

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e avaliação clínica dos efeitos de formulações
dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3**

Kassandra Azevedo Tadini

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e avaliação clínica dos efeitos de formulações
dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3**

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

**Área de concentração: Medicamentos e
Cosméticos**

Orientada: Kassandra Azevedo Tadini

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Maria

Berardo Gonçalves Maia Campos

Ribeirão Preto

2009

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.

Tadini, Kassandra Azevedo
Desenvolvimento e avaliação clínica dos efeitos de formulações dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3. Ribeirão Preto, 2009.

171 p.: il.; 30cm

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

Orientadora: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves

1. Dermocosméticos 2. Dimetilaminoetanol 3. Acetil Hexapeptídeo-3
4. Estabilidade 5. Compatibilidade Cutânea 6. Eficácia Clínica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kassandra Azevedo Tadini

“Desenvolvimento e avaliação clínica dos efeitos de formulações dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3”

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

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia
de Cosméticos da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.**

Dedicatória

A vocês, meus queridos pais, Ângelo e Lourdes, rendo homenagens

Por sonharem junto comigo

Por sofrerem no meu lugar

Por me doarem suas alegrias

Por terem sido o exemplo, o ombro amigo

Pelas vezes que me deram o peixe

E mais ainda, por terem me ensinado a pescar

Vocês são os verdadeiros idealizadores desse sonho

Que considero ser resultado mais do trabalho de vocês do que do meu próprio

Pois sem os seus braços fortes e suas mãos protetoras

Todas as minhas conquistas jamais teriam se tornado realidade

Agradecimento especial

À Profª Drª Patrícia M. B. G. Maia Campos, agradeço por ter me conduzido durante todos esses anos na estrada do conhecimento científico. Acima da orientação, imprescindível para a realização desse trabalho, se sobrepõe a amizade e a cumplicidade com que conduzimos nossa relação de mestre e aprendiz.

Agradecimentos

A Deus, por ser a minha fonte de vida e inspiração.

Aos meus queridos irmãos, Ângelo Júnior e Thiago, por representarem para mim um porto seguro e a certeza de que sempre estarei acompanhada pelos caminhos da vida. Sei que em vocês sempre encontrarei abrigo.

Ao Daniel Fernández, por seu amor, carinho, dedicação e pelos muitos momentos de felicidade que já compartilhamos juntos.

Às eternas amigas Adriana Mautschke, Renata Franco, Izabel Polegato, Pricilla Tadini, Milene Borges, Bianka Tadini e Vanessa Novato, por estarem a tantos anos me ajudando a escrever a história da minha Vida.

Às amigas Lorena Rigo Gaspar e Susi Elaine Dal´Belo, pela amizade e solicitude durante todos os anos de minha formação como pesquisadora.

Às amigas Sabrina Clepf e Glasiela Anconi, pelo apoio e hospitalidade, que foram fundamentais para a minha trajetória na realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cosmetologia, Flávio, Mariana, Mirela, Ananda, Luciana e Víctor, pela ajuda prestada, amizade e companheirismo.

À amiga e gestora, Andrea Costa, pela compreensão e apoio constante para a realização desse trabalho.

A todos os amigos da Natura, em especial, Fabiana Paes, Flávia Sena, Ana Paula Nagamatsu, Rodrigo Collina, Ana Carolyna Piconi, Fabiana Maso, Aline Armeline, Diana Queiroz, Luciana Parra e Reinaldo Miguel pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pela grande amizade que torna nosso ambiente profissional muito agradável.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Rosana dos Santos, Eleni Angeli, Rossana Ribeiro e Ana Lúcia Turatti, pela compreensão e solicitude.

Às mulheres voluntárias que participaram dos experimentos, pela importante colaboração que possibilitou a realização dessa pesquisa.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” - Antoine de Saint-Exupéry

*“A sabedoria distingue no infinito
das coisas o mais sensacional dos
sabores, colocando-nos à frente das
descobertas e das possibilidades de
derrubar os obstáculos que estão
além do princípio e do fim”*

Latumia

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Biologia da pele - Aspectos gerais e envelhecimento	5
2.2. Pesquisa e desenvolvimento de produtos cosméticos	8
2.3. Aplicação da reologia no desenvolvimento de formulações cosméticas	9
2.4. Acetil hexapeptídeo-3 em formulações dermocosméticas	11
2.5. Dimetilaminoetanol (DMAE) em formulações dermocosméticas	13
2.6. Avaliação clínica de formulações cosméticas	15
2.6.1. Avaliação sensorial	15
2.6.2. Avaliação da segurança de produtos cosméticos	16
2.6.3. Avaliação da eficácia de produtos cosméticos por técnicas de biofísica e imagem da pele	17
3. OBJETIVO	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Matérias-primas	24
4.2. Equipamentos e acessórios	24
4.3. Desenvolvimento das formulações	25
4.3.1. Determinação do pH	26
4.3.2. Testes preliminares de estabilidade	27

4.3.2.1. Centrifugação	27
4.3.2.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas	27
4.3.3. Estudo de estabilidade acelerada	27
4.3.3.1. Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico	27
4.3.3.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas	28
4.3.3.3. Centrifugação	28
4.3.3.4. Determinação do pH	28
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
5.1. Triagem das voluntárias para a análise sensorial e para os estudos de eficácia	30
5.2. Análise sensorial das formulações estáveis	31
5.3. Avaliação da segurança por meio do estudo de compatibilidade cutânea	32
5.4. Avaliação da eficácia das formulações por técnicas de biofísica e imagem da pele	34
5.4.1. Descrição das técnicas empregadas nesse estudo	34
5.4.1.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo	34
5.4.1.2. Determinação da perda transepidérmica de água	35
5.4.1.3. Determinação das propriedades mecânicas da pele	35
5.4.1.3.1. Determinação das características anisotrópicas da pele	35
5.4.1.3.2. Determinação das características viscoelásticas da pele	35
5.4.1.4. Determinação do micro-relevo cutâneo	37
5.4.2. Avaliação dos efeitos imediatos das formulações após uma única aplicação	39
5.4.3. Avaliação dos efeitos das formulações a longo prazo	39
5.5. Análise estatística	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Desenvolvimento das formulações	42

6.1.1. Determinação do pH	42
6.1.2. Testes preliminares de estabilidade	42
6.1.2.1. Centrifugação	42
6.1.2.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas	42
6.1.3. Estudo de estabilidade acelerada	43
6.1.3.1. Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico	43
6.1.3.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas	48
6.1.3.3. Centrifugação	48
6.1.3.4. Determinação do pH	48
6.2. Análise sensorial das formulações estáveis	49
6.2.1. Estudo estatístico dos resultados obtidos	49
6.2.1.1. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1 e F4	49
6.2.1.2. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1A e F4A	52
6.2.1.3. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1D e F4D	54
6.2.1.4. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1AD e F4AD	56
6.3. Avaliação da segurança por meio do estudo de compatibilidade cutânea	58
6.4. Avaliação da eficácia das formulações por técnicas de biofísica e imagem da pele	59
6.4.1. Avaliação dos efeitos imediatos das formulações após uma única aplicação	59
6.4.1.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, da perda transepidermica de água, das propriedades viscoelásticas da pele e do micro-relevo cutâneo	59
6.4.1.2. Estudo estatístico dos resultados obtidos	59
6.4.1.2.1. Conteúdo aquoso do estrato córneo	60
6.4.1.2.2. Perda transepidermica de água	62
6.4.1.2.3. Propriedades viscoelásticas da pele	64
6.4.1.2.4. Micro-relevo cutâneo	67

6.4.2. Avaliação dos efeitos das formulações a longo prazo	71
6.4.2.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, das propriedades mecânicas da pele e do micro-relevo cutâneo	71
6.4.2.2. Estudo estatístico dos resultados obtidos	71
6.4.2.2.1. Conteúdo aquoso do estrato córneo dos antebraços	72
6.4.2.2.2. Conteúdo aquoso do estrato córneo da face	73
6.4.2.2.3. Propriedades mecânicas da pele	75
6.4.2.2.3.1. Características anisotrópicas da pele dos antebraços	75
6.4.2.2.3.2. Características anisotrópicas da pele da face	79
6.4.2.2.3.3. Propriedades viscoelásticas da pele do antebraço	84
6.4.2.2.3.4. Propriedades viscoelásticas da pele da face	88
6.4.2.2.4. Micro-relevo cutâneo dos antebraços	92
6.4.2.2.5. Micro-relevo cutâneo da face	95
7. DISCUSSÃO	100
8. CONCLUSÕES	114
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
APÊNDICES	133
ANEXOS	168

Resumo

Tadini, K. A. **Desenvolvimento e avaliação clínica dos efeitos de formulações dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3**. 2009. 171 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O dimetilaminoetanol (DMAE) e o acetil hexapeptídeo-3 (AHP) vêm sendo utilizados em formulações dermocosméticas com finalidade antienvhecimento. No entanto, há poucos trabalhos na literatura referentes aos efeitos dessas substâncias ativas no tecido cutâneo. Assim, o presente estudo tem por objetivos o desenvolvimento, a avaliação da estabilidade física, da segurança e da eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo DMAE e/ou AHP. Para tal, foram preparadas quatro formulações à base de ceras auto-emulsionantes compostas por álcool batílico e lecitina de soja ou ésteres de polietilenoglicol, estabilizadas por polímeros hidrofílicos (hidroxietilcelulose ou polímero de acrilato). Estas formulações foram acrescidas ou não (veículo) de 10% de uma solução a 0,05% de AHP e/ou de 9% de DMAE acetamidobenzoato e submetidas a testes preliminares de estabilidade. A seguir, foram realizados estudos de estabilidade por determinação do comportamento reológico, bem como uma análise sensorial. A formulação composta de ésteres de polietilenoglicol e polímero de acrilato (F4) apresentou melhor estabilidade e melhor sensorial e, assim, foi utilizada como veículo nos testes clínicos. Nesses testes avaliou-se a compatibilidade cutânea após uma única aplicação do produto na região das costas das voluntárias e a eficácia a curto (efeitos imediatos) e a longo prazo. Para a avaliação dos efeitos imediatos, analisou-se a hidratação, as propriedades viscoelásticas e o micro-relevo da pele da região ventral dos antebraços, após 2 horas da aplicação das formulações: veículo (F4), veículo + DMAE (F4D), veículo + AHP (F4A) e veículo + DMAE + AHP (F4AD). Para analisar os efeitos a longo prazo, as voluntárias aplicaram as formulações diariamente nos antebraços e na face sendo que, após 2 e 4 semanas de tratamento, foram realizadas medidas dos parâmetros acima mencionados e das propriedades mecânicas da pele por determinação de suas características anisotrópicas. Os resultados obtidos no estudo clínico mostraram que todas as formulações estudadas apresentaram compatibilidade cutânea muito boa além de efeitos imediatos aumentando o conteúdo aquoso do estrato córneo. Por outro lado, observou-se que apenas as formulações que continham as substâncias ativas provocaram uma diminuição significativa da perda transepidérmica de água (TEWL), ou seja, mostraram efeito na melhoria da função barreira da pele. A longo prazo, observou-se que todas as formulações provocaram aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo na face, o que não ocorreu para o antebraço. No entanto, somente as

formulações que continham AHP reduziram a anisotropia da pele da face, ou seja, com o uso de tais formulações ocorreu uma melhora significativa das propriedades mecânicas da pele. Em síntese, de acordo com os dados obtidos, pode-se concluir que as formulações desenvolvidas apresentaram-se estáveis, seguras e eficazes, uma vez que não sofreram alterações em suas propriedades físico-químicas e não causaram irritação na pele. Além disso, as formulações que continham AHP ou DMAE apresentaram efeitos imediatos na diminuição da TEWL e as formulações acrescidas de AHP reduziram a anisotropia da pele após 4 semanas de aplicação, melhorando significativamente o tônus e a firmeza da pele. Assim, o AHP pode ser considerado uma substância eficaz para aplicação em formulações dermocosméticas com finalidade antienvhecimento.

Palavras chave: Dermocosméticos, Acetil Hexapeptídeo-3, Dimetilaminoetanol, Estabilidade, Compatibilidade Cutânea, Eficácia Clínica.

Abstract

Tadini, K. A. **Development and clinical evaluation of the effects of dermocosmetic formulations containing dimethylaminoethanol or acetyl hexapeptide-3**. 2009. 171 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Dimethylaminoethanol (DMAE) and acetyl hexapeptide-3 (AHP) have been used in dermocosmetic formulations for anti-aging purposes. However, few scientific papers are concerned about the effects of these active substances on cutaneous tissue. Thus, the aim of the present study is the development, evaluation of physical stability, safety and clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing DMAE and/or AHP. Four formulations based on self emulsifying wax containing batyl alcohol and lecithin or polyethyleneglycol ester, stabilized by hydrophilic polymers (hydroxyethylcellulose or acrylate polymer) were prepared as vehicles. They were supplemented or not with acetyl hexapeptide-3 solution (0.05%) and DMAE acetamidobenzoate to final concentrations of 10% and 9%, respectively, and submitted to preliminary stability tests, followed by the determination of rheological behavior, as well as, sensorial analysis. The formulation containing polyethyleneglycol ester and acrylate polymer (F4), chosen as vehicle for the clinical trials, showed the best stability and sensorial. In these trials, skin compatibility was evaluated after a single product application on the backs of volunteers, as well as, the short (immediate effects) and long term efficacy. To evaluate the immediate effects, skin hydration, viscoelastic properties and skin microrelief were tested in the ventral forearm region, 2 hours after application of the formulations: vehicle (F4), vehicle + DMAE (F4D), vehicle + AHP (F4A) and vehicle + DMAE + AHP (F4AD). Long term effects of the same formulations were evaluated in volunteers by daily applications on the forearm and face. After 2 and 4 weeks of treatment, the same parameters were measured in addition to the determination of skin mechanical properties by its anisotropic characteristics. The results obtained in the clinical study showed that all formulations tested had a very good skin compatibility besides an immediate effect of increasing the stratum corneum water content. On the other hand, only formulations containing the active substances produced a significant decrease in transepidermal water loss (TEWL), in other words, these formulations improved the skin barrier function. Long term studies demonstrated that all formulations promoted an enhancement of the stratum corneum water content when applied on the face but not in the forearm. However, only formulations containing AHP reduced skin anisotropy in the face, ie, there was a significant improvement of the skin mechanical properties due to the use of these formulations. In summary, according

to the results obtained, it can be concluded that the developed formulations were stable, safe and effective, since they did not present alterations in their physicochemical properties and did not cause skin irritation. Moreover, the formulations containing AHP or DMAE presented immediate effects by reducing the TEWL and the ones supplemented with AHP reduced the skin anisotropy after 4 weeks of application, significantly improving the skin tone and firmness. Thus, it is suggested that AHP may be considered an effective substance to be used in cosmetic formulations with anti-aging purposes.

Key words: Dermocosmetics, Acetyl Hexapeptide-3, Dimethylaminoethanol, Stability, Skin Compatibility, Clinical Efficacy.

1 Introdução

A preocupação em manter a pele com aspecto jovem e saudável tem desafiado a clínica dermatológica a tratar alterações cutâneas que não estejam necessariamente relacionadas a uma condição patológica, mas sim que simplesmente apresentam caráter inestético. Nas últimas décadas, em função dos avanços na Ciência Cosmética, têm-se desenvolvido formulações com o objetivo de proporcionar efeitos significativos no tratamento ou prevenção de alterações cutâneas decorrentes do envelhecimento, como a perda de elasticidade, o ressecamento, a formação de rugas e de manchas, retardando, assim, procedimentos invasivos e conseqüentemente a cirurgia plástica.

Neste contexto, substâncias com propriedade antienvelhecimento têm sido propostas para atenuar rugas e marcas de expressão, deixando-as menos visíveis. Entretanto, o dinamismo da área cosmética tem feito com que, muitas vezes, tanto as substâncias ativas, quanto o produto cosmético sejam disponibilizados no mercado sem que seus reais benefícios e seu mecanismo de ação tenham sido elucidados cientificamente.

Dentre estas substâncias pode-se mencionar o dimetilaminoetanol (DMAE) e o acetil hexapeptídeo-3 que têm sido utilizados em formulações tópicas com finalidade antienvelhecimento, em decorrência de suas propriedades farmacodinâmicas e de algumas evidências clínicas observadas na melhoria do aspecto geral do tecido cutâneo.

Porém há poucos trabalhos na literatura referentes ao uso tópico do DMAE na melhoria das condições da pele envelhecida em decorrência da redução na aparência de rugas, sendo que esses estudos foram conduzidos por avaliações de caráter qualitativo (GROSSMAN; GISOLDI; COLE, 2002; UHODA et al., 2002; WALLO et al., 2002).

Considerando os avanços nos conhecimentos da biologia da pele, tais como os mecanismos envolvidos na renovação celular, no envelhecimento do tecido cutâneo e com os receptores neuroendócrinos, os peptídeos vêm ganhando notoriedade, uma vez que, em função de sua estrutura química, podem atuar na hidratação, na proteção e na homeostase da pele, mantendo-a saudável e com aspecto jovem.

Assim, apesar de ser citado na literatura que o acetil hexapeptídeo-3 possui uma ação análoga à neurotoxina botulínica tipo A e, portanto, vem sendo utilizado em formulações tópicas antienvelhecimento devido ao seu possível efeito antirugas (BLANES-MIRA et al., 2002), é de fundamental importância a avaliação dos seus efeitos na epiderme e na derme, local de ação dos produtos dermocosméticos, visando a elucidação dos efeitos deste peptídeo na hidratação, proteção e propriedades mecânicas da pele.

Uma vez que, até o momento, da mesma forma como ocorre para o DMAE, há poucos trabalhos relatados na literatura que apresentam dados referentes aos efeitos do acetil

hexapeptídeo-3 no tecido cutâneo, é de fundamental importância a realização de estudos clínicos objetivos para avaliar a eficácia destas substâncias na pele.

Para tal, as técnicas de biofísica e análise de imagem da pele são fundamentais, uma vez que são métodos não invasivos, sendo possível a realização de estudos de eficácia diretamente na pele humana, nas reais condições de uso do produto, sem causar qualquer agressão ou desconforto para o voluntário da pesquisa. Algumas das características cutâneas que podem ser analisadas por meio dessas técnicas incluem o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidermica de água, as propriedades mecânicas da pele e o micro-relevo cutâneo (HAFTEK et al., 2008; PAYE et al., 2007; UHODA et al., 2002).

Por fim, a busca por produtos que promovam melhorias significativas na aparência da pele envelhecida, sem a necessidade de procedimentos invasivos, faz com que o DMAE e o acetil hexapeptídeo-3 ocupem, atualmente, uma posição de destaque dentre as substâncias ativas propostas para uso em cosméticos, o que leva a um grande interesse por parte dos consumidores e dos profissionais de saúde em obter informações cada vez mais seguras e precisas a respeito de seus efeitos na pele. Neste contexto, o presente estudo tem por finalidade avaliar os reais benefícios da aplicação dessas substâncias ativas, veiculadas em formulações dermocosméticas, na pele humana, por meio da aplicação das técnicas de biofísica e análise de imagem da pele.

2 Revisão da Literatura

2.1. Biologia da pele - Aspectos gerais e envelhecimento

A pele é um complexo órgão, sendo um dos maiores do corpo humano com uma área de superfície no indivíduo adulto de aproximadamente 1,7 m², o que corresponde a aproximadamente 5,5% da massa corporal (GOLDSMITH, 1990). A pele exerce diversas funções, sendo uma delas a proteção do organismo contra a radiação ultravioleta e as agressões mecânicas, químicas e térmicas. A superfície da pele, por ser relativamente impermeável, impede a desidratação em excesso e age como um obstáculo à invasão microbiana. Além disso, o tecido cutâneo possui pH levemente ácido (4,1 a 5,8), o que auxilia na proteção contra microorganismos (SEGGER et al., 2007), sendo que esse pH é resultante da presença de substâncias hidrossolúveis presentes no estrato córneo, da secreção sebácea e sudorípara e da liberação de ácido carbônico (EHLERS et al., 2001). A pele pode ainda ser considerada o maior órgão sensorial do corpo, uma vez que possui diversos receptores para tato, pressão, dor e temperatura. Além disso, um grande número de mediadores químicos atuam em diferentes receptores neuroendócrinos presentes na pele regulando funções fisiológicas e garantindo a homeostase do tecido (SIVILIA et al., 2008). Nos humanos, a pele é o principal órgão termorregulador, exercendo tal função através do tecido adiposo e dos pêlos que juntos impedem a perda excessiva de temperatura, e também através da secreção das glândulas sudoríparas denominada suor, que ao ser lançado na superfície da pele e evaporar-se garante a diminuição da temperatura corporal quando isso se faz necessário. A pele exerce ainda diversas funções metabólicas, pois os triglicerídeos encontrados no tecido adiposo (hipoderme) representam importante reserva de energia e a síntese de vitamina D, que ocorre na epiderme, é indispensável para complementar a quantidade obtida na dieta alimentar (BEHELLI; CURBAN, 1975; HALLER, 1989; ROOSTERMAN et al., 2006).

A pele é constituída por três camadas de tecido: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1). A epiderme está estruturada por um grupo de células vivas denominado epiderme viável e por um conjunto de células mortas que formam o estrato córneo. A epiderme viável é constituída de células metabolicamente ativas que formam outras três camadas distintas: granulosa, espinhosa e basal. Em locais do organismo onde a pele é mais espessa, por exemplo, nas regiões palmar e plantar existe mais uma camada epidérmica chamada lúcida, que se localiza entre as camadas granulosa e córnea.

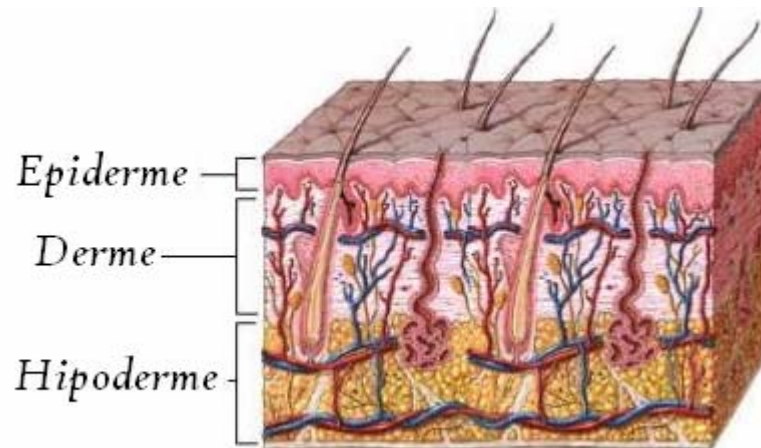


Figura 1. Representação das camadas da pele.

A camada basal, a mais interna, consiste de uma fileira única de células cúbicas que possuem uma alta atividade reprodutiva, tendo por função garantir a renovação da epiderme, uma vez que as células recém-produzidas migram em direção às camadas superiores, num processo em que ocorrem modificações graduais na sua forma e composição química. A camada espinhosa é formada por células volumosas e poliédricas que encontram-se em fase de crescimento e no início da síntese de queratina. A camada granulosa, por sua vez, é constituída por células em seu último estágio de diferenciação, que ao serem totalmente queratinizadas, tornam-se anucleadas e perdem sua capacidade metabólica, passando a formar o estrato córneo, onde sofrem um processo de esfoliação. O estrato córneo é, então, formado por camadas extremamente coesas de corpos de células epidérmicas, os corneócitos, que desempenham o papel fundamental de proteger os tecidos vivos da perda de água, mantendo-os adequadamente hidratados. Dessa forma, a principal função desempenhada pelo estrato córneo é de funcionar como uma barreira que garanta a homeostase cutânea. Existe, portanto, um processo denominado renovação epidérmica que consiste no deslocamento permanente e repetido de células que da camada basal atingem a superfície da epiderme, de onde se desprendem já mortas. Esse processo se completa aproximadamente em duas semanas em pessoas jovens e em torno de 37 dias para pessoas com idade superior a 50 anos, resultando em uma eliminação diária de cerca de seis a quatorze gramas de células mortas (EDWARDS; MARKS, 1995; ROTHMAN, 1954).

A derme é uma camada vascularizada de tecido conjuntivo denso fibroelástico, possuindo arteríolas e vênulas, por onde circula o sangue. Há também presença de vasos linfáticos na derme que são responsáveis pelo transporte de substâncias formadas durante os

processos metabólicos realizados na pele (HOLBROOK; WHEATER; BURKITT; DANIELS, 1982; WOLFF, 1993). O processo de envelhecimento cutâneo é acompanhado por uma diminuição da circulação na derme, devido ao estreitamento dos vasos sanguíneos e linfáticos, o que prejudica o fornecimento de materiais importantes para a sobrevivência das células, bem como ocorre uma redução na drenagem linfática.

O envelhecimento tem sido definido por alguns autores como um acúmulo de modificações moleculares no organismo que resultam em manifestações clínicas macroscópicas (GIACOMONI, 1995). O envelhecimento cutâneo resulta da combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos. A ação dos fatores intrínsecos, que podem ser traduzidos como envelhecimento cronológico, resulta em afinamento da epiderme e aumento da sua fragilidade, diminuição da espessura dérmica e da vascularização, redução no número de fibroblastos e na sua capacidade metabólica, além de uma resposta menor a fatores de crescimento. Em geral, os tratamentos tópicos não podem evitar o envelhecimento intrínseco. Por outro lado, os fatores extrínsecos que consistem na exposição da pele a diversas agressões como radiação ultravioleta, poluição atmosférica, traumatismos, hábito de fumar e metabólitos de substâncias ingeridas ou inaladas são causadores de modificações moleculares e induzem alterações das propriedades morfológicas e biofísicas da pele como, por exemplo, elastose e atrofia da derme com perda de colágeno. As manifestações clínicas correspondentes a esses danos são hiperpigmentação, rugas, mudanças na textura da pele e formação de comedões (BEITNER, 2003). O envelhecimento extrínseco é um intensificador do envelhecimento cronológico, sendo esse o motivo pelo qual áreas expostas e não expostas à radiação ultravioleta costumam apresentar aspectos muito diferentes (ENJELKE et al., 1997; STEINER, 1995).

O envelhecimento cutâneo causa modificações morfológicas e funcionais principalmente na derme, que resultam em alterações na proliferação e na capacidade de reparo das células. Há estudos demonstrando que a elastina, responsável pela elasticidade cutânea perde sua qualidade elástica enquanto o colágeno diminui com o avanço da idade, além de ter sua organização alterada (ELSON, 1997; RIEGER, 1996). Alguns pesquisadores relatam ainda, que existe uma correlação negativa entre a idade e as propriedades elásticas da pele do antebraço em mulheres, devido a uma notável diminuição da sua capacidade em retornar ao estado inicial após uma deformação, dentre outros fatores (BATISSE et al., 2002; ISHIKAWA; ISHIKAWA; MIYACHI, 1995; SUMINO et al., 2004).

O conhecimento científico a respeito da biologia da pele tem contribuído para o surgimento de novos produtos com propostas de prevenção e tratamento das alterações

cutâneas decorrentes do envelhecimento. Para o desenvolvimento de tais produtos inúmeras substâncias ativas com efeitos que podem conferir eficácia antienvelhecimento à formulação têm sido propostas. Dentre essas substâncias ativas pode-se citar o dimetilaminoetanol e o acetil hexapeptídeo-3, que têm sido utilizados em formulações tópicas com finalidade antienvelhecimento em decorrência de seus efeitos na melhoria do aspecto geral da pele observados clinicamente.

2.2. Pesquisa e desenvolvimento de produtos cosméticos

O processo de desenvolvimento de um produto cosmético envolve diversas etapas que devem ser rigorosamente seguidas para se obter um produto com qualidade satisfatória. A primeira delas é a definição detalhada das características da formulação, ou seja, quais os atributos que se espera desse novo produto. A partir dessa definição, inicia-se uma pesquisa profunda, na literatura-técnico científica para se definir as matérias-primas que podem ser utilizadas para se obter uma formulação com as características desejadas. Essas matérias-primas deverão ter alta qualidade, o que contribuirá para a qualidade do produto final, além de serem compatíveis entre si, pois, do contrário, ocorrerá a desestabilização da fórmula. A pesquisa relativa às matérias-primas deve envolver, por exemplo, a análise da faixa de pH em que as mesmas são estáveis e eficazes, bem como a avaliação da necessidade do uso de antioxidantes (MAIA CAMPOS, 2002).

De acordo com as características sensoriais desejáveis para a formulação, deve-se definir os emolientes a serem utilizados, pois esses são matérias-primas responsáveis pelas características de espalhabilidade, sensação de oleosidade e hidratação. Os emolientes de baixo peso molecular, por serem mais voláteis conferem à formulação uma característica de rápida secagem, já os de peso molecular mais alto são responsáveis por uma sensação de maior oleosidade. Os umectantes, por sua vez, garantem que a formulação não sofra perda de água, sendo fundamentais para a manutenção da estabilidade. Deve-se definir, ainda, o conservante a ser utilizado, de tal forma que se garanta a integridade microbiológica da formulação, bem como os agentes de consistência, responsáveis pela viscosidade do produto que será maior ou menor de acordo com a concentração utilizada dessas matérias-primas. Por fim, as substâncias ativas devem ser definidas de acordo com os efeitos esperados para esse produto.

Após o desenvolvimento da formulação, a partir das matérias-primas adequadas, deve-se conduzir o estudo de estabilidade, a partir do qual serão observadas as características da formulação ao longo do tempo e sob condições de estresse. Esse estudo visa garantir que a formulação apresentará integridade durante o seu prazo de validade e que não ocorra qualquer alteração em seu aspecto que comprometa sua performance (MUEHLBACH; BRUMMER; EGGERS, 2006).

Em seguida, devem ser realizadas avaliações que atestem a segurança de uso do produto e para isso são conduzidos testes de compatibilidade dérmica em voluntários para se garantir que o produto pode ser estendido para uso em uma população maior. Por fim, para se respaldar os atributos de eficácia, devem ser realizados testes nos usuários do produto com o objetivo de se avaliar a performance, os efeitos, bem como a aceitação da formulação pelo consumidor. Esses testes são realizados por meio de métodos não-invasivos, empregando-se equipamentos que medem, por exemplo, o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidérmica de água e a elasticidade cutânea (GASPAR et., 2001).

Para se realizar o registro do produto deve-se apresentar todos os testes acima citados, garantindo a estabilidade dentro do prazo de validade, a eficácia e a segurança, de acordo com as exigências regulatórias. Além disso, devem ser apresentadas as especificações da formulação e do material de embalagem (BRASIL – ANVISA, 2005).

Finalizando, o desenvolvimento de formulações cosméticas exige uma série de testes desde a seleção rigorosa das matérias-primas até a validação de métodos utilizados para se assegurar a qualidade, a segurança e a eficácia do produto.

2.3. Aplicação da reologia no desenvolvimento de formulações cosméticas

A Reologia é o estudo de como os materiais deformam-se e fluem sob a influência de forças externas (NAÉ, 1993). Na área cosmética, os estudos reológicos são importantes tanto na etapa de desenvolvimento como também durante a aplicação dos produtos na pele, uma vez que a reologia pode influenciar no processo de fabricação, na estabilidade e na aceitação da formulação proposta.

Assim, a determinação do comportamento reológico de uma formulação é de grande importância, pois auxilia o entendimento da natureza físico-química do produto, de tal forma que seja possível detectar sinais precoces de instabilidade, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, formulações teste e produtos finais, bem como acompanhar o processo de produção (BARRY, 1993). Na análise de um reograma, o aspecto de interesse

primordial para projeções de estabilidade é a mínima alteração desse reograma em condições comparáveis de temperatura e tensão de cisalhamento.

A análise reológica permite identificar dois diferentes tipos de comportamento de acordo com as características de fluxo: o “Newtoniano” e o “não Newtoniano”. O fluxo “Newtoniano” apresenta valores constantes de viscosidade, independente da força externa aplicada, ou seja, a relação entre o gradiente e a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional. No fluxo “não-Newtoniano”, esta relação não é proporcional, ou seja, com o aumento da força aplicada há alteração da viscosidade inicial, que na maioria das vezes diminui (fluxo plástico ou pseudoplástico) e mais raramente aumenta (fluxo dilatante) (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993).

O fluxo pseudoplástico é o mais comum e o mais interessante para os produtos cosméticos, pois além do produto apresentar uma viscosidade de acordo com os requisitos da grande maioria das preparações cosméticas (géis, emulsões, shampoos), permite também um espalhamento adequado e uma melhor cobertura da pele. O mesmo resultado não se obtém com um fluido Newtoniano, pois, devido ao seu rápido fluxo através da pele, após a sua aplicação, sua distribuição não é uniforme (DAHMS, 1996).

O índice de fluxo de um material indica o grau de pseudoplastia deste e quando este índice é igual a um, temos um material com fluxo “Newtoniano” e à medida que seu valor diminui, distanciando-se da unidade, tem-se um aumento da pseudoplastia (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993).

A escolha do método instrumental é de fundamental importância para que a determinação e a avaliação das propriedades reológicas de um sistema sejam bem sucedidas. Para um sistema Newtoniano, onde o gradiente de cisalhamento é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento, pode-se utilizar instrumentos que operam em apenas um gradiente de cisalhamento. Entretanto, para fluidos não-Newtonianos deve-se utilizar um instrumento que opere com vários gradientes de cisalhamento, obtendo-se, assim um reograma completo do sistema (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993).

O fluxo pseudoplástico pode apresentar também uma característica particular, a tixotropia, que pode facilitar ainda mais o espalhamento e até mesmo a penetração de substâncias ativas. A tixotropia, que é a área formada entre a curva ascendente e descendente de um reograma, fornece a informação da capacidade que uma emulsão tem de reconstituir sua estrutura após a aplicação de uma força.

Por fim, o estudo do comportamento reológico, é de fundamental importância para otimizar o desenvolvimento de produtos cosméticos, pois quando ocorre a desestabilização na

estrutura de uma formulação, em decorrência de alguma alteração, o comportamento reológico pode ser modificado e esta informação é utilizada na avaliação da estabilidade.

2.4. Acetil hexapeptídeo-3 em formulações dermocosméticas

O mercado cosmético tem lançado vários peptídeos para serem utilizados em formulações com finalidade antienvhecimento, devido à capacidade destes em melhorar a firmeza e elasticidade da pele (ANDRE-FREI et al., 1999). Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Essas substâncias possuem diversas funções no organismo, podendo agir como hormônios ou fatores liberadores destes, como neuropeptídeos, neurotransmissores, antibióticos naturais ou substratos de proteases (MACHADO et al., 2004).

Dentre os autores que avaliam a eficácia de peptídeos com função antienvhecimento, Ennamany et al. (1998), ao estudarem a ação do SECMA-1[®], polipeptídeo purificado de algas verdes de espécies de *Ulva*, demonstraram que este apresenta efeito *in vitro* na síntese de glicosaminoglicanas. Tais substâncias são componentes da superfície celular e da membrana basal e regulam as interações entre células adjacentes e entre células e as proteínas da matriz extracelular, tais como fibronectina, laminina e vários tipos de colágeno.

Andre-Frei et al. (1999) ao estudarem peptídeos de soja (Phytokine[®]) demonstraram que estes podem ser reconhecidos por queratinócitos induzindo assim a produção de citocinas, que por sua vez, induzem a síntese de matriz extracelular pelos fibroblastos.

Um outro peptídeo que vem sendo utilizado em formulações antienvhecimento é o acetil hexapeptídeo-3 (Figura 2) (arginina-ácido glutâmico-ácido glutâmico-metionina-ácido glutâmico-arginina) (Figura 3) devido ao seu efeito antirugas que vem sendo proposto (RUIZ et al., 2007). Análises topográficas da pele demonstraram que essa substância quando aplicada na face de voluntárias, durante 30 dias, proporcionou efeito na atenuação da profundidade das rugas (BLANES-MIRA et al., 2002).

Porém, cumpre salientar que o mecanismo de ação desse peptídeo, quando aplicado diretamente na pele humana, ainda não está bem estabelecido, visto que o efeito observado na análise topográfica da pele não está relacionado à sua ação proposta inicialmente na junção neuromuscular, de acordo com estudos *in-vitro* (BLANES-MIRA et al., 2002).

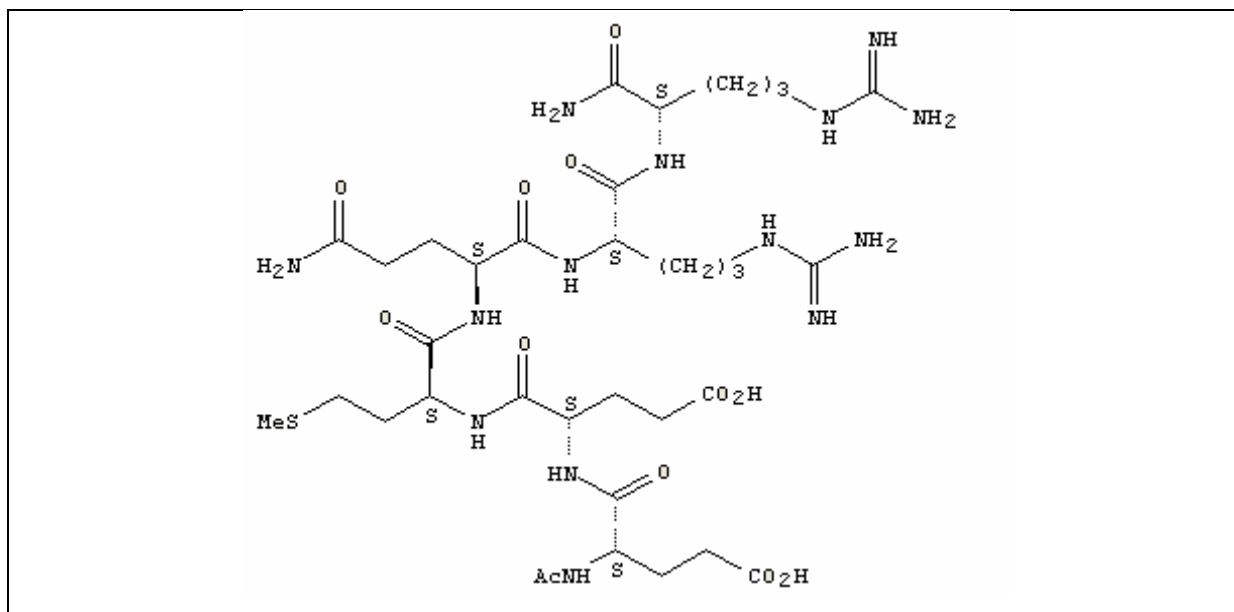


Figura 2. Molécula do acetil hexapeptide-3.

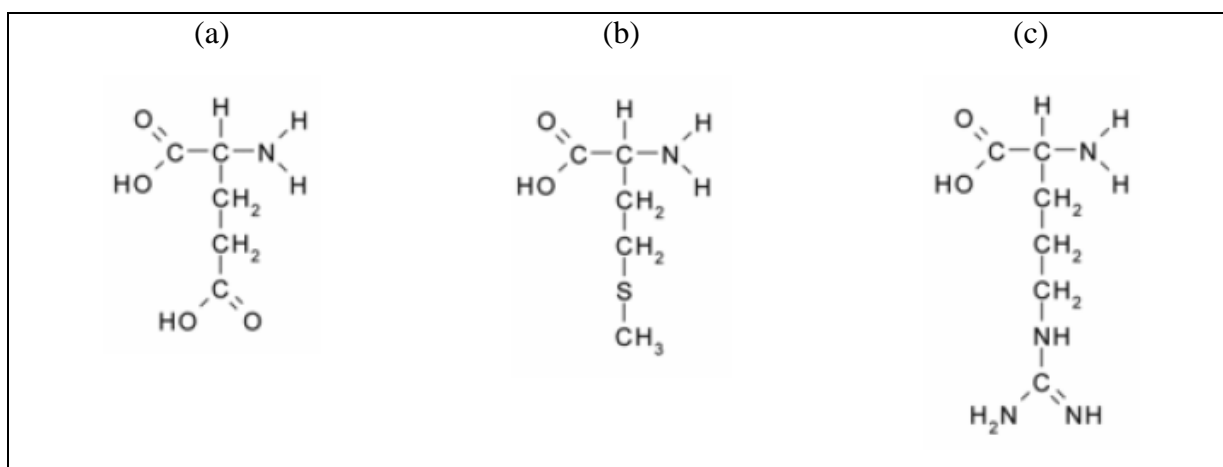


Figura 3. Estrutura molecular dos aminoácidos: (a) ácido glutâmico, (b) metionina e (c) arginina.

Assim, esse hexapeptídeo foi sintetizado com a finalidade de mimetizar a ação proporcionada pela neurotoxina botulínica tipo A (Botox[®] da Allergan Pharmaceuticals, Irlanda) que apresenta eficácia comprovada na redução de rugas de expressão quando administrada por injeção intra-dérmica. O mecanismo de ação dessa neurotoxina no tratamento do envelhecimento cutâneo baseia-se na paralisia da musculatura facial provocada

pela inibição da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (BECKER-WEGERICH; RAUCH; RUZICKA, 2002; BENEDETTO, 1999; PUIG, 2004). Apesar de sua eficácia comprovada, seu uso vem sendo limitado, uma vez que essa neurotoxina apresenta alta toxicidade, o que levou à busca por substâncias que tenham mecanismo de ação semelhante a ela, porém com efeitos mais suaves e controlados (BENEDETTO, 1998; JOHNSON, 1999). Há estudos *in vitro* demonstrando que tanto o acetil hexapeptídeo-3 como a neurotoxina apresentam efeito na inibição da liberação de neurotransmissores na junção neuromuscular, tais como a acetilcolina (BLANES-MIRA et al., 2002, 2004). Portanto, esse hexapeptídeo mostrou-se como uma promissora alternativa ao uso da neurotoxina botulínica e vem sendo empregado em formulações antienvhecimento.

Dessa forma, torna-se relevante a condução de pesquisas científicas que avaliem os reais benefícios do acetil hexapeptídeo-3 na pele quando presente em formulações dermocosméticas de uso tópico, visando a elucidação do seu modo de ação na epiderme e na derme. Cumpre salientar que estudos clínicos que utilizam métodos não invasivos, como as técnicas de biofísica e imagem da pele, são de fundamental importância para a avaliação da eficácia de cosméticos nas reais condições de uso, ou seja, na pele humana.

2.5. Dimetilaminoetanol (DMAE) em formulações dermocosméticas

O DMAE é uma substância naturalmente encontrada em peixes marinhos, tais como sardinha e salmão, além de ser também produzido em pequenas quantidades no cérebro humano, sendo um análogo de colina, substância precursora do neurotransmissor acetilcolina (Ach) (GRAGNANI et al., 2007; PERRICONE, 2001). Dados da literatura demonstram que, quando administrado oralmente, ele inibe o metabolismo da colina nos tecidos periféricos, permitindo que a colina livre se acumule no sangue, atinja o Sistema Nervoso Central (SNC) e estimule receptores colinérgicos (HAUBRICH; GERBER; PFLUEGER, 1981). Outro mecanismo de ação proposto baseia-se no fato do DMAE penetrar a barreira hematoencefálica e agir como um precursor de colina, aumentando a síntese de Ach no SNC (RE'O, 1974).

Há evidências de que o DMAE é eficaz no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central, sendo utilizado oralmente, por exemplo, em crianças hiperativas e para a melhora de diversas funções cognitivas (depressão leve, discinesia tardia, fadiga crônica, perda de memória, etc.) (CAI, 1985; FERRIS et al., 1977; GEORGE; PRIDMORE; ALDOUS, 1981; LAMBERT et al., 1978; RUGGINENTI, 1974). Essa substância pode ser

utilizada em diversas formas de sais, incluindo o acetamidobenzoato (Figura 4), o bitartarato, o hemisuccinato e o aceglutamato (MARTINDALE, 1999; PENOVICH et al., 1978; RE'O, 1974).

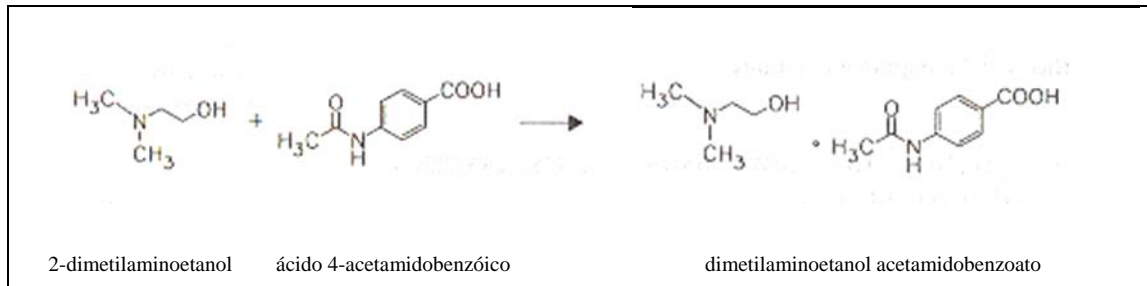


Figura 4. Rota de síntese do dimetilaminoetanol acetamidobenzoato.

O advento do uso do DMAE em Cosmetologia ocorreu quando foi observado clinicamente que o uso oral desta substância provocava um efeito não esperado nos pacientes: o enrijecimento da musculatura do pescoço. A princípio, esse efeito foi correlacionado à propriedade do DMAE em aumentar os níveis de Ach e dessa forma ele produziria uma contração muscular, ajudando a devolver o tônus e a firmeza dos músculos submetidos ao processo de envelhecimento. A partir dessa observação, o DMAE passou a ser utilizado também topicamente como ativo antienvhecimento, estando inscrito no “*International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*” (1997) com o nome Dimethyl MEA. Entretanto, o uso tópico do DMAE é recente e até o momento, não existem muitos trabalhos relatados na literatura científica que comprovem sua eficácia e elucidem seu mecanismo de ação no tecido cutâneo.

Estudos *in vitro* mostraram que o DMAE diminui o *crosslinking* de proteínas, uma característica do envelhecimento celular (NAGY; NAGY, 1980). O aumento no *crosslink* de proteínas pode ser causado pela formação de radicais livres hidroxila e há a hipótese de que o DMAE reduza tal *crosslink* por agir como um *scavenger* de radicais livres (NAGY; DAJKO; URAY, 1994; NAGY; FLOYD, 1984; NAGY; NAGY, 1980). Além disso, o DMAE tem sido conhecido como um precursor de fosfatidilcolina, um fosfolípídeo de membrana. Assim, Grossman (2005), sugere que ele poderia também agir como um estabilizador de membrana celular, através da formação de fosfatidilcolina, apesar de não haver dados científicos que comprovem esse mecanismo.

Além disso, estudos baseados em observações clínicas relataram a segurança de uso do DMAE, bem como os seus efeitos na melhora da aparência da pele envelhecida, no aumento de firmeza da área dos olhos, lábios e bochechas, bem como na diminuição de linhas frontais horizontais (COLE; GISOLD; GROSSMAN, 2002; GROSSMAN; GISOLDI; COLE, 2002; PIÉRARD et al., 2002; WALLO et al., 2002).

Uhoda et al. (2002), ao avaliar as características anisotrópicas da pele, utilizando o equipamento *Reviscometer*[®], demonstraram que a aplicação tópica de DMAE provocou um aumento da firmeza da pele de voluntárias, sugerindo que esse efeito pode estar relacionado a um aumento de retenção de água na derme papilar. Além disso, Tadini (2009) também sugere que os benefícios proporcionados pelo DMAE estejam relacionados a efeitos na derme, uma vez que houve um aumento de espessura dessa camada e das fibras de colágeno da pele de camundongos sem pêlo após o tratamento com formulações contendo essa substância. Por outro lado, Morissette; Germain e Marceau (2007), sugerem que o efeito antirrugos atribuído ao DMAE pode ser induzido por uma formação de vacúolos dentro das células, o que provocaria uma expansão celular, tendo um rápido efeito na aparência geral da pele.

Nesse contexto, é de fundamental importância a realização de estudos científicos visando não somente comprovar a eficácia de produtos que contenham DMAE, mas também avaliar seu mecanismo de ação na pele.

2.6. Avaliação clínica de formulações cosméticas

2.6.1. Avaliação sensorial

O tipo de formulação e a aceitação do consumidor frente às características sensoriais podem influir de maneira importante na escolha do produto. Além disso, o usuário pode variar a forma de aplicação, a frequência de uso e a quantidade de produto utilizada, dependendo de uma maior ou menor aceitação das características sensoriais e de espalhabilidade deste (GOMES et al., 1998).

Assim, a avaliação sensorial é um instrumento que pode influir significativamente, o sucesso de um produto cosmético, uma vez que se deve considerar que as percepções de qualidade de um produto para um formulador e um consumidor são diferentes. A qualidade avaliada por um formulador é baseada na confiabilidade de um produto durante o tempo de armazenagem em diferentes condições ambientais, priorizando a conservação das

propriedades originais do produto: forma de apresentação e ativos. Para o consumidor, a qualidade de um produto está diretamente relacionada com sua percepção fisiológica e sua sensação de bem estar produzida durante e depois da aplicação (TACHINARDI et al., 2005).

Após a realização de um estudo das características sensoriais de um produto, podemos direcioná-lo para um determinado segmento de mercado e assim minimizar os problemas de aceitação, aproximando-se do “produto ideal”. Nesse sentido, a avaliação sensorial se apresenta como o melhor caminho para a área de marketing e a área de desenvolvimento de uma empresa criar uma efetiva e bem sucedida parceria no lançamento de novos produtos de sucesso (TACHINARDI et al., 2005).

2.6.2. Avaliação da segurança de produtos cosméticos

Produtos cosméticos necessitam de ensaios clínicos em humanos, para que se possa oferecer ao usuário o máximo de segurança com o menor risco, garantindo as melhores condições de uso do produto. A partir de informações pré-clínicas coletadas, deve haver a comprovação de segurança de uso em humanos. Estas informações são importantes para determinação do modo e local de uso, advertências de rotulagem e orientações para o serviço de atendimento ao consumidor (BRASIL – ANVISA, 2003). Além disso, para que um produto seja considerado “dermatologicamente testado”, ensaios de compatibilidade cutânea devem ser conduzidos.

A compatibilidade cutânea é definida como a ausência de irritação na pele sob circunstâncias normais de uso e sob condições de mau uso razoavelmente previsíveis que levam em consideração reações objetivas assim como respostas subjetivas tais como sensação de pinicação, queimação ou coceira (BÉLGICA – COLIPA, 1997).

Os ensaios de compatibilidade têm por objetivo comprovar a inocuidade dos produtos na pele humana, sendo realizados, de modo geral, com apósitos oclusivos ou semi-oclusivos (*patch tests*) ou em modelos abertos (*open tests*). Representam o primeiro contato do produto acabado com um ser humano e por isso devem seguir premissas de ordem ética e de boas práticas clínicas (BRASIL – ANVISA, 2003).

O principal ensaio de compatibilidade é o Teste de Irritação Cutânea Primária e Acumulada, no qual o produto é aplicado de forma aberta, semi-oclusiva ou oclusiva, de acordo com o produto a ser avaliado. A duração do contato e periodicidade das leituras são padronizadas e a interpretação dos resultados é feita por um dermatologista, considerando o ICDRG (*International Contact Dermatitis Research Group*) (BRASIL – ANVISA, 2003).

Este teste pode ser usado para avaliar novas formulações com matérias-primas conhecidas, sendo possível fazer avaliações comparativas de diversas formulações no mesmo indivíduo, incluindo geralmente um padrão que não provoca reação, como o soro fisiológico, por exemplo. As formulações são aplicadas em pequenas cúpulas de inox presentes no apósito, e em seguida este é aplicado nas costas ou no antebraço dos voluntários durante um período mínimo de 24 horas.

Assim, a realização de um teste de compatibilidade cutânea é importante para fornecer informações em relação à segurança de uso das formulações contendo acetil hexapeptídeo-3 e DMAE, antes da realização de estudos clínicos de eficácia.

2.6.3. Avaliação da eficácia de produtos cosméticos por técnicas de biofísica e imagem da pele

As técnicas de biofísica e imagem da pele consistem na avaliação das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele por meio de métodos objetivos e não-invasivos, não provocando, portanto, qualquer agressão ou desconforto para o sujeito da pesquisa (EGAWA et al., 2002a; HAFTEK et al., 2008; PAYE et al., 2007; SILVER; SIPERKO; SEEHRA, 2003). O termo “não-invasivo” deve ser utilizado para procedimentos ou instrumentos que causam mudanças mínimas e temporárias na função ou estrutura do órgão estudado, além de não envolver dor, incisões ou perda de sangue (ROGIERS, 1996).

As técnicas de biofísica representam uma complementação importante ao estudo clínico baseado na avaliação visual e no uso de questionários, sendo que sua potencialidade de aplicação resultou na construção de sofisticados equipamentos destinados à análise das condições da pele, permitindo a realização de medidas rigorosas dos efeitos obtidos pelo tratamento com formulações tópicas (GOMES et al., 1998; LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002; MIGNINI, 1998). Além disso, cumpre destacar que, no Brasil, para o registro de um produto no Ministério da Saúde, é necessário que se comprove sua eficácia quando a ele é atribuído um benefício específico (BRASIL– ANVISA, 2005), e para tal as técnicas de biofísica têm-se mostrado muito adequadas.

A investigação por meio dessas técnicas pode ser realizada na pele humana utilizando-se de voluntários e está diretamente relacionada às reais condições de uso de um produto dermocosmético, sendo de grande valia para a elucidação científica de efeitos através, por exemplo, da determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, da perda transepidérmica de água, das propriedades mecânicas e do micro-relevo cutâneo (BLANES-MIRA et al., 2002;

DOBREV, 2002; GIOIA; CELLENO, 2002; HAFTEK et al., 2008; PAYE et al., 2007; SAGIV; DIKSTEIN; INGBER, 2001).

O conteúdo aquoso do estrato córneo é mantido pelo filme hidrolipídico encontrado na pele, o qual é formado por material graxo excretado pelas glândulas sebáceas, e por substâncias presentes no suor. As funções do filme hidrolipídico são: proteger a pele do ressecamento, manter sua flexibilidade e formar uma barreira de proteção acídica contra a penetração de substâncias danosas ao organismo (SMITH, 1999; SPENCER, 1988). A determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo pode ser utilizada para a avaliação da eficácia de produtos antienvhecimento, uma vez que os valores deste parâmetro tendem a diminuir em decorrência do envelhecimento (SATOR et al., 2001). Dentre os diversos métodos disponíveis para a avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, tem-se considerado que os mais precisos baseiam-se em medidas da impedância e da capacitância do meio (ROGIERS, 1996), sendo que este último apresenta a vantagem de não sofrer a interferência de sais ou produtos químicos aplicados na pele. O *Corneometer*[®], um equipamento baseado na medida da capacitância, tem sido muito utilizado por apresentar alta sensibilidade (CHENG et al., 2007; EGAWA et al., 2002b; KIM et al., 2007; OGOSHI; SERUP, 2005; PAYE et al., 2007; SAGIV; MARCUS, 2003; VOEGELI, 2008).

A integridade da função barreira do estrato córneo pode ser monitorada utilizando a medida da perda transepidérmica de água (do inglês *transepidermal water loss* – TEWL), que representa a evaporação de água na superfície da pele. Esta medida é baseada no princípio de difusão de Fick, o qual está relacionado à pressão formada pela difusão da água no eletrodo do equipamento. Assim, quanto maiores os valores de TEWL, expressos em g/m².h, pior pode ser considerada a função barreira da pele. O equipamento utilizado para a realização dessa medida é o *Tewameter*[®] (CAMPOS; GONÇALVES; GASPAR, 2008; CHENG, et al., 2009).

Outra técnica bastante utilizada para a avaliação da eficácia de produtos cosméticos é a medida das propriedades mecânicas da pele por determinação de suas características anisotrópicas e é determinada pelo equipamento *Reviscometer*[®]. Esse equipamento possui uma sonda que contém dois sensores que são colocados sobre a pele, um deles emite ondas de ultra-som e o outro serve como receptor, sendo que esta sonda realiza diferentes medidas em diferentes ângulos na superfície da pele. O tempo que a onda necessita para percorrer a distância entre o sensor emissor e o receptor é o parâmetro a ser medido pelo equipamento, sendo denominado RRTM (*resonance running time measurements*). Este tempo varia de acordo com a posição em que o sensor é colocado sobre a pele, ou seja, se a medida está sendo feita em direção favorável ou contra as fibras elásticas. A sonda é colocada sobre a pele

das voluntárias, em diferentes posições, sendo que os sensores devem ser alinhados em diferentes ângulos: $0^\circ / 180^\circ$, $45^\circ / 225^\circ$, $90^\circ / 270^\circ$, $135^\circ / 315^\circ$ para avaliação da anisotropia da pele, ou seja, em uma condição de variabilidade das propriedades físicas da pele em diferentes direções. As ondas de ultra-som se propagam na pele de forma diferente, dependendo das condições das fibras elásticas e da hidratação da pele (HERMANS-LÊ et al., 2001, RUVOLO; STAMATAS; KOLLIAS, 2007). Com este equipamento, é possível determinar as propriedades mecânicas da pele por meio da avaliação do RRTM máximo, do RRTM mínimo e do cálculo da anisotropia da pele, pela razão RRTM máximo dividido pelo RRTM mínimo. Esta razão é sempre maior que 1 exceto no caso de uma pele isotrópica, sendo que, quanto mais próximo de 1 esta razão, menor será a anisotropia da pele, ou seja, menor será a desorganização das fibras elásticas, o que reflete no aumento da firmeza da pele (RUVOLO; STAMATAS; KOLLIAS, 2007; VEXLER; POLYANKY; GORODETSKY, 1999)

As propriedades viscoelásticas da pele também vêm sendo amplamente estudadas, principalmente em estudos relacionados à eficácia de produtos tópicos (DOBREV 2000, 2002). A avaliação desse parâmetro permite uma abordagem das características físicas do tecido cutâneo, numa perspectiva reológica, uma vez que, por ser de natureza viscoelástica, a pele humana possui tanto características elásticas quanto plásticas. Nesse sentido, a pele tende a não retornar ao seu estado original de maneira imediata, quando submetida a uma deformação temporária em sua estrutura por aplicação de forças externas (SILVER; SIPERKO; SEEHRA, 2003). Esse fenômeno pode ser observado na pele jovem e acentua-se na pele envelhecida (OBA et al., 2002). Estudos *in vitro* têm demonstrado que as propriedades viscoelásticas da pele estão intimamente relacionadas com as fibras elásticas e de colágeno localizadas na derme, as quais permitem um estiramento da pele (MARKS, 1991). Dessa forma, produtos cosméticos que se propõe a melhorar as propriedades viscoelásticas da pele podem ter sua eficácia avaliada por diversos instrumentos que são baseados em métodos de torção (MURRAY; WICKET, 1997) e sucção (JEMEC; WULF, 1999; PEDERSEN; JEMEC, 1999). Dentre os equipamentos, cujo princípio de medida se baseia na sucção da pele, o *Cutometer*[®] tem sido muito empregado em estudos científicos (DOBREV, 2005; RYU et al., 2008; SEGGER; MATTHIES; SALDEEN 2008). O princípio de operação e as aplicações referentes a esse equipamento foram descritas por Barel; Courage e Clarys (1995).

O micro-relevo da superfície da pele reflete a organização tridimensional da derme e dos tecidos subcutâneos, sendo que o estudo da topografia da pele é bastante importante no diagnóstico de várias doenças e é um indicador confiável para a avaliação do processo de

envelhecimento (DE PAEPE et al., 2000; GASSMUELLER; KECSKES; JAHN, 1995; PIÉRARD; PIÉRARD-FRANCHIMONT, 1996). Com o envelhecimento, o micro-relevo cutâneo se modifica devido a alterações na epiderme e na derme, as quais resultam na sensação de aspereza, além de terem impacto na aparência geral da pele (KOH et al., 2002). O micro-relevo cutâneo é afetado, ainda, pelo estado de hidratação do estrato córneo, por fatores climáticos, incluindo umidade relativa, temperatura e exposição solar, além da utilização de produtos dermatológicos de aplicação tópica (LÉVÊQUE 1999; RAAB 1990; ROELANDTS 1994; VÖRÖS 1990). Além disso, as características do micro-relevo cutâneo são modificadas frente a alterações tais como eczema tópico, psoríase e ictiose, em que o mau funcionamento da função barreira induz à aspereza e descamação da pele, deixando-a com aparência envelhecida. Esse parâmetro pode ser analisado pelo equipamento *Visioscan*[®], uma câmera de vídeo, cujo princípio de medida baseia-se na captação de uma imagem gráfica da superfície da pele sob luz ultravioleta, bem como no processamento eletrônico dessa imagem de acordo com parâmetros clínicos que correspondem às condições fisiológicas da pele.

Por fim, cumpre salientar que, no Brasil o Conselho Nacional de Saúde regulamentou as pesquisas envolvendo seres humanos através da Resolução 196/96 e constituiu a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (1996), responsável, entre outros, pelo registro dos Comitês de Ética em Pesquisa Institucionais. Dessa forma, todos os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos devem obedecer às normas dessa Resolução, além de serem submetidos a uma avaliação prévia por um Comitê de Ética.

3 Objetivo

O objetivo desse estudo foi o desenvolvimento, a avaliação da estabilidade física, da compatibilidade cutânea e da eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo DMAE e/ou acetil hexapeptídeo-3 na hidratação, nas propriedades mecânicas e no micro-relevo da pele humana.

4 Material e Métodos

4.1. Matérias-primas

As matérias-primas descritas, a seguir, estão de acordo com o INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) e quando aplicável também está descrito o nome comercial e o fornecedor/fabricante.

- Acetil hexapeptídeo-3 em solução a 0,05%, Argireline[®], Lipotec
- Água destilada e deionizada
- Base autoemulsificante contendo ácidos cáprico e caprílico, álcool batílico e lecitina de soja, Nikkolipid 81S[®], Nikkol
- Dimeticone DC 200/50CS, D'Altomare
- Dimetilaminoetanol acetamidobenzoato (99%), Galena
- Ésteres de polietilenoglicol (C12-20 acid PEG-8 ester), Xalifin 15[®], Vevy
- Fenoxietanol, metil, etil, butil e propilparabenos, Phenonip[®], Clariant
- Filtro hidrossolúvel UVA/UVB (ácido fenilbenzimidazol sulfônico e benzofenona- 4), Merck
- Glicerina PA, Synth
- Hidróxido de sódio, Prolabo
- Hidroxietilcelulose, Natrosol[®] 250 HHR, Aqualon
- Octil octanoato, Dragoxat EH[®], Symrise
- Polímero de acrilato, Plurigel[®], Galena
- Propilenoglicol PA, Synth

4.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico, Heidolph[®], RZR 2021
- Apósito oclusivo FINN CHAMBER[®]
- Balança eletrônica Marte, modelo AS 2000
- Bisnagas plásticas com capacidade para 30 gramas.
- Centrífuga Excelsa Baby II, Fanem, modelo 206-R, potência 0,0440 kw
- Chapa de aquecimento
- *Corneometer*[®] CM 825 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha)
- *Cutometer*[®] SEM 575 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha)
- Estufas termostatizadas com controle de umidade Eletrolab, modelo 111FC de 37°C e 45°C

- Higrômetro, CE
- Peagômetro, Digimed[®], modelo DM 20
- Potes plásticos com capacidade para 30 gramas.
- Purificador de água Milli Q
- Reômetro modelo DV-III (tipo Cone & Placa), marca Brookfield, acoplado ao Software Rheocalc versão V1.01 e um spindle CP 52
- *Reviscometer*[®] RV 600 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha)
- Termômetro
- *Tewameter*[®] MX16 (Courage & Kazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha).
- Vidrarias em geral
- *Visioscan*[®] VC 98 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha)

4.3. Desenvolvimento das formulações

As formulações desenvolvidas estão descritas na Tabela 1 e foram preparadas em agitador Heidolph[®] RZR 2021, com agitação de 625 rpm, durante 25 minutos. Em seguida, as formulações em estudo foram adicionadas ou não (veículo) de: 10% de uma solução de acetil hexapeptídeo-3 (0,05%) ou de 9% de dimetilaminoetanol (DMAE) acetamidobenzoato (peso molecular: 268,31), correspondendo a 3% de DMAE (peso molecular: 89,14), ou ainda da associação dessas duas substâncias ativas nas concentrações citadas.

Tabela 1 - Formulações desenvolvidas

Matérias-primas	Concentração das matérias-primas % (p/p)			
	F1	F2	F3	F4
Ácidos cáprico e caprílico, álcool batílico e lecitina de soja	3,5	3,5	-	-
Ésteres de polietilenoglicol	-	-	3,5	3,5
Hidroxietilcelulose	0,9	-	0,9	-
Polímero de acrilato	-	0,7	-	0,7
Éster de ácido graxo	2,5	2,5	2,5	2,5
Propilenoglicol	2,0	2,0	2,0	2,0
Glicerina	2,0	2,0	2,0	2,0
Fenoxietanol e parabenos	0,8	0,8	0,8	0,8
Dimeticone DC 200/50CS	2,0	2,0	2,0	2,0
Filtro hidrossolúvel UVA/B	7,5	7,5	7,5	7,5
Hidróxido de sódio	-	0,15	-	0,15
Água deionizada qsp.	100,0	100,0	100,0	100,0

4.3.1. Determinação do pH

A medida de pH foi realizada em peagômetro Digimed DM 20, utilizando-se amostras de todas as formulações, diluídas a 10% em água deionizada.

4.3.2. Testes preliminares de estabilidade

4.3.2.1. Centrifugação

Neste teste preliminar de estabilidade, 5 gramas de cada amostra objeto de estudo foram centrifugados a 3000 rpm, por 30 minutos, em centrífuga Excelsa Baby II, Fanem (MAIA CAMPOS; BADRA, 1992).

4.3.2.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas

As análises foram realizadas, diariamente, por um período de 7 dias, sendo que durante esse período amostras das formulações foram acondicionadas em potes plásticos opacos e mantidas à temperatura ambiente e em estufas termostatizadas a 37 e 45°C e com controle de umidade (70% de umidade relativa). As amostras foram observadas, visualmente, quanto às seguintes alterações: cor, separação de fases e homogeneidade.

4.3.3. Estudo de estabilidade acelerada

4.3.3.1. Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico

Para a avaliação da estabilidade física das formulações selecionadas nos testes preliminares, estas foram novamente preparadas 24 horas antes da primeira análise e acondicionadas em potes plásticos opacos com capacidade para 30 g, sendo então submetidas à armazenagem no ambiente e em estufas termostatizadas a 37 e 45°C e com controle de umidade (70% de umidade relativa) por um período de 28 dias. Após esse período foram coletadas amostras das formulações para determinação da viscosidade e do comportamento reológico.

Este estudo foi realizado em reômetro modelo DV-III (tipo Cone & Placa), marca Brookfield, acoplado a um Software Rheocalc versão V1.01, utilizando-se de spindle CP 52 e 0,5g de amostra. Todas as medidas foram efetuadas a 25°C utilizando-se velocidades de rotação progressivamente maiores (1 a 10 rpm), para se obter a curva ascendente e progressivamente menores (10 a 1 rpm), para se obter a curva descendente do reograma (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

A integração numérica das curvas dos reogramas assim obtidos foi realizada no Software Microcal Origin e a área sob a curva foi calculada a fim de se obter a área de histerese (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

Com os valores de viscosidade aparente obtidos, de acordo com a lei de Ostwald, foi possível determinar também os valores do índice de consistência e índice de fluxo (SORIANO; CONTRERAS; FLORES, 1996):

$$\sigma = K(\gamma)^n$$

Onde:

σ = tensão de cisalhamento

γ = gradiente de cisalhamento

K = índice de consistência

n = índice de fluxo

4.3.3.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas

Após 28 dias de armazenamento nas condições de temperatura descritas no item anterior, foram observadas visualmente as características macroscópicas e organolépticas das formulações com o objetivo de avaliar a influência do tempo e das condições de temperatura sobre a estabilidade das mesmas.

4.3.3.3. Centrifugação

Após 28 dias de armazenamento, as amostras foram submetidas novamente à centrifugação para a verificação da influência do tempo e das temperaturas de armazenamento na estabilidade frente a esse parâmetro.

4.3.3.4. Determinação do pH

Esta avaliação foi feita para acompanhamento e verificação se os valores de pH mantiveram-se estáveis após 28 dias de armazenamento nas temperaturas ambiente, 37 e 45°C.

5 Casuística e Métodos

5.1. Triagem das voluntárias para a análise sensorial e para os estudos de eficácia

Após a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Anexo A), foram selecionadas 80 voluntárias para a etapa de análise sensorial das formulações consideradas estáveis, 10 voluntárias para a avaliação dos efeitos imediatos das formulações por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele e 40 voluntárias para o estudo dos efeitos a longo prazo com essas mesmas técnicas.

As voluntárias apresentavam idades entre 35 e 55 anos e peles tipo II, III e IV (Tabela 2), bem como informaram que não estavam fazendo uso de contraceptivos orais, não estavam grávidas, não eram fumantes e não possuíam nenhum tipo de dermatose ou alergia nos antebraços. Quando alguma delas possuía o hábito de utilizar algum produto cosmético no rosto e antebraço, a voluntária era orientada a interromper o uso dessas formulações, por no mínimo duas semanas antes de participar do presente estudo.

As voluntárias leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), declarando que estavam plenamente de acordo em participar desta pesquisa, estando cientes dos procedimentos, dos riscos e dos benefícios.

Tabela 2 – Fototipos cutâneos (PATHAK; FITZPATRICK, 1993).

Fototipos	Descrição	Sensibilidade ao Sol
I – Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II – Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III - Morena Clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV - Morena Moderada	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V – Morena Escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI – Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

5.2. Análise sensorial das formulações estáveis

Esta análise foi realizada a fim de se determinar, dentre as formulações consideradas estáveis no item 4.3.3, a que possuía as melhores características sensoriais, sendo então utilizada nos estudos de avaliação de segurança e eficácia.

Para garantir melhor avaliação pelas voluntárias, as formulações foram analisadas duas a duas. Dessa forma, as voluntárias tiveram seus antebraços divididos em regiões e receberam 0,2 g das formulações objeto de estudo conforme o grupo ao qual pertenciam:

- Grupo 1: receberam as formulações 1 e 4 (F1 e F4)
- Grupo 2: receberam as formulações F1 e F4 contendo 10% de uma solução de acetil hexapeptídeo-3 (0,05%) (F1A e F4A, respectivamente)
- Grupo 3: receberam as formulações F1 e F4 contendo 9% de DMAE acetamidobenzoato (F1D e F4D, respectivamente)

- Grupo 4: receberam as formulações F1 e F4 contendo a associação das duas substâncias ativas: 10% acetil hexapeptídeo-3 e 9% DMAE acetamidobenzoato (F1AD e F4AD, respectivamente).

As formulações foram espalhadas pelas próprias voluntárias que imediatamente e após 5 minutos atribuíram notas a cada formulação, utilizando a ficha de avaliação sensorial (Figura 5), em relação aos seguintes parâmetros: toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação na pele imediata e sensação na pele após 5 minutos da aplicação.

Responda a avaliação abaixo utilizando os seguintes parâmetros sensoriais:
 (1) péssimo (2) ruim (3) regular (4) bom (5) excelente

Parâmetros avaliados	Notas atribuídas	
	F1	F4
Toque e pegajosidade		
Espalhabilidade e aparência na pele		
Sensação na pele imediatamente		
Sensação na pele após 5 minutos		

Figura 5. Ficha de avaliação sensorial.

5.3. Avaliação da segurança por meio do estudo de compatibilidade cutânea

Este trabalho foi iniciado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos Hospital Leonor Mendes de Barros (Protocolo CEP nº148/06), tendo sido realizado em parceria com a Evic Brasil S/C Ltda. Este estudo teve por objetivo verificar a compatibilidade cutânea das formulações após uma única aplicação sobre a pele em condições oclusivas, tendo sido previamente validado.

Foram selecionadas 27 voluntárias de fototipo II a IV (PATHAK; FITZPATRICK, 1993), com idades entre 20 e 59 anos. Para a seleção dessas voluntárias, foram considerados os seguintes critérios de exclusão: marcas cutâneas na área experimental que pudessem interferir na avaliação das reações cutâneas (problemas de pigmentação, elementos de cicatrizes, pilosidade super desenvolvida, queimaduras solares, etc); reação eczematosa ainda

visível, cicatriz ou seqüela de pigmentação sobre a área experimental referentes a estudos anteriores; alergia ao níquel; alergia ou reatividade para a categoria do produto estudado; dermatografismo; hiper-reatividade cutânea; atopia; alergia a esparadrapo; exposição intensiva ao sol nos meses precedentes ao início do estudo; previsão de exposição intensiva ao sol ou exposição UVA (lâmpadas UV) durante o período do estudo; previsão de banho de piscina, mar ou banheira e sessões de sauna ou bronzamento durante a realização do estudo; tratamento com vitamina A ácida e/ou seus derivados nos três meses antecedentes ao início do estudo; tratamento tópico com corticóides na área experimental até oito dias antes do início do estudo; tratamento com radiação UVA ou UVB até um mês antes do início do estudo; gravidez ou lactação; previsão de vacinação durante a realização do estudo ou vacinação até três semanas antes do estudo; tratamento com medicamentos anti-inflamatórios ou antialérgicos há 15 dias antes do estudo.

A pesquisa foi realizada utilizando-se o teste de irritação cutânea primária, ou seja, o teste de contato (*patch test*) que consiste na aplicação do produto de forma oclusiva. Neste teste, 20µL das 4 formulações em estudo foram aplicados de maneira randomizada sobre cúpulas de alumínio com área de 50 mm² (FINN CHAMBER[®]) colados por uma fita adesiva hipoalergênica, que foi fixada na área dorsal dos voluntários (Figura 6). Foi reservada uma outra área experimental em que não foi aplicado nenhum produto, para ser utilizada como controle. Além disso, um apósito controle, correspondente ao tipo de apósito utilizado no estudo, contendo soro fisiológico foi aplicado concomitantemente aos apósitos com o produto teste.

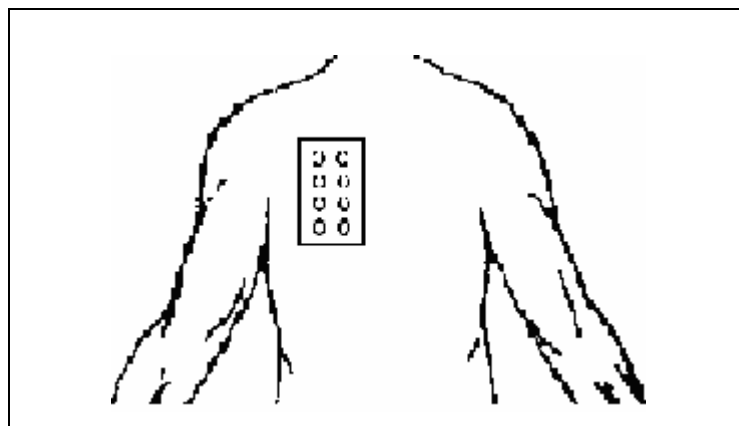


Figura 6. Aplicação do *patch* no dorso dos voluntários.

Após aproximadamente 48 horas, o teste de contato foi removido da pele e a avaliação visual do resultado foi efetuada após regressão do eritema ocasionado pela retirada da fita adesiva, ou seja, após aproximadamente 15 minutos da remoção do apósito. A avaliação foi realizada de acordo com a Tabela 3 que estabelece a escala definida pelo ICDRG (*International Contact Dermatitis Research Group*) (FISCHER, 1995; MARZULLI; MAIBACH, 1976).

Tabela 3 - Critérios de avaliação de teste de contato propostos pelo ICDRG

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

5.4. Avaliação da eficácia das formulações por técnicas de biofísica e imagem da pele

5.4.1. Descrição das técnicas empregadas nesse estudo

5.4.1.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Para a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo foi utilizado o equipamento *Corneometer*[®] CM 825, acoplado a um software, que mede o teor de hidratação do estrato córneo baseado no princípio da medida da capacitância elétrica, ou seja, na variação da constante dielétrica do meio em função da quantidade de água presente. Os resultados são dados em unidades arbitrárias (UA) pelo próprio equipamento em função do conteúdo aquoso presente no estrato córneo, sendo estimado que 1 UA corresponde entre 0,2 e 0,9 mg de água por grama de estrato córneo. Foram efetuadas 20 medições no antebraço das voluntárias e na região malar, sendo calculada a média dos valores obtidos. O número de medições realizadas foi determinado conforme o tamanho da região estudada, de tal forma a garantir que todo o local fosse avaliado.

5.4.1.2. Determinação da perda transepidérmica de água

Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento *Tewameter*[®] *TM 210*, acoplado a um software, cuja função é medir a perda transepidérmica de água, baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick. Os valores são dados em $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. A sonda do aparelho permaneceu por 1,5 minuto sobre a pele dos antebraços e o valor médio das 5 medidas obtidas neste intervalo de tempo foi empregado nos cálculos posteriores (GIOIA; CELLENO, 2002; NANGIA, 1998).

5.4.1.3. Determinação das propriedades mecânicas da pele

5.4.1.3.1. Determinação das características anisotrópicas da pele

Para tal avaliação foi utilizado o equipamento *Reviscometer*[®] *RV600*, o qual determina o tempo necessário para uma onda de ultra-som percorrer uma determinada distância através da pele (RRTM - *resonance running time measurements*). Este tempo está relacionado com a direção das fibras de colágeno e elastina na pele. A sonda do ultra-som foi colocada sobre a pele das voluntárias, em diferentes posições, sendo que os sensores foram alinhados em diferentes ângulos: $0^\circ / 180^\circ$, $45^\circ / 225^\circ$, $90^\circ / 270^\circ$. Com este equipamento, foram determinados o RRTM máximo, mínimo e médio, bem como a anisotropia da pele que é calculada pela divisão do RRTM máximo pelo RRTM mínimo. Quanto menor a variação entre o menor e o maior RRTM, ou seja, quanto mais próximo de 1 a anisotropia da pele, menor será a desorganização das fibras de colágeno e elastina, o que reflete no aumento da firmeza da pele (RUVOLO; STAMATAS; KOLLIAS, 2007; UHODA et al., 2002). Além disso, sabe-se que altos valores de RRTM máximo são característicos de peles mais envelhecidas (HERMANNNS-LÊ et al., 2001).

5.4.1.3.2. Determinação das características viscoelásticas da pele

Para a determinação das propriedades viscoelásticas da pele foi utilizado o equipamento *Cutometer*[®] *SEM 575*, equipado com uma sonda que possui um orifício com 2 mm de diâmetro. O princípio deste equipamento é fundamentado no método de sucção, ou seja, a pressão negativa que é criada pelo dispositivo de leitura provoca sensível penetração da pele no orifício e o nível de penetração obtido é determinado por um sistema de leitura ótico,

no qual a intensidade de luminosidade captada é proporcional à penetração da pele no dispositivo.

Este sistema é acoplado a um software, com 4 módulos de leitura, que contém fórmulas para calcular as variáveis que podem ser estudadas e são apresentadas na tela do computador e gravadas juntamente com o gráfico obtido. No presente estudo, foi utilizado o módulo 1, o qual produz uma rápida sucção da pele, seguida de interrupção da sucção, sendo a pressão empregada de 450 mbar. Cada leitura foi realizada utilizando-se 4 ciclos consecutivos de sucção.

Os parâmetros fornecidos pelo equipamento (Tabela 4) são calculados a partir do gráfico apresentado na Figura 7.

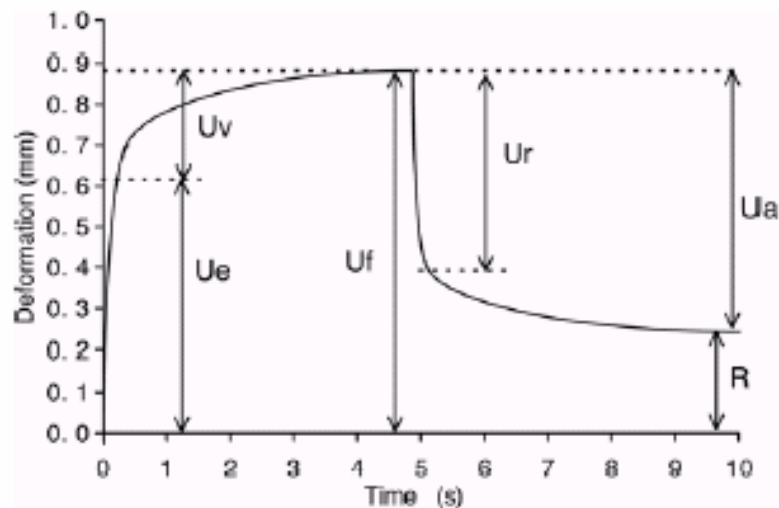


Figura 7. Curva de deformação da pele obtida pelo equipamento *Cutometer[®] SEM 575* (DOBREV, 2000).

Legenda: Ue: distensão imediata

Uv: distensão retardada

Ur: retração imediata

Ua: retração total

Uf: distensibilidade total da pele

R: deformação residual no fim do ciclo de medida (resíduo da deformação)

Tabela 4 - Parâmetros fornecidos pelo equipamento *Cutometer*[®] SEM 575.

Variáveis	Significado
$R0 = U_f$	Distensibilidade total da pele.
$R1 = R$	Deformação residual da pele.
$R2 = U_a/U_f$	Elasticidade total da pele: relação da retração total com a distensão total, ou seja, incluindo a deformação viscosa.
$R3$	Última amplitude máxima.
$R4$	Última amplitude mínima.
$R5 = U_r/U_e$	Elasticidade da pele: relação da retração imediata com a distensão imediata, ou seja, considerando apenas os parâmetros da deformação elástica.
$R6 = U_v/U_e$	Elasticidade da pele: relação da distensão retardada com a distensão imediata.
$R7 = U_r/U_f$	Elasticidade da pele: relação da retração imediata com a distensão total, ou seja, habilidade da pele em retornar à sua posição inicial, após uma deformação.
$R8$	Área acima da curva, dada por U_f e pelo tempo de sucção.

5.4.1.4. Determinação do micro-relevo cutâneo

Neste estudo foi utilizado o equipamento *Visioscan*[®] VC 98, o qual permite a avaliação quali e quantitativa da superfície da pele nas condições fisiológicas, por meio de técnicas de profilometria óptica, as quais utilizam um processo de digitalização de imagem obtida por uma câmera de vídeo equipada com uma unidade que emite luz ultravioleta e capta uma imagem da pele digitalizada 256 níveis de cinza, ponto a ponto, onde 0 equivale ao preto

e 255 ao branco (Figura 8). O programa fornece um histograma que apresenta uma distribuição de diferentes níveis de cinza, quantificando os pontos escuros, que correspondem à rugosidade e pontos claros correspondentes aos platôs do micro-relevo cutâneo. Com este método são avaliados os seguintes parâmetros relacionados à superfície da pele: rugosidade (Se_r) - porção de pontos escuros que representam as rugas; Se_w - número e largura das rugas, sendo que quanto maior número de rugas maior é este valor; Se_{sm} refere-se à forma e largura das rugas, sendo que quanto maior o valor dessa variável melhor a textura e maciez da pele (Figura 9). Avalia-se ainda o parâmetro R_t (rugosidade) (Figura 10), relacionado à profundidade das rugas (FISCHER; WIGGER-ALBERTI; JACOBI et al., 2004).

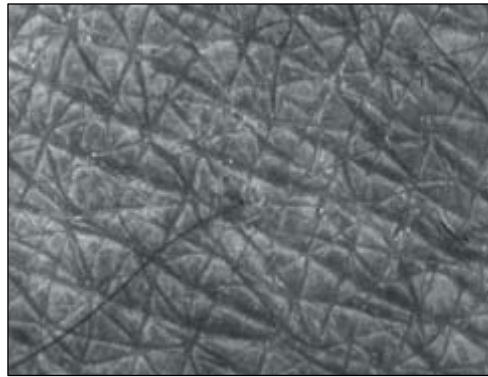


Figura 8. Imagem digitalizada da pele obtida pelo equipamento *Visioscan*[®] VC 98.

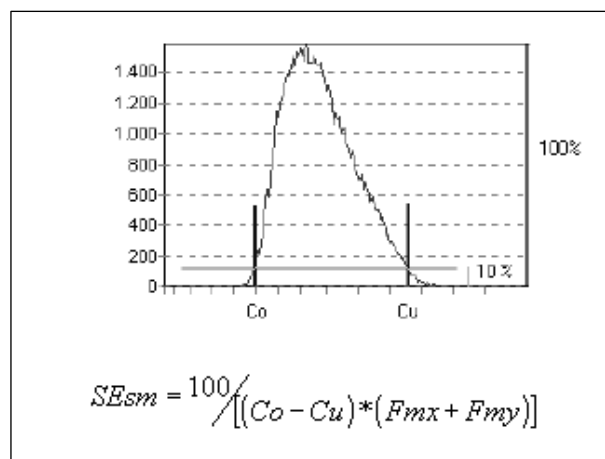


Figura 9. Cálculo do parâmetro Se_{sm} (média da largura das rugas), onde Co, Cu = limites de Se_{sm} como a porcentagem do máximo do histograma e Fm = média da largura das rugas nas direções vertical e horizontal.

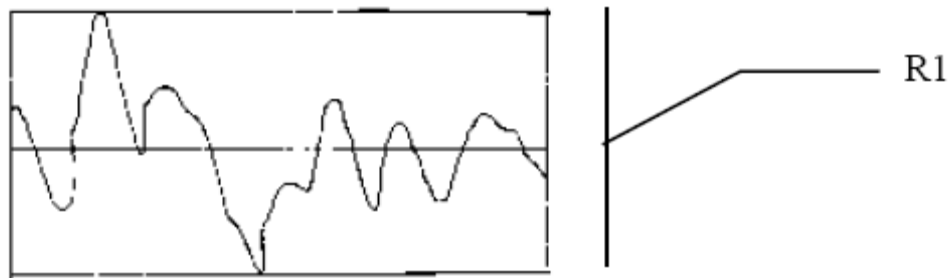


Figura 10. Cálculo do parâmetro R_t , distância entre o valor mais alto (pico) e o mais baixo (vale).

5.4.2. Avaliação dos efeitos imediatos das formulações após uma única aplicação

A avaliação dos efeitos das formulações após uma única aplicação foi efetuada na porção anterior dos antebraços, região ventral (BEITNER, 2003; ROBERT; ROBERT; ROBERT, 2003) de 10 voluntárias previamente selecionadas.

As voluntárias foram mantidas em um ambiente com temperatura ($22 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e umidade relativa controladas ($62 \pm 4\%$) durante a execução dos testes. Após elas terem permanecido 30 minutos em repouso com os braços descobertos para aclimação da pele, foram realizadas medidas basais do conteúdo aquoso do estrato córneo, da perda transepidérmica de água, das propriedades viscoelásticas da pele e do micro-relevo cutâneo nas regiões citadas.

Em seguida, foi aplicado aleatoriamente 0,2 grama das formulações acrescidas de DMAE e/ou acetil hexapeptídeo-3 e do veículo nas regiões em estudo, sendo que uma das regiões foi reservada para controle, ou seja, nenhuma formulação foi aplicada. Após duas horas da aplicação única foram realizadas novas medidas.

5.4.3. Avaliação dos efeitos das formulações a longo prazo

As voluntárias foram submetidas aos testes após permanecerem no mínimo duas semanas sem usar produtos cosméticos nas regiões a serem avaliadas, sendo que tais avaliações foram iniciadas a partir de 30 minutos de aclimação em ambiente com temperatura e umidade relativa do ar controlados ($20 - 22^\circ\text{C}$ e $45 - 55\%$ respectivamente).

As formulações objeto de estudo foram aplicadas diariamente nas regiões anteriores dos antebraços direito e esquerdo (HUMBERT et al., 2003) e em toda a face por um período

de 28 dias, sendo que antes da aplicação destas, foram realizadas medidas basais dos parâmetros a serem avaliados.

O experimento foi realizado com 40 voluntárias, as quais foram divididas em 4 grupos:

- Grupo 1: aplicação do veículo (F4), no antebraço esquerdo e na face, e do veículo acrescido de DMAE (F4D) no antebraço direito.
- Grupo 2: aplicação de F4D no antebraço esquerdo e na face e F4 no antebraço direito.
- Grupo 3: aplicação do veículo acrescido de acetil hexapeptídeo-3 (F4A), no antebraço esquerdo e na face, e do veículo acrescido de acetil hexapeptídeo-3 e DMAE (F4AD) no antebraço direito.
- Grupo 4: aplicação de F4AD no antebraço esquerdo e na face e de F4A no antebraço direito.

A fim de evitar erros durante a aplicação, as voluntárias foram instruídas adequadamente em termos de quantidade a ser aplicada e em relação à aplicação de cada formulação na sua região específica. As regiões foram avaliadas inicialmente (valores basais) e após um período de 14 e 28 dias da aplicação das formulações quanto aos seguintes parâmetros: conteúdo aquoso do estrato córneo, propriedades mecânicas da pele (características anisotrópicas e viscoelásticas) e micro-relevo cutâneo, de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

5.5. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos para a análise sensorial e para a avaliação da eficácia foram submetidos à análise estatística, tendo sido realizados testes preliminares de normalidade da distribuição e de homogeneidade das variâncias envolvidas no experimento para se verificar se a distribuição amostral analisada era normal ou não. Se as amostras fossem homogêneas seriam empregados testes paramétricos (distribuição normal), ou, então, testes não-paramétricos para distribuição de frequências que não se aproximassem da normal matemática.

Os testes estatísticos acima referidos foram realizados por meio de software estatístico elaborado por MAIA CAMPOS (1999).

6 Resultados

6.1. Desenvolvimento das formulações

6.1.1. Determinação do pH

Os valores de pH obtidos inicialmente para as formulações em desenvolvimento encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de pH das formulações

Formulações	pH			
	Veículo	Formulação com acetil hexapeptídeo-3	Formulação com DMAE	Formulação com acetil hexapeptídeo-3 e DMAE
1	6,76	6,78	6,65	6,65
2	6,55	6,50	6,56	6,53
3	6,85	6,88	6,85	6,89
4	6,50	6,63	6,46	6,50

6.1.2. Testes preliminares de estabilidade

6.1.2.1. Centrifugação

A formulação 2 que continha DMAE e também a que continha a associação de DMAE e acetil hexapeptídeo-3 foram consideradas instáveis no teste de centrifugação, pois apresentaram separação de fases. Já as formulações 1, 3 e 4 não apresentaram separação de fases, independente da presença das substâncias ativas, assim, foram consideradas estáveis frente a este teste de estabilidade.

6.1.2.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas

As formulações consideradas estáveis (1, 3 e 4) frente ao teste de centrifugação, foram então submetidas ao teste de estabilidade por determinação das características macroscópicas e organolépticas.

Após sete dias de estudo, as amostras da formulação 3, contendo ou não as substâncias ativas, apresentaram separação de fases quando submetidas a 45°C, mostrando-se, portanto, instáveis frente a este teste de estabilidade.

Por outro lado, as formulações 1 e 4 foram consideradas estáveis em relação às características macroscópicas e organolépticas, quando submetidas a estresse térmico por 7 dias, pois não apresentaram separação de fases ou ressecamento da superfície. Essas formulações foram então submetidas aos testes de estabilidade acelerada, cujos resultados estão descritos no item a seguir.

6.1.3. Estudo de estabilidade acelerada

6.1.3.1. Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico

O comportamento reológico das formulações estudadas pode ser avaliado por meio da análise dos reogramas (Figuras 11 a 18), dos valores de índice de fluxo (Tabela 6), de viscosidade aparente mínima (Tabela 7), do índice de consistência (Tabela 8) e da área de histerese (Tabela 9), obtidos ao longo do período de estudo.

A análise dos reogramas e dos valores de índice de fluxo permitiu verificar que as formulações apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, os valores de viscosidade diminuíram com o aumento da tensão de cisalhamento, apresentando assim valores de índice de fluxo menores que 1. Durante o período de estudo, os reogramas de todas as formulações estudadas apresentaram praticamente o mesmo perfil que foi obtido no tempo inicial, não ocorrendo alterações significativas, tais como picos de instabilidade ou comportamento antitixotrópico.

Pode-se observar que a formulação 1 apresentou um leve aumento do índice de fluxo com a presença das substâncias ativas, principalmente com a adição de DMAE e que o contrário aconteceu com a formulação 4 que apresentou uma tendência de diminuição desse parâmetro ao ser adicionada das substâncias ativas, ou seja, ocorreu um aumento da pseudoplastia do sistema.

Os valores de viscosidade aparente mínima e do índice de consistência apresentados pela formulação 4 acrescida ou não das substâncias ativas foram superiores, em relação aos

apresentados pela formulação 1, não tendo ocorrido alterações significativas nesse parâmetro durante o período de estudo.

A análise dos reogramas e dos valores de viscosidade aparente mínima permitiu observar que a formulação 1 quando adicionada das substâncias ativas sofreu uma leve queda nos valores de viscosidade. Por outro lado, a formulação 4 apresentou leve aumento da viscosidade quando adicionada apenas de acetil hexapeptídeo-3 e leve diminuição desse parâmetro quando adicionada de DMAE ou da associação das duas substâncias ativas, com exceção da formulação contendo DMAE, armazenada 28 dias no ambiente.

Em relação ao índice de consistência, pode-se observar também que, da mesma forma como ocorreu com a viscosidade, para a formulação 1 houve diminuição desse parâmetro quando as substâncias ativas estavam presentes. Já a formulação 4 apresentou aumento do índice de consistência quando acrescida de acetil hexapeptídeo-3 ou DMAE e diminuição deste índice quando as duas substâncias ativas estavam associadas.

Em relação aos valores de área de histerese, ou seja a tixotropia, verificou-se que a formulação 4, contendo ou não as substâncias ativas, apresentou maiores valores que a formulação 1, sendo que essa última apresentou valores ainda mais baixos para esse parâmetro quando adicionada de DMAE em todas as condições analisadas. Já a formulação 4 apresentou aumento de tixotropia quando adicionada das substâncias ativas tanto no tempo inicial como após 28 dias nas diferentes condições de armazenamento.

Por fim, a partir da análise reológica, todas as formulações podem ser consideradas estáveis, pois não apresentaram alterações significativas nos parâmetros avaliados, quando acrescidas ou não de acetil hexapeptídeo-3 ou de DMAE, após 28 dias nas diferentes condições de armazenamento.

Dessa forma, essas formulações foram submetidas à análise sensorial, cujos resultados estão descritos no próximo item, com o objetivo de se determinar a formulação mais adequada para aplicação na pele e, portanto, para a avaliação clínica da segurança e da eficácia.

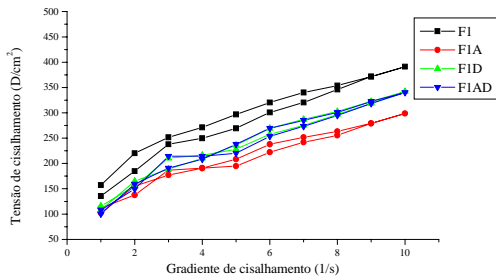


Figura 11: Formulação 1 acrescida (F1A, F1D e F1AD) ou não (F1) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, à temperatura ambiente no tempo inicial.

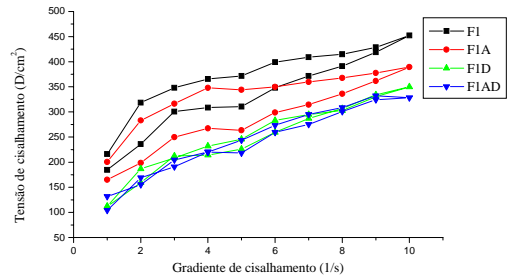


Figura 12: Formulação 1 acrescida (F1A, F1D e F1AD) ou não (F1) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, à temperatura ambiente no tempo 28 dias.

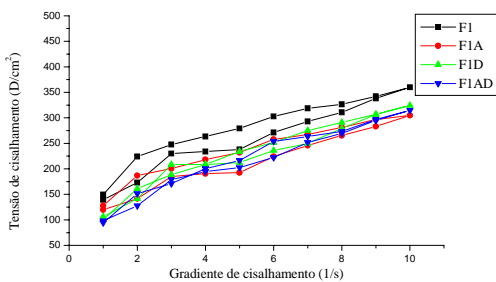


Figura 13: Formulação 1 acrescida (F1A, F1D e F1AD) ou não (F1) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, a 37°C no tempo 28 dias

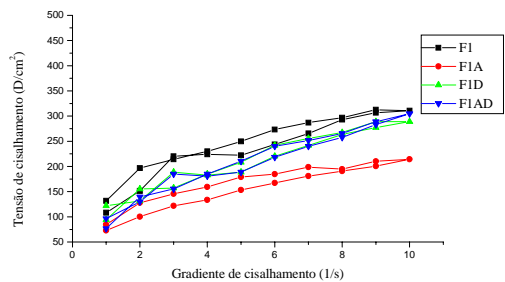


Figura 14: Formulação 1 acrescida (F1A, F1D e F1AD) ou não (F1) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, a 45°C no tempo 28 dias

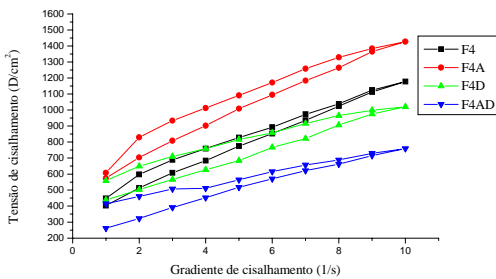


Figura 15: Formulação 4 acrescida (F4A, F4D e F4AD) ou não (F4) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, à temperatura ambiente no tempo inicial.

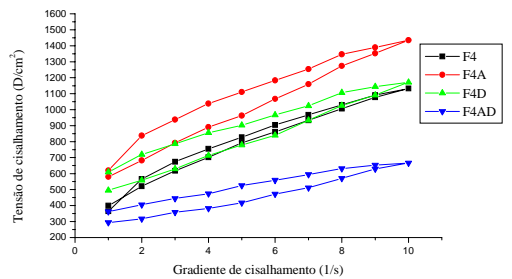


Figura 16: Formulação 4 acrescida (F4A, F4D e F4AD) ou não (F4) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, à temperatura ambiente no tempo 28 dias.

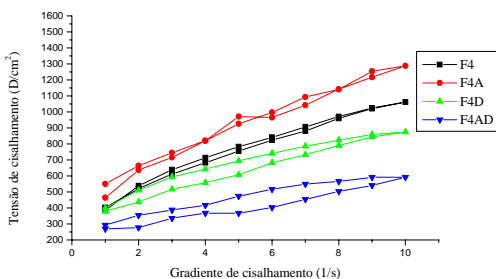


Figura 17: Formulação 4 acrescida (F4A, F4D e F4AD) ou não (F4) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, a 37°C no tempo 28 dias

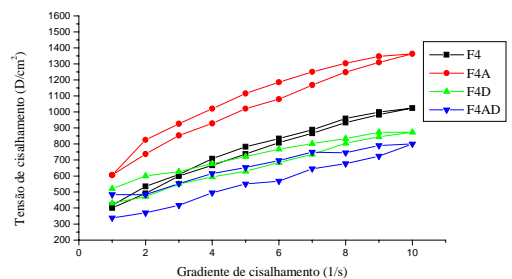


Figura 18: Formulação 4 acrescida (F4A, F4D e F4AD) ou não (F4) de acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, a 45°C no tempo 28 dias.

Tabela 6 - Valores do índice de fluxo inicial das formulações estudadas com (F1A, F1D, F1AD, F4A, F4D e F4AD) ou sem (F1 e F4) acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, e do índice de fluxo quando submetidas à temperatura ambiente, 37 e 45°C por 28 dias.

Formulação	Índice de Fluxo			
	Inicial	28 dias		
		Ambiente	37°C	45°C
F1	0,41	0,32	0,37	0,41
F1A	0,43	0,31	0,38	0,43
F1D	0,47	0,47	0,47	0,44
F1AD	0,49	0,46	0,50	0,52
F4	0,44	0,47	0,43	0,41
F4A	0,38	0,38	0,41	0,35
F4D	0,32	0,33	0,36	0,28
F4AD	0,37	0,32	0,33	0,31

Tabela 7 - Valores da viscosidade aparente mínima (cP) inicial das formulações estudadas com (F1A, F1D, F1AD, F4A, F4D e F4AD) ou sem (F1 e F4) acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, e da viscosidade aparente mínima quando submetidas à temperatura ambiente, 37 e 45°C por 28 dias. Valores calculados no ponto máximo do gradiente de cisalhamento.

Formulação	Viscosidade Aparente Mínima (cP)			
	Inicial	28 dias		
		Ambiente	37°C	45°C
F1	3912	4522	3598	3106
F1A	2988	3893	3047	2143
F1D	3421	3499	3244	2890
F1AD	3401	3283	3146	3047
F4	11776	11324	10616	10243
F4A	14273	14352	12877	13624
F4D	10204	11717	8749	8729
F4AD	7589	6665	5918	8002

Tabela 8 - Valores do índice de consistência inicial das formulações estudadas com (F1A, F1D, F1AD, F4A, F4D e F4AD) ou sem (F1 e F4) acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, e do índice de consistência quando submetidas à temperatura ambiente, 37 e 45°C por 28 dias.

Formulação	Índice de Consistência			
	Inicial	28 dias		
		Ambiente	37°C	45°C
F1	14891	14913	14873	12671
F1A	10788	7483	12340	8144
F1D	11380	11623	10751	10510
F1AD	10789	10119	9766	8963
F4	40848	38964	39077	39440
F4A	57991	61552	48791	60419
F4D	46429	50536	39555	44800
F4AD	30696	38019	25909	36574

Tabela 9 - Valores da área de histerese inicial das formulações estudadas com (F1A, F1D, F1AD, F4A, F4D e F4AD) ou sem (F1 e F4) acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, e da área de histerese quando submetidas à temperatura ambiente, 37 e 45°C por 28 dias.

Formulação	Área de histerese (dina/cm ² .s)			
	Inicial	28 dias		
		Ambiente	37°C	45°C
F1	156	385	221	145
F1A	50	474	216	157
F1D	20	85	72	51
F1AD	31	61	83	43
F4	418	287	154	236
F4A	697	936	173	629
F4D	880	993	492	631
F4AD	556	664	617	912

6.1.3.2. Determinação das características macroscópicas e organolépticas

As formulações 1 e 4 contendo ou não acetil hexapeptídeo e/ou DMAE não apresentaram alterações quanto às suas características macroscópicas e organolépticas após serem submetidas 28 dias às diferentes condições de temperatura.

6.1.3.3. Centrifugação

As formulações 1 e 4 contendo ou não as substância ativas objeto de estudo não apresentaram separação de fases no teste de centrifugação, ou seja, foram consideradas estáveis frente a este teste de estabilidade.

6.1.3.4. Determinação do pH

Os valores iniciais de pH das formulações em estudo e os obtidos após 28 dias de armazenamento nas temperaturas ambiente, 37 e 45°C estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores do pH inicial das formulações estudadas com (F1A, F1D, F1AD, F4A, F4D e F4AD) ou sem (F1 e F4) acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE, e do pH das formulações quando submetidas à temperatura ambiente, 37 e 45°C por 28 dias.

Formulação	pH			
	Inicial	28 dias		
		Ambiente	37°C	45°C
F1	6,81	6,83	6,72	6,65
F1A	6,80	6,79	6,73	6,67
F1D	6,62	6,64	6,58	6,52
F1AD	6,64	6,66	6,61	6,51
F4	6,65	6,64	6,80	6,82
F4A	6,75	6,71	6,66	6,69
F4D	6,55	6,58	6,50	6,57
F4AD	6,50	6,52	6,50	6,53

6.2. Análise sensorial das formulações estáveis

As formulações 1 e 4, acrescidas ou não das substâncias ativas, por terem sido consideradas estáveis frente ao estudo de estabilidade acelerado, foram submetidas à análise sensorial para verificar qual delas seria mais indicada para ser utilizada nos estudos de avaliação de segurança e eficácia. Dessa forma, as notas atribuídas, a cada formulação estudada, para os parâmetros: toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após cinco minutos da aplicação, estão apresentadas no Apêndice A.

6.2.1. Estudo estatístico dos resultados obtidos

Os dados experimentais referentes à análise dos parâmetros: toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após cinco minutos consistiram em 40 valores correspondentes a 2 formulações x 20 repetições, dando o produto fatorial $2 \times 20 = 40$. Cumpre destacar que a análise estatística foi realizada comparando-se as formulações duas a duas, da mesma forma como feito durante a avaliação pelas voluntárias. Assim F1 foi comparada a F4; F1A a F4A; F1D a F4D e F1AD a F4AD.

Testes estatísticos preliminares foram realizados, com a finalidade de verificar a normalidade e a homogeneidade da distribuição amostral, a fim de decidir sobre que tipos de testes deveriam ser empregados (paramétricos ou não paramétricos). O teste realizado com os dados originais não acusou alta probabilidade da distribuição ser normal, por isso, para uma melhor interpretação dos resultados obtidos, foi selecionado um teste não paramétrico, para dados vinculados, específico para a comparação de duas amostras entre si, o teste de Wilcoxon.

6.2.1.1. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1 e F4

Os resultados do teste de Wilcoxon obtidos para as formulações F1 e F4 em relação aos parâmetros toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após cinco minutos estão apresentados nas Tabelas 11 a 14.

Tabela 11 – Toque e pegajosidade das formulações F1 e F4 – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	1,73
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	4,1614 %
• em testes bicaudais	8,3228 %
Significativo	$p < 0,05$

Tabela 12 – Espalhabilidade e aparência na pele das formulações F1 e F4 – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	1,16
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	12,2737 %
• em testes bicaudais	24,5474 %
Não significativo	$p > 0,05$

Tabela 13 – Sensação imediata das formulações F1 e F4 – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	0,35
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	36,2047 %
• em testes bicaudais	72,4094 %
Não significativo	$p > 0,05$

Tabela 14 – Sensação após cinco minutos das formulações F1 e F4 – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	0,53
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	29,6989 %
• em testes bicaudais	59,3978 %
Não significativo	$p > 0,05$

A análise estatística demonstrou que as formulações F1 e F4 diferiram apenas em relação ao toque e pegajosidade na pele, sendo que F4 apresentou maiores notas, ou seja, foi considerada mais agradável ao uso em relação a esse parâmetro ($p < 0,05$). A Figura 19 apresenta a média e o intervalo de confiança obtidos para cada parâmetro analisado.

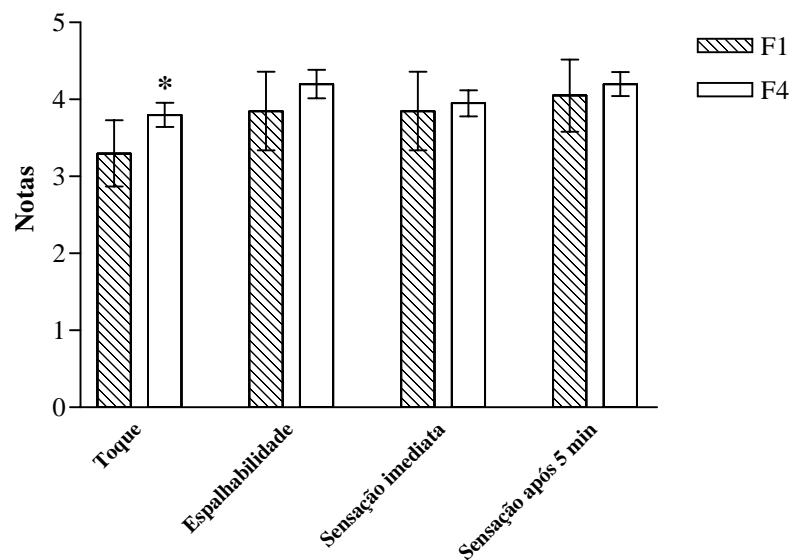


Figura 19. Notas atribuídas às formulações F1 e F4 em relação aos parâmetros toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após 5 minutos da aplicação.

6.2.1.2. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1A e F4A

Os resultados do teste de Wilcoxon obtidos para as formulações F1A e F4A, ou seja, que continham acetil hexapeptídeo-3, em relação aos parâmetros sensoriais avaliados estão apresentados nas Tabelas 15 a 18.

Tabela 15 – Toque e pegajosidade das formulações F1A e F4A – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	3,12
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	0,0897 %
• em testes bicaudais	0,1794 %
Significativo	$p < 0,01$

Tabela 16 – Espalhabilidade e aparência na pele das formulações F1A e F4A – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	1,96
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	2,5238 %
• em testes bicaudais	5,0476 %
Significativo	$p < 0,05$

Tabela 17 – Sensação imediata das formulações F1A e F4A – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	0,03
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	48,7474 %
• em testes bicaudais	97,4948 %
Não significativo	$p > 0,05$

Tabela 18 – Sensação após cinco minutos das formulações F1A e F4A – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	1,01
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	15,5441 %
• em testes bicaudais	31,0882 %
Não significativo	$p > 0,05$

O teste de Wilcoxon demonstrou que a formulação F4A apresentou notas estatisticamente maiores quando comparada à formulação F1A em relação aos parâmetros toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele ($p < 0,05$). A Figura 20 mostra a média e o intervalo de confiança obtidos para cada parâmetro analisado.

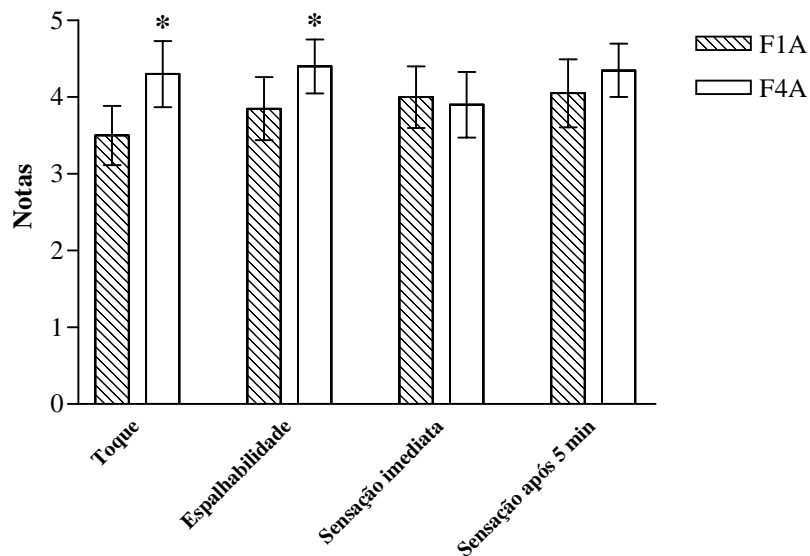


Figura 20. Notas atribuídas às formulações F1A e F4A em relação aos parâmetros toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após 5 minutos da aplicação.

6.2.1.3. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1D e F4D

Os resultados do teste de Wilcoxon obtidos para as formulações F1D e F4D, ou seja, que continham DMAE, em relação aos parâmetros sensoriais avaliados estão apresentados nas Tabelas 19 a 22.

Tabela 19 – Toque e pegajosidade das formulações F1D e F4D – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	3,29
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	0,0504 %
• em testes bicaudais	0,1008 %
Significativo	p<0,01

Tabela 20 – Espalhabilidade e aparência na pele das formulações F1D e F4D – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	2,50
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	0,6268 %
• em testes bicaudais	1,2536 %
Significativo	p<0,01

Tabela 21 – Sensação imediata das formulações F1D e F4D – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	2,24
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	1,2676 %
• em testes bicaudais	2,5352 %
Significativo	p<0,05

Tabela 22 – Sensação após cinco minutos das formulações F1D e F4D – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	2,35
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	0,9328 %
• em testes bicaudais	1,8656 %
Significativo	p<0,01

A análise estatística possibilitou verificar que a formulação F4D apresentou notas estatisticamente maiores do que F1D em relação a todos os parâmetros analisados ($p<0,05$). A Figura 21 apresenta as médias dos valores obtidos e o intervalo de confiança para cada parâmetro avaliado.

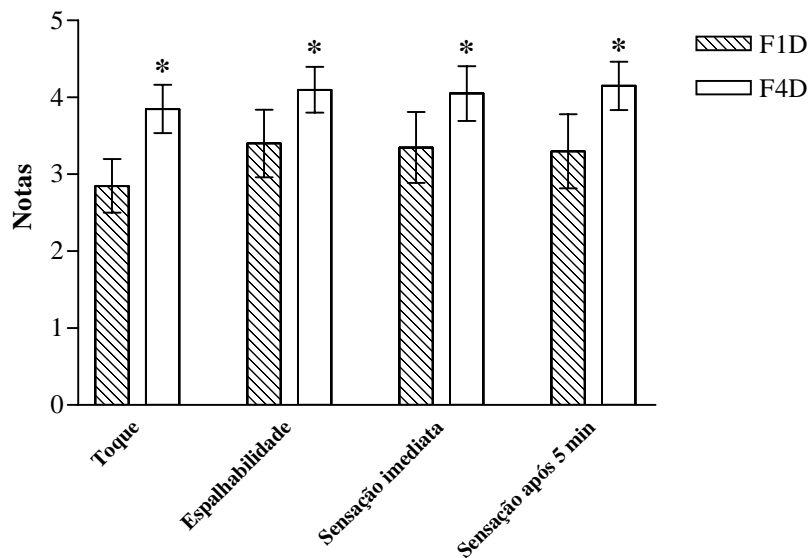


Figura 21. Notas atribuídas às formulações F1D e F4D em relação aos parâmetros toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após 5 minutos da aplicação.

6.2.1.4. Estudo estatístico dos resultados obtidos para as formulações F1AD e F4AD

Os resultados do teste de Wilcoxon obtidos para as formulações F1AD e F4AD, ou seja, que continham acetil hexapeptídeo-3 e DMAE, em relação aos parâmetros sensoriais avaliados estão apresentados nas Tabelas 23 a 26.

Tabela 23 – Toque e pegajosidade das formulações F1AD e F4AD – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	3,08
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	0,1053 %
• em testes bicaudais	0,2106 %
Significativo	p<0,01

Tabela 24 – Espalhabilidade e aparência na pele das formulações F1AD e F4AD – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	3,41
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	0,0329 %
• em testes bicaudais	0,0658 %
Significativo	p<0,01

Tabela 25 – Sensação imediata das formulações F1AD e F4AD – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	1,57
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	5,8273 %
• em testes bicaudais	11,6546 %
Não significativo	p>0,05

Tabela 26 – Sensação após cinco minutos das formulações F1AD e F4AD – Teste de Wilcoxon

Parâmetros calculados	Valores
Valor de z calculado pelo teste	2,04
Probabilidades de Ho para esse valor de z	
• em testes monocaudais	2,0755 %
• em testes bicaudais	4,1510 %
Significativo	$p < 0,05$

A análise estatística demonstrou que a formulação F4AD apresentou notas estatisticamente superiores em relação à F1AD para os parâmetros: toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele e sensação após 5 minutos ($p < 0,05$). A Figura 22 mostra o gráfico das médias dos valores obtidos nessa análise, bem como o intervalo de confiança.

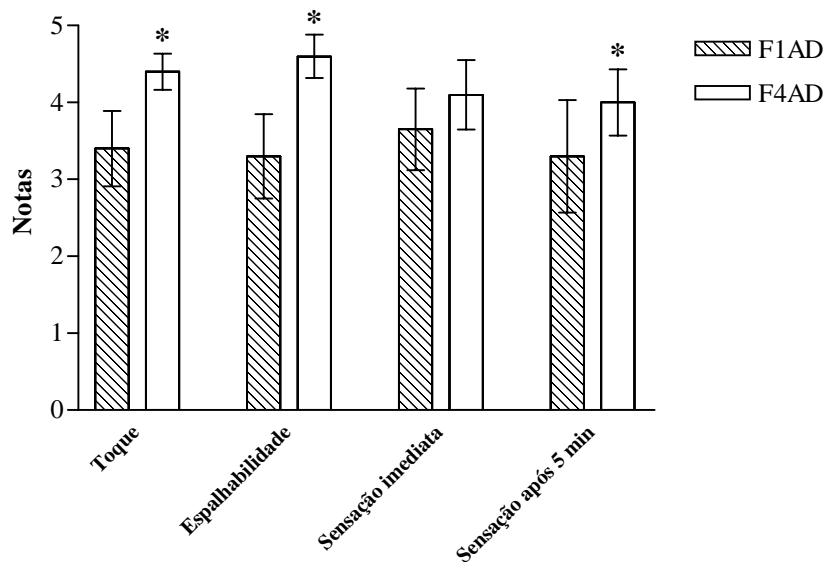


Figura 22. Notas atribuídas às formulações F1AD e F4AD em relação aos parâmetros toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após 5 minutos da aplicação.

6.4. Avaliação da eficácia das formulações por técnicas de biofísica e imagem da pele

6.4.1. Avaliação dos efeitos imediatos das formulações após uma única aplicação

6.4.1.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, da perda transepidérmica de água, das propriedades viscoelásticas da pele e do micro-relevo cutâneo

Os valores referentes à determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo (Apêndice B), da perda transepidérmica de água (Apêndice C), das propriedades viscoelásticas da pele (Apêndice D) e do micro-relevo cutâneo (Apêndice E), obtidos no início do experimento (valores basais) e após 2 horas da aplicação única das formulações estudadas nos antebraços das voluntárias, foram submetidos à análise estatística descrita a seguir.

6.4.1.2. Estudo estatístico dos resultados obtidos

Os dados experimentais deste trabalho consistiram em 100 valores, correspondentes, às diferentes variáveis estudadas na pele, para os dois fatores de variação (formulações e tempo decorrido após aplicação). Esses valores provieram do cruzamento de 4 formulações (veículo, veículo + acetil hexapeptídeo-3, veículo + DMAE, veículo + acetil hexapeptídeo-3 + DMAE) e uma região sem tratamento, x 2 tempos (inicial e 2 horas) x 10 repetições, dando o produto fatorial $5 \times 2 \times 10 = 100$.

Testes estatísticos preliminares foram realizados, com a finalidade de verificar a normalidade e a homogeneidade da distribuição amostral, a fim de decidir sobre que tipos de testes deveriam ser empregados (paramétricos ou não paramétricos).

Os resultados destes testes preliminares indicaram que as amostras testadas apresentaram-se homogêneas e a distribuição de frequências se aproximava da distribuição de frequências da curva normal matemática, com exceção do parâmetro U_v/U_e (relação da distensão retardada pela distensão imediata) obtido a partir da análise das propriedades viscoelásticas da pele, para o qual foi necessária a transformação logarítmica dos dados, a fim de normalizar a distribuição. Essa transformação foi efetuada segundo a equação $y' = \log [y]$.

O teste paramétrico que melhor se adaptou ao modelo experimental foi a Análise de Variância, utilizada para dados vinculados e para a comparação de mais de duas amostras entre si.

6.4.1.2.1. Conteúdo aquoso do estrato córneo

O resultado da análise estatística referente ao conteúdo aquoso do estrato córneo encontra-se na Tabela 28.

Tabela 28 – Conteúdo aquoso do estrato córneo dos antebraços das voluntárias após aplicação única das formulações objeto de estudo - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	400,3813	4	100,0953	1,14	35,1628 %
Resíduo I	3963,9937	45	88,0887		
Entre Tempos (T)	1395,7163	1	1395,7163	64,47	0,0001 %
Interação F x T	344,3087	4	86,0772	3,98	0,7756 %
Resíduo II	974,2407	45	21,6498		
Variação total	7078,6406	99			

A interação entre os fatores de variação formulações e tempos mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,01$), ou seja, as formulações comportaram-se de maneira diferente em função dos diferentes tempos (inicial e 2 horas).

Foi realizado, a fim de se comparar quais médias eram diferentes entre si, o teste de Tukey (Tabela 29), cujos resultados são melhor visualizados quando representados em gráficos tipo colunas agrupadas. A Figura 23 apresenta o gráfico referente a esta interação, ou seja, o comportamento das formulações em função dos tempos de aplicação (média e intervalo de confiança).

Pode ser observado que, após 2 horas da aplicação, o veículo e as formulações contendo acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE provocaram um aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo em relação aos valores basais.

Tabela 29 – Teste de Tukey – Conteúdo aquoso do estrato córneo – Fatores de variação: formulações e tempos.

Tempo	Tratamento	Média	Valor crítico de Tukey 5%
Inicial	Controle	42,38000	7,28202
	F4	43,41000	
	F4A	42,34000	
	F4D	43,02000	
	F4AD	40,90000	
2 horas	Controle	42,83000	
	F4	52,19000	
	F4A	53,75000	
	F4D	50,77000	
	F4AD	49,87000	

F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

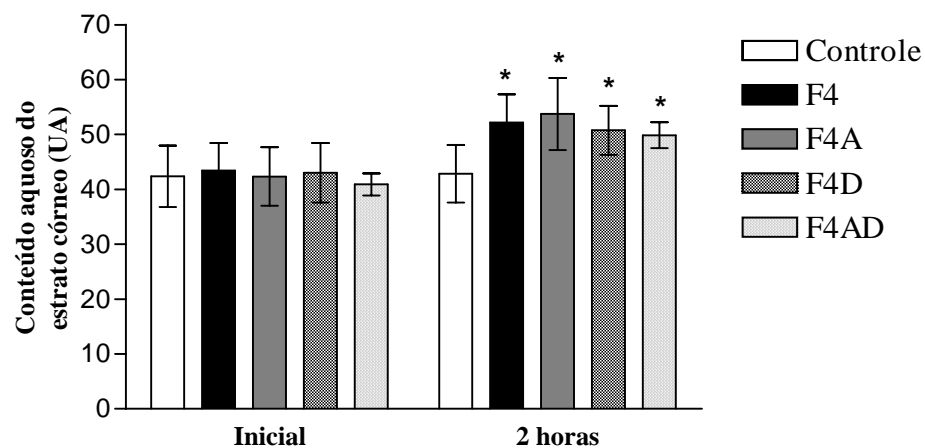


Figura 23. Conteúdo aquoso do estrato córneo antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

* Significativo em relação ao tempo inicial ($p < 0,01$)

6.4.1.2.2. Perda transepidérmica de água

O resultado da análise estatística obtido para a perda transepidérmica de água dos antebraços encontra-se na Tabela 30.

Tabela 30 – Perda transepidérmica de água dos antebraços das voluntárias após aplicação única das formulações objeto de estudo - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	6,4285	4	1,6071	0,84	49,2361 %
Resíduo I	85,8698	45	1,9082		
Entre Tempos (T)	26,6155	1	26,6155	67,03	0,0001 %
Interação F x T	5,2400	4	1,3100	3,30	1,8532 %
Resíduo II	17,8686	45	0,3971		
Variação total	142,0223	99			

A interação entre os fatores de variação formulações e tempos mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,1$), ou seja, as formulações comportaram-se de maneira diferente em função dos diferentes tempos (inicial e 2 horas).

A seguir, foi realizado o teste de Tukey (Tabela 31) através do qual observou-se que apenas as regiões dos antebraços das voluntárias que receberam o tratamento com as formulações que continham acetil hexapeptídeo-3 e/ou DMAE apresentaram uma diminuição da perda transepidérmica de água após 2 horas, em relação aos valores basais. Esses resultados podem ser melhor visualizados na Figura 24 (média e intervalo de confiança).

Tabela 31 – Teste de Tukey – Perda transepidermica de água – Fatores de variação: formulações e tempos.

Tempo	Tratamento	Média	Valor crítico de Tukey 5%
Inicial	Controle	3,88	0,94007
	F4	3,70	
	F4A	3,85	
	F4D	4,17	
	F4AD	3,83	
2 horas	Controle	3,69	
	F4	2,80	
	F4A	2,51	
	F4D	2,92	
	F4AD	2,37	

F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

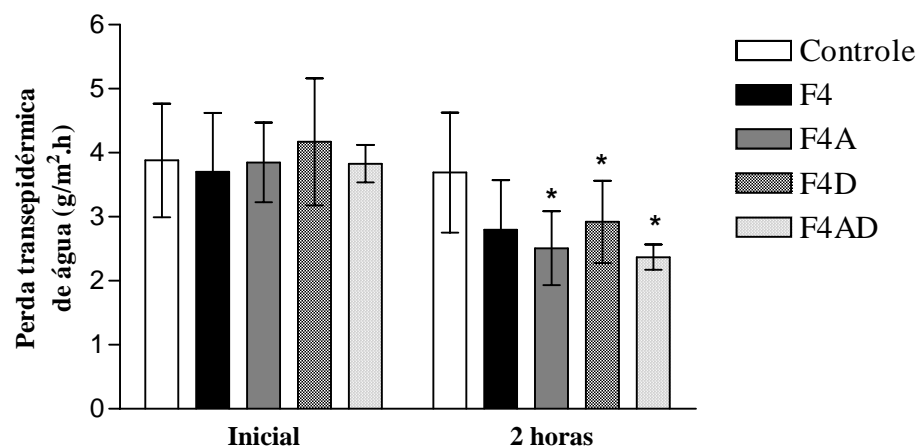


Figura 24. Perda transepidermica de água antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

* Significativo em relação ao tempo inicial ($p < 0,1$)

6.4.1.2.3. Propriedades viscoelásticas da pele

Os resultados da Análise de Variância referentes à viscoelasticidade da pele dos antebraços encontram-se nas Tabelas 32 a 35.

Tabela 32 – Elasticidade total da pele, relação da retração total com a distensão total (U_a/U_f), medida após aplicação única das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0148	4	0,0037	0,36	16,6544 %
Resíduo I	0,4563	45	0,0101		
Entre Tempos (T)	0,0186	1	0,0186	6,83	1,1728 %
Interação F x T	0,0055	4	0,0014	0,51	26,7920 %
Resíduo II	0,1224	45	0,0027		
Variação total	0,6176	99			

Tabela 33 – Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e), medida após aplicação única das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0176	4	0,0044	0,18	5,2585 %
Resíduo I	1,1247	45	0,0250		
Entre Tempos (T)	0,0079	1	0,0079	1,30	25,9773 %
Interação F x T	0,0056	4	0,0014	0,23	8,1660 %
Resíduo II	0,2741	45	0,0061		
Variação total	1,4299	99			

Tabela 34 – Elasticidade da pele, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e) medida após aplicação única das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância (Logarítmo dos dados)

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0262	4	0,0066	0,34	15,1097 %
Resíduo I	0,8632	45	0,0192		
Entre Tempos (T)	0,0000	1	0,0000	0,00	4,1129 %
Interação F x T	0,0250	4	0,0062	1,01	41,2379 %
Resíduo II	0,2774	45	0,0062		
Variação total	1,1918	99			

Tabela 35 – Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f), medida após aplicação única das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0082	4	0,0021	0,20	6,4613 %
Resíduo I	0,4631	45	0,0103		
Entre Tempos (T)	0,0021	1	0,0021	0,70	41,3429 %
Interação F x T	0,0082	4	0,0020	0,67	37,8237 %
Resíduo II	0,1378	45	0,0031		
Variação total	0,6194	99			

A Análise de Variância demonstrou que, após uma única aplicação, as formulações contendo ou não as substância ativas objeto de estudo não alteraram os parâmetros relacionados à viscoelasticidade da pele do antebraço das voluntárias ($p > 0,05$).

As Figuras 25 a 28 mostram as médias dos valores obtidos e o intervalo de confiança para cada região avaliada.

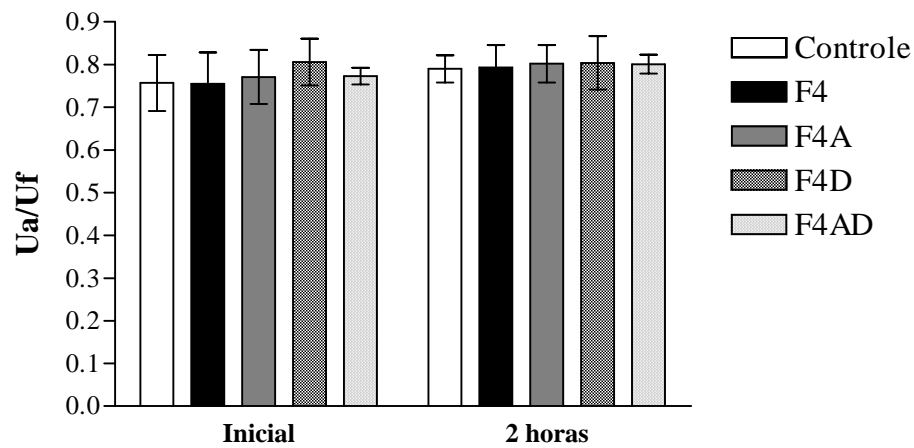


Figura 25. Elasticidade total da pele, relação da retração total com a distensão total (U_a/U_f), antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

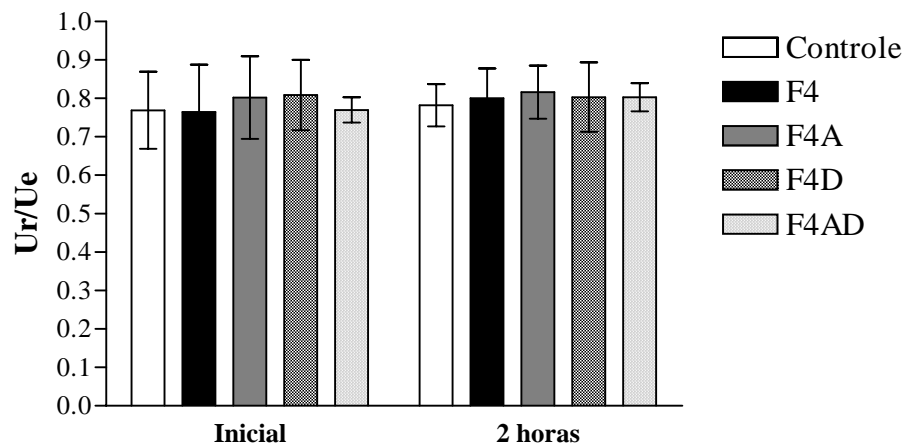


Figura 26. Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e), antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

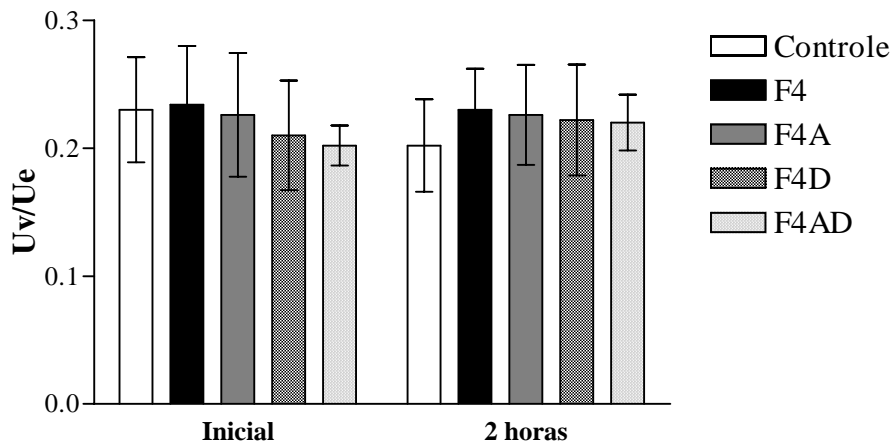


Figura 27. Elasticidade da pele, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e) antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

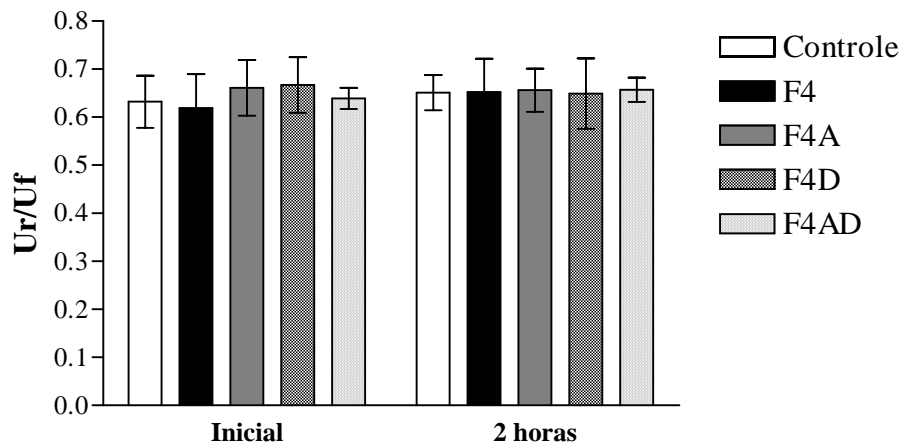


Figura 28. Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f) antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.1.2.4. Micro-relevo cutâneo

Os resultados da análise estatística obtidos para os valores do micro-relevo cutâneo estão apresentados nas Tabelas 36 a 39.

Tabela 36 – Aspereza da pele (Se_r) dos antebraços das voluntárias após aplicação única das formulações objeto de estudo - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,7097	4	0,1774	0,47	24,2820 %
Resíduo I	16,8480	45	0,3744		
Entre Tempos (T)	0,0828	1	0,0828	0,54	47,2220 %
Interação F x T	1,1102	4	0,2776	1,81	14,1673 %
Resíduo II	6,8818	45	0,1529		
Variação total	25,6326	99			

Tabela 37 – Textura da pele (Se_{sm}) dos antebraços das voluntárias após aplicação única das formulações objeto de estudo - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	215,8250	4	53,9562	0,27	10,2438 %
Resíduo I	9125,9717	45	202,7994		
Entre Tempos (T)	285,6850	1	285,6850	16,45	0,0400 %
Interação F x T	88,6775	4	22,1694	1,28	29,2655 %
Resíduo II	781,4502	45	17,3656		
Variação total	10497,6094	99			

Tabela 38 – Número de rugas da pele (Se_w) dos antebraços das voluntárias após aplicação única das formulações objeto de estudo - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	13,0313	4	3,2578	0,19	5,7608 %
Resíduo I	787,7188	45	17,5049		
Entre Tempos (T)	2,1137	1	2,1137	0,39	45,6434 %
Interação F x T	8,8363	4	2,2091	0,41	19,4443 %
Resíduo II	245,3000	45	5,4511		
Variação total	1057,0000	99			

Tabela 39 – Rugosidade da pele (R_t) dos antebraços das voluntárias após aplicação única das formulações objeto de estudo - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	84,5250	4	21,1313	0,12	2,7368 %
Resíduo I	8077,3501	45	179,4967		
Entre Tempos (T)	515,2750	1	515,2750	21,77	0,0113 %
Interação F x T	80,8750	4	20,2187	0,85	49,9412 %
Resíduo II	1065,3499	45	23,6744		
Varição total	9823,3750	99			

A análise estatística demonstrou que, após uma única aplicação, as formulações em estudo não provocaram alterações nos parâmetros relacionados ao micro-relevo cutâneo dos antebraços das voluntárias ($p > 0,05$).

As Figuras 29 a 32 mostram os gráficos das médias dos valores obtidos nessa análise, bem como o intervalo de confiança.

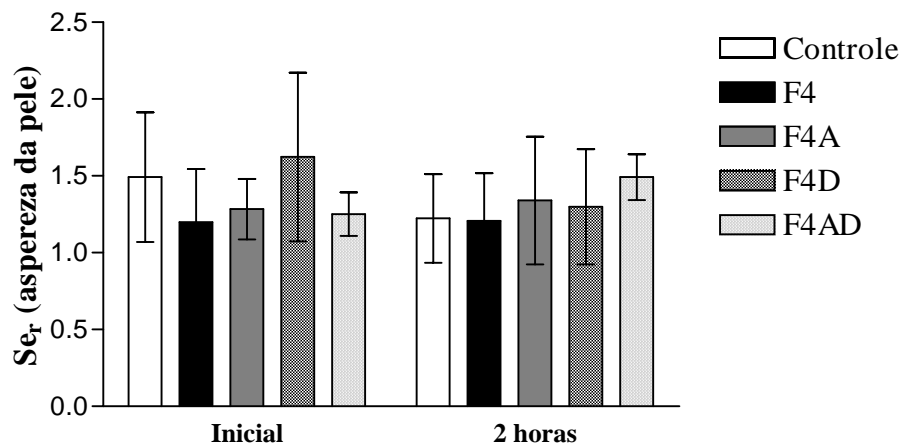


Figura 29. Aspereza da pele (Se_r) antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

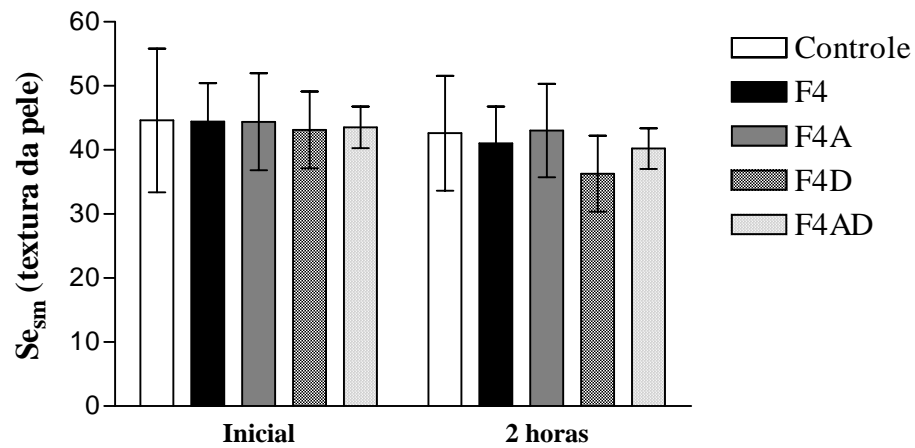


Figura 30. Textura da pele (Se_{sm}) antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

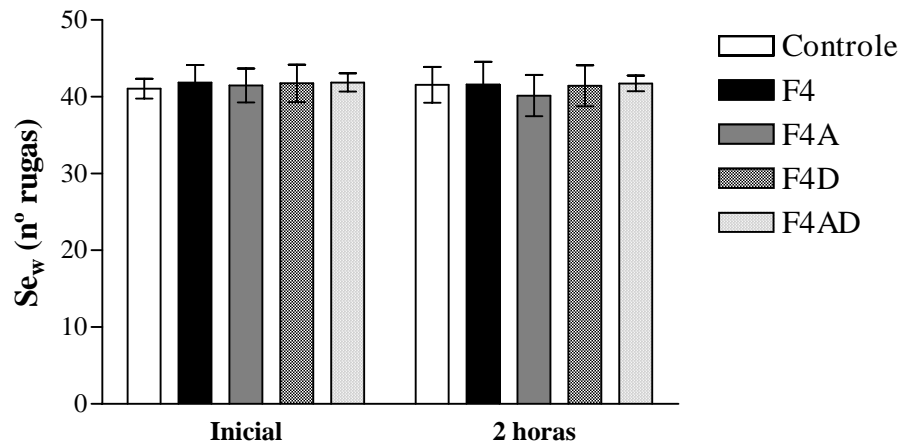


Figura 31. Número de rugas da pele (Se_w) antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

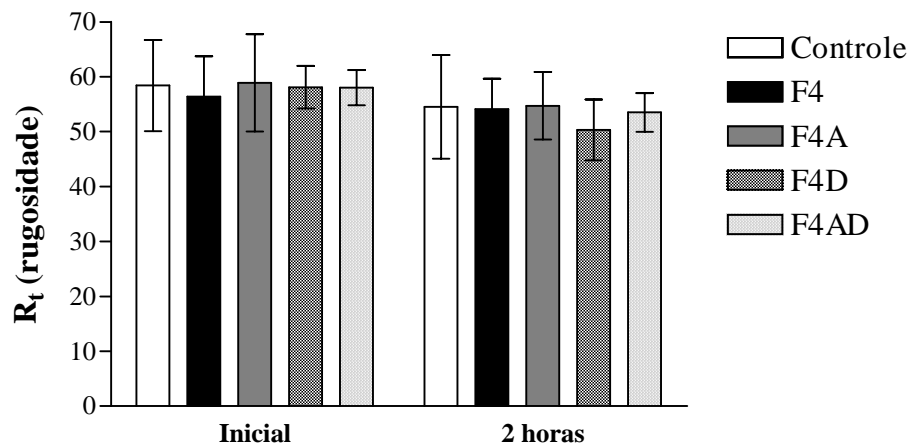


Figura 32. Rugosidade da pele (R_t) antes e após 2 horas da aplicação única das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.2. Avaliação dos efeitos das formulações a longo prazo

6.4.2.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, das propriedades mecânicas da pele e do micro-relevo cutâneo

Os resultados referentes à determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo (Apêndice F e G), das propriedades mecânicas da pele por análise das características anisotrópicas (Apêndice H e I) e viscoelásticas (Apêndice J e K) e do micro-relevo cutâneo (Apêndice L e M), obtidos no início do experimento (valores basais), bem como os obtidos nos tempos correspondentes a 2 e 4 semanas de uso das formulações nos antebraços e região da face foram submetidos à análise estatística descrita a seguir.

6.4.1.2. Estudo estatístico dos resultados obtidos

Testes estatísticos preliminares foram realizados, com a finalidade de verificar a normalidade e a homogeneidade da distribuição amostral, a fim de decidir sobre que tipos de testes deveriam ser empregados (paramétricos ou não paramétricos).

Os resultados destes testes preliminares indicaram que as amostras testadas apresentaram-se homogêneas e a distribuição de frequências se aproximava da distribuição de frequências da curva normal matemática, com exceção do parâmetro anisotropia da pele

($RRTM_{\text{máximo}} / RRTM_{\text{mínimo}}$) obtido a partir da análise das características anisotrópicas da pele, para o qual foi necessário utilizar o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, indicado para dados não vinculados e para a comparação de mais de duas amostras entre si.

Assim, os dados experimentais para a análise estatística consistiram de 240 valores, correspondentes ao cruzamento dos valores obtidos para as 4 formulações (veículo, veículo + acetil hexapeptídeo-3, veículo + DMAE, veículo + acetil hexapeptídeo-3 + DMAE), x 3 tempos (inicial, 2 e 4 semanas de tratamento) x 20 repetições, dando o produto fatorial $4 \times 3 \times 20 = 240$.

6.4.1.2.1. Conteúdo aquoso do estrato córneo dos antebraços

O resultado da Análise de Variância para o conteúdo aquoso do estrato córneo dos antebraços está apresentado na Tabela 40

Tabela 40 – Conteúdo aquoso do estrato córneo dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	68,4417	3	22,8139	0,16	7,6972 %
Resíduo I	10904,5996	76	143,4816		
Entre Tempos (T)	2531,9250	2	1265,9625	55,43	0,0000 %
Interação F x T	133,9083	6	22,3180	0,98	44,3551 %
Resíduo II	3471,2192	152	22,8370		
Variação total	17110,0938	239			

A interação entre os fatores de variação formulações e tempos, obtida na análise estatística, não acusou diferenças significativas entre os valores de conteúdo aquoso do estrato córneo obtidos no antebraço, após a aplicação diária das formulações em estudo ($p > 0,05$), o que pode ser visualizado na Figura 33 (média e intervalo de confiança).

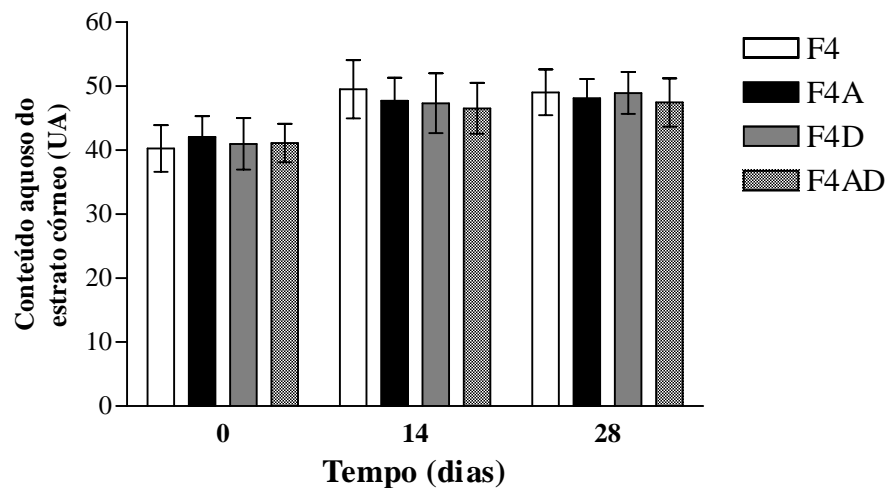


Figura 33. Conteúdo aquoso do estrato córneo antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.1.2.2. Conteúdo aquoso do estrato córneo da face

O resultado da análise estatística para o conteúdo aquoso do estrato córneo da face está apresentado na Tabela 41.

Tabela 41 – Conteúdo aquoso do estrato córneo da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	710,5458	3	236,8486	2,08	10,8556 %
Resíduo I	8654,8916	76	113,8801		
Entre Tempos (T)	2618,1626	2	1309,0813	75,41	0,0000 %
Interação F x T	226,0541	6	37,6757	2,17	4,8264 %
Resíduo II	2638,5959	152	17,3592		
Variação total	14848,250	239			

A interação entre os fatores de variação formulações e tempos, mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,1$), ou seja, as formulações comportaram-se de maneira diferente em função dos diferentes tempos (inicial, 14 e 28 dias).

Foi realizado, a fim de se comparar quais médias eram diferentes entre si, o teste de Tukey (Tabela 42), cujos resultados são melhor visualizados quando representados em gráficos tipo colunas agrupadas. A Figura 34 apresenta o gráfico referente a esta interação, ou seja, o comportamento das formulações em função dos tempos de aplicação (média e intervalo de confiança).

Pode ser observado que, após 14 dias de tratamento, o veículo e as formulações contendo acetil hexapeptídeo-3 ou DMAE provocaram um aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo em relação aos valores basais, sendo que esses valores foram estatisticamente iguais entre si e aos obtidos após 28 dias de tratamento. A formulação contendo a associação das duas substâncias ativas provocou um aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo após 28 dias de tratamento semelhante estatisticamente às demais formulações.

Tabela 42 – Teste de Tukey – Conteúdo aquoso do estrato córneo da face – Fatores de variação: formulações e tempos.

Tempo	Tratamento	Média	Valor crítico de Tukey 5%
Inicial	F4	47,73500	4,37039
	F4A	45,11000	
	F4D	49,11250	
	F4AD	45,52750	
14 dias	F4	52,53651	
	F4A	54,29750	
	F4D	55,97250	
	F4AD	49,48500	
28 dias	F4	56,19250	
	F4A	52,93750	
	F4D	56,34750	
	F4AD	52,41000	

F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

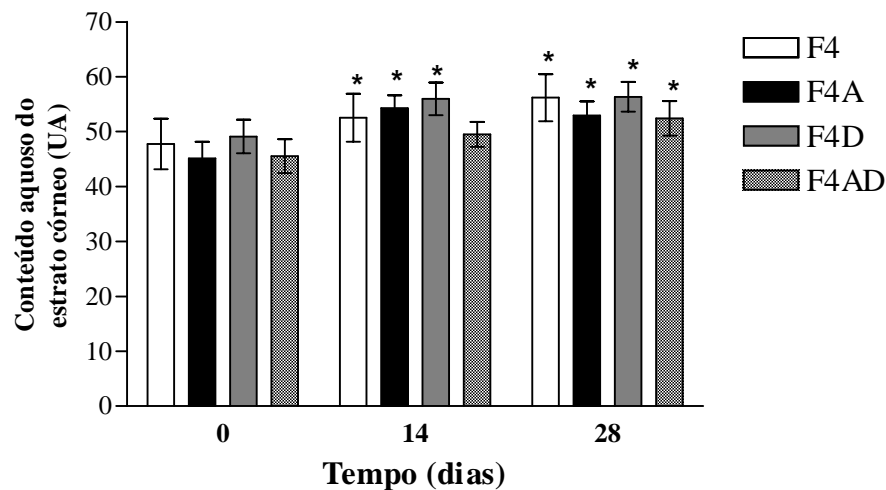


Figura 34. Conteúdo aquoso do estrato córneo antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face das voluntárias. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

* Significativo em relação ao tempo inicial ($p < 0,1$)

6.4.1.2.3. Propriedades mecânicas da pele

6.4.1.2.3.1. Características anisotrópicas da pele dos antebraços

Os resultados da Análise de Variância obtidos para o RRTM máximo, RRTM mínimo e RRTM médio dos antebraços estão apresentados nas Tabelas 43 a 45.

Tabela 43 – RRTM máximo da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr. Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	19538,1328	3	6512,7109	1,18	32,4679 %
Resíduo I	421199,1875	76	5542,0947		
Entre Tempos (T)	46536,0000	2	23268,0000	5,79	0,4146 %
Interação F x T	31385,0664	6	5230,8442	1,30	25,9080 %
Resíduo II	611045,6250	152	4020,0371		
Variação total	1129704,0000	239			

Tabela 44 – RRTM mínimo da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr. Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	3290,5500	3	1096,8500	0,70	44,3694 %
Resíduo I	118550,8672	76	1559,8799		
Entre Tempos (T)	4611,7500	2	2305,8750	2,66	7,1631 %
Interação F x T	906,8500	6	151,1417	0,17	11,8005 %
Resíduo II	131971,7344	152	868,2351		
Variação total	259331,7500	239			

Tabela 45 – RRTM médio da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr. Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	4165,4668	3	1388,4889	0,60	38,1571 %
Resíduo I	174727,8594	76	2299,0508		
Entre Tempos (T)	2856,8000	2	1428,4000	1,04	35,7875 %
Interação F x T	4626,5332	6	771,0889	0,56	23,6659 %
Resíduo II	209219,3438	152	1376,4430		
Variação total	395596,0000	239			

A análise estatística demonstrou que após o tratamento com as formulações em estudo não foram observadas alterações no RRTM máximo, RRTM mínimo e RRTM médio da pele do antebraço das voluntárias ($p > 0,05$).

As Figuras 35 a 37 mostram os gráficos das médias dos valores obtidos nessa análise, bem como o intervalo de confiança.

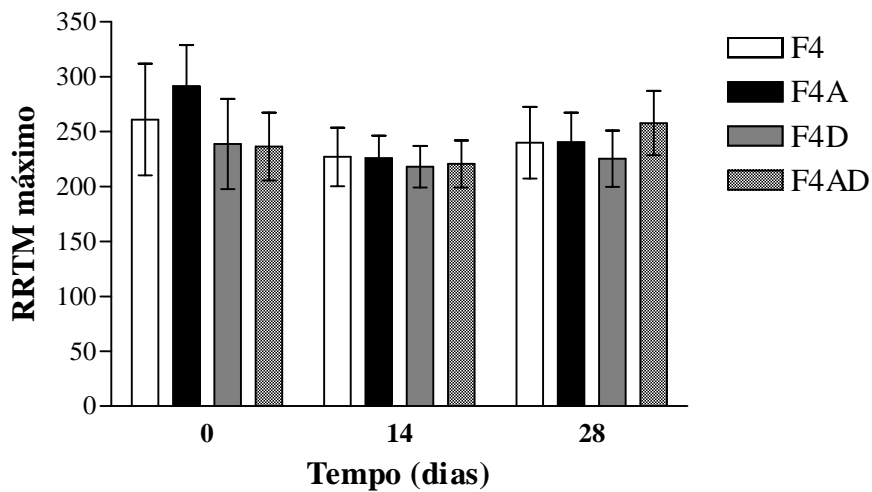


Figura 35. RRTM máximo da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

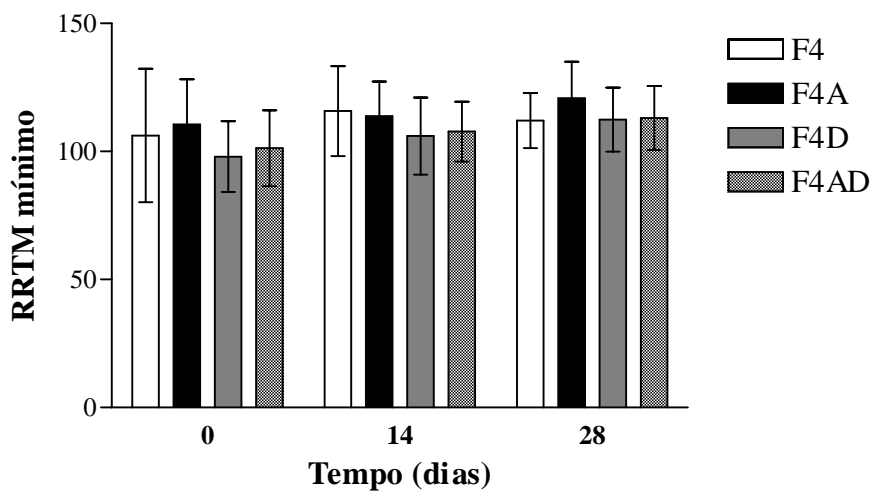


Figura 36. RRTM mínimo da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

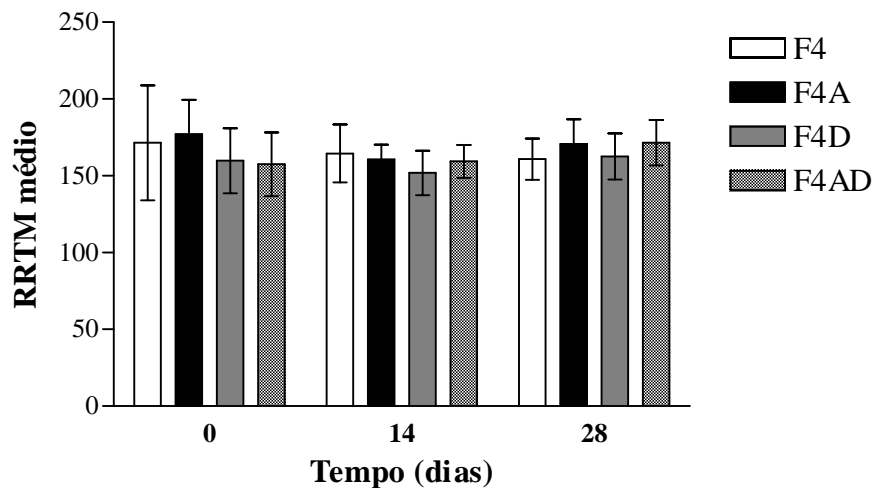


Figura 37. RRTM médio da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

No caso da anisotropia da pele ($RRTM_{máximo} / RRTM_{mínimo}$), como a distribuição dos dados foi considerada não normal, foi aplicado um teste não paramétrico para dados não vinculados, específico para a comparação de mais de duas amostras entre si, Kruskal Wallis (Tabela 46), a partir do qual foi possível verificar que não houve alterações nesse parâmetro.

Tabela 46 – Anisotropia da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Kruskal-Wallis

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado	19,4483
Valor do X^2 para 11 graus de liberdade	19,45
Probabilidade de H_0 para esse valor	5,35 %
Não-significativo	$p > 0,05$

Os resultados desse teste podem ser melhor visualizados quando representados em gráficos tipo colunas agrupadas. A Figura 38 apresenta o gráfico referente ao comportamento das formulações em função dos tempos de aplicação (média e intervalo de confiança).

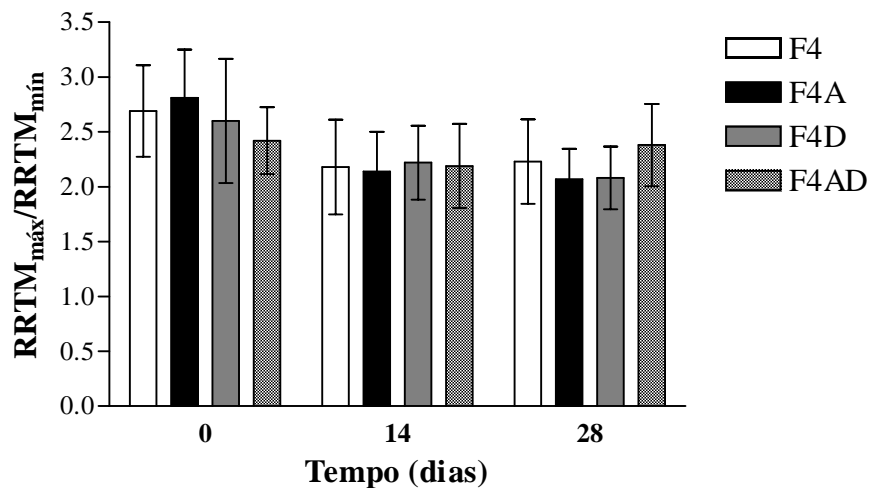


Figura 38. Anisotropia ($RRTM_{\text{máximo}} / RRTM_{\text{mínimo}}$) da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.1.2.3.2. Características anisotrópicas da pele da face

Os resultados da análise estatística obtidos para o RRTM máximo, RRTM mínimo e RRTM médio da face estão apresentados nas Tabelas 47 a 49.

Tabela 47 – RRTM máximo da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	189779,6719	3	63259,8906	3,30	2,4292 %
Resíduo I	1456170,6250	76	19160,1406		
Entre Tempos (T)	10492,2002	2	5246,1001	0,86	42,7147 %
Interação F x T	18263,5273	6	3043,9211	0,50	19,1443 %
Resíduo II	924233,0000	152	6080,4805		
Variação total	2598939,0000	239			

Tabela 48 – RRTM mínimo da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	14579,7998	3	4859,9331	0,62	39,3458 %
Resíduo I	593430,8750	76	7808,3008		
Entre Tempos (T)	23247,0000	2	11623,5000	9,54	0,0295 %
Interação F x T	5987,4004	6	997,9001	0,82	44,2149 %
Resíduo II	185123,9219	152	1217,9205		
Variação total	822369,0000	239			

Tabela 49 – RRTM médio da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	55994,6680	3	18664,8887	1,70	17,2092 %
Resíduo I	832870,0000	76	10958,8154		
Entre Tempos (T)	7020,0000	2	3510,0000	1,92	14,8079 %
Interação F x T	9150,9316	6	1525,1553	0,83	45,3431 %
Resíduo II	277937,4063	152	1828,5355		
Variação total	1182973,0000	239			

A análise estatística demonstrou que, após o tratamento com as formulações em estudo, não foram observadas alterações no RRTM máximo, RRTM mínimo e RRTM médio da pele da face das voluntárias ($p > 0,05$).

As Figuras 39 a 41 mostram os gráficos das médias dos valores obtidos nessa análise, bem como o intervalo de confiança.

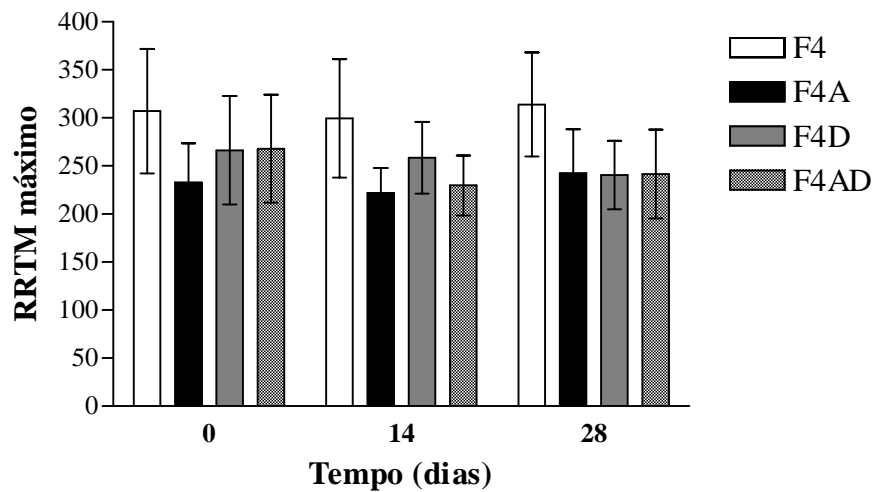


Figura 39. RRTM máximo da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

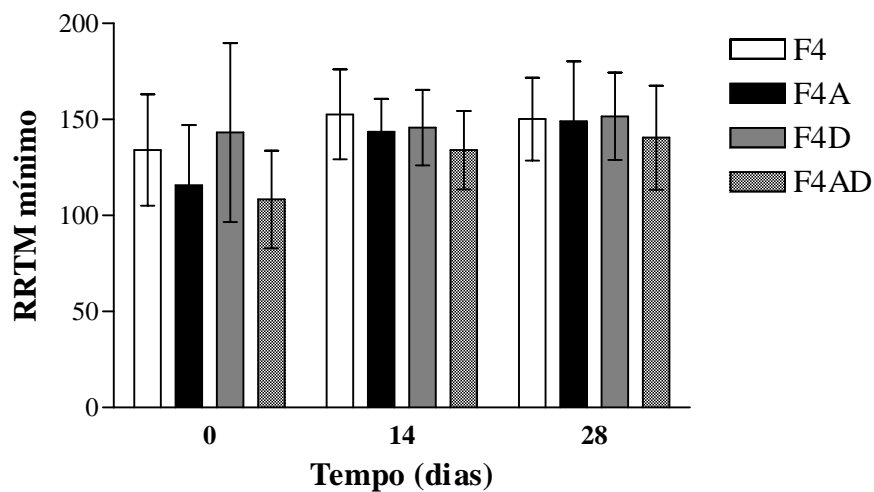


Figura 40. RRTM mínimo da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

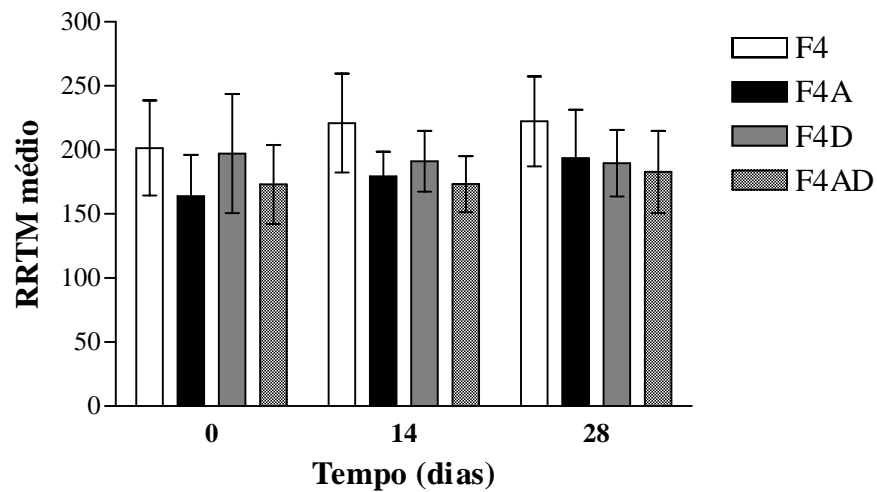


Figura 41. RRTM médio da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

No caso da anisotropia da pele ($RRTM_{\text{máximo}} / RRTM_{\text{mínimo}}$), como a distribuição dos dados foi considerada não normal, foi aplicado o teste estatístico Kruskal Wallis. Os resultados desse teste estão apresentados na Tabela 50.

Tabela 50 – Anisotropia da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Kruskal-Wallis.

Comparação entre as médias dos postos						
Grupos comparados (comparações duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos			Significância	
		0,05	0,01	0,001		
F4 inicial X F4 14 dias	20,3250	41,8592	55,1795	70,8264	ns	
F4 inicial X F4 28 dias	7,1500	41,8592	55,1795	70,8264	ns	
F4 14 dias X F4 28 dias	13,1750	41,8592	55,1795	70,8264	ns	
F4A inicial X F4A 14 dias	55,8250	41,8592	55,1795	70,8264	1%	
F4A inicial X F4A 28 dias	42,6500	41,8592	55,1795	70,8264	5%	
F4A 14 dias X F4A 28 dias	13,1750	41,8592	55,1795	70,8264	ns	
F4D inicial X F4D 14 dias	5,5500	41,8592	55,1795	70,8264	ns	
F4D inicial X F4D 28 dias	33,4000	41,8592	55,1795	70,8264	ns	
F4D 14 dias X F4D 28 dias	27,8500	41,8592	55,1795	70,8264	ns	
F4AD inicial X F4AD 14 dias	47,0500	41,8592	55,1795	70,8264	5%	
F4AD inicial X F4AD 28 dias	50,8500	41,8592	55,1795	70,8264	5%	
F4AD 14 dias X F4AD 28 dias	3,8000	41,8592	55,1795	70,8264	ns	

F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE. ns: não significativo

Os resultados da análise estatística mostraram que a aplicação das formulações acrescidas de acetil hexapeptídeo-3 ou da associação de DMAE e acetil hexapeptídeo-3 provocaram uma diminuição significativa da anisotropia da pele da face ($RRTM_{\text{máximo}} / RRTM_{\text{mínimo}}$) após 14 dias de tratamento, quando comparados aos valores basais e esses valores foram mantidos constantes após 28 dias de tratamento (Figura 42).

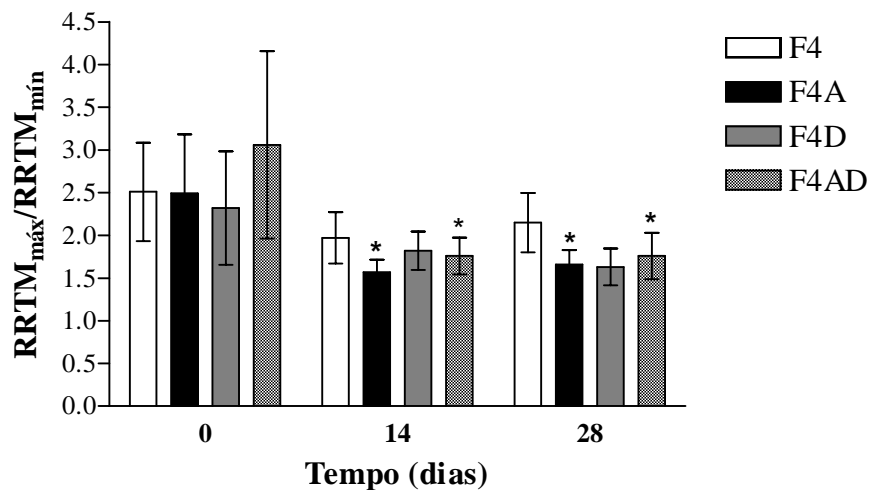


Figura 42. Anisotropia ($RRTM_{\text{máximo}} / RRTM_{\text{mínimo}}$) da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.1.2.3.3. Propriedades viscoelásticas da pele do antebraço

Os resultados da análise estatística para os valores de viscoelasticidade da pele dos antebraços estão apresentados nas Tabelas 51 a 54.

Tabela 51 – Elasticidade total da pele, relação da retração total com a distensão total (U_a/U_f), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0959	3	0,0320	2,56	6,0332 %
Resíduo I	0,9501	76	0,0125		
Entre Tempos (T)	0,0321	2	0,0161	2,45	8,7507 %
Interação F x T	0,0163	6	0,0027	0,41	13,1025 %
Resíduo II	0,9950	152	0,0065		
Variação total	2,0894	239			

Tabela 52 – Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,1599	3	0,0533	1,89	13,7140 %
Resíduo I	2,1438	76	0,0282		
Entre Tempos (T)	0,0241	2	0,0121	1,83	16,1308 %
Interação F x T	0,0426	6	0,0071	1,08	37,6600 %
Resíduo II	0,9998	152	0,0066		
Variação total	3,3703	239			

Tabela 53 – Elasticidade da pele, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,1599	3	0,0533	1,89	13,7140 %
Resíduo I	2,1438	76	0,0282		
Entre Tempos (T)	0,0241	2	0,0121	1,83	16,1308 %
Interação F x T	0,0426	6	0,0071	1,08	37,6600 %
Resíduo II	0,9998	152	0,0066		
Variação total	3,3703	239			

Tabela 54 – Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele dos antebraços das voluntárias - Análise de variância

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,1098	3	0,0366	2,17	9,7077 %
Resíduo I	1,2818	76	0,0169		
Entre Tempos (T)	0,0124	2	0,0062	1,76	17,2873 %
Interação F x T	0,0414	6	0,0069	1,97	7,3105 %
Resíduo II	0,5333	152	0,0035		
Varição total	1,9787	239			

O estudo estatístico possibilitou verificar que após o tratamento com as formulações objeto de estudo não foram detectadas alterações estatisticamente significativas nos parâmetros relacionados à viscoelasticidade da pele dos antebraços das voluntárias ($p>0,05$).

As Figuras 43 a 46 mostram os gráficos das médias dos valores obtidos nessa análise, bem como o intervalo de confiança.

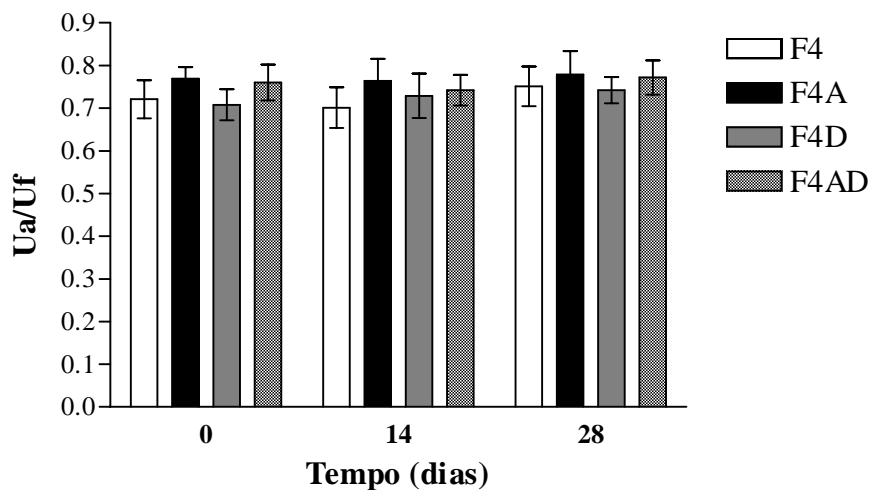


Figura 43. Elasticidade total da pele, relação da retração total com a distensão total (U_a/U_f) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

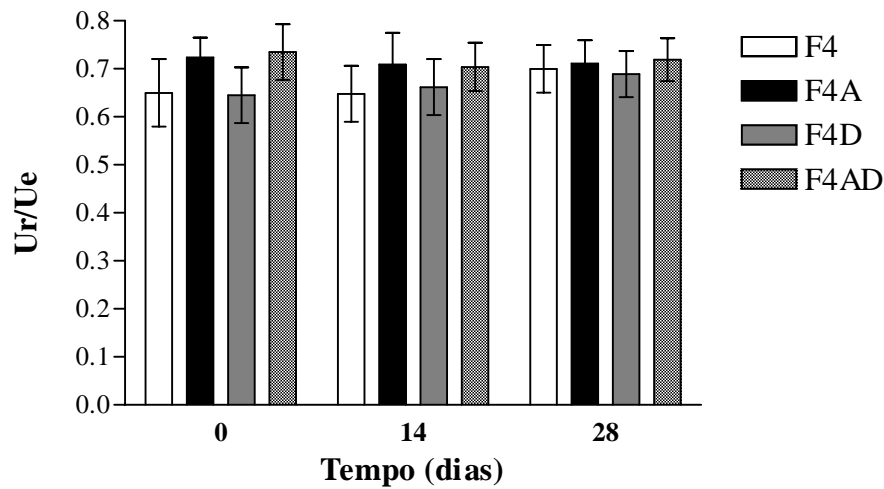


Figura 44. Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

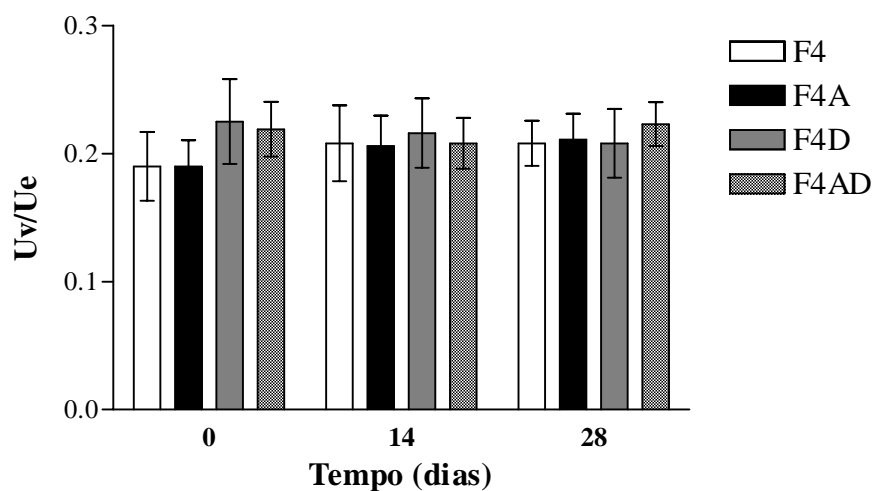


Figura 45. Elasticidade da pele, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

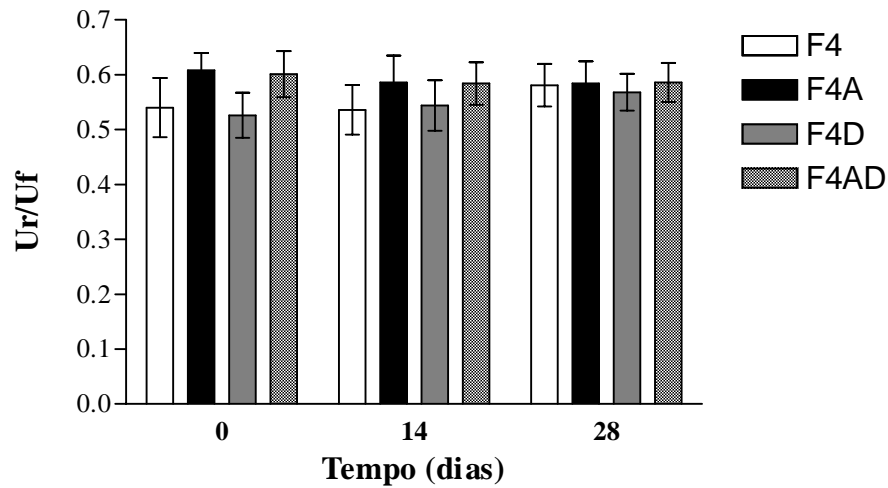


Figura 46. Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.1.2.3.4. Propriedades viscoelásticas da pele da face

Os resultados da análise estatística obtidos para as propriedades viscoelásticas da pele da face estão apresentados nas Tabelas 55 a 58.

Tabela 55 – Elasticidade total da pele, relação da retração total com a distensão total (U_a/U_f), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele da face das voluntárias - Análise de variância

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0321	3	0,0107	1,33	27,0661 %
Resíduo I	0,6126	76	0,0081		
Entre Tempos (T)	0,0175	2	0,0087	3,48	3,2385 %
Interação F x T	0,0097	6	0,0016	0,64	30,3614 %
Resíduo II	0,3820	152	0,0025		
Variação total	1,0538	239			

Tabela 56 – Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele da face das voluntárias - Análise de variância

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0730	3	0,0243	1,82	14,9304 %
Resíduo I	1,0157	76	0,0134		
Entre Tempos (T)	0,0284	2	0,0142	3,80	2,3858 %
Interação F x T	0,0333	6	0,0056	1,49	18,5416 %
Resíduo II	0,5678	152	0,0037		
Variação total	1,7182	239			

Tabela 57 – Elasticidade da pele, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele da face das voluntárias - Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0172	3	0,0057	1,74	16,5072 %
Resíduo I	0,2502	76	0,0033		
Entre Tempos (T)	0,0053	2	0,0027	1,93	14,5986 %
Interação F x T	0,0236	6	0,0039	2,86	11,1505 %
Resíduo II	0,2088	152	0,0014		
Variação total	0,5051	239			

Tabela 58 – Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f), medida após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na pele da face das voluntárias - Análise de variância

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,1098	3	0,0366	2,17	9,7077 %
Resíduo I	1,2818	76	0,0169		
Entre Tempos (T)	0,0124	2	0,0062	1,76	17,2873 %
Interação F x T	0,0414	6	0,0069	1,97	7,3105 %
Resíduo II	0,5333	152	0,0035		
Variação total	1,9787	239			

A análise de variância demonstrou que as regiões da face tratadas com as formulações em estudo não apresentaram alterações estatisticamente significativas na viscoelasticidade da pele ($p > 0,05$).

As Figuras 47 a 50 mostram os gráficos das médias dos valores obtidos nessa análise, bem como o intervalo de confiança.

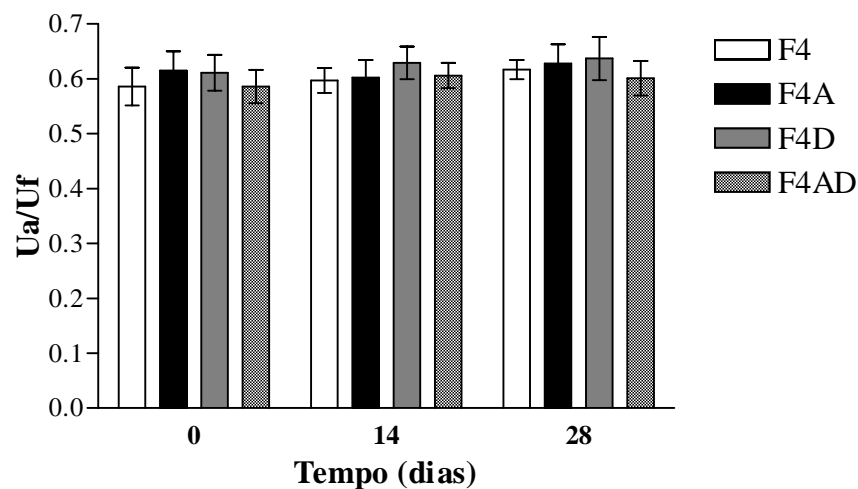


Figura 47. Elasticidade total da pele, relação da retração total com a distensão total (U_a/U_f) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

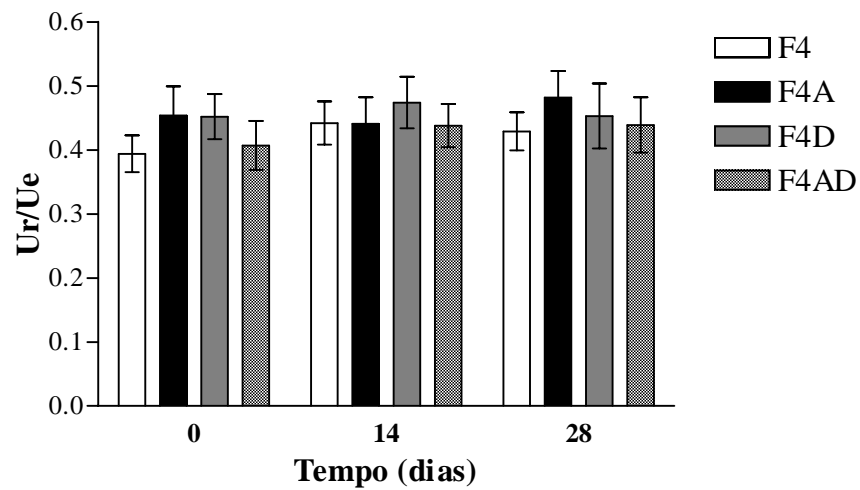


Figura 48. Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

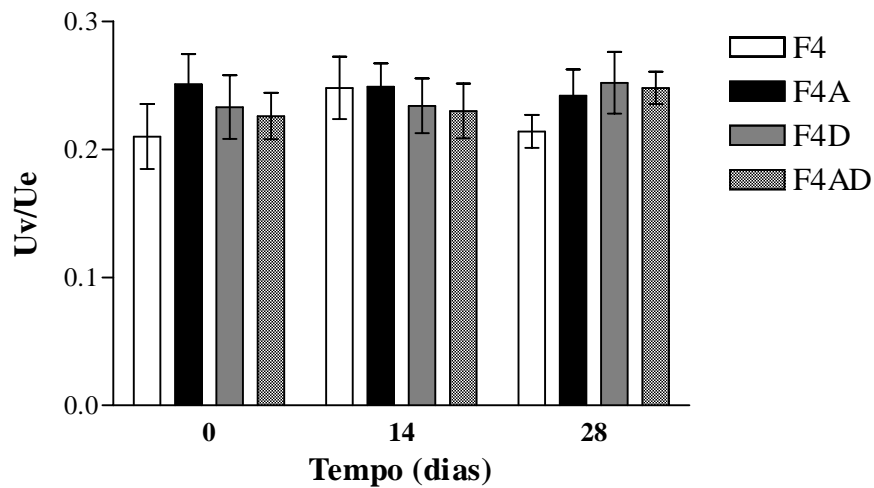


Figura 49. Elasticidade da pele, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

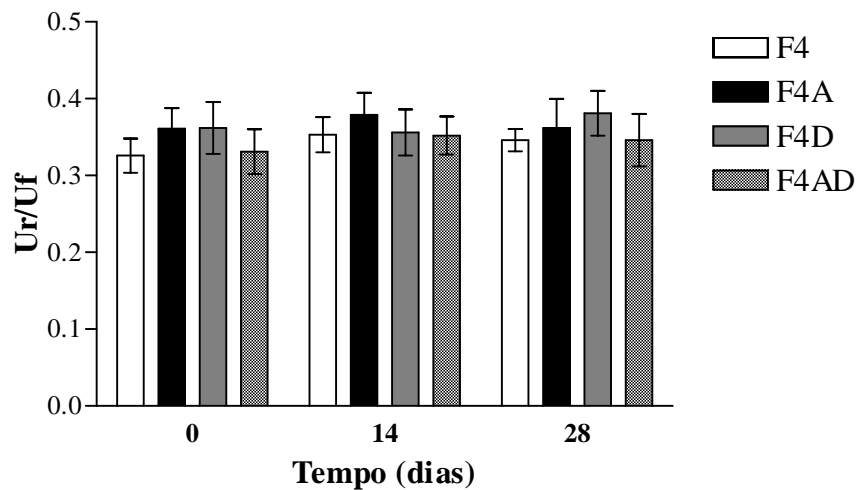


Figura 50 - Elasticidade da pele, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.1.2.4. Micro-relevo cutâneo dos antebraços

Os resultados da análise estatística referentes ao micro-relevo cutâneo dos antebraços estão apresentados nas Tabelas 59 a 62.

Tabela 59 – Aspereza da pele (Se_r) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	0,0782	3	0,0261	0,08	3,0065 %
Resíduo I	24,8006	76	0,3263		
Entre Tempos (T)	0,4479	2	0,2240	1,45	0,8145%
Interação F x T	0,6038	6	0,1006	0,65	30,7135 %
Resíduo II	23,5566	152	0,1550		
Variação total	49,4872	239			

Tabela 60 – Número de rugas da pele (Se_w) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	111,8958	3	37,2986	0,41	24,7430 %
Resíduo I	6980,8750	76	91,8536		
Entre Tempos (T)	121,3625	2	60,6813	1,82	16,3926 %
Interação F x T	239,6542	6	39,9424	1,20	31,0723 %
Resíduo II	5075,8374	152	33,3937		
Variação total	12529,6250	239			

Tabela 61 – Textura da pele (Se_{sm}) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	135,4438	3	45,1479	0,55	34,3014%
Resíduo I	6291,7749	76	82,7865		
Entre Tempos (T)	246,9438	2	123,4719	4,99	0,8145%
Interação F x T	143,0312	6	23,8385	0,96	45,3390%
Resíduo II	3762,9626	152	24,7563		
Variação total	10580,1563	239			

Tabela 62 – Rugosidade da pele (R_t) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	204,1500	3	68,0500	0,58	36,5096%
Resíduo I	8937,2666	76	117,5956		
Entre Tempos (T)	13,4000	2	6,7000	0,18	16,2388%
Interação F x T	187,5000	6	31,2500	0,83	45,3702%
Resíduo II	5692,4336	152	37,4502		
Variação total	15034,7500	239			

A análise estatística demonstrou que após o tratamento com as formulações em estudo não foram observadas alterações nos parâmetros relacionados ao micro-relevo cutâneo dos antebraços das voluntárias ($p>0,05$).

As Figuras 51 a 54 mostram os gráficos das médias dos valores obtidos nessa análise, bem como o intervalo de confiança.

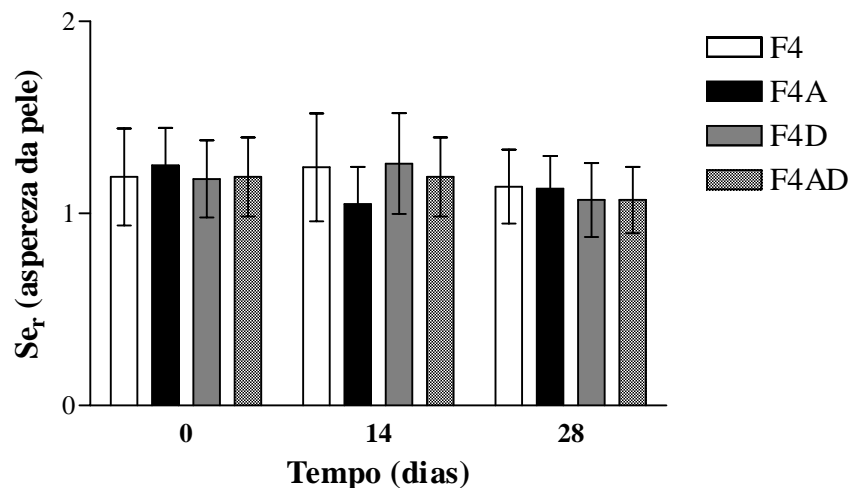


Figura 51. Aspereza da pele (Se_r) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

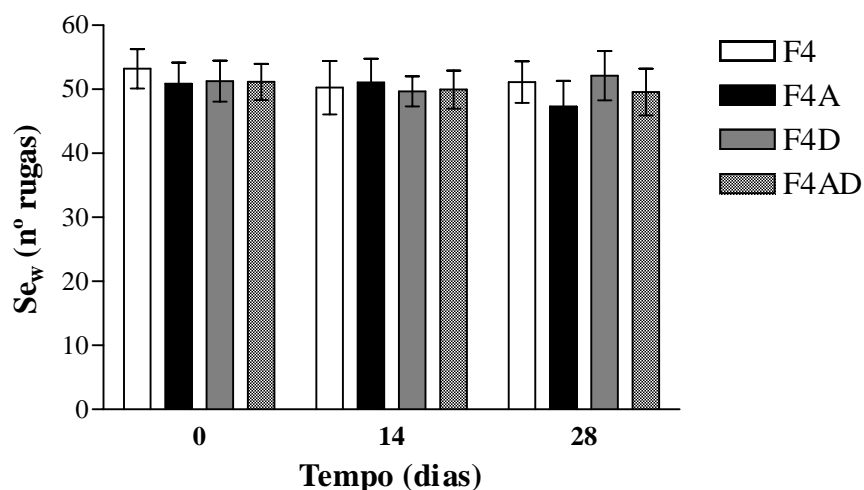


Figura 52. Número de rugas da pele (Se_w) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

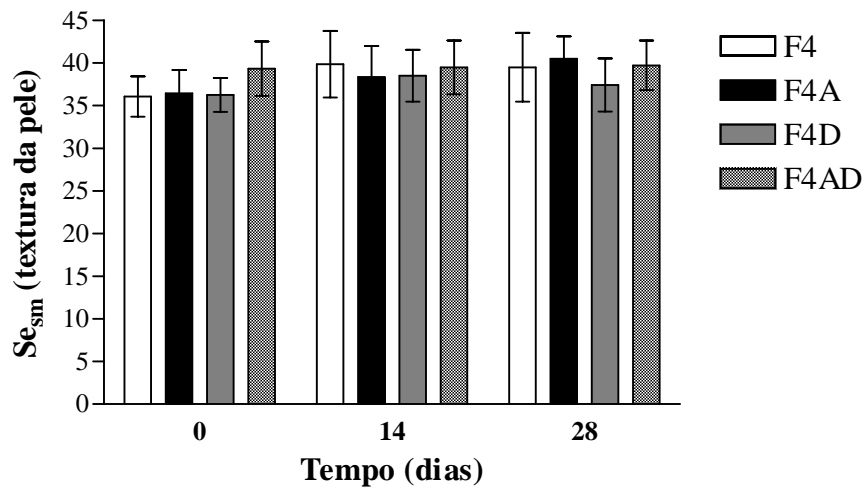


Figura 53. Textura da pele (Se_{sm}) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

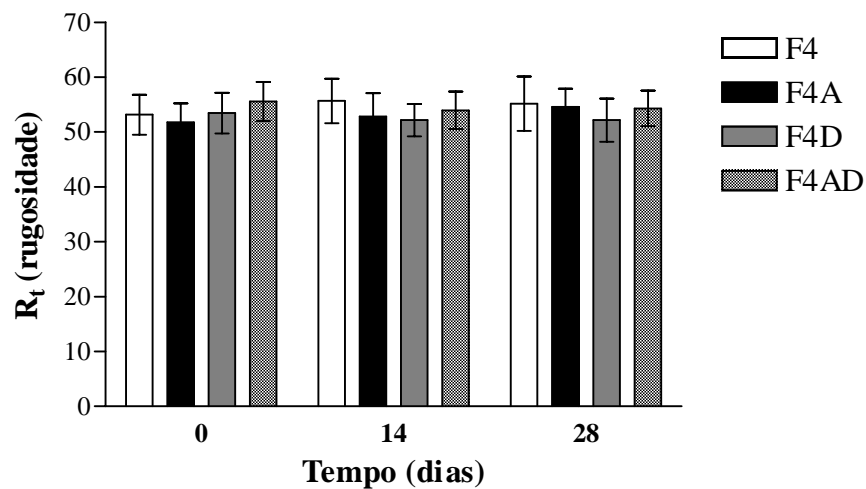


Figura 54. Rugosidade da pele (R_t) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

6.4.1.2.5. Micro-relevo cutâneo da face

Os resultados da análise estatística obtidos para os parâmetros relacionados ao micro-relevo cutâneo da face estão apresentados nas Tabelas 63 a 66.

Tabela 63 – Aspereza da pele (Se_r) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	3,0316	3	1,0105	1,36	26,1905 %
Resíduo I	56,6623	76	0,7456		
Entre Tempos (T)	0,7021	2	0,3511	0,81	44,8706 %
Interação F x T	4,3756	6	0,7293	1,69	12,6149 %
Resíduo II	65,5627	152	0,4313		
Variação total	130,3344	239			

Tabela 64 – Número de rugas da pele (Se_w) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	671,9459	3	223,9819	1,20	31,5465 %
Resíduo I	14192,4502	76	186,7428		
Entre Tempos (T)	206,6125	2	103,3063	1,89	15,2687 %
Interação F x T	327,1541	6	54,5257	1,00	43,0323 %
Resíduo II	8314,0244	152	54,6975		
Variação total	23712,1875	239			

Tabela 65 – Textura da pele (Se_{sm}) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	133,0875	3	44,3625	0,57	36,2055 %
Resíduo I	5873,2251	76	77,2793		
Entre Tempos (T)	123,7250	2	61,8625	2,26	10,5747 %
Interação F x T	133,0250	6	22,1708	0,81	43,4853 %
Resíduo II	4161,0000	152	27,3750		
Variação total	10424,0625	239			

Tabela 66 – Rugosidade da pele (R_r) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações objeto de estudo – Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Formulações (F)	520,5458	3	173,5153	1,54	20,9396 %
Resíduo I	8555,5996	76	112,5737		
Entre Tempos (T)	333,3625	2	166,6812	3,89	2,1829 %
Interação F x T	270,0542	6	45,0090	1,05	39,4614 %
Resíduo II	6505,2505	152	42,7977		
Varição total	16184,8125	239			

A análise estatística não acusou diferenças significativas entre as formulações estudadas ($p > 0,05$). Assim após o tratamento diário com as formulações não houve alterações estatisticamente significativas nos parâmetros relacionados ao micro-relevo cutâneo da pele da face das voluntárias, o que pode ser melhor visualizado nas Figuras 55 a 58 (média e intervalo de confiança).

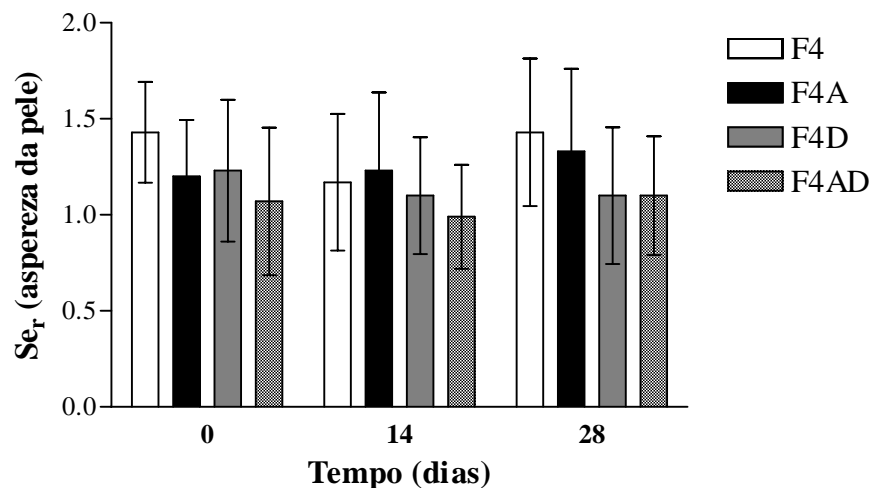


Figura 55. Aspereza da pele (Se_r) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

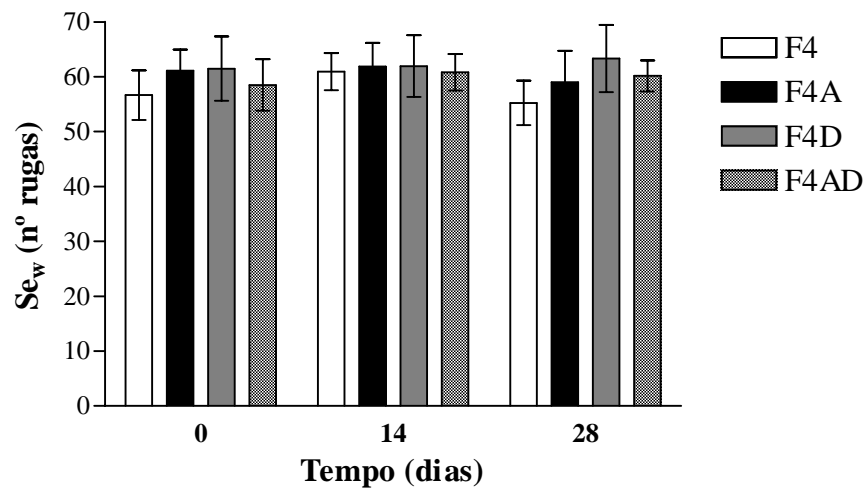


Figura 56. Número de rugas da pele (Se_w) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

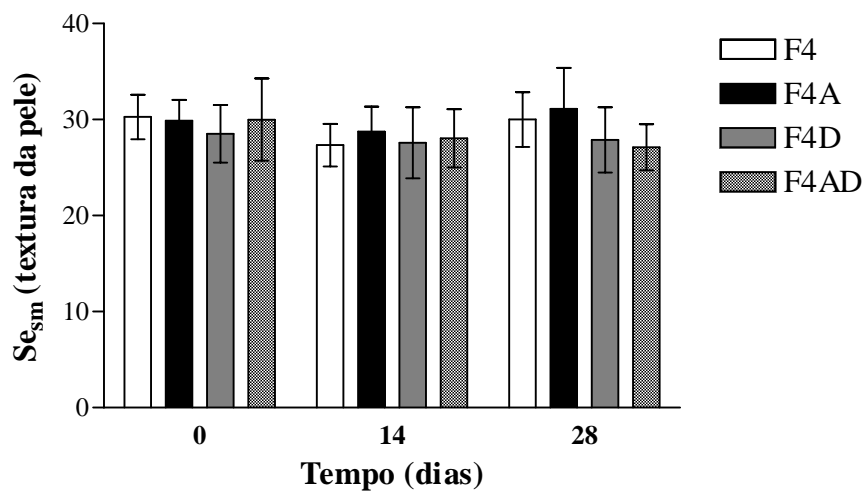


Figura 57. Textura da pele (Se_{sm}) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

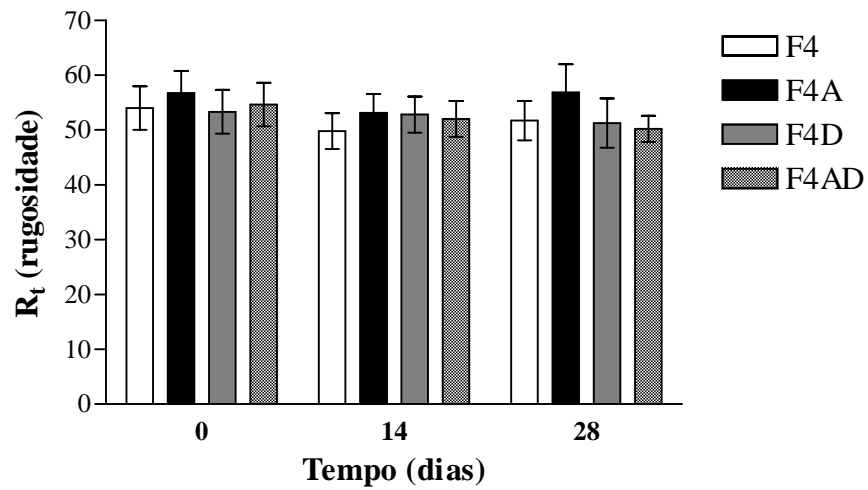


Figura 58. Rugosidade da pele (R_t) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações. F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

7 Discussão

A preocupação em manter a pele com aspecto jovem e saudável tem desafiado a área cosmética e a clínica dermatológica, no desenvolvimento de produtos cada vez mais eficazes, na prevenção e tratamento do envelhecimento cutâneo e no tratamento de alterações cutâneas de caráter inestético, tais como, hipo e hiperpigmentação, rugas e ressecamento da pele.

Desta forma, a indústria cosmética tem disponibilizado inúmeras substâncias ativas visando a prevenção e o tratamento tópico de alterações cutâneas decorrentes do envelhecimento, retardando procedimentos invasivos e conseqüentemente a cirurgia plástica.

Neste contexto, substâncias com propriedade antienvelhecimento que possam aumentar a firmeza e melhorar o tônus da pele têm sido propostas para atenuar rugas e marcas de expressão, deixando-as menos visíveis. Dentre estas substâncias pode-se mencionar o DMAE e o acetil hexapeptídeo-3 que têm sido utilizados em formulações tópicas com finalidade antienvelhecimento em decorrência de seus efeitos na melhoria do aspecto geral da pele observados clinicamente (BLANES-MIRA et al., 2002; GROSSMAN, 2005; PUIG, 2004; UHODA et al., 2002).

Assim, esta pesquisa foi conduzida seguindo as etapas referentes ao desenvolvimento de novos produtos, sendo que a escolha da porcentagem das substâncias ativas a serem adicionadas na formulação ocorreu baseado em trabalhos publicados na literatura científica (BLANES-MIRA et al., 2002; PUIG, 2004; UHODA et al., 2002). Dessa forma, as formulações foram elaboradas e submetidas à avaliação do pH e a testes preliminares de estabilidade por avaliação visual e centrifugação. Os estudos de estabilidade possuem a finalidade de verificar se a formulação desenvolvida mantém suas características organolépticas e físico-químicas (BRASIL – ANVISA, 2004). Nesse sentido, esse estudo pode ser considerado como um requisito imprescindível para a garantia da qualidade do produto.

Considerando que o tecido cutâneo possui pH levemente ácido (4,1 a 5,8), o que auxilia na proteção contra microorganismos (SEGGER et al., 2007), segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL – ANVISA, 2005), a determinação da faixa de pH de uma formulação deve contemplar três diferentes aspectos: estabilidade dos ingredientes, segurança e eficácia do produto. Sendo assim, o processo de desenvolvimento foi realizado visando a obtenção de formulações com pH levemente ácido para uma boa compatibilidade com a pele e por ser adequado para as matérias-primas constituintes da formulação, o que é fundamental para sua estabilidade.

O teste preliminar de estabilidade por centrifugação é de grande importância para a seleção das formulações em desenvolvimento mais estáveis, as quais serão, posteriormente

submetidas aos testes de estabilidade por estresse térmico. Quando centrifugada, a amostra é submetida a um estresse que simula um aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e, conseqüentemente antecipando possíveis instabilidades, que poderão ser observadas, por exemplo, na forma de precipitação, separação de fases ou coalescência (BRASIL – ANVISA, 2005).

As composições das formulações estudadas diferiram em relação à cera auto-emulsionante e ao polímero utilizados. No teste de estabilidade por centrifugação, foi possível observar que, diante da adição das substâncias ativas, a composição utilizada na formulação 2 (álcool batílico, lecitina de soja e polímero de acrilato) não foi adequada para manter a estabilidade, pois ocorreu separação de fases, o que não aconteceu com as formulações 1, 3 e 4. A separação de fases de uma emulsão demonstra um balanço inadequado entre a quantidade de agentes de consistência e emulsificantes empregados (MAIA CAMPOS, 1994).

Em seguida, as formulações foram submetidas ao estudo de estabilidade por estresse térmico, que tem por finalidade acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade, tais como separação de fases da emulsão e oxidação dos ativos, o que pode levar a alterações de cor e odor do produto. Esse estudo envolve duas etapas, os testes preliminares de estabilidade, no qual as formulações são avaliadas visualmente após 7 dias de armazenamento e, o estudo de estabilidade acelerada em que, após 28 dias, as amostras são submetidas não somente à análise visual mas também à determinação do comportamento reológico, à centrifugação e à leitura do pH.

Nos testes preliminares de estabilidade, as formulações 1 e 4 foram consideradas estáveis, pois não apresentaram separação de fases ou ressecamento da superfície, o que demonstra que sua composição estava adequada em termos de agentes de consistência e de umectantes, sendo que estes últimos evitam o ressecamento da formulação. Essas formulações foram, então, submetidas aos estudos de estabilidade acelerada, dentre os quais foi realizada a avaliação da estabilidade física por determinação do comportamento reológico, pois este estudo é de fundamental importância no desenvolvimento de formulações, uma vez que pode fornecer informações a respeito da estabilidade física do produto ao longo de sua vida de prateleira e sua performance no momento da aplicação na pele (BARNES, 1994; BRUMMER; GODERSKY, 1999; DAHMS, 1996; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993; SEMENZATO, 2000).

Os dados obtidos para o índice de fluxo no estudo reológico indicaram que todas as formulações apresentaram comportamento pseudoplástico, sendo este tipo de fluxo desejável para produtos cosméticos, pois permite um espalhamento adequado e uma melhor cobertura

da pele, o que não seria possível obter com um fluido Newtoniano, o qual flui rapidamente na pele durante a aplicação, resultando em uma distribuição não uniforme (DAHMS, 1994).

Os valores superiores de viscosidade aparente mínima e do índice de consistência apresentados pela formulação 4 acrescida ou não das substâncias ativas, quando comparada com a formulação 1, eram esperados, uma vez que essa característica pôde ser observada pela análise visual das formulações.

Foi possível observar ainda que, a formulação 4 apresentou uma tendência de diminuição da viscosidade quando foi adicionada de DMAE e os valores de índice de consistência apresentaram um comportamento inverso, ou seja, houve um aumento desse índice quando a formulação 4 foi adicionada de DMAE. Esse fato mostra a importância do estudo reológico para avaliar produtos semi-sólidos não newtonianos, para os quais valores diferentes de viscosidade aparente podem ser obtidos em função do gradiente de cisalhamento (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993), sendo que, no caso desse estudo, foi considerado o último ponto da curva ascendente do reograma (ponto de máximo cisalhamento). Já o cálculo do índice de consistência considera a integração dos valores de tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento obtidos no reograma resultante do comportamento do produto durante a análise reológica, sendo que o índice de fluxo e, portanto, a pseudoplastia do sistema influenciam nessa medida. Em síntese, o índice de consistência é mais adequado para representar a reologia de um produto semi-sólido com comportamento não newtoniano, pois indica as condições de fluidez da formulação durante toda a análise reológica e não somente em um momento dessa análise.

Em relação à tixotropia, ou seja, a presença de área de histerese, verificou-se que a formulação 4, contendo ou não as substâncias ativas, apresentou maiores valores que a formulação 1, não tendo ocorrido alterações significativas nesse parâmetro ao longo do experimento. A tixotropia informa a capacidade da formulação em reconstituir sua estrutura após ser submetida à aplicação de uma força. Elevados valores de tixotropia revelam que a formulação necessita de um longo tempo para reconstituir sua estrutura. Há um tempo ideal para que a formulação se restabeleça, o qual não deve ser muito longo para que não haja escoamento excessivo da mesma, porém este não deve ser muito curto. O escoamento sobre a pele provoca uma diminuição da interação do filme formado pela emulsão e a pele (DAHMS, 1994).

Dando continuidade aos testes de estabilidade acelerada, após serem submetidas 28 dias às diferentes condições de temperatura, novas amostras das formulações foram submetidas à centrifugação, não tendo ocorrido separação de fases. Além disso a análise dos

valores de pH, também demonstrou que o tempo e a temperatura não influenciaram a estabilidade das formulações em relação a esse parâmetro.

Sendo assim, a análise do conjunto de variáveis envolvidas no teste de estabilidade mostrou que as formulações estudadas podem ser consideradas estáveis, pois não apresentaram variações significativas nos parâmetros avaliados. Assim, essas formulações foram submetidas à próxima etapa desse trabalho que foi a análise sensorial, com o objetivo de se selecionar a formulação mais adequada para ser utilizada nos estudos clínicos dos efeitos das formulações na pele.

A análise sensorial tem por finalidade analisar respostas humanas provenientes de estímulos conferidos por diferentes materiais, tais como cosméticos e alimentos, e que sejam percebidos através dos cinco sentidos humanos: visão, olfato, paladar, tato e audição (STONE; SIDEL, 1992). No caso da área cosmética essa análise é amplamente utilizada, pois é de fundamental importância que um produto seja agradável ao consumidor, apresentando um sensorial diferenciado. Sendo assim, na indústria cosmética, a função da análise sensorial é conduzir testes válidos que forneçam dados confiáveis para que decisões estratégicas sejam tomadas, uma vez que o desempenho sensorial de uma formulação é um fator de elevada importância que interfere na aceitação do produto pelo consumidor e conseqüentemente no seu potencial de venda (LEE et al., 2005; PARENTE; GAMBARO; SOLANA, 2005; WORTEL; WIECHERS, 2000). No caso de uma pesquisa científica, é fundamental a adesão do voluntário ao tratamento para que se obtenha resultados consistentes, o que pode ser alcançado com o uso de uma formulação que apresente boa aceitabilidade. Nesse sentido, existem vários trabalhos científicos que empregam a análise sensorial como etapa do desenvolvimento de formulações de uso tópico (ALMEIDA; GAIO; BAHIA, 2008; ANCONI; DAL'BELO; CAMPOS, 2005; LEE et al., 2005). Os atributos sensoriais analisados no presente trabalho, toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação na pele após cinco minutos, foram escolhidos baseando-se nessas publicações.

A partir da análise sensorial realizada foi possível verificar que a formulação 4 apresentou características sensoriais estatisticamente melhores do que a formulação 1, sendo que elas diferiam entre si em relação às ceras auto-emulsionantes e polímeros utilizados. Esses dados podem ser explicados pelo fato de que o polímero de acrilato utilizado na formulação 4 tem a propriedade de conferir um toque seco e bastante agradável, por outro lado, a hidroxietilcelulose utilizada na formulação 1 confere uma característica de pegajosidade, resultando em uma espalhabilidade ruim. Conseqüentemente, a sensação

imediate e após cinco minutos conferida pela formulação 4 foi estatisticamente mais agradável do que a conferida pela formulação 1. Esses resultados são coincidentes com um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa em que seis formulações de géis contendo diferentes polímeros, dentre eles a hidroxietilcelulose e o polímero de acrilato, foram submetidas à análise sensorial. Nesse trabalho o gel à base de hidroxietilcelulose teve a menor nota em termos de espalhabilidade, toque e sensação na pele (ANCONI; DAL'BELO; CAMPOS, 2005).

Além disso, neste trabalho foi possível correlacionar os dados obtidos no estudo reológico das formulações com os resultados da análise sensorial. Assim, quando se adicionou as substâncias ativas, a formulação 1 apresentou um leve aumento do índice de fluxo e a formulação 4 sofreu uma leve diminuição nesse parâmetro, tendo sido melhor avaliada na análise sensorial, conforme já mencionado. Isso pode ser explicado pelo fato de que à medida que os valores de índice de fluxo diminuem, tem-se um aumento da pseudoplastia do sistema, o que muitas vezes pode melhorar o espalhamento da formulação na pele, pois a característica de pseudoplastia confere à formulação a propriedade de reduzir sua viscosidade quando a ela é aplicada uma força (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993).

Nesse sentido, os estudos clínicos foram conduzidos utilizando-se a formulação 4 como veículo, sendo que a primeira etapa foi avaliar a segurança de uso das formulações contendo ou não as substâncias ativas objeto de estudo. Para isso, foi realizado um teste de compatibilidade cutânea em voluntários humanos com a aplicação de um *patch* sob condições de oclusão, que facilitam a penetração dos ingredientes dos produtos na pele. Nesse teste, todas as formulações demonstraram compatibilidade cutânea muito boa, pois nenhum voluntário apresentou reação de irritação cutânea primária após a retirada dos apósitos (FISCHER, 1995). Sendo assim, essas formulações foram consideradas seguras para uso cosmético e utilizadas nos estudos de eficácia a curto e a longo prazo, empregando-se técnicas de biofísica, que são métodos que permitem a avaliação da eficácia de um produto cosmético nas reais condições de uso.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, o registro de um produto requer que ele seja submetido a testes que comprovem sua eficácia quando a ele é atribuído um benefício específico. Nesse sentido, as técnicas de Biofísica têm ocupado uma posição de destaque para a avaliação da eficácia de produtos, pois consistem na determinação das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele por meio de métodos objetivos, científicos e não-invasivos (LAUGIER; MAIBACH, 1999; OBA, 2002; SUGATA, 2002). Sendo assim, esta metodologia foi a de escolha para cumprirmos os

objetivos propostos.

As regiões corporais selecionadas para o referido estudo foram a região interna dos antebraços e a região malar da face das voluntárias, pois ambas têm sido amplamente empregadas para a avaliação da eficácia de produtos com finalidade antienvelhecimento (BEITNER, 2003; ROBERT; ROBERT; ROBERT, 2003). A pele da face é uma região indicada para a avaliação desses produtos, pois, considerando que é mais vulnerável à ação do fotoenvelhecimento, representa a principal área de interesse na aplicação de formulações antienvelhecimento (SOMMERFELD, 2007; TAKEMA et al., 1994). Por outro lado, por ser protegida da radiação ultravioleta, a região anterior dos antebraços reflete os efeitos do envelhecimento cronológico (intrínseco) na pele (ROBERT; ROBERT; ROBERT, 2003) e tem sido muito utilizada nos estudos de eficácia por apresentar uma série de vantagens, como facilidade de aplicação e avaliação, comprometimento dos voluntários ao estudo e por haver, nessa região, menor interferência das condições ambientais e do estilo de vida (SUMINO et al., 2004). Assim, optamos por conduzir os experimentos em ambas as regiões citadas para verificar uma possível diferença de ação das formulações objeto de estudo em cada uma delas (TAKEMA et al., 1994). Uma vez que as formulações seriam utilizadas na face e que as voluntárias não poderiam utilizar qualquer outro produto nas regiões de estudo, foi acrescentado filtro solar nas formulações para garantir que a pele não estaria exposta às agressões provocadas pela radiação solar.

A avaliação da eficácia de produtos tópicos por biofísica deve seguir protocolos criteriosamente padronizados, a fim de se obter dados reais sobre as condições da pele avaliadas. Nesse sentido, as avaliações foram realizadas após as voluntárias permanecerem no mínimo 30 minutos em ambiente com temperatura e umidade controladas, uma vez que esses fatores podem influenciar as condições da pele (DOBREV, 2000; ROGIERS, 1990). A seleção das voluntárias foi realizada mediante alguns critérios de inclusão e exclusão, como sexo, idade, tipo de pele, pessoas não usuárias de contraceptivos orais e fumo e que não estavam grávidas e/ou apresentavam dermatoses. Esses critérios contribuem para a diminuição das variações interindividuais, já que tais fatores são determinantes nas condições cutâneas (BEITNER, 2003; ROGIERS, 1990; SUMINO et al., 2004).

A avaliação do efeito imediato de formulações dermocosméticas é de grande importância, uma vez que permite verificar a ação desses produtos na pele logo após a sua aplicação, como por exemplo, alteração na umectação cutânea, na função barreira da pele, no micro-relevo cutâneo ou efeito tensor imediato (DAL'BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006).

Em relação à avaliação dos efeitos a curto prazo nos antebraços, foi observado que as formulações estudadas provocaram um aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo independente da presença de DMAE ou acetil hexapeptídeo-3 após 2 horas da aplicação. Esses resultados são coincidentes com os dados obtidos por Uhoda et al. (2002) em um estudo em que se avaliou o efeito de um gel contendo DMAE na hidratação da pele da face após 45 minutos de aplicação. Nesse estudo, tanto o veículo como a formulação contendo DMAE provocaram aumento estatisticamente significativo nos valores de hidratação. Além disso, Anconi e Campos (2008) em um estudo de avaliação da eficácia de diferentes peptídeos, na pele, dentre eles o acetil hexapeptídeo-3, observaram que as formulações contendo ou não peptídeos, ocasionaram aumento significativo do conteúdo aquoso do estrato córneo após 2 horas de aplicação única.

Por outro lado, quando se avaliou a função barreira da pele por meio da medida da perda transepidermica de água, observou-se diminuição significativa desse parâmetro somente nas regiões que foram tratadas com as formulações acrescidas das substâncias ativas objeto de estudo, ou seja, a presença dessas substâncias foi necessária para obtenção de tal efeito.

Dessa maneira, em geral, formulações cosméticas podem melhorar a hidratação da superfície da pele, independente da presença de substâncias ativas, as quais são utilizadas para potencialização desse efeito hidratante e obtenção de outros benefícios específicos, como neste caso, a melhoria da função barreira da pele.

A capacidade de retenção de água no estrato córneo é dependente de componentes higroscópicos, representados pelos fatores de umectação natural (*natural moisturizing factor – NMF*) e por lipídeos polares, tais como os esfingolipídeos existentes nos espaços intercelulares do estrato córneo (YAMAMURA; TEZUKA, 1989). O DMAE utilizado nesta pesquisa está na forma de sal (acetamidobenzoato), apresentando, portanto, característica higroscópica. Dessa forma, o mecanismo de ação do DMAE estaria relacionado ao aumento da capacidade de retenção de água na pele, gerando uma diminuição dos valores de perda transepidermica de água, conforme observado em nosso estudo. Yoshizawa et al. (2003) observaram que soluções contendo os sais cloreto de sódio e de potássio impediram o aumento da perda transepidermica de água e diminuíram o ressecamento da pele, após uma irritação provocada por lauril sulfato de sódio. Os autores sugerem o uso dessas soluções como coadjuvantes no tratamento de dermatite atópica ou outras dermatites crônicas. Além disso, Uhoda et al. (2002), ao observarem um aumento da firmeza da pele de voluntários que receberam aplicação tópica de DMAE, sugeriram que esses efeitos podem estar relacionados com um aumento de retenção de água na pele.

Em relação ao efeito de diminuição da perda transepidérmica de água também observado para as formulações que continham acetil hexapeptídeo-3, é importante destacar que o peso molecular dos peptídeos utilizados em formulações cosméticas influencia seu mecanismo de ação e seus efeitos na pele. Os peptídeos de alto peso molecular apresentam, em geral, propriedades filmógenas enquanto que os de baixo peso molecular são mais efetivos na retenção de umidade (CHALLONER; CHAHAL; JONES, 1998, LINTNER, 2008). O acetil hexapeptídeo-3 avaliado nesse estudo não possui alto peso molecular, tendo, inclusive, apresentado uma significativa permeação em um teste *in vitro* realizado com amostra de estrato córneo de pele humana (PUIG, 2004). Assim, diante desses dados da literatura e devido a característica higroscópica de alguns peptídeos de baixo e médio peso molecular pode-se sugerir que o mecanismo de ação do acetil hexapeptídeo-3 para promover uma diminuição da perda transepidérmica de água esteja relacionado com a retenção de água no tecido cutâneo.

O próximo teste realizado para se avaliar o efeito imediato das formulações foi a determinação das propriedades viscoelásticas da pele. Nessa análise nenhuma alteração significativa foi observada nos parâmetros avaliados, o que indica que as formulações estudadas não apresentaram efeito tensor imediato na pele, como observado por Uhoda et al. (2002) que ao estudarem o efeito de um gel contendo DMAE na face de voluntárias, observaram que não houve alterações nos valores obtidos com o equipamento *Cutometer*[®]. Além disso, o acetil hexapeptídeo-3 também não apresentou efeitos imediatos na viscoelasticidade da pele, não apresentando, portanto, propriedades filmógenas como ocorre com peptídeos de alto peso molecular, como a proteína do trigo (GIANETI; MAIA CAMPOS, 2006).

Finalizando o estudo dos efeitos das formulações a curto prazo, a próxima etapa foi a análise do micro-relevo cutâneo por meio do equipamento *Visioscan*[®], o qual permite a avaliação da superfície da pele, por meio de técnicas de profilometria óptica e digitalização de imagem. Nesse estudo, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros relacionados ao micro-relevo da pele após 2 horas de aplicação das formulações objeto de estudo no antebraço, quando comparados aos valores basais.

Dando seqüência às análises por biofísica e análise de imagem da pele foi feita a avaliação a longo prazo dos efeitos da aplicação diária das formulações, sendo esse estudo de extrema importância, pois está diretamente relacionado às reais condições de uso de um produto dermocosmético, sendo, portanto, de grande valia para a elucidação científica dos seus efeitos na pele a longo prazo.

Neste estudo, observou-se uma tendência de aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo na região dos antebraços das voluntárias, no entanto, os valores não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação aos obtidos no início do experimento. Por outro lado, na região da face, da mesma forma como observado no estudo a curto prazo, houve aumento de hidratação provocado pelo veículo e pelas formulações contendo DMAE ou acetil hexapeptídeo-3 após 14 dias de tratamento, sendo que esses valores foram iguais entre si e também aos valores obtidos após 28 dias de tratamento, demonstrando que a hidratação foi mantida ao longo do tempo. No caso da formulação contendo a associação das duas substâncias ativas, o aumento de hidratação foi observado após 28 dias de tratamento, sendo os valores estatisticamente semelhantes aos obtidos para as formulações que continham as duas substâncias ativas separadas.

Assim, a formulação cosmética utilizada como veículo aumentou o conteúdo aquoso do estrato córneo para os níveis adequados de hidratação para uma pele considerada normal, ou seja, a composição da formulação por si só já proporcionou um aumento significativo da umectação cutânea. Esses resultados são coincidentes com os observados em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, no qual foi avaliado o efeito de formulações dermocosméticas contendo DMAE no conteúdo aquoso do estrato córneo após oito semanas de aplicação (TADINI, 2009).

De acordo com alguns trabalhos relatados na literatura, formulações dermocosméticas podem hidratar significativamente a pele independente da presença de substâncias ativas com finalidades específicas, pois são constituídas por matérias-primas umectantes e emolientes, como é o caso da formulação empregada nesse estudo (LEE; CHOI, 1999, LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002, TADINI, 2009). O aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo é um importante benefício para o tecido cutâneo, uma vez que auxilia na prevenção do ressecamento, da descamação excessiva da pele e da formação de rugas superficiais, estando, portanto envolvido na prevenção e tratamento do envelhecimento cutâneo (IMOKAWA, 2000; LODÉN, 2001; RIEGER, 1998). Além disso, é de fundamental importância que produtos cosméticos apresentem eficácia hidratante, uma vez que a hidratação da pele tende a diminuir em decorrência do envelhecimento (SATOR et al., 2001).

Além da diminuição de hidratação, a perda da firmeza e elasticidade da pele é uma das características mais marcantes que ocorrem durante o envelhecimento, sendo que suas propriedades mecânicas não são uniformes em todas as direções, havendo uma necessidade de se entender esta anisotropia angular. Por definição, anisotropia é uma propriedade característica de uma estrutura na qual as propriedades físicas e químicas podem variar de

acordo com a direção em que são medidas (RUVOLO; STAMATAS; KOLLIAS, 2007).

Nesse sentido, a próxima etapa referente ao estudo de eficácia foi a avaliação do efeito das formulações nas propriedades mecânicas da pele através das medidas de suas propriedades anisotrópicas. Para isso, empregou-se o equipamento *Reviscometer*[®], o qual vem sendo utilizado em diversas pesquisas científicas por possuir alta sensibilidade na verificação da anisotropia da pele (RUVOLO; STAMATAS; KOLLIAS, 2007). Esse equipamento determina o tempo (RRTM - *resonance running time measurements*) necessário para que ondas de ultrassom percorram certa distância no tecido cutâneo, de tal forma que, as medidas de RRTM são inversamente proporcionais à velocidade de propagação das ondas emitidas na superfície da pele. A sonda do equipamento foi colocada sobre a pele das voluntárias, em diferentes posições, de modo que, em cada voluntária foram coletadas medidas de RRTM de quatro diferentes ângulos. Foram registrados os valores da menor (RRTM mínimo) e da maior (RRTM máximo) medidas observadas, e posteriormente foi calculada a média dessas medidas (RRTM médio) e a anisotropia da pele que é obtida através da divisão do RRTM máximo pelo RRTM mínimo. Por razões técnicas, essas medidas são expressas em unidades arbitárias (HERMANNNS-LÊ et al., 2001).

No presente estudo, não foram detectadas alterações significativas nos valores de RRTM máximo, RRTM mínimo e RRTM médio após a aplicação diária das formulações. Uhoda et al. (2002) também não observou alterações no RRTM mínimo e RRTM médio em um trabalho em que se avaliou o efeito de um gel contendo DMAE após 45 minutos de aplicação, porém observou uma diminuição do RRTM máximo. Como já mencionado, no presente estudo, não foram observadas alterações no RRTM máximo, sugerindo que o efeito observado por Uhoda et al. (2002) pode ser detectado quando as medidas são realizadas logo após a aplicação da formulação contendo DMAE. Assim, a retenção de água na derme papilar, sugerida pelo autor como a causa para o efeito observado, não é mantida após 3 horas de aplicação.

Por outro lado, as formulações contendo acetil hexapeptídeo-3 e a formulação contendo a associação desse peptídeo com DMAE provocaram uma redução da relação RRTM máximo dividido pelo RRTM mínimo, ou seja, da anisotropia da pele da face, o que sugere que houve uma melhora no tônus e na firmeza da pele, uma vez que, segundo trabalhos científicos publicados, a velocidade de propagação das ondas de ultrassom emitidas na superfície da pele pelo *Reviscometer*[®] é diretamente proporcional à sua rigidez (RUVOLO; STAMATAS; KOLLIAS, 2007; VEXLER; POLYANSKY; GORODETSKY, 1999), ou seja, quanto melhor o tônus da pele, menor será o tempo de propagação das ondas e

consequentemente menores serão os valores de RRTM e de anisotropia (NIZET; PIEÂRARD-FRANCHIMONT; PIEÂRARD, 2001).

Apesar deste efeito poder ser atribuído à hidratação do tecido cutâneo, uma vez que segundo Ruvolo; Stamatas; Kollias (2007) a velocidade de propagação das ondas é diretamente proporcional à quantidade de água na pele, o efeito observado nesse estudo pode estar relacionado a um aumento da firmeza da pele independente de hidratação, pois, as formulações contendo acetil hexapeptídeo-3 não exerceram efeito hidratante superior ao veículo, o qual não provocou alteração na anisotropia da pele.

Além disso, Hermanns-Lê et al. (2001) avaliaram as propriedades anisotrópicas da pele de voluntários e verificaram que com o aumento da idade, um número maior de pessoas apresentaram maiores valores de RRTM máximo, de RRTM médio e de anisotropia, o que, segundo os autores, indica uma diminuição na firmeza da pele .

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o acetil hexapeptídeo-3 aumentou a firmeza da pele da face, uma vez que as regiões tratadas com as formulações que continham esse peptídeo apresentaram diminuição da anisotropia, o que sugere que o acetil hexapeptídeo-3 possui eficácia antienvelhecimento, conforme já mencionado por Blanes-Mira et al. (2002). Esse autor, utilizando réplicas de silicone, observou que a aplicação tópica de uma emulsão contendo esse peptídeo resultou em atenuação das rugas da região periocular após 15 e 30 dias de tratamento, quando comparado com o veículo.

Uma vez que, ao contrário da região da face, a aplicação das formulações objeto de estudo no antebraço não provocou nenhuma alteração significativa da anisotropia da pele, percebe-se que há algumas diferenças nos resultados obtidos para a aplicação das formulações nas duas regiões estudadas da mesma forma como ocorreu em relação ao conteúdo aquoso do estrato córneo. Isso se deve ao fato de que a pele dos antebraços e da face possuem características bastante diferentes. Por estar mais exposta do que os antebraços, a face é mais vulnerável ao fotoenvelhecimento, sendo, dessa forma, mais susceptível à ação de produtos antienvelhecimento (PIÉRARD; UHODA; PIÉRARD-FRANCHIMONT, 2004). De acordo com Blinchnann e Serup (1988) e Rogiers (1990), variações nas características da pele em diferentes regiões do corpo podem estar relacionadas também a diferenças na espessura do estrato córneo e no número e atividade das glândulas sebáceas.

Dando continuidade aos estudos de avaliação de eficácia, foram analisadas as propriedades viscoelásticas do tecido cutâneo. Apesar das formulações estudadas terem sido efetivas no aumento da hidratação da superfície da pele na região da face, as propriedades

viscoelásticas tanto do antebraço, quanto da face não foram alteradas. Embora alguns autores correlacionem a viscoelasticidade cutânea com o grau de umectação da pele (DOBREV, 2000), outros afirmam que estes dois fatores não possuem uma correlação linear, ou seja, a elasticidade não depende apenas da hidratação (WIECHERS; BARLOW, 1999). Nesse sentido, a associação de hidratantes e substâncias que atuem na elasticidade cutânea seria recomendada para otimizar o efeito antienvhecimento de uma formulação.

Os resultados observados nesse estudo são condizentes com os obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa, ao se avaliar o efeito após uma hora e após oito semanas de aplicação de formulações dermocosméticas contendo DMAE nas propriedades viscoelásticas da pele (TADINI, 2009). Por outro lado, nesse mesmo estudo, observou-se um efeito significativo de formulações contendo DMAE quando se analisou histologicamente a pele de camundongos sem pêlo tratada com tais formulações, verificando-se um aumento significativo da espessura da derme e das fibras de colágeno. Considerando que, a ação do DMAE pode estar envolvida com as camadas mais profundas da pele, ou seja, a derme, é importante que essa substância atinja um nível adequado de penetração.

De acordo com alguns estudos que vem sendo realizados (GRATIERI; LOPEZ, 2004) o DMAE alcança a derme, no entanto, é fato conhecido que o veículo influencia a penetração cutânea de substâncias ativas (MAIA CAMPOS; BENETTON; ECCLESTON, 1994) indicando que o desenvolvimento de veículos adequados pode otimizar a penetração e conseqüentemente a eficácia do produto. Nesse sentido, no presente estudo utilizou-se um veículo diferente do estudo anterior, à base de ésteres de polietilenoglicol com o objetivo de se aumentar a penetração das substâncias ativas na pele, uma vez que os derivados de polietilenoglicol possuem essa propriedade (SHIN; CHO; OH, 2001). Além disso, outro fator de extrema importância em relação à permeação de substâncias ativas é a espessura do tecido cutâneo. A pele do camundongo sem pêlo possui uma espessura bastante reduzida em relação à pele humana (HA et al., 2005; LU et al., 1999; TAKEMA et al., 1994; TSUKAHARA et al., 2001), facilitando a permeação de substâncias ativas nas camadas mais profundas, o que pode ter contribuído para que o DMAE atuasse na derme desses animais, conforme observado por TADINI (2009).

Em relação à permeação cutânea do acetil-hexapeptídeo-3, nota-se por meio dos trabalhos publicados que esse fator foi priorizado durante o seu desenvolvimento, uma vez que essa substância foi sintetizada com o objetivo de mimetizar os efeitos da neurotoxina botulínica. Assim, esse hexapeptídeo foi idealizado de tal forma a possuir um tamanho reduzido, capaz de permear o tecido cutâneo e que ao mesmo tempo preservasse sua atividade

biológica. Dessa forma, foram realizados testes *in vitro* com amostra de estrato córneo de pele humana, através dos quais se demonstrou que essa substância é capaz de permear através da pele (BLANES-MIRA et al., 2002; PUIG, 2004).

Em relação à análise do micro-relevo cutâneo, embora as formulações estudadas tenham mostrado efeitos hidratantes, o que poderia melhorar o micro-relevo da pele (DE PAEPE et al., 2000; KAMPF; ENNEN, 2006; SATO et al., 2000), não foi possível observar efeitos significativos na melhoria da textura, maciez e rugosidade da pele após o período de tratamento nos antebraços e na face das voluntárias, quando comparados aos valores basais. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Blanes-Mira et al. (2002) em um estudo utilizando-se réplicas de silicone da pele. Esses autores observaram que a aplicação de uma emulsão contendo 10% de acetil hexapeptídeo-3, por 30 dias, provocou 30% de diminuição da rugosidade e da aspereza da pele. A rugosidade da pele é o conjunto de irregularidades, isto é, pequenas saliências (picos) e reentrâncias (vales) que caracterizam sua superfície e, com o envelhecimento, a distância entre os picos e os vales aumenta em função do ressecamento progressivo da pele e da presença de rugas mais profundas (LI et al., 2006).

Finalizando, o presente estudo possibilitou o desenvolvimento de formulações dermocosméticas estáveis, seguras, com sensorial adequado, bem como a avaliação da eficácia dessas formulações na hidratação, nas propriedades mecânicas e no micro-relevo da pele. De acordo com os resultados obtidos, as formulações que continham DMAE e/ou acetil hexapeptídeo-3 apresentaram efeitos imediatos na diminuição da perda transepidermica de água. Além disso, as formulações com acetil hexapeptídeo-3 reduziram a anisotropia da pele da face, melhorando significativamente o tônus e a firmeza da pele. Assim o acetilhexapeptídeo-3 pode ser considerado uma substância eficaz para aplicação em formulações dermocosméticas com finalidade antienvhecimento.

8 Conclusões

Nas condições experimentais do presente trabalho foi possível concluir que:

- Na etapa de desenvolvimento das formulações, a considerada mais adequada, com base nos estudos de estabilidade e análise sensorial, foi a formulação 4, à base de ésteres de polietilenoglicol e polímero de acrilato e, portanto, selecionada para os testes clínicos propostos.
- Todas as formulações estudadas apresentaram compatibilidade cutânea muito boa, sendo portanto, consideradas seguras para aplicação na pele humana.
- Na avaliação dos efeitos das formulações por biofísica e análise de imagem após uma única aplicação no antebraço, foi observado um aumento no conteúdo aquoso do estrato córneo, independente da presença de acetil hexapeptídeo-3 ou DMAE. Por outro lado, apenas as formulações que continham as substâncias ativas provocaram uma diminuição significativa da perda transepidermica de água, ou seja, o DMAE e o acetil hexapeptídeo-3 mostraram efeito na melhoria da função barreira da pele. As propriedades viscoelásticas e o micro-relevo da pele não sofreram alterações significativas com o uso das formulações em nenhuma das regiões avaliadas.
- Em relação à avaliação dos efeitos das formulações por biofísica e análise de imagem a longo prazo, foi observado um aumento significativo do conteúdo aquoso do estrato córneo apenas na face, após 2 e 4 semanas de aplicação das formulações objeto de estudo. Porém, no estudo das propriedades mecânicas da pele pela análise de suas características anisotrópicas, somente as formulações que continham acetil hexapeptídeo-3 reduziram significativamente a anisotropia da pele da face, ou seja, o acetil hexapeptídeo-3 proporcionou uma melhora no tônus e na firmeza da pele. As propriedades viscoelásticas e o micro-relevo da pele não sofreram alterações significativas em nenhuma das regiões avaliadas.
- A partir dos resultados obtidos na análise das características anisotrópicas da pele, o acetil hexapeptídeo-3 pode ser considerado uma substância eficaz para aplicação em formulações dermocosméticas com finalidade antienvelhecimento.
- As formulações desenvolvidas foram estáveis, seguras e eficazes na melhoria das condições da pele sendo que, as que continham acetil hexapeptídeo-3 mostraram ainda efeito antienvelhecimento, sendo, portanto consideradas as mais eficazes para tal finalidade de uso.

9 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, I.F.; GAIO, A.R.; BAHIA, M.F. Hedonic and descriptive skinfeel analysis of two oleogels: comparison with other topical formulations. **J. Sensory Studies**, Connecicut, v. 23, p. 92–113, 2008.

ANCONI, G.L.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Stability and clinical efficacy of cosmetic formulations containing different peptides. In: 25th IFSCC Congress, 2008.

ANCONI, G.L.; DAL'BELO, S.E.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Desenvolvimento de géis para veiculação de oligo e polissacarídeos ricos em fucose e rhamnose em associação com DMAE ou extrato protéico de trigo. In: 19^o Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2005, São Paulo. Tecnologia cosmética: um desafio para o futuro, 2005. v. 1.

ANDRE-FREI, V.; PERRIER, E.; AUGUSTIN, C.; DAMOUR, O.; BORDAT, P.; SCHUMANN, K.; FÖRSTER, T.H.; WALDMANN-LAUE, M. A comparison of biological activities of a new soya biopeptide studied in an *in vitro* skin equivalent model and human volunteers. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 21, p. 299-311, 1999.

BAREL, A.O.; COURAGE, W.; CLARYS, P. Suction method for measurement of skin mechanical properties; the Cutometer. In: Serup J, Jemec GBE, eds. Handbook of non-invasive methods and the skin. Boca Raton: CRC Press, p. 335-340, 1995.

BARNES, H.A. Rheology of emulsions – a review. **Colloids. Surf. A**, Amsterdam, v. 91, p. 89-95, 1994.

BARRY, B.W. Dermatological formulations. In: BARRY, B. W. **Rheology of dermatological vehicles**, New York: Marcel Dekker, 1993, p. 351-403.

BATISSE, D.; BAZIN, R.; BALDEWECK, T.; QUERLEUX, B.; LÉVÊQUE, J. L. Influence of age on the wrinkling capacities of skin. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 8. p. 148-154, 2002.

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

BECKER-WEGERICH, P.M.; RAUCH, L.; RUZICKA, T. Botulinum toxin: a successful décollete rejuvenation, **Dermatol. Surg.**, Metairie, v. 28, p. 168-171, 2002.

BEITNER, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 149, n. 4, p. 841-9, 2003.

BÉLGICA – The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility, 1997. Disponível em: <http://www.colipa.com> . Acesso em 17 de janeiro de 2006.

BENEDETTO, A.V. Environment and skin aging. **Clin. Dermatol.**, New York, v. 16, p. 129-139, 1998.

BENEDETTO, A.V. The cosmetic use of botulinum neurotoxin type A. **Int. J. Derm.**, Rochester, v. 38, p. 641-655, 1999.

BLANES-MIRA, C.; CLEMENTE, J.; JODAS, J.; GIL, A.; FERNANDEZ-BALLESTER, G.; PONSATI, B.; GUTIERREZZ, L.; PEREZ-PAYA, E.; FERRER-MONTIEL, A. A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 24, p. 303-310, 2002.

BLANES-MIRA, C.; MERINO, J.M.; VALERA, E.; FERNÁNDEZ-BALLESTER, G.; GUTIÉRREZ, L.M.; VINIEGRA, S.; PÉREZ-PAYÁ, E.; FERRER-MONTIEL, A. Small peptides patterned after the N-terminus domain of SNAP25 inhibit SNARE complex assembly and regulated exocytosis. **J. Neurochem.**, Londres, v. 88, p. 124-135, 2004.

BLINCHMANN, C.W.; SERUP, J. Assessment of skin moisture: measurement of electrical conductance, capacitance and transepidermal water loss. **Acta. Derm. Venereol.**, Stockholm, v. 68, p. 284-290, 1988.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf> . Acesso em 23 de maio de 2009.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, maio de 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>> . Acesso em 23 de maio de 2009.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 211, de 14 de julho de 2005. Estabelece a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 jul. 2005.

BRUMMER, R.; GODERSKY, S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. **Colloids. Surf. A**, Amsterdam, v. 152, p. 89-94, 1999.

CAI, N. Treatment of 37 cases of tardive dyskinesia by deanol. **Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi**, Beiping, v. 18, n. 4, p. 234-236, 1985.

CAMPOS, P.M.B.G.M.; GONÇALVES, G.M.; GASPAR, L.R. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* efficacy of topical formulations containing vitamin C and its derivatives studied by non-invasive methods. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 376-80, 2008.

CHALONER, N.I.; CAHAL, S.P.; JONES, Y.R.T. Proteínas cosméticas para el cuidado de La piel, **Cosméticos Nuevos**, p. 33-42, 1998.

CHENG, Y.; DONG, Y.; DONG, M.; WANG, C.; SUN, Y.; SU, N.; LIU, J.; ZHENG, H.; YANG, X.; LI, J.; ANDREAS, S.; ROHR, M.; LIU, W. Moisturizing and antisebum effect of cosmetic application on facial skin. **J. Cosmet. Dermatol.**, Massachusetts v. 6, n. 3, p. 172-177, 2007.

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

COLE, C.A.; GISOLD, E.M.; GROSSMAN, R.M. Clinical and consumer evaluations of improved facial appearance after 1 month use of topical dimethylaminoethanol - Anais do 60th Annual Meeting – American Academy of Dermatology Scientific Posters Presentations – New Orleans, LA – February 22-27, 2002.

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

DAL'BELO, S.E.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 12, n. 2, p. 241-246, 2006.

DE PAEPE, K.; LAGARDE, J.M.; GALL, Y.; ROSEEUW, D.; ROGIERS, V. Microrelief of the skin using a light transmission method. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 292, p. 500-510, 2000.

DOBREV, H. Application of Cutometer area parameters for the study of human skin fatigue. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 11, n. 2, p. 120-122, 2005.

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

DOBREV, H.P. Use of Cutometer to assess epidermal hydration. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 6, n. 4, p. 239-244, 2000.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clin. Dermatol.**, New York, v. 13, p. 375-380, 1995.

EGAWA, M.; OGURI, M.; HIRAO, T.; TAKAHASHI, M.; MIYAKAWA, M. The evaluation of skin friction using a frictional feel analyzer. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 8, n. 1, p. 41-51, 2002a.

EGAWA, M.; OGURI, M.; KUWAHARA, T.; TAKAHASHI, M. Effect of exposure of human skin to a dry environment. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 8, n. 4, p. 212-218, 2002b.

EHLERS, C.; IVENS, U.I.; MØLLER, M.L.; SENDEROVITZ, T.; SERUP, J. Comparison of two pH meters used for skin surface pH measurement: the pH meter 'pH900' from Courage & Khazaka versus the pH meter '1140' from Mettler Toledo. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 84-9, 2001.

ELSON, M.L. Rejuvenescimento tóxico da pele. **Rev. Cosmiatria Med. Estética**, São Paulo, v. 5, p. 25-28, 1997.

ENJELKE, M.; JENSEN, J.M.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; PROKSCH, E. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 137, p. 219-225, 1997.

ENNAMANY, R.; SABOUREAU, D.; MEKIDECHE, N.; CREPPY, E.E. SECMA 1[®], a mitogenic hexapeptide from *Ulva* algae modulates the production of proteoglycans and

glycosaminoglycans in human foreskin fibroblast. **Hum. Exp. Toxicol.**, Londres, v. 17, p. 18-22, 1998.

FERRIS, S.H; SATHANANTHAN, G.; GERSHON, S.; CLARK, C. Senile dementia: treatment with deanol. **J. Am. Geriatr. Soc.**, New York, v. 25, n. 6, p. 241-244, 1977.

FISCHER, A. **Contact Dermatitis**, New York, 2nd ed., Philadelphia, 1995.

FISCHER, W.T.; WIGGER-ALBERTI W.; ELSNER P. Direct and no-direct measurements techniques for analysis of skin surface topography. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, Basel, n. 12, v. 1, p. 1-11, 1999.

GASPAR, L.R.; GONÇALVES, G.M.S.; PEREIRA, L.H.T.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Aplicação e padronização de metodologias não-invasivas para a avaliação de eficácia. **Cosm. & Toil. (Ed. Port.)**, São Paulo, v. 13, n. 5, p. 68-73, 2001.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 250, n. 2, p. 35-44, 2003.

GASSMUELLER J, KECSKES A, JAHN P. Stylus method for skin surface contour measurement. In: Serup J, Jemec GBE (eds), Handbook of non-invasive methods and the skin. CRC Press, Boca Raton Copenhagen, p. 83-90, 1995.

GEORGE, J.; PRIDMORE, S.; ALDOUS, D. Double blind controlled trial of deanol in tardive dyskinesia. **Aust. N. Z. J. Psychiatry**, Victoria, v. 15, n. 1, p. 68-71, 1981.

GIACOMONI, P.U. Radiação ultravioleta, invecchiamento e blebs. **G. Gerontol.**, Firenze, v. 43, p. 209-210, 1995.

GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de formulações cosméticas contendo extratos protéicos de trigo e/ou soja. **Cosm. & Toil. (Ed. Port.)**, São Paulo, v. 18, p. 52, 2006.

GIOIA, F.; CELLENO, L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 8, p. 178-186, 2002.

GOLDSMITH, L.A. My organ is bigger than your organ. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 126, p. 301-302, 1990.

GOMES, A.L.; LANGER, C.M.; OLIVEIRA, E.C.; VAILROLETTO, L. Diferentes tipos de pele: diferentes necessidades cosméticas. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 12., 1998. São Paulo, **Anais**. São Paulo, 1998. p. 220-231.

GRAGNANI A., GIANNOCCARO F.B., SOBRAL C.S., FRANÇA J.P., FERREIRA L.M. Dimethylaminoethanol affects the viability of human cultured fibroblasts. **Aesthetic Plast. Surg.**, New York, v. 31, n. 6, p. 711-718, 2007.

GRATIERI, T.; LOPEZ, R.F.V. Aplicação tópica do 2-Dimetilaminoetanol (DMAE): Desenvolvimento de método de quantificação e estudos de permeação e retenção cutânea *in vivo*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 18, 2004, São Paulo. CD ROOM. São Paulo, 2004.

GROSSMAN, R. The role of dimethylaminoethanol in cosmetic dermatology. **Am. J. Clin. Dermatol.**, Auckland, v. 6, n. 1, p. 39-47, 2005.

GROSSMAN, R.M.; GISOLDI, E.M.; COLE, C.A. Long term safety and efficacy evaluation of a new skin firming technology: dimethylaminoethanol - Anais do 60th Annual Meeting – American Academy of Dermatology Scientific Posters Presentations – New Orleans, LA – February 22-27, 2002.

HA, R.Y.; NOJIMA, K.; ADAMS, W.P.; BROWN, S.A. Analysis of facial skin thickness: defining the relative thickness index. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 115, p. 1769-1773, 2005.

HAFTEK, M.; MAC-MARY, S.; LE BITOUX, M., A.; CREIDI, P.; SEITÉ, S.; ROUGIER, A.; HUMBERT, P. Clinical, biometric and structural evaluation of the long-term effects of a topical treatment with ascorbic acid and madecassoside in photoaged human skin. **Exp. Dermatol.**, Copenhagen, v. 17, p. 946-952, 2008.

HALLER, P.H. Aplicações de lipídeos e fosfolipídeos em cosméticos. **Cosm. Toil.**, Carol Stream, v. 1, n. 4, p. 33-40, 1989.

HAUBRICH, D.R.; GERBER, N.H.; PFLUEGER, A.B. Deanol affects choline metabolism in peripheral tissues of mice. **J. Neurochem.**, Londres, v. 37, n. 2, p. 476-482, 1981.

HERMANNNS-LÊ, T.; JONLET, F.; SCHEEN, A.; PIÉRARD G.E. Age and body mass index-related changes in cutaneous shear wave velocity. **Exp. Gerontol.**, Oxford, v. 36, p. 363-372, 2001.

HOLBROOK, K.A.; WOLFF, K. The structure and development of skin. In: FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLF, K. *Dermatology in general medicine*, 4th ed., New York: McGraw-Hill, 1993, cap. 16, p.241-253.

HUMBERT, P.G.; HAFTEK, M.; CREIDI, P.; LAPIERE, C.; NUSGENS, B.; RICHARD, A.; SCHMITT, D.; ROUGIER, A.; ZAHOUANI, H. Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo. **Exp. Dermatol.**, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 237-244, 2003.

IMOKAWA, G. Biological mechanisms of epidermal pigmentation, wrinkle formation and barrier disruption in atopic dermatitis. In: IFSCC CONGRESS, 21., 2000, Berlin. CD ROOM. Berlin, 2000.

ISHIKAWA, T.; ISHIKAWA, O.; MIYACHI, Y. Measurement of skin elastic properties with a new suction device (I): Relationship to age, sex and the degree of obesity in normal individuals. **J. Dermatol.**, Tokyo, v. 22, p. 713-717, 1995.

JACOBI, U.; CHEN, M.; FRANKOWSKI, G.; SINKGRAVEN, R.; HUND, M.; RZANY, B.; STERRY, W.; LADERMANN, J. *In vivo* determination of skin surface topography using an optical 3D device. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 10, p. 207-214, 2004.

JEMEC, G.B.E.; WULF, H.C. Correlation between the greasiness and the plasticizing effect of moisturizers. **Acta Derm. Venereol.**, Stockholm, v. 79, p. 115–117, 1999.

JOHNSON E.A. Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 53, p. 551-575, 1999.

KAMPF, G.; ENNEN, J. Regular use of a hand cream can attenuate skin dryness and roughness caused by frequent hand washing. **BMC Dermatol.**, Londres, v. 13, n. 6, p. 1-5, 2006.

KIM, E.; NAM, G.W.; KIM, S.; LEE, H.; MOON, S.; CHANG, I. Influence of polyol and oil concentration in cosmetic products on skin moisturization and skin surface roughness. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 13, n. 4, p. 417-424, 2007.

KOH, J.S.; KANG, H.; CHOI, S.W.; KIM, H.O. Cigarette smoking associated with premature facial wrinkling: image analysis of facial skin replicas. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 21-27, 2002.

LAMBERT, P.A.; WOLFF, P.H.; DE MAXIMY B.; GHENIM, A. Dimethylaminoethanol in the treatment of neuroleptic-induced tardive dyskinesia. **Ann. Med. Psychol.**, Paris, v. 136, p. 625-629, 1978.

LAUGIER, J.P.K.; MAIBACH, H.I., Bioengineering techniques and skin response evaluation. **Cosm. Toil.**, Carol Stream, v. 114, n. 8, p. 49-51, 1999.

LEE, I.S., YANG, H.M., KIM, J.W., MAENG, Y.J., LEE, C.W., KANG, Y.S., RANG, M.J.; KIM, H.Y. Terminology development and panel training for sensory evaluation of skin care products including aqua cream. **J. Sensory Studies**, Connecticut v. 20, n. 5, p. 421-433, 2005.

LEE, K.K; CHOI, J.D. The effects of Areca cathechu L extract on anti-aging. **Inter J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 21, p. 285-295, 1999.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Application of a non-invasive method to study the moisturizing effect of formulations containing vitamins A or E or ceramide on human skin. **J. Cosmet. Sci.**, New York, v. 53, n. 5, p. 263-268, 2002.

LÉVÊQUE, J.L. EEMCO guidance for the assessment of skin topography. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v. 12, p. 103-114, 1999.

LI L.I.; MAC-MARRY, S.; MARSAUT, D.; SANTHILLIER, J.M.; NOUVEAU, S.; GHARBI, T.; LACHARRIERE, O.; HUMBERT, P. Age-related changes in skin topography and microcirculation. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 294, p. 412-416, 2006.

LINTNER, K. Peptídeos, aminoácidos e proteínas no tratamento da pele. **Cosmetic & Toiletries (Ed. Port.)**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 42-48, 2008.

LODÉN, M. Skin barrier function: effects of moisturizers. **Cosm. Toil.**, Carol Stream, v. 116, n. 6, p. 31-38, 2001.

LU, Y.P.; LOU, Y. R.; YEN, P.; MITCHELL D.; HUANG, M. T.; CONNEY A. H. Time course for early adaptive responses to ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. **Cancer Res.**, Chicago, v. 59, p. 4591-4602, 1999.

MACHADO A.; LIRIA C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MAIA CAMPOS, G. G. M. C. Software versão 8.0. Ribeirão Preto, Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, 1999.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Bases dermocosméticas. **Rev. Cosmiatria Med. Estética**, São Paulo, v. 2, n. 2, 1994.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Desenvolvimento de Produtos Cosméticos. **Cosm. & Toil. (Ed. Port.)**, São Paulo, v. 14, p. 66-69, 2002.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BADRA, M.V.L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol Cosméticos**, São Paulo, v. 79, p. 8-11, 1992.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BENETTON, S.A.; ECCLESTON, G.L. . The influence of the vehicle in the penetration of vitamin A into the skin. In: IFSCC INTERNATIONAL CONFERENCE, 1994, Veneza. Anais. 1994, p. 915-925.

MARKS, R. Mechanical properties of the skin. In: GOLDSMITH, LA, eds. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin, 2nd ed. New York: Oxford University Press, p. 602-621, 1991.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A.H.C. Rheology. In: MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical pharmacy**. 4th ed, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, cap.17, p. 453-473.

MARTINDALE, W. Martindale the Extra Pharmacopeia. Pharmaceutical Press, 1999.

MARZULLI, F.N.; MAIBACH, H.I. Contact allergy: predictive testing in man. **Contact Dermatitis**, New York v. 2, p. 1-17, 1976.

MIGNINI, E. Year 2000: which tests to predict cosmetic products safety and claims substantiation. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 12, 1998, São Paulo. **Anais**. São Paulo, 1998. p.1-13.

MORISSETTE, G.; GERMAIN, L.; MARCEAU, F. The antiwrinkle effect of topical concentrated 2-dimethylaminoethanol involves a vacuolar cytopathology. **Br. J. Dermatol.**, Oxford v. 156, n. 3, p. 433-439, 2007

MUEHLBACH, M.; BRUMMER, R.; EGGERS, R. Study on the transferability of the time temperature superposition principle to emulsions. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford v. 28, n. 2, p. 109-116, 2006.

MURRAY, B.C.; WICKETT, R.R. Correlations between Dermal Torque Meter, Cutometer, and Dermal Phase Meter measurements of human skin. **Skin Res. Technol.** Copenhagen, v. 3, p. 101-106, 1997.

NAÉ, H.N. Introduction to Rheology. In: LABA, D. Rheological properties of cosmetic and toiletries. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.2, p.9-33.

NAGY, I.; FLOYD, R.A. Electron spin resonance spectroscopic demonstration of the hydroxyl free radical scavenger properties of dimethylaminoethanol in spin trapping experiments confirming the molecular basis for the biological effects of centrophenoxine. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 297-310, 1984.

NAGY, I.; NAGY, K. On the role of cross-linking of cellular proteins in aging. **Mech. Ageing Dev.**, Lausanne, v. 14, n. 1-2, p. 245-251, 1980.

NAGY, K.; DAJKO, G.; URAY, I. Comparative studies on the free radical scavenger properties of two nootropic drugs. CPH AND BCE-001. **Ann. N. Y. Acad Sci**, New York, v. 717, p. 115-121, 1994.

NANGIA, A. In vivo measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier functions. **Inter. J. Pharma.**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 31-40, 1998.

NIZET, J.L., PIEÂRARD-FRANCHIMONT, C., PIEÂRARD, G.E. Influence of the body posture and gravitational forces on shear wave propagation in the skin. **Dermatology**, v. 202, n. 2, p. 177-180, 2001.

OBA, A.; GOMI, T.; GRAVES, C.; PEARSE, A.; EDWARDS, C. A non-invasive method for measuring invisible subcutaneous UV damage. In: IFSCC CONGRESS, 22, 2002, Edinburgh, CD-ROM. Edinburgh, 2002.

OGOSHI, K.; SERUP, J. Inter-instrumental variation of skin capacitance measured with the Corneometer. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 11, n. 2, p. 107-109, 2005.

PARENTE, M.F.; GAMBARO, A.; SOLANA, G. Study of sensory properties of emollients used in cosmetics and their correlation with physicochemical properties. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 175–182, 2005.

PATHAK, M.A.; FITZPATRICK, T.B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T. B; EILSEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K.F. 4th ed. *Dermatology in general medicine*, 4th ed., New York: McGraw-Hill, 1993, cap.137, p.1689-1716.

PAYE, M.; MAC-MARY S.; ELKHYAT, A.; TARRIT, C.; MERMET, P.; HUMBERT, P.H. Use of the Reviscometer for measuring cosmetics-induced skin surface effects. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 13, n. 4, p. 343-349, 2007.

PEDERSEN, L. K.; JEMEC, G. B. E. Plasticising effect of water and glycerin on human skin *in vivo*. **J. Dermatol. Sci.**, Amsterdam, v. 18, p. 48–52, 1999.

PENOVICH, P.; MORGAN, J.P.; KERZNER, B.; KARCH, F.; GOLDBLATT, D. Double-blind evaluation of deanol in tardive dyskinesia. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 239, n. 19, p. 1997-1998, 1978.

PERRICONE, N. O Fim das Rugas: Um método natural e definitivo para evitar o envelhecimento da pele. 2. edição. Rio de Janeiro: Campus, p.82, 2001.

PIÉRARD, G.E.; FASKA, N.; CAUWENBERGH, G.; ROBERT, C.; COLE, C.A. Measurement of facial skin firmness: topical treatment with dimethylaminoethanol – Anais do 60th Annual Meeting – American Academy of Dermatology Scientific Posters Presentations – New Orleans, LA – February 22-27, 2002.

PIÉRARD, G.E.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. Fractal microrelief of the skin and nail. **J. Int. Dermatol. Ped.**, v. 8, p. 75–79, 1996.

PIÉRARD, G.E.; UHODA, I.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. From skin microrelief to wrinkles. An area ripe for investigation. **J. Cosm. Dermatol.**, Oxford, v. 2, p. 21-28, 2004.

PUIG, A. Hexapeptídeo: nova alternativa ao combate às rugas. **Cosmetic & Toiletries**, Carol Stream, v. 16, p. 48-50, 2004.

RAAB, W.P. The skin surface and stratum corneum. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 122, p. 37–41, 1990.

RE'O. 2-Dimethylaminoethanol (deanol): a brief review of its clinical efficacy and postulated mechanism of action. **Curr. Ther. Res. Clin. Exp.**, New York, v. 16, p. 1238-1242, 1974.

RIEGER, M. Ceramides: their promise in skin care, **Cosm. Toil.**, Carol Stream, v. 111, p. 33-45, 1996.

RIEGER, M. Water, water, everywhere. **Cosm. Toil.**, Carol Stream, v. 113, p. 75-87, 1998.

ROBERT, C.; ROBERT, A.M.; ROBERT, L. Effect of a fucose-rich polysaccharide preparation on the age-dependent evolution of the skin surface micro-relief. **Pathol. Biol.**, Paris, v. 51, n. 10, p. 586-590, 2003.

ROELANDTS, R. Ageing and photoageing. In: Brian R, Maibach HI (eds) *Cosmetic dermatology*. **Martin Dunitz**, p. 321–330, 1994.

ROGIERS, V. Standardized conditions needed for skin surface hydration measurements. **Cosm. Toil.**, Carol Stream, v. 105, p. 76-82, 1990.

ROGIERS, V. The potential use of non-invasive methods in the safety assessment of cosmetic products – The report and recommendations of ECVAM/EEMCO Workshop 36 Altern Lab Anim, n. 27, p. 515-537, 1996.

ROOSTERMAN, D.; GOERGE, T.; SCHNEIDER, S.W.; BUNNETT, N.W.; STEINHOFF, M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. Review. **Physiol. Rev.**, Washington, v. 86, n. 4, p. 1309-1379, 2006.

ROTHMAN, S. **Physiology and biochemistry of the skin**. Chicago: Chicago Press, p. 221-232, 1954.

RUGGINENTI, A. Effects of dimethylaminoethanol acetyl glutamate on the attentive capacity of a group of soccer players. **Arch. Maragliano Patol. Clin.**, Genova, v. 30, n. 2, p. 189-198, 1974.

RUIZ, M.A.; CLARES B., MORALES M.E., CAZALLA S., GALLARDO V. Preparation and stability of cosmetic formulations with an anti-aging peptide. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford v. 58, n. 2, p. 157-171, 2007.

RUVOLO, E.C. JR; STAMATAS, G.N.; KOLLIAS, N. Skin Viscoelasticity Displays Site- and Age-Dependent Angular Anisotropy. **Skin Pharmacol. Physiol.**, Berlin, v. 20, p. 313-321, 2007.

RYU, H.S.; JOO, Y.H.; KIM, S.O.; PARK, K.C.; YOUN, S.W. Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 354-358, 2008.

SAGIV, A. E.; DIKSTEIN, S.; INGBER, A. The efficiency of humectants as skin moisturizers in the presence of oil. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 7, p. 32-35, 2001.

SAGIV, A.E.; MARCUS, Y. The connection between *in vitro* water uptake and *in vivo* skin moisturization. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 306-311, 2003.

SATO J.; YANAI, M.; HIRAO, T.; DENDA, M. Water content and thickness of the stratum corneum contribute to skin surface morphology. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 292, n. 8, p. 412-417, 2000.

SATOR, P.G.; SCHMIDT, J.B.; SATOR, M.O.; HUBER, J.C.; HONIGSMANN, H. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing - A pilot study. **Maturitas**, Amsterdam, v. 39, n. 1. p. 43-55, 2001.

SEGGER, D.; ABMUS, U.; BROCK, M.; ERASMY, J.; FINKEL, P.; FITZNER, A.; HEUSS, H.; KORTEMEIER, U.; MUNKE, S.; RHEINLÄNDER, T.; SCHMIDT-LEWERKÜHNE, H.; SCHNEIDER, W.; WESER, G. Multicenter study on measurement of the natural pH of the skin surface. **IFSCC Magazine**, Orlando, v.10, n.2, p.107-110, 2007.

SEGGER, D.; MATTHIES, A.; SALDEEN, T. Supplementation with Eskimo Skin Care improves skin elasticity in women. A pilot study. **J. Dermatol. Treat.**, Londres, v. 19, n. 5, p. 279-283, 2008.

SEMENZATO, A. Rheology: a new approach for stability testing and formulation development. In: IFSCC CONGRESS, 21, 2000, Berlin. CD-ROM. Berlin, 2000.

SHIN, S.C.; CHO, C.W.; OH, I.J. Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 222, p. 199–203, 2001.

SILVER, F.H.; SIPERKO, L.M.; SEEHRA, G.P. Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 9, n. 1, p. 3-23, 2003.

SIVILIA, S., PARADISI, M.; D'INTINO, G.; FERNANDEZ, M.; PIRONDI, S.; LORENZINI, L.; CALZA, L. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2008.

SMITH, W. Stratum corneum barrier integrity controls skin homeostasis. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 21, p. 99-106, 1999.

SOMMERFELD, B. Randomised, placebo-controlled, double-blind, split-face study on the clinical efficacy of Tricutan on skin firmness. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 14, n. 11, p. 711-715, 2007.

SORIANO, M. M. J.; CONTRERAS, M. J. F.; FLORES, E. S. Proposal and pharmacotechnical study of a modern dermo-pharmaceutical formulation for cold cream. **Boll. Chim. Farm.**, Milano, v. 135, n. 6, p. 364-373, 1996.

SPENCER, T. S. Dry skin and skin moisturizers. **Clin. Dermatol.**, New York, n. 6, p. 24-28, 1988.

STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. **Cosm. Toil. (Ed. Port.)**, São Paulo, v. 7, p. 29, 1995.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory Evaluation Practices. Academic Press, Orlando, 1992.

SUGATA, K.; NISHIJIMA, T.; KITAHARA, T.; TAKEMA, Y. Etiology of the intrinsic and natural texture of human skin, In: IFSCC CONGRESS, 22, 2002, Edinburgh. CD-ROM. Edinburgh, 2002.

SUMINO, H.; ICHIKAWA, S.; ABE, M.; ENDO, Y.; ISHIKAWA, O.; KURABAYASHI, M. Effects of aging, menopause and hormone replacement therapy on forearm skin elasticity in women. **J. Am. Geriatr. Soc.**, New York, v. 52, p. 945-949, 2004.

TACHINARDI, F.; SÁ DIAS, T.C.; PICIRILI, C.A.D.; GOMES, A.L.; ARRUDA, R. Avaliação sensorial de produtos cosméticos em pele no. **In: XVII COLAMIQC**, Cusco, CD-ROM Cusco, 2005.

TADINI, K.A.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. In vivo skin effects of a DMAE-based formulation. **Pharmazie**, Berlin. *In press*.

TAKEMA, Y.; YORIMOTO, Y.; KAWAI, M.; IMOKAWA, G. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 131, n. 5, p. 641-648, 1994.

TSUKAHARA, K.; TAKEMA, Y.; MORIWAKI, S., FUJIMURA, T.; IMOKAWA, G. Dermal fluid translocation is an important determinant of the diurnal variation in human skin thickness. **British J. Dermatol.**, Lisboa, v. 145, p. 590-596, 2001.

UHODA, I.; FASKA, N.; ROBERT, C.; CAUWENBERGH, G.; PIÉRARD, G. E. Split face study on the cutaneous tensile effect of 2-dimethylaminoethanol (deanol) gel. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 8, p. 164–167, 2002.

VEXLER, A.; POLYANSKY, I.; GORODETSKY, R. Evaluation of skin viscoelasticity and anisotropy by measurement of speed of shear wave propagation with viscoelasticity skin analyzer. **J. Investig. Dermatol.**, New York, v. 113, p. 732-739, 1999.

VOEGELI, D. The effect of washing and drying practices on skin barrier function. **J. Wound Ostomy Contience Nurs.**, St. Louis, v. 35, n. 1, p. 84-90, 2008.

VÖRÖS, E. Age-related changes of the human skin surface microrelief. **Gerontology**, Vancouver, v. 30, p. 276–285, 1990.

WALLO, W.; KOLLIAS, N.; PAYONK, G.; KURTZ, E. S. Clinical instrumental documentation of the skin firming effects of topical dimethylaminoethanol - Anais do 60th Annual Meeting – American Academy of Dermatology Scientific Posters Presentations – New Orleans, LA – February 22-27, 2002.

WHEATER, P. R.; BURKITT, H. G.; DANIELS, V. G. Histologia funcional - texto e atlas, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1982. p. 49-63, 116-126.

WIECHERS, J.W.; BARLOW, T. Skin moisturization and elasticity originate from at least two different mechanisms. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 21, p. 425-435, 1999.

WORTEL, V.A.L.; WIECHERS, J.W. Skin sensory performance of individual personal care ingredients and marketed personal care products. **Food Qual. Pref.**, Oxford, v. 11, p. 121–127, 2000.

YAMAMURA, T.; TEZUKA, T. The water-holding capacity of the stratum corneum measured by ¹H-NMR. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 93, p. 160-164, 1989.

YOSHIZAWA, Y.; KITAMURA, K.; KAWANA, S.; MAIBACH, H. I. Water, salts and skin barrier of normal skin. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v. 9, p. 31-33, 2003.

Apêndices

Apêndice A – Notas atribuídas pelas voluntárias na avaliação sensorial

Tabela 1 - Notas atribuídas pelas voluntárias às formulações F1 e F4.

Formulações							
Toque e pegajosidade		Espalhabilidade e aparência na pele		Sensação imediata		Sensação após cinco minutos	
F1	F4	F1	F4	F1	F4	F1	F4
2	4	2	3	1	3	4	4
2	3	2	4	3	3	2	5
3	4	3	5	3	4	4	4
3	4	2	4	4	4	4	4
5	4	4	5	4	4	4	4
4	5	4	4	5	5	5	5
4	4	5	4	5	4	4	4
4	4	5	5	5	5	5	5
2	4	4	5	3	4	2	4
4	2	5	2	5	3	5	5
3	4	4	4	4	4	4	4
3	3	4	4	3	3	5	5
2	4	3	4	3	5	3	5
3	4	3	5	3	4	3	4
3	3	3	4	4	3	3	3
5	4	5	5	5	5	5	4
3	4	5	5	3	4	5	3
4	4	5	4	5	4	5	4
4	3	5	3	5	3	5	3
3	5	4	5	4	5	4	5

Tabela 2 - Notas atribuídas pelas voluntárias às formulações F1A e F4A.

Formulações							
Toque e pegajosidade		Espalhabilidade e aparência na pele		Sensação imediata		Sensação após cinco minutos	
F1A	F4A	F1A	F4A	F1A	F4A	F1A	F4A
2	5	4	5	3	4	4	4
3	5	4	4	3	4	5	4
3	4	4	4	4	4	3	5
5	5	5	5	5	4	5	5
4	4	3	4	4	3	3	4
3	5	4	4	4	4	4	5
4	5	4	4	4	4	5	5
4	4	5	5	5	5	4	4
3	5	5	5	3	5	5	4
3	4	3	5	4	3	3	4
4	5	3	5	5	4	5	4
5	4	5	5	4	4	5	5
4	4	4	4	5	4	5	4
3	4	3	5	3	5	3	5
4	1	5	2	5	1	4	2
4	4	4	5	5	4	4	4
4	5	4	5	4	5	4	5
2	4	3	4	2	4	2	5
3	4	3	4	4	4	3	4
3	5	2	4	4	3	5	5

Apêndice A - Notas atribuídas pelas voluntárias na avaliação sensorial

Tabela 3 - Notas atribuídas pelas voluntárias às formulações F1D e F4D.

Formulações							
Toque e pegajosidade		Espalhabilidade e aparência na pele		Sensação imediata		Sensação após cinco minutos	
F1D	F4D	F1D	F4D	F1D	F4D	F1D	F4D
4	3	4	3	4	3	4	3
4	4	4	4	5	4	5	3
2	3	3	3	3	3	4	4
3	4	4	4	3	3	4	4
2	3	4	4	3	4	3	4
2	5	3	5	3	5	2	4
2	4	3	4	4	4	3	5
3	4	5	5	3	5	4	5
2	4	2	5	3	3	4	4
3	3	2	4	3	4	3	4
4	5	4	5	5	5	5	5
3	4	2	4	2	4	3	4
2	4	2	4	1	4	2	4
4	5	5	5	4	5	4	5
3	3	4	4	3	4	1	5
3	4	4	4	4	4	3	4
3	4	4	4	2	5	3	5
2	3	3	3	4	3	3	4
3	4	3	4	4	4	4	3
3	4	3	4	4	5	2	4

Tabela 4 - Notas atribuídas pelas voluntárias às formulações F1AD e F4AD.

Formulações							
Toque e pegajosidade		Espalhabilidade e aparência na pele		Sensação imediata		Sensação após cinco minutos	
F1AD	F4AD	F1AD	F4AD	F1AD	F4AD	F1AD	F4AD
5	5	5	5	5	5	5	5
5	5	4	5	5	5	5	5
3	4	3	5	3	5	2	4
3	5	3	5	3	5	4	5
4	4	5	5	4	5	5	5
4	4	3	4	3	2	4	3
3	4	3	4	2	2	2	2
3	4	2	3	2	3	2	3
5	5	4	5	5	4	5	5
4	5	3	5	5	5	3	3
4	4	4	5	4	5	5	5
5	4	5	5	5	4	5	5
3	5	3	4	4	4	3	3
3	5	5	5	5	4	1	4
3	5	2	5	3	4	4	4
2	4	1	5	2	5	1	4
2	4	2	5	3	4	1	4
2	4	3	4	2	4	2	4
3	4	2	4	4	4	2	4
2	4	4	4	4	3	5	3

Apêndice B

Tabela 5 - Conteúdo aquoso do estrato córneo dos antebraços das voluntárias obtidos na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações				
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	49,10	51,20	46,70	51,90	45,90
	49,00	43,90	49,00	51,30	43,80
	47,30	45,20	48,40	42,50	41,00
	29,10	34,10	32,20	32,30	38,60
	34,30	38,70	30,30	36,20	31,30
	49,40	49,20	47,30	46,00	39,00
	38,10	35,10	39,30	39,10	38,70
	33,80	37,90	36,10	32,50	33,10
	49,90	55,00	51,30	50,00	53,10
	43,80	43,80	42,80	48,40	44,50
	2 horas	48,90	54,40	47,40	50,50
42,20		47,40	54,90	53,20	45,80
49,50		52,00	51,30	56,90	47,20
30,50		42,20	50,80	44,30	40,50
31,40		47,90	34,50	46,20	42,60
47,60		50,80	52,80	49,70	43,00
42,40		44,70	58,20	42,80	48,30
38,20		58,40	55,50	46,90	54,70
50,10		58,30	64,50	54,10	58,20
47,50		65,80	67,60	63,10	62,50

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice C

Tabela 6 – Valores de perda transepidérmica de água dos antebraços das voluntárias obtidos na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações				
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	4,34	2,32	4,34	2,40	3,22
	3,08	2,66	2,72	2,76	2,98
	4,88	5,84	4,42	4,66	5,08
	5,14	4,64	4,70	4,38	3,74
	2,24	2,96	5,14	6,18	4,78
	2,46	2,96	2,86	3,18	3,92
	5,36	3,06	2,74	4,64	2,94
	3,34	2,50	3,38	2,50	2,46
	2,72	4,82	4,02	6,00	4,16
	5,24	5,24	4,22	5,00	5,06
	2 horas	4,42	2,46	3,50	2,04
2,96		1,78	3,48	2,20	2,30
5,24		3,98	2,80	2,40	2,78
2,60		3,20	1,90	2,20	2,06
2,56		1,04	2,34	4,24	2,20
2,25		2,06	1,52	2,98	1,80
5,74		2,58	1,18	2,90	1,84
2,82		2,48	2,24	2,10	2,12
3,10		4,50	2,94	4,42	3,92
5,16		3,88	3,18	3,68	2,10

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice D - Propriedade viscoelásticas da pele antes e após 2 horas de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 7 - Elasticidade total da pele dos antebraços, relação da retração total com a distensão total (U_a/U_f), medida na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	0,698	0,681	0,595	0,724	0,709	
	0,763	0,750	0,787	0,767	0,756	
	0,622	0,643	0,711	0,708	0,667	
	0,610	0,736	0,667	0,867	0,771	
	0,815	0,852	0,826	0,750	0,760	
	0,875	0,903	0,800	0,958	0,897	
	0,781	0,816	0,794	0,857	0,786	
	0,848	0,818	0,868	0,813	0,795	
	0,829	0,788	0,875	0,842	0,775	
	0,727	0,565	0,784	0,771	0,814	
	2 horas	0,739	0,804	0,684	0,815	0,793
		0,796	0,723	0,750	0,739	0,705
		0,714	0,646	0,733	0,848	0,654
0,841		0,804	0,811	0,891	0,829	
0,818		0,853	0,828	0,720	0,800	
0,844		0,829	0,821	0,923	0,839	
0,818		0,868	0,871	0,844	0,867	
0,794		0,844	0,878	0,838	0,853	
0,795		0,848	0,816	0,629	0,846	
0,743		0,714	0,824	0,794	0,826	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Tabela 8 - Elasticidade da pele dos antebraços, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e), medida na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	0,694	0,615	0,528	0,686	0,694	
	0,774	0,659	0,825	0,730	0,684	
	0,590	0,588	0,684	0,700	0,650	
	0,543	0,674	0,615	0,763	0,690	
	0,950	1,000	0,941	0,700	0,750	
	0,960	1,042	0,895	1,111	1,000	
	0,769	0,848	0,821	0,867	0,818	
	0,846	0,861	0,903	0,840	0,812	
	0,862	0,808	1,000	0,875	0,765	
	0,704	0,556	0,806	0,821	0,833	
	2 horas	0,718	0,816	0,613	0,833	0,780
		0,744	0,641	0,732	0,684	0,605
		0,686	0,641	0,737	0,838	0,614
0,789		0,789	0,862	0,833	0,743	
0,750		0,893	0,826	0,632	0,864	
0,960		0,893	0,905	1,000	0,917	
0,846		0,875	0,846	0,815	0,917	
0,786		0,895	0,943	0,933	0,889	
0,794		0,885	0,844	0,607	0,879	
0,750		0,667	0,852	0,857	0,821	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice D - Propriedade viscoelásticas da pele antes e após 2 horas de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 9 - Elasticidade da pele dos antebraços, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e), medida na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	0,194	0,205	0,167	0,137	0,122	
	0,226	0,182	0,175	0,162	0,184	
	0,154	0,235	0,184	0,200	0,200	
	0,171	0,152	0,154	0,184	0,143	
	0,350	0,350	0,353	0,200	0,250	
	0,280	0,292	0,316	0,333	0,261	
	0,231	0,152	0,214	0,167	0,273	
	0,269	0,222	0,226	0,280	0,219	
	0,207	0,269	0,280	0,187	0,176	
	0,222	0,278	0,194	0,250	0,194	
	2 horas	0,179	0,211	0,226	0,125	0,160
		0,140	0,205	0,171	0,211	0,158
		0,200	0,231	0,184	0,243	0,182
0,158		0,211	0,276	0,146	0,171	
0,179		0,214	0,261	0,316	0,364	
0,280		0,250	0,333	0,300	0,292	
0,269		0,187	0,192	0,185	0,250	
0,214		0,184	0,171	0,233	0,259	
0,147		0,269	0,187	0,250	0,182	
0,250		0,333	0,259	0,214	0,179	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Tabela 10 - Elasticidade da pele dos antebraços, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f), medida na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	0,581	0,511	0,552	0,603	0,618	
	0,632	0,558	0,702	0,628	0,578	
	0,511	0,476	0,578	0,583	0,542	
	0,563	0,585	0,533	0,644	0,604	
	0,704	0,741	0,696	0,583	0,600	
	0,750	0,706	0,680	0,833	0,793	
	0,625	0,737	0,676	0,743	0,643	
	0,667	0,705	0,737	0,656	0,667	
	0,714	0,636	0,781	0,737	0,650	
	0,576	0,535	0,676	0,657	0,698	
	2 horas	0,609	0,674	0,500	0,741	0,672
		0,653	0,532	0,625	0,565	0,523
		0,571	0,521	0,622	0,674	0,519
0,682		0,652	0,676	0,727	0,634	
0,636		0,735	0,655	0,480	0,633	
0,750		0,714	0,679	0,669	0,710	
0,667		0,737	0,710	0,688	0,733	
0,647		0,756	0,705	0,757	0,706	
0,692		0,697	0,711	0,486	0,744	
0,600		0,500	0,676	0,706	0,696	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice E – Valores do micro-relevo cutâneo antes e após 2 horas de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 11 - Aspereza da pele (Se_r) dos antebraços das voluntárias obtidos na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	1,43	0,63	1,32	0,63	1,42	
	1,66	0,56	1,35	1,86	1,00	
	2,57	1,64	1,86	2,21	1,56	
	1,60	2,07	1,40	2,46	2,15	
	1,47	1,51	0,87	2,24	1,70	
	0,90	0,86	1,02	0,82	1,02	
	0,82	1,41	1,42	1,09	1,04	
	0,66	0,84	1,05	0,75	0,67	
	2,11	1,35	1,37	2,69	1,12	
	1,70	1,12	1,18	1,48	0,83	
	2 horas	1,92	0,83	1,20	0,49	0,90
		1,03	0,98	1,46	0,93	2,01
		1,83	1,92	2,10	1,36	1,62
1,48		1,66	1,38	1,18	2,43	
1,00		0,86	1,77	2,44	1,41	
0,79		0,79	1,01	1,64	1,54	
1,18		1,30	1,01	0,90	1,67	
1,24		0,68	0,72	1,43	1,01	
0,77		1,57	2,28	1,51	1,16	
0,99		1,48	0,47	1,11	1,17	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Tabela 12 - Número de rugas (Se_w) dos antebraços das voluntárias obtidos na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	43,13	44,29	44,29	40,29	43,13	
	37,94	41,07	41,27	45,00	45,00	
	42,86	42,87	42,19	44,29	46,15	
	42,86	46,00	44,29	42,87	48,87	
	40,95	43,73	43,39	40,37	39,71	
	40,95	40,29	38,65	43,13	38,65	
	40,52	37,90	39,71	40,75	40,00	
	41,07	45,00	46,00	46,30	41,27	
	38,35	35,84	36,33	34,29	38,00	
	41,96	41,54	38,62	40,29	37,94	
	2 horas	43,13	46,50	40,52	48,21	38,62
		42,87	37,94	38,65	39,71	39,71
		38,35	40,95	38,62	45,00	43,39
43,39		45,80	42,87	43,73	46,30	
48,87		45,43	42,35	42,87	40,37	
40,29		40,29	35,78	40,52	40,37	
40,29		39,71	37,94	40,95	36,59	
40,75		46,30	48,87	40,95	46,92	
37,10		35,29	38,00	35,84	42,35	
40,75		38,00	37,94	36,59	42,86	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice E – Valores do micro-relevo cutâneo antes e após 2 horas de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 13 - Textura da pele (Se_{sm}) dos antebraços das voluntárias obtidos na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	44,16	39,68	53,85	54,51	52,44	
	82,55	46,08	58,56	53,01	58,59	
	58,97	54,87	55,35	55,27	57,23	
	27,43	25,67	28,34	32,92	27,86	
	37,84	48,98	36,10	38,63	39,31	
	45,94	54,51	48,61	44,16	48,61	
	34,77	45,09	34,07	36,31	42,24	
	36,59	40,46	41,35	35,88	34,05	
	37,81	46,42	52,14	43,20	38,76	
	40,15	42,49	35,46	37,23	36,12	
	2 horas	35,88	36,04	42,79	40,50	44,65
		63,10	45,14	51,24	32,76	47,17
59,97		45,94	61,72	55,80	49,99	
23,61		24,14	26,06	26,59	21,53	
46,91		50,88	39,30	30,18	38,63	
51,85		51,85	47,59	40,11	57,28	
34,57		39,31	34,83	28,38	38,42	
33,62		37,32	43,98	35,13	34,91	
38,96		39,53	49,10	36,38	32,53	
37,66		40,06	33,54	37,14	37,03	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Tabela 14 - Rugosidade da pele (Rt) dos antebraços das voluntárias obtidos na região controle e nas regiões que receberam a aplicação das formulações, antes e após 2 horas de aplicação única.

Tempo	Formulações					
	Controle	F4	F4A	F4D	F4AD	
Inicial	60,00	50,00	74,00	67,00	63,00	
	78,00	54,00	70,00	65,00	66,00	
	76,00	76,00	75,00	55,00	72,00	
	43,00	37,00	41,00	56,00	38,00	
	56,00	63,00	51,00	54,00	61,00	
	58,00	60,00	67,00	57,00	67,00	
	47,00	61,00	48,00	52,00	53,00	
	50,00	50,00	51,00	52,00	49,00	
	52,00	59,00	64,00	63,00	52,00	
	64,00	54,00	48,00	60,00	59,00	
	2 horas	45,00	52,00	53,00	60,00	51,00
		59,00	62,00	44,00	60,00	70,00
65,00		69,00	66,00	67,00	77,00	
41,00		39,00	41,00	34,00	33,00	
55,00		53,00	44,00	53,00	59,00	
65,00		60,00	58,00	69,00	65,00	
52,00		51,00	43,00	56,00	44,00	
50,00		50,00	50,00	46,00	47,00	
53,00		62,00	53,00	42,00	49,00	
56,00		49,00	51,00	48,00	50,00	

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice F

Tabela 15 - Conteúdo aquoso do estrato córneo dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	45,15	51,65	48,75	44,60
	56,75	40,90	58,20	42,45
	46,00	38,00	53,70	42,25
	41,80	34,20	41,95	32,05
	43,25	38,05	49,05	36,10
	25,40	44,45	27,40	41,80
	39,05	52,00	37,00	34,20
	42,40	47,65	41,15	47,00
	36,00	51,20	39,10	53,90
	34,10	46,70	31,05	44,10
	43,60	41,70	38,25	42,70
	36,40	37,80	43,15	37,10
	38,15	40,95	33,55	43,25
	46,05	37,95	48,95	37,90
	34,70	36,50	31,70	34,20
	51,10	41,70	47,00	38,75
	23,10	26,60	25,65	29,90
	44,65	41,65	44,55	45,65
	40,40	54,10	42,20	54,05
	37,10	38,15	37,45	40,40
14 dias	50,25	48,70	56,65	41,60
	59,10	46,70	55,55	49,85
	61,80	55,80	60,30	56,55
	46,30	49,50	41,10	45,00
	51,60	42,95	49,25	38,90
	38,55	56,05	38,55	51,90
	39,10	47,30	32,75	40,95
	47,40	57,20	42,95	59,20
	42,45	46,95	44,95	50,25
	35,05	63,30	33,00	60,55
	55,60	50,25	50,25	44,35
	67,75	37,45	61,10	36,35
	45,25	39,15	46,65	39,10
	52,85	41,90	53,35	42,15
	40,75	39,10	35,30	34,05
	68,55	44,25	63,55	43,20
	41,15	32,80	34,95	34,30
	48,00	45,85	42,85	47,90
	57,90	54,15	60,50	60,40
	41,30	48,70	42,95	41,60
28 dias	51,00	48,75	54,00	43,15
	61,50	51,20	58,05	56,40
	44,35	45,30	56,30	44,90
	44,30	49,10	41,50	42,95
	49,45	45,30	54,15	40,95
	46,20	56,75	43,10	55,20
	50,25	40,85	58,10	41,45
	44,30	53,55	48,75	61,55
	46,15	49,20	47,05	45,80
	38,95	60,35	37,90	56,60
	52,35	53,10	50,40	50,30
	65,85	44,50	56,60	40,55
	44,95	43,85	45,50	43,35
	47,70	47,80	44,35	51,20
	51,45	39,70	46,75	38,40
	51,25	43,30	50,75	39,90
	37,05	36,70	38,65	36,80
	42,85	46,85	41,45	49,10
	64,50	60,95	61,25	65,70
	46,55	45,50	44,10	44,65

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice G

Tabela 16 - Conteúdo aquoso do estrato córneo da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	58,45	45,05	48,80	51,85
	57,35	50,10	54,50	54,05
	48,15	40,40	48,50	44,05
	40,30	37,60	42,30	43,50
	59,50	42,55	45,00	47,20
	57,90	37,95	48,85	46,75
	51,05	34,65	47,60	36,40
	52,65	35,15	43,30	37,95
	40,45	43,75	51,20	36,00
	31,10	42,20	42,20	35,40
	32,20	48,85	56,25	51,80
	33,40	50,90	60,15	42,65
	49,45	50,40	44,25	43,60
	45,35	55,95	39,20	37,15
	54,45	49,15	60,50	45,50
	49,90	51,05	61,00	44,30
	55,75	53,05	50,25	56,35
	61,70	52,10	48,80	51,30
	34,15	44,35	48,85	50,05
	41,45	37,00	40,75	54,70
14 dias	55,25	52,35	56,05	53,90
	56,75	58,35	58,40	52,30
	40,10	56,85	61,85	48,90
	45,00	54,75	59,10	42,50
	64,25	52,95	53,35	50,90
	64,50	50,65	52,70	51,60
	55,70	49,60	50,80	46,80
	56,20	50,15	59,35	45,65
	48,38	49,15	48,95	48,90
	39,80	52,05	50,05	44,30
	42,05	63,60	67,90	47,70
	37,50	67,45	64,10	55,60
	47,15	58,25	47,95	45,15
	51,20	50,30	44,60	41,25
	62,40	47,65	57,00	50,10
	53,10	54,00	54,95	49,45
	69,25	57,15	64,90	57,30
	65,00	53,70	63,65	60,40
	47,30	54,85	51,65	47,25
	49,85	52,15	52,15	49,75
28 dias	53,00	52,75	58,50	65,75
	56,65	55,75	62,25	63,00
	47,05	54,15	58,25	52,70
	49,85	49,90	60,70	43,90
	69,15	46,80	53,10	48,25
	67,40	49,65	52,35	50,05
	54,40	43,05	46,45	57,85
	56,80	49,65	53,70	49,90
	46,10	52,85	49,20	44,95
	48,05	50,10	53,05	47,45
	43,15	59,00	55,50	54,40
	45,15	64,80	58,25	50,05
	56,10	60,75	54,05	41,00
	46,90	51,50	55,65	47,70
	57,05	59,20	67,65	52,15
	65,80	54,55	52,80	54,45
	69,55	55,25	68,35	65,40
	74,35	54,75	62,70	57,25
	60,75	50,25	53,20	50,25
	56,60	44,05	51,25	51,75

F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE.

Apêndice H - Características anisotrópicas da pele após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços

Tabela 17 – RRTM máximo dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	285,75	294,50	269,50	206,75
	254,75	271,25	171,50	231,50
	235,75	221,00	262,25	167,75
	181,00	318,25	238,00	281,50
	268,75	275,75	143,75	119,25
	228,00	255,00	217,50	253,00
	232,00	246,50	226,75	197,75
	254,75	318,00	252,00	304,25
	383,00	397,50	308,75	296,50
	230,25	473,50	150,00	290,75
	209,25	422,50	118,75	137,00
	573,75	247,25	254,50	188,50
	495,75	249,75	178,25	157,00
	239,50	342,25	442,25	170,75
	265,75	227,00	331,25	231,50
	188,25	227,75	366,50	309,25
	196,25	185,75	358,25	239,75
	100,75	410,00	130,25	278,25
	191,00	234,25	185,25	333,50
	206,25	212,50	171,25	332,50
14 dias	274,25	219,75	261,75	163,75
	283,50	329,50	220,00	314,25
	290,50	273,00	277,50	248,00
	253,75	229,00	183,25	239,50
	171,25	229,50	206,50	227,75
	228,25	287,00	187,75	161,00
	182,50	201,50	210,00	154,00
	263,25	228,50	288,25	277,50
	279,25	274,00	278,25	237,00
	157,25	194,00	149,00	195,00
	291,25	203,00	182,50	181,25
	200,50	175,50	208,75	223,00
	233,25	239,00	137,00	179,00
	190,25	173,50	211,00	163,75
	169,75	175,50	212,75	216,75
	259,75	202,00	228,00	283,00
	213,75	211,75	252,25	243,25
	114,50	171,00	217,00	192,25
	324,25	288,00	242,50	260,50
	158,75	210,50	207,00	250,25
28 dias	337,25	329,00	322,25	260,00
	321,00	308,75	279,75	262,50
	184,25	207,75	197,25	122,50
	298,00	205,33	160,00	237,00
	326,50	225,25	229,75	303,75
	224,00	313,50	190,00	261,75
	253,75	210,25	211,00	358,25
	254,75	192,25	277,75	219,75
	377,25	340,75	277,00	306,75
	149,50	264,25	195,75	236,25
	156,00	185,00	210,00	284,00
	221,75	225,00	280,00	284,50
	198,50	250,50	344,25	185,25
	182,25	171,00	182,25	336,25
	186,50	208,00	193,00	310,25
	220,25	264,25	228,25	338,50
	160,00	170,25	223,75	181,25
	201,25	162,75	130,75	159,00
	339,50	243,00	189,50	283,00
	205,00	330,25	185,25	225,50

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice H - Características anisotrópicas da pele após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços

Tabela 18 – RRTM mínimo dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	111,75	113,75	169,00	87,50
	74,00	114,00	105,25	96,75
	79,50	105,50	98,00	74,75
	88,25	63,75	78,50	77,00
	58,00	78,75	65,25	65,75
	94,75	85,00	85,75	111,75
	114,00	80,00	142,50	76,00
	90,50	95,00	99,00	105,75
	83,25	116,75	123,25	114,25
	83,75	221,00	88,50	97,75
	102,75	115,25	77,25	73,75
	229,25	98,25	96,00	51,25
	270,75	178,75	52,00	114,25
	88,50	154,50	92,00	103,50
	115,50	117,25	146,75	122,50
	136,50	125,75	73,50	101,50
	91,00	89,50	66,00	87,50
	32,25	88,50	85,25	172,00
	49,75	70,25	98,00	178,75
	130,00	100,25	117,25	112,75
14 dias	132,25	132,25	130,50	141,00
	110,50	106,75	97,75	137,75
	108,25	139,75	128,00	146,75
	88,75	65,50	101,75	85,50
	85,25	124,50	61,75	141,50
	157,75	96,50	116,25	99,25
	138,00	107,00	138,75	105,75
	78,75	114,75	129,75	72,50
	166,50	113,25	159,25	132,50
	110,25	66,00	87,75	89,75
	68,00	119,75	97,25	98,75
	113,75	125,50	82,75	75,50
	109,00	172,25	52,50	118,25
	99,75	132,00	113,25	137,75
	128,75	132,00	114,00	87,75
	170,75	126,75	160,00	65,50
	123,50	130,25	117,50	98,50
	26,25	53,75	49,00	108,50
	185,25	81,50	116,75	112,25
	113,75	135,25	66,00	100,25
28 dias	124,75	156,50	84,00	109,50
	104,50	99,25	134,00	101,00
	98,50	84,25	77,75	70,75
	111,75	80,00	85,25	79,25
	80,00	147,75	79,00	96,25
	108,00	109,00	121,00	102,50
	137,75	99,50	178,75	84,75
	134,25	104,50	121,00	107,25
	106,75	129,50	123,75	151,25
	87,75	107,25	135,50	124,75
	90,50	122,75	89,50	123,75
	130,00	118,25	125,25	146,75
	156,50	117,75	144,00	103,50
	107,00	149,50	107,00	132,25
	118,50	124,25	128,50	90,50
	140,75	100,50	125,25	88,75
	106,75	99,50	90,25	99,50
	58,75	123,50	80,50	129,75
	109,75	217,00	96,25	153,50
	129,25	125,75	121,25	165,75

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice H - Características anisotrópicas da pele após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços

Tabela 19 – RRTM médio dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	202,88	177,81	212,94	127,13
	160,50	192,06	148,00	145,75
	158,38	146,38	165,63	119,44
	132,81	141,69	133,69	141,69
	114,38	135,63	98,50	90,38
	138,94	131,88	153,38	166,06
	161,06	128,69	171,13	136,69
	142,94	163,81	152,88	180,06
	214,88	230,25	201,75	195,06
	150,31	315,56	111,06	172,25
	134,50	223,00	98,25	106,94
	389,50	196,44	162,06	86,88
	381,94	221,13	110,81	129,44
	134,50	214,06	273,50	133,94
	183,31	172,06	227,69	188,56
	162,94	171,06	195,44	193,25
	137,31	138,25	165,19	156,63
	70,94	188,31	117,31	216,19
	107,00	118,38	152,06	264,06
	150,69	136,81	145,88	199,56
14 dias	199,13	170,75	185,13	154,94
	191,31	193,56	152,25	192,31
	199,06	174,56	191,19	185,25
	147,56	119,88	131,50	152,13
	117,06	165,56	104,69	186,00
	192,06	151,00	149,38	129,81
	159,25	147,81	176,19	124,19
	142,88	153,69	186,94	141,25
	222,13	187,94	196,19	199,81
	134,38	143,63	116,81	146,19
	146,06	152,25	129,81	133,75
	160,06	153,25	148,81	161,75
	173,63	207,44	107,50	152,38
	140,50	155,75	153,50	147,81
	149,13	156,19	147,19	151,50
	209,69	162,75	193,19	150,88
	162,06	157,88	172,50	149,69
	67,31	129,06	99,06	156,31
	243,00	166,19	160,13	169,06
	135,25	166,44	135,88	202,81
28 dias	229,69	214,25	157,31	165,19
	170,44	183,88	212,44	161,00
	134,75	132,44	128,94	100,00
	176,31	126,40	119,81	124,25
	164,13	179,00	141,56	172,94
	150,75	210,19	158,88	160,94
	174,69	146,25	197,50	190,75
	171,00	132,81	201,94	160,94
	208,19	218,75	199,50	217,75
	118,13	157,25	158,19	174,94
	116,88	142,25	145,13	206,31
	164,38	150,56	206,63	210,50
	168,38	174,69	214,13	141,13
	140,88	157,31	140,88	220,06
	145,19	172,81	151,56	171,56
	169,25	184,63	169,88	180,25
	133,38	133,06	138,44	139,06
	126,44	140,63	106,94	150,06
	189,31	228,56	144,69	201,56
	165,00	229,25	158,31	183,06

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice H - Características anisotrópicas da pele após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços

Tabela 20 – Anisotropia ($RRTM_{\text{máximo}} / RRTM_{\text{mínimo}}$) da pele dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	2,56	2,59	1,59	2,36
	3,44	2,38	1,63	2,39
	2,97	2,09	2,68	2,24
	2,05	4,99	3,03	3,66
	4,63	3,50	2,20	1,81
	2,41	3,00	2,54	2,26
	2,04	3,08	1,59	2,60
	2,81	3,35	2,55	2,88
	4,60	3,40	2,51	2,60
	2,75	2,14	1,69	2,97
	2,04	3,67	1,54	1,86
	2,50	2,52	2,65	3,68
	1,83	1,40	3,43	1,37
	2,71	2,22	4,81	1,65
	2,30	1,94	2,26	1,89
	1,38	1,81	4,99	3,05
	2,16	2,08	5,43	2,74
	3,12	4,63	1,53	1,62
	3,84	3,33	1,89	1,87
	1,59	2,12	1,46	2,95
14 dias	2,07	1,66	2,01	1,16
	2,57	3,09	2,25	2,28
	2,68	1,95	2,17	1,69
	2,86	3,50	1,80	2,80
	2,01	1,84	3,34	1,61
	1,45	2,97	1,62	1,62
	1,32	1,88	1,51	1,46
	3,34	1,99	2,22	3,83
	1,68	2,42	1,75	1,79
	1,43	2,94	1,70	2,17
	4,28	1,70	1,88	1,84
	1,76	1,40	2,52	2,95
	2,14	1,39	2,61	1,51
	1,91	1,31	1,86	1,19
	1,32	1,33	1,87	2,47
	1,52	1,59	1,43	4,32
	1,73	1,63	2,15	2,47
	4,36	3,18	4,43	1,77
	1,75	3,53	2,08	2,32
	1,40	1,56	3,14	2,50
28 dias	2,70	2,10	3,84	2,37
	3,07	3,11	2,09	2,60
	1,87	2,47	2,54	1,73
	2,67	2,57	1,88	2,99
	4,08	1,52	2,91	3,16
	2,07	2,88	1,57	2,55
	1,84	2,11	1,18	4,23
	1,90	1,84	2,30	2,05
	3,53	2,63	2,24	2,03
	1,70	2,46	1,44	1,89
	1,72	1,51	2,35	2,29
	1,71	1,90	2,24	1,94
	1,27	2,13	2,39	1,79
	1,70	1,14	1,70	2,54
	1,57	1,67	1,50	3,43
	1,56	2,63	1,82	3,81
	1,50	1,71	2,48	1,82
	3,43	1,32	1,62	1,23
	3,09	1,12	1,97	1,84
	1,59	2,63	1,53	1,36

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice I - Características anisotrópicas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 21 – RRTM máximo da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	151,00	200,00	113,50	269,25
	123,50	136,25	142,00	271,00
	173,75	290,75	129,50	103,75
	243,00	401,75	245,00	270,50
	170,25	104,25	346,25	151,00
	372,50	247,50	437,75	344,25
	241,25	255,25	138,50	181,00
	315,50	340,50	205,75	289,00
	135,00	145,00	445,50	131,00
	392,25	319,25	391,50	267,00
	270,50	320,00	225,25	405,25
	400,25	157,00	447,50	537,75
	254,25	98,25	100,00	163,00
	600,00	145,00	193,25	137,00
	607,25	208,00	235,00	192,75
	430,50	252,25	259,50	498,00
	311,50	298,25	328,00	333,25
	367,00	277,50	439,50	301,75
	215,75	301,25	329,00	166,25
	366,25	158,00	174,00	345,00
14 dias	107,50	125,00	156,75	174,50
	157,00	225,00	233,00	286,00
	133,25	217,00	185,00	181,00
	229,50	346,75	277,25	204,75
	221,75	221,00	353,00	304,00
	289,25	262,50	368,00	301,00
	272,25	307,25	186,75	336,00
	353,75	289,00	197,50	291,75
	322,25	187,25	272,00	146,50
	383,00	230,50	320,25	193,00
	269,25	194,75	340,00	151,25
	319,25	222,50	429,25	373,75
	254,50	128,50	179,75	213,50
	574,75	182,75	286,75	198,25
	250,75	172,50	156,75	138,75
	277,75	277,75	220,75	166,00
	440,00	182,25	215,00	228,50
	637,25	227,50	265,75	229,75
	219,00	201,25	178,00	225,50
	277,00	235,00	346,50	250,75
28 dias	149,00	153,25	271,75	230,50
	392,00	273,00	228,25	377,00
	396,00	367,00	263,00	134,50
	441,50	434,00	270,50	336,75
	192,25	250,75	341,25	259,00
	291,25	218,25	386,00	227,00
	276,25	410,50	235,50	163,00
	313,25	370,00	245,50	392,00
	212,00	173,75	336,00	236,75
	341,75	214,75	307,75	354,00
	310,75	161,75	245,25	275,50
	395,75	185,25	295,50	465,00
	260,75	112,50	175,25	200,25
	407,50	105,50	175,50	157,00
	238,50	167,25	122,50	140,25
	197,25	197,25	155,25	127,25
	615,00	195,50	144,00	249,00
	428,00	305,50	162,75	135,50
	272,75	334,50	138,25	145,75
	148,00	223,00	309,25	225,50

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice I - Características anisotrópicas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 22 – RRTM mínimo da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	110,00	109,75	91,50	139,00
	99,00	70,50	80,75	185,75
	97,75	186,50	88,25	86,25
	108,00	315,00	216,25	103,50
	86,75	86,25	262,50	128,75
	119,75	119,50	364,25	113,00
	153,50	145,75	108,50	113,00
	223,75	186,00	101,75	162,50
	123,50	125,75	297,50	81,25
	177,25	131,00	347,25	101,00
	178,00	123,75	115,50	123,75
	132,00	74,25	192,25	273,25
	112,25	78,00	77,00	82,25
	335,50	31,25	81,25	100,50
	130,00	47,25	61,00	71,50
	135,25	41,50	63,00	74,25
	150,50	190,25	78,50	44,25
	82,25	123,00	68,75	105,50
	56,25	53,25	86,75	43,25
	69,50	75,00	81,00	34,75
14 dias	77,50	101,75	76,50	131,25
	98,00	96,00	115,25	127,25
	109,25	176,25	162,50	107,75
	115,75	216,50	237,25	105,25
	135,75	113,25	178,00	121,21
	164,50	143,00	199,00	151,00
	188,25	197,75	109,50	117,25
	202,00	201,75	125,75	126,50
	120,00	116,00	158,25	108,25
	210,25	145,75	235,25	115,75
	222,50	130,75	158,00	106,75
	174,50	122,50	149,75	310,00
	105,00	102,75	94,00	116,50
	204,50	126,25	104,75	115,75
	114,25	159,00	136,50	130,50
	115,75	157,50	127,25	137,75
	266,25	116,50	134,25	147,00
	165,50	112,75	132,50	134,00
	144,00	145,00	133,25	135,25
	119,50	191,50	146,25	135,25
28 dias	87,25	93,00	120,75	148,50
	105,00	116,50	156,25	133,50
	125,25	228,25	114,50	90,75
	238,50	316,00	218,00	106,00
	124,50	113,75	239,75	129,00
	111,75	150,25	216,00	131,25
	101,50	237,25	107,00	100,25
	204,75	297,25	144,75	210,50
	156,00	105,25	227,00	148,50
	182,00	124,25	243,50	168,00
	247,50	111,75	150,50	113,00
	175,00	102,00	135,75	360,25
	123,00	97,25	130,50	114,75
	202,75	81,75	130,25	124,75
	139,25	136,00	109,50	127,50
	129,75	131,75	87,75	120,25
	174,50	116,25	130,25	117,25
	149,75	142,75	141,75	128,50
	115,75	142,25	111,25	125,75
	110,00	137,75	118,00	111,75

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice I - Características anisotrópicas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 23 - RRTM médio da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	123,38	140,19	99,38	195,38
	113,63	103,63	116,25	219,75
	120,00	228,13	103,56	94,94
	157,81	358,19	230,63	153,94
	116,44	96,81	298,63	139,31
	192,69	160,63	405,19	179,94
	179,44	206,56	123,00	142,56
	268,44	247,31	147,06	235,50
	129,13	136,63	369,44	101,94
	273,44	197,50	364,44	159,19
	219,13	183,00	169,69	213,44
	248,50	112,63	313,38	399,00
	176,81	88,81	90,19	123,13
	427,25	92,19	131,19	114,69
	325,44	115,06	148,13	143,63
	238,94	118,19	152,00	199,81
	206,63	242,94	154,44	173,44
	187,19	191,81	188,63	164,06
	164,44	150,44	214,56	128,69
	160,63	105,69	123,25	177,69
14 dias	88,09	115,25	107,94	152,31
	132,31	149,75	149,94	181,50
	120,38	198,69	171,13	134,50
	184,38	257,81	252,31	135,31
	166,94	162,19	248,56	173,05
	211,63	202,81	278,06	208,44
	218,56	259,19	134,13	225,19
	277,00	239,63	164,94	179,69
	202,75	148,19	201,44	127,56
	283,06	177,06	267,38	138,94
	245,63	162,38	221,63	131,63
	237,50	172,94	248,94	337,19
	174,50	116,00	127,44	177,44
	396,50	152,88	163,63	162,25
	176,00	165,44	148,25	133,81
	183,19	221,38	179,31	154,94
	369,50	146,44	163,81	187,31
	366,31	164,69	204,63	177,44
	185,81	166,75	153,00	170,56
	198,31	207,50	236,94	176,06
28 dias	107,50	120,06	166,50	174,44
	181,19	223,88	185,19	213,25
	239,88	301,31	170,81	105,06
	340,44	374,00	234,81	203,81
	145,88	151,31	280,19	186,63
	200,94	175,25	298,50	179,94
	169,56	300,25	170,81	121,50
	252,13	339,38	186,63	309,44
	186,56	129,88	269,31	182,00
	258,13	165,06	272,75	226,94
	272,56	127,00	209,13	196,38
	262,88	151,75	205,50	396,25
	192,81	106,31	151,63	143,13
	264,50	93,94	145,94	144,94
	169,25	147,75	117,19	135,75
	154,31	163,13	128,56	123,44
	394,75	148,19	138,00	191,44
	330,88	217,19	150,75	132,88
	191,25	257,88	120,94	135,75
	129,63	179,19	190,63	152,06

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice I - Características anisotrópicas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 24 – Anisotropia ($RRTM_{\text{máximo}} / RRTM_{\text{mínimo}}$) da pele da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	1,37	1,82	1,24	1,94
	1,25	1,93	1,76	1,46
	1,78	1,56	1,47	1,20
	2,25	1,28	1,13	2,61
	1,96	1,21	1,32	1,17
	3,11	2,07	1,20	3,05
	1,57	1,75	1,28	1,60
	1,41	1,83	2,02	1,78
	1,09	1,15	1,50	1,61
	2,21	2,44	1,13	2,64
	1,52	2,59	1,95	3,27
	3,03	2,11	2,33	1,97
	2,27	1,26	1,30	1,98
	1,79	4,64	2,38	1,36
	4,67	4,40	3,85	2,70
	3,18	6,08	4,12	6,71
	2,07	1,57	4,18	7,53
	4,46	2,26	6,39	2,86
	3,84	5,66	3,79	3,84
	5,27	2,11	2,15	9,93
14 dias	1,39	1,23	2,05	1,33
	1,60	2,34	2,02	2,25
	1,22	1,23	1,14	1,68
	1,98	1,60	1,17	1,95
	1,63	1,95	1,98	2,51
	1,76	1,84	1,85	1,99
	1,45	1,55	1,71	2,87
	1,75	1,43	1,57	2,31
	2,69	1,61	1,72	1,35
	1,82	1,58	1,36	1,67
	1,21	1,49	2,15	1,42
	1,83	1,82	2,87	1,21
	2,42	1,25	1,91	1,83
	2,81	1,45	2,74	1,71
	2,19	1,08	1,15	1,06
	2,40	1,76	1,73	1,21
	1,65	1,56	1,60	1,55
	3,85	2,02	2,01	1,71
	1,52	1,39	1,34	1,67
	2,32	1,23	2,37	1,85
28 dias	1,71	1,65	2,25	1,55
	3,73	2,34	1,46	2,82
	3,16	1,61	2,30	1,48
	1,85	1,37	1,24	3,18
	1,54	2,20	1,42	2,01
	2,61	1,45	1,79	1,73
	2,72	1,73	2,20	1,63
	1,53	1,24	1,70	1,86
	1,36	1,65	1,48	1,59
	1,88	1,73	1,26	2,11
	1,26	1,45	1,63	2,44
	2,26	1,82	2,18	1,29
	2,12	1,16	1,34	1,75
	2,01	1,29	1,35	1,26
	1,71	1,23	1,12	1,10
	1,52	1,50	1,77	1,06
	3,52	1,68	1,11	2,12
	2,86	2,14	1,15	1,05
	2,36	2,35	1,24	1,16
	1,35	1,62	2,62	2,02

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice J – Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 25 - Elasticidade total da pele dos antebraços, relação da retração total com a distensão total (Ua/Uf), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,808	0,806	0,787	0,844
	0,611	0,674	0,660	0,694
	0,766	0,771	0,771	0,635
	0,583	0,689	0,800	0,706
	0,683	0,667	0,680	0,659
	0,686	0,763	0,636	0,771
	0,727	0,861	0,697	0,862
	0,862	0,813	0,730	0,800
	0,923	0,722	0,879	0,806
	0,667	0,750	0,757	0,750
	0,762	0,786	0,737	0,750
	0,660	0,756	0,617	0,714
	0,700	0,714	0,673	0,694
	0,563	0,795	0,680	0,721
	0,682	0,771	0,689	0,722
	0,721	0,750	0,605	0,628
	0,640	0,864	0,651	1,000
	0,750	0,862	0,579	0,857
	0,750	0,784	0,710	0,757
	0,882	0,788	0,824	0,833
14 dias	0,829	0,915	0,833	0,717
	0,682	0,711	0,837	0,820
	0,708	0,648	0,682	0,712
	0,667	0,806	0,717	0,689
	0,696	0,660	0,917	0,640
	0,705	0,838	0,744	0,800
	0,588	0,806	0,656	0,806
	0,769	0,765	0,791	0,788
	0,850	0,788	0,850	0,846
	0,667	0,719	0,743	0,758
	0,600	0,720	0,643	0,738
	0,653	0,697	0,588	0,646
	0,630	0,522	0,761	0,583
	0,638	0,929	0,688	0,690
	1,000	0,744	0,897	0,756
	0,639	0,689	0,731	0,692
	0,571	1,000	0,633	0,907
	0,667	0,861	0,667	0,789
	0,688	0,706	0,750	0,718
	0,771	0,750	0,451	0,750
28 dias	0,784	1,000	0,776	1,000
	0,654	0,917	0,636	0,867
	0,933	0,574	0,673	0,654
	0,763	0,756	0,778	0,792
	0,757	0,690	0,806	0,690
	0,650	0,824	0,810	0,763
	0,850	0,886	0,750	0,833
	0,829	0,710	0,765	0,781
	0,897	0,750	0,895	0,750
	0,750	0,735	0,735	0,758
	0,596	0,917	0,690	0,702
	0,633	0,638	0,635	0,680
	0,720	1,000	0,808	0,776
	0,936	0,673	0,714	0,755
	0,721	0,789	0,756	0,750
	0,650	0,765	0,740	0,667
	0,780	0,647	0,650	0,690
	0,647	0,806	0,690	0,895
	0,750	0,743	0,765	0,795
	0,719	0,750	0,765	0,850

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice J - Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 26 - Elasticidade da pele dos antebraços, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,696	0,800	0,892	0,880
	0,523	0,700	0,579	0,683
	0,634	0,625	0,683	0,500
	0,452	0,658	0,619	0,628
	0,667	0,600	0,628	0,647
	0,600	0,727	0,500	0,793
	0,571	0,900	0,593	0,957
	0,792	0,846	0,700	0,875
	1,000	0,633	1,000	0,840
	0,485	0,724	0,645	0,690
	0,471	0,722	0,613	0,690
	0,575	0,667	0,500	0,595
	0,628	0,629	0,578	0,621
	0,512	0,667	0,610	0,722
	0,632	0,667	0,658	0,677
	0,750	0,710	0,567	0,568
	0,545	0,744	0,500	0,857
	0,759	0,800	0,607	0,800
	0,739	0,897	0,682	0,857
	0,963	0,769	0,750	0,821
14 dias	0,788	0,744	0,828	0,625
	0,611	0,677	0,818	0,714
	0,692	0,511	0,639	0,605
	0,581	0,821	0,564	0,649
	0,615	0,575	0,732	0,619
	0,575	0,871	0,667	0,767
	0,414	0,917	0,536	0,917
	0,781	0,714	0,771	0,815
	0,853	0,846	0,879	0,905
	0,655	0,577	0,552	0,720
	0,488	0,622	0,606	0,611
	0,683	0,630	0,558	0,512
	0,652	0,390	0,744	0,564
	0,564	0,806	0,625	0,657
	0,848	0,636	0,758	0,711
	0,548	0,641	0,650	0,636
	0,512	0,886	0,581	0,806
	0,536	0,897	0,654	0,781
	0,783	0,704	0,720	0,742
	0,778	0,710	0,349	0,730
28 dias	0,733	0,778	0,805	0,758
	0,605	0,780	0,574	0,811
	0,789	0,478	0,605	0,558
	0,625	0,730	0,641	0,692
	0,710	0,697	0,742	0,697
	0,650	0,821	0,650	0,839
	0,750	0,897	0,750	0,875
	0,793	0,720	0,714	0,769
	0,906	0,710	0,903	0,750
	0,667	0,667	0,679	0,769
	0,500	0,786	0,606	0,650
	0,561	0,500	0,581	0,595
	0,714	0,684	0,652	0,561
	0,750	0,651	0,574	0,711
	0,694	0,688	0,641	0,667
	0,550	0,655	0,850	0,600
	0,850	0,615	0,550	0,682
	0,615	0,862	0,682	0,875
	0,840	0,750	0,846	0,774
	0,692	0,750	0,741	0,750

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice J - Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 27 - Elasticidade da pele dos antebraços, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,130	0,240	0,270	0,280
	0,227	0,150	0,237	0,195
	0,146	0,200	0,171	0,182
	0,143	0,184	0,190	0,186
	0,139	0,200	0,163	0,206
	0,167	0,152	0,158	0,207
	0,179	0,200	0,222	0,261
	0,208	0,231	0,233	0,250
	0,219	0,200	0,320	0,240
	0,182	0,241	0,194	0,241
	0,235	0,167	0,226	0,241
	0,175	0,154	0,175	0,167
	0,163	0,200	0,156	0,241
	0,171	0,128	0,220	0,194
	0,158	0,167	0,184	0,161
	0,165	0,161	0,267	0,162
	0,136	0,128	0,132	0,200
	0,379	0,160	0,357	0,167
	0,217	0,276	0,409	0,321
	0,259	0,269	0,214	0,286
14 dias	0,242	0,205	0,241	0,150
	0,222	0,226	0,303	0,190
	0,231	0,149	0,222	0,209
	0,186	0,286	0,179	0,216
	0,179	0,175	0,171	0,190
	0,100	0,194	0,194	0,167
	0,172	0,292	0,143	0,292
	0,219	0,214	0,229	0,222
	0,176	0,269	0,212	0,238
	0,241	0,231	0,207	0,320
	0,163	0,111	0,273	0,167
	0,195	0,222	0,186	0,171
	0,174	0,122	0,179	0,231
	0,205	0,167	0,200	0,200
	0,182	0,182	0,182	0,184
	0,161	0,154	0,210	0,182
	0,140	0,200	0,140	0,194
	0,286	0,241	0,385	0,187
	0,391	0,259	0,280	0,258
	0,296	0,215	0,186	0,195
28 dias	0,133	0,222	0,195	0,212
	0,209	0,171	0,170	0,216
	0,184	0,174	0,140	0,209
	0,187	0,216	0,154	0,231
	0,194	0,273	0,161	0,273
	0,195	0,214	0,185	0,226
	0,205	0,207	0,205	0,250
	0,207	0,240	0,214	0,231
	0,219	0,214	0,226	0,225
	0,200	0,259	0,214	0,269
	0,237	0,143	0,273	0,175
	0,195	0,175	0,209	0,190
	0,190	0,211	0,130	0,195
	0,175	0,140	0,191	0,178
	0,194	0,187	0,154	0,185
	0,185	0,172	0,155	0,200
	0,235	0,308	0,305	0,318
	0,308	0,241	0,318	0,187
	0,280	0,250	0,308	0,258
	0,231	0,200	0,259	0,225

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice J - Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 28 - Elasticidade da pele dos antebraços, relação da retração imediata com a distensão total (U_r/U_f), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,615	0,645	0,702	0,688
	0,426	0,609	0,468	0,571
	0,553	0,521	0,583	0,423
	0,396	0,556	0,520	0,529
	0,585	0,500	0,540	0,537
	0,514	0,632	0,432	0,657
	0,485	0,750	0,485	0,759
	0,655	0,688	0,568	0,700
	0,821	0,528	0,758	0,677
	0,410	0,583	0,541	0,556
	0,381	0,619	0,500	0,556
	0,489	0,578	0,426	0,510
	0,540	0,524	0,500	0,500
	0,438	0,591	0,500	0,605
	0,545	0,571	0,556	0,583
	0,540	0,611	0,447	0,488
	0,480	0,659	0,442	0,714
	0,550	0,690	0,447	0,686
	0,607	0,703	0,484	0,649
	0,765	0,606	0,618	0,639
14 dias	0,634	0,617	0,667	0,543
	0,500	0,553	0,628	0,600
	0,563	0,444	0,523	0,500
	0,490	0,639	0,478	0,533
	0,522	0,489	0,625	0,520
	0,523	0,730	0,558	0,657
	0,353	0,710	0,469	0,710
	0,641	0,588	0,628	0,667
	0,725	0,667	0,725	0,731
	0,528	0,469	0,457	0,545
	0,420	0,560	0,476	0,524
	0,571	0,515	0,471	0,438
	0,556	0,348	0,630	0,458
	0,468	0,690	0,521	0,548
	0,718	0,538	0,641	0,600
	0,472	0,556	0,550	0,538
	0,449	0,738	0,510	0,674
	0,417	0,722	0,472	0,658
	0,563	0,559	0,563	0,590
	0,600	0,585	0,294	0,650
28 dias	0,647	0,636	0,673	0,625
	0,500	0,667	0,491	0,667
	0,667	0,407	0,531	0,462
	0,526	0,600	0,556	0,563
	0,595	0,548	0,639	0,548
	0,585	0,676	0,565	0,684
	0,655	0,743	0,585	0,700
	0,657	0,581	0,588	0,625
	0,744	0,555	0,737	0,625
	0,556	0,529	0,559	0,606
	0,404	0,688	0,476	0,553
	0,469	0,426	0,481	0,500
	0,600	0,565	0,577	0,469
	0,638	0,571	0,482	0,604
	0,581	0,579	0,556	0,563
	0,575	0,559	0,485	0,500
	0,525	0,471	0,635	0,517
	0,471	0,694	0,517	0,737
	0,656	0,600	0,647	0,615
	0,563	0,585	0,588	0,565

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice K - Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 29 - Elasticidade total da pele da face, relação da retração total com a distensão total (Ua/Uf), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,515	0,600	0,543	0,532
	0,520	0,697	0,537	0,590
	0,512	0,600	0,545	0,679
	0,500	0,618	0,595	0,556
	0,615	0,692	0,600	0,629
	0,525	0,641	0,500	0,474
	0,536	0,541	0,574	0,524
	0,519	0,467	0,632	0,500
	0,600	0,702	0,529	0,516
	0,561	0,698	0,538	0,600
	0,688	0,650	0,618	0,611
	0,676	0,550	0,618	0,615
	0,563	0,579	0,600	0,587
	0,590	0,514	0,719	0,682
	0,583	0,524	0,633	0,487
	0,594	0,556	0,667	0,571
	0,628	0,629	0,739	0,643
	0,567	0,704	0,706	0,594
	0,641	0,735	0,718	0,667
	0,794	0,611	0,613	0,658
14 dias	0,618	0,571	0,649	0,622
	0,639	0,529	0,564	0,636
	0,487	0,614	0,535	0,526
	0,520	0,641	0,528	0,512
	0,575	0,639	0,600	0,611
	0,615	0,750	0,571	0,537
	0,558	0,628	0,619	0,658
	0,600	0,478	0,571	0,618
	0,605	0,667	0,618	0,563
	0,659	0,660	0,543	0,606
	0,625	0,500	0,656	0,605
	0,629	0,606	0,684	0,632
	0,550	0,500	0,700	0,689
	0,545	0,563	0,643	0,622
	0,579	0,553	0,694	0,552
	0,609	0,564	0,613	0,613
	0,660	0,667	0,727	0,667
	0,632	0,654	0,727	0,643
	0,559	0,606	0,697	0,650
	0,667	0,658	0,645	0,550
28 dias	0,576	0,571	0,519	0,731
	0,600	0,673	0,450	0,667
	0,610	0,513	0,615	0,579
	0,561	0,684	0,523	0,535
	0,659	0,657	0,618	0,583
	0,618	0,703	0,632	0,500
	0,625	0,563	0,566	0,590
	0,650	0,500	0,600	0,564
	0,556	0,688	0,690	0,688
	0,649	0,711	0,568	0,571
	0,650	0,550	0,630	0,571
	0,550	0,750	0,606	0,649
	0,620	0,640	0,692	0,575
	0,650	0,580	0,690	0,516
	0,622	0,575	0,756	0,556
	0,656	0,516	0,727	0,571
	0,593	0,679	0,650	0,696
	0,658	0,667	0,750	0,722
	0,576	0,667	0,727	0,550
	0,657	0,667	0,727	0,600

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice K - Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 30 - Elasticidade da pele da face, relação da retração imediata com a distensão imediata (U_r/U_e), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,351	0,437	0,379	0,359
	0,316	0,625	0,324	0,424
	0,361	0,406	0,394	0,429
	0,289	0,429	0,448	0,378
	0,467	0,500	0,424	0,429
	0,364	0,567	0,359	0,273
	0,300	0,367	0,359	0,314
	0,340	0,256	0,419	0,324
	0,395	0,525	0,407	0,320
	0,424	0,556	0,437	0,417
	0,415	0,520	0,462	0,500
	0,483	0,450	0,462	0,452
	0,385	0,406	0,545	0,436
	0,419	0,355	0,519	0,486
	0,400	0,324	0,458	0,250
	0,385	0,393	0,536	0,357
	0,417	0,500	0,595	0,486
	0,435	0,619	0,593	0,520
	0,406	0,429	0,484	0,444
	0,536	0,414	0,440	0,533
14 dias	0,585	0,448	0,452	0,433
	0,556	0,393	0,406	0,486
	0,312	0,472	0,343	0,333
	0,302	0,484	0,323	0,294
	0,419	0,517	0,424	0,379
	0,516	0,586	0,464	0,382
	0,429	0,417	0,485	0,469
	0,444	0,308	0,429	0,400
	0,433	0,475	0,500	0,346
	0,469	0,436	0,321	0,423
	0,381	0,391	0,520	0,389
	0,483	0,407	0,586	0,438
	0,406	0,333	0,542	0,500
	0,423	0,333	0,500	0,486
	0,419	0,355	0,483	0,455
	0,421	0,375	0,440	0,440
	0,462	0,636	0,615	0,531
	0,448	0,550	0,615	0,571
	0,393	0,385	0,538	0,550
	0,542	0,516	0,500	0,450
28 dias	0,360	0,485	0,311	0,619
	0,389	0,550	0,242	0,500
	0,412	0,364	0,364	0,355
	0,382	0,483	0,333	0,343
	0,441	0,500	0,444	0,425
	0,429	0,516	0,375	0,333
	0,375	0,317	0,378	0,387
	0,600	0,324	0,432	0,375
	0,414	0,590	0,457	0,346
	0,467	0,541	0,367	0,393
	0,450	0,550	0,524	0,444
	0,350	0,450	0,520	0,467
	0,550	0,580	0,550	0,419
	0,380	0,420	0,565	0,360
	0,387	0,419	0,606	0,381
	0,462	0,360	0,654	0,429
	0,400	0,571	0,450	0,568
	0,500	0,600	0,430	0,643
	0,385	0,520	0,462	0,440
	0,448	0,500	0,600	0,550

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice K - Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 31 - Elasticidade da pele da face, relação da distensão retardada com a distensão imediata (U_v/U_e), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,158	0,207	0,250	0,205
	0,316	0,206	0,375	0,182
	0,194	0,333	0,250	0,262
	0,156	0,276	0,214	0,216
	0,300	0,212	0,147	0,250
	0,212	0,179	0,300	0,152
	0,120	0,205	0,233	0,200
	0,149	0,226	0,154	0,176
	0,163	0,259	0,175	0,240
	0,242	0,219	0,194	0,250
	0,171	0,308	0,230	0,286
	0,172	0,308	0,235	0,258
	0,231	0,364	0,187	0,179
	0,258	0,185	0,194	0,189
	0,200	0,250	0,235	0,219
	0,231	0,286	0,286	0,250
	0,194	0,243	0,250	0,200
	0,304	0,259	0,286	0,280
	0,219	0,258	0,214	0,250
	0,214	0,240	0,241	0,267
14 dias	0,341	0,194	0,207	0,233
	0,333	0,219	0,214	0,189
	0,219	0,229	0,222	0,267
	0,163	0,161	0,258	0,206
	0,290	0,212	0,241	0,241
	0,258	0,250	0,241	0,206
	0,229	0,273	0,194	0,187
	0,296	0,200	0,179	0,133
	0,267	0,308	0,200	0,231
	0,281	0,250	0,205	0,269
	0,143	0,280	0,304	0,194
	0,207	0,310	0,222	0,187
	0,250	0,250	0,212	0,250
	0,269	0,273	0,185	0,216
	0,226	0,241	0,226	0,318
	0,211	0,240	0,219	0,240
	0,205	0,269	0,364	0,219
	0,310	0,269	0,300	0,333
	0,214	0,269	0,269	0,235
	0,250	0,292	0,226	0,240
28 dias	0,180	0,200	0,273	0,238
	0,250	0,212	0,225	0,286
	0,206	0,182	0,182	0,226
	0,206	0,222	0,310	0,229
	0,206	0,259	0,250	0,200
	0,214	0,187	0,194	0,222
	0,167	0,178	0,171	0,258
	0,175	0,216	0,176	0,219
	0,241	0,200	0,231	0,231
	0,233	0,233	0,216	0,250
	0,205	0,286	0,245	0,296
	0,210	0,320	0,255	0,233
	0,225	0,300	0,281	0,290
	0,200	0,261	0,255	0,240
	0,194	0,242	0,290	0,286
	0,231	0,269	0,240	0,250
	0,200	0,245	0,333	0,243
	0,267	0,235	0,350	0,286
	0,269	0,269	0,320	0,235
	0,207	0,320	0,250	0,245

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice K - Propriedades viscoelásticas da pele antes e após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 32 - Elasticidade da pele da face, relação da retração imediata com a distensão total (Ur/Uf), antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,303	0,350	0,314	0,298
	0,240	0,455	0,268	0,359
	0,302	0,325	0,295	0,340
	0,250	0,353	0,351	0,311
	0,359	0,436	0,350	0,343
	0,300	0,436	0,304	0,237
	0,268	0,297	0,298	0,262
	0,296	0,222	0,342	0,275
	0,340	0,447	0,324	0,258
	0,341	0,465	0,359	0,333
	0,354	0,325	0,353	0,389
	0,412	0,355	0,353	0,359
	0,313	0,342	0,400	0,370
	0,333	0,297	0,438	0,409
	0,333	0,262	0,367	0,205
	0,313	0,306	0,417	0,286
	0,349	0,400	0,478	0,405
	0,333	0,481	0,471	0,406
	0,333	0,353	0,385	0,356
	0,441	0,333	0,355	0,421
14 dias	0,436	0,371	0,378	0,351
	0,417	0,324	0,333	0,409
	0,256	0,386	0,279	0,263
	0,260	0,385	0,278	0,244
	0,325	0,417	0,350	0,306
	0,410	0,472	0,371	0,317
	0,349	0,349	0,381	0,395
	0,343	0,261	0,357	0,353
	0,342	0,396	0,382	0,281
	0,366	0,362	0,257	0,333
	0,333	0,300	0,406	0,326
	0,400	0,333	0,447	0,368
	0,325	0,275	0,433	0,400
	0,333	0,281	0,393	0,400
	0,342	0,289	0,389	0,345
	0,348	0,308	0,355	0,355
	0,383	0,467	0,485	0,436
	0,342	0,423	0,485	0,429
0,324	0,303	0,424	0,351	
0,433	0,421	0,387	0,385	
28 dias	0,305	0,381	0,259	0,500
	0,311	0,449	0,200	0,389
	0,341	0,308	0,308	0,289
	0,317	0,368	0,273	0,279
	0,366	0,400	0,353	0,354
	0,353	0,432	0,316	0,273
	0,321	0,271	0,321	0,308
	0,395	0,275	0,356	0,308
	0,333	0,479	0,381	0,281
	0,378	0,444	0,297	0,314
	0,365	0,385	0,407	0,343
	0,355	0,325	0,394	0,378
	0,301	0,400	0,423	0,325
	0,375	0,425	0,448	0,290
	0,324	0,325	0,488	0,296
	0,375	0,290	0,515	0,343
	0,333	0,429	0,385	0,457
	0,395	0,444	0,300	0,500
	0,303	0,394	0,364	0,427
	0,371	0,400	0,455	0,275

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice L – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços

Tabela 33 – Aspereza da pele (Se_T) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	0,53	1,01	1,51	0,90
	1,06	1,34	0,94	1,30
	0,30	1,86	1,18	2,54
	0,91	2,02	1,05	1,81
	1,20	0,74	1,18	1,03
	2,62	1,28	1,63	1,07
	1,38	1,29	1,06	0,93
	2,44	1,30	2,07	0,88
	1,09	1,37	0,49	0,80
	1,21	1,15	1,10	1,36
	1,28	0,67	1,13	0,98
	1,27	0,96	1,65	1,21
	0,99	1,55	0,58	1,63
	0,54	0,34	0,72	0,68
	1,04	1,48	1,22	1,01
	1,03	1,81	0,65	1,44
	1,44	0,80	1,76	1,50
	1,37	1,25	0,95	0,54
	1,39	0,97	1,89	0,93
	0,64	1,75	0,88	1,30
14 dias	0,75	1,56	1,01	0,70
	0,98	1,66	1,59	1,38
	0,62	1,34	0,61	1,52
	1,19	0,35	1,22	0,92
	2,00	0,45	0,66	0,59
	1,88	0,80	1,93	1,38
	1,19	0,91	1,46	0,81
	2,46	1,07	1,28	1,63
	1,45	1,19	0,43	2,08
	0,67	1,10	0,73	1,75
	0,81	1,11	0,71	0,73
	2,04	0,99	1,55	0,76
	1,29	1,31	2,06	1,68
	0,52	1,76	1,08	1,26
	0,49	1,19	1,33	1,13
	0,70	0,38	0,87	1,81
	1,59	0,69	2,61	0,69
	1,86	0,85	1,83	0,95
	0,62	0,75	1,26	0,85
	1,76	1,55	0,92	1,25
28 dias	0,49	0,80	0,79	1,48
	1,45	1,26	0,56	0,43
	1,15	1,63	0,96	0,98
	1,41	1,00	1,25	1,63
	0,46	0,95	0,77	0,87
	1,46	0,65	1,36	1,49
	1,13	1,09	1,33	0,96
	1,08	0,73	1,56	0,82
	1,00	1,09	0,74	1,54
	0,95	1,45	1,04	1,55
	0,94	0,53	0,60	0,99
	1,27	0,45	0,84	0,45
	1,03	1,24	0,45	0,86
	0,55	1,62	1,46	0,75
	1,13	1,35	1,39	1,05
	1,14	1,15	1,07	0,99
	1,31	1,44	1,63	1,59
	2,32	1,30	1,59	1,22
	1,54	1,34	1,64	0,86
	0,98	1,62	0,45	0,80

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice L – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços

Tabela 34 – Número de rugas (Se_w) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	65,46	52,67	58,44	58,44
	55,10	51,30	52,28	48,87
	51,92	52,28	48,94	60,40
	46,92	46,30	40,75	48,94
	53,20	67,50	52,00	56,25
	60,00	45,00	52,67	41,96
	53,07	49,51	50,62	49,98
	45,00	56,57	43,55	45,38
	45,00	42,35	53,60	55,14
	46,00	43,13	51,88	42,86
	62,37	52,28	56,12	51,43
	60,00	66,89	52,67	55,10
	46,30	46,50	53,07	56,25
	51,92	56,57	53,07	57,65
	49,17	48,94	48,21	53,82
	45,38	50,62	60,11	58,44
	51,92	45,38	56,25	42,35
	52,41	50,89	58,42	50,62
	61,36	51,92	30,00	46,50
	61,45	41,27	52,94	42,86
14 dias	71,33	52,67	51,88	54,95
	60,00	52,94	46,30	46,92
	46,00	57,65	50,57	53,82
	46,30	70,52	46,00	56,25
	45,50	53,60	52,94	51,92
	43,75	35,29	46,71	42,86
	53,82	52,67	47,23	50,57
	51,43	38,00	45,80	45,24
	39,71	40,29	53,60	41,07
	48,87	55,75	46,00	59,00
	62,37	49,89	62,37	50,62
	40,95	62,37	56,25	66,41
	44,29	53,07	43,39	52,67
	61,45	50,62	57,03	48,87
	43,05	48,21	42,86	53,27
	41,93	46,08	45,24	45,38
	43,13	47,78	46,92	47,78
	53,07	50,57	49,89	40,60
	62,05	55,04	49,67	45,00
	46,00	48,21	52,67	46,00
28 dias	67,50	58,42	63,53	47,23
	45,80	57,37	54,95	50,62
	49,17	53,82	43,13	65,39
	49,98	49,51	61,63	48,87
	47,78	57,65	43,13	46,92
	57,75	27,83	45,70	41,47
	46,71	45,38	41,07	50,57
	49,51	37,37	50,62	48,87
	43,13	40,00	50,57	43,75
	45,80	38,00	41,93	50,65
	55,38	40,95	67,25	48,21
	60,00	60,57	60,92	72,00
	50,62	48,94	67,25	53,82
	57,65	45,00	48,94	41,50
	42,35	46,50	49,51	44,29
	51,11	48,21	52,12	46,15
	41,27	42,96	50,57	41,27
	49,51	43,39	43,73	46,71
	48,87	45,24	52,28	45,38
	62,37	59,05	53,60	58,05

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice L – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços

Tabela 35 – Textura da pele (Se_{sm}) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	42,55	35,13	37,64	36,00
	43,20	40,02	39,42	36,65
	37,64	42,46	33,77	37,51
	37,82	47,36	37,66	44,05
	36,05	36,86	37,50	36,23
	37,26	40,46	38,19	55,38
	43,09	28,22	33,41	41,98
	37,67	30,10	37,63	36,57
	33,48	39,30	32,65	44,77
	32,80	45,54	35,79	52,11
	40,41	30,33	39,29	35,79
	27,54	29,57	33,61	35,49
	24,40	34,60	23,09	33,08
	33,13	26,93	33,86	27,44
	39,83	30,83	40,50	35,90
	37,98	41,00	42,08	47,45
	33,13	35,17	36,23	36,59
	31,92	35,05	40,90	34,93
	39,76	37,64	39,06	34,60
	31,52	42,22	32,24	43,89
14 dias	57,49	35,13	43,58	31,87
	46,98	38,38	41,62	33,45
	37,08	51,65	37,93	39,02
	35,88	27,50	37,08	33,08
	33,05	35,75	41,45	33,13
	57,40	50,65	41,99	52,11
	39,02	29,02	45,38	42,48
	32,81	50,39	29,82	52,12
	34,07	42,55	37,31	42,01
	29,32	37,00	31,37	33,05
	32,00	31,43	32,00	37,96
	35,13	32,00	26,78	32,81
	36,85	35,40	33,33	35,13
	31,52	41,00	33,53	43,98
	52,05	31,82	49,37	32,44
	41,51	51,50	50,67	50,64
	44,16	37,03	40,73	37,03
	40,01	44,00	37,42	38,86
	35,00	32,00	45,00	43,05
	45,63	33,08	33,61	45,05
28 dias	50,90	39,26	42,88	40,99
	51,11	43,26	39,84	25,82
	38,35	43,70	38,64	35,70
	40,48	46,04	28,29	41,05
	44,43	41,97	40,02	30,55
	42,04	47,87	42,50	54,74
	50,68	36,57	35,24	39,45
	32,68	45,74	42,52	45,45
	31,74	44,88	34,89	40,60
	29,82	43,60	37,36	35,00
	31,02	36,49	33,22	40,50
	27,54	27,80	27,96	37,80
	25,82	33,77	20,98	35,90
	32,28	33,30	32,30	35,00
	44,72	37,48	47,53	41,10
	39,05	33,27	37,05	45,78
	49,03	38,49	44,00	42,22
	46,04	43,05	47,58	39,09
	49,85	47,78	37,91	39,39
	32,00	45,00	37,31	48,05

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice L – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações nos antebraços.

Tabela 36 – Rugosidade da pele (R_t) dos antebraços das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	59,00	50,00	48,00	47,00
	66,00	51,00	56,00	51,00
	47,00	59,00	45,00	56,00
	50,00	74,00	50,00	69,00
	53,00	47,00	53,00	48,00
	69,00	56,00	69,00	71,00
	60,00	46,00	49,00	61,00
	56,00	45,00	73,00	51,00
	50,00	52,00	46,00	53,00
	49,00	63,00	49,00	70,00
	55,00	45,00	59,00	56,00
	41,00	55,00	50,00	58,00
	36,00	52,00	41,00	54,00
	45,00	41,00	49,00	49,00
	53,00	44,00	54,00	51,00
	54,00	53,00	50,00	60,00
	60,00	49,00	59,00	53,00
	52,00	51,00	54,00	44,00
	57,00	50,00	63,00	51,00
	51,00	52,00	52,00	58,00
14 dias	63,00	61,00	53,00	45,00
	65,00	52,00	55,00	51,00
	51,00	68,00	45,00	52,00
	50,00	37,00	53,00	48,00
	44,00	47,00	49,00	50,00
	70,00	68,00	62,00	62,00
	59,00	50,00	56,00	57,00
	54,00	64,00	44,00	61,00
	48,00	59,00	49,00	58,00
	44,00	42,00	45,00	50,00
	44,00	42,00	48,00	47,00
	53,00	51,00	43,00	52,00
	48,00	49,00	46,00	56,00
	47,00	57,00	48,00	64,00
	65,00	40,00	66,00	45,00
	55,00	50,00	59,00	70,00
	62,00	47,00	57,00	47,00
	63,00	54,00	56,00	49,00
	58,00	63,00	52,00	50,00
	70,00	55,00	57,00	65,00
28 dias	57,00	57,00	48,00	54,00
	74,00	49,00	51,00	38,00
	54,00	67,00	54,00	51,00
	50,00	61,00	58,00	59,00
	54,00	53,00	51,00	42,00
	59,00	61,00	58,00	66,00
	61,00	54,00	48,00	58,00
	47,00	64,00	63,00	59,00
	47,00	58,00	49,00	63,00
	47,00	55,00	50,00	55,00
	51,00	50,00	42,00	57,00
	41,00	42,00	41,00	51,00
	37,00	49,00	30,00	55,00
	44,00	45,00	48,00	62,00
	62,00	50,00	59,00	55,00
	55,00	45,00	52,00	60,00
	79,00	50,00	64,00	54,00
	67,00	54,00	63,00	51,00
	64,00	64,00	54,00	51,00
	53,00	63,00	60,00	45,00

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice M – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 37 – Aspereza da pele (Se_r) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	2,23	0,94	1,43	0,64
	0,45	0,80	0,87	2,70
	1,27	1,58	0,19	0,13
	1,36	1,37	1,24	0,25
	1,77	0,64	1,42	1,03
	1,30	2,79	0,20	1,13
	2,61	0,53	1,41	0,80
	0,59	0,81	1,33	0,39
	1,73	1,31	1,27	1,48
	1,37	1,40	1,35	2,32
	2,07	0,36	1,43	0,39
	0,78	0,66	0,36	0,75
	0,82	0,65	0,20	0,31
	1,22	0,69	0,20	0,66
	1,08	0,72	2,07	2,28
	1,20	2,06	1,93	0,47
	1,90	1,53	0,99	1,87
	1,37	2,00	3,03	0,12
	1,98	1,23	1,05	1,77
	1,50	1,88	2,67	2,00
14 dias	3,63	1,44	0,70	0,48
	0,48	0,48	0,87	1,75
	0,52	1,29	0,95	1,77
	1,46	0,40	0,51	0,48
	1,91	1,60	1,31	1,04
	1,49	3,44	0,77	0,43
	1,73	1,46	1,76	0,78
	0,52	1,04	0,97	0,62
	0,85	2,50	0,94	1,65
	1,18	0,50	1,23	0,45
	0,78	0,24	0,19	0,40
	1,10	0,32	1,00	0,57
	0,19	0,71	0,25	0,29
	1,18	0,54	0,15	1,36
	0,58	0,90	1,41	1,37
	1,69	2,92	1,99	0,60
	1,04	1,17	0,62	2,13
	0,62	1,29	1,95	1,66
	1,65	1,51	1,88	1,35
	0,85	0,85	2,47	0,65
28 dias	0,45	0,89	0,26	0,52
	1,19	0,35	0,49	0,85
	0,83	0,50	0,18	1,77
	1,30	0,19	1,37	0,65
	3,26	1,25	2,75	1,35
	1,50	2,41	2,05	1,03
	1,77	2,63	1,47	1,30
	1,61	2,06	0,65	2,07
	0,80	2,65	0,99	1,95
	2,17	2,25	1,98	0,25
	0,31	0,58	0,84	0,28
	1,86	0,89	0,63	0,52
	0,27	0,19	0,02	0,09
	0,46	0,20	0,25	2,05
	2,61	1,48	0,49	2,23
	1,55	2,68	1,85	1,10
	1,77	2,33	2,15	1,33
	2,64	1,14	1,21	0,40
	1,43	1,47	1,02	1,01
	0,88	0,55	1,35	1,15

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice M – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 38 – Número de rugas (Se_w) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	57,03	72,00	55,38	64,29
	65,46	71,27	72,12	49,17
	60,40	56,57	83,08	70,13
	57,03	60,11	57,65	73,14
	60,40	61,63	52,28	57,14
	56,25	58,42	72,12	64,29
	33,44	60,57	57,14	56,57
	61,45	57,46	51,43	61,63
	42,87	50,62	52,28	45,00
	49,98	51,43	59,34	53,27
	55,38	74,27	55,38	58,42
	75,27	69,23	71,27	56,27
	69,23	61,45	80,70	72,00
	57,46	70,13	77,14	66,41
	58,42	75,00	52,67	57,03
	66,46	51,43	45,00	66,89
	60,40	57,46	76,63	51,88
	52,41	61,36	55,10	62,37
	42,96	51,43	65,18	30,36
	50,62	49,66	37,50	53,82
14 dias	47,78	57,03	64,29	61,45
	70,13	70,80	60,57	55,38
	62,17	60,00	84,52	55,38
	62,17	75,52	60,00	66,41
	60,40	70,56	59,34	57,14
	53,27	56,57	57,14	61,63
	56,57	52,28	60,40	55,38
	60,57	55,10	52,28	65,18
	61,63	60,20	50,57	60,15
	48,83	70,15	63,90	70,05
	62,37	73,14	76,91	58,42
	68,21	75,52	65,79	77,14
	77,47	54,54	73,14	72,00
	65,79	65,39	85,55	57,65
	59,34	70,56	60,57	64,24
	60,92	45,00	60,40	65,18
	70,13	56,27	70,80	49,17
	53,82	49,66	45,70	51,43
	60,92	64,29	46,50	54,05
	56,27	55,15	40,37	59,05
28 dias	64,29	65,46	60,92	57,03
	60,00	64,29	72,12	56,75
	56,12	61,63	73,14	55,38
	44,29	77,14	60,00	55,00
	45,38	66,41	55,38	49,89
	60,55	49,98	70,05	56,27
	55,38	40,75	60,40	56,27
	51,43	46,00	75,04	52,28
	55,38	40,95	57,03	56,12
	45,70	60,05	45,70	55,00
	65,39	78,86	66,89	65,79
	56,75	70,56	84,52	61,63
	69,23	66,41	92,58	71,27
	72,12	75,52	77,14	68,25
	43,13	64,29	60,57	60,57
	48,45	44,29	56,25	65,39
	55,38	40,95	43,75	61,63
	42,87	56,12	60,40	65,18
	52,41	52,67	49,51	69,23
	60,57	58,15	45,08	64,15

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice M – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 39 - Textura da pele (Se_{sm}) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	38,32	28,80	31,02	25,07
	25,53	26,73	27,05	35,40
	24,46	33,26	21,02	22,79
	30,34	35,35	29,05	20,11
	30,98	24,96	37,91	24,00
	33,08	34,35	21,64	28,41
	40,93	24,53	27,20	34,85
	24,89	27,35	35,79	21,63
	35,67	33,41	33,36	32,08
	32,98	37,29	27,24	49,43
	35,67	26,00	31,02	22,90
	24,46	25,96	23,16	26,79
	24,23	24,89	17,43	23,40
	27,35	28,05	20,37	29,35
	27,81	23,40	39,72	27,15
	25,92	38,78	29,30	26,09
	27,72	27,35	23,91	52,91
	31,92	31,48	29,31	21,89
	34,36	31,32	25,42	33,46
	28,85	34,26	39,53	42,14
14 dias	41,47	27,15	18,39	23,23
	22,79	23,01	24,53	29,46
	21,82	24,30	19,44	35,67
	28,54	18,13	24,30	25,90
	27,72	26,46	32,04	24,00
	32,44	36,43	24,00	21,63
	30,10	28,81	27,72	31,02
	22,90	30,86	28,81	22,03
	28,29	28,85	51,58	36,65
	24,90	25,43	24,92	32,01
	30,31	25,60	20,30	24,54
	23,05	25,38	27,37	24,07
	20,45	28,47	20,11	19,80
	25,66	25,50	21,64	32,28
	27,24	26,46	32,71	41,63
	27,96	43,25	26,09	22,03
	29,81	29,94	23,01	36,88
	26,53	32,77	39,67	34,30
	31,25	31,76	30,27	21,50
	23,63	36,42	34,63	22,45
28 dias	26,74	27,23	21,38	28,74
	27,54	21,73	23,44	31,27
	23,57	24,96	20,11	35,67
	35,43	20,37	24,30	20,55
	39,39	32,81	32,57	31,43
	36,05	44,98	26,45	26,79
	35,67	36,31	32,62	34,66
	32,81	37,08	20,07	25,78
	27,91	39,19	28,74	29,86
	29,75	40,02	38,25	34,25
	27,20	24,60	22,61	20,53
	31,27	22,93	25,27	21,63
	19,04	24,17	18,33	19,60
	23,44	19,94	20,37	29,05
	41,40	31,76	27,80	27,80
	24,05	51,02	39,38	25,50
	35,67	43,24	43,40	31,62
	31,55	28,29	27,72	22,03
	30,40	29,02	26,74	20,77
	21,26	23,03	38,05	25,02

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Apêndice M – Valores do micro-relevo cutâneo após 14 e 28 dias de aplicação das formulações na face.

Tabela 40 – Rugosidade da pele (R_t) da face das voluntárias antes e após 14 e 28 dias de tratamento.

Tempo	Formulações			
	F4	F4A	F4D	F4AD
Inicial	62,00	56,00	58,00	49,00
	55,00	49,00	51,00	62,00
	39,00	54,00	42,00	50,00
	54,00	57,00	65,00	49,00
	55,00	56,00	60,00	50,00
	50,00	57,00	49,00	54,00
	77,00	48,00	51,00	57,00
	47,00	51,00	65,00	54,00
	58,00	60,00	60,00	53,00
	55,00	71,00	52,00	74,00
	65,00	48,00	58,00	43,00
	41,00	45,00	43,00	51,00
	46,00	42,00	38,00	44,00
	51,00	55,00	39,00	56,00
	49,00	58,00	56,00	42,00
	51,00	67,00	56,00	53,00
	55,00	59,00	55,00	61,00
	52,00	57,00	56,00	55,00
	62,00	74,00	45,00	68,00
	56,00	70,00	67,00	68,00
14 dias	60,00	49,00	49,00	48,00
	53,00	52,00	53,00	63,00
	38,00	49,00	47,00	59,00
	52,00	43,00	53,00	57,00
	44,00	50,00	57,00	43,00
	59,00	64,00	45,00	49,00
	53,00	50,00	60,00	55,00
	46,00	53,00	55,00	45,00
	50,00	64,00	65,00	53,00
	47,00	47,00	53,00	40,00
	58,00	55,00	44,00	43,00
	40,00	52,00	51,00	49,00
	36,00	43,00	43,00	44,00
	50,00	46,00	42,00	51,00
	46,00	52,00	55,00	54,00
	54,00	68,00	57,00	50,00
	54,00	51,00	46,00	57,00
	48,00	58,00	66,00	66,00
	60,00	67,00	54,00	56,00
	48,00	49,00	61,00	58,00
28 dias	55,00	49,00	53,00	57,00
	49,00	43,00	44,00	53,00
	40,00	45,00	42,00	59,00
	50,00	51,00	46,00	43,00
	59,00	66,00	50,00	48,00
	60,00	68,00	65,00	50,00
	59,00	61,00	60,00	57,00
	57,00	64,00	45,00	45,00
	55,00	63,00	49,00	52,00
	60,00	68,00	75,00	56,00
	47,00	50,00	47,00	42,00
	47,00	46,00	50,00	46,00
	33,00	50,00	36,00	44,00
	49,00	46,00	42,00	54,00
	60,00	57,00	51,00	53,00
	44,00	84,00	63,00	44,00
	59,00	71,00	65,00	54,00
	53,00	51,00	49,00	49,00
	55,00	58,00	48,00	50,00
	43,00	46,00	45,00	48,00

(F4: veículo; F4A: veículo + acetil hexapeptídeo-3; F4D: veículo + DMAE; F4AD: veículo + acetil hexapeptídeo + DMAE).

Anexos

Anexo A - Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. do Café, s/nº - Fone: (0xx16) 3602.4213 - Fax: (0xx16) 633.2336
14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Of. CEP 60/2005 - FCFRP/USP
kms

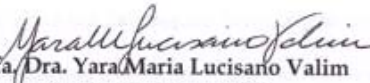
Ribeirão Preto, 07 de dezembro de 2005.

Prezada Professora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "Desenvolvimento e avaliação clínica da eficácia de formulações dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptideo-3", apresentado por V. Sa. a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 62, foi analisado na 47ª reunião deste CEP, realizada no dia 06 de dezembro de 2005 e considerado **aprovado**.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,


Prof.ª Dra. Yara Maria Lucisano Valim
Coordenadora do CEP
FCFRP - USP

Ilma. Sra.
Prof.ª. Dr.ª. PATRÍCIA M. B. G. MAIA CAMPOS
Depto. de Ciências Farmacêuticas
FCFRP - USP

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de consentimento (frente)

Pesquisadora responsável: Prof^a Dr^a Patrícia M. B. G. Maia Campos (CRF: 11922)

Médica responsável: Dr^a Maria Rita O. Rocha (CRM: 29452)

Pesquisadora principal: Kassandra Azevedo Tadini (CRF: 31694)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Kassandra Azevedo Tadini, sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e estou desenvolvendo a pesquisa “Desenvolvimento e avaliação clínica da eficácia de formulações dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3” com o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação de formulações cosméticas contendo dimetilaminoetanol (DMAE) ou acetil hexapeptídeo-3, na pele das voluntárias.

Para tal, inicialmente uma formulação será aplicada na pele do seu antebraço direito e outra no seu antebraço esquerdo. Após a aplicação, você receberá um questionário de avaliação sensorial onde você deverá atribuir notas de 1 a 5 para cada formulação, considerando os parâmetros toque, espalhabilidade e sensação na pele. Em seguida, serão feitas medidas de hidratação cutânea e elasticidade da pele, bem como avaliação do relevo cutâneo e das fibras de colágeno. Para tal serão utilizados equipamentos que avaliam a pele de maneira não invasiva, ou seja, sem causar corte ou dor, pois possuem sondas especiais, que são somente encostadas na pele durante a leitura. Essas leituras serão realizadas nos seus antebraços e região da face.

Posteriormente, as formulações lhes serão fornecidas sem nenhum custo e deverão ser aplicadas por você em sua casa, 2 vezes ao dia, por 28 dias, sendo que você deverá retornar à sala de ensaios biológicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto após 14 e 28 dias do início do estudo, para nova avaliação da pele com os equipamentos acima mencionados.

O principal efeito esperado com o uso destas formulações é o aumento da hidratação e da elasticidade da pele. Porém, as formulações poderão eventualmente causar vermelhidão e/ou coceira, o que pode ocorrer com o uso de qualquer formulação cosmética, mas para a sua segurança haverá acompanhamento da pesquisa pela pesquisadora e pela médica, responsáveis pela mesma, sendo que, caso você venha a apresentar o menor sinal de alguma reação indesejável, você será imediatamente excluída da pesquisa e serão tomadas todas as providências necessárias para a recuperação do estado normal da sua pele e para que não fiquem seqüelas, estando nós pesquisadores obrigados a arcar com as despesas necessárias. Se você está de acordo em participar da pesquisa, posso garantir-lhe que as informações fornecidas serão confidenciais e somente serão utilizadas neste trabalho, e se for de seu interesse, os resultados lhes serão fornecidos.

Se tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, poderá entrar em contato comigo através dos telefones: (16) 3966-2890 ou (16) 8139-2860 ou no endereço: Rua Albert Einstein nº 1334, apto 33C, Jardim Antártica, Ribeirão Preto - SP.

Prof^a Dr^a Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
(Pesquisadora Responsável)

Kassandra Azevedo Tadini
Pesquisadora Principal

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de consentimento (verso)

EU: _____,

R.G. nº: _____, abaixo assinado, acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) sobre a pesquisa “Desenvolvimento e avaliação clínica da eficácia de formulações dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3” e tendo recebido as informações contidas neste termo de consentimento, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar como voluntário da pesquisa citada.

- 1 – A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 2 – A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar do estudo sem que isso me traga alguma penalidade ou prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- 3 – A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
- 4 – O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
- 5 – A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
- 6 – Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.
- 7 – Que se ocorrerem reações adversas na pele (como alergia, irritações e outras), decorrente da aplicação local das formulações, os voluntários deverão interromper imediatamente o uso destas.

Tenho ciência do exposto acima e desejo colaborar com a pesquisa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Assinatura do voluntário