UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da eficácia clínica de dermocosméticos contendo antiglicantes por técnicas de biofísica e imagem

Verônica Rego de Moraes

Ribeirão Preto

2021

Verônica Rego de Moraes

Avaliação da eficácia clínica de dermocosméticos contendo antiglicantes por técnicas de biofísica e imagem

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos.

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 20/12/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

Moraes, V. R.	**Avaliação da eficácia clínica de dermocosméticos contendo antiglicantes por técnicas de biofísica e imagem**	Espaço de **2,5 cm** reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUDORADO FCFRP

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Verônica Rego de Moraes

Avaliação da eficácia clínica de dermocosméticos contendo antiglicantes por técnicas de biofísica e imagem. Ribeirão Preto, 2021.

118p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

1. Antiglicantes. 2.Tecnicas de Biofísica e análise deimagem. 3. Pele diabética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Verônica Rego de Moraes

Título do trabalho: **Avaliação da eficácia clínica de dermocosméticos contendo antiglicantes por técnicas de biofísica e imagem**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USPpara obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedicatória

À minha família, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis, me apoiando e dando suporte em todas as minhas decisões.

Ao meu grupo de laboratório por me acolherem tão bem e pela amizade e companheirismo durante todos esses anos.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita"

Mahatma Gandhi

Agradecimento

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me dado a capacidade de realizar meu sonho com a finalização do doutorado.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Patrícia M.B.G. Maia Campos pela paciência e orientação ao longo desses anos. Por ser mais que uma orientadora, uma amiga nos momentos difíceis, estar sempre me inspirando e me forçando a ser cada vez melhor, transmitindo essa paixão por ensinar e pela pesquisa.

Agradeço a minha família, meus pais Pedro e Rosana, e minha irmã, Raquel, que sempre estiveram ao meu lado, ouvindo e discutindo minha pesquisa, mesmo que não entendessem. Vocês são minha base, meu espelho e não seria nada sem vocês.

Agradeço aos meus colegas de laboratório do NEATEC pelas discussões que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente. Pela ajuda desde o começo, até o final caótico em tempos de pandemia. Aos meus amigos Maísa, Marcella, Letícia Kakuda, Rodolfo, Cláudia, Barbara, Jéssica, Letícia Nakamura Victor Gabriel, Hélio, Jonas pelo companheirismo, cumplicidade, paciência e trocas de experiências que vocês me proporcionaram.

Agradeço as minhas participantes de pesquisa pelo comprometimento e carinho à pesquisa e dedicação aos retornos para avaliação.

Agradeço a SILAB por ter oferecido minhas substâncias ativas do qual sem elas o trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo acolhimento, por ser minha casa nesses 7 anos, um local onde guardo muitas recordações boas, a todos docente e funcionários, principalmente Eleni e Henrique, por estarem sempre dispostos e serem solícitos.

Agradeço a CAPES pelo financiamento dos equipamentos que foram utilizados, que foram essenciais para o desenvolvimento e sucesso do estudo, Código de Financiamento 001 (CAPES).

RESUMO

MORAES, V. R. **Avaliação da eficácia clínica de dermocosméticos contendo antiglicantes por técnicas de biofísica e imagem.** 2021. 118f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Além dos radicais livres, existem outros mecanismos que aceleram o envelhecimento cutâneo, como o processo de glicação das fibras de colágeno, o qual vem sendo muito estudado. Esse processo ocorre por um mecanismo não enzimático que visa a glicação de um monossacarídeo com uma proteína, geralmente colágeno, o que faz com que as fibras de colágeno se tornem rígidas, além de formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais resultam na perda da elasticidade e firmeza da pele. No caso de portadores de Diabetes Mellitus (DM), a alta concentração de açúcar no sangue faz com que o processo de glicação seja exacerbado levando a alterações cutâneas, como danos na função barreira da pele. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar a eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo os extratos aquosos de semente de girassol (*Helianthus Annus*) e de alga vermelha (*Hypnea musciformis*), os quais possuem potencial antiglicante. Previamente ao desenvolvimento das formulações foi realizada a caracterização da pele de indivíduos saudáveis e portadores de Diabetes Mellitus visando comparar ambas as peles como suporte para a realização do estudo clínico de eficácia de formulações antiglicantes. A seguir, formulações acrescidas ou não (veículo) do extrato antiglicantes de *Helianthus Annus* e desse extrato em associação com o de *Hypnea musciformis* foram desenvolvidas e submetidas à testes de estabilidade por determinação do comportamento reológico e características organolépticas. Por fim, para o estudo clínico de eficácia foram recrutadas 59 participantes de estudo do sexo feminino, idade 39-55 anos, sendo 21 saudáveis e 38 portadores de diabetes tipo 2, não insulina dependentes, as quais foram divididas em 3 grupos: V01 com associação de substâncias ativas, V02 com o extrato de alga vermelha e V03 o veículo. Antes e após 45 e 90 dias de aplicação das formulações na pele da face foram realizadas medidas da perda transepidérmica de água, hidratação, propriedades viscoelásticas, microrrelevo cutâneo, ecogenicidade da derme e características morfológicas e estruturais da pele, por meio de técnicas de biofísica e análise de imagem da pele. Os resultados obtidos mostraram que as formulações foram estáveis não apresentando alterações significativas no comportamento reológio, valores de pH e características organolépticas após 56 dias de armazenamento nas temperaturas 5º e 45º. O estudo clínico de caracterização da pele mostrou que há diferenças significativas nos parâmetros biofísicas e morfológicos avaliados entre a pele de indivíduos saudáveis e portadores de diabetes. Além disso, após o tratamento com as formulações objeto de estudo houve melhora significativa da barreira cutânea e da derme da pele dos indivíduos diabéticos quando comparada com as saudáveis principalmente em relação ao aumento da ecogenicidade da derme. Por fim, o extrato da alga vermelha, isoladamente ou em combinação com o extrato de girassol, pode ser sugerido como uma substância ativa inovadora e eficaz para o desenvolvimento de formulações para o controle de alterações cutâneas decorrentes do processo de glicação.

Palavras-chave: Antiglicantes, extrato de alga vermelha *Hypnea musciformis,* extrato de girassol, reologia, microscopia confocal de reflectânia, cosméticos.

ABSTRACT

MORAES, V.R. **Evaluation of the clinical efficacy of dermocosmetics containing antiglycants by biophysical and imaging techniques.** 2021. 118f. Thesis (Doctorate degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

In addition to free radicals, other mechanisms aggravate skin aging, such as the glycation process of collagen fibers, which has been extensively studied. This process occurs through a non-enzymatic mechanism that aims at the glycation of a monosaccharide with a protein, usually collagen, which causes them to become rigid, in addition to the formation of advanced glycation end products (AGEs) which result in the loss of skin elasticity. In the case of patients with Diabetes Mellitus (DM), the high concentration of sugar in the blood causes the glycation process to be exacerbated, leading to skin changes, such as damage to the skin's barrier function. Thus, there is an intense search for active ingredients that have antiglycant potential. In this context, the aim of the present study was to develop and evaluate the clinical efficacy of dermocosmetic formulations antiglycant purposes added with aqueous extracts of sunflower seed (*Helianthus Annus*) and red seaweed (*Hypnea musciformis*). Prior to the development of the formulations, the characterization of the skin of healthy individuals and patients with Diabetes Mellitus was carried out in order to compare both skins as support for the clinical study of the effectiveness of antiglycant formulations. Next, formulations with or without addition (vehicle) of the antiglycant extract of *Helianthus Annus* and of this extract in association with that of *Hypnea musciformis* were developed and submitted to stability tests for determination of rheological behavior and organoleptic characteristics. Finally, 59 female study participants, aged 39 to 55 years, 21 healthy and 38 with type 2 diabetes, non-insulin dependent, were recruited for the clinical efficacy study, who were divided into 3 groups: vehicle, *Hypnea musciformis* and in association with *Helianthus Annus*. Before and after 45 and 90 days of application of the formulations on the skin of the face, measurements were taken of transepidermal water loss, hydration, viscoelastic properties, skin micro-relief, dermis echogenicity and morphological and structural characteristics of the skin, using biophysical and skin image analysis. The results obtained showed that the formulations were stable, showing no significant changes in rheological behavior, pH values and organoleptic characteristics after 56 days of storage at temperatures. 5°C and 45°C. The clinical study of skin characterization showed that there are significant differences in the biophysical and morphological parameters evaluated between the skin of healthy individuals and those with diabetes. Furthermore, after treatment with the studied formulations, there was a significant improvement in the biophysical parameters of the skin of diabetic women when compared to healthy participants, especially in relation to the increase in dermis echogenicity. Finally, red seaweed extract, alone or in combination with sunflower extract, can be suggested as an innovative and effective active substance for the development of formulations for the control of skin changes resulting from the glycation process.

Keywords: Antiglycants, red seaweed extract, sunflower extract, rheology, biophysical and imaging techniques, cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REGIÕES DE ANÁLISE DO ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO DA PELE SAUDÁVEL E DA PELE DIABÉTICA. 44

FIGURA 2. REGIÃO DE ESTUDO DA FASE CLÍNICA DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO COM O USO DA FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA ACRESCIDAS OU NÃO DO ATIVO POR 90 DIAS. ... 45

FIGURA 3. COMPARAÇÃO DOS VALORES DE TEXTURA OBTIDOS ENTRE AS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS ANALISANDO OS PARÂMETROS DE FIRMEZA, CONSISTÊNCIA, COESIVIDADE E ÍNDICE DE VISCOSIDADE. 50

FIGURA 4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO E DA FORMULAÇÃO GEL CREME VEÍCULO EM TEMPERATURA AMBIENTE. 51

FIGURA 5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO E DA FORMULAÇÃO GEL CREME VEÍCULO EM TEMPERATURA 5°C. 51

FIGURA 6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO E DAS FORMULAÇÕES GEL CREME VEÍCULO EM TEMPERATURA 45°C. 51

FIGURA 7. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO E DAS FORMULAÇÕES GEL CREME CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA EM TEMPERATURA AMBIENTE. 52

FIGURA 8. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO E DAS FORMULAÇÕES GEL CREME CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA EM 5°C. 52

FIGURA 9. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO DAS FORMULAÇÕES GEL CREME CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA EM 45°C. 52

FIGURA 10. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO DAS FORMULAÇÕES GEL CREME CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DO ATIVO DE ALGA VERMELHA E DA SEMENTE DE GIRASSOL EM TEMPERATURA AMBIENTE. 53

FIGURA 11. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO DAS FORMULAÇÕES GEL CREME CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DO ATIVO DE ALGA VERMELHA E DA SEMENTE DE GIRASSOL EM 5°C. 53

FIGURA 12. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VISCOSIDADE MÍNIMA APARENTE, ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA E ÍNDICE DE FLUXO DAS FORMULAÇÕES GEL CREME CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DO ATIVO DE ALGA VERMELHA E DA SEMENTE DE GIRASSOL EM 45ºC. 53

FIGURA 13. COMPORTAMENTO REOLÓGICO NO PERÍODO DE 56 DIAS (T56) EM INTERVALOS DE 7 DIAS, DA FORMULAÇÃO VEÍCULO, NAS TEMPERATURAS AMBIENTE (A), 45ºC (B) E 5ºC (C). 54

FIGURA 14. COMPORTAMENTO REOLÓGICO NO PERÍODO DE 56 DIAS (T56) EM INTERVALOS DE 7 DIAS, DA FORMULAÇÃO VEÍCULO, NAS TEMPERATURAS AMBIENTE (A), 45ºC (B) E 5ºC (C). 54

FIGURA 15. COMPORTAMENTO REOLÓGICO NO PERÍODO DE 56 DIAS (T56) EM INTERVALOS DE 7 DIAS, DA FORMULAÇÃO VEÍCULO, NAS TEMPERATURAS AMBIENTE (A), 45ºC (B) E 5ºC (C). 55

FIGURA 16. COMPARAÇÃO DA PERDA TRANSEPIDÉRMICA DE ÁGUA ENTRE O GRUPO SAUDÁVEL E GRUPO DIABÉTICO NA REGIÃO PERIORBITAL DA FACE. **SIGNIFICANTE (P = 0,009). 55

FIGURA 17. COMPARAÇÃO DA PERDA TRANSEPIDÉRMICA DE ÁGUA ENTRE O GRUPO SAUDÁVEL E GRUPO DIABÉTICO NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE. *SIGNIFICANTE (P = 0,03). 56

FIGURA 18. COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO AQUOSO DE ÁGUA NA PELE (HIDRATAÇÃO) ENTRE O GRUPO SAUDÁVEL E GRUPO DIABÉTICO NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE 56

FIGURA 19. COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO AQUOSO DE ÁGUA NA PELE (HIDRATAÇÃO) ENTRE O GRUPO SAUDÁVEL E GRUPO DIABÉTICO NA REGIÃO PERIORBITAL DA FACE. 57

FIGURA 20. COMPARAÇÃO DA COLORAÇÃO DA PELE ENTRE O GRUPO SAUDÁVEL E GRUPO DIABÉTICO NA REGIÃO PERIORBITAL (A) E NASOLABIAL (B) DA FACE. *SIGNIFICANTE (P = 0.04 E P = 0.02, RESPECTIVAMENTE). 57

FIGURA 21. COMPARAÇÃO ENTRE VOLUME, ÁREA E PROFUNDIDADE DAS RUGAS NA REGIÃO PERIORBITAL (A, B, C) ENTRE O GRUPO SAUDÁVEL E DIABÉTICO E PROFUNDIDADE NA REGIÃO NASOLABIAL (D) DA FACE. SIGNIFICANTE (***P = 0.0002; **P = 0.005, *P = 0.0235). 58

FIGURA 22. COMPARAÇÃO DO PARÂMETRO DE PIXELS HIPOECOGÊNICO ENTRE OS GRUPOS COM PARTICIPANTES SAUDÁVEIS E DIABÉTICOS NA REGIÃO NASOLABIAL ANALISADA. MAIORES VALORES PIXELS HIPOECOGENICOS INDICA MAIORES ALTERAÇÕES NA DERME. *SIGNIFICANTE (P=0.04). 59

FIGURA 23. AVALIAÇÃO DA RAZÃO DA ECOGENICIDADE DA DERME - NÚMERO DE PIXELS

hipoecogenicos/ número de pixels totais entre os grupos com participantes saudáveis e diabéticos na região nasolabial. da face. * Significante (p=0.04). 59

Figura 24. Comparação da avaliação do parâmetro R5 – elasticidade da pele (retração imediata/ distensão imediata - Ur/Ue) da região nasolabial entre o grupo saudável e diabético *** Significante (p=0.0002). 60

Figura 25. Imagens reoresentativas obtidas pelo MCR – As setas indicam a presenta de colágeno grosseiro e amontoado no grupo diabético (A) e a presença de colágeno reticulado no grupo saudável (B). 61

Figura 26. Imagens representativa obtidas pelo MCR da região de junção derma-epidérmica no grupo diabético (A) e no grupo saudável (B). As setas evidenciam a presenta das papilas policíclicas em maior quantidade no grupo diabética do que no grupo saudável. z=126 µm 61

Figura 27. Comparação da profundidade da papila dérmica entre o grupo saudável e diabético. Significante (*p=0.03). 62

Figura 28. Conteúdo aquoso do estrato córneo da região nasolabial da face, sendo V01 S - o grupo saudável e V01 D ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos. 62

Figura 29. Distribuição da hidratação da superfície da pele representados pelos índices Gray Index T e MGL, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos..... 63

Figura 30. Imagem representativa da topografia da distribuição da água na superfície da pele das participantes de pesquisa diabéticas no tempo basal (A), após 45 dias de uso do produto (B) e após 90 dias (C). 65

Figura 31. Imagem representativa da topografia da distribuição da água na superfície da pele das participantes de pesquisa saudáveis no tempo basal (A), após 45 dias de uso do produto (B) e após 90 dias (C). 65

Figura 32. Perda transepidérmica de água na região nasolabial da face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos. 66

Figura 33. Avaliação do pH da pele na região nasolabial da face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos. 66

Figura 34. Avaliação do parâmetro Ser, que indica a rugosidade da pele (A), na

REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SESC (B), QUE INDICA A DESCAMAÇÃO DA PELE, SESM, QUE INDICA A MACIEZ DA PELE (C) E SEW, QUE AVALIA AS RUGAS PRESENTES NA PELE (D) NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO V01 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V01 D, O RUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS 67

FIGURA 35. RELAÇÃO DO NÚMERO DE PIXELS HIPOECOGÊNICOS NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V01 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V01 D, OGRUPO DIABÉTICO, QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS. SIGNIFICANTE (**P=0.0414). MAIORES VALORES PIXELS HIPOECOGÊNICOS MOSTRA MAIS DANOS NA PELE. 68

FIGURA 36. AVALIAÇÃO DA ECOGENICIDADE DA PELE EM RELAÇÃO DO NÚMERO DE PIXELS HIPOECOGÊNICOS PELO NÚMERO DE PIXELS TOTAIS, NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V01 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V01 D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS. SIGNIFICANTE (**P=0.0070)... 69

FIGURA 37. ESPESSURA DA DERME EM MILÍMETROS (MM) NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V01 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V01 D, OGRUPO DIABÉTICO, QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOSS. 69

FIGURA 38. IMAGEM DO ULTRASSOM DE ALTA FREQUÊNCIA NA REGIÃO NASOLABIAL DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO DIABÉTICAS NO TEMPO INICIAL (A), APÓS 45 DIAS (B) E APÓS 90 DIAS (C) DE USO DA FORMULAÇÃO CONTENDO ASSOCIAÇÃO DOS EXTRATOS. 70

FIGURA 39. AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO R0, QUE INDICA A DISTENSÃO TOTAL DA PELE (A), R1, QUE INDICA A DEFORMAÇÃO RESIDUAL (B), R2, QUE INDICA A VISCOELASTICIDADE (C), R5, QUE INDICA A ELASTICIDADE NET (D), R6, QUE INDICA A PORÇÃO DA VISCOELASTICIDA (E) E R7, QUE INDICA A ELASTICIDADE BIOLÓGICA DA PELE (F) NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V01 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V01 D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS..... 71

FIGURA 40. CONTEÚDO AQUOSO DO ESTRATO CÓRNEO DA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA (*P=0.0175) 72

FIGURA 41. DISTRIBUIÇÃO DA HIDRATAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA PELE REPRESENTADOS PELOS ÍNDICES GRAY INDEX T E MGL, SENDO D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O EXTRATO DE ALGA VERMELHA. 73

FIGURA 42. IMAGEM REPRESENTATIVA DA TOPOGRAFIA DA DISTRIBUIÇÃO DA ÁGUA NA SUPERFÍCIE DA PELE DAS PARTICIPANTES DE PESQUISA DIABÉTICAS NO TEMPO BASAL (A), APÓS 45 DIAS DE USO DO PRODUTO (B) E APÓS 90 DIAS (C). 73

FIGURA 43. PERDA TRANSEPIDÉRMICA DE ÁGUA NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO D, O GRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O EXTRATO DE ALGA VERMELHA. 74

FIGURA 44. AVALIAÇÃO DO PH DA PELE NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA. 74

FIGURA 45. AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO SER, QUE INDICA A RUGOSIDADE (A), SESC, QUE INDICA A DESCAMAÇÃO (B), SESM, QUE INDICA A MACIEZ (C) E SEW, QUE AVALIA AS RUGAS (D) NA PELE SENDO D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA. 75

FIGURA 46. RELAÇÃO DO NÚMERO DE PIXELS HIPOECOGÊNICOS NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO D, OGRUPO DIABÉTICO, QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O EXTRAO DE ALGA VERMELHA. SIGNIFICANTE (***P=0.0001). MAIORES VALORES PIXELS HIPOECOGÊNICOS MOSTRA MAIS DANOS NA PELE. 76

FIGURA 47. AVALIAÇÃO DA ECOGENICIDADE DA PELE EM RELAÇÃO DO NÚMERO DE PIXELS HIPOECOGÊNICOS PELO NÚMERO DE PIXELS TOTAIS, NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO COM O EXTRATO DE ALGA VERMELHA. SIGNIFICANTE (**P=0.0045; ****P=<0.0001). 77

FIGURA 48. ESPESSURA DA DERME EM MILÍMETROS (MM) NA REGIÃO NASOLABIAL FACE SENDO D, OGRUPO DIABÉTICO, QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA. 77

FIGURA 49. IMAGEM DO ULTRASSOM DE ALTA FREQUÊNCIA NA REGIÃO NASOLABIAL DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO DIABÉTICAS NO TEMPO INICIAL (A), APÓS 45 DIAS (B) E APÓS 90 DIAS (C) DE USO DA FORMULAÇÃO CONTENDO O EXTRATO DE ALGA VERMELHA. 78

FIGURA 50. AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO R0, QUE INDICA A DISTENSÃO TOTAL DA PELE (A), R1, QUE INDICA A DEFORMAÇÃO RESIDUAL (B), R2, QUE INDICA A VISCOELASTICIDADE (C), R5, QUE INDICA A ELASTICIDADE NET (D), R6, QUE INDICA A PORÇÃO DA VISCOELASTICIDADE(E) E PARÂMETRO R7, QUE INDICA A ELASTICIDADE BIOLÓGICA DA PELE, NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO D O GRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO CONTENDO O ATIVO DE ALGA VERMELHA. 79

FIGURA 51. CONTEÚDO AQUOSO DO ESTRATO CÓRNEO DA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO V03 S - O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. SIGNIFICANTE (*P=0.0241; ***P=0.0002). 80

FIGURA 52. DISTRIBUIÇÃO DA HIDRATAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA PELE REPRESENTADOS PELOS

ÍNDICES GRAY INDEX T E MGL, SENDO V03 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. 81

FIGURA 53. IMAGEM REPRESENTATIVA DA TOPOGRAFIA DA DISTRIBUIÇÃO DA ÁGUA NA SUPERFÍCIE DA PELE DAS PARTICIPANTES DE PESQUISA DIABÉTICAS NO TEMPO BASAL (A), APÓS 45 DIAS DE USO DO PRODUTO (B) E APÓS 90 DIAS (C). 81

FIGURA 54. IMAGEM REPRESENTATIVA DA TOPOGRAFIA DA DISTRIBUIÇÃO DA ÁGUA NA SUPERFÍCIE DA PELE DAS PARTICIPANTES DE PESQUISA SAUDÁVEIS NO TEMPO BASAL (A), APÓS 45 DIAS DE USO DO PRODUTO (B) E APÓS 90 DIAS (C). 81

FIGURA 55. PERDA TRANSEPIDÉRMICA DE ÁGUA NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO V03 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. 83

FIGURA 56. AVALIAÇÃO DO PH DA PELE NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO V03 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. 83

FIGURA 57. AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO SER, QUE INDICA A RUGOSIDADE DA PELE (A), SESC, QUE INDICA A DESCAMAÇÃO (B), SESM, QUE INDICA A MACIEZ (C) E SEW (D) QUE AVALIA AS RUGAS PRESENTES DA PELE, NA REGIÃO NASOLABIAL DA FACE, SENDO V03 O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. 84

FIGURA 58. RELAÇÃO DO NÚMERO DE PIXELS HIPOECOGÊNICOS NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V03 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, OGRUPO DIABÉTICO, QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. MAIORES VALORES PIXELS HIPOECOGÊNICOS MOSTRA MAIS DANOS NA PELE. 85

FIGURA 59. AVALIAÇÃO DA ECOGENICIDADE DA PELE EM RELAÇÃO DO NÚMERO DE PIXELS ECOGÊNICOS PELO NÚMERO DE PIXELS TOTAIS, NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V03 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, O GRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. 86

FIGURA 60. ESPESSURA DA DERME EM MILÍMETROS (MM) NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V03 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, OGRUPO DIABÉTICO, QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. 86

FIGURA 61. IMAGEM DO ULTRASSOM DE ALTA FREQUÊNCIA NA REGIÃO NASOLABIALL DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO DIABÉTICAS NO TEMPO INICIAL (A), APÓS 45 DIAS (B) E APÓS 90 DIAS (C) DE USO DA FORMULAÇÃO VEÍCULO. 87

FIGURA 62. AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO R0, QUE INDICA A DISTENSÃO TOTAL DA PELE (A); R1, QUE INDICA A DEFORMAÇÃO RESIDUAL (B); R2, QUE INDICA A VISCOELASTICIDADE

(C); R5, QUE INDICA A ELASTICIDADE NET (D); R6, QUE INDICA A PORÇÃO DA VISCOELASTICIDADEDA (E) E R7, QUE INDICA A ELASTICIDADE BIOLÓGICA (F) NA REGIÃO NASOLABIAL FACE, SENDO V03 S, O GRUPO SAUDÁVEL E V03 D, OGRUPO DIABÉTICO QUE UTILIZOU A FORMULAÇÃO VEÍCULO. 88

FIGURA 63. AVALIAÇÃO POR ESCORE DA QUALIDADE DO COLÁGENO NAS PARTICIPANTRES DE ESTUDO SAUDÁVEIS E DIABÉTICAS, NO GRUPO QUE UTILIZOU POR 90 DIAS A FORMULAÇÃO CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS (P=0.0043)..... 89

FIGURA 64. IMAGEM DO MRC DO COLÁGENO DAS PARTICIPANTES DE ESTUDO DIABÉTICAS SENDO (A), O TEMPO INICIAL ANTES DO USO DA FORMULAÇÃO E (B), APÓS 90 DIAS DO ESTUDO. O CIRCULO REPRESENTA O COLÁGENO DISUNFUNCIONAL, AMORFO E GROSSEIRO, E AS SETAS MOSTRAM A MELHORA VISUAL DO COLÁGENO COM O USO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS, NÃO APARENTANDO HIPOREFLEXIVO..... 90

FIGURA 65. IMAGEM MCR DA JUNÇÃO DERMEEPIDÉRMICA, ONDE O CÍRCULO EM A MOSTRA A PRESENÇA DE MÚLTIPLAS PAPILAS POLICÍCLICAS E B, UMA PAPILA MAIS DEFINIDA DEVIDO AO AUMENTO DA PROFUNDIDADE DAS PAPILAS. 90

FIGURA 66. AVALIAÇÃO DAS IMAGENS DE MCR DO BRILHO INTERQUERATINÓCITOS NO TEMPO INICIAL (A) DO ESTUDO E APÓS 90 DIAS (B) COM O USO DA FORMULAÇÃO ACRESCIDA COM AMAS SUBSTAÂNCIAS ATIVAS..... 91

FIGURA 67. AVALIAÇÃO POR ESCORE DA QUALIDADE DO COLÁGENO NAS PARTICIPANTES DE ESTUDO DIABÉTICAS, NO GRUPO QUE UTILIZOU POR 90 DIAS A FORMULAÇÃO VEÍCULO.92

FIGURA 68. IMAGEM DO MRC DO COLÁGENO, REPRESENTADO PELAS SETAS, DAS PARTICIPANTES DE ESTUDO DIABÉTICAS SENDO (A), O TEMPO INICIAL ANTES DO USO DA FORMULAÇÃO E (B), APÓS 90 DIAS DO ESTUDO. NO CÍRCULO DESTACA A PRESENÇA DE UMA PAPILA DÉRMICA REGULAR (A), E APÓS 90 DIAS PODE-SE PERCEBER A PRESENÇA DE PAPILAS POLICÍCLICAS (B). 92

FIGURA 69. AVALIAÇÃO DAS IMAGENS DE MCR DO BRILHO INTERQUERATINÓCITOS NO TEMPO INICIAL (A) DO ESTUDO E APÓS 90 DIAS (B) COM O USO DA FORMULAÇÃO ACRESCIDA COM AMAS SUBSTAÂNCIAS ATIVAS..... 93

FIGURA 70. AVALIAÇÃO DA PERCEPÇÃO SENSORIAL IMEDIATO DAS TRÊS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS: V01, ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS; V02, ACRESCIDO DE EXTRATO DE ALGA VERMELHA E V03 VEÍCULO. 95

FIGURA 71. AVALIAÇÃO DA PERCEPÇÃO SENSORIAL APÓS 5 MINUTOS DE APLICAÇÃO DAS TRÊS FORMULAÇÕES OBTIDAS: V01, ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS; V02, ACRESCIDO DE EXTRATO DE ALGA VERMELHA E V03 VEÍCULO. 95

FIGURA 72. AVALIAÇÃO DA ESCOLHA DE QUAL FORMULAÇÃO AGRADOU MAIS AS PARTICIPANTES DE PESQUISA. 96
FIGURA 73. PESQUISA DE INTENÇÃO DE COMPRA DA FORMULAÇÃO. 96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MATÉRIAS PRIMAS E SUAS CONCENTRAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE GEL CREME. 37

TABELA 2. AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH DA FORMULAÇÃO GEL CREME VEÍCULO EM TEMPERATURA AMBIENTE, DE 45ºC E DE 5ºC, RESPECTIVAMENTE. 48

TABELA 3. AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH DA FORMULAÇÃO GEL CREME CONTENDO O SUBSTÂNCIA ATIVA DE ALGA VERMELHA EM TEMPERATURA AMBIENTE, 45ºC E DE 5ºC, RESPECTIVAMENTE. 49

TABELA 4. AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH DA FORMULAÇÃO GEL CREME CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DE SUBSTÂNCIA ATIVA DE ALGA VERMELHA E SEMENTE DE GIRASSOL EM TEMPERATURA AMBIENTE, DE 45ºC E DE 5ºC, RESPECTIVAMENTE. 49

TABELA 5. COMPARAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS NA ANÁLISE DE ESPALHABILIDADE ENTRE AS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS. 50

TABELA 6. ESPESSURA DAS CAMADAS DA EPIDERME DAS PARTICIPANTES DIABÉTICAS DO ESTUDO ANTES (BASAL) E APÓS 90 DIAS DE APLICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES VEÍCULO E COM ASSOCIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS. (* SIGNIFICANTE EM RELAÇÃO AO VALOR BASAL – T0, P<0,05) 94

LISTA DE SÍMBOLOS

^{o}C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
%	Porcentagem
µ	Micro
mm	Milímetro

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Advanced glycation end products
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
MCR	Microscopia Confocal de Reflexão
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2

SUMÁRIO

RESUMO ..... **I**

ABSTRACT ..... **II**

LISTA DE FIGURAS ..... **III**

LISTA DE TABELAS ..... **VIII**

LISTA DE SÍMBOLOS ..... **X**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **IX**

1 INTRODUÇÃO **22**

2 REVISÃO DA LITERATURA **25**

2.1 PELE E O PROCESSO DE GLICAÇÃO 25

2.2 EXTRATOS ANTIGLICANTES DE ORIGEM NATURAL EM PRODUTOS COSMÉTICOS 28

2.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS 29

2.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS 31

3 OBJETIVO **35**

4 MATERIAL E MÉTODOS **37**

4.1. PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES 37

4.1.1 Desenvolvimento das formulações 37

4.1.2 Testes preliminares de estabilidade 37

4.1.3 Determinação do perfil de textura das formulações 38

4.1.4 Avaliação do comportamento reológico das formulações gel creme 38

4.2 CASUÍSTICA E MÉTODOS 39

4.2.1 Triagem das participantes 39

4.2.2 Instrumentação – Técnicas de biofísica e análise de imagem 40

4.2.2.1 Determinação do microrrelevo cutâneo 40

4.2.2.2 Avaliação das características colorimétricas da pele 40

4.2.2.3 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo 41

4.2.2.4 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

41
4.2.2.5Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele 41
4.2.2.6Avaliação linhas, rugas e homogeneidade na textura da pele. 42
4.2.2.7Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência 42
4.2.2.8Avaliação das propriedades mecânicas da pele - viscoelasticidade 42
4.2.2.9Avaliação das características morfológicas e estruturais da pele 43
4.2.3 Avaliação da caracterização da pele saudável e pele diabética 43
4.2.4 Estudo clínico das formulações desenvolvidas a longo prazo 44
4.2.5 Avaliação sensorial das formulações, percepção de eficácia da formulação e intenção de compra 45
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS 45
5 RESULTADOS 48
5.1 PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES 48
5.1.1 Desenvolvimento das formulações 48
5.1.1.1Testes preliminares de estabilidade 48
5.1.1.2Determinação do perfil de textura das formulações 49
5.1.1.3Avaliação do comportamento reológico das formulações gel creme 50
5.2 CARACTERIZAÇÃO PELE SAUDÁVEL E PELE DIABÉTICA 55
5.2.1 Determinação da perda transepidérmica da água –TEWL 55
5.2.2 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo 56
5.2.3 Avaliação da coloração da pele 57
5.2.4 Avaliação dos parâmetros de volume, área e profundidade das rugas da pele por imagens de alta resolução 58
5.2.5 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência

58
5.2.6 Avaliação das propriedades mecânicas da pele – viscoelasticidade..... 59
5.2.7 Avaliação das características morfológicas e estruturais da pele..... 60
5.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CLÍNICOS A LONGO PRAZO DO GRUPO V01 62
5.3.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo..... 62
5.3.2 Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele 63
5.3.3 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)..... 65
5.3.4 Determinação do pH da pele..... 66
5.3.5 Determinação do microrrelevo cutâneo 67
5.3.6 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência 67
5.3.7 Avaliação das propriedades mecânicas da pele – viscoelasticidade..... 70
5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CLÍNICOS A LONGO PRAZO DO GRUPO V02..... 71
5.4.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo..... 71
5.4.2 Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele 72
5.4.3 Determinação da perda transepidérmica da água (TEWL)..... 73
5.4.4 Determinação do pH da pele..... 74
5.4.5 Determinação microrrelevo cutâneo 75
5.4.6 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência 75
5.4.7 Avaliação das propriedades mecânicas da pele - viscoelasticidade 78
5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CLÍNICOS A LONGO PRAZO DO GRUPO V03 79
5.5.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo..... 79
5.5.2 Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele 80
5.5.3 Determinação da perda transepidérmica da água (TEWL)..... 82
5.5.4 Determinação do pH da pele..... 83
5.5.5 Determinação do microrrelevo cutâneo 84
5.5.7 Avaliação das propriedades mecânicas da pele – viscoelasticidade..... 87
5.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA A LASER 88
5.7 AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES, PERCEPÇÃO DE EFICÁCIA DA FORMULAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA 94
6 DISCUSSÃO 98
7 CONCLUSÃO 108

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 110

9 ANEXOS 117

1. INTRODUÇÃO

No envelhecimento, o expossoma está diretamente relacionado com a poluição, radiação solar, fumo, temperatura, alimentação, nível de estresse, falta de sono e fadiga (MISRA, 2020). O envelhecimento intrínseco é representado por alterações na estrutura da pele, alterações bioquímicas, redução da proliferação celular e outros (TOBIN, 2017). A consequência do envelhecimento cutâneo fisiológico é percetível pois há um afinamento da epiderme e a capacidade de renovação celulcar é reduzida. Há um afrouxamento da junção dermoepidérmica, bem como, uma desorganização das fibras colágenos da derme (BOISMAL et al., 2020)

O processo de envelhecimento intrínseco pode ocorrer por processos de oxidação que resultam na formação e liberação de radicais livres responsáveis por causar danos ao DNA e pelo processo de glicação. O processo de glicação é derivado de uma reação aminocarbonílica não enzimática estruturada a partir de interações entre açúcares e proteínas reduzidos (MARTIN et al., 2016). Esses processos acontecem de forma mais intensa e rápida em situações de hiperglicemia, que ocorre em pessoas com Diabetes Mellitus (TOBIN, 2017).

Dessa forma, as complicações cutâneas são comuns em indivíduos com diabetes, uma vez que, a insulina é tida como um fator de crescimento para os queratinócitos cultivados e sua importância para na proliferação, migração e diferenciação destes acarretam fenótipos malformados de queratinócitos em pessoas diabéticas. Por isso, há a suposição que a anormalidade da proliferação e diferenciação dos queratinócitos na epiderme de indivíduos com diabetes perturba a função do estrato córneo. Com isso, há a hipótese é que a hiperglicemia este relacionada a perda de função da insulina em pacientes com Diabetes Mellitus resultando em um estado de hidratação reduzido do estrato córneo juntamente com a diminuição da atividade das glândulas sebáceas (SEIRAFI et al. 2009).

Os produtos de glicação avançada - AGEs são encontrados em vários tipos de tecidos durante o envelhecimento, como nos músculos vasculares esqueléticos e lisos, nas membranas basais e no colágeno articular, entre outros (GKOGKOLOU & BÖHM,2012). Os AGEs endógenos são formados mais rapidamente em pessoas que têm Diabetes, devido à alta concentração de açúcar circulante no sangue, que gera maior degradação no colágeno e, consequentemente, os sinais de envelhecimento são mais perceptíveis e acentuados.

Na pele que apresenta os AGEs são encontradas variações na homeostase de funcionamento da barreira cutânea. Os portadores de diabetes apresentam um decréscimo na hidratação do estrato córneo, uma demora maior no tempo de recuperação da pele após alguma lesão, diminuição da síntese lipídica e uma diminuição da microbiota (GHADIALLY et al., 1996; CHOI et al., 2007; PARK et al., 2011).

Assim, as propostas de produtos anti-AGE estão sendo estudadas na área farmacêutica e cosmética, com o objetivo de desenvolver novos compostos com características anti envelhecimento (GKOGKOLOU & BÖHM,2012). A deposição dos produtos AGEs na pele é observado com uma significância muito maior em pessoas diabéticas quando comparadas com pessoas saudáveis (MAKRANTONAKI et al., 2016) o que faz com que esse grupo seja alvo de interesse em estudos de avaliação da eficácia de produtos dermocosméticos com aplicação de substâncias ativas com atividade antiglicantes, sendo assim, um bom alvo para a realização de estudos clínicos relacionados ao processo de glicação utilizando técnicas não invasivas.

Nesse contexto, estudos clínicos por medidas instrumentais não invasivas, como as técnicas avançadas de biofísica e imagem da pele, na pele de portadores de diabetes são de grande valia para a avaliação de alterações cutâneas decorrentes do processo de glicação, bem como para a avaliação da eficácia de antiglicantes tópicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele e o processo de glicação

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e é responsável por cerca de 16% do peso corporal. Tem como uma das duas principais funções, a preservação das estruturas internas do contato com o meio externo. É constituída por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, sendo a derme a mais profunda, composta por tecido conjuntivo denso irregular. (Ana Flavia cunha et al., 2019).

Ela se localiza entre a epiderme e o tecido subcutâneo, há uma alta concentração de fibras de colágeno e elastina que ajuda a promover a sustentação da epiderme e tem como objetivo a participação nos processos fisiológicos e patológicos do órgão cutâneo (TASSINARY, 2019).

Um dos mecanismos de envelhecimento estudados recentemente é a glicação, que é causada pela reação de Maillard, cuja envolve uma reação química não enzimática entre uma redução de um açúcar e uma proteína. A primeira pessoa a observar essa reação foi o Louis-Camille Maillard em 1912 quando ele notou que os aminoácidos reagiram com açúcar para criando compostos acastanhados. Quando ocorre esse mecanismo inicia-se uma série de reações química que faz um “cross-linking”com as proteínas são denominadas de produtos finais de glicação avançada e são acumulados durante a vida (BAUMANN,2018).

A doença Diabetes Melittus atinge mais de 8,5% da população adulta; associado a um número de mortes superior a 3,7 milhões por ano (WHO, 2016). Diabetes Mellitus ou doença do açúcar é uma doença cronica metabólica caracterizada por um aumento no nível de açúcar o sangue e uma disfuncionalidade no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas devido a uma insuficiência de produção e/ou ação de insulina (NERMINA et al., 2020).

Estudos mostram que mais que 90% dos casos de Diabetes Mellitus são do tipo 2 que a doença é a nona causa de redução de expectativa de vida (YAN et al., 2017). Em 2010 estimou-se que cerca de 3.96 milhões de adultos entre 20-79 anos morreram em decorrência da doença que a previsão é que em 2030 haj mais de 366 milhões de pessoas portadoras de diabetes no mundo (BEAGLEY et al., 2013; IDF, 2015; ZIMMET, 2017).

O aumento da glicose sérica causa danos em uma gama diversificada de células, incluindo células endoteliais, neurológias, renal e também queratinócitos e fibroblastos (LIMA et al., 2017). As complicações cutâneas são comuns em indivíduos com diabetes, uma vez que, a insulina é tida como um fator de crescimento para os queratinócitos cultivados e sua importância para na proliferação, migração e diferenciação destes acarretam fenótipos malformados de queratinócitos em pessoas diabéticas. Por isso, há a suposição que a anormalidade da proliferação e diferenciação dos queratinócitos na epiderme de indivíduos com diabetes perturba a função do estrato córneo (SPRAVCHIKOV et al., 2001; WERTHEIMEr et al., 2001).

O colágeno pode ser considerado a proteína mais importante para a pele, uma vez que é essencial para a estrutura e função da matriz extracelular na derme. Os tipos I e III de colágenos são os mais abundantes na pele representando na faixa de 85-90% e 8-11% respectivamente (MAIA CAMPOS et al., 2015*)*. É uma proteína fundamental para a estrutura, aparência e função derme, um envelhecimento normal faz com que a pele seja mais fina e apresente aparência mais enrugada. As ligações cruzadas tornando o colágeno disfuncional fazendo com que a pele se torne mais rígida e pessoas diabéticas são mais suscetíveis no aceleramento do envelhecimento devido ao alto nível de açúcar no sangue (DANIEL et al., 2002). Diversos estudos mostram os efeitos biológicos da glicação em sistemas de matrix extracelular in vitro que atingem principalmente as proteínas de colágeno tipo IV (PUGLIESE et al., 1997; PAGEON et al., 2008).

A elastina é outra proteína que também pode ser prejudicada pela glicação. A pele fotoenvelhecida é conhecida pela capacidade anormal de formar anormal agregados conhecidos por elastose que geralmente é referente a degradação solar, porém recentemente pesquisas descobriram que esses aglomerados são possivelmente causados por glicação. Isso se deve a elastina ser aderente, rígido e desprovido de sua elasticidade usual, que é provavelmente a razão pela qual as pessoas diabéticas estão associadas ao aumento do envelhecimento da pele em comparação com controles normais. Com isso, o colágeno e a elastina tem um papel importante na glicação no que diz respeito ao envelhecimento da pele. a glicação provavelmente desempenha um papel no dano visto no colágeno e elastina de pele envelhecida (Pageon et al. 2007; Baumann, 2018).

2.2 Extratos antiglicantes de origem natural em produtos cosméticos

A palavra “cosmético” Kosmetos que significa ornamento vem do grego. Desde o Egito antigo, a sociedade fazia o uso de oléos e cremes para proteção térmica contra o calor do deserto e contra outras adversidades climáticas, como vento. Eram utilizadas plantas como thyme (*Thymus L*.), marjoram (*Mentha L*.), chamomile (*Matricaria L*.), lavender (*Lavandula L*.), lily (*Liliaceae*), peppermint (*Mentha L*.), rosemary (*Rosmarinus officinalis L*.), cedar (*Cedrus libani A. Rich*), rose (*Rosa L*.) (Francisco et al., 2018).

Os agentes antioxidantes são responsáveis pela inibição e consequentemente na redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Entre os agentes antioxidantes clássicos podemos citar a vitamina A, vitamina C e vitamina E (STEINER, 2002). Além disso, extratos de origem vegetal são alvo de interesse pela comunidade cientifica, bem como da indústria cosmética, visto que apresentam composição rica em compostos com atividade antioxidante e outros compostos benéficos para a estrutura da pele, tendo grande potencial para aplicação em produtos de uso tópico. Como exemplo, folhas de *Morus nigra L.* foram estudadas e observou-se que seu extrato possui grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente flavonoides que apresentam forte efeito antioxidante (ALMEIDA-CINCOTTO et al., 2016).

Diversos outros extratos naturais vêm sendo estudados e apresentam sua atividade antioxidante comprovada, tais como extrato de folhas de Goiabeira (*Psidium guajava*); extrato de Jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*), planta do bioma da Caatinga e extrato da polpa de Umbu (*Spondias tuberosa*), um fruto do Nordeste Brasileiro (COELHO et al., 2016; ALVES et al., 2017; ZERAIK et al., 2016).

Thirunavukkarasu et al., 2004; Dearlove et al., 2008, relatam que alguns temperos utilizados no cotidiano, como a canela, cravo, orégano, podem ser alvos de estudo como substâncias antiglicantes por modificações na estrutura da frutose. Outros ingredientes como gengibre, taurina, cartinina também são alvos de estudo como substâncias ativas antiglicantres, porém seu mecanismo de ação ainda não está bem ilucidado.

Existem diversos ativos propostos com atividade antiglicantes, como extrato

hidroalcoólico de Chorão-das-praias (*Carpobrotus edulis*), uma planta oriunda da África do sul (HAFSA et al. 2016); extrato de Ivy Gourd (*Coccinia grandis*), que possui um efeito significativo antiglicante, assim como antioxidante (MEENATCHI et al 2016); extrato de alho (*Allium Sativum*) envelhecido, que quando comparado com extrato de alho fresco obteve um potencial antiglicação muito significativo (ELOSTA et al. 2017), porém a maioria dos estudos foram realizados em modelos animais, e quando em *in vivo* apresentam resultados não conclusivos e por isso o presente estudo é importante.

O extrato de semente de girassol (*Helianthus annuus*) é rico em ácidos fenólicos, apresentando ação anti radicais livres (ROCHA-FILHO et al. 2016) e, segundo (SILAB,2016), apresenta potencial para inibição das reações de glicação, uma vez que, o mecanismo de ação dos agentes antiglicantes é a inibição da reação do açúcar com a proteína (colágeno). Além disso, a fração glicopeptídica desse extrato limita a ligação cruzada que faz as fibras de colágenos tornarem-se rígidas (SILAB,2016), além da existência de estudo que comprovam sua atividade antioxidante (CHAKRABORTY et al.,2016).

O extrato de alga vermelha, proveniente da alga *Hypnea musciformis* é rico em galactanas sulfatadas e tem sido proposto como um ingrediente ativo inovador com potencial para proteger a pele da glicação por duas maneiras, por impacto celular e por impacto tecidual.

O impacto celular é proveniente da prevenção de alteração no citoesqueleto e preservação da atividade metabólica celular. No tecido o extrato atua na formação da rede de colágeno e fibrilina, bem como pode levar ao também aumento da elasticidade e firmeza cutânea (SILAB,2016).

Com isso a pesquisa e desenvolvimento de produtos cosméticos e dermocosméticos vem colaborar para o progresso da qualidade da vida através da aparência da pele (MAIA CAMPOS et al., 2019).

2.3 Desenvolvimento de formulações cosméticas

A etapa de Pesquisa e Desenvolvimento das formulações é uma das partes mais importantes dentro do projeto que deve ser feito com muito cuidado e atenção a escolha das matérias primas. Deve-se atentar sobre incompatibilidades químicas,

possíveis reações adversas que as participantes possam ter, garantir que as formulacoes desenvolvidas sejam estáveis, analisar seu perfil reológico, de textura e o sensorial para saber a aceitabilidade do produto.

A análise do perfil reológico e o de textura da formulação que será desenvolvia é um passo fundamental no P&D pois trará a noção de como a mesma irá se comportar após o acréscimo do ingrediente ativo, uma vez que, esse acréscimo pode haver mudança tanto no seu perfil de textura quanto no seu perfil de sensorial do seu público alvo e sua estabilidade (SILVA, et al., 2020).

A análise do perfil de textura das formulações vem sendo realizada por meio dos parâmetros de firmeza, coesividade, consistência, índice de viscosidade e trabalho de cisalhamento (SHIRATA et al. 2016; INFANTE et al. 2019)

O perfil de textura e o comportamento reológico mostram parâmetros que podem ser usados para avaliar a estabilidades das formulações desenvolvidas. É possível observar sinais de alterações nas propriedades físicas relacionadas ao valor de pH, temperatura e características organolépticas e propriedades reológicas (VICTOR et al., 2019).

Outro parâmetro que é de extrema importância para aderência ao tratamento é a avaliação do perfil sensorial, pois é um indicativo do que pode ser alterado na formulação para que seja melhor aceita. Além do que, a boa aceitação do produto desenvolvido é primordial para o sucesso do estudo (CALIXTO et al. 2018; MELO e MAIA CAMPOS, 2019).

A combinação do perfil de textura com a analise sensorial está sendo cada vez mais exploradas pelas indústrias cosméticas para analisar seu público alvo e saber a aceitabilidade do produto no mercado consumidor e assim ser um preditor do sucesso ou não do produto desenvolvido. (GILBERT, et al., 2013; CALIXTO e MAIA CAMPOS, 2017).

Por fim, a junção das técnicas de textura e reologia e análise sensorial de formulações contribuem no desenvolvimento de produtos cosméticos que sejam estáveis e possuam propriedades sensoriais aceitáveis com o público alvo para que foi desenvolvido.

2.4 Avaliação da eficácia clínica de formulações cosméticas

O protocolo de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de cosméticos tem como base, além dos estudos que avaliam a estabilidade e eficácia das formulações, a utilização de aparelhos não invasivos, como as técnicas de biofísica e de análise de imagem apresentam fornecem uma gama de informações em tempo real e ajudam na aplicabilidade e continuidade dos estudos (MAIA CAMPOS, et al., 2016).

Dentre as técnicas de biofísica da pele, cumpre destacar as que avaliam o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidérmica de água, as propriedades mecânicas da pele (viscoelasticidade e anisotropia), uma vez que, o processo de envelhecimento pode causar alterações no estrato córneo, que promovem um aumento da perda transepidérmica de água, bem como alteração das fibras de colágeno e elastina, decorrentes do processo de glicação resultando no aparecimento de rugas e outras alterações cutâneas.

Outros paramêtros analisados por meio das técnicas de biofísica da pele são: avaliação do microrrelevo, coloração, propriedades mecânicas, características morfológicas e estruturais da pele (GIANETI, et al., 2014; ANDRADE, et al., 2015; MERCURIO, et al., 2015).

A avaliação do conteúdo de água presente no estrato córneo é analisada através do Corneometer CM 825 (Courage & Kazaka), o qual a medida é resultado da capacitância elétrica que mede o nível de hidratação do estrato córneo. Outro equipamento também utilizado para avaliar a hidratação superficial da pele é o MoistureMap (Courage & Kazaka), cujo sensor fornece informações gráficas sobre a distribuição de hidratação e a microtopografia da pele, sendo possível obter imagens em tons de cinza dependendo a quantidade de agua presente naquela região (LEVEQUE & BERNARD, 2004).

A avaliação da perda transepidérmica de água é feita com o auxílio do equipamento Tewameter TM 210 (Courage & Kazaka), cuja função é medir a evaporação de águada superfície da pele. (ZHAI, et al., 2004; DAL'BELO, et al., 2006; TAKAGI, et al., 2015). O uso desses três equipamentos faz com que tenhamos resultados sobre a melhora das condições hidrolípicas da barreira cutânea, pois são análises complementares que mostra o efeito da formulação desenvolvida ao longo do tratamento.

Para a avaliação das propriedades viscoelásticas da pele é empregado o equipamento Cutometer® Dual MPA, equipado com uma com orifício de 4mm. O mecanismo do aparelho é através da leitura óptica que percebe a intensidade de penetração da pele no dispositivo. Uma pele mais flácida terá resultados bem diferentes de uma pele mais jovem enriquecida de colágeno pois esta irá ser sugada pelo orifício, quanto aquela entrará com mais facilidade demonstrando o quão envelhecida está. (YOO et al., 2014).

A avaliação do microrrelevo cutâneo é realizada com o equipamento Visioscan® VC98 (Courage & Khazaka, Alemanha), que analisa parâmetros como rugosidade, rugas, descamação e maciez da pele através do software interno SELS (*Surface Evaluation of the Living Skin*). O resultado obtido é uma imagem capturada por uma câmera de vídeo acrescido de uma lâmpada que emite luz violeta, que com diferentes tons de cinzas, onde os pontos escuros são correlacionados com a rugosidade e pontos claros, aos platôs do microrrelevo cutâneo. (MELO e MAIA CAMPOS, 2018).

Dentre as técnicas de análise de imagem, destacam-se o ultrassom de alta frequência (20 MHz) utilizado para avaliação da espessura e ecogenicidade da derme, assim como o microscópio confocal de reflectância a laser (Vivascope 1500), o qual permite a obtenção de imagens da epiderme e derme papilar e avaliação em nível próximo do histológico, de um modo não invasivo. Essas técnicas de imagem são consideradas uma inovação na aplicação da pesquisa clínica de cosméticos, por possibilitarem a avaliação das características da pele em tempo real (GIANETI, 2013).

A avaliação da ecogenicidade e espessura da derme é realizada utilizando um ultrassom de 20MHz (Dermascan® C, Cortex Technology). O software analisa a ecogenidade da pele por intermédio de pixels. Para calcular a ecogenicidade, o software mede os pixels hipoecogenicos em relação com o número total de pixels. Este parâmetro pode ser relacionado com retenção de água entre as fibras de colágeno, bem como com a densidade das fibras de colágeno na pele, permitindo a avaliação da região da derme (MERCURIO et al., 2016; FOSSA SHIRATA et al., 2019). Nas imagens obtidas é possível observar uma diferença de coloração, sendo visualmente perceptível o acompanhamento da melhora da pele. A escala de ecogenicidade da pele obtida pelo equipamento é: branco > vermelho > amarelo > verde > azul > preto, sendo que quanto mais próximo da coloração preta, pior é o

estado geral da pele.

O microscópio confocal de reflectância (Vivascope 1000®), é um equipamento inovador que permite a avaliação de alterações morfológicas e estruturais na pele, com a obtenção de imagens por um método não invasivo, sem a necessidade de biópsias. As imagens obtidas podem ter vários parâmetros como a espessura do estrato córneo, espessura média, mínima e máxima da epiderme viável, profundidade do sulco e a profundidade da papila dérmica, entre outros, que podem ser analisados em conjunto ou individualmente, dependendo do objetivo do estudo (MERCURIO et al., 2016; MERCURIO, et al., 2015).

O Vivascope permite visualizar modificações em vários parâmetros como na epiderme, morfologia celular e modificações no colágeno presente na matrix extracelular. As imagens fornecidas pelo microscópico de reflectância a laser nos fornece informações sobre espessura das camadas da epiderme, organização dos queratinócitos, mudanças no padrão de pigmentação, estrutura na rede de colágeno, entre outros (CAMPOS et al., 2017).

3. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo desenvolver e avaliar a eficácia clínica de formulações dermocosméticas com finalidades antiglicante acrescidas dos extratos aquosos de semente de girassol (*Helianthus annuus*) e de alga vermelha, *Hypnea musciformis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pesquisa e Desenvolvimento das formulações

4.1.1 Desenvolvimento das formulações

Foi desenvolvida uma formulação gel creme para os cuidados da pele com bases compatíveis com os diferentes tipos de pele, de forma a serem obtidas formulações estáveis e com características sensoriais adequadas às finalidades propostas. Foi adicionado ou não a concentração de 2% do extrato da alga vermelha ou 2 % de extrato de alga vermelha com 4% de extrato de girassol associação dos ativos na formulação final. As matérias primas e formulaçõesestão descritas na Tabela 1 de acordo com a nomenclatura INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*).

Tabela 1. Matérias primas e suas concentrações para o desenvolvimento da formulação de gel creme.

Composição (INCI)	V01	V02	V03
Cetearyl Alcohol (and) Polysorbate 60 (and) Cetearyl Glucoside	5	5	5
Myristyl Myristate	1	1	1
Caprylic/Capric Triglyceride	2	2	2
Propylene	3	3	3
Glycerin	6	6	6
Cetyl Acetate (and) Oleyl Acetate (and) Acetylated Lanolin Alcohol	1	1	1
Hypnea musciformis extract	2	2	
Helianthus annuus extract	4		
EDTA	0,1	0,1	0,1
BHT	0,1	0,1	0,1
Xylityl Sesquicaprylate	0,55	0,55	0,55
Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Butylparaben	0,25	0,25	0,25
Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer	1	1	1
Cyclopentasiloxane	1	1	1
Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7	2	2	2
Carbomer	4	4	4
Agua qsp 100			

4.1.2 Testes preliminares de estabilidade

As formulações em estudo foram submetidas a testes preliminares de

estabilidade por centrifugação, determinação de pH e avaliação visual semanal durante 28 dias, quando mantidas no ambiente e quando submetidas ao estresse térmico à 5°C e 45ºC. No teste de centrifugação, 5 gramas de cada amostra foram centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440, Fanem. A medida de pH foi realizada em peagômetro Analion, utilizando-se amostras diluídas em água destilada (10%) (DAVIS et al., 1977). Na avaliação visual foram consideradas as seguintes alterações: cor, separação de fases e homogeneidade (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003a).

Para o teste de centrifugação, 0,5 gramas de cada amostra serão centrifugadas por três ciclos de 30 minutos, a 3000rpm, em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440, Fanem. A medida de pH foi feita em um peagâmetro da marca Digimed diretamente na amostra de formulação. Na avaliação organoléptica serão consideradas as alterações cor, separação de fases, homogeneidade (GUARATINI, GIANETI e CAMPOS, 2006).

4.1.3 Determinação do perfil de textura das formulações

A análise do perfil de textura das formulações xampu desenvolvidas foi realizada utilizando-se o equipamento TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable Microsystems, Surrey U.K.) As formulações foram avaliadas em termos de espalhabilidade, firmeza e *work of shear* (TAI, *et al*., 2014). Para tal foi utilizado o software Exponent. Para tal foi utilizado o software Exponent. O acessório para a análise de dureza foi um probe cônico com ângulo de 45º. As medidas foram realizadas 5 vezes e em triplicata, respectivamente, em temperatura ambiente.

4.1.4 Avaliação do comportamento reológico das formulações gel creme

A determinação do comportamento reológico das formulações foi feita na etapade caracterização bem como a avaliação da estabilidade utilizando um Reômetro Brookfield DV3T, em temperatura ambiente.

O software utilizado foi o Rheocalc T e os parâmetros avaliados foram, índice de fluxo, índice de consistência e viscosidade mínima aparente.

As amostras foram mantidas na temperatura de 25ºC em câmara climática

modelo TE-4001-TE, marca Tecnal e submetidas a estresse térmico, nas temperaturas de 5°C e 45°C, em estufa termostatizada com controle de umidade e fotoperíodo, modelo 111FC (Eletrolab) e geladeira. Foram coletadas para o estudo reológico, alíquotas de 0,5g das amostras em intervalos de tempo de 7, 14, 21, 28 e 56 dias (SOUZA et al., 2017). Para os cálculos foi utilizado o software OriginPro 8® e para análise estatística e gráficos o software GraphPad Prism 6®.

4.2 Casuística e métodos

4.2.1 Triagem das participantes

Após a aprovação do comitê de ética (CEP/FCFRP no. 451 – CAAE no 73911117.6.0000.5403), foram recrutadas 28 participantes do sexo feminino, com idades entre 39-55 anos (+-49,07), fototipos Fitzpatrick de pele II-III para caracterização da pele diabética. Foram divididas em 2 grupos: o grupo 1 consistiu em 14 participantes saudáveis e o grupo 2 em 14 participantes diabéticos.

Para a fase clínica foram recrutadas ao todo 59 participantes de estudo, com a mesma faixa etária e etnia, sendo entre elas 21 saudáveis e 38 diabéticas do tipo 2 que foram separadas em 3 grupos: formulação veiculo, formulação com extrato de alga vermelha e formulação com associação das substâncias ativas de semente de girassol e alga vermelha. Para o recrutamento foi realizada uma anamnese para percepção dos hábitos de saúde, com perguntas sobre hábitos alimentares, ingestão de água, uso de filtro solar e presença de alergias cosméticas. Para as participantes diabéticas, elas deveriam ter sido diagnosticadas por pelo menos 5 anos e quando o tratamento foi iniciado também foi questionado.

O fator de não inclusão foi se o participante era fumante, grávida ou com doenças dermatológicas. Os experimentos foram realizados na Escola de Farmacêutica Ciências de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, em uma sala de 21 ± 2°C e 45% a 55% de umidade relativa, na região nasolabial sendo randomizada. As participantes foram aclimatadas na sala por pelo menos 15 minutos antes das medidas serem tomadas para permitir a adaptação completa de sua pele.

As participantes foram esclarecidas e orientadas sobre os objetivos e métodosda pesquisa e, concordando em participar do estudo, assinaram o Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos os estudos de eficácia foram realizados e supervisão do médico dermatologista, Dr. João Carlos Lopes Simão (CRM: 94214).

4.2.2 Instrumentação – Técnicas de biofísica e análise de imagem

Anteriormente à realização das medidas, as participantes foram aclimatadas por 20 minutos em ambiente com temperatura (20 a 22°C) e umidade relativa do ar (45% a 55%) controladas.

4.2.2.1 Determinação do microrrelevo cutâneo

Neste estudo foi utilizado o equipamento Visioscan® VC98 (Courage & Khazaka, Alemanha) para a determinação do microrrelevo cutâneo. Este equipamento permite a avaliação quali e quantitativa da superfície da pele nas condições fisiológicas por meio de técnicas de profilometria óptica, as quais utilizam um processo de digitalização de imagem obtida por uma câmera de vídeo equipada com uma unidade que emite luz ultravioleta e a imagem captada fornece um histograma que apresenta uma distribuição de diferentes níveis de cinza,quantificando os pontos escuros, que correspondem à rugosidade e pontos claros, aos platôs do microrrelevo cutâneo. A partir de cálculos realizados pelo software interno SELS (*Surface Evaluation of the Living Skin*), parâmetros relacionados à rugosidade (Ser - calcula os níveis de cinza acima do limite em comparação com a imagem inteira, reflete a “aspereza” da pele), rugas (Sew - calculado a partir da proporção de rugas horizontais e verticais), descamação (Sesc – nível de falta de hidratação do estrato córneo. É o número de pixels em que o nível de cinza é maior do que o seu limiar) e maciez da pele (Sesm - calculado a partir da largura e profundidade média das rugas) são obtidos (CAMARGO JUNIOR e MAIA CAMPOS,2011; MELO e MAIA CAMPOS, 2018).

4.2.2.2 Avaliação das características colorimétricas da pele

A colorimetria é feita pelo aparelho Colorimeter CL 400 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha) que quantifica a reflectância da fonte de luz monocromática padrão na pele. Este fornece os valores de L*a*b, ao qual o a*

representa o eritema e o L* é proporcional a redução da pigmentação da melanina. Também calcula a tipologia angular individual pela medida do arco tangente refletido, que é inversamente associado a pigmentação da pele (TAYLOR et al., 2006).

4.2.2.3 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Para a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo foram realizadas medidas utilizando o equipamento *Corneometer® CM 825* (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha), o qual, por meio da medida da capacitância elétrica, mede o nível de hidratação do estrato córneo (DAL'BELO, et al., 2006). Foram realizadas 5 medidas em cada região de estudo, sendo calculada a média dosvalores obtidos. Os resultados são fornecidos em unidades arbitrárias (UA) onde estima-se que 1 UA corresponda a 0,2 - 0,9 mg de água por grama de estrato córneo (DAL'BELO; GASPAR; CAMPOS, 2006; MELO e MAIA CAMPOS, 2018).

4.2.2.4 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

Para avaliação da função barreira da pele, foi utilizado o equipamento *Tewameter® TM 210* (Courage & Kazaka), cuja função é medir a evaporação de água da superfície da pele (ROGIERS, 2001; DAL'BELO et al., 2006). Este equipamento é acoplado a um software, cuja função é medir a perda transepidérmica de água - TEWL, baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick em 1855. Os valores são dados em g.m2.h-1. A sonda do aparelho permanece por 20 segundos sobre a pele nas regiões de estudo, e o valor médio das medidas obtidas neste intervalo de tempo é empregado nos cálculos posteriores (GIOIA; CELLENO, 2002, MAIA CAMPOS, et al., 2016). As medidas foram realizadas em triplicata e posteriormente foi realizado o cálculo da média dos valores obtidos.

4.2.2.5 Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele

O sensor do MoistureMap 100MM (Courage-Khazaka, Alemanha), fornece informações gráficas sobre a distribuição da hidratação da superfície e topografia da pele através de medidas de capacitância e análise de imagem. A sonda é pressionada sobre a área a ser analisada e obtêm-se com o auxilio do software as imagens as

quais posteriormente são transformadas em valores numéricos.

4.2.2.6 Avaliação linhas, rugas e homogeneidade na textura da pele.

Para a detecção das manchas visíveis e as visíveis apenas com a luz UV será utilizado o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha). Este equipamento fornece imagem da pele iluminada por diodos emissores de luz branca (white LED) e por diodos emissores de luz semelhante ao UV (UV-like LED), respectivamente. Sobre as imagens obtidas, o software calcula a porcentagem de poros, linhas e rugas, e a homogeneidade na textura da pele (HERMANNS-LÊ et. al., 2013; LEVY et al., 2004).

4.2.2.7 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência

Para a avaliação da ecogenicidade e espessura da derme foi utilizado um equipamento de ultrassom de 20MHz (Dermascan® C, Cortex Technology). A ecogenicidade, por unidade de área, é determinada em pixels, com o auxílio de um software. Tal parâmetro está relacionado com retenção de água entre as fibras de colágeno e com o envelhecimento e fotoenvelhecimento (GIANETI e MAIA CAMPOS, 2014). Essa análise foi realizada nas regiões frontal, malar e vertex capilar.

4.2.2.8 Avaliação das propriedades mecânicas da pele - viscoelasticidade

Para a avaliação das propriedades viscoelásticas da pele foi utilizado o aparelho Cutometer® Dual MPA (Courage & Khazaka, Alemanha), equipado com duas sondas, uma com orifício de 4mm e outra com orifício de 2mm. Este equipamento mede a deformação da pele em resposta à sucção, ou seja, a pressão negativa que é criada pelo dispositivo de leitura provoca sensível penetração da peleno orifício e o nível de penetração obtido é determinado por um sistema de leitura ótica, no qual a intensidade da luminosidade captada é proporcional à penetração dapele no dispositivo (GIANETI, et al, 2013).

Na pesquisa cosmética, diversos estudos utilizando a sonda com 2mm de abertura, podem ser encontrados. Com esse diâmetro, é possível avaliar as

propriedades mecânicas da região da epiderme. Com o auxílio de uma sonda com maior abertura, como 4 mm por exemplo, é possível obter mais informações, uma vez que essa abertura permite a avaliação da pele com maior profundidade, permitindo a avaliação da região da derme. Em associação com outras técnicas, é possível uma avaliação mais completa dessa região da pele.

4.2.2.9 Avaliação das características morfológicas e estruturais da pele

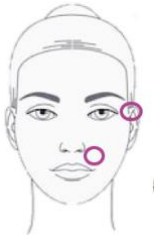
A avaliação das características celulares das diferentes camadas da pele foi realizada utilizando o microscópio confocal de reflectância a laser - Vivascope® 1500, o qual utiliza uma fonte a laser com um comprimento de onda de 830 nm. As imagens foram obtidas na região periorabital da face em triplicata e a cada 1,5 µm a partir do estrato córneo até a profundidade de 37,5 µm e a cada 3 µm até a profundidade de 132,5µm (MERCURIO, et al., 2015). A avaliação da morfologia do colágeno na derme papilar foi feita com base no escore proposto por LONGO et al., (2011), onde foram avaliados os seguintes descritores: presença de colágeno fino e reticulado, presença de colágeno grosseiro, presença de colágeno amontoado e desorganizado, presença de colágeno ondulado e brilhante, os quais permitem identificar os sinais de envelhecimento, bem como, alterações na morfologia da pele.

4.2.3 Caracterização da pele saudável e pele diabética

O estudo foi realizado em duas etapas: na primeira etapa, 28 participantes do sexo feminino, com idade entre 39 a 55 anos, pele fototipos II-III de Fitzpatrick (1993) foram recrutadas, sendo 14 saudáveis e 14 diabéticas.

Para tal, a pele das participantes frami avaliadas na região nasolabial e periorbital da face (Figura 1) em relação às propriedades mecânicas da pele, características morfológicas e estrututais da derme, a hidratação pelo conteúdo aquoso do estrato córneo e a perda transepidérmica de água, área, profundidade e volume das rugas, coloração. A segunda etapa consistiu de 12 participantes (6 saudáveis e 6 diabéticas) cuja pele foi analisada por Microscopia Confocal de Reflectância - MCR. Uma anamnese foi feita para o conhecimento de seus hábitos de saúde. Para as diabéticas, questões sobre o tempo diagnosticado da doença e o início do tratamento também foram incluidas.

Figura 1. Regiões de análise do estudo de caracterização da pele saudável e da pele diabética.

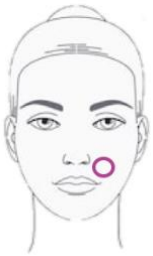


4.2.4 Estudo clínico de eficácia das formulações em longo prazo

Para a avaliação dos efeitos de longo prazo as participantes do estudo foram separadas randomicamente em 3 grupos: formulação com associação de ativos, formulação com um ativo e formulação veículo. A randomização foi processada para que tanto a média quanto o coeficiente de variação de ambos grupos tivessem a menor variação possível entre eles.

O estudo foi duplo cego, então os grupos foram denominados como V01, V02 e V03, respectivamente. O grupo V01 tiveram 14 participantes saudáveis e 9 diabéticas, V02 possuíam 12 participantes do estudo diabéticas e V03 tinham 13 participantes de studo saudáveis e 9 participantes do estudo diabéticas, sendo ao todo foram recrutadas 59 participantes do estudo. O estudo teve duração de 90 dias, as medidas foram realizadas, antes (basal) após 45 e 90 dias da aplicação das formulações sendo a área nasolabial escolhida para o estudo clínico (Figura 2). As participantes do estudo foram aconselhadas a utilizar a formulação no período da noite após o banho, antes de dormir e no dia seguinte lavar o rosto e passar o protetor solar de costume. A quantidade de formulação aconselhada para utilizar foi de 0,5. A área de foco do estudo foi a nasolabial, analisando os parâmetros de conteúdo aquoso do estrato córneo (hidratação), perda transepidérmica de água (TEWL), microrrelevo da pele, avaliação da ecogenicidade, elasticidade da pele e por fim, características morfológicas e estruturais da epiderme.

Figura 2. Região de estudo da fase clínica das participantes do estudo com o uso da formulação desenvolvida acrescidas ou não do ativo por 90 dias.



4.2.5 Avaliação sensorial das formulações, percepção de eficácia da formulação e intenção de compra

Para a avaliação da percepção de eficácia e sua intenção de compra foi elaborado um questionário que ao término da última medida foi respondido por todas as participantes. As participantes foram avaliadas, não somente em relação a percepção da eficácia do produto utilizado pelo período, como também foram realizadas perguntas referentes ao sensorial das três formulações desenvolvidas, indicando o melhor produto e, se caso fosse comercializado, se comprariam ou não o produto.

Em relação às prorpriedades sensoriais foram analisados os parâmetros imediatos de oleosidade, pegajosidade, suavidade, facilidade em espalhamento e absorção, firmeza e após 5 minutos as características de resíduo oleoso, branco, maciez e hidratação da pele e toque seco.

4.3 Análise estatística e apresentação dos resultados

Os dados experimentais obtidos na caracterização e no estudo clínico foram submetidos à análise estatística sendo que, no caso de a distribuição ser normal, o teste indicado foi a Análise de Variância (ANOVA) e no caso de a distribuição não ser normal, a estatística foi a não-paramétrica, aplicando o teste de Kruskal-Wallis e Friedman, para amostras múltiplas não vinculadas e vinculadas, respectivamente.

Os resultados foram apresentados na forma de gráficos, tabelas e figuras e discutidos frente aos dados fornecidos pela literatura consultada. Os softwares

utilizados foram o Origin Pro 8 para avaliaçãoda normalidade dos dados e Graphpad Prism 8 para análise estatística e testes de correlação.

5. RESULTADOS

5.1 Pesquisa e desenvolvimento das formulações

5.1.1 Desenvolvimento das formulações

5.1.1.1 Testes preliminares de estabilidade

A formulação desenvolvida foi considerada estável aos testes preliminares de estabilidade, não apresentando alterações significativas no pH, como pode ser observado (Tabela 2,3 e 4), cor ou separação de fases. A avaliação da estabilidade também foi realizada de forma complementar com o perfil reológico das formulações.

Tabela 2. Avaliação da variação do pH da formulação gel creme veículo em temperatura ambiente, de 45ºC e de 5ºC, respectivamente.

	TA			45 ºC			5 ºC		
0	6,22	6,15	6,21						
7	6,14	6,13	6,14	6,13	6,11	6,09	6,0	6,07	6,06
14	6,09	6,16	6,11	6,20	6,22	6,22	6,11	6,07	6,05
21	5,97	6,03	6,01	6,03	6,07	6,05	6,00	6,00	6,05
28	6,08	6,07	6,04	5,96	6,00	5,95	5,97	5,96	5,95
90	6,03	5,98	5,95	5,79	5,77	5,79	5,95	6,01	5,97

Tabela 3. Avaliação da variação do pH da formulação gel creme contendo o substância ativa de alga vermelha em temperatura ambiente, 45ºC e de 5ºC, respectivamente.

	TA			45 ºC			5 ºC		
0	5,74	5,74	5,58						
7	5,81	5,80	5,87	5,79	5,78	5,74	5,85	5,74	5,76
14	5,70	5,71	5,73	5,80	5,72	5,78	5,71	5,74	5,76
21	5,74	5,68	5,74	5,76	5,76	5,77	5,75	5,78	5,75
28	5,61	5,56	5,58	5,71	5,68	5,69	5,64	5,71	5,66
90	5,67	5,69	5,71	5,69	5,70	5,74	5,68	5,70	5,69

Tabela 4. Avaliação da variação do pH da formulação gel creme contendo a associação de substância ativa de alga vermelha e semente de girassol em temperatura ambiente, de 45ºC e de 5ºC, respectivamente.

	TA			45 ºC			5 ºC		
0	5,71	5,66	5,61						
7	5,75	5,71	5,66	5,71	5,72	5,68	5,74	5,66	5,71
14	5,65	5,71	5,71	5,71	5,70	5,71	5,72	5,71	5,72
21	5,70	5,70	5,69	5,73	5,79	5,73	5,72	5,77	5,74
28	5,70	5,70	5,67	5,58	5,60	5,61	5,62	5,65	5,62
90	5,565	5,64	5,64	5,55	5,55	5,59	5,62	5,59	5,61

5.1.1.2 Determinação do perfil de textura das formulações

A análise de textura mostrou que a adição das substâncias ativas aquosos de alga vermelha e da semente de girassol resultaram em uma diminuição dos parâmetros de firmeza, consistência, coesividade e no índice de viscosidade (Figura 3) da formulação quando comparada com a formulação veículo. Isso era o esperado, uma vez que, o extrato por ser aquoso deixaria a formulação base em qual foi

incorporada mais fluída, tanto que se observa que na formulação contendo ambas substâncias ativas é a formulação que tem os menores parâmetros.

Além disso, analisou-se o work of shear (Tabela 5), que esta relacionado com a espalhabilidade do produto.

Figura 3. Comparação dos valores de textura obtidos entre as formulações desenvolvidas analisando os parâmetros de firmeza (g), consistência (g.sec), coesividade (g) e índice de viscosidade (g.sec).

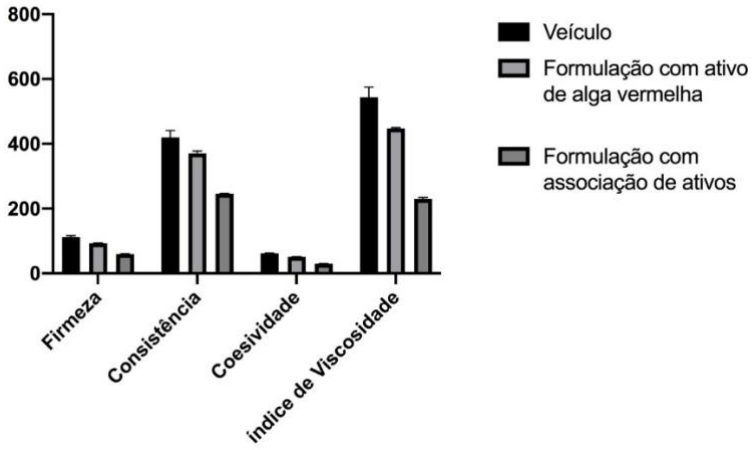


Tabela 5. Comparação dos valores obtidos na análise de espalhabilidade entre as formulações desenvolvidas.

Work of shear (g.sec)		
Veículo	**Formulação com alga vermelha**	**Formulação com associação**
39,57	39,61	41,91
40,68	38,26	41,18
40,57	39,07	41,01

5.1.1.3 Avaliação do comportamento reológico das formulações gel creme

No perfil reológico das formulações desenvolvidas podemos observar que tanto o acréscimo do ativo aquoso de alga vermelha, quanto na sua associação com o ativo de semente de girassol, que também é aquoso, não houve mudanças na reologia da formulação durante o período estudado de 56 dias. Em relação ao perfil de viscosidade, consistência e o índice de fluxo pode-se observar uma variação destes parâmetros conforme o tempo e da temperatura que a formulação foi submetida para análise. Entretanto, essa variação não promoveu nenhum tipo de dano no corpo da formulação que se manteve estável durante todo o estudo pré liminar e na fase clínica.

Figura 4. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente índice de consistência e índice de fluxo e da formulação gel creme veículo em temperatura ambiente.

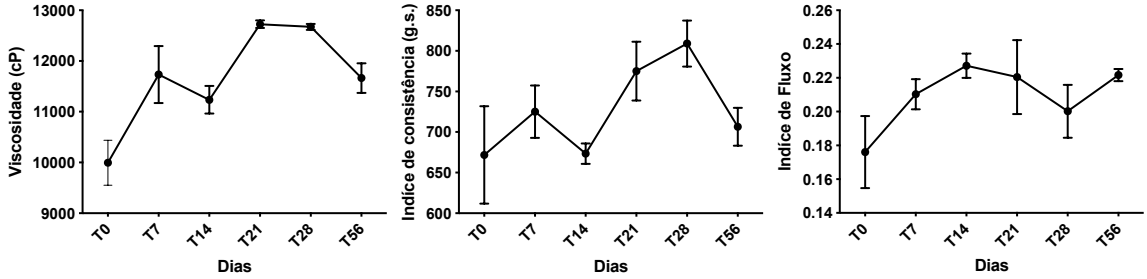


Figura 5. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo e da formulação gel creme veículo em temperatura 5ºC.

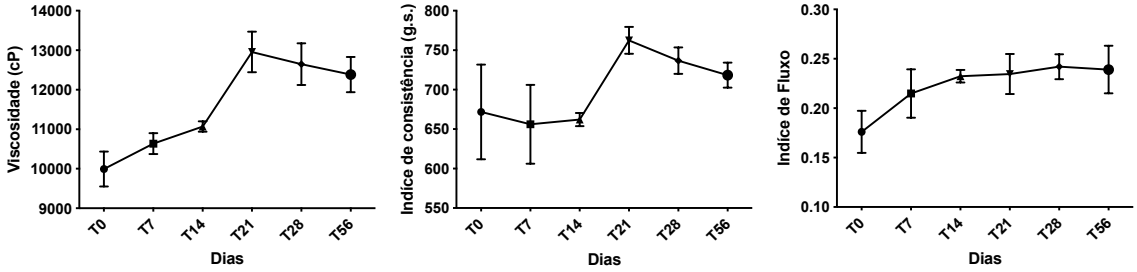


Figura 6. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo e das formulações gel creme veículo em temperatura 45ºC.

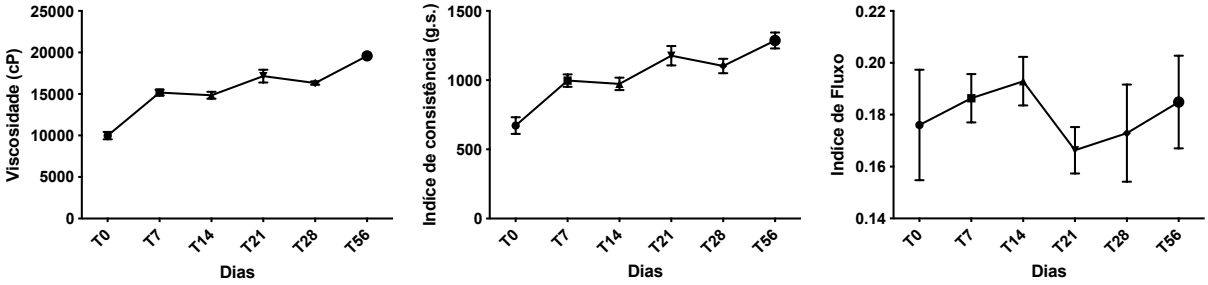


Figura 7. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo e das formulações gel creme contendo o ativo de alga vermelha em temperatura ambiente.

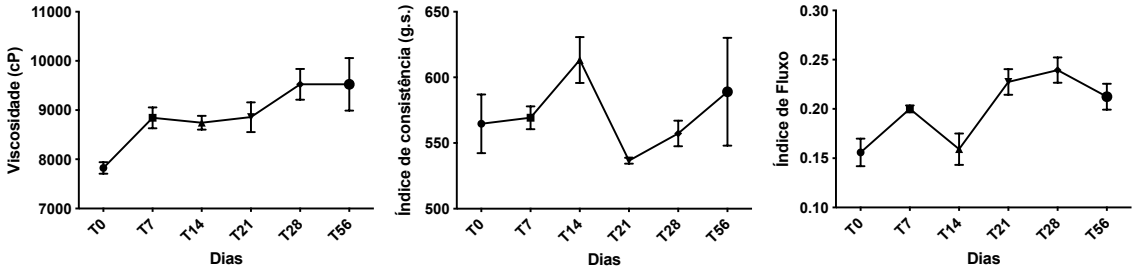


Figura 8. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo e das formulações gel creme contendo o ativo de alga vermelha em 5ºC.

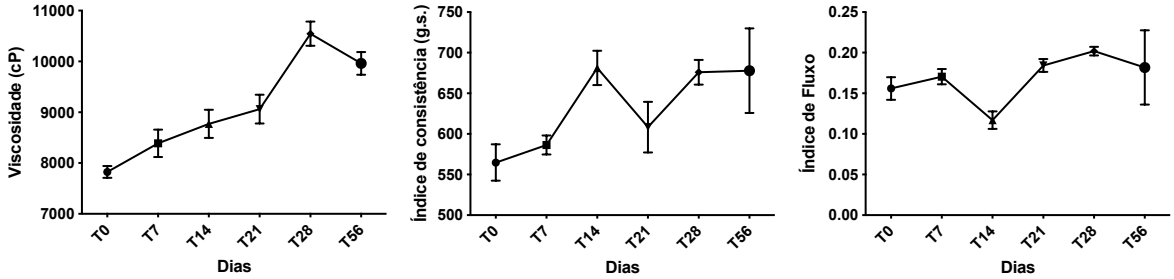


Figura 9. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo das formulações gel creme contendo o ativo de alga vermelha em 45ºC.

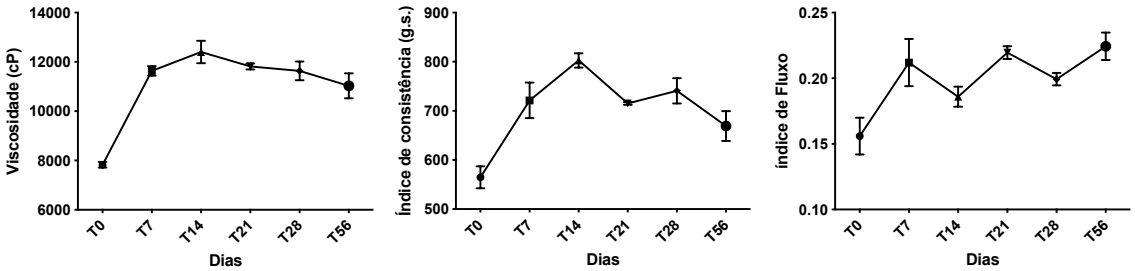


Figura 10. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo das formulações gel creme contendo a associação do ativo de alga vermelha e da semente de girassol em temperatura ambiente.

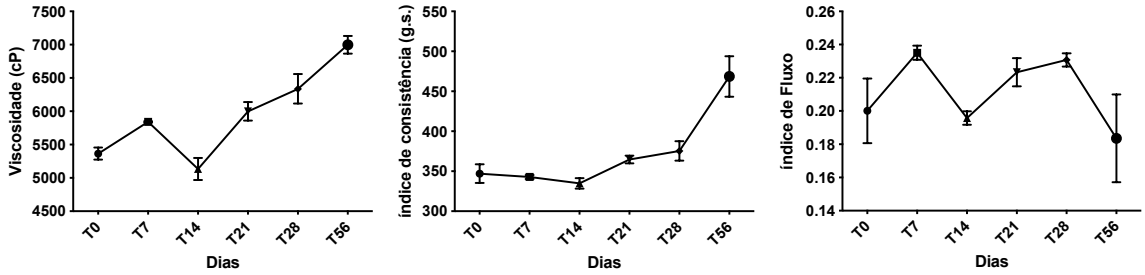


Figura 11. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo das formulações gel creme contendo a associação do ativo de alga vermelha e da semente de girassol em 5ºC.

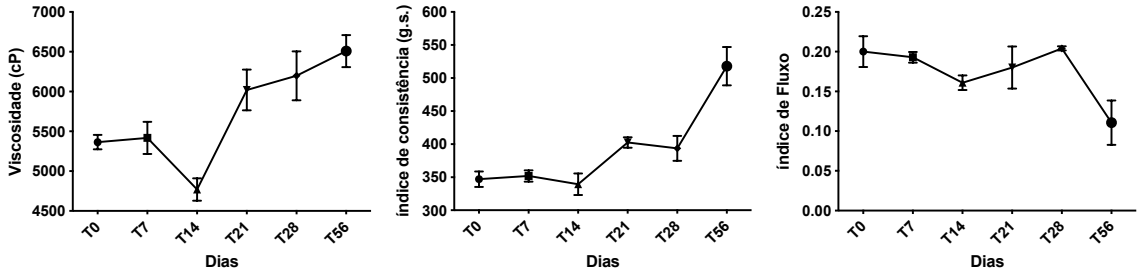


Figura 12. Avaliação dos parâmetros da viscosidade mínima aparente, índice de consistência e índice de fluxo das formulações gel creme contendo a associação do ativo de alga vermelha e da semente de girassol em 45ºC.

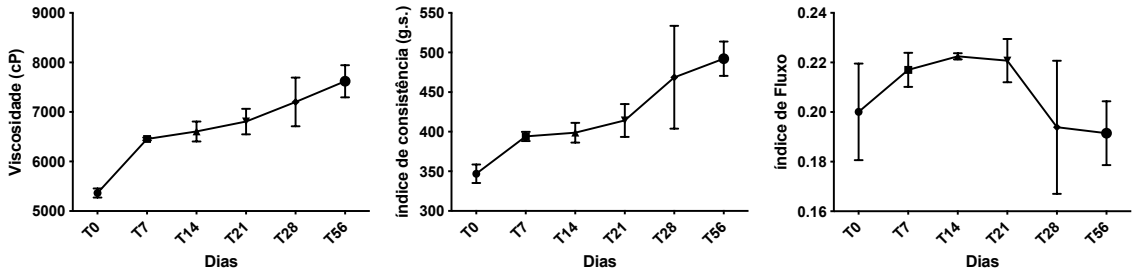


Figura 13. Comportamento reológico no período de 56 dias (T56) em intervalos de 7 dias, da formulação veículo, nas temperaturas ambiente (A), 45ºC (B) e 5ºC (C).

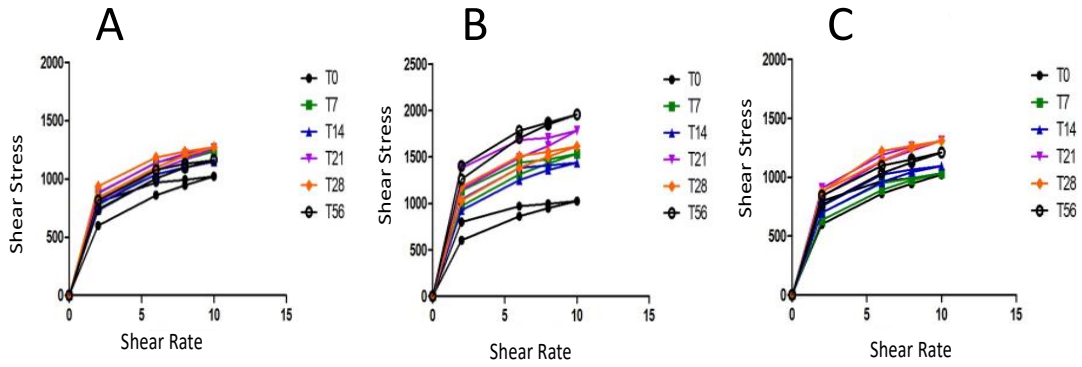


Figura 14. Comportamento reológico no período de 56 dias (T56) em intervalos de 7 dias, da formulação veículo, nas temperaturas ambiente (A), 45ºC (B) e 5ºC (C).

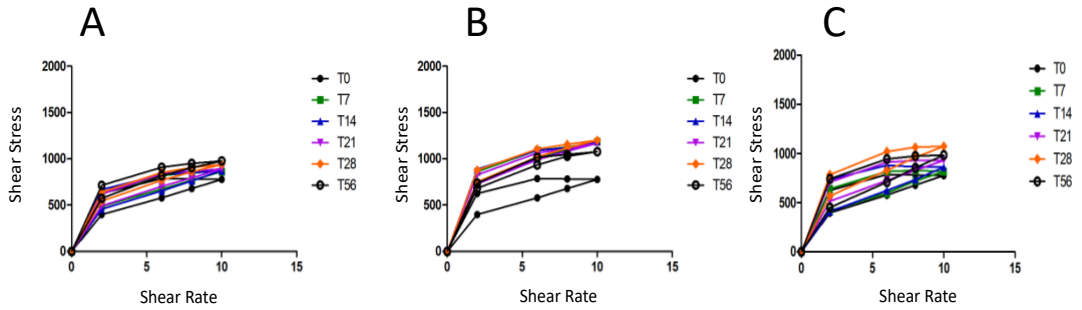
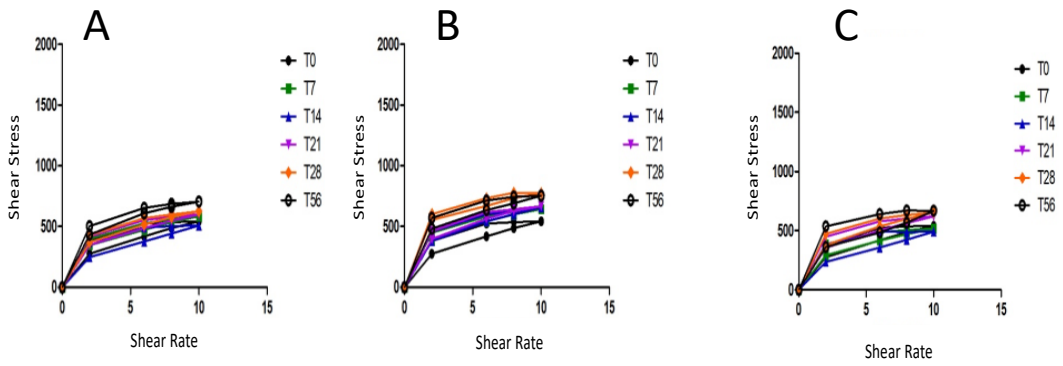


Figura 15. Comportamento reológico no período de 56 dias (T56) em intervalos de 7 dias, da formulação veículo, nas temperaturas ambiente (A), 45ºC (B) e 5ºC (C).



5.2 Caracterização da pele das participantes de estudo saudáveis e diabéticas

5.2.1 Determinação da perda transepidérmica da água –TEWL

Foi possível observar uma diferença estatisticamente grande entre o grupo com pele saudável e o grupo com a pele diabética (Figuras 16 e 17), principalmente na região periorbital. A análise do TEWL é considerada importante, uma vez que, é uma das referencias para avaliar a integridade da pele (MERCÚRIO et al. 2013).

Além disso valores maiores de TEWL foram encontrados nas participantes de pesquisa diabéticas quando comparadas com as saudáveis.

Figura 16. Comparação da perda transepidérmica de água entre o grupo saudável e grupo diabético na região periorbital da face. **Significante (p = 0,009).

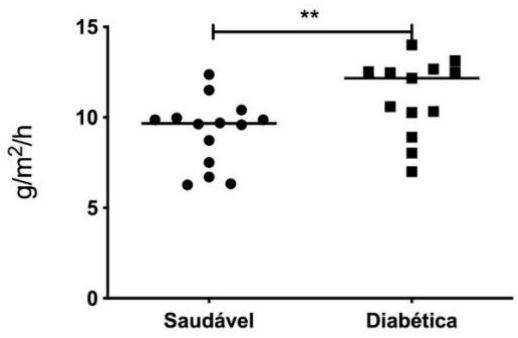
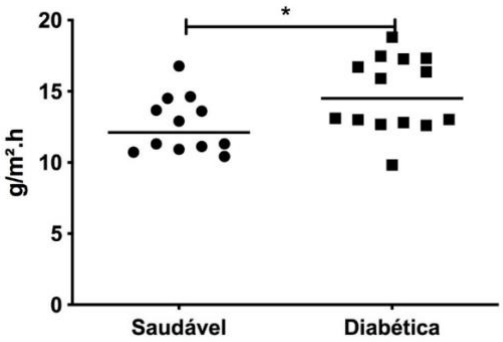


Figura 17. Comparação da perda transepidérmica de água entre o grupo saudável e grupo diabético na região nasolabial da face. *Significante (p = 0,03).



5.2.2 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre o conteúdo aquoso do estrato córneo, tanto na região nasolabial (Figura 18) quanto na região periorbital da face entre os grupos de estudo (Figura 19). Com isso, considera-se que ambos os grupos possuíam o mesmo nível de hidratação da pele.

Figura 18. Comparação do conteúdo aquoso de água na pele (hidratação) entre o grupo saudável e grupo diabético na região nasolabial da face

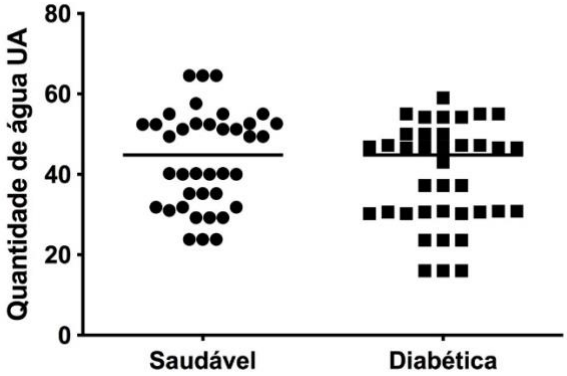
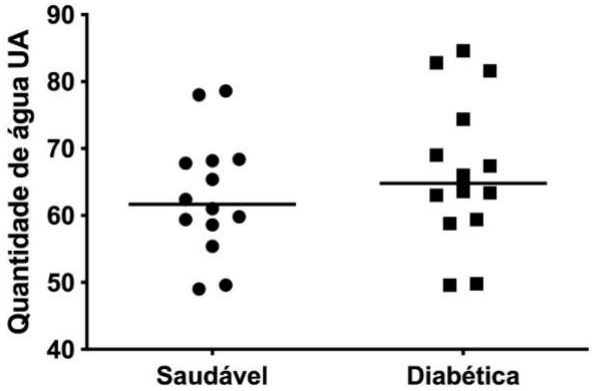


Figura 19. Comparação do conteúdo aquoso de água na pele (hidratação) entre o grupo saudável e grupo diabético na região periorbital da face.

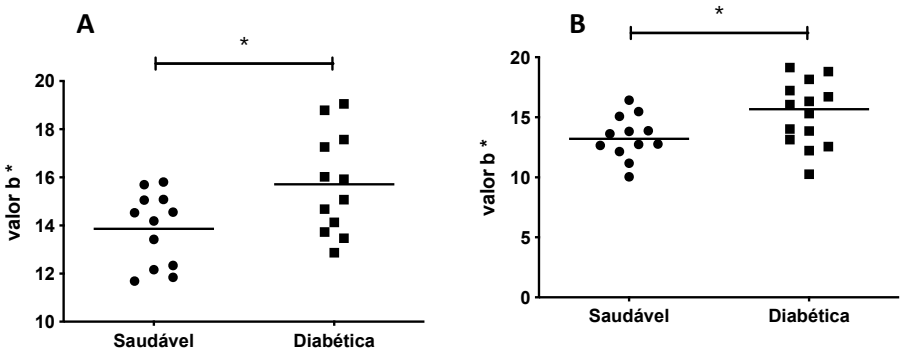


5.2.3 Avaliação da coloração da pele

Na determinação da diferença de coloração da pele entre os grupos, foi possível observar uma modificação significativa entre os valores de b, que estão relacionados a cor amarela. No grupo diabético foi detectado uma coloração mais amarelada nas regiões de estudo quando comparado com o grupo saudável (Figura 20).

Isso pode estar relacionado com a quantidade maior de reações de Schiff que aumenta a produção dos produtos finais de glicação que possuem uma cor amarelada (VAN et al. 2008; SUEKi et al. 1991; NIKOLEISHVILi et al. 2006).

Figura 20. Comparação da coloração da pele entre o grupo saudável e grupo diabético na região periorbital (A) e nasolabial (B) da face. *Significante (p = 0.04 e p = 0.02, respectivamente).

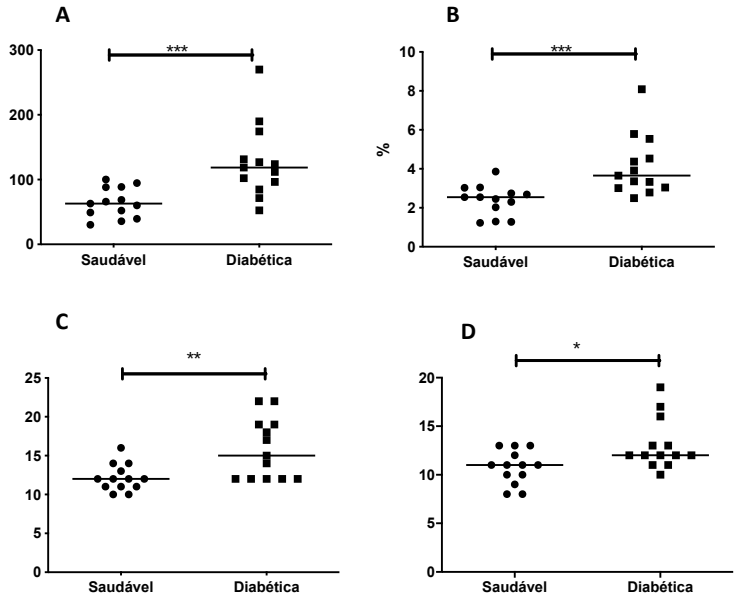


5.2.4 Avaliação dos parâmetros de volume, área e profundidade das rugas da pele por imagens de alta resolução

Na análise por meio através de imagens de alta resolução foi possível observar uma quantidade maior e mais profundas de rugas no grupo diabético quando comparada com o grupo saudável em ambas regiões de estudo.

Além disso, com base nos dados obtidos foi constatado que as rugas presentes na pele das diabéticas possuíam maior área, volume e profundidade na região periorbital, enquanto na região nasolabial apresentavam apenas maior profundidade quando comparadas com o outro grupo de estudo (Figura 21).

Figura 21. Comparação entre volume, área e profundidade das rugas na região periorbital (A, B, C) entre o grupo saudável e diabético e profundidade na região nasolabial (D) da face. Significante (***p = 0.0002; **p = 0.005, *p = 0.0235).



5.2.5 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência

Na caracterização foi possível observar que as participantes diabéticas apresentaram uma quantidade maior de pixels hipoecogênicos (Figura 22) quando comparadas com as participantes saudáveis apenas na região nasolabial.

Correlacionando com isso há um maior razão de ecogenicidade com as

participantes diabéticas apresentando menor ecogenicidade (Figura 23). Isso pode ser devido ao aumento excessivo do crosslinking dos AGEs que deixa o colágeno disfuncional (BEHM et al., 2012; YOON et al., 2002).

Figura 22. Comparação do parâmetro de pixels hipoecogênico entre os grupos com participantes saudáveis e diabéticos na região nasolabial analisada. Maiores valores pixels hipoecogenicos indica maiores alterações na derme. *Significante (p=0.04).

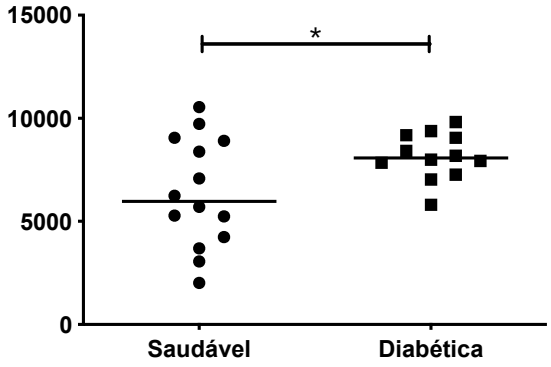
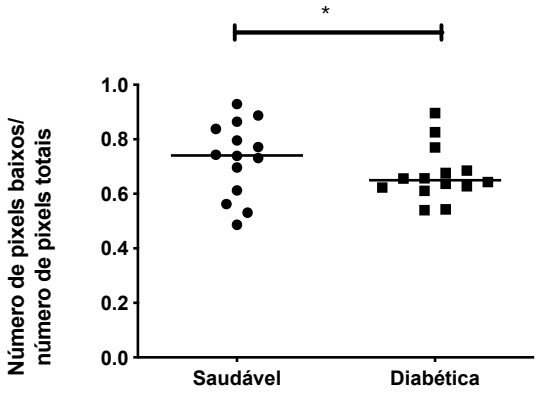


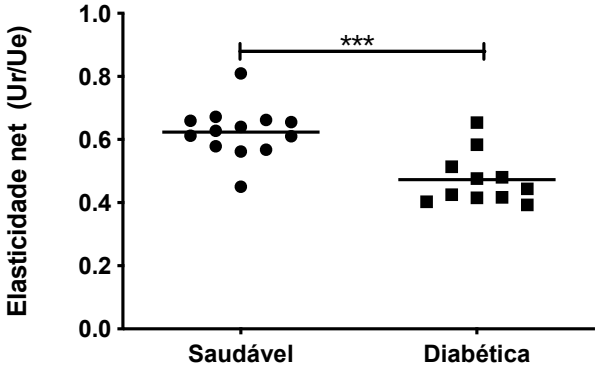
Figura 23. Avaliação da razão da ecogenicidade da derme - número de pixels hipoecogenicos/ número de pixels totais entre os grupos com participantes saudáveis e diabéticos na região nasolabial. da face. * Significante (p=0.04).



5.2.6 Avaliação das propriedades mecânicas da pele – viscoelasticidade

Na análise das propriedades elásticas da pele foi possível avaliar que no grupo diabético teve valores menores significativas no parâmetro do R5 (Figura 24) na região nasolabial da face. Os outros parâmetros analisados R2, R6 e R7 não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativas em nenhuma das regiões de estudo.

Figura 24. Comparação da avaliação do parâmetro R5 – elasticidade da pele (retração imediata/ distensão imediata - Ur/Ue) da região nasolabial entre o grupo saudável e diabético *** Significante (p=0.0002).



5.2.7 Avaliação das características morfológicas e estruturais da pele

Por meio da análise de imagens obtidas do Microscópio Confocal de Reflectância (MCR) foi possível observar que há maiores modificações estruturais presentes na pele dos portadores de diabetes em relação à pele dos participantes saudáveis. Tais modificações foram a presença de mais exacerbada de colágeno grosseiro e amontoado, como Longo et al. 2013 descreve como Longo et al. 2013 descreve (Figura 25).

Também é possível observar a presença de papilas policíclica (Figura 26) em maior quantidade. As alterações na morfologia das papilas podem estar correlacionadas ao o envelhecimento mais acentuado da pele diabética devido a glicação, onde há a desestruturação da fibra de colágeno e consequentemente uma perca na morfologia da pele, o que pode-se ver na figura 27 cuja as participantes diabéticas apresentaram uma profundidade na papila dérmica maior quando comparada com o grupo saudável.

Figura 25. Imagens representativas obtidas pelo MCR – As setas indicam a presenta de colágeno grosseiro e amontoado no grupo diabético (A) e a presença de colágeno reticulado no grupo saudável (B).

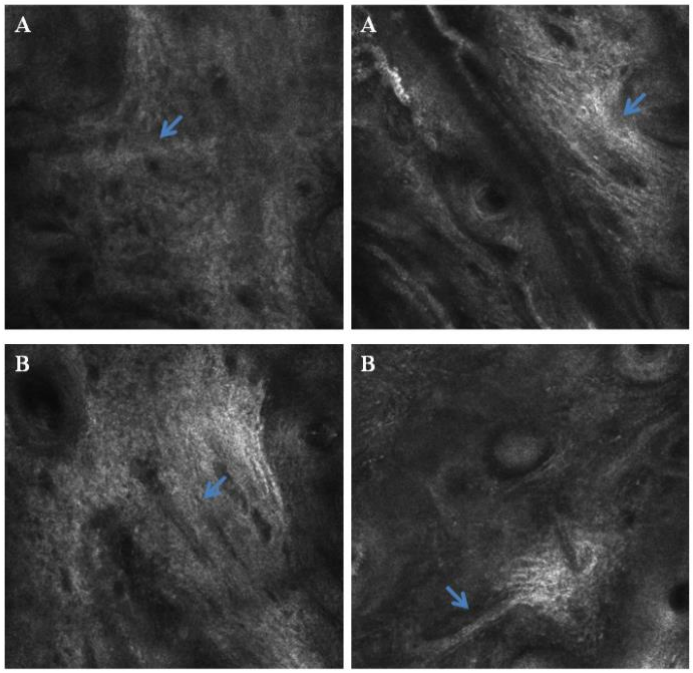


Figura 26. Imagens representativa obtidas pelo MCR da região de junção derma-epidérmica no grupo diabético (A) e no grupo saudável (B). As setas evidenciam a presenta das papilas policíclicas em maior quantidade no grupo diabética do que no grupo saudável. z=126 µm

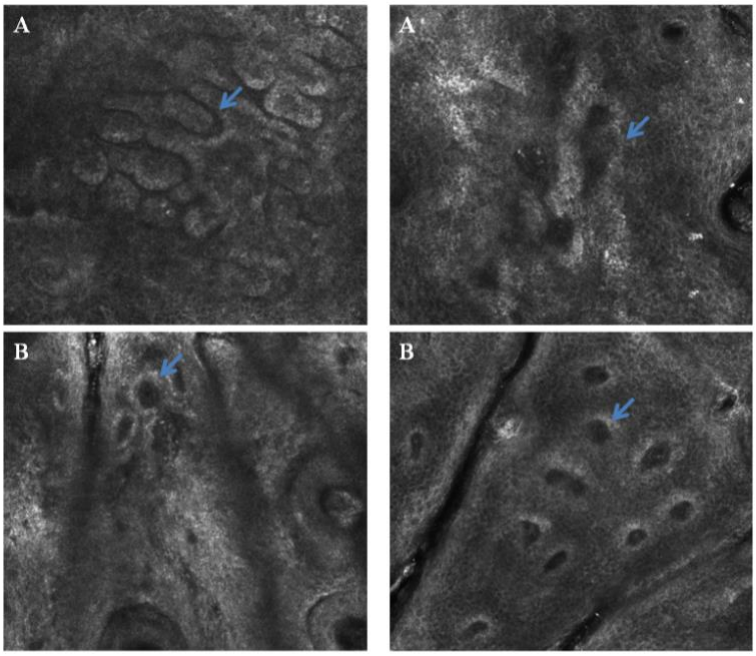
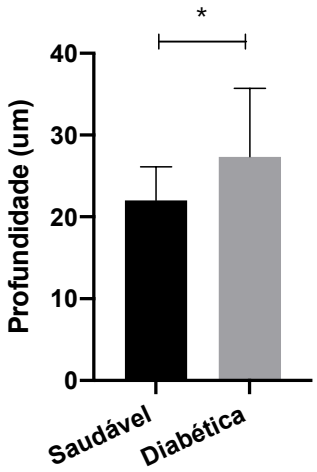


Figura 27. Comparação da profundidade da papila dérmica entre o grupo saudável e diabético. Significante (*p=0.03).

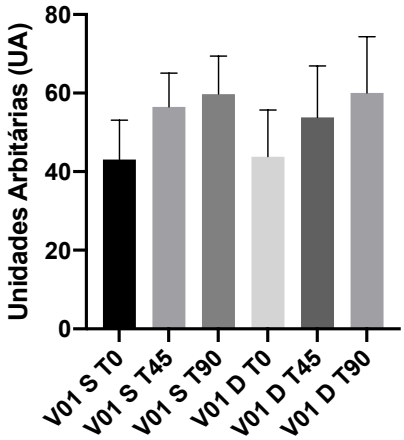


5.3 Avaliação dos efeitos clínicos a longo prazo do grupo V01

5.3.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

O resultado da avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo – hidratação, está representado na Figura 28. Não houve aumento significativo na hidratação em ambos os grupos, com uso da formulação com associação de substâncias ativas.

Figura 28. Conteúdo aquoso do estrato córneo da região nasolabial da face, sendo V01 S - o grupo saudável e V01 D ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos.



5.3.2 Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele

Os resultados da distribuição da hidratação da superfície da pele representados pelos índices Gray Index T e MGL na Figura 29 não houve aumento significativo na hidratação em ambos os grupos no período de estudo. Nas figuras 30 e 31 temos as imagens topográficas da distribuição da água na superfície da epiderme onde podemos perceber que houve uma hidratação com o uso da formulação desenvolvida, porém não significativa.

Figura 29. Distribuição da hidratação da superfície da pele representados pelos índices Gray Index T e MGL, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, o grupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos.

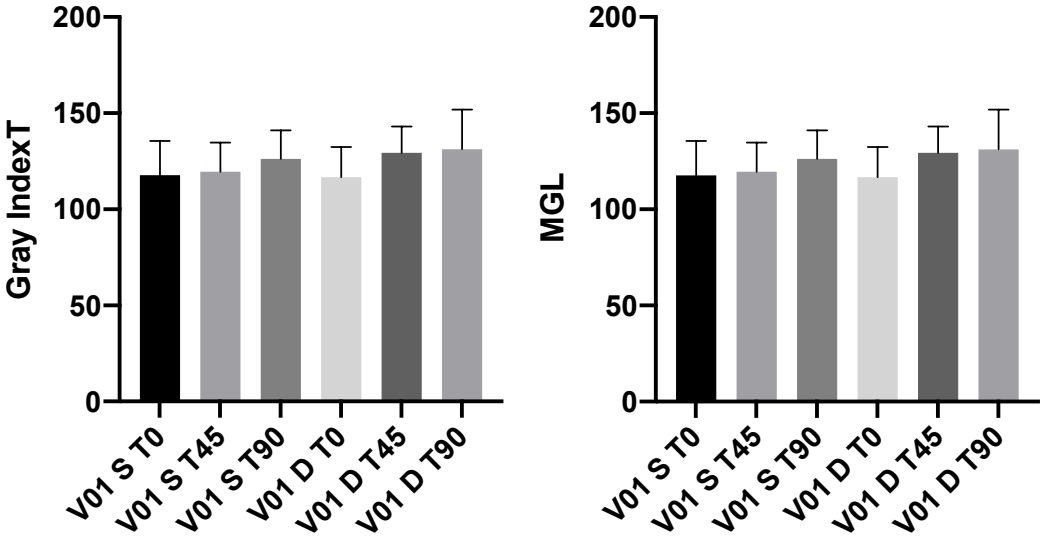


Figura 30. Imagem representativa da topografia da distribuição da água na superfície da pele das participantes de pesquisa diabéticas no tempo basal (A), após 45 dias de uso do produto (B) e após 90 dias (C).

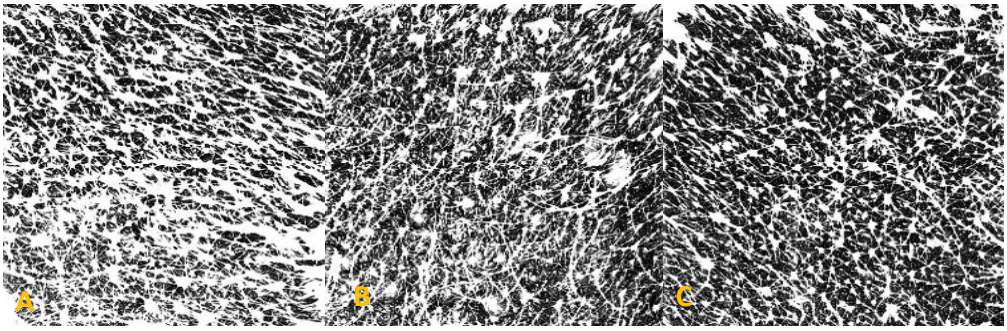
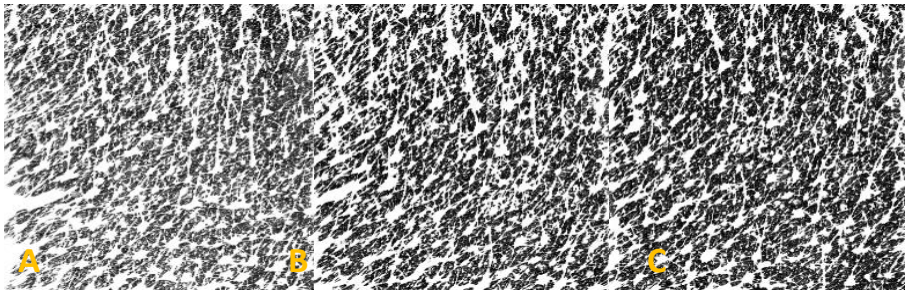


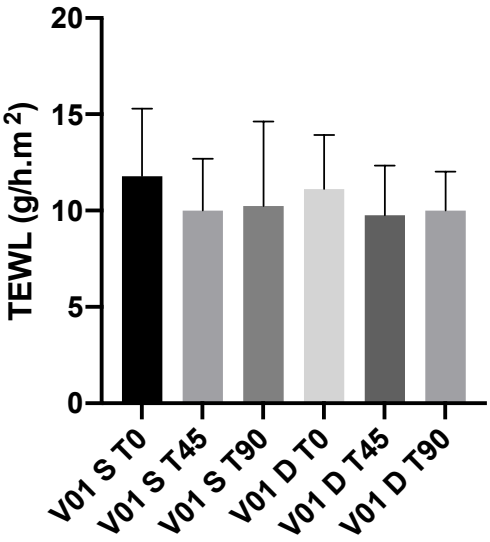
Figura 31. Imagem representativa da topografia da distribuição da água na superfície da pele das participantes de pesquisa saudáveis no tempo basal (A), após 45 dias de uso do produto (B) e após 90 dias (C).



5.3.3 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

Não foi possível observar nenhuma alteração relacionada na perda transepidérmica de água – TEWL, em nenhum dos grupos que fizeram o uso da formulação desenvolvida após 90 dias de uso (Figura 32).

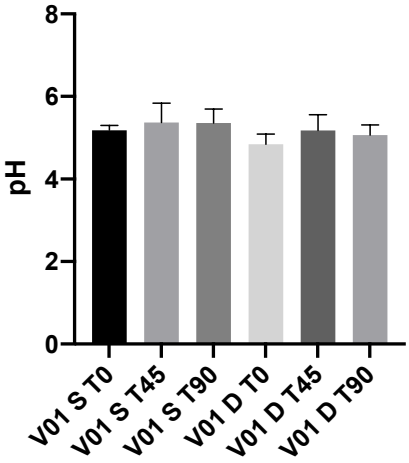
Figura 32. Perda transepidérmica de água na região nasolabial da face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos.



5.3.4 Determinação do pH da pele

A utilização da formulação não promoveu alterações no pH da pele de ambos os grupos após 90 dias de uso (Figura 33).

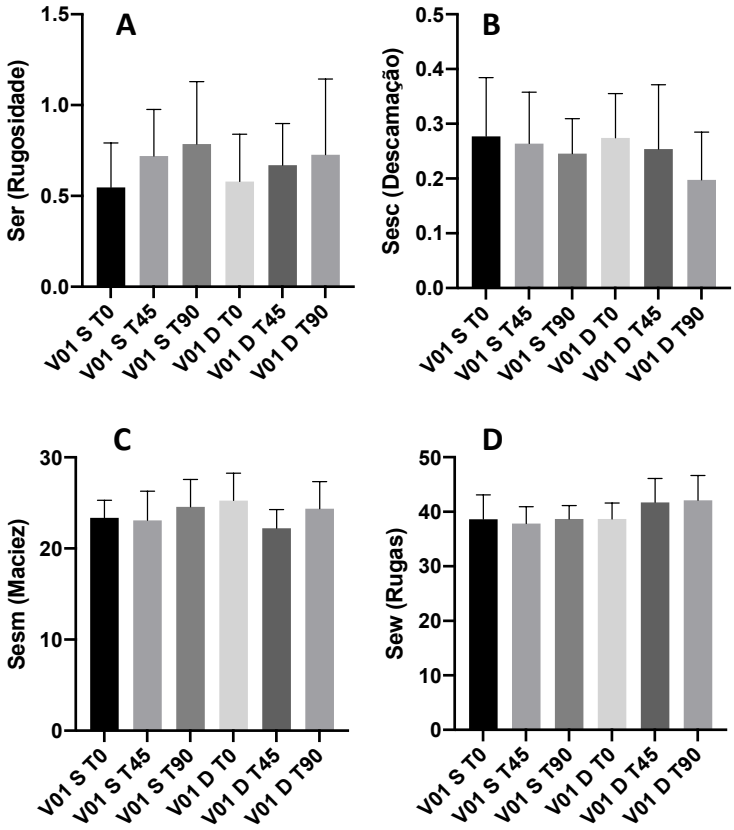
Figura 33. Avaliação do pH da pele na região nasolabial da face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos.



5.3.5 Determinação do microrrelevo cutâneo

Não foram observadas alterações significativas Ser, Sesc, Sew ou Sesm (Figura 34). Percebe-se uma diminuição mais acentuada do Sesc para o grupo diabético quando comparado com o grupo saudável, porém não estatisticamente diferente entre os tempos.

Figura 34. Avaliação do parâmetro Ser, que indica a rugosidade da pele (A), na região nasolabial da face, Sesc (B), que indica a descamação da pele, Sesm, que indica a maciez da pele (C) e Sew, que avalia as rugas presentes na pele (D) na região nasolabial da face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, o rupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos



5.3.6 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência

Na região nasolabial da face, houve queda significativa na quantidade de número de pixels hipocogênicos quando comparando o tempo inicial com o tempo após 90 dias com o uso da formulação (Figura 35 e Figura 38) apenas no grupo diabético. Em relação a razão de ecogenicidade (Figura 36) também houve uma queda

estatisticamente significativa apenas no grupo das diabéticas quando comparando o tempo basal após 3 meses de tratamento. Foi possível observar melhora na ecogenicidade, com a redução na razão de pixels baixos sobre os pixels totais.

Com tudo, não foi possível notar uma variação significativa na espessura da derme (Figura 37) após 90 dias de aplicação da formulação em ambos os grupos.

Figura 35. Número de pixels hipoecogênicos na região nasolabial face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, o grupo diabético, que utilizou a formulação contendo associação de extratos. Significante (**p=0.0414). Maiores valores pixels hipoecogênicos mostra mais danos na pele.

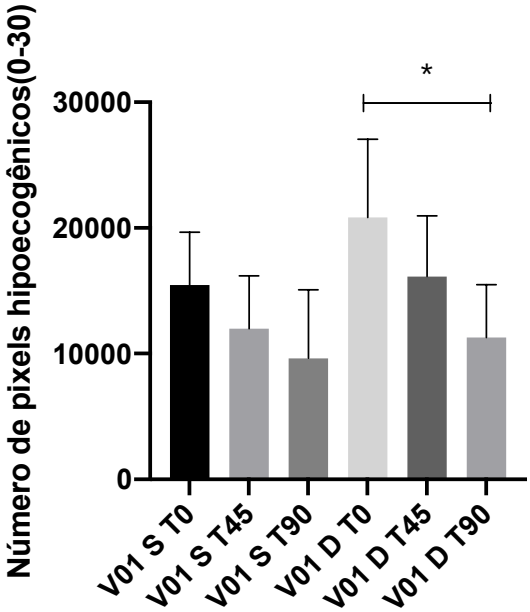


Figura 36. Ecogenicidade da pele em relação do número de pixels hipoecogênicos pelo número de pixels totais, na região nasolabial face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos. Significante (**p=0.0070).

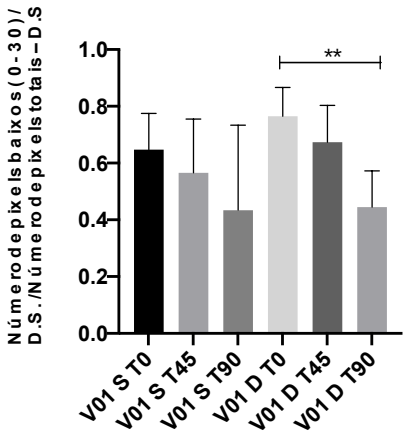


Figura 37. Espessura da derme em milímetros (mm) na região nasolabial face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, o grupo diabético, que utilizou a formulação contendo associação de extratoss.

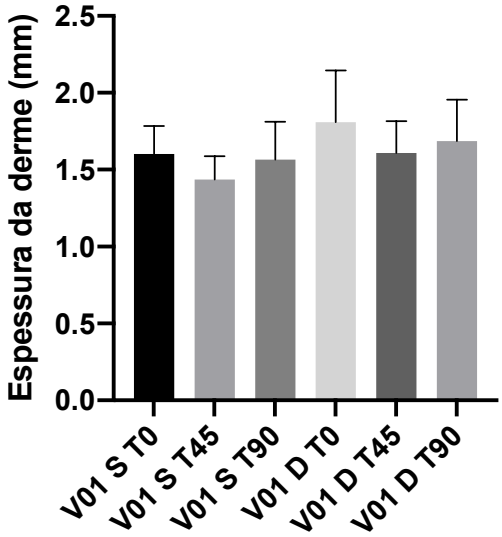
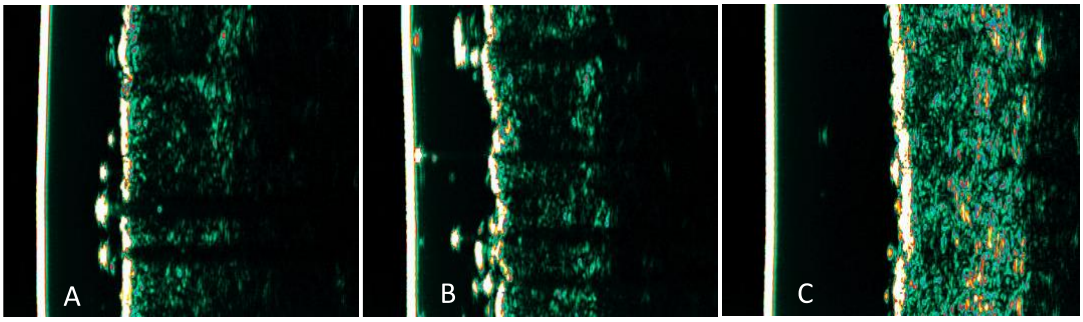


Figura 38. Imagens representativas do ultrassom de alta frequência na região nasolabial da face de uma participante do estudo diabética no tempo inicial (A), após 45 dias (B) e após 90 dias (C) de uso da formulação contendo associação dos extratos.



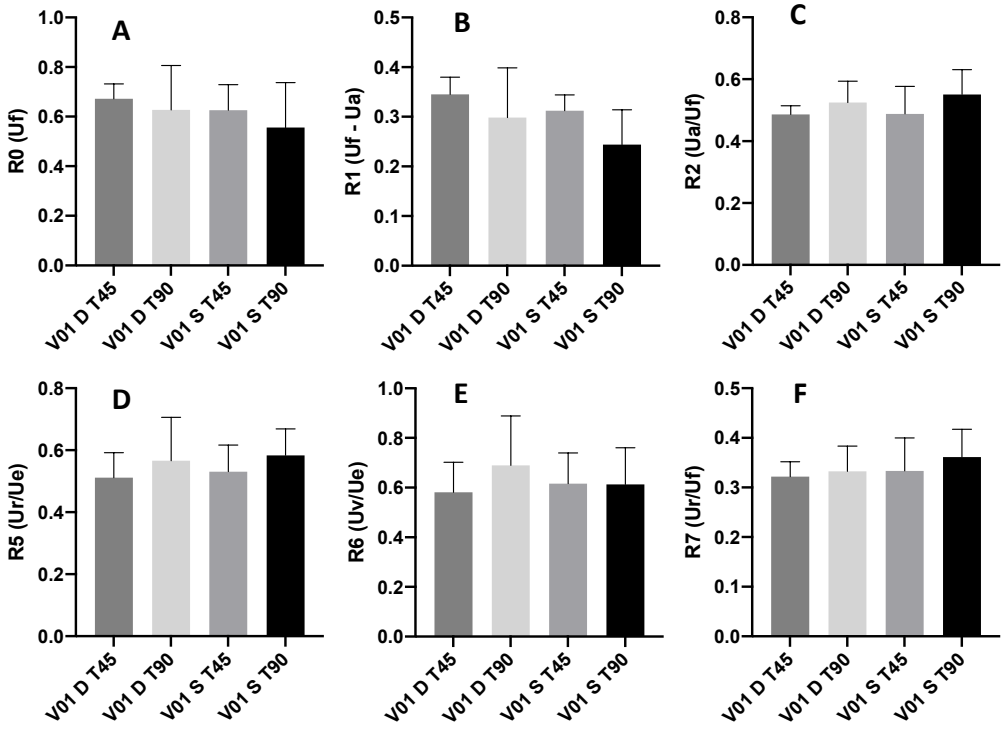
5.3.7 Avaliação das propriedades mecânicas da pele – viscoelasticidade

Os resultados do tempo basal das propriedades viscoelasticidade (Figura 39) da pele apresentaram problemas levando a não obtenção dos mesmos, sendo possível apresentação apenas dos valores dos tempos 45 e 90.

Não foram observadas nenhuma alteração significativa durante o período de estudo em nenhum dos parâmetros analisados pele.

Os AGEs têm papel fundamental no decaimento da elasticidade da pele. A influências desses produtos sob o cross-linking do colágeno resulta em mudanças fisiológicas das propriedades do colágeno, o que faz com que haja o aumento da rigidez, maior incidência de ruptura e variações na temperatura e solubilidade (XIN et al., 2019)

Figura 39. Avaliação do parâmetro R0, que indica a distensão total da pele (A), R1, que indica a deformação residual (B), R2, que indica a viscoelasticidade (C), R5, que indica a elasticidade net (D), R6, que indica a porção da viscoelasticida (E) e R7, que indica a elasticidade biológica da pele (F) na região nasolabial face, sendo V01 S, o grupo saudável e V01 D, o grupo diabético que utilizou a formulação contendo associação de extratos.

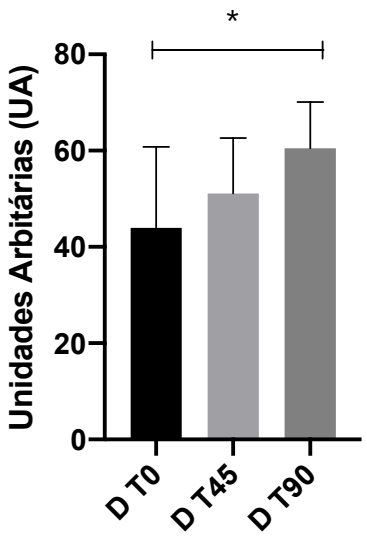


5.4 Avaliação dos efeitos clínicos em longo prazo do grupo v02

5.4.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Os resultados da avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo – hidratação, está representado na Figura 40. Houve aumento significativo na hidratação do grupo diabético com uso da formulação com ativo da alga vermelha.

Figura 40. Conteúdo aquoso do estrato córneo da região nasolabial da face, sendo D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo o ativo de alga vermelha (*p=0.0175)



5.4.2 Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele

Os resultados da distribuição da hidratação da superfície da pele representados pelos índices Gray Index T e MGL na Figura 41, não houve aumento significativo na hidratação em ambos os grupos no período de estudo.

Na figura 42 temos a imagem topográfica da distribuição da água na superfície da epiderme onde podemos perceber que houve uma hidratação com o uso da formulação desenvolvida, porém não significativa.

Figura 41. Distribuição da hidratação da superfície da pele representados pelos índices Gray Index T e MGL, sendo D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo o extrato de alga vermelha.

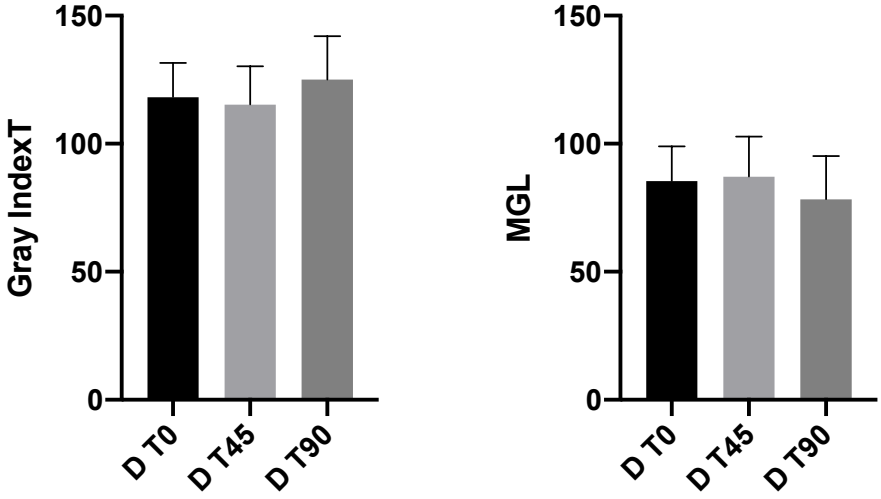
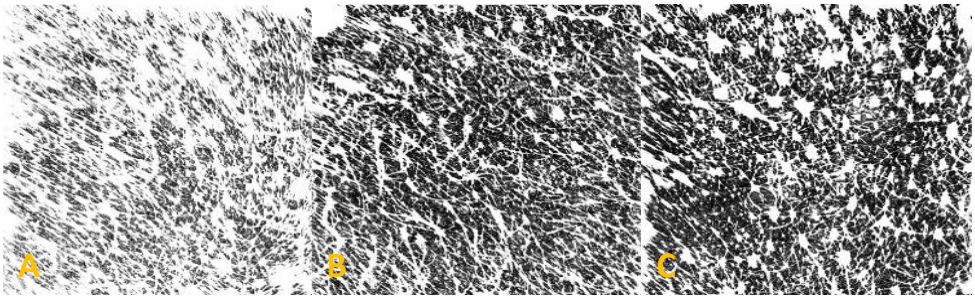


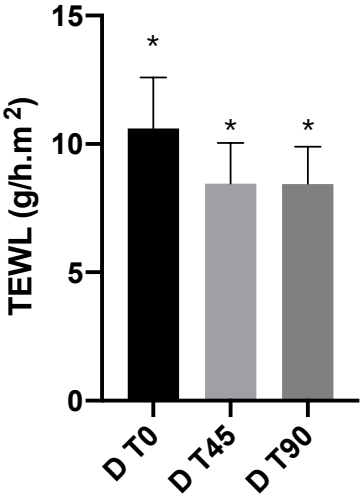
Figura 42. Imagem representativa da topografia da distribuição da água na superfície da pele das participantes de pesquisa diabéticas no tempo basal (A), após 45 dias de uso do produto (B) e após 90 dias (C).



5.4.3 Determinação da perda transepidérmica da água (TEWL)

Na Figura 43 foi possível observar que houve alteração significativa em todos os tempos de estudo relacionada na perda transepidérmica de água – TEWL no grupo de estudo com o uso da formulação.

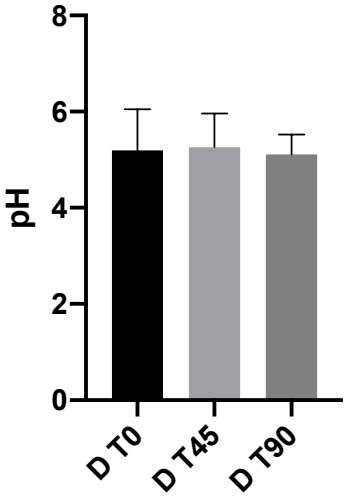
Figura 43. Perda transepidérmica de água na região nasolabial da face, sendo D, o grupo diabético que utilizou a formulação contendo o extrato de alga vermelha.



5.4.4 Determinação do pH da pele

A utilização da formulação não promoveu alterações no pH da pele do grupo de estudo após 90 dias de uso (Figura 44).

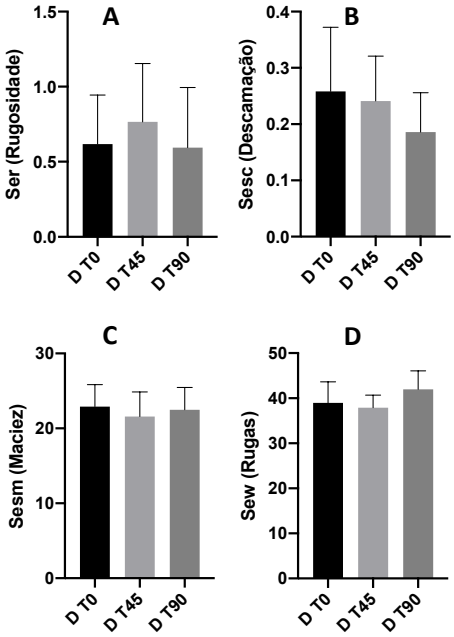
Figura 44. Avaliação do pH da pele na região nasolabial da face, sendo D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo o ativo de alga vermelha.



5.4.5 Determinação microrrelevo cutâneo

Não foram observadas alterações significativas Ser, Sesc, Sew ou Sesm (Figura 45), porém percebe-se uma diminuição acentuada do Sesc mas sem significância estatística.

Figura 45. Avaliação do parâmetro Ser, que indica a rugosidade (A), Sesc, que indica a descamação (B), Sesm, que indica a maciez (C) e Sew, que avalia as rugas (D) na pele sendo D, ogrupo diabético que utilizou a formulação contendo o ativo de alga vermelha.



5.4.6 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência

Na região nasolabial da face, houve queda significativa na quantidade de número de pixels hipocogênicos quando comparando o tempo inicial com o tempo após 90 dias com o uso da formulação (figura 46 e Figura 49) no grupo de estudo.

Em relação a razão de ecogenicidade (Figura 47) também houve uma queda estatisticamente significativa quando comparando o tempo basal após 3 meses de tratamento, porém também foi observado uma diminuição da relação na metade do tratamento, mostrando já uma eficácia do mesmo.

Foi possível observar melhora na ecogenicidade, com a redução na razão de

pixels baixos sobre os pixels totais.

Já em relação a espessura, foi possível observar uma diminuição significativa após 45 dias do uso da formulação (figura 48) e aumento do mesmo no tempo restante do tratamento, que não foi significativo.

Figura 46. Relação do número de pixels hipoecogênicos na região nasolabial face, sendo D, ogrupo diabético, que utilizou a formulação contendo o extrao de alga vermelha. Significante (***p=0.0001). Maiores valores pixels hipoecogênicos mostra mais danos na pele.

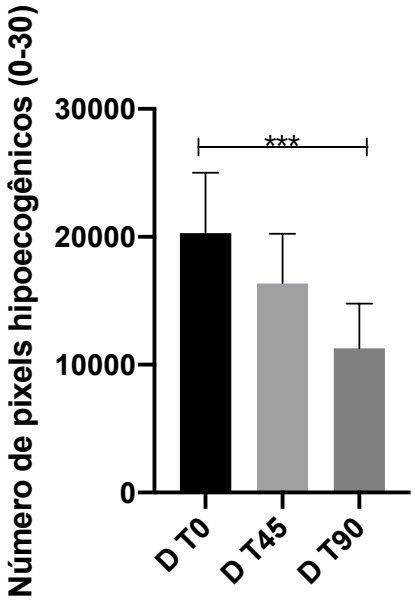


Figura 47. Avaliação da ecogenicidade da pele em relação do número de pixels hipoecogênicos pelo número de pixels totais, na região nasolabial face, sendo D, ogrupo diabético que utilizou a formulação com o extrato de alga vermelha. Significante (**p=0.0045; ****p=<0.0001).

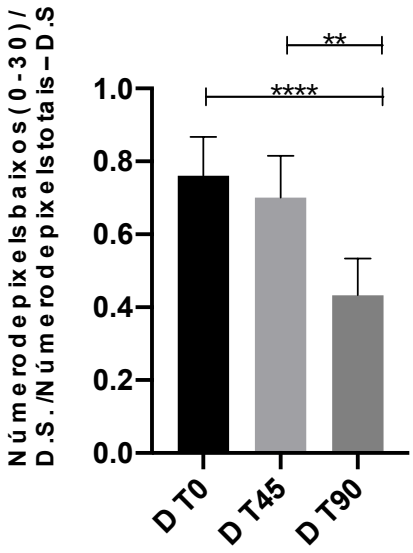


Figura 48. Espessura da derme em milímetros (mm) na região nasolabial face sendo D, o grupo diabético, que utilizou a formulação contendo o ativo de alga vermelha.

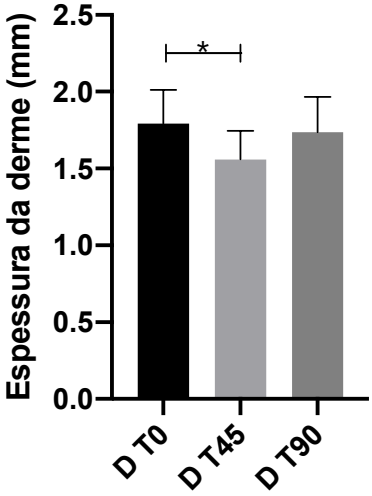
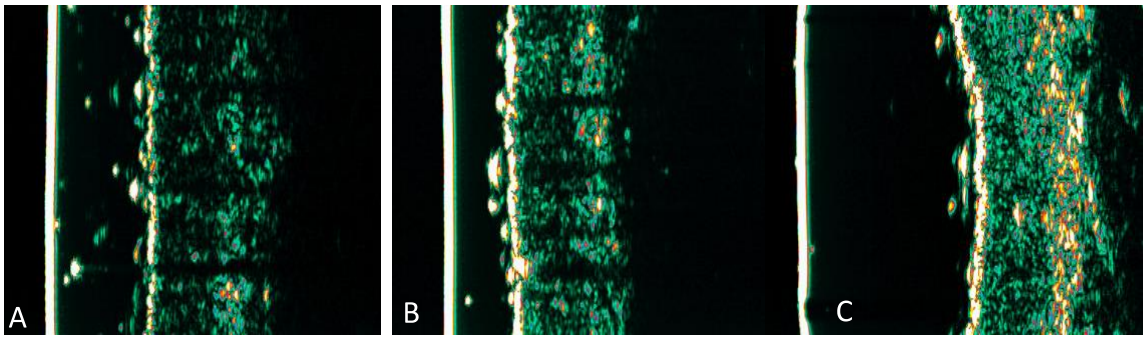


Figura 49. Imagem do ultrassom de alta frequência na região nasolabial das participantes do estudo diabéticas no tempo inicial (A), após 45 dias (B) e após 90 dias (C) de uso da formulação contendo o extrato de alga vermelha.

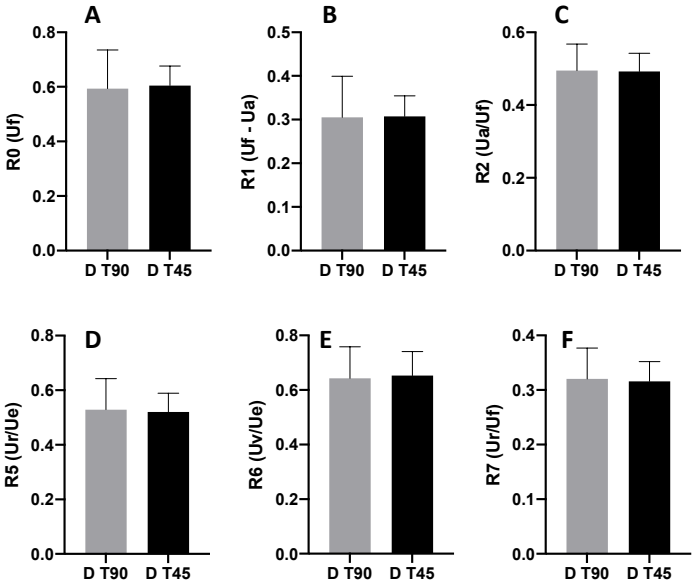


5.4.7 Avaliação das propriedades mecânicas da pele - viscoelasticidade

Os resultados do tempo basal das propriedades viscoelasticidade da pele apresentaram problemas levando a não obtenção dos mesmos, sendo possível apresentação apenas dos valores dos tempos 45 e 90 (Figura 50).

Não foram observadas nenhuma alteração significativa durante o período de estudo em nenhum dos parâmetros analisados pele.

Figura 50. Avaliação do parâmetro R0, que indica a distensão total da pele (A), R1, que indica a deformação residual (B), R2, que indica a viscoelasticidade (C), R5, que indica a elasticidade net (D), R6, que indica a porção da viscoelasticidade(E) e parâmetro R7, que indica a elasticidade biológica da pele, na região nasolabial face, sendo D o grupo diabético que utilizou a formulação contendo o ativo de alga vermelha.

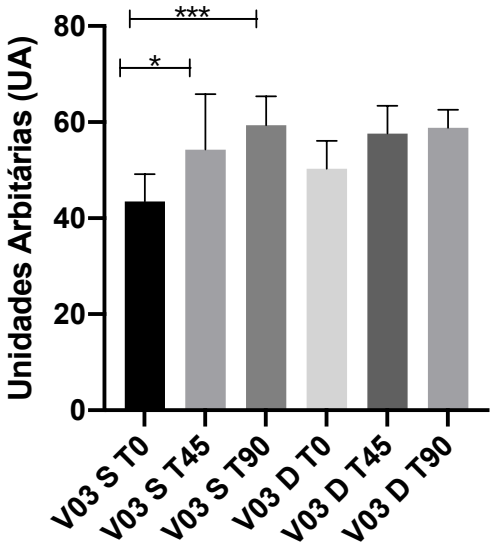


5.5 Avaliação dos efeitos clínicos a longo prazo do grupo V03

5.5.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

O resultado da avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo – hidratação, está representado na Figura 51. Houve aumento significativo na hidratação no grupo saudável, tanto após 45 dias como após 90 dias de tratamento com uso da formulação veículo.

Figura 51. Conteúdo aquoso do estrato córneo da região nasolabial da face, sendo V03 S - o grupo saudável e V03 D o grupo diabético que utilizou a formulação veículo. Significante (*p=0.0241; ***p=0.0002).



5.5.2 Determinação da distribuição da hidratação da superfície da pele

Os resultados da distribuição da hidratação da superfície da pele representados pelos índices Gray Index T e MGL na Figura 52, não houve aumento significativo na hidratação em ambos os grupos no período de estudo.

Nas figuras 53 e 54 temos a imagens topográficas da distribuição da água na superfície da epiderme onde podemos perceber que houve uma hidratação com o uso da formulação desenvolvida, porém não significativa.

Figura 52. Distribuição da hidratação da superfície da pele representados pelos índices Gray Index T e MGL, sendo V03 S, o grupo saudável e V03 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação veículo.

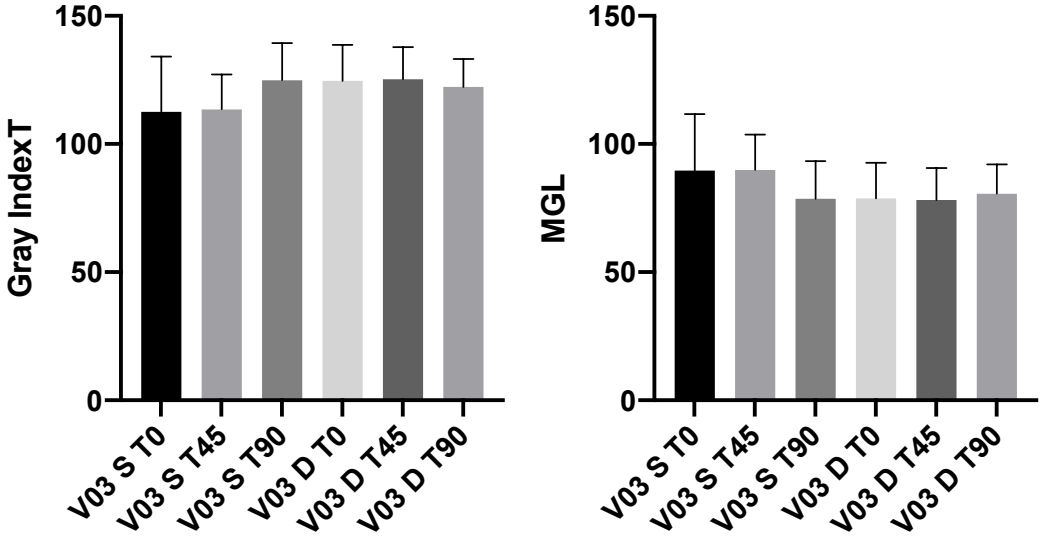


Figura 53. Imagem representativa da topografia da distribuição da água na superfície da pele das participantes de pesquisa diabéticas no tempo basal (A), após 45 dias de uso do produto (B) e após 90 dias (C).

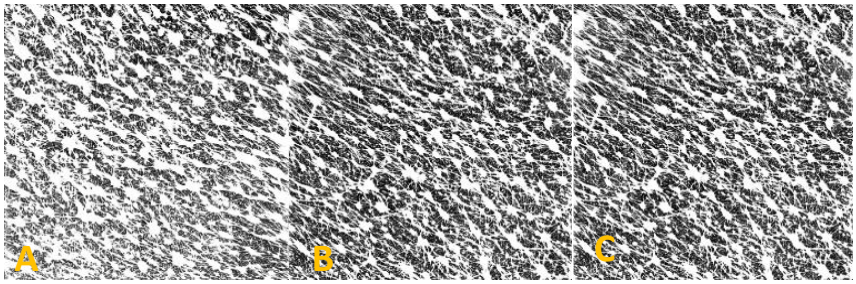
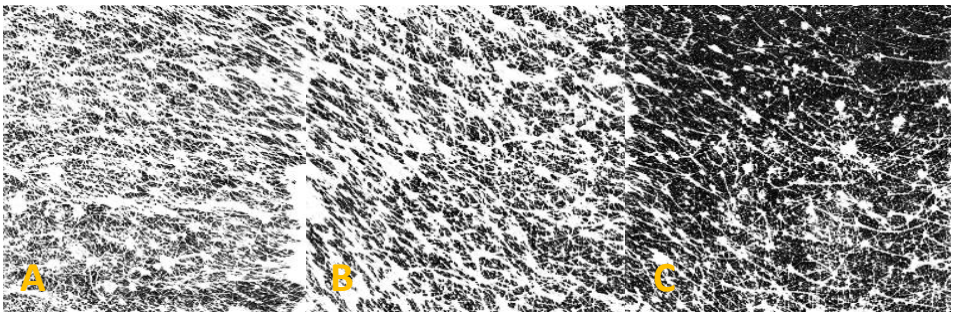


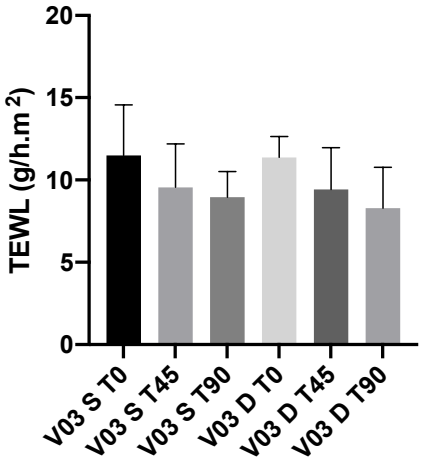
Figura 54. Imagem representativa da topografia da distribuição da água na superfície da pele das participantes de pesquisa saudáveis no tempo basal (A), após 45 dias de uso do produto (B) e após 90 dias (C).



5.5.3 Determinação da perda transepidérmica da água (TEWL)

Não foi possível observar nenhuma alteração relacionada na perda transepidérmica de água – TEWL, em nenhum dos grupos que fizeram o uso da formulação desenvolvida após 90 dias de uso (Figura 55).

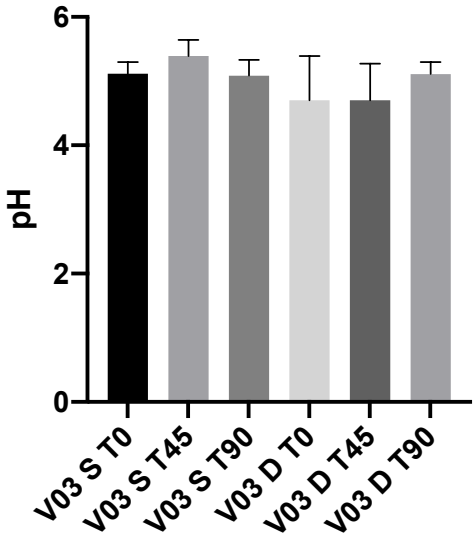
Figura 55. Perda transepidérmica de água na região nasolabial da face, sendo V03 S, o grupo saudável e V03 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação veículo.



5.5.4 Determinação do pH da pele

A utilização da formulação não promoveu alterações no pH da pele de ambos os grupos após 90 dias de uso (Figura 56).

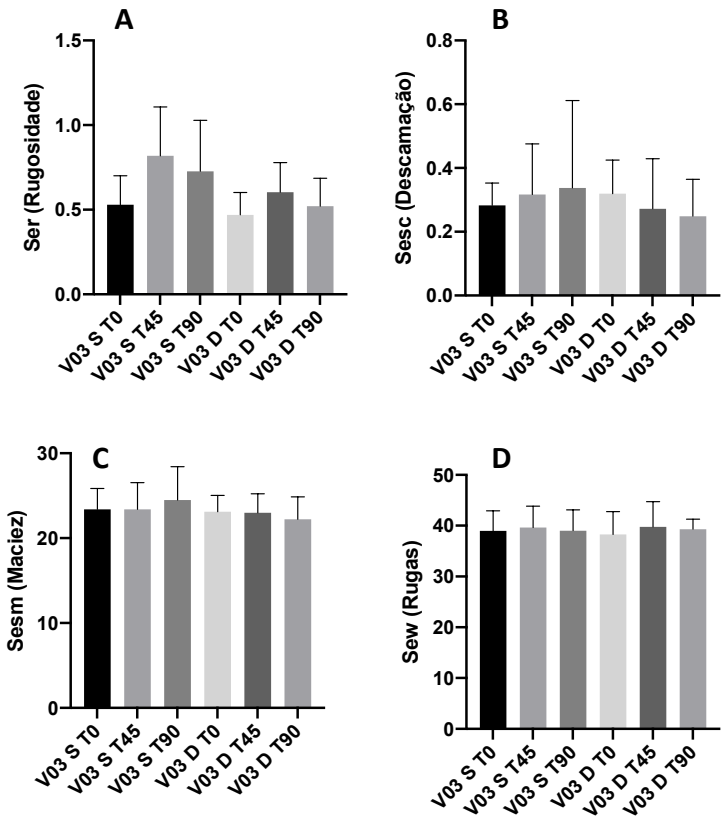
Figura 56. Avaliação do pH da pele na região nasolabial da face, sendo V03 S, o grupo saudável e V03 D, ogrupo diabético que utilizou a formulação veículo.



5.5.5 Determinação do microrrelevo cutâneo

Não foram observadas alterações significativas Ser, Sesc, Sew ou Sesm (Figura 57), porém percebe-se uma diminuição acentuada do Sesc mas sem significância estatística.

Figura 57. Avaliação do parâmetro Ser, que indica a rugosidade da pele (A), Sesc, que indica a descamação (B), Sesm, que indica a maciez (C) e Sew (D) que avalia as rugas presentes da pele, na região nasolabial da face, sendo V03 o grupo saudável e V03 D, o grupo diabético que utilizou a formulação veículo.



5.5.6 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência

Na região nasolabial da face, não houve queda significativa na quantidade de número de pixels hipocogênicos quando comparando o tempo inicial com o tempo após 90 dias com o uso da formulação (Figura 58 e Figura 61) no grupo de estudo e nem na espessura da derme (Figura 60).

Em relação a razão de ecogenicidade (figura 59) foi possível observar uma melhora da ecogenicidade apenas no grupo saudável após o período de tratamento com a formulação placebo.

Figura 58. Relação do número de pixels hipoecogênicos na região nasolabial face, sendo V03 S, o grupo saudável e V03 D, ogrupo diabético, que utilizou a formulação veículo. Maiores valores pixels hipoecogênicos mostra mais danos na pele.

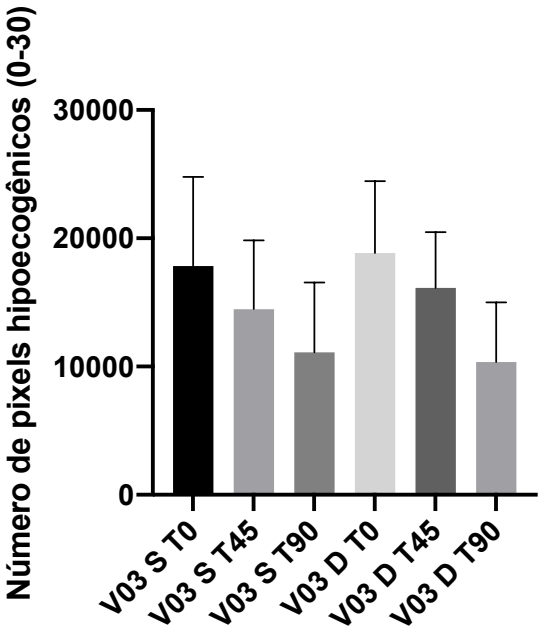


Figura 59. Avaliação da ecogenicidade da pele em relação do número de pixels ecogênicos pelo número de pixels totais, na região nasolabial face, sendo V03 S, o grupo saudável e V03 D, o grupo diabético que utilizou a formulação veículo.

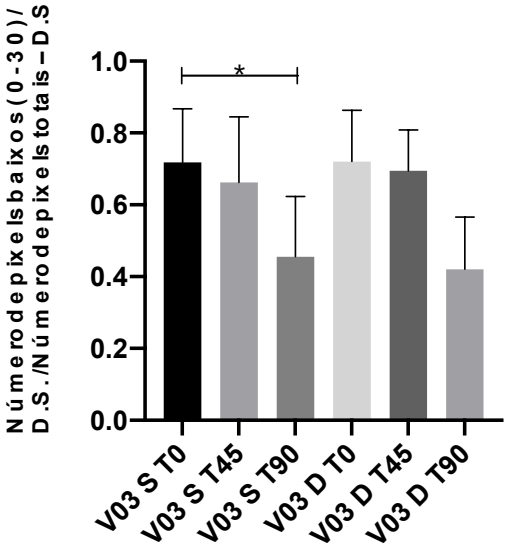


Figura 60. Espessura da derme em milímetros (mm) na região nasolabial face, sendo V03 S, o grupo saudável e V03 D, ogrupo diabético, que utilizou a formulação veículo.

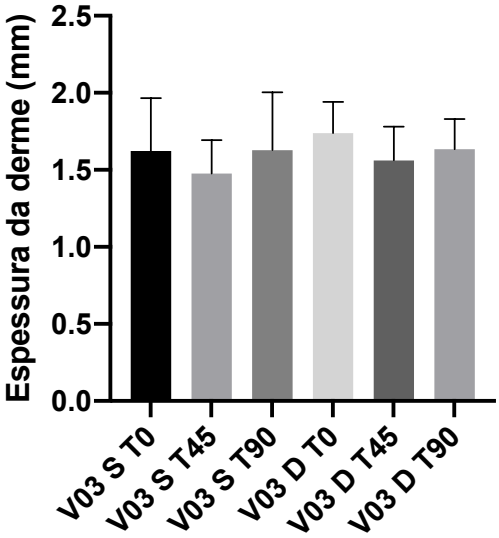
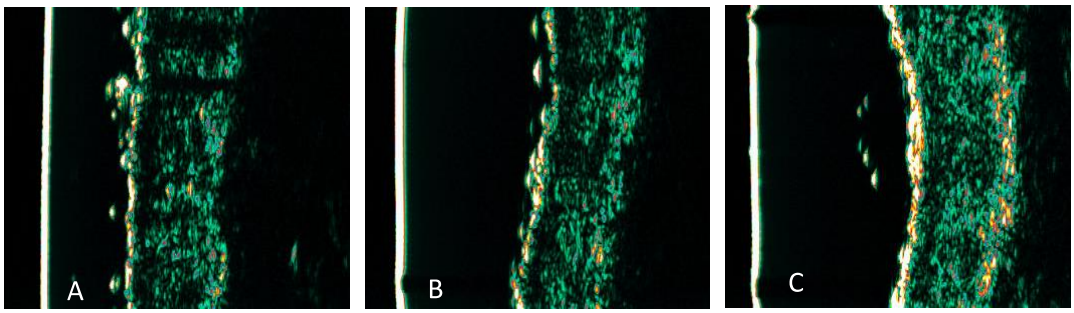


Figura 61. Imagem do ultrassom de alta frequência na região nasolabiall das participantes do estudo diabéticas no tempo inicial (A), após 45 dias (B) e após 90 dias (C) de uso da formulação veículo.

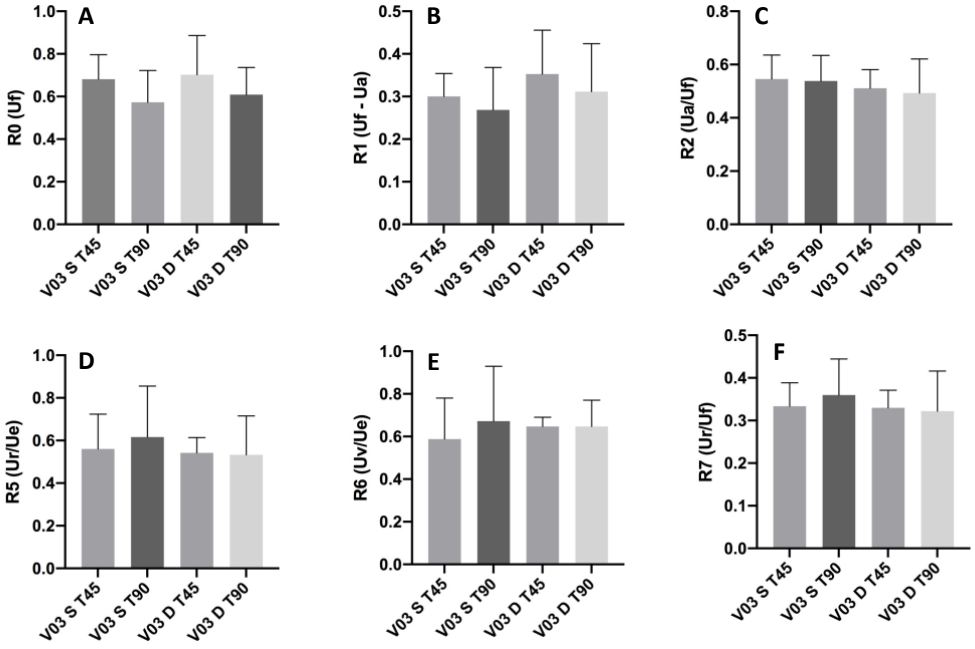


5.5.7 Avaliação das propriedades mecânicas da pele – viscoelasticidade

Os resultados do tempo basal das propriedades viscoelasticidade da pele apresentaram problemas levando a não obtenção dos valores no tempo basal, apenas nos tempos 45 e 90.

Não foram observadas nenhuma alteração significativa durante o período de estudo em nenhum dos parâmetros analisados pele (Figura 60).

Figura 62. Avaliação do parâmetro R0, que indica a distensão total da pele (A); R1, que indica a deformação residual (B); R2, que indica a viscoelasticidade (C); R5, que indica a elasticidade net (D); R6, que indica a porção da viscoelasticidadeda (E) e R7, que indica a elasticidade biológica (F) na região nasolabial face, sendo V03 S, o grupo saudável e V03 D, o grupo diabético que utilizou a formulação veículo.



No grupo veículo e o com associação de substâncias ativas foram feitas análises de MRC nas participantes de pesquisa diabéticas, no tempo inicial, antes de começar o tratamento com o produto desenvolvido e no tempo final, após os 90 dias do estudo. Apesar de algumas desistências que ocorreram, foi possível observar a modificações entre ambos os tempos.

5.6 Análise das caracteristicas morfologicas da pele por Microscopia de Reflectância - MCR

A análise das imagens obtidas por MCR permite identificar alterações mais profundas na pele. Uma análise foi feita em relação à melhora na morfologia do colágeno presente na pele das participantes de estudo diabéticas antes e após 90 dias de uso das formulações nos grupos V01, com as formulações que foram acrescidas de ambas substâncias ativas e no grupo V03 que utilizou a formulação veículo.

No grupo V01 foi possível observar uma melhora em relação ao escore do colágeno da pele (Figuras 63 e 64), bem como também uma melhora em relação ao aparecimento de papilas policíclicas (Figura 65), que é um dos parâmetros comumente descritos para avaliar o envelhecimento (LONGO et al., 2013; LONGO et al., 2012)

Figura 63. Avaliação por escore da qualidade do colágeno nas participantres de estudo saudáveis e diabéticas, no grupo que utilizou por 90 dias a formulação contendo associação de substâncias ativas Significante (p=0.0043)

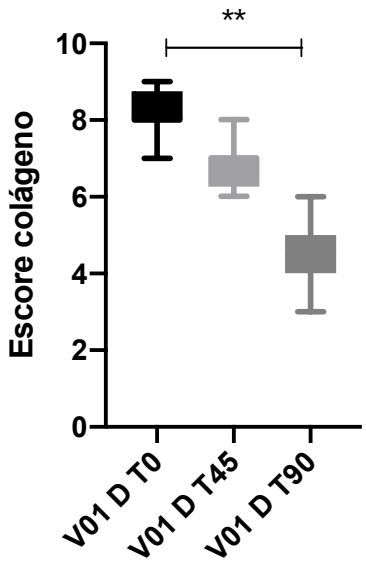


Figura 64. Imagens representativas do MRC do colágeno das participantes de estudo diabéticas sendo (A), o tempo inicial antes do uso da formulação e (B), após 90 dias do estudo. O circulo representa o colágeno amorfo e grosseiro, e as setas mostram a melhora na morfologia do colágeno após o uso das formulações que continham as substâncias ativas, não aparentando hiporeflexivo.

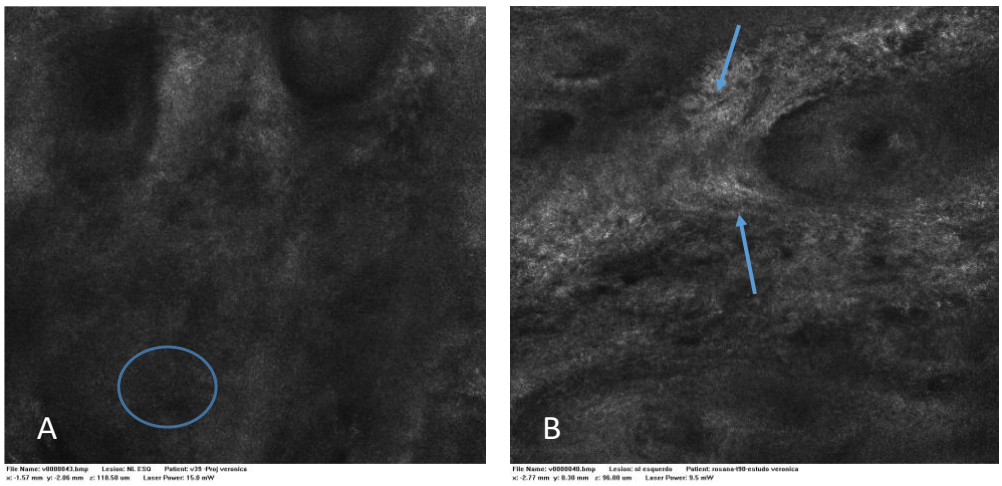
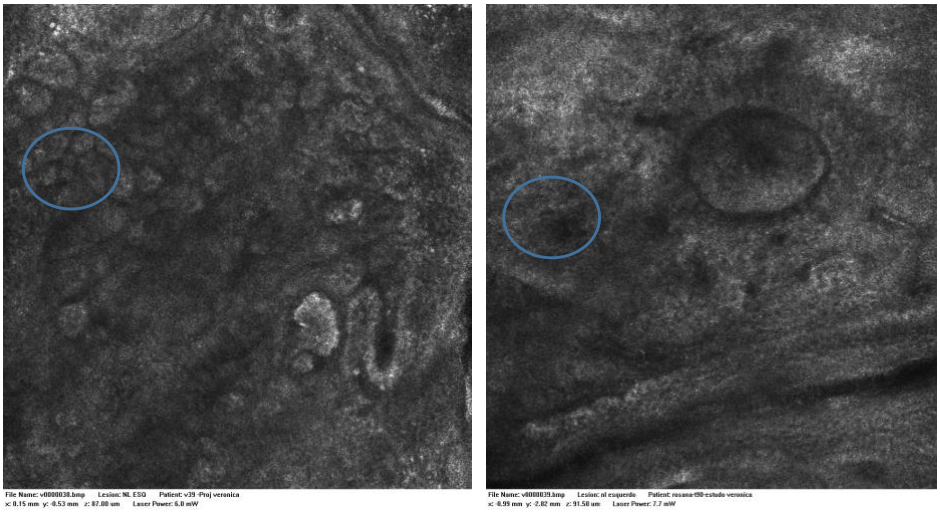
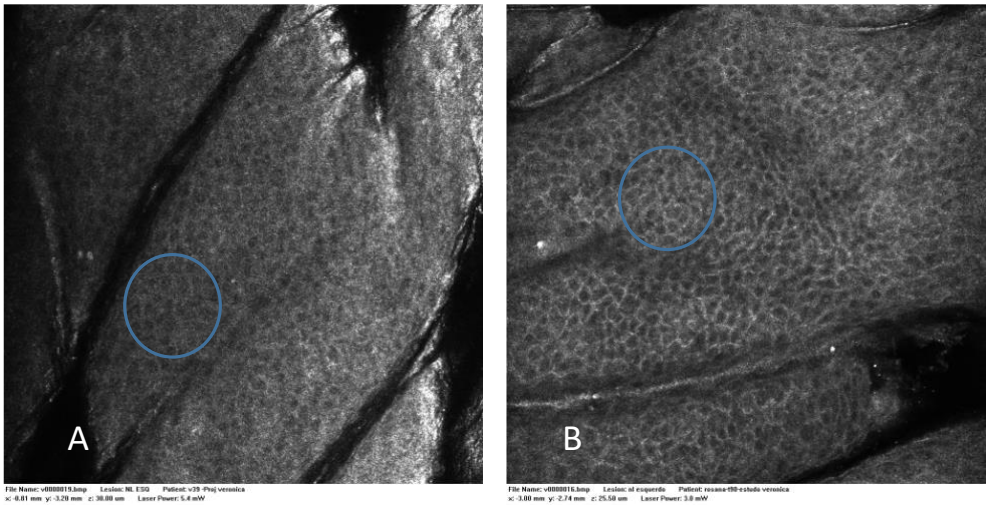


Figura 65. Imagens representativas do MRC da junção dermeepidérmica, onde o círculo em A mostra a presença de múltiplas papilas policíclicas e B, uma papila mais definida.



Manfredini et al. 2013, relataram que a hidratação pode ser observada nas imagens do microscópio confocal pelo aumento do brilho interqueratinócitos das células na camada granulosa, como também a melhora no padrão “honeycomb” (WURM et al., 2012). No nosso estudo foi possível observar uma melhora em ambos os paramtetros utilizados para analisar a hidratação da pele (Figura 66).

Figura 66. Imagens representativas do MRC do brilho interqueratinócitos no tempo inicial (A) do estudo e após 90 dias (B) com o uso da formulação acrescida com amas substaâncias ativas.



Dessa forma, a formulação proposta foi efetiva também na hidrtação da pele. Os dados obtidos no MCR corroboram com os resultados obtidos nos equipamentos de biofísica, bem como, na viscoelasticidade da pele.

Por outro lado, no grupo V03 não foi possível observar melhora no escore da morfologa do colágeno (Figuras 67 e 68) das participantes diabéticas.

Figura 67. Avaliação por escore da morfologia do colágeno nas participantes de estudo diabéticas, no grupo que utilizou por 90 dias a formulação veículo.

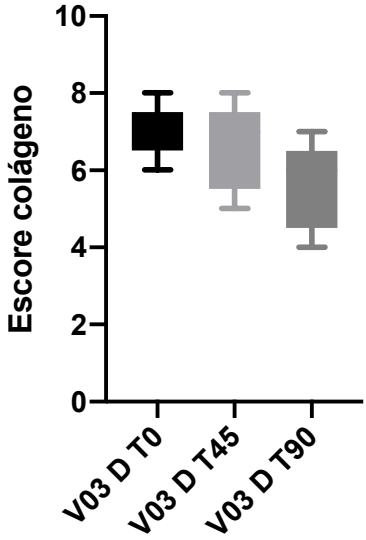


Figura 68. Imagem representativa obtida do MRC mostrando o colágeno, representado pelas setas, das participantes de estudo diabéticas sendo (A), o tempo inicial antes do uso da formulação e (B), após 90 dias do estudo. No círculo destaca a presença de uma papila dérmica regular (A), e após 90 dias pode-se perceber a presença de papilas policíclicas (B).

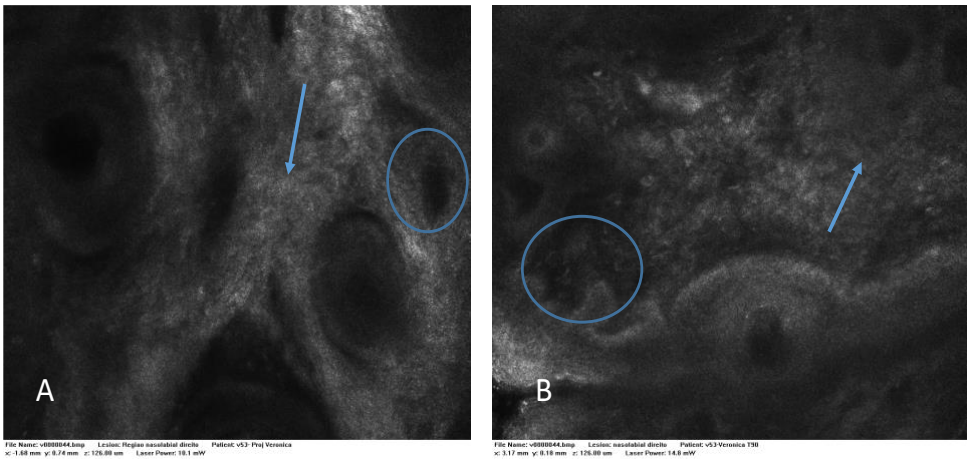
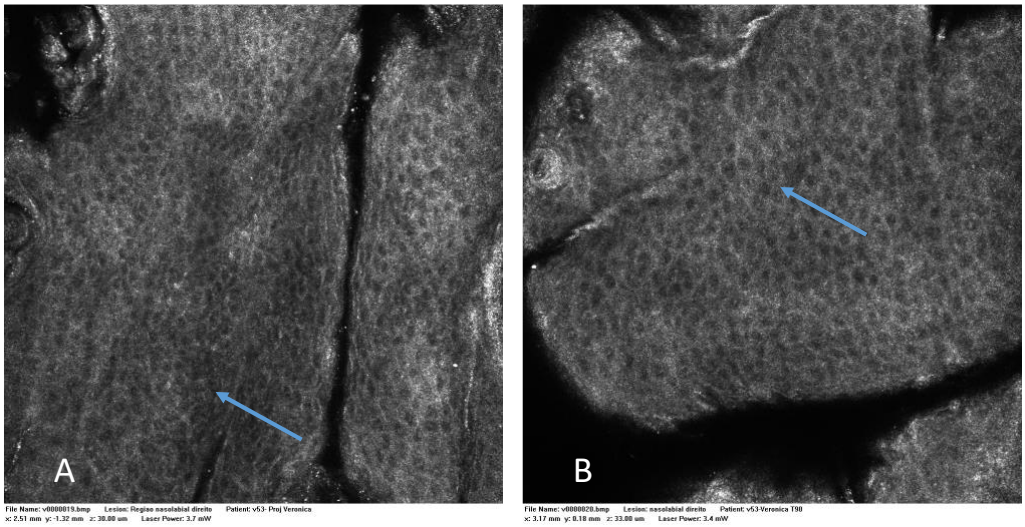


Figura 69. Avaliação das imagens de MCR do brilho interqueratinócitos no tempo inicial (A) do estudo e após 90 dias (B) com o uso da formulação acrescida com ambas substâncias ativas.



As participantes do estudo que utilizaram a formulação veiculo, apesar de não apresentarem nenhuma melhora em relação ao colágeno, apresentaram uma melhora na sua hidratação com o aumento do brilho interqueratinocitos (MANFREDINI et al., 2013; MANFREDINI et al., 2019), o que sugere que as matérias primas utilizadas na formulação base auxiliaram na hidratação cutânea.

De acordo com as analise quantitativa (Tabela 6), houve aumento dos valores da profundidade da papila no grupo V01, o qual apresentou um menor aparecimento de papilas policíclicas após 90 dias de tratamento, o que corrobora com os resultados observados na analise qualitativa das imagens obtidas no MCR.

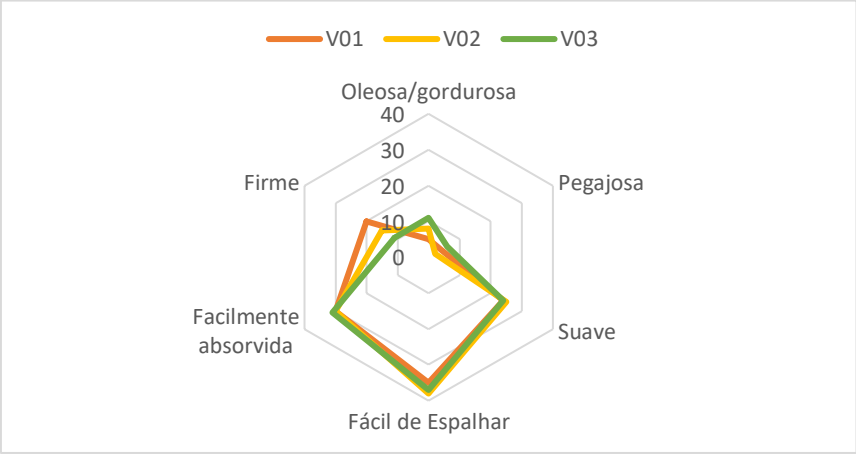
Tabela 6. Espessura das camadas da epiderme das participantes diabéticas do estudo antes (basal) e após 90 dias de aplicação das formulações veículo e com associação de substâncias ativas. (* significante em relação ao valor basal – t0, p<0,05).

	Basal (t0)	Após 90 dias
Espessura Estrato Córneo		
Associação Veículo	12,375 ± 2,117 14,200 ± 2,885	14,000 ± 2,535 13,900 ± 2,535
Espessura Granulosa		
Associação Veículo	13,750 ± 3,982 15,000 ± 2,632	16,000± 2,121 10,400 ± 3,209*
Profundidade das Papilas		
Associação Veículo	31,688 ± 5,922 38,700± 3,994	33,375± 4,969 36,300± 2,971
Espessura Mínima da Epiderme		
Associação Veículo	28,875± 6,616 30,600± 5,550	29,125± 6,849 22,600± 4,561*
Espessura Máxima da Epiderme		
Associação Veículo	61,656± 7,864 69,300± 5,586	61,938± 8,625 58,900± 5,189*
Espessura Média		
Associação Veículo	45,484± 4,853 49,950± 5,197	45,844± 65,612 40,750± 4,654*

5.7 Avaliação sensorial das formulações, percepção de eficácia da formulação e intenção de compra

A aceitabilidade das formulações desenvolvidas fora analisada pelas participantes do estudo ao final dos 3 meses de tratamento. Todas as participantes do estudo foram usaram os três produtos desenvolvidos e avaliaram características como oleosa, facilidade de espalhar, facilmente absorvida, suavidade, firmeza e pegajosidade logo após a aplicação (Figura 61).

Figura 70. Avaliação da percepção sensorial imediato das três formulações desenvolvidas: V01, associação de extratos; V02, acrescido de extrato de alga vermelha e V03 veículo.



Após 5 minutos foram analisados parâmetros como: resíduo oleoso/branco, hidratação da pele, maciez, toque seco (Figura 62).

Figura 71. Avaliação da percepção sensorial após 5 minutos de aplicação das três formulações obtidas: V01, associação de extratos; V02, acrescido de extrato de alga vermelha e V03 veículo.

Ao final foi pedido para escolherem a formulação que mais agradou (Figura 63) e sua pretensão de compra, caso o produto fosse comercializado (Figura 64).

Figura 72. Avaliação da escolha de qual formulação agradou mais as participantes de pesquisa.

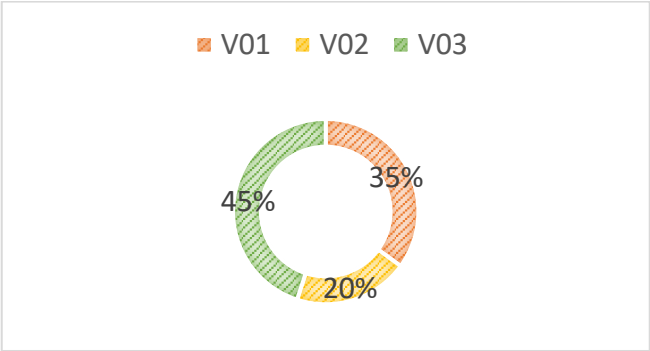
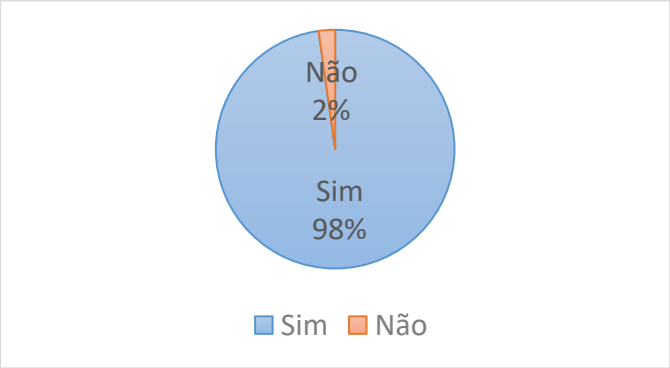


Figura 73. Pesquisa de intenção de compra da formulação.



A análise sensorial e percepção da eficácia das formulações é fundamental para avaliar a aceitabilidade e adesão das participantes do estudo na pesquisa, que refete na adesão aos tratamentos tópicos.

6. DISCUSSÃO

Com o passar do tempo, a Diabetes Mellitus vem aumentando sua prevalência em todo mundo e estima-se que até 2025 o número de pessoas portadoras da doença será de aproximadamente 285 milhões de adultos (ROSEN & YOSIPOVITCH,2018). A DM afeta a pele através de muitos mecanismos, mas o estado de hiperglicemia e os AGEs são os dois mecanismos mais conhecidos e mais estudados na literatura (LEGIAWATI et al., 2020).

A auto estima dos pacientes diabéticos também é considerado um fator para eles serem alvos de estudo, pois por estarem constantemente regrados por dieta, apresentarem os sinais de envelhecimentos mais precocemente, além de muitas vezes possuírem outras doenças faz com que esse grupo tenha uma baixa auto estima em relação a si (SAKAI et al, 2005; DE SOUZA FREITAS et al., 2020).

Com isso, é importante a pesquisa de novas substâncias ativas anti glicantes eficazes que possam ajudar na qualidade de vida e na auto estima desse grupo específico que irá aumentar com o passar dos anos.

No presente estudo, foi desenvolvida uma base cosmética minimalista que foi usada como veículo para as outras duas formulações acrescidas dos extratos com concentrações adequadas de materiais graxos e matérias primas hidrofílicas, visando a aplicação em peles mais sensíveis.

Na etapa de desenvolvimento das formulações, foi considerado o banco de dados do nosso grupo de pesquisa que contém informações das matérias-primas disponíveis. O desenvolvimento da formulação foi padronizado, tendo variáveis, como o tempo de agitação controlados, para que as formulações não apresentassem diferenças entre si. O tipo de formulação elaborada foi gel creme, pois devido ao clima da cidade, este teria um sensorial mais agradável, aumentando a aderência ao estudo. Os emolientes utilizados foram escolhidos para não deixar resíduo oleoso após a aplicação e que promovesse o toque seco. A base de polímeros hidrofílicos utilizadas para agregar ao toque seco, sendo escolhidos polímeros fácies e de baixo custo para uma formulação com valor agregado mais baixo, pensando em mercado consumidor. Os extratos foram solubilizados em propilenoglicol, umectante.

O perfil de textura das formulações de gel creme teve uma redução nos parâmetros de consistência, índice de viscosidade e firmeza após o acréscimo das

substâncias ativas hidrofílicas. No parâmetro de work of shear, que também é relacionado com a espalhabilidade, houve uma diminuição quando adicionado o extrato de alga vermelha, porém um aumento no seu valor quando adicionado ambas substâncias ativas aquosos.

Estudos anteriores do nosso grupo, mostraram que é possível fazer uma correlação entre o perfil de textura e a análise sensorial das formulações, sendo que a diminuição dos parâmetros obtidos na textura, bem como o work of shear indica uma formulação menos viscosa, e assim, mais fácil de se espalhar (CALIXTO e MAIA CAMPOS, 2017). Apesar das formulações terem sidas bem aceitas pelas participantes de pesquisa, houve uma divergência com a literatura, pois com o acréscimo de ambas susbtâncias ativas, houve um aumento do work of shear, mantendo os outros parâmetros reduzidos comparado com a formulação veículo. Este aumento, entretanto, não foi significantemente alta, uma vez que, a formulação veículo que apresentou o segundo maior valor de work of shear e a formulação com associação de substâncias ativas que apresentou o maior valor, foram a primeira e a segunda escolha, respectivamente, no questionário de intenção de compra.

A formulação base e as que foram acrescidas com as substâncias ativas apresentaram-se estáveis no teste preliminares de centrifugação, na medida do pH durante o tempo do estudo, não havendo alteração de cor, odor e nem textura. O perfil reológico e de textura das três formulações mantiveram-se estáveis sendo assim aptas para o estudo clínico.

Os resultados obtidos na análise do perfil reológico mostraram que o índice de consistência da formulação acrescidas de ambos os extratos foi o menor comparado com as outras duas formulações. O que é corrobora com os parâmetros de textura (CALIXTO e MAIA CAMPOS, 2017).

Nesse contexto, as formulações desenvolvidas com adição dos extratos de alga vermelha e girassol, apresentaram perfil reológico e de textura que são complementares, apesar de divergentes da análise sensorial, e não interferiu na aceitabilidade das participantes de pesquisa, bem como sua aderência.

No estudo clínico, a etapa inicial foi a realização da caracterização da pele diabética comparando-a com a pele saudável. Portadores de DMT2 apresentam uma disfunção na barreira cutânea resultando em alteração na hidratação do estrato

córneo e na perca transepidérmica de agua (SEIRAFI et al., 2009; PARK et al., 2011), um pH da pele mais ácido e coloração amarelada, devido aos substratos formados pela glicação (SUEKI et al., 1991; NIKOLEISHVILi et al., 2006; CRĂCIUN et al., 2015; LU et al., 2020), colagénio disfuncional, causando perca na elasticidade da pele e rugas mais proeminentes (VERZIJL et al., 2000; PAGEON et al., 2010; LONGO et al., 2013; RINNERTHALER et al., 2015; XIN et al., 2020).

Nos resultados da caracterização podemos observar que os valores de TEWL foram significantemente mais altos nas participantes de estudo diabéticas quando comparadas com a saudável. O TEWL é um parâmetro utilizado para avaliar os efeitos da glicação, pois demonstra como está a função barreira cutânea da pele. Além disso, com o estudo desse parâmetro podemos avaliar se o tratamento está sendo eficaz (NØRRESLET et al., 2018).

Robison et al. (2010) descreve que a hidratação do estrato córneo depende de variáveis como arranjos e integridade das camadas, os lipídios lamelares, além de fatores hidratantes naturais (NFM). Os valores obtidos pelo Corneometer não mostraram diferenças na hidratação de ambos os grupos nas duas regiões de estudo.

Em relação a coloração amarelada, foi possível observar analisado parâmetro b que a pele diabética apresentou alteração na cor quando comparada com a pele saudável em ambas regiões de estudo. Brigitte e Joachim, 1985 relataram a presença de unha e pele amarelas em portadores de DMT2. O aumento da concentração sérica de glicose na corrente sanguina faz com que mais produtos de glicosilação sejam formados, por ex. furosina, na pele e nas unhas (LITHNER, 1976; PAGEON et al., 2010 BEHM et al., 2012) o que as tornam amareladas e está relacionada diretamente com o tempo da doença. Quanto mais tempo a pessoa possuir a doença, mais acúmulo terá e consequentemente, mais alteração na cor será perceptivel.

O colágeno é uma importante proteína para a pele, sendo fundamental na estrutura e funcionalidade da matrix extracelular da derme. Uma pele com rugas e mais fina é considerado com um sinal de envelhecimento, sendo resultado da diminuição da quantidade de colágeno funcional. Por outro lado, a glicação faz com que haja um aumento na deteriorização dessa proteína devido ao aumento de crosslinking fazendo com que os sinais de envelhecimento aparecam mais precocemente e mais nítidos (SCHMID et al., 2002). Na análise das técnicas de imagem da pele, as imagens do Visioface obtidas pela câmara de alta resolução

podemos observar que a área, volume e profundidade das rugas nas participantes do estudo diabéticas na região periorbital foi significantemente mais proeminentes do que nas participantes de pesquisa saudáveis. Na região nasolabial, foi possível observar uma diferença estatística na profundidade das rugas nas participantes de pesquisa diabética. Isso corrobora com a anamnese sobre qual parte da face incomodava mais em relação a rugas.

Modificações nas fibras colágenos influenciam diretamente nas propriedades estruturais e mecânicas da matrix extracelular sendo manifestadas por intermedio de rugas, flacidez e perca da elasticidade da pele (Nkengne et al., 2013). No equipamento Dermascan foi possível observar uma concentração maior de pixels hipoecogenicos quando comparada com as participantes de pesquisa saudáveis. Os pixels hipoecogênicos aparecem na imagem obtida com a coloração preta, uma vez que, a escala de ecogenicidade é branco > vermelho > amarelo > verde > azul > preto, sendo (SHIRATA et al. 2019), demonstrando assim que houve uma maior degradação do colágeno existente e esse fenómeno pode estar associado a maior velocidade de degradação dessas proteínas por causa da alta concentração de AGEs (ZELLERS et al., 2021; BEHM et al, 2012)

Corroborando com os resultados obtidos nos equipamentos de imagens, foi demonstrado que a elasticidade da pele diabética é menor, como observado no parâmetro R5. O parâmetro R5, bem como o R2 e R7 são analisados para avaliar o índice de elasticidade da pele. O R5 é a relação da porção elástica da recuperação da pele pela porção elástica da pressão negativa causada pelo probe (XI et al., 2020). A pele saudável apresentou maior valor nesse parâmetro pois a elasticidafe líquida da pele desse grupo apresentou menor tempo entre a retração e distensão imediata, ou seja, a pele saudável por apresentar mais colágenos funcionais volta ao platô mais rapidamente do que a pele diabética que é deficiente nesse tipo de proteína.

Por fim, o último equipamento utilizado na caracterização foi o microscópico de reflectância a laser (MCR), para a avaliação das características morfológicas e estruturais da epiderme e derme. Na análise das imagens obtidas do equipamento de confocal de reflectância (MCR) foi possível observar as diferenças morfológicas entre as peles saudáveis e diabéticas. Longo et al., 2013 descrever as alterações que podem ser encontradas a nível epiderme, junção dermepiderme, papilas dérmicas. Nas imagens obtidas podemos observar diferenças morfológicas importantes entre a

pele saudável e a diabética. Na pele saudável há uma predominância de fibras colágenos reticulaas, finas delimitadas, enquanto a pele diabética apresenta fibras colágenos amorfos e grosseiros, disfuncionais, resultantes da glicação exarcebada.

Outro parâmetro analisado foi a conformação das papilas dérmicas. Nas participantes de pesquisa diabéticas, a profundidade das papilas foi significantemente maiores quando comparadas com as saudáveis, além de, prevalência da presença de papilas policíclicas, mostrado o achatamento da mesma. Esses dados corroboram com a literatura que descrevem que o envelhecimento cutâneo faz com que haja essas alterações morfológicas nas camadas da pele (WURM et al., 2012; MERCURIO et al., 2015) e também que há diferenças no processo de envelhecimento em pessoas diabéticas, sendo essas atingidas mais precocemente (BAUMANN et al., 2018).

Após a finalização do desenvolvimento das formulações que foram escolhidas para o estudo clínico e da caracterização da pele de ambos os grupos, foram recrutadas mais participantes para o estudo clínico de três meses de tratamento. Elas foram selecionadas conforme a faixa etária estipulada, passaram pela anamnese para conhecer hábitos e tempo de doença, no caso das diabéticas. Elas foram instruídas conforme uso, tempo de estudo, tempo de reavaliação, e advertidas caso houvesse alguma alergia ou irritação para entrar em contato. As medidas foram feitas no tempo 0, 45 e 90 dias. O V01 foi o grupo que usaram a formulação com associação de substâncias ativas, V02 a formulação com ativo de alga vermelha e V03 o veículo.

No parâmetro de hidratação do estrato córneo, podemos observar que houve uma melhora na hidratação dos três grupos, tanto no grupo das diabéticas quanto no grupo das saudáveis. No grupo V02 a houve diferença significante entre o tempo inicial após 90 dias de tratamento, enquanto nos outros grupos, apenas o grupo das saudáveis no V03 apresentou melhora significante ao final do estudo.

A hidratação na pele diabética ainda é pouco estudada na literatura, Serafi et al.,2009 relatam não encontraram diferenças na hidratação entre diabéticas e saudáveis, enquanto Sakai et al., 2005 relatam que redução na hidratação, bem como, redução no nível de secreção de sebo. A melhora na hidratação pode estar relacionada com o uso constante da formulação e no grupo V02 que é acrescida no ativo de alga vermelha, o ativo pode ter ajudado na hidratação, melhorando a matrix extracelular. A redução na hidratação pode ser mais observada em diabéticas quem não possuíam a doença controlada do que naquelas que fazem acompanhamento.

Pode-se sugerir que o controle da hiperglicemia pode ser um melhor parâmetro para analisar a hidratação da pele, do que analisando outros dados, por exemplo, hemoglobina glicada, exame recorrente nos portadores de DMT2. Com isso, a hidratação da pele pode ser reversível caso a pessoa tenha um controle no nível glicêmico sérico (LAI et al., 2021).

Relacionando os resultados da hidratação do estrato córneo, podemos observar que a topografia da hidratação da pele teve uma melhora, corroborando com os resultados obtidos no Corneometer®. É possível observar um aumento na intensidade dos pixels cinzas no tempo inicial, antes de cada grupo começar a utilizar as formulacoes, e após 90 dias de uso. Como mencionado anteriormente, o MoistureMap® viabiliza a quantificação da hidratação por capacitância através da obtenção de imagem. Quanto maiores valores de Gray index, mais hidratada está a pele e, consequentemente, a imagem irá possuir uma coloração de cinza mais escura (LEITE e MAIA CAMPOS, 2020).

Os valores de TEWL observados no tempo inicial foi maior do que no final do estudo, nos 3 grupos e em ambos os grupos saudáveis e diabética. No grupo V02 pode-se perceber que a diferença entre os três tempos analisados. Em pacientes diabéticos, alterações no funcionamento dos queratinócitos, devido ao problema de insulina, faz com que a proliferação, diferenciação das células sejam afetadas, causando alterações no estrato córneo e assim prejuízo na barreira cutânea (BEHM et al., 2012). O extrato de alga vermelha tem propriedades que podem ajudar formação na rede de colágeno (SILAB, 2016). O resultado do V02 pode estar correlacionado com esse mecanismo da substância ativa, que apesar do V01 estar em associação com o extrato de girassol, não possuiu o mesmo resultado. A associação das substâncias ativas não mostrou sinergismo, umas vez que, isoladamente foram eficazes.

A faixa de pH da pele saudável é de 4,2 a 5,6, sendo considerada relativamente mais ácida (MALIYAR et al., 2020). O pH das participantes diabéticas, apesar de estarem dentro dos parâmetros normais, apresentaram valores mais ácidos nos três grupos no tempo inicial em relação às saudáveis e após três meses de uso da formulação. A pele dos portadores de DMT2 sofre mudanças em seu microambiente como dsfunções nas glândulas sudoríparas, na termorregulação e no pH (LECHNER et al., 2019; LIU et al., 2017). Devido a essas alterações, os diabéticos apresentam

uma mais concentração de *S. aureus* na pele, do que os saudáveis. Isso faz com que essa microbiota alterada, induza um processo inflamatório na pele, causando dermatite atópica (LIPSKY et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Não foram observados nenhuma alteração significativa nos parâmetros de Ser, Sesc, Sesm e Sew em nenhum dos dois grupos com o uso das três formulações desenvolvidas.

A derme é feita de fibroblastos que produzem colágeno, elastina, ácido hialurônico, entre outros que mantém a pele firme, saudável e macia (BAUMANN et al., 2018). Há na composição da matrix extracelular tem cerca de 28 tipos de colágenos, onde 80% é apenas do tipo I do qual é formada a derme. A concentração de colágeno na derme (CASPERS et al., 1998). Os AGEs também geram estresse oxidativo e faz com que aumente a apoptose dos fibroblastos na matrix extracelular, fazendo com que a pele envelhecida tenha menor quantidade de fibloblastos funcionais (GARY et al., 2009; ALI et al., 2021).

O número de pixels hipoecogênicos nas participantes diabéticas foi maior quando comparada com as participantes saudáveis os grupos V01 e V03. No grupo V01 a quantidade de pixels hipoecogênicos foi significantemente menor após os três meses de estudo, enquanto nas participantes saudáveis, apesar da queda no número, não houve tanta diferença. Consequentemente, isso com que houvesse um aumento significativo da razão da ecogenicidade (pixels hipoecogênicos/pixels totais), ou seja, uma redução na ecogenicidade e densidade dérmica) nas diabéticas. No grupo V02, assim como no grupo V01, foi possível observar uma grande queda no número de pixels hipoecogênicos, bem como o aumento da ecogenicidade.

Em ambos os grupos não foram observadas alterações na espessura da pele, podendo ser um indicativo que a melhora da ecogenicidade da pele está relacionada com aumento da produção de fibras de colágeno e elastina na pele (MELO e MAIA CAMPOS, 2018), ou com a menor degradação das mesmas demostrando a efetividade das substâncias ativas. Por outro lado, o V03, grupo que utilizou a formulação veiculo, não apresentou nenhuma alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados.

Foi usado a sonda de 4 mm do equipamento Cutometer® para analise da viscoelasticidade da pele dos grupos de estudo em profundidade. No grupo V01 houve

redução nos valores dos parâmetros R0 e R1, distensão total e resíduo da deformação respectivamente. Os parâmetros R2, R5, R6 e R7 tiveram um aumento dos valores comparando o tempo de 45 dias e após 90 dias. No grupo V02 não foram observadas nenhum aumento ou diminuição. No grupo V03, que usaram a formulação veiculo, foi possível observar uma diminuição no R0 e R1. O parâmetro R2 e R7 não apresentaram nenhuma alteração, enquanto, R5 e R6 apresentaram um aumento apenas no grupo das saudáveis.

Apesar do processo de formação dos AGEs não serem reversíveis, o uso de antiglicantes/antioxidantes podem ajudar a controlar e evitar mais danos na pele (BAUMANN et al., 2018). Os parâmetros R2 e R7, estão relacionados com a elasticidade bruta e biológica. O valor de R7 ter aumentado com o uso da formulação, pode ser relacionado com as substâncias ativas antiglicantes utilizados que evitou a degradação de mais colágenos e elastinas, como corrobora com os dados na literatura (TRUJILLO et al., 2014; LEGIAWATI et al., 2020).

O aumento nos parametros R5 e R6, quando analisado em os outros dados obtidos, bem como a hidratação, pode estar relacionada com a hidratação do estrato córneo, no grupo V03 (MAIA CAMPOS, et al, 2008). No grupo V01, o parâmetro R6, a porção viscoelástica pode estar relacionada com a maior densidade de colágeno na derme, observado na ecogenicidade (FOSSA SHIRATA et al., 2019).

Cumpre destacar que a aplicação do MCR foi essencial para analisar mais profundamente e de um modo não invasivo, as mudanças na pele de ambos os grupos que utilizaram as formulações veiculo e a que continha a associação das substâncias ativas, principalmente em relação à morfologia do colágeno, uma vez que não há estudos relatados na literatura com a utilização dessa técnica avançada de imagem na avaliação da pele de diabéticos.

Na análise da espessura da pele, não foi possível observar nenhuma alteração significativa entre o tempo inicial e o após 90 dias. Entretanto, podemos perceber que houve um aumento da espessura da camada granulosa no final do estudo de ambos os grupos, o que, de acordo com estudo relatados na literatura, pode ser indicativo segundo estudos correlacionado com a hidratação da pele (MAIA CAMPOS, MELO, GUERRA, 2019).

Em relação ao colágeno foi possível observar uma melhora na morfologia do

mesmo no grupo V01. Longo et al., 2013, relata que o envelhecimento causa modificações nas fibras fazendo com que elas fiquem amorfas, grosso e amontado, sem reflectância. Outro parâmetro analisado nas imagens obtidas foi a formação de papilas policíclicas que é um indicativo do envelhecimento da pele, uma vez que é causado pelo achatamento da camada junção dermoepidérmica (CAMPOS et al., 2017). A avaliação da qualidade do colágeno foi analisado entre o tempo inicial e final para comparação da melhoria do colágeno, se houve menos degradação. Nessa avaliação pode-se perceber que o colágeno do grupo V01 teve alterações, mostrando menos características de envelhecimento como descrevem Longo et al., 2012; Cinotti et al., 2020.

O grupo que utilizou a formulação veículo não apresentou melhora nas condições fisiológicas do colágeno, bem como o aparecimento de papilas policíclicas que corrobora com os valores encontrados na tabela 6, uma vez que a profundidade das papilas nesse grupo aumento. Entretanto condizente com estudos relatados, tanto o grupo V01 quando V03 apresentaram melhora na hidratação da pele, podendo ser observadas mais profundamente nas imagens (MANFREDINI et al., 2019).

Por fim, considerando que a diabetes é uma doença que tem alta prevalência, estudos dessa natureza são de fundamental importância como suporte o desenvolvimento de tratamentos tópicos mais específicos para os cuidados da pele de portadores de diabetes, bem como tem como contribuição a comprovação da eficácia clínica, por medidas instrumentais, de substâncias ativas antiglicantes para a aplicação no desenvolvimento de formulações cosméticas antienvelhecimento mais inovadoras e eficazes.

7. CONCLUSÃO

As formulações desenvolvidas foram estáveis, uma vez que não houve alteração de cor, odor, pH e nas propriedades mecânicas no estudo de estabilidade acelerada no período de 3 meses.

A análise perfill de textura das formulações, por meio dos parâmetros espalhabilidade, *work of shear*, viscosidade, auxiliou na definição da formulação a ser usada como veículo para a adição das substâncias ativas em estudo, a qual apresentou propriedades sensoriais adequadas às finalidades propostas.

O estudo de caracterização da pele mostrou sinais de envelhecimento mais predominantes na pele dos participantes do estudo portadores de diabetes quando comparado com a pele do grupo dos participantes saudáveis, mesmo sendo da mesma faixa etária.

De acordo com os resultados do estudo clínico de eficácia, as formulações desenvolvidas a base dos extratos antiglicantes objeto de estudo foram eficazes na melhora das condições gerais da pele de portadores de diabetes, sendo que a formulação que continha apenas o antiglicante, alga vermelha *Hypnea musciformis* mostrou resultados mais pronunciados, principalmente em relação ao aumento da densidade dérmica e melhora da morfologia do colágeno após o tratamento. Além disso, os resultados obtidos na caracterização da pele por MCR evidenciou as diferenças entre a morfologia da pele saudável e da pele dos participantes diabéticos, apresentando alterações principalmente no colágeno.

Por fim, o extrato da alga vermelha *Hypnea musciformis*, isoladamente ou em combinação com o extrato de girassol - *Helianthus Annus*, pode ser sugerido como uma substância ativa inovadora para aplicação em formulações cosméticas eficazes na redução das alterações cutâneas decorrentes do processo de glicação e sinais do envelhecimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Cincotto, M.G.J.; Chirar, B.G.; CicarelliI, R. M.B. FM. Avaliação do potencial citotóxico e do potencial em estimular a biossíntese de colágeno de extrato de folhas de Morus nigra L. em cultura celular. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicad**a, Araraquara, v. 37, ago. 2016.

Ali, S. M. *In-vivo Confocal Raman Spectroscopic Imaging of the Human Skin Extracellular Matrix Degradation due to Accumulated Intrinsic and Extrinsic Aging.* **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine***, 2020,.* doi:10.1111/phpp.12623

Al-Mutairi N, Zaki A, Sharma AK et al. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. Study from Farwaniya Hospital, Kuwait. **Med Princ Pract** 2006; 15:427–30

Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of Ne -Carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. **J. Biol Chem** 1986;261:4889–4894.

Avery NC, Sims TJ, Bailey AJ. quantitative determination of collagen cross-links. **Methods Mol Biol** 2009;522:103-2.

Bayliss MT, Bijlsma JWJ, Floris PJG, Lafeber, Johan M. Tekoppele. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. **Biochem. J** 2000;350:381–387.

Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Review Mechanisms of maturation and ageing of collagen. 106;1998:1–56.

Baynes JW, Monnier VM. The Maillard Reaction in Ageing, **Diabetes, and Nutrition**. Alan R. Liss. New York 1989.

Bayliss MT, Bijlsma JWJ, Floris PJG, Lafeber, Johan M. Tekoppele. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. **Biochem. J** 2000;350:381–387.

Behm B, Schreml S, Landthaler P, et al. Skin signs in diabetes mellitus. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. 2012; 26 (10): 1203-1211

Boismal, Francoise, et al. "Skin aging: Pathophysiology and innovative therapies." **Medecine Sciences: M/S** 36.12 (2020): 1163-1172.

Boer M, Duchnik E, Maleszka R et al. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. **Postepy Dermatol Alergol** 2016; 33:1–5.

Campos, Patrícia MBG Maia, Maísa Oliveira de Melo, and Daiane Garcia Mercurio. "Assessment of Skin Photoaging with Reflectance Confocal Microscopy." ***Daily Routine in Cosmetic Dermatology*** (2017): 57.

Caspers PJ, Lucassen GW, Wolthuis R, Bruining HA, Puppels GJ. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. **Biospectroscop**y 1998;4:S31–S39.

Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Glucose and Aging. **Sci. Am** 1987;256:82–88.

Cinotti, E., et al. "Structural skin changes in elderly people investigated by reflectance confocal microscopy." ***Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*** 34.11 (2020):

2652-2658.

Coelho, KD.; Paim, CS.; Deuschele, RA. N.. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade e capacidade antioxidante de uma formulação em gel contendo o extrato das folhas de goiabeira (Psidium guajava L.). **Revista Biomotriz**, -, v. 1, n. 1, p.136-155, jul. 2016.

Choi EH,Man MQ,XuPetal.JInvestDerma- tol 2007: 127: 2847–2856.

Danby, F. William. "Nutrition and aging skin: sugar and glycation." ***Clinics in dermatology*** 28.4 (2010): 409-411.

Daniel S, Reto M, Mibelle AG. Collagen Glycation and Skin Aging . **Cosmetics Cosmetics and Toiletries** Manufacture Worldwide 2002:118 –124.

Daniel, Schmid, et al. "Collagen glycation and skin aging." ***Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide* (**2002).

de Souza Freitas, Anna Júlia, et al. "Identificação de portadores de diabetes mellitus tipo 2 e incentivo as mudanças no estilo de vida." ***Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*** 16.3 (2020).

Dearlove RP, Greenspan P, Hartle DK, Swanson RB, Hargrove JL. Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. **J Med Food** 2008;11:275-81.

Dunn J. Oxidation of glycation proteins: age-dependent accumulation of N- (carboxylmethyl)lysine in lens proteins. **Biochemistr**y 1989;28:9464-9468.

Fossa Shirata, M. M., G. A. D. Alves, and P. M. B. G. Maia Campos. "Photoageing-related skin changes in different age groups: a clinical evaluation by biophysical and imaging techniques." ***International journal of cosmetic science*** 41.3 (2019): 265-273.

Gaar, Jakob, Rafea Naffa, and Margaret Brimble. "Enzymatic and non-enzymatic crosslinks found in collagen and elastin and their chemical synthesis." ***Organic Chemistry Frontiers*** 7.18 (2020): 2789-2814.

Gaspar, L. R., et al. "Evaluation of dermatological effects of cosmetic form**ulations containing Saccharomyces cerevisiae extract and vitamins." *Food** and chemical toxicology* 46.11 (2008): 3493-3500.

Gary J. Fisher, Quan. T, Purohit. T, Shao. Y, Cho. MK, He. T, Varani. J, Kang. S, Voorhees. JJ, Pathol .AJ. Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin Jan 2009;174(1):101–114.

Gianeti, MD.; Mercurio, DG.; Maia Campos, PMBG. The use of green tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient. **Dermatologic Therapy**, v. 26, p. 267-271, 2013.

Ghadially R, Brown B E, Hanley K et al. **J Invest Dermatol** 1996: 106: 1064–1069.

Greenwood AM. A study of the skin in five hundred cases of diabetes. **JAMA** 1927; 89 : 774–6

Gkogkolou, Paraskevi, and Markus Böhm. "Advanced glycation end products: key players in skin

aging?." ***Dermato-endocrinology*** 4.3 (2012): 259-270.

Infante, VHP, Calixto, LS, PATRÍCIA MBG CAMPOS. "Propriedades físico mecânicas de formulações tópicas à base de diferentes polímeros." (2019).

Kobayashi T, Glatz M, Horiuchi K, Kawasaki H, Akiyama H, Kaplan DH, et al. Dysbiosis and Staphylococcus aureus colonization drives inflammation in atopic dermatitis. **Immunity** 2015;42:756–66. https://doi.org/10.1016/j. immuni.2015.03.014.

Kurtalic, Nermina, Sadat Kurtalic, and Eldina Malkic Salihbegovic. "Skin Changes in Patients with Diabetes Melitus Type 2 and their Impact on Quality of Life." ***Materia Socio-Medi****ca* 32.4 (2020): 283.

Lai CCK, Md Nor N, Kamaruddin NA, Jamil A, Safian N. Comparison of transepidermal water loss and skin hydration in diabetics and nondiabetics. **Clin Exp Dermatol**. 2021 Jan;46(1):58-64. doi: 10.1111/ced.14363. Epub 2020 Sep 30. PMID: 32619023.

Langton, Abigail K., et al. "A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing." ***International journal of cosmetic science*** 32.5 (2010): 330-339.

Langton, Abigail K., et al. "A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing." ***International journal of cosmetic science*** 32.5 (2010): 330-339.

Leite M.G.A.; Maia Campos P.M.B.G. Correlations between sebaceous glands activity and porphyrins in the oily skin and hair and immediate effects of dermocosmetic formulations. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 00, p. 1–7, 2020.

Lechner A, Akdeniz M, Tomova-Simitchieva T, Bobbert T, Moga A, Lachmann N, et al. Comparing skin characteristics and molecular markers of xerotic foot skin between diabetic and non-diabetic subjects: an exploratory study. **J Tissue Viabil**ity 2019;28:200–9. https://doi.org/10.1016/j. jtv.2019.09.004.

Legiawati, Lili, et al. "Oral and Topical Centella asiatica in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Dry Skin: A Three-Arm Prospective Randomized Double-Blind Controlled Trial." ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*** 2020 (2020).

Leveque, Jean Luc, and Bernard Querleux. "SkinChip®, a new tool for investigating the skin surface in vivo." ***Skin Research and Technology*** 9.4 (2003): 343-347.

Lima AL, Illing T, Schliemann S, et al. Cutaneous Manifestations of Diabetes Mellitus: A Review. A**m J Clin Dermatol** 2017;18:541-553.

Liu Y, Sebastian B, Liu B, Zhang Y, Fissel JA, Pan B, et al. Sensory and autonomic function and structure in footpads of a diabetic mouse model. Sci Rep 2017;7:41401. https://doi.org/ 10.1038/srep41401.

Lipsky BA, Senneville E´ , Abbas ZG, Arago´ n-Sa´ nchez J, Diggle M, Embil JM, et al. Guidelines on the diagnosis and treatment of foot infection in persons with diabetes (IWGDF 2019 update). **Diabetes Metab Res Rev** 2020;36:e3280. https://doi. org/10.1002/dmrr.3280.

Longo C, DE PACE B, et al. Proposal for an in vivo histopathologic scoring system for skin aging by means of confocal microscopy. **Skin Res Technol** 2013; 19:e167-173.

Longo C, et al. "Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means

of confocal microscopy." Journal of the American Academy of Dermatology 68.3 2013: e73-e82.

Longo, CIA.; Beretti, F.; Cesanaro, AM.; PELLACANI, G. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. **J Am Acad Dermatol**, v.13, 2011.

Lu, Y. F., et al. "Effects and mechanism of Lactococcus lactis thermo-sensitive hydrogel on the wound healing of full-thickness skin defects in diabetic mice." *Zhonghua Shao Shang za zhi= Zhonghua Shaoshang Zazhi*= ***Chinese Journal of Burns*** 36.12 (2020): 1117-1129.

Maia Campos, P. M. B. G., et al. "Cichorium intybus root extract: A "**vitamin D-like" active ingredient to improve skin barrier function." Journal** of Dermatological Treatment 28.1 (2017): 78-81.

Maliyar, Khalad, Reneeka Persaud-Jaimangal, and R. Gary Sibbald. "Associations Among Skin Surface pH, Temperature, and Bacterial Burden in Wounds." ***Advances in skin & wound care*** 33.4 (2020): 180-185.

Meenatchi, P; Purushothaman, A; Maneemegala, S. Antioxidant, antiglycation and insulinotrophic properties of Coccinia grandis (L.) in vitro: Possible role in prevention of diabetic complications. **J Tradit Complement Med**.. -, p. 54-64. mar. 2016.

Manfredini M, Mazzaglia G, Ciardo S, et al. Does skin hydration influence keratinocyte biology? In vivo evaluation of microscopic skin changes induced by moisturizers by means of reflectance confocal microscopy. **Skin research and technology**. 2013; 19 (3): 299-307.

Manfredini, M.; Bettoli, V.; Sacripanti, G.; Farnetani, F.; Bigi, L.; Puviani, M.; Corazza, M.; PellacanI, G. The evolution of healthy skin to acne lesions: a longitudinal, in vivo evaluation with reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology,** v. 33, p. 1768–1774, 2019.

Mercurio DG, Segura JH, Demets MB, et al. Clinical scoring and instrumental analysis to evaluate skin types. **Clin Exp Dermatol** 2013;38:302-308.

Mercurio, DG., et al. "Morphological, structural and biophysical properties of French and Brazilian photoaged skin." ***British Journal of Dermatology*** 174.3 (2016): 553-561.

Misra, Biswapriya B. "The chemical exposome of human aging." Frontiers in Genetics 11 (2020): 1351.

Naylor, E.C.; Watson, R.E.; Sherratt, M.J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas** 2011, 69, 249–256.

Nikoleishvili, L. R., et al. "Characteristic changes of skin and its accessories in type 2 diabetes mellitus." ***Georgian medical news*** 131 (2006): 43-46.

Nikoleishvili LR, Kurashvili RB, Virsaladze DK. Characteristic changes of skin and its accessories in type 2 diabetes mellitus. **Georgian Med New**s 2006; 131:43–46.

Nkengne A, Roure R, Rossi AB, Bertin C. The skin agi**ng index: a new approach for documenting anti-aging products or procedures. SKIN** RES TECHNOL 2013;19:291–298.

Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. **Int J Biochem Cell Biol**. 1996;28(12):1297-1310.

Pageon H, Técher MP, Asselineau D. Reconstructed skin modified by glycation of the dermal equivalent as a model for skin aging and its potential use to evaluate anti-glycation molecules. **Exp Gerontol** 2008;43: 584–588.

Pageon H. Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. **Pathol Biol.** 2010;58(3):226231.

Park HY, Kim JH, Jung M, Chung CH, Hasham R, Park CS, Choi EH. A long-standing hyperglycaemic condition impairs skin barrier by accelerating skin ageing process. **Exp Dermatol**. 2011 Dec;20(12):969-74. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01364.x. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22017743.

Peppa M, Vlassara H. Peppa H. Hormones V. Advanced glycation end products and diabetic complications: A General overview 2005;4(1):28-37.

Rinnerthaler, Mark, et al. "Oxidative stress in aging human skin." **Biomolecule**s 5.2 (2015): 545-589.

Rocha-Filho, PA.; Maruno, M.; FerrarI, M.. Liquid Crystal Formation from Sunflower Oil: Long Term Stability Studies. **Molecules**. -, p. 10-15. jun. 2016

Sakai S, Endo Y, Ozawa N et al. Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with experimentally induced diabetes mellitus. **J Invest Dermatol** 2003; 120: 79–85.

Seirafi H, Farsinejad K, Firooz A, et al. Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2009;23:146-149.

Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M et al. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. **Diabetes** 2001; 50:1627–35.

Sueki H, Nozaki S, Numazawa S, et al. Effect of non-enzymatic glycosylation and heating on browning of human stratum corneum and nail. **Dermatologic**a 1991;183:197-202.

Trujillo J, Granados-Castro LF, Zazueta C, et al. Mito- chondria as a target in the therapeutic properties of curcumin. **Arch Pharm** 2014;347(12):873–84.

Thirunavukkarasu V, Nandhini AT, Anuradha CV. Fructose diet- induced skin collagen abnormalities are prevented by lipoic acid. **Exp Diabetes Res** 2004;5:237-44.

Van Hattem S, Bootsma AH, Thio HB. Skin manifestations of diabetes. **Cleve Clin J Med**. 2008; 75(11): 772-774.

Vergne DMC, Vasconcelos, ACP, Batista, et al. Collagen modification by Maillard reaction. J **Therm Anal Calorim** 2018;131:671-679.

Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. **J Biol Chem**. 2000;275(50):39027-39031.

Visscher M, Geiss S. Emollient therapy for newborn infants – a global perspective. Newborn Infant Nurs Rev

2014; 14: 153–9

Wertheimer E, Spravchikov N, Trebicz M et al. The regulation of skin proliferation and differentiation in the IR null mouse: impli- cations for skin complications of diabetes. **Endocrinology** 2001; 142:1234–41.

Woo, M. S., et al. "Comparison of skin elasticity test results from the Ballistometer® and Cutometer®." **Skin Research and Technology** 20.4 (2014): 422-428.

Wurm EMT, Longo C, Curchin C, Soyer HP, Prow TW, Pellacani G. In vivo assessment of chronological ageing and photoageing in forearm skin using reflectance confocal microscopy. Br **J Dermatol** 2012; 167: 270–9.

Xiao P, Singh Hn Ou X, Caparnagiu AR, Kramer G, Imhof RE. In-vivo solvent penetration measurement using contact imaging and skin stripping. **SCC Annual Scientific Meeting & Technology Showcase**, New York. 2011.

Yoon HS, Baik SH, Oh CH. Quantitative measurement of desquamation and skin elasticity in diabetic patients. **Skin Research and Technology**. 2002; 8(4): 250-254.

Zellers, Jennifer A., et al. "Clinical complications of tendon tissue mechanics due to collagen cross-linking in diabetes." **The Science, Etiology and Mechanobiology of Diabetes and its Complications. Academic Press,** 2021. 201-226.

Zhang, Shili, et al. "The role of the microbiome in diabetes mellitus." **Diabetes Research and Clinical Practice** 172 (2021).

Anexo 1. Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP.

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

Of. CEP/FCFRP nº. 013/2018
kms

Ribeirão Preto, 15 de agosto de 2018.

À Pós-graduanda
Veronica Rego de Moraes
Orientadora: Profª. Drª. Patrícia M. B. G. Maia Campos
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA DE DERMOCOSMÉTICOS CONTENDO ANTIGLICANTES POR TÉCNICAS DE BIOFÍSICA E IMAGEM**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 451 – CAAE nº 73911117.6.0000.5403,** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 179ª reunião ordinária, realizada na presente data, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 2.822.529.

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

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

Atenciosamente,

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

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