnica indispensável em diferentes áreas, como química, biologia, ciências médicas, tecnológicas e inúmeras outras.

O princípio básico da espectrometria de massas consiste em gerar íons a partir de compostos (orgânicos ou inorgânicos) através de um método de ionização apropriado, separá-los através de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas, e detectar quali e/ou quantitativamente os compostos a partir da relação massa-carga dos íons (m/z) e suas respectivas abundâncias por meio de um detector, que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico em função da relação m/z é convertida por um processador de dados, que gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004; SARAIVA, 2008).

2.2 Análise de *Headspace*

O *headspace* consiste na atmosfera gasosa que circunda uma amostra. As técnicas que empregam o *headspace* coletam os compostos presentes nesta atmosfera, o que pode ser feito de modo estático ou dinâmico, este último utilizando um gás inerte que tem como função o arraste dos *flavors*, em geral para um dispositivo adsorvente. No uso de adsorvente, o material coletado deverá ser liberado pelo emprego de solvente ou de temperatura.

Os métodos de *headspace* para isolamento de compostos voláteis pode ser exemplificado pela natureza e espessura da fase adsorvente: são disponíveis comercialmente adsorventes de diferentes polaridades e espessuras de fase. Observa-se que polidimetilsiloxano (PDMS) é mais sensível a compostos não polares, poliacrilato (PA) é preferido para compostos polares e a combinação destes

com outros adsorventes tais como divinilbenzeno (DVB), carboxen (CAR) e carbowax (CW) é utilizada para as mais variadas composições encontradas nas diversas amostras. Segundo a literatura, o uso do carboxen nestas fibras aumenta a capacidade de retenção em função de potencializar simultaneamente os efeitos de adsorção e de distribuição dos analitos na fase estacionária (BELITZ, 1999; KOLB & ETTRE, 1991).

Quanto à espessura de fase, os compostos voláteis requerem o uso de fibras com espessura de fase maior, exigindo um tempo mais alto para atingir o equilíbrio entre a fibra e as substâncias presentes no *headspace*. Fibras com espessura de fase maior possibilitam maior sensibilidade, pois tem a capacidade de reter maior concentração de voláteis (WARDENCKI *et al.*, 2004).

Após a adsorção dos componentes voláteis, os compostos são liberados por dessorção térmica através de uma dessorçor, como ATD 650 Turbo Matrix (*Automatic Thermal Desorber*) acoplado ao cromatógrafo a gás ou no próprio injetor cromatográfico por efeito da temperatura, o que torna a técnica muito simples para ser utilizada (WARDENCKI *et al.*, 2004). O processo de extração dos componentes voláteis pode ser feito por diferentes técnicas, tais como:

- *Agitação e temperatura da amostra*: observa-se que a presença de agitação e aquecimento (40-60°C) acelera a transferência dos voláteis da matriz para o adsorvente.

- *Adição de sais solúveis à amostra*: a eficiência de extração é aumentada pela adição de sais, tais como cloreto de sódio, carbonato de potássio e outros, sendo o primeiro mais comum. A adição de sais é preferencialmente utilizada quando da extração por *headspace*, a fim de poupar a fibra da presença destes sais. Segundo ROCHA *et al.* (2001) isto é um resultado direto do fenômeno de *salting-out*, que consiste na diminuição da solubilidade dos compostos na fase aquosa, promovendo sua passagem para a fase de vapor.

- *Dessorção do analito*: a dessorção eficiente dos analitos adsorvidos na fibra é dependente de fatores como: volatilidade do composto, espessura de fase da fibra, temperatura do injetor cromatográfico, *design* do injetor e tempo de dessorção. Geralmente, utiliza-se o injetor no modo sem divisão de fluxo, de 2 a 5 minutos de válvula fechada, de modo a garantir toda a transferência dos voláteis adsorvidos para a coluna cromatográfica. A temperatura do injetor deve levar em consideração

o ponto de ebulição do componente menos volátil presente na fibra. A fim de evitar alargamento dos picos e garantir uma boa resolução cromatográfica da amostra, deve-se manter a temperatura do forno cromatográfico o mais baixa possível, ou ainda optar por criogenia (WARDENCKI *et al.*, 2004).

- *Purge and trap*: é a extração de voláteis por fluxo contínuo de gás inerte através ou na superfície acima da amostra, sendo, em seguida, capturados e se necessário concentrados em adsorventes (carvão ativo, Porapak[®], Tenax[®], entre outros). A liberação dos voláteis capturados pode ser feita por meio da dessorção térmica ou extração com solventes (OLIVEIRA, 2009).

2.3. Avaliação da composição aromática

A história da perfumaria se confunde com a própria história do mundo. As composições aromáticas sempre representaram refinamento e requinte em várias culturas e sociedades. Os perfumes foram muito usados pelos povos antigos. Da China ao Egito e da Pérsia a Roma, as pessoas se perfumam em exagero, usando composições aromáticas nos cabelos, roupas, banhos, escravos favoritos e cavalos. O perfume fez parte, também, da ciência médica, sendo usado por monges, doutores e homens esclarecidos, como indica o Livro Assírio das Ervas, datado do segundo milênio antes de Cristo. Os avanços na área de higiene também “andaram de mãos dadas” com o desenvolvimento das composições aromáticas (SCHUELLER & ROMANOWSKI, 2005).

Em perfumaria, podemos utilizar inúmeras matérias-primas, em média 2000 a 3000 matérias-primas diferentes, classificadas como naturais (provenientes da natureza: elementos vegetais ou animais) ou sintéticas (produzidas artificialmente). Para melhor compreensão, o universo de matérias-primas pode ser dividido em 13 grupos olfativos: herbal, aldeídico, verde, frutal, floral, especiaria, madeira, couro, animal, musk, âmbar e vanila (PEREIRA *et al.*, 2009).

Um perfume pode ser definido como sendo uma dispersão hidroalcoólica contendo de 12 a 30% de óleos essenciais ou composições aromáticas, dispersos homogeneamente. A composição aromática é o resultado da mistura de diversas matérias-primas, elaborada por meio do conhecimento dos grupos químicos e de suas reações ou interações, juntamente com a habilidade do perfumista em fazer

seu balanceamento na composição com intuito de criar um produto cosmético que agrade ao usuário e atenda suas expectativas (PEREIRA *et al.*, 2010).

A estrutura de uma composição aromática é formada por 3 partes: notas de cabeça, de corpo e de fundo, fundamentadas nas características de volatilidade das matérias-primas e do valor odorífero dessas, que compõem a composição aromática e podem ser definidas conforme citado por PEREIRA, 2009:

Notas de Cabeça: é a primeira impressão do odor que se tem da composição aromática (quando se abre o frasco do produto ou se aplica o perfume na pele), caracterizada pelos componentes mais voláteis. Na pele, as notas de cabeça permanecem até 15 minutos após a aplicação do perfume. Exemplo: matérias-primas cítricas, verdes, florais e frutais.

Notas de Corpo: representam o “coração” da composição aromática. Constitui o tema principal e determina caráter da composição aromática. São formadas por componentes de volatilidade intermediária. Tem duração de 15 minutos até 4h e serão, essencialmente, responsáveis pelo “reconhecimento” do perfume, como se fosse sua “assinatura”, pois são as notas de maior percepção pelo usuário da composição aromática, e por quem se aproxima dela. Exemplo: matérias-primas florais, especiarias, aldeídos.

Notas de Fundo: representam a etapa final da composição aromática. Envolvem as porções residuais do perfume, sendo formadas por componentes de baixa volatilidade e alta massa molar, considerados popularmente e erroneamente de “fixadores”. As notas de fundo aparecem depois que as notas de cabeça se evaporaram e as notas de corpo não estão quase presentes. Possui duração entre 4 e 8h. Exemplo: matérias-primas como madeiras, âmbar, musk.

No ramo da perfumaria, para que um fabricante tenha garantia de sucesso ao lançar um produto no mercado de qualidade elevada, e com grandes chances de aceitação pelo consumidor, é fundamental a análise e o monitoramento das seguintes características sensoriais do perfume:

- agradabilidade do odor da composição aromática, que é uma das formas de medir o grau de aceitabilidade do produto pelo consumidor;
- intensidade, grau de percepção do odor pelo usuário, ou seja, se ele é “fraco”, “moderado”, “forte”, etc.;

Segundo SCHUDEL&QUELLET (2004) a intensidade de perfume e a interação da composição aromática e pele estão relacionados com a percepção da composição aromática e a interação com o local de aplicação. Três fatores importantes interferem nesta variável:

valor odorífero dos componentes da composição aromática (pressão de vapor dividido pelo threshold); entende-se threshold como concentração mínima perceptível

composição do substrato onde foi aplicado;

pressão de vapor da composição;

threshold dos componentes

efeito de partição (interação perfume-substrato).

O estudo das matérias-primas que compõem uma composição aromática se torna primordial para compreender os efeitos que a oscilação hormonal causam na pele que podem afetar o desempenho de cada ingrediente e consequentemente influenciar na percepção do perfume aplicado na pele, desde que a separação dos compostos voláteis requer uma cromatografia a gás de alta resolução. As colunas capilares são utilizadas pela alta resolução e eficiência. Os injetores também evoluíram, sendo os tipos *Split-Splitless*, *on-Column* e *Programmed Temperature Vaporizer* (PTV) os mais utilizados (FRANCO & JANZANTTI, 2003).

A associação de cromatógrafos a gás a espectrômetros de massa (CG-EM) permitiu o avanço na identificação dos compostos voláteis. Padrões puros e o índice de retenção de Kovats têm auxiliado na identificação dos compostos (FRANCO & JANZANTTI, 2003). Além do emprego de técnicas como cromatografia a gás e espectrometria de massa, as avaliações sensoriais devem ser correlacionadas com avaliações instrumentais, a fim de produzir resultados com aplicações práticas (BASTOS, DA SILVA e FRANCO, 1998). Após a separação dos compostos voláteis, a avaliação sensorial realizada por técnicas olfatométricas pode indicar os compostos voláteis odoríferos. Nem todos os picos dos cromatogramas representam compostos voláteis odoríferos, assim como o tamanho dos picos não é indicativo da contribuição efetiva do composto para a descrição do aroma (SIMÕES *et al.*, 2009).

No estudo realizado por PEREIRA, 2009, apesar de exploratório, demonstrou o aumento da percepção da mulher na fase lútea, e menor na pele do homem, nesta mesma fase. Os resultados obtidos devem ser considerados no

desenvolvimento de composição aromáticas e nos instiga a explorar matérias-primas aromáticas que influenciem no comportamento da mulher em função do ciclo menstrual a fim de verificar o perfil olfativo dessas e identificar quais das matérias-primas que são mais susceptíveis as oscilações que elevem a estabilidade do perfume ou que interagem com aspectos fisiológicos da pele determinando um desempenho do perfume intrínseco àquele organismo, que futuramente possibilitam avaliar o desempenho do perfume por tipo de pele, tom de pele, por exemplo.

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi identificar as matérias-primas aromáticas da composição aromática e suas alterações que ocorrem na pele da mulher em função do ciclo menstrual que poderiam afetar o desempenho da composição aromática na pele ou se a alteração olfativa na mulher é predominante sobre as alterações fisiológicas ocasionadas pelos hormônios sexuais na pele por meio de técnicas de análise estatística multivariada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Aplicação de técnica multivariada para identificação dos componentes voláteis da composição aromática em função do ciclo menstrual

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar se existe um padrão de resposta, perfil espectrométrico em função do ciclo menstrual.
- Identificar os ingredientes da composição aromática de maior susceptibilidade às oscilações hormonais.
- Verificar a possibilidade de correlacionar os dados instrumentais com as propriedades biomecânicas (Corneometria, Sebumetria e TEWL) em função do ciclo menstrual.

4. MATERIAL, SUJEITOS E MÉTODOS

Em PEREIRA (2009) realizou em estudo com objetivo de avaliar a substantividade de um composição aromática aplicada na pele em função do ciclo

menstrual, relacionando a análise sensorial e as medidas biomecânicas (Índice de Corneometria, de Sebumetria e TEWL). Neste presente estudo, tem-se o objetivo de complementar a análise feita anteriormente por meio do estudo de correlação instrumental e sensorial da composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual. No entanto, como se trata de uma complementação do estudo, o Material, Sujeitos e Métodos são exatamente os mesmos descritos por PEREIRA, (2009), porém com um número de julgadores maior para dar representatividade e confiabilidade nos dados gerados para avaliação da correlação instrumental e sensorial.

4.1 Materiais e Equipamentos

4.1.1 Solvente

- Álcool etílico desodorizado e neutro 80°GL, grau de pureza analítico, produto comercializado pela Usina Ester.

4.1.2 Matérias-primas

- Composição aromática: componente aromático, produto comercializado pela Givaudan: Ciclo[®] 1910 (Floral Verde Amadeirado).

Floral Verde Amadeirado é composta principalmente por notas olfativas de fundo, menos difusivas que entregam maior substantividade de perfume na pele. As frações florais e verdes estão em menor quantidade, mas que representam o frescor e a identidade da composição aromática. As notas verdes correspondem ao topo, são as mais voláteis e a floral, o corpo da composição aromática.

- Irgasan[®] DP 300 (Triclosan): conservante da formulação, grau de pureza farmacêutico, produto comercializado pela Ciba.

Componentes	% p/p
Composição aromática Ciclo 1910 [®]	12,0
Irgasan [®] DP 300 (INCI: Triclosan)	0,1-0,3
Álcool etílico desodorizado e neutro 80°GL	q.s.p. 100,0

Modo de preparo: quantidade preparada de aproximadamente 200,0 g de produto. Inicialmente. Num béquer de vidro de 650 mL, pesaram-se os

ingredientes da composição e, em seguida, o Irgasan[®] DP 300 que foi adicionado à preparação aromática e homogeneizou-se, por meio do agitador mecânico IKA. Esta pré-mistura foi adicionada ao álcool etílico desodorizado e neutro 80° GL e completou-se a massa da formulação até 200,0 g com o mesmo solvente. Foram acondicionados 15 mL (aproximadamente 3/4 da capacidade do frasco) da formulação em frasco de vidro inerte de capacidade de 20 mL e com tampa de rosca plástica.

4.1.3. Padrões

- **Decanoato de etila:** padrão para cromatografia, grau de pureza analítico

4.1.4. Equipamentos

- Detetor de Sebo, Courage-Khazaka, modelo SEBUMETER[®] SM 810.
- Detetor de hidratação cutânea, Courage-Khazaka, modelo CORNEOMETER[®] CM 825
- Detetor de perda de água transepidermal, Courage-Khazaka, modelo TEWAMETER[®] TM 210
- Termômetro clínico de mercúrio
- Microscópio eletrônico Leika[®], modelo Galen III
- Cromatógrafo HP[®], Modelo HP6890.
- Detetor Espectômetro de Massa HP[®], Modelo HP5973
- Bomba de vácuo *Low Flow* Gilian[®]. Modelo: LFS-113DC
- ATD 650[®] Turbo Matrix (*Automatic Thermal Desorber*) / Desorsor Térmico Automático / marca Perkin Elmer

4.1.5 Acessórios

- Seringa Removable Needle, Volume 100µL, largura 50mm, OD=0,5mm SGE
- Aparato de vidro para coleta de *headspace* dinâmico. Capacidade de 150mL
- Tubo de carvão ativo
- Tubo de metal com polímero adsorvente Tenax[®]

4.2 Sujeitos

O estudo avaliou, em seres humanos, o comportamento dos componentes voláteis da composição aromática em função do ciclo menstrual. Os riscos previsíveis incorridos pelos voluntários que fizeram parte do estudo foram mínimos, e houve coerência entre o objetivo do estudo e os possíveis riscos e problemas relacionados à modalidade planejada do protocolo.

Os riscos durante a aplicação do perfume, avaliação do pico ovulatório e análise das medidas interescapulares foram mínimos para os voluntários. Todos os procedimentos de aplicação de perfume, assim como a coleta de *headspace* não foram invasivos, não causando efeitos adversos para o voluntário.

O controle foi realizado por meio de 2 indivíduos do sexo masculino, com idade entre 18 a 40 anos, que avaliaram 5 voluntárias em função de ciclo menstrual a fim de verificar se existe alteração fisiológica na pele das mulheres que possam interferir na performance da composição aromática. No homem não existem as oscilações hormonais ou ciclo menstrual e menor influência hormonal (NAVARRETE-PALACIOS *et al.*, 2003). Desta forma, puderam ser observados os efeitos decorrentes da alteração hormonal na sensibilidade olfativa da mulher, sem ocorrer alterações na fisiologia da pele que pudessem interferir na substantividade do perfume.

Este estudo foi realizado baseando-se na Resolução Normativa 196/96, CNS/MS”, normas da International Conference Harmonization (ICH), Good Clinical Practice (GCP) e a Declaração de Helsinque, após a obtenção da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

A pesquisa manteve o anonimato do voluntário e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer tempo. Todos foram esclarecidos dos possíveis riscos mais freqüentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa / alérgica.

O protocolo de teste detalhado encontra-se no **Anexo 1**, que envolveu 29 voluntárias como grupo de estudo; com coleta de *headspace* de 40µl do perfume aplicado no antebraço direito das voluntárias nos tempos inicial T₀, 1,5h; 3,0h; 4,5h e 6h nas 4 fases do ciclo na sequencia: ovulatória, lútea, menstrual e folicular.

4.3 Normas IFRA para a composição aromática

A composição aromática que foi utilizada estava em conformidade com as normas da Associação Internacional de Composição aromáticas (IFRA – 39ª atualização/ abril 2005) sendo permitido o seu uso em 100% em perfume.

As normas IFRA referentes à restrição de uso foram baseadas na avaliação de segurança do Conselho de Especialistas do Instituto de Pesquisa de Materiais para Composição aromáticas (RIFM) e foram revistas pelo Comitê Científico da IFRA.

4.4 MÉTODOS

O Desenho do estudo, Tipo de Estudo, Aspectos Éticos, Tamanho Amostral, Seleção dos Sujeitos encontram-se no Protocolo de Teste (Anexo 1).

4.4.1 Análise de *Headspace* e por cromatografia a gás

Quando a composição aromática é aplicada na pele, o perfumista pode medir a potência da composição aromática em diferentes tipos de pele usando um painel sensorial de diferentes tipos de pele, comparando ou ranqueando a performance de um perfume para o outro a fim de avaliar se a composição aromática é hedônica e a sua potência (intensidade percebida).

Entretanto, o nariz é um excelente instrumento qualitativo para medir intensidade de perfume, mas não pode dar detalhes quantitativos do perfume requerido para entender por que a composição aromática é potente ou hedônica.

O desenvolvimento de aplicação e metodologias para a determinação da composição aromática e misturas similares é uma tarefa desafiante, isto é uma consequência das propriedades gerais inerentes dessas misturas (AUGUSTO & LEITE, 2003):

- a concentração de alguns analitos da composição aromática pode ser extremamente baixa
- muitos componentes são misturas muito complexas de polaridade e volatilidade diversa
- alguns compostos tem a estabilidade química limitada, sofrem reações de fotólise e oxidação e tornando difícil sua identificação e separação

Dentre as técnicas empregadas para caracterização química de composições aromáticas e para avaliar o seu perfil de evaporação depois de ser aplicada na pele são: *Headspace*, *Headspace Estático* e *Headspace Dinâmico* (PAWLISZYN, 1997; PATIÑO & HERNANDEZ, 2004). Parei aqui

O principal método usado é uma técnica de *headspace* dinâmica desenvolvida para identificar e quantificar componentes voláteis responsáveis por dar um aroma de flor, fruta e de outras substâncias odoríferas. Esta foi estendida para medir o desempenho de perfumes na pele humana. Essa técnica quantifica a partição individual de componentes da pele no ar, ou seja, a propriedade odorífera de cada um, o perfil de percepção olfativa. Com isso, permite-se mapear o desempenho da composição aromática na pele e identificar produtos de degradação durante os tempos de avaliação ou matérias-primas que mais se destaquem em performance (BAYDAR *et al.*, 1995; PAWLISZYN, 1997).

A metodologia é descrita da seguinte forma: o produto é aplicado numa área delimitada do antebraço previamente descontaminada aplicando-se sabonete líquido sem perfume na pele e espera-se aproximadamente uns 20 minutos de equilíbrio para que ela esteja inodora e não interfira na coleta de *headspace* do perfume. Sela-se o braço com o aparelho de vidro para coleta no tempo determinado. Em intervalos pré-determinados é coletado os componentes voláteis do perfume.. Esta técnica é acoplada num computador com controle de dessorção térmica e cromatografia a gás e os dados são analisados automaticamente. Desta forma, minimiza-se o erro associado aos sistemas manuais (BAYDAR *et al.*, 1995).

Concomitantemente à análise sensorial, os componentes voláteis das amostras de 40 µL de perfume com matérias-primas em concentrações conhecidas que foram aplicadas na pele do indivíduo avaliado pelo painel, foram coletados em intervalos de tempos pré-determinados, por meio de arraste por bomba de vácuo e adsorvidas por um tubo Tenax[®]. Após a coleta, o tubo foi acoplado num aparelho de dessorção térmica que fez a dessorção dos componentes para serem analisados no Cromatógrafo a Gás (CG) com detetor de massa para identificar e quantificar quais os compostos que estão sendo alterados ou produtos de reação, tendo como padrão a pele sem aplicação de produto (BAYDAR *et al.*, 1995).

O instrumento para determinação do *headspace* está exemplificado nas **Figura 1 a 3**.

Figura 1. Tubo de vidro, seringa, tubo Tenax[®] para fazer o *headspace* no braço (BAYDAR *et al.*, 1995).

Figura 2. Instrumento para fazer o *headspace* no braço (BAYDAR *et al.*, 1995).

Figura 3. Cromatografia gasosa acoplada ao dessorçor térmico de coleta de *headspace* (BAYDAR *et al.*, 1995; PAWLISZYN, 1997)

Detetor Espectômetro de Massa

Cromatógrafo

Dessorçor térmico

Tubo Tenax[®]

4.4.1.1 Condições Cromatográficas

Os tubos de Tenax[®] foram acoplados no ATD 650[®] Turbo Matrix / marca Perkin Elmer, desorvidos à temperatura de 100 °C por 10 minutos com fluxo de hélio de 60 mL/min no equipamento GC/MS (Gas Chromatography / Mass Spectrometer) Cromatografia a gás modelo 6890 marca Agilent[®] / Espectrometria de Massa modelo 5973 / marca Agilent[®], usando os seguintes parâmetros cromatográficos:

1) Temperatura do *Trap* (Injetor) -30 °C durante a concentração. Válvula mantida a 150 °C.

2) Durante a etapa de dessorção do *Trap*, a temperatura do *Trap* aumenta a 225 °C, com fluxo de hélio a 1,5 ml/min.

3) Injeção na coluna cromatográfica com proporção de 5:1 (amostra total injetada = 16,7%) , temperatura de interface a 280 °C.

5) Os voláteis foram transferidos a uma coluna capilar apolar HP Ultra[®] 2 , com 50m de comprimento x 0,20mm de diâmetro interno x 0,33µm de espessura de filme.

6) A temperatura inicial de corrida foi de 50 °C , com tempo inicial de 2 min para estabilização, a uma velocidade de ascensão de 3°C / minuto, atingindo a temperatura final de 280 °C.

7) O gás carreador foi Hélio a um fluxo de 1,5 ml/min.

8) Cada composto foi analisado pelo detector seletivo de massas, acoplado a coluna com uma interface a 280 °C e a fonte de íons à temperatura de 250 °C.

9) Potencial de ionização foi 70 eV e os íons monitorados de 35 a 350 UMA (Unidades de Massa Atômica).

4.4.1.2. Índice de Kovats

O Índice de Kovats descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono. Fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura do Cromatógrafo a Gás, sendo independente das condições experimentais (FRANCO & JANZANTTI, 2003).

Neste experimento foi empregado uma mistura de padrões de alcanos C₈-C₁₆ adicionada à solução dos voláteis, sendo injetado 2 mL no Cromatógrafo a Gás nas

mesmas condições das análises cromatográficas. Os índices dos diferentes compostos foram determinados e comparados aos descritos na literatura (FRANCO & JANZANTTI, 2003).

4.4.1.3. Análise multivariada dos dados cromatográficos

Para análise dos dados foi aplicado o método de Análise de Componentes Principais (ACP), técnica estatística potencial que pode ser utilizada para redução do número de variáveis, fornecendo uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. Como descrito por PRADO *et al.*(2002), a ACP fornece as ferramentas adequadas para identificar as variáveis mais importantes no espaço das componentes principais. Esta análise consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas componente principal, por meio da transformação de coordenadas, que é um processo trivial quando utiliza matrizes. Este processo pode ser feito de diversas maneiras, conforme interesse e de algumas especificidades do método.

Os componentes principais são as novas variáveis geradas por meio de transformação matemática especial realizada sobre as variáveis originais. Esta operação matemática está disponível em diversos softwares estatísticos especializados. Cada componente principal representa uma combinação linear de todas as variáveis originais. Por exemplo, um sistema com oito variáveis, após a transformação, apresentou oito componentes principais que, por sua vez, foram escritos como uma combinação linear das oito variáveis originais. Nestas combinações, cada variável teve uma importância ou peso diferente (SCOTTI, 2008).

Duas são as características das componentes principais que as tornam mais efetivas que as variáveis originais para a análise do conjunto das amostras (PRADO *et al.*, 2002) e que podem guardar entre si correlações que são suprimidas nas dos componentes principais. Ou seja, estes são ortogonais entre si e, deste modo, traz uma informação estatística diferente das outras.

A segunda característica importante é decorrente do processo matemático-estatístico de geração de cada componente que maximiza a informação estatística para cada uma das coordenadas que estão sendo criadas. As variáveis originais têm a mesma importância estatística, enquanto que as dos componentes principais têm

importância estatística decrescente. Ou seja, os primeiros componentes principais são tão mais importantes que pode-se até desprezar os demais. Destas características podemos compreender que a análise de componentes principais podem ser analisadas separadamente devido à ortogonalidade, servindo para interpretar o peso das variáveis originais na combinação das componentes principais mais importantes e podem servir para visualizar o conjunto da amostra apenas pelo gráfico dos dois primeiros componentes principais, que detêm maior parte da informação estatística (SCOTTI, 2008).

Considerando-se a seleção de variáveis e de compostos disponíveis em extensos bancos de dados, diversos algoritmos foram, também, utilizados e/ou desenvolvidos, como por exemplo, o algoritmo genético para a primeira (LEARDI *et al.*, 1992; LEARDI, 1994). Estes procedimentos devem, em princípio, gerar modelos que se apliquem não somente à série de treinamento, ou seja, devem gerar modelos robustos (SCOTTI, 2008)

Segundo SCOTTI (2008), modelos obtidos a partir de um grande número de dados, em geral apresentado como banco de dados, utilizam funções matemáticas, desenvolvidas e/ou aplicadas, inicialmente, em Quimiometria, como PCA (Principal Component Analysis) (WOLD *et al.* 1987), PLS (Partial Least Square) (BARONI *et al.*, 1993), K-NN (*k-nearest-neighbour*), SIMCA (LIVINGSTONE, 1995) .

Com relação ao número de informações utilizado para gerar o modelo, algumas das ferramentas desenvolvidas, como o PCA (WOLD *et al.*, 1987), diminuem a dimensionalidade dos dados, minimizando ao máximo a perda de informações estatisticamente significativas, gerando componentes ortogonais. A utilização do PCA na regressão linear múltipla resultou no procedimento denominado regressão de componentes principais, PCR (LIVINGSTONE, 1995), útil nos casos no qual o número de variáveis é maior do que o de amostras. Outra técnica bastante utilizada na área de QSAR é o PLS–Partial Least Square (mínimos quadrados parciais). PLS (Partial Least Square, sigla para o método dos mínimos quadrados parciais) torna-se uma boa alternativa por ser um método mais robusto que o MLR e o PCR (LIVINGSTONE, 1995).

Para SCOTTI (2008), aplicando-se análises de regressão linear múltipla (MLR) para séries que apresentam um número muito superior de variáveis em relação de amostras ($p \gg n$), aumentam-se as chances de se achar um falso modelo

com um bom ajuste, ou seja, se obtém não uma correlação verdadeira, mas sim apenas uma coincidência (“correlação ao acaso”) (TOPLISS & COSTELLO, 1972; TOPLISS & EDWARDS, 1979). Assim, esta chance aumenta, quanto maior o número de variáveis em relação ao número de amostras. Deve-se considerar que os resultados observados se referem a estudos realizados para números aleatórios (TOPLISS & COSTELLO, 1972; TOPLISS & EDWARDS, 1979), enquanto para números reais, poder-se-ia observar comportamento diferente.

Tanto no PCA (WOLD *et al.*, 1987) como no PLS (LIVINGSTONE, 1995) operação fundamental é repetir a extração de componentes, ou seja, uma combinação linear de todas as variáveis sob consideração, mantendo-se cada novo componente ortogonal a qualquer outro componente previamente extraído.

No PCA, no entanto, cada novo componente apenas engloba a quantidade de variância das variáveis independentes remanescentes, enquanto no PLS, os componentes são extraídos ao mesmo tempo, de ambas as séries de variáveis: dependente(s) e independentes. Este procedimento de extração de componentes é realizado visando expressar a quantidade de variância comum em ambas às séries de variáveis: dependente(s) e independentes. Assim, PLS tenta em uma única etapa correlacionar a(s) variável (is) dependente(s) com todas as variáveis independentes. Em contraste, a regressão multilinear em cada etapa identifica uma variável independente que melhor correlaciona com a variável dependente.

O *PLS*, como também o *PCR* (LIVINGSTONE, 1995), não são sensíveis à presença de colinearidade das variáveis independentes na série de dados. No entanto, para facilitar a interpretação e os cálculos no tratamento *PLS*, numa primeira aproximação recomenda-se retirar, na série original e na medida do possível, as variáveis mais correlacionadas.

Neste estudo, foi utilizada como modelo de análise a avaliação dos efeitos sazonais sobre a composição dos óleos voláteis, no qual foi desenvolvida uma metodologia por meio da Análise de Componentes Principais (ACP) utilizando os dados brutos obtidos da análise por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massa. Esta metodologia foi adaptada para o experimento em colaboração com o Prof. Dr. Marcus T. Scotti da Universidade Federal da Paraíba, anteriormente descrita por PAVÓN *et al.* (2006) para amostras de petróleo.

Os dados dos espectros de massas das matérias-primas da composição aromática, mais precisamente da abundância dos diferentes fragmentos (m/z) em função do tempo de retenção dos constituintes, foram exportados em arquivo texto no formato ASCII. As séries de dados foram submetidas ao software MATLAB 6.5 para obtenção dos gráficos de superfícies de contorno de intensidade de m/z em função do tempo para cada amostra ou matéria-prima que compõe a composição aromática, conforme indicado na **Figura 3**.

Figura 3. Gráfico de superfície de contorno do espectro de massas do óleo volátil de folhas secas de um dos espécimes de *Myrcia macrocarpa* DC. coletadas em novembro de 2006 (SCOTTI, 2008).

Posteriormente, após análise visual dos gráficos de superfície de contorno, as faixas de fragmentos de massa (m/z) selecionadas foram submetidas à análise de componentes principais (ACP) (WOLD *et al.*, 1987), conforme evidenciado na **Figura 4**. Para isto, foi utilizado o software *Uncrambler* versão 9.5 (ESBENSEN, 2002). Os dados foram previamente submetidos a normalização de área (**Equação 1**). Esta transformação normaliza o espectro X_i , calculando a área sob a curva $\sum x_{ij}$ e faz com que a área sobre a curva seja a mesma para todos os espectros.

$$newX_i = X_i / \sum_j x_{ij}$$

Equação 1

Figura 4. Análise de Componentes Principais do espectro de massas dos componentes voláteis da composição aromática CICLO® 1910 nas diferentes fases do ciclo menstrual (PEREIRA, 2009).

Legenda: men: menstrual; fol: folicular; lut: lútea; ovu: ovulatória.

4.4.2 Análise das medidas biomecânicas

PEREIRA (2009) avaliou a substantividade de uma composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual, relacionando a análise sensorial e as medidas biomecânicas (corneometria, sebumetria e TEWL) analisadas no antebraço da mulher, mas essas medidas não apresentaram significância no modelo. No entanto, por meio da análise sensorial, a intensidade de perfume percebida em função das fases do ciclo menstrual constatou que a mulher percebeu maior intensidade de perfume na fase lútea em relação às demais fases e verificou na mesma fase, avaliando o mesmo perfume, menor intensidade deste perfume na sua pele quando comparada com a do homem.

Segundo o estudo realizado por PEREIRA (2009), a oscilação hormonal e os efeitos decorrentes na percepção do odor demonstraram que a substantividade da composição aromática na pele foi resultante, praticamente, da avaliação olfativa, ou seja, da sensibilidade/percepção da julgadora, influenciada pela oscilação hormonal principalmente na fase lútea. Nesta, ocorreu maior percepção do perfume em relação às fases ovulatória ($p < 0,05$) e folicular e menstrual ($p < 0,01$). A avaliação da intensidade de perfume aplicado na pele masculina representou uma variável que

exerceu influência estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Provavelmente, os aspectos fisiológicos da pele masculina, que não foram considerados neste estudo, interferiram na percepção do odor, pois a mulher apresentou percepção menor na pele do homem na fase lútea ($p < 0,0002$).

As medidas biomecânicas coletadas no antebraço das mulheres não foram significativas para o modelo utilizado por PEREIRA (2009), porém algumas referências citam a influência dos hormônios nas propriedades biomecânicas da pele. O local de medição pode interferir na quantidade e na atividade de algumas glândulas, como citado por MACDONALD AND CLARKE (1970), que observaram que as medições realizadas nas costas dos voluntários apresentavam maior produção de sebo comparada com a face e com o antebraço.

No presente estudo, realizou-se a tentativa de correlacionar os dados coletados por PEREIRA (2009) com os dados cromatográficos em função do ciclo menstrual, de forma a avaliar se existe uma relação de medidas ou algum padrão de resposta das mulheres.

4.4.3 Condições experimentais

Na primeira avaliação, os voluntários, que preencheram os critérios de inclusão e aceitaram voluntariamente participar deste estudo, após serem esclarecidos e assinarem o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, **Anexo 4 e 5**, responderam ao questionário fornecido pelo Instituto de Pesquisa. Em seguida, foram submetidos à avaliação cuidadosa pelo co-investigador, na qualidade de médico, nas instalações do centro monitor e investigador, Instituto de Pesquisa Clínica. O co-investigador, em todos os tempos experimentais determinados, realizou o acompanhamento clínico do estudo, anotando qualquer reação não esperada do produto, em documento apropriado para esta finalidade.

4.4.3.1. Experimento

Foi formada uma equipe sensorial para a avaliação do perfume. Em, toda análise tomou-se o cuidado para que não houvesse saturação do perfume no ambiente. Cada voluntária avaliava separadamente uma da outra para que não houvesse influência na resposta e o perfume era aplicado em local diferente do

avaliado, sendo que os julgadores foram previamente orientados e treinados no procedimento.

O local de realização dos testes foi no Instituto de Pesquisa Clínica Medcin – Instituto da Pele, com as condições de temperatura de 22-25°C e Umidade Relativa de 45-55%.

O teste avaliou o desempenho do perfume das mulheres em diferentes fases do ciclo.

Os dados iniciais do voluntário referentes às medidas consideradas para os estudos, como peso, altura, avaliação do ciclo menstrual nos últimos 6 meses, foram tomados por técnicos e médicos especializados para avaliação clínica (medidas de temperatura basal e muco cérvico), sendo-lhes atribuída à responsabilidade de avaliar este parâmetro em cada fase do ciclo menstrual.

Antes da aplicação do perfume, todas as vezes que as julgadoras visitaram o Instituto, foram realizadas medidas instrumentais da pele das julgadoras (índices de sebumetria, corneometria e TEWL) e a coleta de *headspace* dos componentes voláteis do antebraço direito de cada voluntária seguindo os mesmos tempos da avaliação sensorial (inicial, 1,5; 3,0; 4,5 e 6h).

Próximo ao período ovulatório, que compreendeu os dias (12º a 16º do ciclo menstrual), foi realizada uma coleta do muco cérvico por uma profissional treinada, que utilizou espécule descartável e coletor com escova também descartável. O material coletado foi analisado por microscopia para identificação da fase ovulatória.

Esperou-se a evaporação do álcool (entre 2-5 minutos) da aplicação do perfume e avaliou-se o tempo inicial e a cada 90 minutos, fez-se a coleta de *headspace* no local onde foi aplicado o perfume e, em seguida, a voluntária fez a avaliação em escala LMS do perfume em sua pele e no pulso de um único voluntário homem e este mesmo voluntário e outro voluntário masculino acrescentado no teste, avaliaram a pele das mulheres em função do ciclo menstrual, considerados controles de pele e olfativo neste estudo e feita da coleta de componentes voláteis conforme descrito no item 4.4.1. Esta etapa se repetiu cinco vezes em cada visita e os voluntários permaneceram no instituto pelo período de 6 horas.

Sendo assim, cada voluntária visitou o Instituto quatro vezes durante um mês, considerando quatro fases do ciclo menstrual para avaliação. Os voluntários controles (homem) estavam disponíveis para participar do teste todas as vezes que

ocorreu a avaliação das voluntárias em função do ciclo menstrual. O detalhamento do desenho do teste está descrito no Protocolo de teste (Anexo 1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas avaliações de **29 voluntárias**, segundo o experimento descrito no **item 4.4.3.1** Coletou-se o *headspace* dos componentes voláteis da composição aromática do perfume CICLO 1910[®] aplicado no braço direito de cada uma das voluntárias, para cada uma das quatro fases do ciclo menstrual (folicular, ovulatória, lútea e menstrual) e avaliando-se nos cinco tempos experimentais (inicial; 1,5; 3; 4,5 e 6h) em cada uma. Além da coleta de *headspace*, as voluntárias avaliaram o produto aplicado em seu braço direito, e, também, o produto aplicado no braço direito de um homem. Foram coletadas medidas biomecânicas que poderiam interferir nos resultados: índice de TEWL; de corneometria e de sebumetria. Essas três variáveis biomecânicas foram coletadas em triplicata, logo após a aplicação do perfume (tempo inicial) e 6 horas após a aplicação do mesmo.

Primeiramente, foi apresentada a fórmula da composição aromática/perfume, de acordo com a injeção realizada no cromatógrafo na **Tabela 1.1**, com os valores em abundância m/z : considerada unidade adimensional formada pela divisão da massa de um íon (em unidade de massa atômica unificada) pelo seu número de carga (independente do sinal). O símbolo é escrito em itálico, letras minúsculas e sem espaços. O termo razão massa-carga está em desuso. A razão massa-carga tem sido utilizada no eixo horizontal de espectros de massa, embora a quantidade medida não seja exatamente a massa do íon dividida pela sua carga elétrica. Para a variável independente representada no eixo horizontal de um espectro de massas, a quantidade adimensional m/z é recomendada. z : um número inteiro representando a carga total de um íon, não considerando o sinal, dividida pela magnitude da carga do elétron, e . (VESSECCHI, 2011). A área % é a abundância relativa e os índices de Kovats para cada componente da fórmula, já descrito no item 4.4.6.2. No **item 5.2** são apresentados cromatogramas dos componentes voláteis da coleta de *headspace* de todas voluntárias nos tempos inicial, 3h e 6h que apresentaram padrão de resposta e outras não na fase lútea do ciclo menstrual. No **item 5.3** segue a análise estatística multivariada aplicada para correlacionar medidas biomecânicas e os parâmetros cromatográficos.

5.1 Fórmula CICLO 1910[®]

A **Tabela 1.1** apresenta o cromatograma do óleo injetado (Fórmula CICLO[®] 1910) que foi obtido para se ter uma referência dos componentes da fragrância absoluta sem interferentes da pele ou hormonais para comparação ao analisar os componentes voláteis do perfume aplicado na pele, coletado por *headspace*.

Tabela 1.1 Fórmula dos componentes voláteis da composição aromática CICLO[®] 1910 injetada no cromatógrafo (PEREIRA, 2009).

Rt	Material	Area 02	% Area	KI
11.93	ETHYL BUTYRATE	2,367,484	0.03	795
21.40	METHYL CAPROATE	2,253,475	0.03	923
21.49	ALPHA THUJENE	1,695,833	0.02	930
22.07	ALPHA PINENE	15,176,733	0.21	939
23.33	CAMPHENE	1,092,833	0.01	954
24.58	BENZALDEHYDE	2,066,106	0.03	960
25.25	SABINENE	5,591,869	0.08	975
25.52	BETA PINENE	44,415,645	0.61	979
26.08	PHENOL	1,197,458	0.02	979
26.49	MYRCENE	32,781,258	0.45	991
27.22	ETHYL CAPRATE	967,301	0.01	999
27.54	BETA PHELLANDRENE	2,825,113	0.04	1003
28.02	DELTA-3-CARENE	812,733	0.01	1005
28.24	HEXYL ACETATE	1,172,314	0.02	1009
28.48	ALPHA TERPINENE	2,780,765	0.04	1017
28.91	PARA CRESYL METHYL ETHER	721,902	0.01	1021
29.08	PARA CYMENE	20,445,346	0.28	1025
29.39	LIMONENE	587,850,350	8.05	1029
29.66	1.8 CINEOL	2,250,313	0.03	1031
29.92	CIS BETA OCIMENE	10,673,485	0.15	1037
30.65	TRANS BETA OCIMENE	18,353,334	0.25	1050
31.47	GAMMA TERPINENE	41,079,597	0.56	1060
32.34	ACETOPHENONE EXTRA	1,684,151	0.02	1065
33.50	TERPINOLENE	5,647,297	0.08	1089
33.63	ALPHA-P-DIME-STYRENE	2,722,081	0.04	1090
34.18	LINALOOL	251,248,818	3.44	1097
34.43	LINALOOL	6,308,641	0.09	1097
35.98	CIS ALLO OCIMENE	773,373	0.01	1132
38.48	BENZYL ACETATE	1,304,887	0.02	1162
39.26	TERPINEN-4-OL	1,857,704	0.03	1177
40.45	FOLIONE	2,967,070	0.04	1203
40.55	ALDEHYDE C-10	1,474,152	0.02	1202
42.74	NERAL	6,492,379	0.09	1238
43.21	LINALYL ACETATE	325,283,135	4.45	1257
44.28	GERANIAL	7,879,780	0.11	1267
45.08	LAVANDULYL ACETATE	3,077,066	0.04	1290

Legenda: Rt: tempo de retenção (min); Área 02: abundância de m/z; KI: Índice de Kovats

Tabela 1.1 Fórmula dos componentes voláteis da composição aromática CICLO[®] 1910 injetada no cromatógrafo (PEREIRA, 2009) (continuação).

Rt	Material	Area 02	% Area	KI
45.57	VERDOX	1,725,971	0.02	1298
45.86	ISOAMBRETTOLIDE	304,249	0.00	1309
47.98	HELIOTROPINE	103,443,657	1.42	1338
48.31	HELIOTROPINE	3,308,024	0.05	1338
48.75	NERYL ACETATE	12,673,896	0.17	1362
49.15	LINALYL ACETATE OU ISOBUTYRATE	7,738,156	0.11	1376
49.67	GERANYL ACETATE	25,328,377	0.35	1381
50.26	BETA PATCHOULENE	3,453,273	0.05	1381
50.45	ISOLONGIFOLENE ALPHA	4,235,420	0.06	1390
50.66	ISOLONGIFOLEN BETA	942,836	0.01	1390
51.12	ALPHA LONGIFOLENE	2,142,486	0.03	1408
51.52	DIMETHYL ANTHRANILATE	1,484,040	0.02	1406
51.79	ALPHA CEDRENE	64,692,819	0.89	1412
51.98	NOPYL ACETATE	40,265,921	0.55	1431
52.23	BETA CEDRENE	17,964,362	0.25	1421
52.68	THUJOPSENE	65,331,359	0.89	1431
53.08	TRANS BETA FARNESENE	1,025,851	0.01	1443
53.35	SEYCHELLENE	4,023,216	0.06	1447
53.64	ALPHA HUMULENE	1,429,146	0.02	1455
53.94	ALPHA PATCHOULEN	2,502,600	0.03	1457
54.10	GAMMA CURCUMENE	2,128,319	0.03	1483
54.58	GAMMA METHYL IONONE	103,010,990	1.41	1489
54.87	A-SELINEN	3,860,368	0.05	1498
55.15	BETA SELINENE	869,923	0.01	1497
55.54	DELTA METHYL IONONE	17,114,968	0.23	1509
55.86	ALPHA BUNESENE / DELTA GUAIENE	12,709,961	0.17	1510
55.98	MYRALDENE	14,629,137	0.20	1527
56.27	N-METHYL-ALPHA IONONE	62,746,340	0.86	1531
56.55	AMBER CORE	5,918,321	0.08	1537
56.62	AMBER CORE	2,776,643	0.04	1539
56.83	AMBER CORE	7,494,721	0.10	1542
56.92	AMBER CORE	1,648,730	0.02	1543
57.13	AMBER CORE	17,281,049	0.24	1544
58.35	AMBER CORE	4,168,739	0.06	1574
58.55	AMBER CORE	432,821	0.01	1582
58.71	AMBER CORE	4,503,563	0.06	1582
58.82	N-METHYL BETA IONONE	14,676,667	0.20	1585
59.52	DIETHYLPHTHALAT		0.00	1591
60.15	HEDIONE	634,986	0.01	1593
60.71	ISO E SUPER	8,592,048	0.12	1599

Legenda: Rt: tempo de retenção (min); Área 02: abundância de m/z; KI: Índice de Kovats

Tabela 1.1 Fórmula dos componentes voláteis da composição aromática CICLO[®] 1910 injetada no cromatógrafo (PEREIRA, 2009) (continuação).

Rt	Material	Area 02	% Area	KI
61.17	ISO E SUPER	2,045,857	0.03	1605
61.59	A-METHYL-B-JONON	TRACES	TRACES	1610
61.60	ISO E SUPER	18,182,711	0.25	1622
61.72	ISO E SUPER	24,336,883	0.33	1642
61.90	HEDIONE (Major Component)	1,587,707,781	21.73	1663
62.21	LYRAL (Minor Component) CYCLOHEXAL	54,803,027	0.75	1665
62.34	ISO E SUPER	67,672,888	0.93	1668
62.47	LYRAL (Major Component)	134,380,472	1.84	1672
62.72	ISO E SUPER (Major Component)	1,040,652,505	14.24	1679
62.96	ISO E SUPER	582,881,085	7.98	1684
63.45	HEDIONE	14,427,097	0.20	1688
63.69	HEDIONE	44,315,476	0.61	1703
63.79	ISO E SUPER	93,602,389	1.28	1702
63.94	ISO E SUPER	223,600,669	3.06	1708
64.40	ISO E SUPER	3,995,844	0.05	1709
64.52	HEDIONE	4,436,045	0.06	1710
64.70	ISO E SUPER	6,190,413	0.08	1714
65.11	BOISAMBRENE FORTE	94,776,893	1.30	1716
65.58	ISO E SUPER	2,683,985	0.04	1719
65.68	METHYL CEDRYL KETONE	5,161,226	0.07	1725
65.85	ISO E SUPER	971,656	0.01	1729
66.51	METHYL CEDRYL KETONE	11,583,618	0.16	1753
66.61	HABANOLIDE IMPURITY	3,751,050	0.05	1771
66.75	CEDRYL ACETATE	12,593,899	0.17	1785
66.95	METHYL CEDRYL KETONE	82,122,529	1.12	1789
67.39	METHYL CEDRYL KETONE	13,412,501	0.18	1798
67.52	METHYL CEDRYL KETONE	3,646,338	0.05	1800
67.74	ISOPROPYL MYRISTATE	18,487,997	0.25	1826
67.94	METHYL CEDRYL KETONE	3,247,730	0.04	1827
68.27	METHYL CEDRYL KETONE	1,200,735	0.02	1829
68.64	METHYL CEDRYL KETONE	1,675,814	0.02	1840

Legenda: Rt: tempo de retenção (min); Área 02: abundância de m/z; KI: Índice de Kovats

Tabela 1.1 Fórmula dos componentes voláteis da composição aromática CICLO[®] 1910 injetada no cromatógrafo (PEREIRA, 2009) (continuação).

Rt	Material	Area 02	% Area	KI
68.80	HABANOLIDE	76,550,654	1.05	1836
68.95	HABANOLIDE	55,842,973	0.76	1841
69.22	THIBETOLIDE	192,332,498	2.63	1849
69.73	METHYL CEDRYL KETONE	2,887,899	0.04	1847
69.95	METHYL CEDRYL KETONE	9,452,963	0.13	1850
72.32	VELVIONE	35,944,379	0.49	1929
72.71	AMBRETTOLIDE	66,678,774	0.91	1946
75.65	ETHYLENE BRASSYLATE	639,989,601	8.76	2033
78.83	AMBERKETAL	976,421	0.01	2025
86.33	HERCOLYN	1,127,847	0.02	2214

Total 7,306,836,856 100.00

Legenda: Rt: tempo de retenção (min); Área 02: abundância de m/z; KI: Índice de Kovats

5.2 Cromatogramas dos componentes voláteis das voluntárias em função do ciclo menstrual

Neste item são apresentados cromatogramas dos componentes voláteis da coleta de *headspace*, exemplificando as fases da composição aromática na corrida cromatográfica e cromatograma de algumas voluntárias nos tempos inicial, 3h e 6h que apresentaram padrão de resposta e outras não em função do ciclo menstrual, com os *scores* e *Loadings* gerados como descrito na **Figura 5**, segundo a metodologia citada no **item 4.4.6.3**. Também, foi gerado os *scores* e *loadings* para os fragmentos m/z dos componentes voláteis geral de todas as voluntárias em função do ciclo menstrual.

5.2.1 Componentes voláteis para a composição aromática

Figura 5. Cromatograma dos componentes voláteis da composição aromática CICLO[®] 1910 injetada no cromatógrafo (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde ao **tempo inicial**; Cromatograma **Azul** corresponde ao **tempo 3h** e Cromatograma **Vermelho** corresponde ao **tempo 6h**.

A corrida cromatográfica foi realizada em até 85 minutos, na **Figura 5**, encontrando-se picos até 75 minutos. Realizou-se a varredura de picos das matérias-primas no cromatograma de acordo com a sua volatilidade. No início, entre o tempo 0 e 10 minutos, encontrou-se componentes como o solvente etanol (pico mais pronunciado em 4,78 min) e o contaminante ambiental tolueno (pico evidenciado em 9,16 min). Esses picos apareceram em todas as fases do ciclo menstrual (Folicular, Ovulatória, Lútea e Menstrual) e em todos os tempos de coleta (Inicial; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0h), segundo BAYDAR *et al* (1995).

Aproximadamente entre os tempos de 15 até 25 a 30 minutos, encontraram-se os picos dos componentes de maior volatilidade, que são as notas de saída de composição aromática conforme citado por PEREIRA (2009), constituídas por notas aldeídicas, cítricas, principalmente o *Limonene* ou Limoneno, muito presente na composição ou como componente principal ou como derivado de misturas e também pelo fato de ele ser um componente característico em composições aromáticas Frescas Verdes, como a Ciclo[®] 1910, que segundo PATIÑO & HERNANDEZ (2004), pode ser considerado Hesperídico, designando a família verde ou cítrico, que se baseia nos óleos de limão, bergamota, laranja, lima ou mandarina. Considerando os compostos na Tabela 1.1, alguns exemplos seriam *Alpha Pinene*, *Limonene* e *Gamma Terpinene*. Como podem ser identificados pelo tempo de retenção e

índice de Kovats, esses componentes foram mais evidentes no tempo inicial de coleta.

Entre os tempos de 25 e 35 minutos, estão apresentados os picos de volatilidade média. Segundo PEREIRA (2009), trata-se de notas de corpo da composição aromática. Esses componentes são mais evidentes nas coletas dos tempos inicial; 1,5 e 3h. Eles podem ser identificados pelo tempo de retenção e índice de Kovats citados na **Tabela 1.1**. São compostos de aspecto floral basicamente, principalmente os odores de Gerânio, que são caracterizados por compostos como os ésteres *Geranyl Acetate* e *Linalyl Acetate*.

Finalmente entre os tempos de 35 a 75 minutos, encontram-se os picos dos componentes com volatilidade de média a baixa, notas de fundo da composição aromática, que foram mais evidentes nas coletas de 3; 4,5 e 6 h. Eles também podem ser identificados pelo tempo de retenção e índice de Kovats citados na Tabela 1.1, que são caracterizados por odores de madeira, couro, musk, mais seco, como exemplo temos *Methyl Cedryl Ketone* (Cedro); *Ethylene Brassylate* (Musk)

A técnica de *Headspace* aplicada é semi-quantitativa, portanto os picos encontrados nos cromatogramas decorrem do arraste gerado pela bomba de vácuo, que não necessariamente serão fiéis quantitativamente à composição aromática injetada no cromatograma, devido à interferentes, como odores corporais e erros experimentais durante a coleta. Essas alterações são mais evidentes para as notas de fundo da composição aromática que podem ser facilmente hidrolisadas pela presença de suor na pele e o arraste pode não ser tão eficiente devido às moléculas terem uma massa molar maior e volatilidade/pressão de vapor menor. A análise depende da interação composição aromática – substrato, conforme demonstrado por SCHUDEL & QUELLET (2004); BAYDAR *et al* (1995).

Estudo realizado por BAYDAR *et al*. (1996) encontrou que o pH da pele aparentemente se afeta pela substantividade ou pela difusividade da composição aromática sobre a pele e a quantidade de componentes voláteis coletados por *headspace* na pele seca é maior do que na pele oleosa. Os componentes aromáticos se distribuem mais por uma pele seca (áspera) do que na pele oleosa (suave), devido possivelmente aos sulcos na pele seca serem mais abertos e planos, o que favorece a evaporação dos componentes. Observou-se também que a

diferença de sexo e raça afeta consideravelmente a evaporação da composição aromática na pele (MOOKHERJEE, 1998; PATIÑO & HERNANDEZ, 2004)

5.2.2 Componentes voláteis em função do ciclo menstrual para as 29 voluntárias

Na **Figura 6**, estão apresentados os *loadings* e *scores* totais para todas voluntárias em função do ciclo menstrual.

Nas **Figuras 7 a 20** estão apresentados os cromatogramas de algumas voluntárias nos tempos de coleta inicial, 3 e 6 h com o objetivo de identificar a sobreposição dos cromatogramas padrões de resposta ou não e interferentes em função do ciclo menstrual. A análise foi realizada concomitantemente com os *loadings* e *scores* gerados segundo técnica demonstrada por PAVÓN *et al.*(2006) e SCOTTI (2008).

Na **Figura 6**, apresentam-se os *scores* totais de todos os fragmentos *m/z* gerados dos componentes voláteis da pele das 29 voluntárias de acordo com a metodologia aplicada por PAVÓN *et al.*(2006) e SCOTTI (2008).

Observou-se uma leve tendência da fase Lútea e Menstrual apresentarem um padrão de resposta, porém a explicação dos *scores* foi baixa (69% e 27%, respectivamente) e existiram muitos pontos de fases Lútea e Menstrual misturados ao restante observado. Porém, para esses que apresentam um leve padrão, observou-se nos *loadings* que os fragmentos 91 e 92 foram os que demonstraram o padrão de resposta para o perfil encontrado nos *scores* de Lútea e Menstrual. Avaliando-se a composição aromática, assim como solventes e contaminantes ambientais, encontram-se esses fragmentos nos seguintes componentes: **91** = *Limonene*; *Linalool*; **92** = *Limonene*; *Linalool*, *cis beta ocimene*; *trans beta ocimene*; *thujopsene*; *linalool* ; *linalyl acetate* ; *alpha cedrene*; *alpha pinene*. Esses componentes foram considerados componentes de saída e de corpo da composição aromática, segundo BAYDAR *et al.* (1995).

Figura 6. Scores totais e Loadings selecionados dos fragmentos m/z das voluntárias em função do ciclo menstrual (PEREIRA, 2009).

Legenda: M: **Cinza** corresponde a fase menstrual; F: **Azul** corresponde a fase Folicular; L: **Vermelho** corresponde a fase Lútea e O: **Verde** corresponde a fase ovulatória.

5.2.3 Componentes voláteis em função do ciclo menstrual (voluntárias 1,19 e 20)

Foram escolhidas as voluntárias 1, 19 e 20 como exemplos de perfis de resposta, pois foram os mais significativos e didáticos para apresentar as diferentes respostas encontradas com as 29 voluntárias, nos tempos inicial, 3 e 6 horas, a fim de evidenciar as principais diferenças nos perfis cromatográficos e nas leituras dos fragmentos em função do ciclo menstrual.

Figura 7. Cromatograma dos componentes voláteis da composição da pele da **voluntária n°1** no **tempo inicial** (PEREIRA, 2009).

.**Legenda:** Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória

Figura 8. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da **voluntária n°1** no **tempo 3h** (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória.

Figura 9. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da voluntária nº1 no tempo 6h (PEREIRA, 2009).

.*Legenda:* Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória

Figura 10. Loadings totais dos fragmentos m/z da voluntária nº1 em função do ciclo menstrual (PEREIRA, 2009).

Figura 11. Scores totais da **voluntária nº1** em função do ciclo menstrual (PEREIRA, 2009).

Legenda: Ovu: **Azul Claro** corresponde a fase Ovulatória; Fol: **Azul escuro** corresponde a fase Folicular; Lut: **Vermelho** corresponde a fase Lútea e Men: **Verde** corresponde a fase Menstrual.

Nas Figuras 7 a 9, apresentaram-se os perfis cromatográficos nos tempos inicial, 3 e 6h, respectivamente, em função do ciclo menstrual, demonstrando a redução dos picos dos componentes em função do tempo e a sobreposição das fases do ciclo em cada um dos cromatogramas, apresentando certo padrão de resposta em relação aos componentes voláteis da pele em função do ciclo menstrual para a voluntária nº1. Relacionando os picos encontrados com os *loadings* e *scores* das Figuras 10 e 11, demonstrou-se uma segmentação clara das fases do ciclo de acordo com os *loadings* dos fragmentos *m/z*, no qual a Folicular e Ovulatória apresentam similaridades na resposta, onde praticamente se encontram quase todos os fragmentos e uma segmentação da fase Lútea e Menstrual que apresentam alguns fragmentos distintos, como os de 91, 92; e os de 60 e 45; respectivamente. Avaliando-se a composição aromática assim como solventes e contaminantes ambientais, encontraram-se esses fragmentos nos seguintes componentes: **91** = *Limonene; Linalool*; **92** = *Limonene; Linalool, cis beta ocimene; trans beta ocimene; thujopsene; linalool ; linalyl acetate ; alpha cedrene; alpha pinene*; **60** = *linalyl acetate; ácido acético; ácido pentanóico* e **45** = *ethyl acetate ; linalyl acetate; linalool*;

n-butanol, considerados componentes de saída e corpo da composição aromática por meio da técnica empregada de BAYDAR et al (1995) e para análise dos fragmentos m/z por PAVÓN et al.(2006) e SCOTTI (2008).

As **Figuras 12, 13 e 14** apresentam o perfil cromatográfico nos tempos inicial, 3h e 6h, respectivamente, evidenciando o decaimento dos picos dos componentes voláteis e o aparecimento de interferentes. As **Figuras 15 e 16** apresentam os *loadings*, que são as leituras dos fragmentos m/z dos componentes voláteis nas 4 fases do ciclo para a voluntária nº19.

Figura 12. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da voluntária nº19 no tempo Inicial (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória.

Figura 13. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da voluntária nº19 no tempo 3h (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória

Figura 14. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da voluntária nº19 no tempo 6h (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória.

Figura 15. Loadings totais dos fragmentos m/z da voluntária nº19 em função do ciclo menstrual (PEREIRA, 2009).

Figura 16. Scores totais da voluntária nº19 em função do ciclo menstrual (PEREIRA, 2009).

Legenda: Ovul: **Azul Claro** corresponde a fase Ovulatória; Fol: **Azul escuro** corresponde a fase Folicular; Lut: **Vermelho** corresponde a fase Lútea e Men: **Verde** corresponde a fase Menstrual.

Nas Figuras 12 a 14, apresentam-se os perfis cromatográficos nos tempos inicial, 3h e 6 h, respectivamente, em função do ciclo menstrual, demonstrando a diminuição dos picos dos componentes em função do tempo e a não sobreposição das fases do ciclo em cada um dos cromatogramas. Não ocorreu um padrão de resposta em relação aos componentes voláteis da pele em função do ciclo menstrual para a voluntária nº 19.

Relacionando os picos encontrados com os *loadings* e *scores* das Figuras 15 e 16, não houve uma segmentação clara das fases do ciclo de acordo com os *loadings* dos fragmentos m/z, no qual ocorreu uma leve similaridade entre as Folicular e a Lútea e entre a Menstrual e a Ovulatória. Este fato pode ter ocorrido devido às variabilidades entre os indivíduos: nutrição, por exemplo, pessoas que se alimentam em excesso de produtos condimentados, apimentados, e tem a susceptibilidade para liberação de metabólitos na pele pelo suor que interferiram na resposta ou algumas patologias do suor, como a hiperidrose, que apresenta um suor excessivo em regiões como as mãos, braços e axilas que podem interferir no desempenho do perfume (LABOWS *et al.*, 1999). Erro experimental do técnico durante a coleta, problemas na injeção da coluna no cromatógrafo, queda de energia durante a análise podem ter colaborado também e afetado todo o perfil

cromatográfico e, conseqüentemente, na relação dos fragmentos m/z com as fases do ciclo menstrual.

Avaliando-se os fragmentos, verificou-se que existe uma segmentação indicativa da fase Folicular e Lútea que apresentam alguns fragmentos distintos, como o 91 e 57; e uma segmentação indicativa dos fragmentos 43 e 46 para as fases Menstrual e Ovulatória. Considerando a composição aromática assim como solventes e contaminantes ambientais, encontraram-se esses fragmentos nos seguintes componentes: **91** = *Limonene*; *Linalool*; **57** = *Isopar H*; **43** = *Linalyl acetate*; *Neryl acetate*; *Geranyl acetate*; *Linalool*; **46** = *Ethanol*; *ethyl acetate*, considerados componentes de saída e corpo da composição aromática por meio da técnica empregada por BAYDAR et al (1995) e para análise dos fragmentos m/z por PAVÓN et al.(2006) e SCOTTI (2008).

As **Figuras 17, 18 e 19** apresentam o perfil cromatográfico nos tempos inicial, 3h e 6h, respectivamente, evidenciando o decaimento dos picos dos componentes voláteis e o aparecimento de interferentes. As **Figuras 20 e 21** apresentam os *loadings*, que são as leituras dos fragmentos m/z dos componentes voláteis nas 4 fases do ciclo para a voluntária nº20.

Figura 17. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da voluntária nº20 no tempo inicial (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória

Figura 18. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da voluntária nº20 no tempo 3h (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória.

Figura 19. Cromatograma dos componentes voláteis componentes voláteis da composição da pele da voluntária nº20 no tempo 6h (PEREIRA, 2009).

Legenda: Cromatograma **Preto** corresponde a fase folicular; Cromatograma **Azul** corresponde a fase Lútea; Cromatograma **Vermelho** corresponde a fase menstrual e Cromatograma **Verde** corresponde a fase ovulatória

Figura 20. Loadings totais dos fragmentos m/z da **voluntária n°20** em função do ciclo menstrual (PEREIRA, 2009).

Figura 21. Scores totais da **voluntária n°19** em função do ciclo menstrual (PEREIRA, 2008).

Legenda: Ovu: **Azul Claro** corresponde a fase Ovulatória; Fol: **Azul escuro** corresponde a fase Folicular; Lut: **Vermelho** corresponde a fase Lútea e Men: **Verde** corresponde a fase Menstrual.

Nas Figuras 17 a 19, apresentaram-se os perfis cromatográficos nos tempos inicial, 3h e 6h, respectivamente em função do ciclo menstrual, demonstrando a queda dos picos dos componentes em função do tempo e a sobreposição das fases do ciclo em cada um dos cromatogramas, apresentando certo padrão de resposta em relação aos componentes voláteis da pele em função do ciclo menstrual para a voluntária n°20, com exceção ao perfil encontrado para a

fase Lútea, na qual verifica-se a presença de um padrão de resposta, onde se encontra principalmente componentes graxos (C2-C18) muito comuns no suor, como descrito por LABOWS *et al.*(1999).

Para LABOWS *et al.* (1999), a análise da composição do suor de mulheres em função do ciclo menstrual, pode relevar diferenças marcantes. Uma dessas análises do conteúdo de esteróides (metabolitos provenientes de hormônios) pode demonstrar que concentrações de androstenol variam no ciclo e foram evidenciados, principalmente, no meio da fase folicular. Vários componentes ácidos, que constituem os odores axilares puderam ser isolados e analisados por GC-MS nas fases folicular e ovulatória do ciclo menstrual. Níveis elevados de ácidos C7, C8 e C10 foram encontrados na fase folicular. Os níveis de ácido (E)-3-metil-2-hexenoico decresceram significativamente na fase folicular e aumentaram na fase ovulatória e a concentração de outros ácidos se mantiveram constante ou diminuíram na fase ovulatória.

A diferença entre os indivíduos e sua flora bacteriana interferiu diretamente no perfil cromatográfico, por isso que, dificilmente, encontrou-se um padrão de resposta geral em função do ciclo menstrual. Conforme LABOWS *et al.*(1999) a quantificação da flora axilar indicou que não existiu diferença no número de micro-organismos (*Staphylococcus epidermidis* e *S. saprophyticus*) nas fases do ciclo menstrual. Entretanto, diferenças foram encontradas nos diteróides lipofílicos, a espécie predominante da bactéria *Corynebacterium lipophilicus*, principalmente na fase ovulatória onde se encontra níveis altos de ácido (E)-3-metil-2-hexenoico que estão associados ao odor encontrado na secreção axilar.

Portanto, relacionando os picos encontrados com os *loadings* e *scores* das **Figuras 20 e 21**, demonstrou-se uma segmentação das fases do ciclo de acordo com os *loadings* dos fragmentos m/z, no qual as fases Folicular e a Menstrual apresentaram similaridades na resposta devido ao fragmento **46**, e uma segmentação da fase Lútea que apresentam o fragmento distinto **57**. Avaliando-se a composição aromática, assim como solventes e contaminantes ambientais, encontraram-se esses fragmentos nos seguintes componentes: **46** = *Ethanol; ethyl acetate* e o **57**= *Isopar H*. Também muitos compostos graxos, conforme mencionado anteriormente, foram encontrados na fase Lútea e não na Ovulatória ou Folicular, por estar próximo da menstruação, a atividade das glândulas sebáceas e

sudoríparas provavelmente aumenta, justificando a presença desses picos. Foram considerados componentes de saída e corpo da composição aromática e odores corporais como interferentes por meio da técnica empregada de BAYDAR *et al.*(1995) e na análise dos fragmentos m/z por PAVÓN *et al.*(2006) e SCOTTI (2008).

5.2.4 Tentativa de correlação dos dados cromatográficos com as medidas biomecânicas

Este item foi considerado em vista das diferenças encontradas e dos interferentes presentes como o suor, ou seja, como este pode interagir com o substrato onde a composição aromática foi aplicada (pele). Acredita-se que os índices biomecânicos possam ter apresentado alguma diferença em alguma das fases do ciclo, impactando positivo ou negativamente no perfil cromatográfico dos componentes voláteis.

Infelizmente, não foi encontrado nenhum padrão de resposta ou modelo preditivo significativo de forma a se obter uma correlação coerente de resposta das medidas biomecânicas com os dados cromatográficos.

6. CONCLUSÕES

- Não foi possível identificar os ingredientes mais susceptíveis as oscilações hormonais, tendo em vista que as explicações geradas pelas análises multivariadas variavam entre 69% e 27%, com poucas oscilações entre os componentes para identificação.

- Foi possível identificar um padrão de resposta espectrométrico para o perfume, com segmentações em cabeça, corpo e fundo e os principais componentes aromáticos presentes em cada fase, como Limonene, *Gama Terpinene* e seus derivados na saída, o *Linalyl acetate* no corpo e *Ethylene Brassylate* no fundo.

- Identificaram-se alguns componentes aromáticos com certo padrão de resposta que variou entre notas de cabeça e corpo ou pela abundância desses fragmentos na composição aromática para algumas voluntárias como os fragmentos **91** = *Limonene*; *Linalool*; **57** = *Isopar H*; **43** = *Linalyl acetate*; *Neryl acetate*; *Geranyl acetate*; *Linalool*; **46** = *Ethanol*; *ethyl acetate* encontrados principalmente em algumas voluntárias, variando nas fases Folicular, Menstrual e Lútea. Esses foram os compostos que apresentaram uma segmentação maior de fragmentos m/z,

obtidos pela análise estatística multivariada usando o programa *Unscrambler* v 9.5, que facilitou a identificação e as correlações com dados cromatográficos. Porém, não foi identificado um padrão de resposta geral em função do ciclo menstrual e, sim para algumas voluntárias.

- Encontraram-se vários interferentes na análise, consideradas variabilidades entre os indivíduos, como: características nutricionais (tipo de alimentos ingeridos), liberação de metabólitos; produtos biotransformados na pele (pelo suor) que podem alterar na resposta ou erro experimental do técnico durante a coleta da amostra, problemas na injeção na coluna no cromatógrafo; e a queda de energia durante a análise que afetam todo o perfil cromatográfico e, consequentemente, na relação dos fragmentos m/z com as fases do ciclo menstrual.

- O suor foi um dos interferentes na análise, principalmente na voluntária 20, predominando na fase lútea a observação de picos de ácidos graxos (ácidos C7, C8 e C10; ácido (E)-3-metil-2-hexenoico).

- Não foi encontrada correlação ou modelo preditivo significativo para as medidas biomecânicas e os dados cromatográficos, em vista dos interferentes evidenciados na análise como o suor.

- A análise realizada por indivíduo evidenciou um padrão distinto na liberação de compostos aromáticos específicos para cada sujeito e associada com a fase do ciclo menstrual. Embora com os resultados obtidos não foi possível gerar um modelo para a liberação de compostos aromáticos na pele e inferir dados para a população, é evidente que os hormônios sexuais têm um efeito único sobre a pele de cada indivíduo.

REFERÊNCIAS

- AUGUSTO, F.; LEITE, A. Sampling and Sample Preparation for Analysis of Aroma and Fragrances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n.3, p. 162-169, 2003.
- BARONI, M.; CONSTANTINO G.; CRUCIANI G.; RIGANELLI, D.L.V; CLEMENTI, S. Generating optimal linear pls estimations (golpe): an advanced chemometric tool for handling 3d-qsar problem. **Quantitative Structure-Activity Relationship**, v. 12, n. 9, p. 20,1993.
- BASTOS, D.H.M.; DA SILVA, M.A.A.P.; FRANCO, M.R.B. Optimization of the isolation procedure of honey volatile compounds for further gas chromatography analysis. **Alimentos e Nutrição**, v. 9, p. 77-88, 1998.
- BAYDAR, A.; MCGEE, T.; PURZYCKI, K. L., Skin Odor Value Technology for Fragrance Performance Optimization. **Perfumer Flavorist**, v.20, p.45-53, 1995.
- BAYDAR, A.; CHARLES, A.; DECAZES, J. M.; MCGEE, T.; PURZYCKI, K. Behaviour of Fragrances on Skin. **Cosmetic Toiletries**, v.111, n.2, p.49-54, 1996.
- BELITZ, G. **Food Chemistry**. Editora Springer, 1999. 89p.
- CHILCOTT, R. P.; BROWN, R.R.; RICE, P. Non-Invasive Quantification of Skin Injury Resulting from Exposure to Sulphur Mustard and Lewisite Vapours. **Burns**, v. 26, n. 3, p. 245-250, 2000.
- DRAKE, M. A. Invited review: sensory analysis of dairy foods. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 4925-4937, 2007.
- ESBENSEN K. Multivariate Data Analysis - In Practice. ISBN 82-993330-3-2, CAMO Process AS, Oslo, 5th Edition; [5] Geladi P, Kowalski BR (1986): Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 2002.
- FRANCO, M.R.B.; JANZANTTI, N.S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M. R.B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, p. 17-28, 2003.
- GROSS, J.H. Mass Spectrometry – A Textbook. Berlin: Springer, 2004.p.518.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- HARVELL, J. HUSSONA-SABED I; MAIBACH, H. I. Changes in transepidermal water loss and cutaneous blood flow during the menstrual cycle. **Contact Dermatitis**. v. 27, p. 294-301, 1992.
- HUMMEL, T.; GOLLISCH, R.; WILDT, G.; KOBAL, G., Changes in olfactory perception during the menstrual cycle. **Experientia**. v. 47, p. 712-715, 1991.
- KOLB, B., ETTRE, L. S. Theory and Practice of Multiple *Headspace* Extraction. **Chromatographia**, v.11/12, p.32, 1991.
- LABOWS, J.N.; REILLY, J. T.; LEYDEN, J. J.; PRETI, G. Axillary Odor Determination, Formation and Control. In:Laden, K., editors. **Antiperspirants and Deodorants**. New York: Marcel Dekker, 1999, p.69-70.
- LEARDI, R.; BOGGIA, R.; TERRILE, M. Genetic algorithms as a strategy for feature-selection. **Journal of Chemometrics**, v. 6, n. 267, p.81, 1992.
- LEARDI, R. Application of a genetic algorithm to feature-selection under full validation conditions and to outlier detection. **Journal of Chemometrics**. v. 8, p.65-79, 1994.
- LIVINGSTONE, D. **Data Analysis for Chemists**. New York: Oxford Science Publications; 1995.
- MACDONALD, I.; CLARKE G. Variations in the levels of cholesterol and triglyceride in the skin surface fat during the menstrual cycle. **British Journal of Dermatology**, v. 83, n. 4, p. 473-476, 1970.
- MEDCIN INSTITUTO DA PELE. Protocolo de estudo: estudo da substantividade de perfume na pele em função do ciclo menstrual. Osasco, 2007. v. 4, n. 54-07 [Documento interno].
- MOOOKHERJEE, B. Fragrance Emission from the Skin. A Study of Molecular diffusion. **Cosmetic Toiletries**, v. 113, n. 7, p. 53-60, 1998.
- NAVARRETE-PALACIOS, E.; HUDSON, R.; REYES-GUERRERO, M. S.; GUEVARA-GUZMA'N, R. Lower olfactory threshold during the ovulatory phase of the menstrual cycle. **Biological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 269-279, 2003.
- OLIVEIRA, L. F. Efeito dos Parâmetros do Processo dedesidratação de Jaca (*Artocarpus heterophyllus*, Lam.) sobre as propriedades químicas, físico-químicas e aceitação sensorial. 2009. 121 p. [Tese de Doutorado] – Instituto de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

- PAVÓN, J. L. P.; PENA A. G.; PINTO, C. G.; CORDERO B. M. Differentiation of types of crude oils in polluted soil samples by *headspace* -fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1137, p.101–109, 2006.
- PEREIRA, C. S. Estudo da substantividade de uma composição aromática na pele em função do ciclo menstrual. São Paulo. 2009, 150p. [Dissertação de Mestrado] – Faculdade de C. Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- PEREIRA, C. S.; BABY, A. R.; KANEKO, T. M; VELASCO, M. V. R. Sensory Approach to Measure Fragrance Intensity on the Skin. **Journal of Sensory Studies**, v.6, n.24, p.871–901, 2009.
- PEREIRA, C. S.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Review Article: Fragrance technology for the dermatologist – a review and practical application. **Journal of Cosmetic Dermatology**, n. 9, p.230–241, 2010.
- PRADO, P. I.; LEWINSHON, T. M.; CARMO, R. L.; HOGAN, D. J. “Ordenação Multivariada na Ecologia e seu Uso em Ciências Ambientais. **Ambiente e Sociedade**, Campinas, SP: v.10, p. 69-83, 2002.
- PATÍÑO, A.J.C.; HERNANDEZ, S.Y.M. Estudio de la Evaporación de um Perfume aplicado sobre la piel em función del tempo, empleando HS-SPME/GC-MSD. 2004. 182p. [Bacharel em Química] – Escuela de Química – Facultad de Ciências – Universidade Industrial de Santander – Bucaramanga, 2004.
- PAWLISZYN, J. Applications of Solid Phase Microextraction. Royal Society of Chemistry. Canadá, 1997, 37p.
- ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Analyse Chimique**. Méthodes et techniques Intrumentales moderns, 6 ed. Paris: Dunod, 2004, 462p.
- SARAIVA, S.A. Caracterização de Matérias-Primas e Produtos Derivados de Origem Graxa por Espectrometria de Massas. 2008. 61p. [Dissertação de Mestrado] – Instituto de Química - Universidade de Campinas, Campinas, 2008.
- SIMOES, D. R. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Aromas em maçãs, suco e sidra: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos** (Impresso), v. 27, p. 151-157, 2009.
- SCHUDEL, M.; QUELLET, Ch. Memorandum Perfume Substantivity. Dubendorf, 2004.32p.

- SCOTTI, M. T. Estudo de CADD com vistas a Proposição de Farmacóforo de um conjunto de Flavonóides como agentes Antichagásicos e Leishmanicidas Potenciais, 2008 [Documento Interno].
- SEKIGUCHI, N.; KOMEDA, T.; FUNAKUBO, H.; CHABICOVSKY, R.; NICOLICS, J.; STANGL, G. Microsensor for the measurement of water content in the human skin. Sensor and Actuators, **Biological Chemical**, v. 78, n. 1/3, p. 326-330, 2001.
- SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. A essência das composições aromáticas. **Cosmetics Toiletries**, v. 17, n. 6, p. 50-55, 2005.
- TOPLISS, J.G.; COSTELLO, R. J., Chance correlation in structure-activity studies using Multiple Regression Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p.1066-8, 1972.
- TOPLISS, J. G.; EDWARDS, R. P.; Chance factors in studies of quantitative structure-activity-relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, p.1238-1244, 1979.
- WARDENCKI, W.; MICHULEC, M.; CURYLO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 703-717, 2004.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. "Principal Component Analysis". **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

Capítulo 3

**Estudo da correlação instrumental e sensorial de uma composição
aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual**

Resumo

Nesta pesquisa, foi proposto um estudo complementar aos resultados obtidos por PEREIRA (2009), a fim de correlacionar análises instrumentais e cromatográficas com a avaliação sensorial em função do ciclo menstrual, com o objetivo de observar a alteração da intensidade de perfume percebida por meio das correlações e as diferenças de percepção entre homem e mulher. O estudo envolveu 29 voluntárias, com idade entre 18-40 anos, e 3 homens que foram usados como grupo controle. Cada voluntário teve 40 µl de perfume aplicado na pele nos tempos inicial, 1.5h, 3h, 4,5h e 6h, sendo os compostos aromáticos liberados adsorvidos em tubo Tenax[®] por meio da técnica de *headspace* e espectrometria com cromatografia a gás e detetor de massa (CGMS). Foram feitas as medidas biomecânicas no antebraço das 29 voluntárias e na região interescapular de 5 voluntárias por último, as mesmas faziam uma auto avaliação sensorial olfativa da intensidade de perfume por meio de escala sensorial de magnitude rotulada (LMS). Concluiu-se que houve diferenças entre a avaliação sensorial de cada mulher ($p < 0,001$), fator intrínseco do indivíduo que interferiu de modo a traçar um modelo padrão de resposta em praticamente todas as correlações possivelmente em decorrência de metabolismo e nutrição, porém observou-se que o índice de Corneometria na região Interescapular em t_0 (inicial) ($p = 0,002$), foi maior para a voluntária que teve mais elevada a intensidade de perfume percebida. Não foi observada nenhuma correlação ($p > 0,05$) entre a análise sensorial e Cromatografia, Corneometria, Sebumetria e TEWL coletados no antebraço. Ao considerar a Cromatografia como variável resposta em função do ciclo menstrual e da avaliação sensorial, a média dos dados cromatográficos na fase Folicular foi maior que nas fases Menstrual e Ovulatória ($p = 0,003$) e nas análises de correlação, houve uma forte correlação positiva entre a análise sensorial e a avaliação na pele do homem ($p < 0,001$). Concluindo-se que as duas variáveis separadamente (sensorial e cromatográfica são influenciadas pelo ciclo menstrual).

Palavras-chave: avaliação sensorial, análise de correlação, ciclo menstrual, composição aromática

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos dos estrogênios na pele envolvem várias alterações nas propriedades biomecânicas, que são consequência das suas oscilações durante o ciclo menstrual, sendo observado que existem oscilações na intensidade de percepção do perfume durante as fases do ciclo menstrual (SHAH *et al.*, 1984; HUMMEL *et al.*, 1991; HARVELL *et al.*, 1992; PEREIRA, 2009).

Duas metodologias que podem ser empregadas para avaliar esses fenômenos são a avaliação sensorial e instrumental que são ferramentas para quantificar e qualificar as mudanças ocorridas na característica olfativa e de intensidade de perfume durante o tempo de aplicação na pele. A avaliação sensorial envolve provadores humanos como instrumentos de medição, a fim de caracterizar um produto (cosméticos, alimentícios, farmacêuticos, entre outros) e verificar sua aceitação.

O objetivo da avaliação sensorial envolve a medição da resposta fisiológica a um estímulo, minimizando as influências introduzidas por fatores psicológicos. Os órgãos sensoriais influenciam na capacidade do cérebro em receber e processar a informação sensorial, que é definida como percepção, e influenciam pelos órgãos do sentido e mantém papel fundamental na avaliação sensorial do produto (IDALINA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2009). A ciência sensorial promove uma válida e confiável informação à pesquisa e ao desenvolvimento de produtos cosméticos, produção e marketing com a finalidade de conduzir às decisões dos negócios envolvidos nas propriedades sensoriais percebidas de um produto (MEILGAARD *et al.*, 1999).

Análise sensorial é a principal medida da qualidade dos produtos e do seu sucesso. Compreende uma variedade de ferramentas importantes e sensíveis para medir a resposta humana na avaliação de alimentos e outros produtos (DRAKE, 2007).

Métodos científicos específicos têm sido desenvolvidos para medir com precisão e reprodutibilidade adequada, de uma forma objetiva, a resposta humana ao estímulo. Gostar ou desgostar não são somente questões que são respondidas pela análise sensorial. A percepção do consumidor associada à sua resposta emocional tem sido investigada também, bem como o impacto do armazenamento e a variabilidade do processo e da embalagem, que podem ser determinadas.

Relações entre a análise instrumental e a percepção sensorial podem ser estabelecidas também. Muitos testes sensoriais podem ser elaborados, mas todo método deve ser selecionado antes dos dados serem coletados (DRAKE, 2007).

Outra importante função da avaliação sensorial é a contribuição nos estudos de estabilidade de produtos, no desenvolvimento dos processos produtivos, na investigação dos benefícios e dos atributos dos produtos a fim de prever o seu comportamento dentro do mercado consumidor. Desta forma, o painel ou a equipe de avaliação sensorial deve estar em condições controladas, usando ferramentas e técnicas adequadas para a produção de resultados consistentes e confiáveis (SANTOS *et al.*, 2005).

O objetivo de qualquer avaliação sensorial deve ser encontrar a melhor relação custo-benefício de um produto, empregando um método eficiente que obtenha a melhor informação sobre o comportamento sensorial de um produto com maior economia no custo final, cujos resultados possam oferecer correlação das análises sensorial, instrumental, físicas e químicas (MEILGAARD *et al.*, 1999).

Na área cosmética, as propriedades sensoriais dos produtos para aceitabilidade ou percepção dos benefícios aos consumidores não tem uma relação direta e é muito mais difícil de ser encontrada do que na área de alimentos ou domissanitários, por que a área de cosméticos tem o “glamour” e apelos de “beleza” e “juventude” incluídos no conceito do produto, existindo maior dificuldade dos consumidores em expressar em linguagem concreta os efeitos do produto. O papel da avaliação sensorial é auxiliar na descrição do objeto avaliado por meio de terminologias, com profundo entendimento das experiências sensoriais que um indivíduo pode ter (CIVILLE & DUS, 2005; CORTEZ-PEREIRA *et al.*, 2009).

2. Efeito da oscilação hormonal, composição aromática e percepção olfativa

Os efeitos descritos devido à oscilação hormonal e à preocupação na identificação das fases do ciclo menstrual, principalmente, a ovulatória, como já foi descrito e evidenciado por PEREIRA (2009), é importante no estudo criterioso sobre as mudanças de performance dos componentes da composição aromática, possibilitando a síntese e seleção de matérias-primas que tenham menor

interferência dos hormônios presentes na pele, a fim de não influenciar em sua performance. Por isso a preocupação em conhecer o comportamento das matérias-primas em função do ciclo menstrual é importante.

Para criar a pirâmide de sua composição aromática, os perfumistas usam uma variedade de óleos essenciais que podem ser naturais ou sintéticos. Os óleos naturais são extraídos de fontes vegetais, como flores, ervas, especiarias, musgos, raízes e folhas. Extratos de fontes animais, como glândulas de almíscar usadas historicamente, vem sendo substituídas em larga escala por compostos sintéticos devido às preocupações com produtos animais. Matérias-primas sintéticas estão, cada vez mais, substituindo os ingredientes naturais, em parte pela necessidade de trazer novas notas não encontradas na natureza, e em outra pela dificuldade em se manter a mesma qualidade do ingrediente natural devido às alterações climáticas constantes. Hoje encontrar ingredientes naturais na construção da composição aromática é “artigo de luxo e sofisticação” (PEREIRA *et al.*, 2010).

Por isso, a busca por conhecimento das matérias-primas e seu comportamento no local onde ela é aplicada é primordial, no caso a pele. Como foi demonstrado por PEREIRA *et al.*, (2010), a composição aromática CICLO 1910[®], que utiliza matérias-primas naturais e sintéticas, é considerada uma rota olfativa muito comum no mercado, havendo um grande interesse em observar e correlacionar as informações adquiridas através da percepção do consumidor (avaliação sensorial) e dos componentes da composição aromática ou fragrância (análise cromatográfica).

Conforme observado em PEREIRA (2009) demonstrou-se que é importante verificar a influência hormonal na percepção olfativa em função do ciclo menstrual, a partir das alterações fisiológicas (oleosidade, hidratação e perda de água transepidermal) na pele em paralelo com a avaliação da intensidade de perfume.

Outro fator que deve ser considerado que justifica a importância neste estudo da avaliação da percepção masculina na pele da mulher em função do ciclo menstrual, é que na fase ovulatória ocorre o pico de concentração de estrógeno e na fase lútea o de progesterona, verifica-se que os hormônios sexuais exerceram influência, principalmente, na percepção do odor (PEREIRA, 2009). Este fato pode ser justificado, pois os hormônios sexuais, principalmente o estrógeno, têm receptores no epitélio olfativo, bulbo olfativo e em outras partes relacionadas com o

mecanismo do olfato, conforme estudado em várias espécies de mamíferos (NAVARRETE-PALACIOS *et al.*, 2003b).

Foi reportado que alterações morfológicas no epitélio nasal durante o ciclo menstrual são semelhantes às alterações que ocorre no epitélio vaginal no mesmo período (NAVARRETE-PALACIOS *et al.*, 2003a).

Neste estudo, foi realizada uma investigação da análise sensorial masculina para avaliar a percepção da intensidade de perfume deste na pele da mulher em função do ciclo menstrual.

A correlação da percepção masculina com a feminina é importante para identificar se alterações que ocorrem na pele da mulher em função do ciclo menstrual podem ser identificadas por alteração olfativa na mulher e são predominantes sobre as alterações fisiológicas ocasionadas pelos hormônios sexuais na pele ou não.

PEREIRA (2009) realizou o estudo com objetivo de avaliar a substantividade de uma composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual, relacionando a análise sensorial e as medidas biomecânicas (corneometria, sebumetria e TEWL) analisadas no antebraço da mulher, mas essas medidas não apresentaram significância no modelo aplicado. No entanto, por meio da análise sensorial, a intensidade de perfume percebida em função das fases do ciclo menstrual constatou que a mulher percebeu maior intensidade de perfume na fase lútea em relação às outras fases. PEREIRA (2009) identificou que na mesma fase, avaliando o mesmo perfume, menor intensidade de perfume na sua pele comparada com a do homem.

Segundo a pesquisa citada, a oscilação hormonal e os efeitos decorrentes na percepção do odor demonstraram que a substantividade da composição aromática na pele foi resultante praticamente da avaliação olfativa, ou seja, da sensibilidade/percepção da julgadora, influenciada pela oscilação hormonal, principalmente na fase lútea. A fase lútea apresentou maior percepção do perfume do que a fases ovulatória ($p < 0,05$) e folicular e menstrual ($p < 0,01$). A avaliação da intensidade de perfume aplicado na pele masculina representou uma variável que exerceu influência estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Provavelmente, os aspectos fisiológicos da pele masculina, que não foram considerados neste estudo,

interferiram na percepção do odor, pois a mulher apresentou menor percepção na pele do homem na fase lútea ($p < 0,0002$).

O estudo realizado por PEREIRA (2009), apesar de exploratório, demonstrou o aumento da percepção de odor da mulher na fase lútea,. Além disso, observou-se na mesma fase menor percepção de odor na pele do homem. Os resultados obtidos devem ser considerados no desenvolvimento de fragrâncias e nos instiga a explorar matérias-primas aromáticas que influenciem no comportamento da mulher em função do ciclo menstrual a fim de verificar o perfil olfativo dessas e identificar quais das matérias-primas que são mais susceptíveis as oscilações que elevem a estabilidade do perfume.

3. Correlação instrumental e sensorial para avaliação da composição aromática

A correlação da análise sensorial com a instrumental tem sido amplamente utilizada desde a década de 90, pois permite classificar o produto de acordo com algum critério e permite prever a qualidade sensorial a partir de medidas. Para a melhoria dos sistemas de processamento, o entendimento das reações físicas e químicas que ocorrem durante a transformação da fruta *in natura* em produtos derivados e sua relação com as características sensoriais é de extrema importância. Isso possibilita a avaliação indireta das características sensoriais por meio de análises instrumentais (ALMEIDA *et al.*, 1999). Além disso, a avaliação das correlações entre essas características auxilia o entendimento dos fatores que alteram o perfil sensorial do alimento ou de uma composição aromática, contribuindo para a otimização dos processos de produção (ALMEIDA *et al.*, 1999; PEDRÃO *et al.*, 1999).

Além do emprego de técnicas como Cromatografia em fase gasosa e espectrometria de Massa, as avaliações sensoriais devem ser correlacionadas com as analisadas instrumentais, a fim de produzir resultados com aplicações práticas (BASTOS, DA SILVA e FRANCO, 1998). Após a separação dos compostos voláteis, a avaliação sensorial realizada por técnicas olfatométricas pode indicar os compostos voláteis odoríferos. Nem todos os picos dos cromatogramas representam compostos voláteis odoríferos, assim como o tamanho dos picos não é indicativo da contribuição efetiva do composto para a descrição do aroma (SIMÕES, 2009).

A associação de cromatógrafos em fase gasosa a espectrômetros de massa (CG-EM) permitiu o avanço na identificação dos compostos voláteis. Padrões puros e o índice de retenção de Kovats têm auxiliado na identificação dos compostos (FRANCO e JANZANTTI, 2003). Além do emprego de técnicas como cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas, as avaliações sensoriais devem ser correlacionadas com avaliações instrumentais a fim de produzir resultados com aplicações práticas. Após a separação dos compostos voláteis, a avaliação sensorial realizada por técnicas olfatométricas pode indicar os compostos voláteis odoríferos. Nem todos os picos dos cromatogramas representam compostos voláteis odoríferos, assim como o tamanho dos picos não é indicativo da contribuição efetiva do composto para a descrição do aroma (BASTOS, DA SILVA e FRANCO, 1998).

Segundo MEILGAARD, CIVILLE e CARR (1988) a validação e confiança das medidas de intensidade que expressam o grau em que cada característica (termo ou componente qualitativo) está presente dependem da seleção de escala (deve ser ampla para englobar todo o alcance de intensidade do parâmetro e ter pontos intermediários suficientes para discriminar todas as pequenas diferenças de intensidade entre as amostras) e do treinamento dos julgadores para que usem a escala de maneira similar para todas as amostras e durante todo o decorrer das análises.

O uso de equipes treinadas adequadamente para descrever suas reações aos produtos permite obter informações sobre seus atributos, independentemente de qualquer influência de preferência (STONE & SIDEL, 1992).

Para OLIVEIRA e BENASSI (2003), a análise sensorial associada à instrumental tem se mostrado muito eficiente na avaliação da qualidade de alimentos pela habilidade e identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, detectando particularidades do produto não medidas por outras técnicas. A análise sensorial descritiva é um dos métodos mais sofisticados para avaliação de produtos, utilizando equipe de julgadores que desenvolve descritores e emprega escalas para medir suas intensidades, caracterizando e descrevendo atributos sensoriais das amostras estudadas. O uso da análise sensorial descritiva vem crescendo devido à sua aplicabilidade para controle de qualidade, desenvolvimento de produtos e processos e estudos de vida-de-prateleira (MURRAY, DELAHUNTY e BAXTER, 2001).

De acordo com QUEIROZ & TREPTOW (2006) a análise sensorial é insubstituível no desenvolvimento de especificações para definir propriedades efetivamente subjetivas e que são fundamentais para a aceitação e preferência do consumidor. Assim, torna-se indispensável na indústria de alimentos ou de cosméticos para o desenvolvimento de novos produtos, modificação de produtos já existentes, otimização de processos, redução de custos e pesquisa de mercado (BASTOS, DA SILVA e FRANCO, 1998).

Baseando-se nas literaturas citadas, demonstra-se a riqueza de informação que se pode obter realizando a correlação sensorial e instrumental, em vista à grande quantidade de dados obtidos por PEREIRA (2009), no qual foi realizada a coleta de dados instrumentais (medidas biomecânicas e cromatográficas) e de avaliação sensorial obtidas em função de 4 tempos experimentais em cada fase do ciclo menstrual (menstrual, folicular, ovulatória e lútea).

Portanto, nesta pesquisa foi estudada a análise sensorial masculina para se avaliar a percepção da intensidade de perfume deste na pele da mulher em função do ciclo menstrual com o intuito de correlacionar a percepção masculina com a feminina para identificar se alterações que ocorrem na pele da mulher em função do ciclo menstrual poderia afetar o desempenho da composição aromática na pele ou se a alteração olfativa na mulher é predominante sobre às alterações fisiológicas ocasionadas pelos hormônios sexuais na pele.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Correlacionar os dados das análises sensorial e instrumental (medidas biomecânicas e cromatográficas) a fim de se obter um modelo preditivo capaz de corroborar no desenvolvimento de produtos

4.2 Objetivos Específicos

- Analisar e comparar as avaliações sensoriais masculinas e femininas na pele da mulher em função do ciclo menstrual
- Identificar se as modificações que ocorrem na pele da mulher devido aos hormônios sexuais poderiam afetar o desempenho da composição aromática aplicada
- Avaliar se a alteração olfativa na mulher é predominante àquela de origem fisiológica ocasionada pelos hormônios sexuais na pele
- Verificar, de forma preliminar, se a avaliação olfativa na pele do homem poderia contribuir no entendimento dos efeitos dos hormônios sexuais na pele da mulher em relação a uma composição aromática na pele.

5. MATERIAL, SUJEITOS E MÉTODOS

PEREIRA (2009) realizou um estudo com objetivo de avaliar a substantividade de uma composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual, relacionando a análise sensorial e as medidas biomecânicas (Índice de Corneometria, de Sebumetria e TEWL).

Neste presente estudo, teve-se o objetivo de complementar a análise realizada anteriormente com mais 10 voluntárias, totalizando 29 voluntárias por meio do estudo de correlação instrumental e sensorial da composição aromática aplicada na pele em função do ciclo menstrual. que seguiram um protocolo sensorial de teste, no qual foram treinadas na avaliação na escala sensorial LMS (escala de magnitude de rótulos) (GUERRA, 2002), por meio de uma referência (matéria-prima: Hexenal-trans-2) que permitiu que as voluntárias se familiarizassem com a escala e com avaliação de intensidade de perfume em função do tempo. Para que desta forma desse maior representatividade e confiabilidade nos dados gerados para avaliação da correlação instrumental e sensorial.

5.1 Materiais e equipamentos

5.1.1 Solvente

- Álcool etílico desodorizado e neutro 80°GL, grau de pureza analítico, produto comercializado pela Usina Ester.

5.1.2 Matérias-primas

- Composição aromática: componente aromático, produto comercializado pela Givaudan: Ciclo[®] 1910 (Floral Verde Amadeirado).

Floral Verde Amadeirado é composta principalmente por notas olfativas de fundo, menos difusivas que apresentam maior substantividade de perfume na pele. As frações florais e verdes estão em menor quantidade, mas que representam o frescor e a identidade da composição aromática. As notas verdes correspondem ao topo, são as mais voláteis e a floral, o corpo da composição aromática.

- Irgasan[®] DP 300 (Triclosan): conservante da formulação, grau de pureza farmacêutico, produto comercializado pela Ciba[®]

Componentes	% p/p
Composição aromática Ciclo 1910 [®]	12,0
Irgasan [®] DP 300 (INCI: Triclosan)	0,1-0,3
Álcool etílico desodorizado e neutro 80°GL	q.s.p. 100,0

Modo de preparo: foram preparados aproximadamente 200,0 g de produto. Inicialmente, num béquer de vidro de 650 mL, pesou-se a composição e, em seguida, o Irgasan[®] DP 300 que foi adicionado à preparação aromática e

homogeneizou-se, por meio do agitador mecânico IKA. Esta pré-mistura foi adicionada ao álcool etílico desodorizado e neutro 80° GL e completou-se a massa da formulação até 200,0 g com o mesmo solvente. Foram acondicionados 15 mL (aproximadamente 3/4 da capacidade do frasco) da formulação em frasco de vidro inerte de capacidade de 20 mL e com tampa de rosca plástica.

5.1.3. Padrões

- **Decanoato de etila:** padrão para cromatografia, grau de pureza analítico

5.1.4. Equipamentos

- Detetor de Sebo, Courage-Khazaka, modelo SEBUMETER® SM 810;
- Detetor de hidratação cutânea, Courage-Khazaka, modelo CORNEOMETER® CM 825;
- Detetor de perda de água transepidermal, Courage-Khazaka, modelo TEWAMETER® TM 210;
- Termômetro clínico de mercúrio;
- Microscópio eletrônico Leika, modelo Galen III;
- Cromatógrafo HP, modelo HP6890;
- Detetor Espectômetro de Massa HP, modelo HP5973;
- Aparelho de dessorção térmica automático Perkin Elmer, modelo: ATD 400.
- Bomba de vácuo Low Flow Gilian, modelo: LFS-113DC

5.1.5 Acessórios

- Seringa Removable Needle, Volume 100UL, largura 50MM, OD=0,5mm SGE

- Aparato de vidro para coleta de *headspace* dinâmico. Capacidade de 150 mL
- Tubo de carvão ativo
- Tubo de metal com polímero adsorvente Tenax

5.2 Métodos

5.2.1 Desenho do estudo

O estudo avaliou a intensidade de perfume em função do ciclo menstrual com **29 voluntárias, grupo de estudo**, com ciclo menstrual normal, não usuárias de medicamentos contraceptivos ou de reposição hormonal, no mínimo 6 meses e de 3 indivíduos do sexo masculino, grupo controle, que foram controle de pele e olfativo, ambos os grupos com idade entre 18 a 40 anos,. Os riscos previsíveis intercorridos pelos voluntários que fizeram parte do estudo foram mínimos, porém ocorreu uma alta taxa de desistência devido a dificuldade de encontrar a voluntária próximo ao pico ovulatório, que dura cerca de 2 a 3 dias apenas, era identificado por meio de um *swab* da vagina, para avaliação do muco cérvico, em que se observava a formação de cristais em formato de “samambaia”, característico do pico ovulatório, como já foi descrito em PEREIRA (2009). Ao ser identificado, cada voluntária fazia 4 visitas ao instituto, totalizando 1 mês de teste para cada voluntária, portanto foi conduzida apenas uma replicata, mas existia um acompanhamento do ciclo das voluntárias por aproximadamente 3 meses antes do teste. Realizava-se a avaliação sensorial e coleta de *headspace* de todas as fases do ciclo, na seguinte sequência: ovulatória, lútea, menstrual e folicular, pois existia um grande risco de não conseguir a avaliação do pico ovulatório. Nos **Anexos 1 e 2**, encontram-se o protocolo de teste e o acompanhamento e intercorrências, respectivamente ao longo dos 2 anos de estudo, em que participaram 41 voluntárias, mas que concluíram o estudo apenas 29.

Os riscos durante a aplicação do perfume e da coleta de *headspace* do perfume na pele foram mínimos para os voluntários. Todos os procedimentos de aplicação de perfume, assim como as medidas biomecânicas como a avaliação sensorial não foram invasivos, não causando efeitos adversos para o voluntário.

5.2.2 Tipo de estudo

Este estudo foi elaborado de acordo com as “Condições gerais para a realização de um teste em humano”, documento que o Instituto de Pesquisa Clínica forneceu.

Estudo monocêntrico, em que foi avaliado a influência do ciclo menstrual da mulher na intensidade do perfume na pele. Foram realizadas avaliações instrumentais da hidratação, quantidade de sebu e perda de água transepidermal da área de aplicação do produto durante as 4 fases do ciclo menstrual. Foram realizadas também coletas dos componentes voláteis do perfume para análise cromatográfica. Em cada visita as 29 voluntárias responderam questionário de auto-avaliação olfativa tendo como comparativo um voluntário do sexo masculino como controle de pele e dois voluntários como controle olfativo, que avaliavam sensorialmente a pele das últimas 5 mulheres do grupo de voluntárias em função do ciclo menstrual.

O controle de pele e olfativo foi realizado no total por 3 voluntários do sexo masculino, adulto de 18 a 40 anos, que foram selecionados segundo os critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão pertinentes, considerados controles de pele e olfativo neste estudo.

No homem não existem as oscilações hormonais ou ciclo menstrual, além de haver menor influência hormonal (NAVARRETE-PALACIOS *et al.*, 2003b). Desta forma, puderam ser observados os efeitos decorrentes da oscilação hormonal, na sensibilidade olfativa da mulher, sem ter alterações na fisiologia da pele, que pudessem interferir na intensidade do perfume. Com o homem realizando a avaliação olfativa, verificou-se “indicativos” de diferenças de sensibilidade olfativa entre os sexos e alterações fisiológicas ocasionadas pelos hormônios sexuais que poderiam afetar a intensidade de perfume em função do ciclo menstrual na pele da mulher, pois as medidas biomecânicas realizadas por PEREIRA (2009), não foram significativas.

5.2.3 Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada de acordo com a legislação brasileira, baseada na Resolução Normativa 196/96, “CNS/MS”, normas da International Conference Harmonization (ICH), Good Clinical Practice (GCP) e a Declaração de Helsinque,

após a obtenção da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), protocolo nº 400.

Para cada voluntária que participou desta pesquisa no grupo de estudo e para o voluntário controle, foram dadas as informações e esclarecimentos necessários, fornecendo o seu consentimento, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme o **Anexo 4** e **Anexo 5**, respectivamente.

A pesquisa manteve o anonimato do voluntário, e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer tempo. Todos foram esclarecidos dos possíveis riscos mais frequentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa / alérgica.

Outros documentos necessários para o prosseguimento da pesquisa estão descritos como:

Anexo 1: Protocolo de teste

Anexo 2: Ficha de acompanhamento e intercorrências

Anexo 3: Carta de aprovação do CEP do Instituto Medcin

Anexo 4: Carta de aprovação do CEP da Fac. de C. Farmacêuticas - USP

Anexo 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do grupo de estudo

Anexo 6: TCLE do grupo controle

5.2.4 Tamanho amostral

O valor amostral envolveu 29 voluntárias, obtido por meio das variâncias ocorridas em estudos preliminares com a escala (LMS) escolhida para o teste e o mínimo de diferença entre dois pontos da escala, para que ocorresse diferença significativa no nível de 95% de intervalo de confiança. A escala LMS foi citada e recomendada para avaliação de perfumes por PEREIRA, *et al.* (2009). Entretanto, considerando a perda de voluntários ou intercorrências durante o estudo, para obter uma margem de segurança para as análises, foram recrutados do sexo feminino, inicialmente, aproximadamente, 40 voluntários e selecionados 30 a 35 voluntários para o estudo, aqueles com melhor desempenho para uso da escala.

Como se tratou de um estudo exploratório, não foi representativo da população. Caso fosse utilizada outra escala e se quisesse detectar outras diferenças, o valor amostral poderia ser alterado.

5.2.5 Seleção dos sujeitos

Foram selecionadas, por meio de banco de voluntárias do Instituto de Pesquisa, 30-35 mulheres de 18 a 40 anos, não usuárias de anticoncepcionais orais, com período de ciclo menstrual variando entre 28 e 30 dias e que não estavam usando nenhum medicamento contraceptivo ou de reposição hormonal estrogênica até seis meses antes do teste. O painel correspondeu aos critérios de inclusão estabelecidos para a realização do estudo.

5.2.5.1 Critérios específicos de inclusão

Os critérios específicos de inclusão, definidos no protocolo, foram os seguintes:

- Idade: de 18 a 40 anos;
- sexo feminino; masculino
- usuários ocasionais ou regulares de produtos cosméticos;
- mulheres com período de ciclo menstrual de 28 a 30 dias

5.2.5.2 Critérios específicos de não-inclusão

Os critérios específicos de não-inclusão, definidos no protocolo, foram os seguintes:

- Uso de medicamentos contraceptivos orais ou de reposição hormonal menos de 6 meses e durante os testes
- marcas cutâneas na área experimental que pudessem interferir nas avaliações das reações cutâneas (problemas de pigmentação, cicatrizes, pilosidade super desenvolvida, efélides, tatuagem e nevus em grande quantidade e queimadura solar dentre outras);
- alergia ou reatividade à categoria de produtos testada;
- tratamento hormonal (anticoncepcionais orais ou reposição hormonal com progesterona, estrógeno ou derivados);

- previsão de alteração dos métodos contraceptivos orais durante o período do estudo;
- dismenorréia (Forte cólica menstrual relatada pelo voluntário ou suspeita médica, sem comprovação laboratorial.)
- amenorréia;
- obesidade, com IMC considerado >30 que tenham comprovado clinicamente irregularidade no ciclo menstrual
- anorexia, com IMC considerado < 18 que tenham comprovado clinicamente irregularidade no ciclo menstrual
- mulheres em período de gestação ou amamentando;

*

5.2.5.3 Critérios de exclusão

- Não atendimento às exigências do estudo;
- gravidez detectada durante o estudo;
- fatores ocorridos independentemente, mas com potencialidade de impedir a continuidade do voluntário no estudo, como exemplo, fraturas ósseas;
- Outros, a critério médico.

5.2.5.4 Exigências requeridas pelo estudo

As exigências impostas aos voluntários durante o período de estudo foram as seguintes:

- não se expor à radiação intensa (solar ou câmara de bronzeamento);
- não alterar hábitos de higiene;
- não utilizar medicamentos como tranquilizantes, antidepressivos, diuréticos, laxantes ou psicotrópicos;
- não realizar esfoliação de pele com esfoliantes químicos ou mecânicos, na área experimental;
- não alterar hábitos de consumo de café, álcool e tabaco;
- comparecer ao Instituto sempre nos mesmos horários, em todas as visitas;
- comunicar qualquer desvio ao investigador.

5.2.6 Normas IFRA para a composição aromática

A composição aromática que foi utilizada estava em conformidade com as normas da Associação Internacional de Fragrâncias (IFRA – 39ª atualização/ abril 2005) sendo permitido o seu uso em 100% em perfume.

As normas IFRA referentes à restrição de uso foram baseadas na avaliação de segurança do Conselho de Especialistas do Instituto de Pesquisa de Materiais para composições aromáticas (RIFM) e foram revistas pelo Comitê Científico da IFRA.

A avaliação dos ingredientes da composição aromática foi feita de acordo com os padrões de segurança mencionados no Anexo I do Código de Prática da IFRA. O estudo de estabilidade da composição aromática Ciclo 1910® foi realizado e demonstrou que esta composição aromática entre as testadas foi a que apresentou os resultados melhores e estáveis, conforme demonstrado por PEREIRA *et al.*(2010). Devido a isso, foi escolhida para dar prosseguimento ao estudo clínico e cromatográfico.

5.2.7 Avaliação Sensorial

A avaliação sensorial é uma ferramenta fundamental no desenvolvimento de produtos. Permite qualificar as percepções humanas relacionadas a um produto e descobrir quais são os atributos que devem ou não estar presentes no produto e em qual intensidade. Este procedimento auxilia a equipe de profissionais que atua na área de pesquisa e desenvolvimento das empresas a gerar produtos de alta qualidade e com grandes chances de aceitação pelo mercado consumidor.

Nos cosméticos, a composição aromática é uma das dimensões de qualidade que mais influencia na aceitação de um produto (HUDEWENZ, 1999). Sendo assim, para um fabricante desta categoria de produto, a intensidade e a característica do perfume são atributos que devem ser analisados com muito cuidado. De fato, pesquisadores e profissionais que atuam nas áreas de marketing e de desenvolvimento têm verificado que a composição aromática pode determinar o sucesso ou o fracasso de um produto. Quando bem elaborada e desenvolvida pode suprir atributos sensoriais necessários para levar um produto de baixa performance técnica para o seu sucesso de mercado (RAU, 2001).

Para esta análise, foi utilizada a escala LMS (*Labeled Magnitude Scale*), que é uma escala semântica de percepção, caracterizada por espaçamentos não lineares (semi-logaritmico) das categorias. Esta escala foi modelada baseada na escala “*category-ratio*” desenvolvida para a mensuração de força física (GUERRA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2009). A escala para avaliação encontra-se no Anexo 1.

O julgador marcou a intensidade de perfume nesta escala (anexo 1) nos tempos inicial e a cada 90 minutos até completar 6h de teste. Os dados foram analisados estatisticamente para a avaliação das diferenças significativas ($p < 0,05$) em cada intervalo de tempo entre as fases do ciclo menstrual de avaliação (GUERRA, 2002 e MEEILGAARD *et al.*, 1999).

5.2.8 Análise de *Headspace* e por Cromatografia em fase gasosa

O principal método usado é uma técnica de *headspace* dinâmica desenvolvida para identificar e quantificar componentes voláteis responsáveis por dar um aroma de flor, fruta e de outras substâncias odoríferas. Posteriormente, esta técnica foi estendida para medir o desempenho de perfumes na pele humana. Essa técnica quantifica a partição individual de componentes da pele no ar, ou seja, a propriedade odorífera do componente, e o perfil de percepção olfativa. Com isso, permite-se mapear o desempenho da composição aromática na pele e identificar produtos de degradação durante os tempos de avaliação ou matérias-primas que mais

Concomitantemente à análise sensorial, os componentes voláteis das amostras de 40 µL de perfume com matérias-primas em concentrações conhecidas que foram aplicadas na pele do indivíduo avaliado pelo painel, foram coletados em intervalos de tempos pré-determinados por meio de arraste por bomba de vácuo e adsorvidas por um tubo tenax. Após a coleta, o tubo foi acoplado num aparelho de dessorção térmica que fez a dessorção dos componentes para serem analisados no Cromatógrafo em fase gasosa (CG) com detetor de massa, de forma a identificar e quantificar quais são os compostos que estão sendo alterados ou produtos de reação, tendo como padrão a pele sem aplicação de produto, utilizando a metodologia de BAYDAR *et al.* (1995), porém os resultados obtidos não foram significativos em vista das variabilidades intrínsecas de cada indivíduo.

Foram identificados ingredientes mais susceptíveis às oscilações hormonais ou os que apresentaram uma segmentação maior de fragmentos m/z , obtidos pela análise estatística multivariada usando o programa *Unscrambler* v 9.5 (WOLD *et al.*, 1987; ESBENSEN, 2002) aplicando-se o método descrito por PAVÓN *et al.* (2006), que facilitou a identificação e as correlações com dados cromatográficos. Porém, não foi encontrado um padrão de resposta geral em função do ciclo menstrual e sim para algumas voluntárias.

5.2.9 Análise das medidas biomecânicas

As medidas biomecânicas coletadas no antebraço das mulheres não foram significativas para o modelo utilizado em PEREIRA (2009), porém algumas referências citam a influência dos hormônios nas propriedades biomecânicas da pele. O local de medição pode interferir na quantidade e na atividade de algumas glândulas, como citado por MACDONALD & CLARKE (1970), que observaram que as medições realizadas nas costas dos voluntários apresentavam maior produção de sebo comparada com a face e com o antebraço.

5.2.10. Correlação da Análise Sensorial e Instrumental

5.2.11. Modelo Linear Generalizado

Os Modelos Lineares Generalizados foram introduzidos no início dos anos 70, tendo um impacto muito grande no desenvolvimento da estatística aplicada. No princípio o seu uso esteve confinado a um grupo restrito de investigadores, dada a falta de bibliografia acessível e a complexidade inicial do GLIM, primeiro software totalmente dirigido à aplicação da metodologia.

Foram precisos cerca de 20 anos para que a teoria e prática dos Modelos Lineares Generalizados fossem transferidos do investigador para o domínio público. Este avanço só foi possível a partir do momento em que o software existente passou a ser melhor compreendida.

Atualmente, a maioria dos pacotes estatísticos de maior expansão já contém módulos adequados ao estudo destes modelos. Pode, pois dizer-se que, neste momento, o conhecimento adequado da metodologia dos Modelos Lineares Generalizados é imprescindível para qualquer indivíduo que utilize métodos

estatísticos. A importância dos Modelos Lineares Generalizados não é apenas de índole prática. Do ponto de vista teórico a sua importância advém, essencialmente, do facto de a metodologia destes modelos constituir uma abordagem unificada e aplicada em métodos de inferência estatística (TURKMAN & SILVA, 2000).

Os Modelos Lineares Generalizados introduzidos por NELDER & WEDDERBURN (1972), correspondem a uma síntese destes e de outros modelos, vindo assim unificar, tanto do ponto de vista teórico como conceptual, a teoria da modelação estatística até então desenvolvida. Seguem os casos particulares dos modelos lineares generalizados:

- modelo de regressão linear clássico;
- modelos de análise de variância e covariância,
- modelo de regressão logística,
- modelo de regressão de Poisson,
- modelos log-lineares para tabelas de contingência multidimensionais,
- modelo *probit* para estudos de proporções, etc.

Devido ao grande número de modelos que englobam e a facilidade de análise associada ao rápido desenvolvimento computacional que se tem verificado nas ultimas décadas, os MLG têm vindo a desempenhar um papel cada vez mais importante na análise estatística, apesar das limitações ainda impostas, nomeadamente por manterem a estrutura de linearidade, pelo fato das distribuições se restringirem à família exponencial e por exigirem a independência das respostas.

5.2.11.1 Terminologia e Tipos de dados

Para TURKMAN & SILVA (2000), O MLG se baseia em modelos experimentais em que há uma variável aleatória Y de interesse primário, a que dá-se o nome de variável resposta ou variável dependente, e um vector $x = (x_1, \dots, x_k)^T$ de k variáveis explicativas, também designadas por covariáveis ou variáveis independentes, que acredita-se explicar parte da variabilidade inerente a Y . A variável resposta Y pode ser contínua, discreta ou dicotômica. As covariáveis, determinísticas ou estocásticas (variável que possui valores verdadeiramente aleatórios), podem ser também de qualquer natureza: contínuas, discretas, qualitativas de natureza ordinal ou dicotômicas (variável com duas alternativas distintas; sim ou não)

Assume-se que tem-se dados da forma

$$(y_i, x_i), i = 1, \dots, n, (1.1)$$

resultantes da realização de (Y, x) em “n” indivíduos ou unidades experimentais, sendo as componentes Y_i do vetor aleatório

$$Y = (Y_1, \dots, Y_n)^T \text{ independentes.}$$

Para as avaliações de correlação foi aplicado o MLG, para verificar se há alteração na sensibilidade olfativa (análise sensorial) de acordo com a fase do ciclo menstrual, o tempo experimental, as voluntárias, as variáveis biomecânicas e a cromatografia.

5.2.12 Condições experimentais

Na primeira avaliação, os voluntários, que preencheram os critérios de inclusão e aceitaram voluntariamente participar deste estudo, após serem esclarecidos e assinarem o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, Anexo 4 e 5, responderam ao questionário fornecido pelo Instituto de Pesquisa, a respeito dos critérios mencionados nos itens 5.2.5.1 a 5.2.5.4. Em seguida, foram submetidos à avaliação cuidadosa pelo co-investigador, na qualidade de médico, nas instalações do centro monitor e investigador, Instituto de Pesquisa Clínica. O co-investigador, em todos os tempos experimentais determinados, realizou o acompanhamento clínico do estudo, anotando qualquer reação não esperada do produto, em documento apropriado para esta finalidade.

Os dados iniciais do voluntário, referentes às medidas consideradas para os estudos, como peso, altura foram tomados por técnicos na avaliação clínica (medidas de temperatura basal e muco cérvico), sendo-lhes atribuída à responsabilidade de avaliar este parâmetro em cada fase do ciclo menstrual.

5.2.13 Experimento

Foi formada uma equipe sensorial para a avaliação do perfume, toda análise tomou-se o cuidado para que não houvesse saturação do perfume no ambiente, cada voluntária avaliava separadamente uma da outra para que não houvesse influência na resposta e o perfume era aplicado em ambiente diferente do avaliado, sendo que os julgadores foram previamente orientados e treinados no procedimento.

O local de realização dos testes foi no Instituto de Pesquisa Clínica Medcin – Instituto da Pele de acordo com as necessidades do teste: temperatura 22-25°C e Umidade Relativa de 45-55%.

O teste avaliou o desempenho do perfume, assim como a percepção olfativa das mulheres em diferentes fases do ciclo. Antes da aplicação do perfume, todas as vezes que as julgadoras visitaram o Instituto, foram realizadas medidas instrumentais da pele do antebraço das 29 julgadoras e das últimas dez foi realizada também da pele da região interescapular (Sebumetria, Corneometria e TEWL).

Próximo ao período ovulatório, que compreendeu os dias (12º a 16º do ciclo menstrual), foi realizada uma coleta do muco cérvico por uma profissional treinada, que utilizou espécule e coletor com escova, descartáveis, o material coletado foi analisado por microscopia para identificar a fase ovulatória.

As avaliações sensoriais ocorreram em todas as julgadoras e em uma área delimitada na superfície da pele do antebraço, onde foi aplicado o perfume que permaneceu na pele das voluntárias durante 6 horas.

Imediatamente após a aplicação do perfume e a cada 90 minutos, a julgadora fez a avaliação em escala LMS (*Labeled Magnitude Scale*) (**Anexo 1**) do perfume em sua pele e no pulso de um único voluntário homem, e, este mesmo voluntário e outro do sexo masculino acrescentado no teste, avaliaram a pele das mulheres em função do ciclo menstrual, considerados controles de pele e olfativo neste estudo. Esta etapa se repetiu cinco vezes em cada visita e os voluntários permaneceram no Instituto pelo período de 6 horas.

Sendo assim, cada julgadora visitou o Instituto quatro vezes durante um mês, considerando quatro fases do ciclo menstrual para a avaliação. Os voluntários que atuaram como controle (homem) estavam disponíveis para participar do teste todas as vezes que ocorreu a avaliação das voluntárias em função do ciclo menstrual. O detalhamento do desenho do teste está descrito no Protocolo de teste (Anexo 1).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas avaliações em **29 voluntárias**, segundo o experimento descrito no item 5.2.7.2. Cada uma delas avaliou a intensidade da composição aromática de um perfume aplicado em seu braço direito, para cada uma das quatro fases do ciclo menstrual (folicular, ovulatória, lútea e menstrual) avaliando-se cinco

tempos experimentais (inicial, 1,5 h, 3 h, 4,5 h e 6 h), em cada uma, além de analisar o produto aplicado em seu braço direito, as voluntárias também avaliaram o produto aplicado no braço direito de um voluntário homem. Foram coletadas triplicata das medidas biomecânicas que poderiam interferir nos resultados: índice de TEWL; de corneometria e de sebumetria, logo após a aplicação do perfume (tempo inicial) e decorridos 6 horas e, concomitante, ocorria na sequência a coleta de *headspace* e a avaliação sensorial, realizada, no tempo inicial e a cada 90 minutos, durante 6 h de teste.

Quanto a análise cromatográfica para análise dos componentes voláteis, para posterior correlação com a avaliação sensorial, encontraram-se vários interferentes na análise, considerados variabilidades entre os indivíduos, como: nutrição (tipo de alimentos ingeridos); liberação de metabólitos; produtos biotransformados na pele (pelo suor) que podem ter alterado na resposta ou erro experimental do técnico durante a coleta das amostras, problemas na injeção na coluna no cromatógrafo; e queda de energia durante a análise que afeta todo o perfil cromatográfico e, conseqüentemente, na relação dos fragmentos m/z com as fases do ciclo menstrual.

O suor foi um dos interferentes na análise, que na fase lútea predominou a observação de picos de ácidos graxos.

Não foi encontrada correlação ou modelo preditivo significativo para as medidas biomecânicas e os dados cromatográficos, em vista dos interferentes evidenciados na análise como o suor.

A análise realizada por indivíduo evidenciou um padrão distinto na liberação de compostos aromáticos específicos para cada sujeito e associada com a fase do ciclo menstrual. Embora com os resultados obtidos não foi possível gerar um modelo para a liberação de compostos aromáticos na pele da população, é evidente que os hormônios sexuais têm um efeito único sobre a pele de cada indivíduo.

Coube-se utilizar esses resultados no estudo de correlação sensorial e instrumental e verificar se a análise cromatográfica é significativa ao modelo de correlação ou não, ou seja, se influencia na resposta sensorial ou não, que será apresentada no item 6.2.

Quanto a análise das propriedades biomecânicas, a proposta foi a análise dessas medidas na área interescapular de 10 voluntárias, em função do ciclo

menstrual para checar se, realmente, não existia diferença de hidratação ou de oleosidade em função do ciclo menstrual.

No entanto os resultados obtidos evidenciaram que as fases do ciclo não interferiram ($p>0,05$) nas variáveis biomecânicas da pele (Índices de Corneometria, Sebumetria e Perda de Água Transepidermal–TEWL) quando analisadas isoladamente, isto é, considerando somente o efeito desse fator.

Há interação dos efeitos “Fase do ciclo” com “Mulher” (mulher*fases) nos resultados dos **índices de Corneometria, Sebumetria e a TEWL** ($p<0,001$), ou seja, o efeito da fase do ciclo nos índices mencionados variou de uma mulher para outra (intrínseco ao indivíduo), que pode ser justificado pela dieta e metabolismo distintos que afetam fisiologicamente a pele de cada uma delas, mas foi possível avaliar tendências para elaboração de um estudo representativo para a população.

Considerando as medidas realizadas no antebraço, o **índice de Corneometria** ($p<0,001$) e **TEWL** ($p<0,011$) apresentaram diferenças nas médias da região tratada e da controle, sendo que a região tratada apresentou média maior que a do controle, demonstrando que estas características podem afetar o desempenho do perfume aplicado na pele (região tratada) ou podem ter sido ocasionadas pela solução hidro alcoólica do perfume aplicada no local, que afetou o substrato e, conseqüentemente, os índices.

A comparação da região interescapular com a do antebraço tratada revelou que a média dos **índices de Corneometria e de Sebumetria** da região do antebraço tratada foi significativamente menor ($p<0,001$) que da interescapular em concordância com a literatura. O fator Mulher foi significativo para **os índices de Corneometria e Sebumetria e TEWL** ($p<0,001$) preponderantes para o modelo, pois não se obteve um padrão resposta em função do ciclo menstrual, que novamente se justificou pela alta variabilidade entre fatores intrínsecos ao indivíduo que são difíceis de controlar como o próprio metabolismo e dieta que afetam fisiologicamente a pele. Acredita-se que talvez exista algum padrão que analise de forma individual as voluntárias em função do ciclo menstrual, porém não foi verificado neste estudo.

Coube-se utilizar esses resultados no estudo de correlação sensorial e instrumental e verificar se as medidas biomecânicas são significativas ao modelo de

correlação ou não. No caso as medidas biomecânicas serão consideradas covariáveis no modelo, que será apresentado no item 6.2.

Para obtenção do modelo de correlação sensorial e instrumental, primeiramente realizou-se a análise descritiva dos dados e verificou-se a normalidade da informação gerada que será descrito no **item 6.1**. Nos **itens 6.2 e 6.3** serão descritos a construção do modelo de correlação sensorial e instrumental e o cálculo dos fatores significativos para o modelo.

6.1. Análise descritiva dos dados

A análise descritiva dos dados permite avaliar o comportamento dos dados, verificar tendências e sinalizar qual o melhor modelo de análise para ser aplicado.

Na **Figura 1**, tem-se o *boxplot* (gráfico em forma de caixa que indicou a variabilidade, mediana, média, “*outliers*” do tratamento dos dados) comparando a cromatografia nas quatro fases do ciclo menstrual, para os cinco tempos experimentais:

Figura 1. Análise de “*boxplot*” da cromatografia por fase do ciclo (Folicular Lútea, Menstrual e Ovulatória) e tempo experimental (inicial 0,0; 1,5h; 3; 4,5; 6,0h)

Legenda: m/z : unidade adimensional formada pela divisão da massa de um íon (em unidade de massa atômica unificada) pelo seu número de carga (independente do sinal). O símbolo é escrito em *itálico*, letras minúsculas e sem espaços. A razão massa-carga tem sido utilizada no eixo horizontal de espectros de massa, embora a quantidade medida não seja exatamente a massa do íon dividida pela sua carga elétrica. Para a variável independente representada no eixo horizontal de um espectro de massas, a quantidade adimensional m/z é recomendada. z : um número inteiro representando a carga total de um íon, não considerando o sinal, dividida pela magnitude da carga do elétron, e . (VESSECCI, 2011).

Observou-se para os dados cromatográficos que as diferenças entre as medianas das fases e dos tempos experimentais foram pequenas e com muitos “outliers” (valores encontrados entre 1,5 e 3 intervalos interquartil acima do terceiro quartil ou abaixo do primeiro), decorrentes, provavelmente, de não alterações significativas no comportamento dos componentes da composição aromática e pelo fato do método de *headspace* ser uma medida relativa da quantidade do componente aromático aplicado na pele (BAYDAR *et al.*, 1995; RANDOLPH & CANHOTO, 1999; AUGUSTO & LEITE, 2003).

Na **Figura 2** apresenta o resultado do teste de normalidade para a cromatografia.

Figura 2. Q-Q *plot* da normalidade dos resíduos dos dados de cromatografia aplicado ao teste de Normalidade.

Legenda: m/z : unidade adimensional formada pela divisão da massa de um íon (em unidade de massa atômica unificada) pelo seu número de carga (independente do sinal). O símbolo é escrito em *itálico*, letras minúsculas e sem espaços. A razão massa-carga tem sido utilizada no eixo horizontal de espectros de massa, embora a quantidade medida não seja exatamente a massa do íon dividida pela sua carga elétrica. Para a variável independente representada no eixo horizontal de um espectro de massas, a quantidade adimensional m/z é recomendada. z : um número inteiro representando a carga total de um íon, não considerando o sinal, dividida pela magnitude da carga do elétron, e . (VESSECHI, 2011).

Para testar se as hipóteses/suposições (independência e resíduos identicamente distribuídos) eram verdadeiras, foi realizado o teste de Normalidade de Kolmogorov_Smirnov (WINER *et al.*, 1991).

No teste de Normalidade dos resíduos, a hipótese de Normalidade foi rejeitada (valor de $p < 0,05$), ou seja, a análise cromatográfica não segue distribuição normal. Porém, para aplicação do modelo linear generalizado não há a necessidade de dados que possuam distribuição normal. Além disto, o teste de Kolmogorov-Smirnov não é considerado robusto o suficiente para algumas avaliações sensoriais, principalmente, em testes afetivos onde se usa escalas categóricas (VILLANUEVA *et al.*, 2000, O' MAHONY, 1982; MCPHERSON & RANDALL, 1985). Portanto, é possível seguir com as análises incluindo este fator no modelo.

Na **Tabela 1** está apresentado o poder do teste para os dois modelos lineares generalizados, que estão demonstrados no **item 6.2 e 6.3**

Tabela 1. Cálculo do poder do teste

MODELO	NÍVEL	PODER DO TESTE
Primeiro	Fase do Ciclo	7,9%
Primeiro	Tempo Experimental	94,4%
Segundo (Interescapular – T0)	Fase do Ciclo	98,8%

Na decisão estatística, o investigador pode rejeitar a hipótese nula quando ela é de fato verdadeira (erro tipo I) ou então não a rejeita quando ela é uma afirmação falsa (erro tipo II). É quando se rejeita a hipótese nula que aparecem as célebres expressões: $p < 0,05$, $p < 0,01$ ou ainda $p < 0,001$. Assim, relativamente aos erros, o erro tipo I designado por alfa (α), define-se como a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira, enquanto o erro tipo II, designado por beta (β), define-se como a probabilidade de não rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa.

O poder do teste pode ser definido como a probabilidade de encontrar diferença se ela realmente existe. Ou seja, é a sensibilidade do teste. A sensibilidade de um teste estatístico é, em grande parte, função do tamanho da amostra. Amostras grandes fornecem estimadores mais precisos dos parâmetros populacionais, isto é, à medida que se aumenta o tamanho da amostra aumenta a precisão dos estimadores.

Os estudos com amostras de reduzida dimensão, e por isso com baixa sensibilidade, transportam uma incerteza considerável quanto à inferência

estatística. Relativamente ao nível de significância utilizada, ele também influencia no poder do teste. Referenciou-se que, convencionalmente, são utilizados os valores de 5% e 1% e algumas vezes 10%. Aumentar o valor do α de 1% para 5% ou 10% aumenta o poder do teste. Assim, um α de, por exemplo, 5% ou 10% aumenta o poder do teste relativamente à utilização de 1%.

Recomenda-se usar valores de poder de teste entre 50 a 80%. O valor de 80% para o poder do teste pode não fazer sentido se não se basear na natureza da temática, tipo de desenho de investigação e, sobretudo, nas consequências lógicas do erro tipo II na decisão do investigador. Se não se encontram diferenças significativas num estudo, a estimação do poder pode ajudar a refletir sobre os resultados (COHEN, 1988; SEDLMEIER & GIGERENZER, 1989).

Portanto, o poder do teste depende da magnitude da diferença entre os fatores “Fase do Ciclo”, “Tempo Experimental”, do tamanho do α (ou seja, se ele é de 0,01, 0,05 ou de 0,10) e do número de julgadores que participaram do teste (LAWLESS & HEYMANN, 1999).

Para o presente estudo, o mínimo necessário de voluntários era 26, obtido por meio das variâncias ocorridas em estudos preliminares com a escala (LMS) escolhida para o teste e o mínimo de diferença entre os dois pontos da escala, para que ocorresse diferença significativa para um α igual 0,05, portanto, o poder do teste foi superior ao calculado de **0,981**, pois participaram **29 julgadoras (n=29)**.

Na **Tabela 1**, observou-se que o poder do teste para a fase do ciclo no primeiro modelo foi baixo. Isso ocorreu devido à pequena diferença entre as médias das fases do ciclo. Para o tempo experimental no primeiro modelo e a fase do ciclo no segundo modelo, o poder do teste foi excelente, acima de 80%, ou seja, existe uma forte indicação de encontrar diferenças significativas no modelo.

Antes de avaliar qual o modelo matemático é o mais adequado para o tratamento dos dados, deve-se considerar se os resíduos foram independentes e distribuídos de forma aleatória, e que não ocorreu dependência entre o resíduo e a variável resposta (intensidade de perfume). O gráfico de efeitos principais permitiu avaliar as diferenças entre os Fatores “Cromatografia” e “Tempos Experimentais” que é uma forma de analisar se existe a tendência ou indicativos de comportamento dos dados, como demonstrado no **Figura 3**.

Figura 3. Gráfico de efeitos principais para a variável cromatografia em relação aos Fatores Mulher, Fases do Ciclo e Tempo Experimental

Notou-se que a média das áreas dos picos da variável cromatografia no Fator “Tempo Experimental” foi mais elevada no tempo inicial, apresentando uma redução após 1,5 e 3 horas, tendo em seguida um pequeno aumento em 4,5 e 6 horas. Em relação às fases do ciclo, observou-se que as médias foram mais baixas nas fases menstrual e ovulatória e uma elevação novamente na fase lútea, que está em concordância em relação ao demonstrado por PEREIRA (2009), porém sem a diferença significativa encontrada anteriormente devido à grande variabilidade observada no Fator “Mulher” para as médias das áreas dos picos da variável cromatografia, o que traduz a diferença estatisticamente significativa desta variável ao modelo, ou seja, a variabilidade entre as mulheres influencia nas variáveis estudadas, o que novamente está em concordância ao ocorrido em PEREIRA (2009). Neste presente estudo, o aumento do “n” amostral ocasionou aumento da variabilidade das mulheres, o que afetou a possibilidade de encontrar diferenças significativas que poderiam gerar inferências para a população

Na **Figura 4** visualizou-se o efeito da interação entre os Fatores “Fase do ciclo” e o “Fator Mulher” na variável cromatográfica.

Figura 4. Gráfico de interação entre a área total do picos cromatográficos em função das fases do ciclo menstrual (Folicular, Ovulatória, Menstrual e Lútea).

Verificou-se que, em geral, a variável cromatografia avaliada em cada uma das mulheres em função do ciclo menstrual não apresentou oscilações significativas, entretanto, para algumas mulheres houve grandes diferenças. Em geral as fases lútea e folicular apresentaram médias maiores que a ovulatória e a menstrual, como foi demonstrado por PEREIRA (2009).

Na **Figura 5**, tem-se os efeitos principais da variável análise sensorial para os fatores “Mulher”, “Fases do Ciclo” e “Tempos Experimentais”.

Figura 5. Avaliação da variável Análise Sensorial em relação aos efeitos principais Mulher, Fases do Ciclo e Tempos Experimentais.

Observou-se na **Figura 5** o efeito do tempo na análise sensorial, que foi identificado previamente por PEREIRA (2009). Notou-se, também, um pequeno aumento no valor das médias da análise sensorial nas fases lútea e folicular. A comparação entre os voluntários permite observar uma grande variabilidade na análise sensorial entre as voluntárias. As notas demonstradas pela mulheres na escala LMS, que pode ser evidenciada no primeiro gráfico e no terceiro da **Figura 5**, estão entre as categorias da escala “fraco” e “forte”, que evidencia que ao longo do estudo em todos os tempos experimentais avaliados, a intensidade de perfume foi claramente percebida e facilmente diferenciada em cada tempo de avaliação.

A **Figura 6** apresenta os efeitos principais Mulher, Fases do Ciclo e Tempos Experimentais na avaliação realizada pela mulher na pele do homem.

Figura 6. Efeitos principais das mulheres, fases do ciclo e tempos experimentais na avaliação da mulher na pele do homem.

Observou-se na **Figura 6** a indicação de redução da sensibilidade olfativa com o decorrer do concordante com a literatura científica (PEREIRA, 2009). Notou-se, também, pequeno aumento nas médias da análise sensorial na fase folicular. A comparação entre os voluntários permitiu observar grande variabilidade entre as voluntárias. Identificou-se que com o $n=29$ a variabilidade entre as mulheres aumentou o que dificultou encontrar diferenças significativas que foram evidenciadas por PEREIRA (2009), no qual a mulher apresentou maior intensidade de perfume na pele do homem do que em sua própria pele na fase lútea.

6.2 Construção do modelo de correlação para a avaliação sensorial em função dos dados cromatográficos

Foi analisada a variável cromatográfica de forma descritiva através de *boxplot*, visualizando conjuntamente os fatores “Fases do Ciclo” e o “Tempo Experimental”. Além disso, foi verificada a normalidade dessa variável por meio do teste de normalidade.

Para verificar se houve alteração na sensibilidade olfativa (análise sensorial) de acordo com os fatores Fase do ciclo menstrual, tempo experimental, voluntárias, variáveis biomecânicas e cromatografia, utilizou-se um modelo linear generalizado, conforme demonstrado por TURKMAN *et al.* (2000). Nesse modelo foi considerado: a sensibilidade olfativa como variável resposta (y); a fase do ciclo menstrual () e o tempo experimental () como fatores fixos, as mulheres () como fatores aleatórios, as variáveis biomecânicas, a avaliação da mulher na pele do homem e a cromatografia como covariáveis:

$$y_{ijk} = \mu... + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + \lambda_1 \text{Corneometria} + \lambda_2 \text{Sebumetria} + \lambda_3 \text{TEWL} + \lambda_4 \text{Pele} _ \text{Homem} + \lambda_5 \text{Cromatografia} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: o índice i é referente às fases do ciclo ($i=1$ representa a fase menstrual, 2 a folicular, 3 a lútea e 4 a ovulatória), j aos tempos experimentais ($j=1$ representa o tempo inicial, 2 refere-se a 1,5 horas, 3 a 3 horas, 4 a 4,5 horas e 5 a 6 horas) e k as mulheres (1, 2, 3, ..., 29) e são os coeficientes das covariáveis. A média geral é representada por μ o erro aleatório é representado por ε .

Foi avaliado se houve diferença entre as médias das análises sensorial por fases do ciclo e por tempos experimentais empregando o teste de Tukey.

A correlação entre as covariáveis e a variável resposta (análise sensorial) foi avaliada com gráficos de dispersão, coeficiente e teste de correlação de Pearson.

Para verificar se ocorreu alteração na sensibilidade olfativa (análise sensorial) em t_0 de acordo com as variáveis fase do ciclo menstrual, mulher e as covariáveis medidas biomecânicas interescapulares e a cromatografia, utilizou-se um modelo linear generalizado. Neste, considerou-se: a sensibilidade olfativa como variável resposta (y); a fase do ciclo menstrual () como fator fixo, as mulheres () como fatores aleatórios, as variáveis biomecânicas e a cromatografia como covariáveis de acordo com a **Equação 2**.

(Equação 2)

$$y_{ijk} = \mu... + \rho_i + \beta_k + \lambda_1 \text{Corneometria}_{inter} + \lambda_2 \text{Sebumetria}_{inter} + \lambda_3 \text{TEWL}_{inter} + \lambda_4 \text{Cromatografia} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde: o índice i é referente às fases do ciclo ($i=1$ representa a fase menstrual, 2 a folicular, 3 a lútea e 4 a ovulatória), j aos tempos experimentais ($j=1$ representa o tempo inicial, 2 refere-se a 1,5 horas, 3 a 3 horas, 4 a 4,5 horas e 5 a 6 horas) e k as mulheres (1, 2, 3, ..., 29) e são os coeficientes das covariáveis. A média geral é representada por μ o erro aleatório é representado por ε .

Além disso, foram avaliados, de forma descritiva, a relação entre a cromatografia, a mulher, a fase do ciclo e o tempo, através dos gráficos de efeitos principais e de interação. A mesma avaliação foi realizada para a análise sensorial e para a avaliação da mulher na pele do homem.

Para analisar, de forma descritiva, a relação entre a avaliação sensorial realizada pelas mulheres (auto-avaliação) e a dos homens nas mulheres em função da fase do ciclo menstrual, primeiramente, foram calculadas as médias da análise sensorial realizadas pelos dois homens. Em seguida, foram elaborados os gráficos de interação da fase do ciclo em função do tempo, um com a avaliação do homem e outro com o das mulheres, utilizando a mesma escala.

Para verificar se houve alteração na variável cromatografia em função das variáveis fase do ciclo menstrual, Tempo Experimental e Mulher utilizou-se um modelo linear generalizado, considerando-se a cromatografia como variável resposta (y); a fase do ciclo menstrual (ρ), o Tempo Experimental (α) como fatores fixos, as mulheres (β) como fatores aleatórios como citado na **Equação 3**.

$$y_{ijk} = \mu + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + \varepsilon_{ijk}$$

(Equação 3)

Onde: o índice i é referente às fases do ciclo ($i=1$ representa a fase menstrual, 2 a folicular, 3 a lútea e 4 a ovulatória), j os tempos experimentais ($j=1$ representa o tempo inicial, 2 refere-se a 1,5 horas, 3 a 3 horas, 4 a 4,5 horas e 5 a 6 horas) e k as mulheres (1, 2, 3, ..., 29) e são os coeficientes das covariáveis. A média geral é representada por μ o erro aleatório é representado por ε .

Foi avaliado se houve diferença entre as médias da cromatografia por fases do ciclo e por tempos experimentais através do teste de *Tukey*.

6.2.1 Análise de correlação instrumental e avaliação sensorial

Primeiro avaliaram-se se os fatores considerados no modelo eram significativos e poderiam ocasionar alguma influência na variável resposta (avaliação sensorial).

Na **Tabela 2** avaliou-se se os efeitos de cada fator e das covariáveis na análise sensorial foram significativos, de acordo com o modelo linear generalizado.

Tabela 2. Efeitos de cada fator significativo ao modelo de análise sensorial

FATOR	GRAUS DE LIBERDADE	ESTATÍSTICA F	VALOR_ p	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	3,13	0,027	Rejeita a hipótese.**
Tempo Experimental	1	43,36	<0,001	Rejeita a hipótese.
Mulher	28	2,35	<0,001	Rejeita a hipótese.
Pele Homem	83	174,67	<0,001	Rejeita a hipótese.
Cromatografia	1	0,71	0,400	Não rejeita a hipótese.
Corneometria	1	0,76	0,386	Não rejeita a hipótese.
TEWL	1	0,03	0,855	Não rejeita a hipótese.
Sebumetria	1	4,72	0,031	Rejeita a hipótese.
R ² -Ajustado = 91,25%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor $p \leq 0,05$, ou seja, existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de significância: 5%

** Hipótese: não houve diferenças entre as médias do fator avaliado

Observou-se que ocorreram diferenças significativas entre as médias do Fator Tempo Experimental, fases do ciclo, mulher, pele do homem e **Sebumetria, ou seja, esses fatores influenciam** na variável resposta (análise sensorial) ($p \leq 0,05$). Essas diferenças encontradas estão em concordância com o que foi demonstrado por PEREIRA (2009). No Fator Tempo Experimental, a diferença de 1h30 para cada avaliação impacta na intensidade de perfume percebida, o que significa que existe uma queda significativa na intensidade de perfume (variável resposta avaliação sensorial) e em relação a Mulher, que é um fator aleatório. Quando encontra-se diferença significativa para este fator no modelo, este indica que houve uma alta variabilidade nos resultados, o que pode influenciar em observar diferenças significativas para outros fatores do modelo, como por exemplo, a fase do ciclo e quando a mulher avalia o mesmo perfume na pele do homem. Para identificar em qual fase do ciclo isso ocorre as alterações, aplicou-se o teste de média *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Na **Tabela 3** a seguir, tem-se o resultado do teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) para a comparação da análise sensorial em cada fase do ciclo:

Tabela 3. Teste de *Tukey* para avaliar diferenças entre as fases do ciclo menstrual

FASE	MÉDIA	AGRUPAMENTO*
Folicular	4,643	A
Lútea	4,632	A
Menstrual	4,330	A
Ovulatória	4,283	A

* A diferença entre as médias das fases do ciclo é considerada significativa se as fases forem classificadas em agrupamentos diferentes

Observou-se que, apesar do modelo linear generalizado apresentar um efeito da fase do ciclo na análise sensorial, esse efeito não foi identificado quando avaliado de forma isolada. Como se pode observar, todas as fases do ciclo menstrual estão no mesmo grupo de letra A, o que demonstrou que não são estatisticamente diferentes. Muitas vezes, quando se tem uma variabilidade alta, principalmente devido ao fator aleatório mulher ter dado significativo ao modelo, este influenciou na resposta e sua alta variabilidade dificultou encontrar diferenças significativas.

Fazendo um comparativo no que foi observado em PEREIRA (2009), em que se identificou um valor em média maior significativo de intensidade de perfume na fase Lútea seguida pela folicular, neste presente estudo observou-se que o aumento no número de pessoas no estudo de 19 para 29 ao invés de fornecer maior robustez aos dados, aumentou a variabilidade do fator aleatório Mulher, o que influenciou na resposta e nas diferenças significativas que poderiam ser encontradas, em valor, os resultados encontrados por fase do ciclo seguem o mesmo perfil encontrado por PEREIRA (2009).

Na **Tabela 4** é apresentado o resultado do teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) para a comparação da análise sensorial em cada tempo experimental.

Tabela 4. Teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) para avaliar diferenças entre as fases do ciclo menstrual

TEMPO	MÉDIA	AGRUPAMENTO*
t0	9,220	A
t1,5	6,059	B
t3	3,711	C
t4,5	2,234	D
t6	1,135	E

* A diferença entre as médias das fases do ciclo é considerada significativa se as fases forem classificadas em agrupamentos diferentes

Na **Figura 3** observou-se o efeito da interação entre os fatores Fase do Ciclo Menstrual e o Tempo Experimental na avaliação sensorial, segundo a auto-avaliação das mulheres e a avaliação masculina.

Figura 3. Efeito da interação entre a fase do ciclo menstrual e o tempo experimental.

Em relação à avaliação homem e mulher, notou-se que no tempo inicial a sensibilidade masculina ao perfume foi maior que a feminina para todas as fases do ciclo menstrual. Nos demais tempos experimentais, a sensibilidade feminina foi levemente superior, conforme foi avaliado por HUMMEL (1991), porém com resultados distintos deste. HUMMEL (1991) fez a avaliação apenas da mulher em função do ciclo, porém NAVARRETE-PALACIOUS (2003b), relatou diferenças de percepção da mulher em função do ciclo e versus o homem, sendo que as diferenças observadas foram na fase ovulatória.

Além disso, observou-se que na fase folicular a diferença entre a sensibilidade feminina e a masculina nas avaliações realizadas após a avaliação inicial (1,5h, 3h, 4,5h e 6h) se acentuou. Segundo a auto-avaliação das seis últimas mulheres do estudo e a média da avaliação que os dois homens realizaram nessas mulheres, estes tiveram maior sensibilidade olfativa ao perfume que as mulheres no tempo inicial. Todos esses pontos observados não foram significativos, são apenas indicativos pois a avaliação homem versus mulher ocorreu apenas para as últimas 10 voluntárias do estudo e foi feita apenas com 3 homens, não permitiu ter dados para fazer uma análise mais robusta que poderia inferir um resultado para a população.

No entanto, na **Tabela 4**, observou-se que houve diferença significativa entre todos os tempos experimentais, observando-se que a média da avaliação sensorial

ou intensidade de perfume reduziu de forma significativa, a percepção de perfume com o passar do tempo, conforme citado por GUERRA, 2002 e comprovado por PEREIRA, 2009.

Nas **Figuras 4 e 5** foram realizadas análises de correlação, pois os fatores pele do homem, que significa avaliação sensorial da intensidade de perfume percebida na pele do homem, a análise cromatográfica e as medidas biomecânicas foram consideradas covariáveis no modelo (variável que não foi controlada no modelo como parte do desenho, mas que foi medida e incluída para reduzir a variabilidade do erro, uma vez que exerceu influência considerável na variável resposta, principalmente a avaliação na pele do homem). Para essas covariáveis recomenda-se a análise de correlação para avaliar se existe uma tendência de linearidade entre as covariáveis ou fatores em relação à variável resposta Análise Sensorial.

A **Figura 4** indicou a correlação da avaliação da mulher na pele do homem e a análise sensorial.

Figura 4. Correlação da avaliação da sensorial da mulher na pele do homem e a sua auto-avaliação.

Correlação: 0,888 p-Valor < 0,001

Observou-se que houve uma forte correlação positiva entre a análise sensorial ou a intensidade de perfume percebida e a avaliação sensorial de intensidade de perfume percebida da mulher na pele do homem, ou seja quanto maior a intensidade de perfume percebida na pele da mulher, maior a intensidade de perfume percebida na pele do homem, considerando-se forte correlação quando o valor da correlação é superior a 0,7 (ANDERSON, 1958). Demonstrou-se que a avaliação sensorial na pele do homem influenciou na resposta da intensidade de perfume percebida pela Mulher, o que corroborou com estudos realizados previamente por PEREIRA, 2009.

Na **Figura 5** é apresentada a correlação entre o fator cromatografia e a análise sensorial

Figura 5. Correlação da avaliação da sensorial da mulher e análise cromatográfica.

Observou-se que não ocorreu correlação entre a análise sensorial e os dados cromatográficos, com o coeficiente de correlação menor que 0,7 e valor de p não significativo ($p > 0,05$). A dispersão dos dados comprovou que não existiu uma linearidade no comportamento dos dados, provavelmente teria que avaliar por matéria-prima individualmente para identificar alguma linearidade de resposta, pois a

dispersão dos dados foi baixa dos dados, avaliando-se apenas com a média total da abundância m/z da composição aromática em função do ciclo menstrual.

A **Figura 6** indica a correlação entre o fator corneometria e a análise sensorial.

Figura 6. Correlação da avaliação da sensorial da mulher e a propriedade biomecânica corneometria.

Correlação: -0,011 p-Valor = 0,866

Observou-se que não houve correlação entre a análise sensorial e a corneometria. Da mesma forma, como foi demonstrado para fator cromatografia, a corneometria não influenciou na intensidade de perfume percebida pela mulher, ou seja, na variável resposta sensorial. O coeficiente de correlação foi abaixo de 0,7 e o valor de p maior que 0,05, que está em concordância com o modelo linear generalizado obtido na Tabela 2, em que a corneometria não apresentou diferença significativa.

A **Figura 7** apresenta a correlação entre a TEWL e a análise sensorial.

Figura 7. Correlação da avaliação da sensorial da mulher e a propriedade biomecânica TEWL.

Correlação: 0,077 p-Valor = 0,241

Observou-se que não houve correlação entre a análise sensorial e o fator TEWL (Perda de água Transepidermal), ou seja, este parâmetro não influenciou na intensidade de perfume percebida pela mulher (variável resposta: sensorial), ao contrário do que foi demonstrado em HARVELL *et al.*(1991) porém em concordância com o modelo demonstrado na Tabela 2, em que o fator TEWL não apresentou diferença significativa ao modelo.

A **Figura 8** indicou correlação entre o fator sebumetria e a análise sensorial.

Figura 8. Correlação da avaliação da sensorial da mulher e a propriedade biomecânica sebumetria.

Correlação: 0,025 p-Valor = 0,701

Observou-se que, apesar do modelo linear generalizado identificar uma correlação entre a análise sensorial e o Fator Sebumetria, essa correlação foi fraca e não foi considerada significativa quando avaliada de forma isolada. Isto é justificado provavelmente pelos valores muito pequenos observados para este fator, que provavelmente dificultaram na comprovação de algum comportamento linear dos dados e pela dispersão elevada de resposta. Os fatores intrínsecos ao indivíduo, metabolismo e nutrição contribuíram para esta variabilidade (BERARDESCA *et al.*, 1995; CHILCOTT *et al.*, 2000). No que se observou isoladamente, notou-se que o valor não foi concordante ao que foi demonstrado pela Tabela 2, em que este fator apresentou diferença significativa no modelo, apresentando influência na resposta da avaliação sensorial, como os valores foram muito baixos e a presença de outliers foi elevada, como já demonstrado anteriormente, recomenda-se não considerar a significância, que está em concordância ao que foi demonstrado por PEREIRA (2009). Em relação ao que foi observado no modelo recomenda-se analisar posteriormente os perfis observados em cada mulher para tirar melhores conclusões.

A partir dos resultados obtidos desses fatores, as medidas biomecânicas coletadas no antebraço (**Sebumetria, Corneometria e TEWL**) não apresentaram influência na resposta da intensidade de perfume percebida na pele da mulher (variável resposta: sensorial), o que confirmou os registros demonstrados por PEREIRA (2009), mesmo nesta pesquisa tendo um número de voluntárias mais representativo.

A **Tabela 5** permitiu avaliar se os efeitos de cada fator e das covariáveis são significativos na análise sensorial de acordo com o modelo linear generalizado utilizando como covariáveis as medidas biomecânicas interescapular para t_0 .

Tabela 5. Efeitos de cada fator significativo ao modelo de análise sensorial usando as medidas biomecânicas interescapular para t_0 .

FATOR	GRAUS DE LIBERDADE	ESTATÍSTICA F	VALOR_p	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	2,43	0,093	Não rejeita a hipótese.
Mulher	9	5,95	<0,001	Rejeita a hipótese.
Cromatografia	1	0,21	0,652	Não rejeita a hipótese.
Corneometria Interescapular	1	12,53	0,002	Rejeita a hipótese.
TEWL Interescapular	1	2,51	0,128	Não rejeita a hipótese.
Sebumetria Interescapular	21	4,67	0,713	Não rejeita a hipótese.
R ² -Ajustado = 58,03%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_p $\leq$ 0,05, existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de significância: 5%

** Hipótese: não houve diferenças entre as médias do fator avaliado

Observou-se que houve diferenças significativas entre as médias das mulheres. Além disso, existiu influência do fator de medida biomecânica da corneometria interescapular na análise sensorial. As respostas obtidas comprovaram o objetivo do estudo que existia uma influência da corneometria interescapular na intensidade de perfume percebida, conforme sugerido por MACDONALD AND CLARKE (1970). Quanto maior o índice de corneometria interescapular, maior foi a intensidade de perfume percebida.

Como não se observou influência dos dados cromatográficos na avaliação sensorial, ou melhor, na intensidade de perfume percebida na pele da mulher, foi realizada a inversão do modelo, onde os dados cromatográficos (usou-se a média ponderada dos componentes aromáticos coletados em função do ciclo menstrual) considerados variável *resposta* e a intensidade de perfume percebida (avaliação sensorial) foi a variável *independente* com o intuito de verificar se a avaliação

sensorial influenciou no desempenho dos componentes aromáticos, denota utilizar este dados como um item elucidativo na discussão.

Outro ponto a ser considerado com a inversão do modelo permitiu analisar a média ponderada dos componentes aromáticos em função do ciclo menstrual para avaliar se existiu influência deste no desempenho dos componentes voláteis.

Na **Tabela 6** foi avaliado se os efeitos de cada fator na variável resposta cromatografia foram significativos de acordo com o modelo linear generalizado.

Tabela 6. Efeitos de cada fator significativo ao modelo de cromatografia usando em função da análise sensorial.

FATOR	GRAUS DE LIBERDADE	ESTATÍSTICA F	VALOR_P	CONCLUSÃO *
Fase do Ciclo	3	4,77	0,003	Rejeita a hipótese.**
Mulher	28	15,12	<0,001	Rejeita a hipótese.
Tempo	4	2,13	0,076	Não rejeita a hipótese.
R ² -Ajustado = 43,71%				

Rejeita-se a hipótese quando o valor_p ≤ 0,05 existe diferença significativa entre os fatores

* Nível de significância: 5%

** Hipótese: não houve diferenças entre as médias do fator avaliado

Apesar do R² obtido ter valor baixo, ou seja, ele não traduz a confiabilidade na explicação do modelo para os efeitos, foi observado que houve diferenças significativas entre as médias das mulheres o que explicou que o fator intrínseco do indivíduo impactou na resposta, como explicado anteriormente. Além disso, existiu diferença entre as médias da cromatografia para o fator fase do ciclo, ou seja, a oscilação dos hormônios sexuais no ciclo menstrual influenciou no comportamento dos componentes voláteis da composição aromática.

Na **Tabela 7** é apresentado o resultado do teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) para a comparação da cromatografia em cada fase do ciclo para identificar em qual ou quais fases encontram-se as diferenças significativas.

Tabela 7. Teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) para avaliar diferenças entre as fases para os dados cromatográficos.

FASE	MÉDIA	AGRUPAMENTO*
Folicular	133527421	A
Lútea	124229439	A B
Menstrual	88752220	B
Ovulatória	87206129	B

* A diferença entre as médias das fases do ciclo será considerada significativa se as fases forem classificadas em agrupamentos diferentes

Na **Tabela 7**, observou-se que as médias da variável cromatografia na fase folicular é maior que nas fases Menstrual e Ovulatória. Observou-se, também, que não existiu diferença significativa entre as fases lútea e folicular (possuem o mesmo agrupamento da letra A), que demonstrou existir uma correlação positiva com a avaliação sensorial, demonstrada por PEREIRA (2009), em que a mulher percebeu maior intensidade de perfume na fase Lútea do que nas demais fases, apesar de que quando se avaliou em relação à avaliação sensorial não existia correlação. Quando se observa esta variável de forma isolada, conseguiu-se obter um padrão de resposta em função das fases do ciclo, que é mais coerente ao observado anteriormente. Provavelmente, a dispersão dos dados cromatográficos foi baixa quando se avaliou em relação ao sensorial que não conseguiu identificar essas diferenças. Na **Tabela 7**, as médias maiores dos dados cromatográficos foram encontradas nas fases lútea e folicular e são concordantes com que foi observado na **Figura 3**, em relação a avaliação sensorial da intensidade de perfume, em que se notou que no tempo inicial a sensibilidade masculina ao perfume foi maior que a feminina para todas as fases do ciclo menstrual. Nos demais tempos experimentais, a sensibilidade feminina foi levemente superior. Além disso, observou-se que na fase folicular a diferença entre a sensibilidade feminina e a masculina nas avaliações realizadas após a avaliação inicial (1,5; 3; 4,5 e 6h) se acentuaram.

Novamente, observou-se que o fator “Mulher” influenciou em praticamente todos os modelos gerados, ou seja, o fator individual, como demonstrado por PEREIRA (2009) influenciou consideravelmente nos valores encontrados, aumentando a variabilidade dos dados e dificultando em encontrar um padrão de resposta que pudesse dar inferência para a população. A subjetividade da avaliação sensorial foi afetada, principalmente, pelos aspectos psicológicos, nutricionais e do próprio metabolismo, pois produtos de degradação dos alimentos são excretados

pelo suor, com citado por LABOWS *et al.* (1999) o que prejudicou na avaliação sensorial, na coleta dos componentes aromáticos da composição aromática e por propriedades biomecânicas, o que já já comprovado por BERARDESCA *et al.*(1995).

Por meio deste estudo, comprovou-se que realmente existem diferenças de percepções em relação à intensidade de perfume entre os sexos, o que enfatiza o efeito dos hormônios sexuais na percepção olfativa das mulheres no ciclo menstrual, conforme citado por NAVARRETE-PALACIOS *et al.*(2003b). Além de influenciar no comportamento do perfume, conforme o modelo gerado dos dados cromatográficos em função da avaliação sensorial, demonstrou-se os efeitos dos hormônios sexuais na pele de forma sutil, fato que infelizmente por meio das propriedades biomecânicas da pele não foram conclusivos.

Como um estudo mais detalhado, sugere-se avaliar os dados cromatográficos da pele do homem, para verificar se existe um padrão de resposta para os componentes aromáticos onde em teoria não existe uma interferência dos hormônios sexuais no substrato pele, além de uma avaliação com um número de voluntários masculinos maior para que possa fazer uma avaliação comparativa mais robusta e ter um entendimento maior se realmente os efeitos fisiológicos da pele interferem no comportamento da composição aromática de forma significativa ou se o olfato é mais pronunciado e é o fator determinante para qualquer diferença encontrada.

Os dados cromatográficos avaliados isoladamente surpreenderam positivamente, sendo possível encontrar diferenças e correlacionar com o ciclo menstrual, porém novamente o número maior de voluntários de homens e mulheres possibilitará ter maior robustez, outro ponto que pode ser considerado que possibilitaria uma maior dispersão dos dados cromatográficos seria o uso de outra técnica que seja mais sensível para coleta de headspace como o SPME (microextração em fase sólida), conforme citado em RANDOLPH & CANHOTO (1999).

7) CONCLUSÕES

- Observou-se que houve diferenças entre a avaliação sensorial de cada mulher ($p < 0,001$), fator intrínseco do indivíduo que interferiu de modo a traçar um modelo padrão de resposta em praticamente todas as correlações.
- Notou-se que aconteceram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a avaliação sensorial de cada tempo experimental (inicial, 1,5; 3; 4,5 e 6h), sendo detectada uma redução da intensidade de perfume percebida com o passar do tempo.
- Notou-se que ocorreram diferenças entre a avaliação sensorial ($p = 0,027$) e o índice de Sebumetria no antebraço ($p = 0,031$) por fase do ciclo, porém a foi somente detectada no modelo linear generalizado considerando todas as variáveis, demonstrou pouca dispersão dos dados para ser detectado
- Verificou-se que o índice de Corneometria na região Interescapular em t_0 (inicial) ($p = 0,002$), influenciou nos resultados da avaliação sensorial, pois quanto maior o índice de Corneometria, mais elevada foi a intensidade de perfume percebida.
- As mulheres perceberam indicativamente maior intensidade de perfume que os homens quando estavam na fase folicular (exceto para o tempo inicial/ t_0). Observou-se que quanto maior a intensidade de perfume, maior a percepção da mulher na pele do homem. Na auto-avaliação das seis últimas mulheres em estudo e a média da análise que os três homens realizaram nessas mulheres, eles perceberam indicativamente maior intensidade de perfume que elas no tempo inicial/ t_0 .
- Houve uma forte correlação positiva entre a análise sensorial ou a intensidade de perfume percebida e a avaliação sensorial de intensidade de

perfume percebida da mulher na pele do homem ($p < 0,001$), ou seja, quanto maior a intensidade de perfume percebida na pele da mulher, maior a intensidade de perfume percebida na pele do homem.

- Não foi observado nenhuma correlação ($p > 0,05$) entre a análise sensorial entre os dados cromatográficos e Corneometria, Sebumetria e TEWL, quando se avaliou o modelo da avaliação sensorial como variável resposta e as propriedades biomecânicas e os dados cromatográficos como covariáveis.
- Quando se considerou os dados cromatográficos como variável resposta em função do ciclo menstrual e da avaliação sensorial, a média dos dados cromatográficos na fase Folicular foi maior que nas fases Menstrual e Ovulatória ($p = 0,003$), em concordância com PEREIRA (2009), em que a mulher percebeu uma intensidade de perfume maior na fase Lútea do que nas outras fases.
- As percepções entre homem e mulher por meio deste estudo comprovaram que realmente existem diferenças de percepções em relação à intensidade de perfume entre os sexos. Levanta-se a hipótese de uma avaliação detalhada dos componentes voláteis na pele do homem, a fim de identificar um padrão de resposta destes sem a interferência dos hormônios sexuais na pele, com um número maior de voluntários masculinos e femininos a fim de se obter uma robustez nos resultados, com a possibilidade de inferir alguma resposta para a população e identificar se as alterações fisiológicas devido aos hormônios sexuais podem afetar significativamente o comportamento de uma composição aromática na pele ou o olfato é mais pronunciado e é o fator determinante para qualquer diferença encontrada.

• Os dados cromatográficos avaliados isoladamente surpreenderam positivamente onde foi possível encontrar diferenças e correlacionar com o ciclo menstrual, porém novamente o número maior de voluntários de homens e mulheres possibilitará ter maior robustez, outro ponto que possa ser considerado que possibilite ter uma maior dispersão dos dados cromatográficos seria o uso de outra técnica que seja mais sensível para coleta de headspace como o SPME (microextração em fase sólida).

• O intuito de correlacionar ao dados cromatográficos com sensorial foi entregar maior confiabilidade aos dados sensoriais que devido as intercorrências do estudo dificultou um controle maior desta variável experimental, medindo os poderes discriminativos e de repetibilidade de cada uma das voluntárias.

• Os hábitos alimentares padronizados para o dia da análise, poderiam minimizar os interferentes do suor que dificultaram na leitura dos componentes voláteis.

• Em vista dos resultados obtidos da performance do perfume na pele, possibilita pensar em produtos que possam controlar a oleosidade e a hidratação, que indiretamente poderia melhorar o comportamento do perfume aplicado na pele.

REFERÊNCIAS

- AUGUSTO, F.; LEITE, A. Sampling and Sample Preparation for Analysis of Aroma and Fragrances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n.3, p. 162-169, 2003.
- ANDERSON, T. W. **An introduction to multivariate statistical analysis**. New York: J.Wiley & Sons, 1958. 375p.
- ALMEIDA, T. C. A., FOLLEGATTI, M. I. S., FREIRE, M. T. A., MADEIRA, M. S., SILVA, F. T., SILVA, M. A. A. P. Determinação de perfil sensorial e parâmetros de qualidade de figos em calda produzidos pela indústria brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.234-240, 1999.
- BASTOS, D.H.M.; DA SILVA, M.A.A.P.; FRANCO, M.R.B. Optimization of the isolation procedure of honey volatile compounds for further gas chromatography analysis. **Alimentos e Nutrição**, v. 9, p. 77-88, 1998.
- BAYDAR, A., MCGEE, T., PURZYCKI, K. L., Skin Odor Value Technology for Fragrance Performance Optimization. **Perfumer Flavorist**, v.20, p.45-53, 1995.
- BERARDESCA, E.; ELSNER, P.; WILHELM, K.P.; MAIBACH, H.I., eds. **Bioengineering of the skin: methods and instrumentation**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 141p. (CRC series in dermatology).
- CIVILLE, G. V.; DUS, C. How sensory evaluation can provide development direction : an approach. **Cosmetic & Toiletries**, v.120, n.4, p.49-56, 2005.
- COHEN, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2ª ed. Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum, 1988.
- PEREIRA, C. S. C. **Estudo da substantividade de uma composição aromática na pele em função do ciclo menstrual**. São Paulo. 2009, 150p. [Dissertação de Mestrado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- PEREIRA, C. S. C., BABY, A. R., KANEKO, T. M; VELASCO, M. V. R. Sensory Approach to Measure Fragrance Intensity on the Skin. **Journal of Sensory Studies**, n.24, p.871–901, 2009.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- PEREIRA, C. S. C.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Review Article: Fragrance technology for the dermatologist – a review and practical application. **Journal of Cosmetic Dermatology**, n.9, p.230–241, 2010.
- CHILCOTT, R. P.; BROWN, R.R.; RICE, P. Non-Invasive Quantification of Skin Injury Resulting form Exposure to Sulphur Mustard and Lewisite Vapours. **Burns**, v. 26, n. 3, p. 245-250, 2000.
- DRAKE, M. A. Invited review: sensory analysis of dairy foods. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 4925-4937, 2007.
- ESBENSEN K. Multivariate Data Analysis - In Practice. ISBN 82-993330-3-2, CAMO Process AS, Oslo, 5th Edition; [5] Geladi P, Kowalski BR (1986): Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytical Chemistry Acta**, v.185, p.1-17, 2002.
- FRANCO, M.R.B.; JANZANTTI, N.S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M. R.B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 28p.
- GUERRA, E. C. **Proposta e análise de uma metodologia para avaliação do desempenho técnico de perfumes**. Campinas, 2002. 81p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Mecânica] - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- HARVELL, J. HUSSONA-SABED I, MAIBACH, H. I. Changes in transepidermal water loss and cutaneous blood flow during the menstrual cycle. **Contact Dermatitis**. v.27, p.294-301, 1992.
- HUDEWENZ, V., Who nose best? When judging a cosmetic product's fragrance, it's difficult to find tools or analytical methods that can replace the human nose. But electronic sensor system can help. **Global Cosmetic Industry**, v.170, n.1 p.34-36, 2002.
- HUMMEL, T., GOLLISCH, R., WILDT, G. & KOBAL, G., Changes in olfactory perception during the menstrual cycle. **Experientia**, v.47, p. 712-715, 1991.
- IDALINA, M. N.; NAKANO, A.; BABY, A. R.; VELASCOS, M. V. R. Análise Sensorial: ferramenta para avaliar eficácia e benefício. **Cosmetic Toiletries**, v.17, n.4 p.52-55, 2005.
- LABOWS, J.N.; REILLY, J. T.; LEYDEN, J. J.; PRETI, G. Axillary Odor Determination, Formation and Control. In:Laden, K., editors. **Antiperspirants and Deodorants**. New York: Marcel Dekker, Inc;1999, 70p.

- LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. New York: Springer, 1999. 848p.
- MACDONALD, I.; CLARKE G. Variations in the levels of cholesterol and triglyceride in the skin surface fat during the menstrual cycle. **British Journal of Dermatology**, v.83, n.4, p.473-476, 1970.
- MCPHERSON, R.S.; RANDALL, E. Line length measurement as a tool for food preference research. **Ecology of Food and Nutrition**, v.17, n.2, p.149-156, 1985.
- MEDCIN INSTITUTO DA PELE. **Protocolo de estudo: estudo da substantividade de perfume na pele em função do ciclo menstrual**. Osasco, 2007, v.4, n.54-07 [Documento interno].
- MEEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3. ed. CRC Press: Boca Raton, 1999, 387p.
- MURRAY, J.M.; DELAHUNTY, C.M.; BAXTER, I.A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, v. 34, p. 461-471, 2001.
- NAVARRETE-PALACIOS, E.; HUDSON, R.; REYES-GUERRERO, M. S.; GUEVARA-GUZMA'N, R. Correlation between cytology of the nasal epithelium and the menstrual cycle. **Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 129, n.4, p.460-463, 2003a.
- NAVARRETE-PALACIOS, E.; HUDSON, R.; REYES-GUERRERO, M. S.; GUEVARA-GUZMA'N, R. Lower olfactory threshold during the ovulatory phase of the menstrual cycle. **Biological Psychology**, v. 63, n.3, p.269-279, 2003b.
- NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. M. (1972). Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society, A**, v.135, p.370–384.
- O'MAHONY, M. Some assumptions and difficulties with common statistics for sensory analysis. **Food Technology**, v.36, n.11, p.75-82, 1982.
- OLIVEIRA, A.P.V.; BENASSI, M.T. Perfil livre: uma opção para análise sensorial descritiva. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 37, p. 66-72, 2003.
- PAVÓN, J. L. P., PENA A. G., PINTO, C. G., CORDERO B. M. Differentiation of types of crude oils in polluted soil samples by *headspace*-fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.1137, p.101–109, 2006.

- PEDRÃO, M. R., BELEIA, A., MODESTA, R. C. D., PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Estabilidade físico-química e sensorial do suco de limão tahiti natural e adoçado, congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.282-286, 1999.
- QUEIROZ, M.I.; TREPTOW, R.O. **Análise sensorial para a avaliação da qualidade dos alimentos**. Rio Grande:Editora da FURG, 2006. 268 p.
- RAU, AH., Multi-Sensory technologies for today's effervescent bath and shower products. **Cosmetic Toiletries**, v. 116, n.10, p. 49-56, 2001.
- RANDOLPH, G.; CANHOTO, A. Analysis of Volatile Fragrance and Flavour compounds by headspace Solid MicroExtraction and GC_MS. *Journal of Chemical Education*, v. 2, p. 240-245, 1999.
- SANTOS, M. I. N.; NAKANO, A.; BABY, A. R.; VELASCOS, M. V. R. Análise sensorial: ferramenta para avaliar eficácia e benefício. **Cosmetic & Toiletries (português)**, v.17, n.4, p.52-55., 2005.
- SEDLMEIER, P.; GIGERENZER, G. Do studies of statistical power have an effect on the power of studies? **Psychological Bulletin**. v.105, n. 2, p. 309-316, 1989.
- SIMÕES, D. R. S; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Aromas em maçãs, suco e sidra: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos** (Impresso), v. 27, p. 151-157, 2009.
- SHAH, A., SATHYANARAYANA, K. H., RUEDI, B., MAGRINI, G. Determination of fertility interval with ovulation time estimation using differential skin surface temperature (DST) measurement. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.41, n.5, p.771-774, 1984.
- STONE, H. & SIDEL, J. L. *Sensory Evaluation Practices*. Orlando, Academic Press, 1992.
- TURKMAN, M.A.A.; SILVA, G.L. Modelos Lineares Generalizados, da teoria à prática. **VIII Congresso Anual da Sociedade Portuguesa de Estatística**, Lisboa, 2000.
- VILLANUEVA, N.D.M.; PETENATE, A.; SILVA, M.A.A.P. Performance of three affective methods and diagnosis of the ANOVA model. **Food Quality and Preference**, v.11, n.5, p.363-370, 2000.
- VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; GOZZO, F.C.; DÖRR, F.A.; MURGU, M.; LEBRE, D.T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V.; RIVEROS, J.M. Nomenclaturas de

Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa. **Revista Química Nova**, v.34, n.10, p.1875-1887, 2011.

WINER, B.J.; BROWN, D.R.; MICHELS, K.M. **Statistical principles in experimental design**. 3.ed. New York: McGraw–Hill, 1991. 1057p.

WOLD, S., ESBENSEN, K., GELADI, P. "Principal Component Analysis". **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.51, n.2, p. 37-52, 1987.

ANEXO 1: Protocolo de teste**Protocolo – 054-07 v.4****Versão 01 Dez/07 – Emenda 1 – 03/12/07****PROTOCOLO DE TESTE – 054-07 V.4****RESUMO DO ESTUDO**

Estudo monocêntrico, em que será avaliada a influência do ciclo menstrual da mulher na substantividade do perfume na pele. Serão realizadas avaliações instrumentais da hidratação, quantidade de sebu e perda de água transepidermal da área de aplicação do produto durante as 4 fases do ciclo menstrual. Serão realizadas também coletas dos componentes voláteis do perfume para análise cromatográfica. Em cada visita as voluntárias responderão questionário de auto-avaliação olfativa tendo como comparativo um voluntário do sexo masculino, controle de pele.

OBJETIVOS

Avaliar a interferência do ciclo menstrual na substantividade do perfume através de análise cromatográfica e questionário sensorial.

DURAÇÃO DO ENSAIO

Duração 90 dias até o término do número mínimo de voluntárias para completar o estudo

AMOSTRA AVALIADA

Fragrância CICLO 1910.

ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi realizada de acordo com a legislação brasileira, baseada na Resolução Normativa 196/96, "CNS/MS", normas da International Conference Harmonization (ICH), Good Clinical Practice (GCP) e a Declaração de Helsinque, após a obtenção da

aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Para cada voluntária que participou desta pesquisa no grupo de estudo e para o voluntário controle, foram dadas as informações e esclarecimentos necessários, fornecendo o seu consentimento, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme o **Anexo 4** e **Anexo 5**, respectivamente.

A pesquisa manteve o anonimato do voluntário, e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer tempo. Todos foram esclarecidos dos possíveis riscos mais frequentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa / alérgica.

Outros documentos necessários para o prosseguimento da pesquisa estão descritos como:

Anexo 2: Carta de aprovação do CEP do Instituto Medcin

Anexo 3: Carta de aprovação do CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do grupo de estudo

Anexo 5: TCLE do grupo controle

SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

I. AMOSTRAGEM POPULACIONAL

Serão necessários 30 (trinta) indivíduos voluntários, do sexo feminino, com idade entre 18 e 40 anos para realização do estudo. Será selecionado, também, um indivíduo voluntário do sexo masculino.

O valor amostral exato envolveu 29 voluntárias, acima do obtido por meio das variâncias ocorridas em estudos preliminares com a escala (LMS) escolhida para o teste e o mínimo de diferença entre dois pontos da escala, para que ocorresse diferença significativa no nível de 95% de intervalo de confiança. Entretanto, considerando a perda de voluntários ou intercorrências durante o estudo, para obter uma margem de segurança para as análises, foram recrutados do sexo feminino, inicialmente, aproximadamente, 40 voluntários e selecionados 30 a 35 voluntários para o estudo, aqueles com melhor desempenho para uso da escala.

Como se tratou de um estudo exploratório, não foi representativo da população. Caso fosse utilizada outra escala e se quisesse detectar outras diferenças, o valor amostral poderia ser alterado.

Os indivíduos participantes terão as quatro primeiras letras do primeiro nome e a primeira letra do último sobrenome, um número de identificação individual, (gerado por

sistema eletrônico) e um número protocolar anotados na *Ficha Clínica do Voluntário*, conforme anexo A.

II. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Voluntários do sexo feminino com idade entre 18 a 40 anos;
- Não utilização de anticoncepcionais no mínimo 6 meses antes do início do estudo;
- Ciclo menstrual normal de 28-30 dias;
- Pele da região do antebraço íntegra;
- Concordância em obedecer aos procedimentos do ensaio e comparecer à clínica nos dias e horários determinados para as avaliações;
- Os voluntários deverão ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Estudo Clínico (ver Anexo B), após a natureza do mesmo ter sido completamente esclarecida.

III. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Mulheres em período de gestação ou amamentando;
- Indivíduos com patologias cutâneas ativas que possam interferir nos resultados do estudo;
- Indivíduos sob tratamento estético até três semanas antes da seleção;
- Indivíduos sob tratamento dermatológico até três meses antes da seleção;
- Patologias hormonais;
- Antecedentes atópicos ou alérgicos;
- História de sensibilização a produtos tópicos;
- Outras condições consideradas pelo pesquisador como razoáveis para a desqualificação do indivíduo da participação do estudo.

Critérios específicos de inclusão

Os critérios específicos de inclusão, definidos no protocolo, foram os seguintes:

- Idade: de 18 a 40 anos;
- sexo feminino; masculino
- usuários ocasionais ou regulares de produtos cosméticos;
- mulheres com período de ciclo menstrual de 28 a 30 dias

Critérios específicos de não-inclusão

Os critérios específicos de não-inclusão, definidos no protocolo, foram os seguintes:

- Uso de medicamentos contraceptivos orais ou de reposição hormonal menos de 6 meses e durante os testes

- marcas cutâneas na área experimental que pudessem interferir nas avaliações das reações cutâneas (problemas de pigmentação, cicatrizes, pilosidade super desenvolvida, efélides, tatuagem e nevus em grande quantidade e queimadura solar dentre outras);
 - alergia ou reatividade à categoria de produtos testada;
 - tratamento hormonal (anticoncepcionais orais ou reposição hormonal);
 - previsão de alteração dos métodos contraceptivos orais durante o período do estudo;
 - dismenorréia *;
 - amenorréia;
 - obesidade, com IMC considerado >30 que tenham comprovado clinicamente irregularidade no ciclo menstrual
 - anorexia, com IMC considerado < 18 que tenham comprovado clinicamente irregularidade no ciclo menstrual
 - mulheres em período de gestação ou amamentando;
- * Cólica menstrual relatada pelo voluntário ou suspeita médica, sem comprovação laboratorial.

MATERIAIS E SUPRIMENTOS

I. AMOSTRA DE TESTE

A empresa *Givaudan do Brasil Ltda.* fornecerá ao pesquisador as amostras a ser avaliada, em recipientes identificados.

Fórmula: *Anexo ao Protocolo*

II. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Os recipientes contendo as amostras a serem avaliadas e entregues pelo pesquisador serão etiquetados conforme demonstrado a seguir:

CÓDIGO DO PRODUTO:

LOTE/ VALIDADE:

DATA DE FABRICAÇÃO:

MEDCIN INSTITUTO DA PELE

TELEFONE: (011) 3654.3849

III. EQUIPAMENTO PERMANENTE

Termômetro

A temperatura basal das voluntárias será verificada para determinação do pico ovulatório.

- Na primeira metade do ciclo, a temperatura do corpo é habitualmente inferior a 37 °C. Aproximadamente 2 dias depois da ovulação, a temperatura sobe cerca de 0,2 °C a 0,4 °C e mantém-se elevada durante a segunda metade do ciclo. Só volta ao seu nível inicial inferior a 37 °C quando ocorre a menstruação.

Corneometer MPA 580 (Courage&Khazaka)

- A medida da capacidade elétrica cutânea (corneometria) é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação da hidratação das camadas superiores da epiderme e para a quantificação do efeito hidratante de produtos cosméticos ou dermatológicos. O equipamento Corneometer MPA 580 (Courage&Khazaka) é capaz de medir a capacitância cutânea através de uma sonda de medição aplicada à pele com pressão de 3,5 N. As medidas são fornecidas em valores arbitrários de 0 à 120 unidades corneométricas.
-

Tewameter®TM 300 (Courage&Khazaka)

- O equipamento Tewameter®TM 300 (Courage&Khazaka) mede o coeficiente de difusão da água evaporada através de dois pares de sensores de umidade presentes numa probe cilíndrica, analisado através de um microprocessador. Os dois sensores são capazes de detectar diferenças de pressão de vapor que está diretamente relacionada com a taxa de evaporação da água no sítio avaliado. Os valores são expressos em g/m²/h.

Sebumeter SM 810 (Courage&Khazaka)

- A medida de sebumetria é fornecida por um microprocessador que calcula a quantidade de sebo presente na fita sintética do cassette. Os valores são apresentados em µg sebo/cm² de pele.

IV. SUPRIMENTOS

- Molde 10 cm²;
- Tubo de vidro;

METODOLOGIA

I. MEDIDAS A SEREM TOMADAS ANTES DO ESTUDO

Antes de serem recrutados para o estudo, os indivíduos serão pré-selecionados pelo pesquisador através dos critérios indicados na *SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS*. Somente indivíduos que estiverem aptos, segundo os critérios da seleção citada, que tiverem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) e que tenham histórico médico de posse do pesquisador poderão participar deste estudo.

I. AVALIAÇÃO INICIAL

Os voluntários deverão passar por uma avaliação dermatológica inicial para checagem dos critérios de inclusão e exclusão, mencionados anteriormente.

III. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

TREINAMENTO

- VISITA 0 – Treinamento de Avaliação Olfativa – Escala Sensorial
-
- As voluntárias participarão de um treinamento de Escala LMS (*Anexo C*) para preenchimento da avaliação olfativa. Este treinamento será realizado na MEDCIN, porém feito por uma pessoa enviada pela empresa patrocinadora.
-
- Após o treinamento, as voluntárias serão orientadas a comparecer a MEDCIN em 4 visitas em diferentes períodos do ciclo menstrual:
-
- Fase 1: 1º ao 7º dia do – fase menstrual;
- Fase 2: 7º ao 10º dia – fase folicular;
- Fase 3: 10º ao 16º dia – fase ovulatória;
- Fase 4: 16º ao 28º dia – fase lútea.
-
- Cada visita pode ser correspondente a fases do ciclo menstrual diferente.
-
- A fase do ciclo menstrual será determinada através da verificação da data das duas últimas menstruações.

TEMPERATURA BASAL

Em cada visita do estudo será verificada a temperatura basal das voluntárias, para determinação do início do pico ovulatório caracterizado pelo aumento da temperatura em aproximadamente 0,5° C.

Na verificação da temperatura será utilizado um termômetro de mercúrio, as temperaturas observadas em todas as visitas serão anotadas na *FICHA CLÍNICA*.

COLETA DE MUCO CERVICAL

Na 3ª semana de estudo que corresponderá à 3ª fase do ciclo, será realizada coleta do muco cervical das voluntárias. O material será analisado por microscopia para identificação do pico ovulatório. A formação de cristais no muco caracteriza a ovulação.

ÁREA EXPERIMENTAL

- A região para avaliação selecionada é o antebraço próximo o punho. Serão demarcadas áreas de 10 cm² em cada antebraço onde serão aplicados 40 microlitros de perfume.

- O produto também será aplicado no voluntário selecionado para controle das voluntárias na avaliação sensorial.

-

- *COLETA DOS COMPONENTES VOLÁTEIS (HEADSPACE)*

- Após a aplicação serão realizadas coletas em duplicata (uma em cada antebraço) dos componentes voláteis através de um tubo de vidro colocado próximo ao punho.

- Em cada visita as coletas serão realizadas com intervalos de 90 (noventa) minutos até que totalize 6 (seis) horas de avaliação.

- A análise cromatográfica será de total responsabilidade da empresa patrocinadora do estudo, Givaudan do Brasil Ltda.

-

- *AVALIAÇÃO SENSORIAL*

- Após cada coleta de headspace, as voluntárias realizarão a auto-avaliação olfativa tendo como comparativo um voluntário do sexo oposto.

- O mesmo produto aplicado nas voluntárias, também será aplicado no voluntário selecionado com controle de pele. Portanto, este deverá estar presente durante todo o período de avaliação em todas as visitas.

- O preenchido do questionário sensorial será realizado em intervalos de 90 (noventa) minutos, até que se totalize 6 (seis) horas de avaliação.

-

MEDIDAS INSTRUMENTAIS BIOMECÂNICAS

Serão realizadas avaliações instrumentais no antebraço das voluntárias, próximo ao punho. Os equipamentos utilizados nestas avaliações são capazes de avaliar a hidratação (corneometria), a oleosidade (sebumetria) e a perda de água transepidermal (TEWL) da pele.

As avaliações serão realizadas em 2 tempos experimentais diferentes de cada visita feita pelas voluntárias ao Instituto. A primeira avaliação deverá ser feita antes da aplicação do perfume (T0) e a segunda, 6 horas (T6h) após aplicação do perfume.

Todas as medidas instrumentais serão realizadas em triplicata e serão anotadas na *BROCHURA DE INVESTIGAÇÃO*.

CONDIÇÕES AMBIENTAIS

O período de permanência de cada visita é de aproximadamente 8 horas. As voluntárias permanecerão durante este período em sala aclimatizada com as seguintes condições:

Temperatura: $T = 20 \pm 2^{\circ}\text{C}$;

Umidade Relativa: $UR = 50 \pm 5\%$.

IV. ORIENTAÇÕES PARA O VOLUNTÁRIO EM PERÍODO DE ESTUDO

- As voluntárias serão orientadas a não utilizar cremes, loções corporais, óleos de banho, colônias e perfumes nas áreas próximas nos dias agendados para visitas.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Serão apresentadas análises estatísticas das avaliações instrumentais realizadas durante o estudo, comparando as características da pele observadas antes e após a aplicação do produto.

OCORRÊNCIA DE REAÇÕES ADVERSAS

Todas as reações adversas, independentemente da relação denexo com o uso da amostra, deverão ser anotadas no formulário de reações adversas, segundo anexo D (avaliação de intensidade da reação) e comunicadas em 48 horas ao patrocinador.

Em caso de qualquer intercorrência, independentemente do período do estudo, ou da natureza relacionada ou não ao estudo, os voluntários terão acesso gratuito a medicações e atendimento médico durante o período de estudo ou após o encerramento do mesmo.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este protocolo de estudo de acordo com as normas de Boas Práticas Clínicas (GCP), as normas internacionais de pesquisa para seres humanos (Declaração de Helsinque) e a última versão da resolução nº. 196 de 10 de Outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

USO DE INFORMAÇÃO E PUBLICAÇÃO

Qualquer utilização das informações e dados obtidos dos estudos somente poderão ser utilizadas após previa anuência mútua, tanto do patrocinador como da instituição de pesquisa, com autorização por escrito.

RETENÇÃO DE DOCUMENTAÇÃO

Os documentos referentes ao estudo serão guardados durante 05 anos pela *Medcin Instituto da Pele*, a menos que um contrato determine diferente.

BIBLIOGRAFIA

Conselho Nacional de Saúde: Resolução 196/96 do Ministério de Saúde. Diário Oficial, 16/10/1996.

Fluhr J. W., and col: Comparative study of five instruments measuring stratum corneum hydration (Corneometer CM 820 and CM 825 ®, Skicon 200 ®, Nova DPM 9003 ®, Dermalab ®) Part II In vivo, *Skin Research and Technology*, 1999, 5, pp. 171-178.

Berardesca E , EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration : electrical methods, *Skin Research and Technology*, 1997, 3, pp. 126-132

Clarys P , Barel A.O , In vitro calibration of the capacitance method (Corneometer CM 825 ®) and conductance method (Skicon 200 ®) for the evaluation of the hydration state of the skin, *Skin Research and Technology*, 1997, 3, pp. 107-113

Clarys P , Barel A.O , Gabard B , Non-invasive electrical measurements for the evaluation of the hydration state of the skin : comparison between three conventional instruments – the Corneometer ®, the Skicon ®, and the Nova DPM ®, *Skin Research and Technology*, 1999, 5, pp. 14-20

M B Quan et al. No-invasive in vivo techniques to differentiate photodamage and ageing in human skin. *Acta dermatologica venereologica* (Oslo). 1997;77:416-19

S D Kirb et al. Nonlinear, three dimensional finite-element model of skin biomechanics. *Journal of otolaryngology* (Toronto). 1998;27:(3):153-60.

J Matts, E Goodyear. A new instrument to measure the mechanical properties of human stratum corneum in vitro. *Journal of cosmetic science* (Nova York). 1998;49:321-33.

P Agache, P Humbert. Measuring the skin, non-invasive investigations, physiology, normal constants. Springer-Verlang Brelin Heidelberg, 2004.

V Rogers. EEMCO Guidance for assessment of transepidermal water loss in cosmeticsciences. *Skin pharmacology application skin physiology*. 2001;14:117-28.

M B Quan et al. No-invasive in vivo Techniques to differentiate photodamage and ageing in human Skin. *Acta dermatologica venereologica* (Oslo). 1997; 77: 416-19.

P Matts, E Goodyear. A new instrument to measure the mechanical properties of human stratum corneum in vitro. Journal of cosmetic science (Nova York). 1998; 49: 321-33.

L C Parish. Women's dermatology from infancy to maturity. 2001 – ED. Pathenon Publishing 174-175.

Arvin, S.; Rao, K. H.; Ruedi, B. Determination of fertility interval with ovulation time estimation using differential skin surface temperature (DST) measurement. Fertility and Sterility – The American Fertility Society. 1984; 41:5.

Barry G. Green, Gregory S. Shaffer, Magdalena, M. Gilmore
Chemical Senses. Vol. 18, pp683-702, 1993

Barry G. Green, Pamela Dalton, Beverly Cowart, Greg Shaffer, Krystyna Ranking
Chemical Senses. Vol. 21, pp323-334, 1996

ANEXOS**Anexo A:** Ficha Clínica do Voluntário**FICHA CLÍNICA**

Estudo: Estudo da Substantividade de Perfume na Pele em Função do Ciclo Menstrual

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Número de inclusão do voluntário: _____

Iniciais do Voluntário: _____

Data de Nascimento: ____/ ____/ ____

Idade: _____anos

Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino

Data da Penúltima Menstruação: _____

Data da Última Menstruação: _____

Telefone Residencial: _____

Telefone Celular: _____

AVALIAÇÃO INICIAL (V0)***Checagem dos Critérios de Inclusão***

- ☐ Sim ☐ Não Voluntários do sexo feminino com idade entre 18 a 40 anos;
- ☐ Sim ☐ Não Não utilização de anticoncepcionais no mínimo 6 meses antes do início do estudo;
- ☐ Sim ☐ Não Ciclo menstrual normal de 28-30 dias;
- ☐ Sim ☐ Não Pele da região do antebraço íntegra;
- ☐ Sim ☐ Não Concordância em obedecer aos procedimentos do ensaio e comparecer à clínica nos dias e horários determinados para as avaliações;
- ☐ Sim ☐ Não Os voluntários deverão ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Estudo Clínico, após a natureza do mesmo ter sido completamente esclarecida.

Checagem dos Critérios de Exclusão

- ☐ Sim ☐ Não Mulheres em período de gestação ou amamentando;
- ☐ Sim ☐ Não Indivíduos com patologias cutâneas ativas que possam interferir nos resultados do estudo;
- ☐ Sim ☐ Não Indivíduos sob tratamento estético até três semanas antes da seleção;
- ☐ Sim ☐ Não Indivíduos sob tratamento dermatológico até três meses antes da seleção;
- ☐ Sim ☐ Não Patologias hormonais que possam interferir na acne/ lesões acneiformes.
- ☐ Sim ☐ Não Antecedentes atópicos ou alérgicos;
- ☐ Sim ☐ Não História de sensibilização a produtos tópicos;

Avaliação Clínica:

Opinião do Médico Dermatologista

O voluntário se encontra apto à introdução no estudo clínico para avaliação da substantividade de perfume na pele em função do ciclo menstrual?

☐ Sim ☐ Não

Médico Avaliador: _____ Data: ____/____/____

VISITA 1

Data: _____

Temperatura Basal: _____

Fase do Ciclo: _____

	<u>HORA</u>	<u>TEMPERATURA</u>	<u>UMIDADE %</u>	<u>FLUXO (ML/MIN)</u>
<u>Branco</u>				
<u>1ª Coleta</u>				
<u>2ª Coleta</u>				
<u>3ª Coleta</u>				
<u>4ª Coleta</u>				
<u>5ª Coleta</u>				

Medidas Instrumentais

	<u>TRATADA</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida</u> <u>Corneometria</u>						
<u>Medida de</u> <u>TEWL</u>						
<u>Medida de</u> <u>Sebumetria</u>						

	<u>CONTROLE</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida</u> <u>Corneometria</u>						
<u>Medida de</u> <u>TEWL</u>						
<u>Medida de</u> <u>Sebumetria</u>						

VISITA 2Data: _____Temperatura Basal: _____Fase do Ciclo: _____

	<u>HORA</u>	<u>TEMPERATURA</u>	<u>UMIDADE %</u>	<u>FLUXO (ML/MIN)</u>
<u>Branco</u>				
<u>1ª Coleta</u>				
<u>2ª Coleta</u>				
<u>3ª Coleta</u>				
<u>4ª Coleta</u>				
<u>5ª Coleta</u>				

Medidas Instrumentais

	<u>TRATADA</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida Corneometria</u>						
<u>Medida de TEWL</u>						
<u>Medida de Sebumetria</u>						

	<u>CONTROLE</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida Corneometria</u>						
<u>Medida de TEWL</u>						
<u>Medida de Sebumetria</u>						

VISITA 3Data: _____Temperatura Basal: _____Fase do Ciclo: _____

	<u>HORA</u>	<u>TEMPERATURA</u>	<u>UMIDADE %</u>	<u>FLUXO (ML/MIN)</u>
<u>Branco</u>				
<u>1ª Coleta</u>				
<u>2ª Coleta</u>				
<u>3ª Coleta</u>				
<u>4ª Coleta</u>				
<u>5ª Coleta</u>				

Medidas Instrumentais

	<u>TRATADA</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida Corneometria</u>						
<u>Medida de TEWL</u>						
<u>Medida de Sebumetria</u>						

	<u>CONTROLE</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida Corneometria</u>						
<u>Medida de TEWL</u>						
<u>Medida de Sebumetria</u>						

VISITA 4Data: _____Temperatura Basal: _____Fase do Ciclo: _____

	<u>HORA</u>	<u>TEMPERATURA</u>	<u>UMIDADE %</u>	<u>FLUXO (ML/MIN)</u>
<u>Branco</u>				
<u>1ª Coleta</u>				
<u>2ª Coleta</u>				
<u>3ª Coleta</u>				
<u>4ª Coleta</u>				
<u>5ª Coleta</u>				

Medidas Instrumentais

	<u>TRATADA</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida Corneometria</u>						
<u>Medida de TEWL</u>						
<u>Medida de Sebumetria</u>						

	<u>CONTROLE</u>					
	<u>T0</u>			<u>T6h</u>		
<u>Medida Corneometria</u>						
<u>Medida de TEWL</u>						
<u>Medida de Sebumetria</u>						

INTERCORRÊNCIAS

DATA ____/____/____ (T:____)

Descrição: _____

Avaliação da Intensidade Global da Reação (Conforme Tabela de Classificação):

- ☐ Leve
☐ Moderada
☐ Intensa

Relação de Nexo Causal da Reação com o produto testado:

- ☐ Não relacionado
☐ Dificilmente relacionado
☐ Provavelmente relacionado
☐ Certamente relacionado

Caso Reações Adversas forem observadas, o Formulário de Evento Adverso deverá ser preenchido.

Médico Avaliador: _____ Data: ____/____/____

ACOMPANHAMENTO - INTERCORRÊNCIAS

DATA ____/____/____ (T:____)

Descrição: _____

Avaliação da Intensidade Global da Reação (Conforme Tabela de Classificação):

- ☐ Leve
☐ Moderada
☐ Intensa

Relação de Nexo Causal da Reação com o produto testado:

- ☐ Não relacionado
☐ Dificilmente relacionado
☐ Provavelmente relacionado
☐ Certamente relacionado

Caso Reações Adversas forem observadas, o Formulário de Evento Adverso deverá ser preenchido.

Médico Avaliador: _____ Data: ____/____/____

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

TÍTULO DO PROTOCOLO: *Estudo da Substantividade do Perfume na pele em função do ciclo menstrual.*

EN XXXXX

INICIAIS DO VOLUNTÁRIO: _____

(04 primeiras letras do 1º nome; 1ª letra do sobrenome)

Nº. Voluntário: _____ (sistema)

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa. Pedimos que entenda detalhadamente todas as etapas e, se concordar, assine este termo de consentimento. Você será previamente examinada por um médico e acompanhada durante a realização da pesquisa. Todas as dúvidas que surgirem durante e após o trabalho serão prontamente esclarecidas.

A pesquisa tem por objetivo estudar a duração do perfume na pele em função do ciclo menstrual da mulher. Para você participar do teste não pode estar tomando pílula anticoncepcional ou outro medicamento de uso contínuo pelo menos 6 meses e ter ciclo menstrual normal de 28-30 dias. Ao se dirigir ao Instituto MEDCIN Instituto da Pele, no endereço: Rua Dr. Carlos de Moraes Barros, 304 Vila Campesina - Osasco – SP - São Paulo, você não deverá estar utilizando cremes, loções corporais, óleos de banho, colônias e perfumes nas áreas próximas ao teste. Sua permanência no instituto em cada dia de avaliação será de 9h (das 8 às 17h). O estudo no total durará um mês e você será convidada a retornar ao Instituto 4 vezes neste período, correspondendo as fases do ciclo de avaliação.

Em cada uma das vezes em que voltar ao instituto, serão realizados os seguintes procedimentos:

1º) Avaliação Clínica (medida da temperatura basal e secreção vaginal). Esta etapa será realizada pelo médico ginecologista Dr Mauricio Addor CRM: 10415 que estará acompanhando todo o estudo, sem ônus para a voluntária. Esta etapa será realizada apenas uma vez.

2º) Avaliação da temperatura corpórea, perda de água pela pele (TEWL), hidratação e a oleosidade da pele. São métodos não-invasivos, medidas superficiais da pele, com mínimo risco à você. Esta etapa será realizada apenas 1 vez pela técnica do instituto Elaine Primo Freire

3º) Aplicação de uma pequena quantidade de perfume próximo ao punho (quantidade usual de mercado) que ficará com esta aplicação durante 6h de teste. Esta etapa será realizada apenas uma vez. O voluntário deverá permanecer no Instituto durante às 6h.

4º) Logo que aplica o perfume e a cada 90 minutos, será realizada a coleta dos componentes voláteis do perfume por meio de um tubo de vidro colocado em cima do local de aplicação do perfume. Em seguida, você deverá fazer a auto-

avaliação e avaliar o mesmo produto aplicado no mesmo local do braço em um voluntário do sexo oposto, seguindo as instruções e treinamento realizados anteriormente. A coleta dos componentes voláteis será realizada pela técnica do instituto Ana Paula dos Santos Gal.

A partir dos dados obtidos com esta pesquisa, será possível identificar substâncias no perfume que o modificam tanto em intensidade e característica, sendo possível substituí-las por substâncias mais estáveis.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA
--

1. Sua contribuição garantirá à comunidade um produto seguro e eficaz;
2. Conforme legislação em vigor, você não receberá nenhuma quantia em dinheiro, sendo que os gastos com transporte serão ressarcidos;
3. Você poderá se retirar da pesquisa a qualquer instante se assim desejar, ou se necessário, a critério do pesquisador;
4. Se houver qualquer modificação nos seus hábitos, solicitamos que nos comunique para melhor interpretação dos resultados;
5. Todas as informações obtidas sobre os voluntários serão mantidas em sigilo;
6. Garantimos que qualquer reação adversa provocada pelo produto em teste será acompanhada pelo médico e/ou especialista responsável pelo projeto e que, se necessário, será fornecida a medicação adequada, assim como qualquer nova informação que seja relevante você será notificado;
7. Uma via deste termo permanecerá no arquivo do Instituto e a outra de em sua posse.

INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

- Todas as matérias primas utilizadas no produto são aprovadas para uso tópico e não são tóxicas. Entretanto, como qualquer produto, poderá causar reações inesperadas como "vermelhidão", "inchaço", "coceira" e "ardor" nos locais de aplicação do produto;
- No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone 11- 3760-8289;
- Em caso de dúvida ou problema, você poderá entrar em contato diretamente com responsável pela pesquisa Claudia Silva Cortez Pereira através do telefone 11-3760-8289. Reclamações ou queixas podem ser feitas diretamente ao Comitê de Ética em Pesquisa no telefone 11-3760-8289.

Eu,

_____,
declaro que estou ciente de que este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição onde será realizado e que não obterei ganhos financeiros com a minha participação, sendo, entretanto ressarcido com transporte e alimentação nos dias e horários designados para as avaliações.

Declaro ainda que, depois de esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa, e que estou recebendo uma via do TCLE do produto estudado.

Assinatura do Voluntário

____/____/____

Data

Digital (se necessário)

Nome do Assist. de Pesquisa

Assinatura

____/____/____

Data

Anexo C: Escala Sensorial LMS

Pergunta: Independente de agradabilidade, avalie a amostra, sem tocar o local, em intensidade de perfume

O mais forte possível

Muito Forte

Forte

Moderado

Fraco

Quase não detectável

Nome da Voluntária:

Data:

Produto: Fine Fragrance

Tempo:

Anexo D: Fórmula Estudada

Givaudan[®]

CERTIFICADO DE CONFORMIDADE - IFRA

Cliente: GIVAUDAN
Fragrância: CICLO 1910
CICLO 1910

Certificamos que a fragrância em referência está em conformidade com as normas da ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL DE FRAGRÂNCIAS (IFRA - 42ª atualização / Maio 2006), desde que a mesma seja utilizada em um nível máximo de concentração de:

Categoria combinada IFRA (*)	Nível máximo de uso (%) (p/p)
Class 1.B* (**)	13.0
Class 2	16.2
Class 3.A	20.0
Class 3.C	20.0
Class 4.A	20.0
Class 4.B	20.0
Class 4.C	20.0
Class 4.D	20.0
Class 5.A	20.0
Class 6 (**)	20.0
Class 7.A	20.0
Class 8	20.0
Class 9.A	20.0
Class 9.C	20.0
Class 10.A	20.0
Class 11.A and 11.B	100.0

(*) veja o anexo da definição das categorias combinadas

Para outras aplicações ou dosagens superiores às indicadas acima, uma nova avaliação de segurança se faz necessária; favor entrar em contato com a Givaudan.

As normas IFRA referentes à restrição de uso são baseadas na avaliação de segurança do Conselho de Especialistas do INSTITUTO DE PESQUISAS DE MATERIAIS PARA FRAGRÂNCIAS (RIFM) e são revistas pelo Comitê Científico da IFRA.

A avaliação dos ingredientes da fragrância é feita de acordo com os padrões de segurança mencionados no Anexo I do Código de Prática da IFRA.

É de responsabilidade de nossos clientes a garantia da segurança do produto final (que contém esta fragrância) através de testes adicionais que se fizerem necessários.

Assuntos Normativos e Segurança de Produtos, Fragrâncias

Este certificado é gerado pelo cálculo baseado nos dados dos ingredientes.

Para a melhoria contínua da exatidão das informações acima, a Givaudan tem um programa de análise e revisão para todos os ingredientes relevantes da fragrância. As informações aqui contidas são, dentro do nosso conhecimento, verdadeiras e precisas no momento em que as mesmas são fornecidas. Portanto, é de sua responsabilidade a garantia do uso da fragrância no produto final dentro dos níveis de aplicação permitidos e da conformidade com a legislação vigente.

Este documento é gerado por computador e, conseqüentemente, não é assinado.

Data de Emissão : 16 Out 2007

Página : 1

freitasm-071016012607

IFR-CAS-01

Givaudan do Brasil Ltda.

Av. Engenheiro Billings 2185 Jaguaré - CEP 05321-010

Sao Paulo Brazil

Regulatory Affairs & Product Safety T 55 11 268 5149 F 55 11 3760 8000

www.givaudan.com

ANEXO 2: Ficha de acompanhamento e intercorrências

Voluntária	D.U.M.	Visita 1 (Fase Menstrual)	dia do ciclo	Coleta de headspace	Visita 2 (Fase Follicular)	dia do ciclo	Coleta de Headspace	Visita 3 (Fase Ovulatória)	dia do ciclo	Coleta de headspace	Visita 4 (Fase Lútea)	dia do ciclo	Coleta de Headspace	Observações (Completar e Instrumentar)	Justificativa	Contagem
1	24/11/2007, 22/02/08	22/02/2008	1º	Injetado dia 29/02/08	30/nov	6º	Injetado dia 04/12/2007	06/dez	13º	Injetado dia 10/12/2007	18/dez	25º	Injetado dia 21/03/2008	OK = ciclo completo		1
2	27/nov	30/nov	4º	Injetado dia 04/12/2007	03/dez	8º	Injetado dia 07/12/2007	12/dez	16º	Injetado dia 13/12/2007	18/dez	22º	Injetado dia 14/01/2008	OK = ciclo completo		2
3	24/11/2007, 18/01/08, 22/02/08 (TWL)	18/01/08, 27/02/08 (TWL)	1º	Injetado dia 23/01/2008	03/dez	10º	Injetado dia 07/12/2007	07/dez	13º	Injetado dia 13/12/2007	18/dez	24º	Injetado dia 14/01/2008	OK = ciclo completo	de dias para menstruação	3
4	28/nov	14/01/2008	7	Injetado dia 19/1/2008	03/dez	6º	Injetado dia 10/12/2007	12/dez	15º	Injetado dia 13/12/2007	18/dez	21º	Injetado dia 17/01/2008	OK = ciclo completo		4
2008																
5	2/1/2008, 28/01/08, 24/02/08	28/02/2008	5º	Injetado dia 03/03/08	06/03/2008	12º	Injetado dia 11/03/08. Repetido: 13/03/08	04/04/2008	15º	Injetado dia 14/04/08	11/03/2008	17º	Injetado dia 18/03/08. Arq 080318.	OK = ciclo completo		5
6	20/02/2008	22/02/2008	2º	Injetado dia 25/02/08	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída do teste	* Trabalho	
7	19/02/2008	22/02/2008	3º	Injetado dia 25/02/08. Dia 26/02/08 braço esq 3h (não tem nada)	28/02/2008	10º	Injetado dia 03/03/08	repetir	repetir	repetir	05/03/2008	16º	Injetado dia 06/03/08. Gerado arquivo de 07/03/08. Continuação: 10/03/08	Pico ovulatório não detectado		
8	26/02/2008	28/02/2008	3º	Injetado dia 03/03/08. braço esq 3h injetado. Não tem nada.	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída	excluída do teste	* Desistiu	
9	08/02/08, 5/3/2008	06/03/2008	2º	Injetado dia 11/03/08 e 13/03/08 (arquivos 080311, 080313)	13/03/2008	9º	Injetado dia 20/03/08. Arq 080318.	19/mar	15º	repetir, pois não detectou ovulação	19/mar	15º	Injetado dia 25/03/08	Pico ovulatório não detectado	repetir comparece u nos testes	
10	03/02/2008	04/03/2008	2º	Injetado dia 05/03/08. Arquivo: 03/03/08	13/03/2008	11º	não compareceu para o teste	repetir	repetir	repetir, pois não detectou ovulação	18/03/2008	17º	Injetado dia 25/03/08	excluída do teste		
11	03/07/2008	03/11/2008	5º	Injetado dia 18/03/08	18/03/2008	12º	Injetado dia 25/03/08	20/03/2008	14º (OK)	Injetado dia 01/04/08	27/03/2008	21º	Injetado dia 10/04/08. água	OK = ciclo completo		6
12	03/12/2008	13/02/2008	2º	Injetado dia 20/03/08. Arq 0803018	20/03/2008	9º	Injetado dia 01/04/08	27/03/2008	16º (ok)	Injetado dia 10/04/08	04/03/2008	22º	Injetado dia 10/04/08. água	OK = ciclo completo		7
13	03/08/2008	03/11/2008	4º	Injetado dia 18/03/08	18/03/2008	11º	Injetado dia 25/03/08. água	20/03/2008	13º(OK)	Injetado dia 10/04/08	27/03/2008	20º	Injetado dia 10/04/08. água	OK = ciclo completo		8
14	23/03/2008	25/03/2008	3º	Injetado dia 27/03/08	04/02/2008	11º	Injetado dia 10/04/08. água	04/04/2008	13º(OK)	Injetado dia 14/04/08	10/04/2008	19º	Injetado dia 17/04/08	OK = ciclo completo		9
15	24/03/2008	25/03/2008	2º	Injetado dia 27/03/08	04/03/2008	10º	Injetado dia 10/04/08. água	30/04/2008	15º(OK)	Injetado dia 05/05/2008	05/06/2008	21º	Injetado dia 07/05/2008	OK = ciclo completo		10
16	11/04/2008	15/04/2008	5º											excluída do teste		
17	11/04/2008	15/04/2008	5º	Injetado dia 17/04/08	22/04/2008	12º	Injetado dia 28/04/08	24/04/2008	14º	Injetado dia 28/04/08	29/04/2008	19º	Injetado dia 05/05/08	OK = ciclo completo		11
18	19/04/2008	23/04/2008	5º	Injetado dia 28/04/08	29/04/2008	11º	Injetado dia 05/05/08				05/06/2008	18º	Injetado dia 07/05/08	RESISTIU Pico ovulatório não detectado		
19	23/05/2008	28/05/2008	6º	Injetado dia 08/06/2008	06/03/2008	12º	Injetado dia 09/06/2008				17/06/2008	26º	Injetado dia 24/06/2008	Pico ovulatório não detectado		
20	23/06/2008	24/06/2008	2º	Injetado dia 2/07/2008	07/02/2008	8º	Injetado dia 10/07/2008	31/07/2008	11º	Injetado dia 05/08/2008	08/07/2008	18º	Injetado dia 12/08/08	OK = ciclo completo		12
21	06/03/2008	06/04/2008	2º	Injetado dia 09/06/2008	06/11/2008	9º	Injetado dia 24/06/2008	08/04/2008		Injetado dia 07/08/2008	19/06/2008	17º	Injetado dia 24/06/2008	OK = ciclo completo		13
22	15/05/08	19/05/08	5º	Injetado dia 24/05/08										RESISTIU		
23	23/05/08	24/05/08	3º	Injetado dia 02/07/08										RESISTIU		
24	27/07/08	29/07/08	3º	Injetado dia 05/08/08	08/01/2008	6º	Injetado dia 05/08/2008	14/07/08	14º	Injetado dia 23/07/08	22/07/2008	21º	Injetado dia 23/07/08	OK = ciclo completo		14
25	15/08/08	15/08/08	1º	Injetado dia 19/08/08	25/08/08	11º	Injetado arquivo 080825 (data 080829)	31/07/2008	12º	Injetado dia 05/08/2008	08/07/2008	19º	Injetado dia 12/08/08	OK = ciclo completo		15
26	20/08/08	16/09/08	4º	Injetado dia 18/09/2008	22/09/08	10º	Injetado dia 25/09/08	08/04/2008	13º	Injetado dia 07/08/2008	08/11/2008	20º	Injetado dia 13/08/08. Arq 080812	OK = ciclo completo		16
27	20/08/08	22/09/08	3º	Injetado dia 25/09/08	29/09/08	10º	Injetado dia 07/10/08	09/09/2008	13º	Injetado dia 09/09/08	09/12/2008	21º	Injetado dia 12/09/08	OK = ciclo completo		17
28	21/08/08	17/09/08	2º	Injetado dia 18/09/08	22/09/08	7º	Injetado dia 25/09/08	09/09/2008	12º	Injetado dia 09/09/08	09/12/2008	20º	Injetado dia 12/09/08	OK = ciclo completo		18
29	20/08/08	não foi			não foi			09/09/2008	15º	Injetado dia 09/09/08	09/10/2008	23º	Injetado dia 18/09/08	RESISTIU		
30	11/07/2008	11/10/2008	3º	Injetado 16/06/2009	17/11/2008	10º	Injetado dia 10/06/2009	24/10/2008	14º	Injetado dia 09/06/2009 e 6h em 06/06/2009	29/10/2008	18º	Injetado dia 03/06/2009 e 04/06/2009	OK = ciclo completo		19
31	12/01/2008	12/03/2008	3º	Injetado dia 15/06/2009	12/08/2008	8º	Injetado dia 16/06/2009	11/11/2008	13º	Injetado dia 15/06/2009	19/11/2008	21º	Injetado dia 16/06/2009	OK = ciclo completo		20
32	31/12/2008	28/01/2009	1º	Injetado dia 16/06/2009	02/03/2009	7º	Injetado dia 16/06/2009	14/01/2009	15º	Injetado dia 16/06/2009	20/01/2009	21º	Injetado dia 16/06/2009	OK = ciclo completo		21
33	14/06/2009	15/07/2009	2º	Injetado dia 17/07/2009	23/07/2009	11º	Injetado dia 23/07/2009	25/06/2009	12º	Injetado dia 01/07/2009	07/08/2009	25º	Injetado dia 14/07/2009. Falha no ATD	OK = ciclo completo		22
34	17/07/2009							27/07/2009	11º	Injetado dia 05/08/2009	08/05/2009	20º	Injetado dia 11/08/2009	OK = ciclo completo		23
35	17/07/2009	20/01/2010	1º	Injetado dia 27/01/2010	27/01/2010	7º	Injetado dia 22/02/2010	30/07/2009	13º	Injetado dia 05/08/2009	08/06/2009	21º	Injetado dia 11/08/2009	OK = ciclo completo		24
36	15/02/2010	16/03/2010	1º	Injetado dia 22/03/2010	22/03/2010	7º	Injetado dia 10/03/2010	24/02/2010	10º	Injetado dia 03/03/2010	03/03/2009	17º	Injetado dia 08/03/2010	OK = ciclo completo		25
37	21/02/2010	18/03/2010	1º	Injetado dia 25/03/2010	22/03/2010	5º	Injetado dia 25/03/2010	03/04/2010	12º	Injetado dia 08/03/2010	03/12/2010	20º	Injetado dia 22/03/2010	OK = ciclo completo		26
38	28/02/2010	29/03/2010	1º	Injetado dia 13/04/2010	09/12/2009		Injetado dia 20/05/2010	03/12/2010	13º	Injetado dia 22/03/2010	18/03/2010	19º	Injetado dia 25/03/2010	OK = ciclo completo		27
39	04/02/2010	05/03/2010	1º	etado dia 11/05/2010 e 19/05/2010	05/11/2010	9º	Injetado dia 20/05/2010	15/04/2010	14º	Injetado dia 22/04/2010	20/04/2010	19º	Injetado dia 27/04/2010	OK = ciclo completo		28
40	05/06/2010	06/08/2010	1º	Injetado dia 15/06/2010	17/06/2010	10º	Injetado dia 22/06/2010	20/05/2010	15º	Injetado dia 25/05/2010 (arquivo 1005258)	27/05/2010	22º	Injetado dia 15/06/2010	OK = ciclo completo		29
41	29/05/2010	29/06/2010	1º	Injetado dia 02/07/2010	07/05/2010	7º	Injetado dia 29/07/2010	06/09/2010	12º	Injetado dia 15/06/2010	17/06/2010	20º	Injetado dia 22/06/2010	OK = ciclo completo		30

Controle Alan avaliará o braço das mulheres em função do ciclo menstrual

Avaliar se realmente não existe diferença fisiológica na pele da mulher

Anexo 3: Aprovação do CEP do Instituto de Pesquisa Clínica Medcin

Centro Médico Novo Horizonte
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/NH

Osasco, 19 de novembro de 2007.

Parecer Nº 244/2007final – CEP/NH

Prezado (a) Senhor (a),

1. Identificação:

- a. **Título do Projeto:** *“Estudo da Substantividade de Perfume na Pele em Função do Ciclo Menstrual”*
- b. **Número do CEP/NH:** 244-07
- c. **Versão do Protocolo:** Protocolo EF – 054-07v4 – Versão01 out/07
- d. **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** Protocolo EF – 054-07v4 – Versão01 out/07
- e. **Pesquisador Responsável:** Flávia A. S. Addor
- f. **Patrocinador:** Givaudan do Brasil Ltda
- g. **Instituição onde será realizado:** Medcin Instituto da Pele
- h. **Tipo de projeto:** Ensaio Clínico aberto, controlado, comparativo e monocêntrico de produto de uso tópico e caráter cosmético.

2. Objetivo:

Avaliar a interferência do ciclo menstrual na substantividade do perfume através de análise cromatográfica e questionário sensorial.

3. Sumário do Projeto:

Estudo monocêntrico, aberto, controlado, comparativo, em voluntários do sexo feminino com idade entre 18 e 40 anos, que não estejam usando a pelo menos 06 meses anticoncepcionais e que tenham ciclo menstrual normal de 28-30 dias. As voluntárias incluídas farão um treinamento para terem condições de responder um questionário de avaliação olfativa e terão como comparação o mesmo procedimento sendo feito em um voluntário do sexo masculino.

Centro Médico Novo Horizonte

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/NH

Ao longo do ciclo menstrual ocorrem alterações da temperatura basal da mulher, antes da ovulação, a temperatura basal corporal permanece em nível baixo; após a ovulação, ela se eleva ligeiramente (alguns décimos de grau centígrados), permanecendo nesse novo nível até a próxima menstruação. Este aumento de temperatura é resultado da elevação dos níveis de progesterona, que tem efeito termogênico.

Este método permite, através da mensuração diária da temperatura basal, a determinação do pico ovulatório, caracterizado pelo aumento da temperatura em aproximadamente 0,5°C.

No primeiro dia de estudo, as voluntárias receberão um termômetro e serão orientadas a verificar a temperatura basal sublingual todos os dias pela manhã, antes de se levantar.

O termômetro deverá ser colocado sob a língua e após aproximadamente 3 minutos deverá ser retirado. A temperatura será anotada na tabela modelo (anexo D) entregue juntamente com o termômetro.

Quando ocorrer qualquer alteração da rotina da voluntária, esta deverá anotar no campo de observações na tabela de anotação da temperatura basal.

As voluntárias também serão orientadas a atentar para os seguintes fatores que podem alterar a temperatura basal, registrando-os no gráfico quando ocorrem:

- Mudanças no horário de verificação da temperatura
- Ingestão de bebidas alcoólicas
- Recolher-se tarde da noite para dormir
- Perturbações do sono, sono interrompido
- Doenças como resfriados, gripes ou outras infecções
- Mudanças de ambiente
- Perturbações emocionais, fadiga, estresse, entre outros
- Refeição muito próxima do horário de dormir
- Relações sexuais na madrugada

Centro Médico Novo Horizonte

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/NH

Outro controle deste período será feito através da coleta do muco cervical que a luz do microscópio forma cristais no período fértil.

A coleta do Muco Cervical será realizada na MEDCIN, em sala reservada e preparada para o procedimento.

Uma auxiliar de enfermagem treinada será responsável pela coleta e utilizando material adequado como espelho, luvas e lâminas descartáveis.

Avaliações instrumentais como corneometria, TEWL, sebumetria, além da coleta de componentes voláteis para posterior cromatografia serão utilizadas para caracterizar a substantividade do perfume e sua interação com o ciclo menstrual.

A região das medições instrumentais será realizada próximo ao punho numa área de 10cm² em cada antebraço onde será aplicado o perfume.

O produto também será avaliado em um voluntário do sexo masculino para controle das voluntárias na avaliação sensorial.

4. Comentários do relator, frente à resolução CNS 196/96

A introdução e desenvolvimento do projeto estão claros e objetivos, embasados na literatura de referência, os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos para o tipo de produto a ser avaliado.

O TCLE está bem elaborado, e contempla claramente os tópicos da resolução, enfatizando que a cópia do TCLE e modo de uso serão entregue ao voluntário. Explicando todos os procedimentos que serão realizados de forma detalhada e simples. Está explícita a ausência de ganhos financeiros, reforçando a total responsabilidade da assistência pelo Instituto/ Patrocinador em caso de ocorrência de evento adverso inesperado.

A coleta da temperatura basal está pormenorizada e bem explicada em seus mínimos detalhes, o que leva a uma melhor compreensão do método e da orientação das voluntárias.

Centro Médico Novo Horizonte

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/NH

A coleta do muco cervical também está mais bem embasada com explicação de local, pessoa e forma da coleta. E como todo procedimento está bem explicado no TCLE, o protocolo de pesquisa está adequado dentro dos parâmetros metodológicos e éticos julgados por este Comitê.

5. Parecer do CEP:

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Novo Horizonte analisou, e **APROVOU** na reunião do dia 09 de novembro de 2007, de acordo com a Resolução CNS 196/96, o protocolo de pesquisa “*Estudo da Substantividade de Perfume na Pele em Função do Ciclo Menstrual*” de autoria do(a) pesquisador(a) .Flávia Addor.

Como procedimento adotado por este Comitê de Ética em Pesquisa, solicitamos a inclusão, no termo de consentimento Livre e Esclarecido do seguinte: qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre os aspectos éticos dessa pesquisa favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Médico Novo Horizonte – Rua Mônica Maria Hubacher, nº 38 – e-mail: nhorizonte@terra.com.br.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – item IV.1f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d);

ANEXO 4: Carta de aprovação do CEP da Faculdade de Farmácia

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP nº 165 /2007

São Paulo, 17 de dezembro de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Claudia Silva Cortez Pereira
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Valéria R. Velasco
FBF

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 17 de dezembro de 2007, **APROVOU** as alterações do projeto "Estudo da substantividade do perfume na pele em função do ciclo menstrual" (Protocolo CEP nº 400) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas, corrigir o TCLE de acordo com a sugestão anexa.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do grupo de estudo

Universidade de São Paulo

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas***TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo de Estudo)*****I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL*****1.** Nome do Paciente:.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....

.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: Estudo da Substantividade do Perfume na pele em função do ciclo menstrual
2. Pesquisador: Claudia Silva Cortez Pereira
Cargo/Função: Farmacêutica (Analista Sensorial) Inscrição Conselho Regional Nº: 30791

Departamento da FCF/USP: Fármaco e Medicamentos

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (X) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()

4. Duração da Pesquisa: 2 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa. Pedimos que entenda detalhadamente todas as etapas e, se concordar, assine este termo de consentimento. Você será previamente examinada pelo médico ginecologista Dr Mauricio Addor CRM: 10415 e acompanhada durante a realização da pesquisa. Todas as dúvidas surgidas durante e após o trabalho serão prontamente esclarecidas.

A pesquisa tem por objetivo estudar a duração do perfume na pele em função do ciclo menstrual da mulher. A voluntária para participar do teste não pode estar tomando pílula anticoncepcional ou outro medicamento de uso contínuo pelo menos 6 meses e ter ciclo menstrual normal de 28-30 dias. Ao se dirigir ao Instituto Medcin, Instituto da Pele, endereço: av Dr Carlos de Moraes Barros, 304 – Osasco – São Paulo, a voluntária não deverá estar utilizando cremes, loções corporais, óleos de banho, colônias e perfumes nas áreas próximas ao teste. Sua permanência no instituto em cada dia de avaliação será de 9h (das 8 às 17h). O estudo no total durará um mês e você será convidada a retornar ao Instituto 4 vezes neste período, correspondendo as fases do ciclo de avaliação.

Em cada uma das vezes em que voltar ao instituto, serão realizados os seguintes procedimentos:

- 1º) Avaliação Clínica (medida da temperatura basal e secreção vaginal). Esta etapa será realizada pelo médico ginecologista Dr Mauricio Addor CRM: 10415 que estará acompanhando todo o estudo, sem ônus para a voluntária. Esta etapa será realizada apenas uma vez.**

2º) Avaliação das características da pele: temperatura, perda de água, hidratação e oleosidade. As medidas serão realizadas no tempo inicial. Esta etapa será realizada apenas 1 vez pela técnica do instituto Elaine Primo Freire

3º) Aplicação de uma pequena quantidade de perfume próximo ao punho (quantidade usual de mercado), que a voluntária ficará com esta aplicação durante 6h de teste e deverá permanecer no instituto durante 6h. Esta etapa será realizada apenas uma vez. Aplicação do perfume será realizada pela pesquisadora responsável pelo estudo.

4º) Após a aplicação do perfume e a cada 90 minutos, primeiro será coletado os componentes voláteis do perfume por meio de um tubo de vidro colocado em cima do local de aplicação do perfume e, na seqüência, você avaliará o perfume aplicado na sua pele e na pele do pulso de um único voluntário masculino. Esta etapa será repetida por 5 vezes. A coleta dos componentes voláteis será realizada pela técnica do instituto Ana Paula dos Santos Gal

A partir dos dados obtidos com esta pesquisa, será possível identificar substâncias no perfume que o modificam tanto em intensidade e característica, sendo possível substituí-las por substâncias mais estáveis.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

8. Sua contribuição garantirá à comunidade um produto seguro e eficaz;
9. Conforme legislação em vigor, você não receberá nenhuma quantia em dinheiro, sendo que os gastos com transporte serão ressarcidos;
10. Você poderá se retirar da pesquisa a qualquer instante se assim desejar, ou se necessário, a critério do pesquisador;
11. Se houver qualquer modificação nos seus hábitos, solicitamos que nos comunique para melhor interpretação dos resultados;
12. Todas as informações obtidas sobre os voluntários serão mantidas em sigilo;
13. Garantimos que qualquer reação adversa provocada pelo produto em teste será acompanhada pelo médico e/ou especialista responsável pelo projeto e que, se necessário, será fornecida a medicação adequada, assim como qualquer nova informação que seja relevante você será notificado;
14. Uma via deste termo permanecerá no arquivo do Instituto e a outra de posse do voluntário

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

- Todas as matérias primas utilizadas no produto são aprovadas para uso tópico e não são tóxicas. Entretanto, como qualquer produto, poderá causar reações inesperadas como “vermelhidão”, “inchaço”, “coceira” e “ardor” nos locais de aplicação do produto;
- No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone 11- 3760-8289;
- Em caso de dúvida ou problema, você poderá entrar em contato diretamente com responsável pela pesquisa Claudia Silva Cortez Pereira através do telefone 11-3760-8289. Reclamações ou queixas podem ser feitas diretamente ao Comitê de Ética em Pesquisa no telefone 11-3760-8289.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

ANEXO 6: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do corpo controle

Universidade de São Paulo

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas***TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Controle)*****I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL*****2.** Nome do Paciente:.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

5. Título do Protocolo de Pesquisa: Estudo da Substantividade de uma composição aromática na pele em função do ciclo menstrual

6. Pesquisador: Claudia Silva Cortez Pereira

Cargo/Função: Farmacêutica (Analista Sensorial)

Inscrição Conselho Regional Nº: 30791

Departamento da FCF/USP: Fármacos e Medicamentos

7. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (X)

Risco Médio ()

Risco Baixo ()

Risco Maior ()

8. Duração da Pesquisa: 2 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa como controle, pois ocorrem modificações na característica da pele da mulher em função do ciclo menstrual e para verificarmos essas mudanças precisamos comparar com a pele do homem. Desta forma, caso aceite participar deste estudo, você deverá estar disponível para participar do teste todas as vezes que tivermos avaliação das voluntárias em função do ciclo menstrual. Pedimos que entenda detalhadamente todas as etapas e, se concordar, assine este termo de consentimento. Todas as dúvidas surgidas durante e após o trabalho serão prontamente esclarecidas.

A pesquisa tem por objetivo estudar a duração do perfume na pele em função do ciclo menstrual da mulher. Ao se dirigir ao Instituto Medcin, Instituto da Pele, endereço: av Dr Carlos de Moraes Barros, 304 – Osasco – São Paulo, o voluntário não deverá estar utilizando cremes, loções corporais, óleos de banho, colônias e perfumes nas áreas próximas ao teste. Sua permanência no instituto no dia da avaliação será de 9h (das 8 às 17h). Você será convidado a retornar ao Instituto várias vezes neste período, correspondendo as fases do ciclo de avaliação de cada voluntária participante.

Em cada uma das vezes em que voltar ao instituto, serão realizados os seguintes procedimentos:

1º) Aplicação de uma pequena quantidade de perfume próximo ao punho (quantidade usual de mercado) que ficará com esta aplicação durante 6h de teste e deverá permanecer no instituto durante 6h. Esta etapa será realizada apenas uma vez. Aplicação do perfume será realizada pela pesquisadora responsável pelo estudo.

2º) Logo após a aplicação do perfume e a cada 90 minutos, 1º será coletado os componentes voláteis do perfume por meio de um tubo de vidro colocado em cima do local de aplicação do perfume, na seqüência, as voluntárias avaliarão o perfume

aplicado na sua pele, seguindo as instruções e treinamento realizados anteriormente. Esta etapa será repetida por 5 vezes. A coleta dos componentes voláteis será realizada pela técnica do instituto Ana Paula dos Santos Freire e apenas na primeira visita ao instituto.

A partir dos dados obtidos com esta pesquisa, será possível identificar substâncias no perfume que o modificam tanto em intensidade e característica, sendo possível substituí-las por substâncias mais estáveis.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

15. Sua contribuição garantirá à comunidade um produto seguro e eficaz;
16. Conforme legislação em vigor, você não receberá nenhuma quantia em dinheiro, sendo que os gastos com transporte serão ressarcidos;
17. Você poderá se retirar da pesquisa a qualquer instante se assim desejar, ou se necessário, a critério do pesquisador;
18. Se houver qualquer modificação nos seus hábitos, solicitamos que nos comunique para melhor interpretação dos resultados;
19. Todas as informações obtidas sobre os voluntários serão mantidas em sigilo;
20. Garantimos que qualquer reação adversa provocada pelo produto em teste será acompanhada pelo médico e/ou especialista responsável pelo projeto e que, se necessário, será fornecida a medicação adequada, assim como qualquer nova informação que seja relevante você será notificado;
21. Uma via deste termo permanecerá no arquivo do Instituto e a outra de posse do voluntário

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

- Todas as matérias primas utilizadas no produto são aprovadas para uso tópico e não são tóxicas. Entretanto, como qualquer produto, poderá causar reações inesperadas como “vermelhidão”, “inchaço”, “coceira” e “ardor” nos locais de aplicação do produto;

- No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone 11- 3760-8289;
- Em caso de dúvida ou problema, você poderá entrar em contato diretamente com o responsável pela pesquisa Claudia Silva Cortez Pereira através do telefone 11-3760-8289. Reclamações ou queixas podem ser feitas diretamente ao Comitê de Ética em Pesquisa no telefone 11-3760-8289.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)