

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de diferentes concentrações de retinóides em formulações
dermocosméticas nos efeitos benéficos e/ou colaterais na pele de
camundongos sem pêlo**

Maria Laura Costantini Gomes

RIBEIRÃO PRETO

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de diferentes concentrações de retinóides em formulações
dermocosméticas nos efeitos benéficos e/ou colaterais na pele de
camundongos sem pêlo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aluno: Maria Laura Costantini Gomes
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos.

RIBEIRÃO PRETO

2007

GOMES, M. L.C.

Influência de diferentes concentrações de retinóides em formulações dermocosméticas nos efeitos benéficos e/ou colaterais na pele de camundongos sem pêlo. Ribeirão Preto, 2007.

108 p. il.; 30cm

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

Orientadora: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves.

1. Ácido Retinóico 2. Palmitato de Retinila 3. Cosméticos 4. Histopatologia
5. Bioengenharia Cutânea 6. Eficácia

Autor: Maria Laura Costantini Gomes

Título: Influência de diferentes concentrações de retinóides em formulações dermocosméticas nos efeitos benéficos e/ou colaterais na pele de camundongos sem pêlo.

Prof (a). Dr(a).

Porf (a). Dr (a).

Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
Orientadora

Trabalho apresentado e aprovado pela Comissão Julgadora em / / 2007

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

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que pela sua força infinita, sempre atendeu minhas preces e permitiu que eu mais uma vez, vencesse mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais **Edison** e **Maria Teresa**, minha eterna gratidão. Sem eles eu não alcançaria essa vitória, pois sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e dando força, sem nunca medir esforços para que eu conseguisse realizar todos os meus sonhos.

Ao meu padrasto **Dr. Jaiter**, que me apoiou como um segundo pai, acompanhando de perto toda a minha trajetória, colaborando com seu incentivo e seu conhecimento médico e científico.

Ao meu irmão **Fernando**, pelo carinho e atenção nas horas em que precisei de apoio e compreensão, dando-me a certeza de sempre poder contar com a sua amizade e companheirismo.

Aos meus queridos sobrinhos **Gabriela** e **Leonardo**, que sempre me trouxeram alegria nas horas de desânimo e cansaço.

A minha querida madrinha tia **Emirene**, que sempre demonstrou orgulho pelo meu trabalho.

Aos meus **amigos** de São José do Rio Preto, pela amizade e apoio em vários momentos importantes da minha vida.

Agradecimento especial

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Patrícia Maia Campos**, o meu eterno agradecimento pela confiança, pelo carinho e pelo entusiasmo com que me orientou, e também pela amizade e pelas oportunidades que me proporcionou. Tenho grande admiração pela determinação e otimismo com que enfrenta seus grandes desafios em sua carreira profissional.*

AGRADECIMENTOS

À amiga **Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro**, agradeço por sua grande colaboração, carinho, incentivo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos (**Susi, Sabrina, Flávio, Glasiela, Kassandra, Nélio, Mirela, Allan, Amanda, Juliana**), pela amizade, colaboração e convivência durante estes anos.

Ao **Manoel Eduardo Bortolin**, funcionário do Laboratório de Tecnologia de cosméticos, pelo apoio e pela amizade durante estes anos.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Rosana dos Santos Florêncio, Eleni Angeli Passos, Ana Lúcia Turatti e Carlos Armando**, pelo carinho e atenção com que sempre me ajudaram.

Ao Sr. **Antônio de Campos**, funcionário da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pela colaboração prestada.

À todos os **funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Tecido Cutâneo: Aspectos gerais do envelhecimento	5
2.2. Retinóides e a pele	8
2.3. Bioengenharia Cutânea	12
2.4. Estudos histopatológicos e histométricos	15
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Matérias-primas	18
4.2. Equipamentos e acessórios	19
4.3. Desenvolvimento das formulações	20
4.4. Determinação do pH	21
4.5. Testes preliminares de estabilidade	22
4.5.1. Teste de centrifugação	22
4.5.2. Avaliação das características macroscópicas e organolépticas.....	22
4.6. Ensaio biológico	22
4.6.1. Animais de laboratório	22
4.6.2. Tratamento	23
4.6.3. Avaliação dos efeitos das formulações na pele de camundongos sem pêlo por Bioengenharia Cutânea	24
4.6.3.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo.....	24
4.6.3.2. Medida do eritema.....	24
4.6.4. Avaliação dos efeitos das formulações na pele de camundongos sem pêlo por técnicas histopatológicas.....	25
4.6.4.1. Técnica morfométrica	26
4.6.4.1.1. Epiderme	26
4.6.4.1.2. Derme.....	27
4.6.4.2. Técnica estereológica	28
4.6.5. Análise estatística	31

5. RESULTADOS	32
5.1. Testes preliminares de estabilidade	32
5.1.1. Determinação do pH	32
5.1.2. Teste de Centrifugação	32
5.1.3. Determinação das características macroscópicas e organolépticas	33
5.2. Ensaio biológico	33
5.2.1. Avaliação dos efeitos das formulações por Bioengenharia Cutânea na pele de camundongos sem pêlo	35
5.2.1.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo	35
5.2.1.2. Medida do eritema	38
5.2.3. Morfometria	41
5.2.3.1. Epiderme	41
5.2.3.2. Derme	47
5.2.4. Estereologia	49
5.2.4.1. Volume citoplasmático	50
5.2.4.2. Volume celular	55
5.2.4.3. Densidade numérica	60
5.2.4.4. Camadas epiteliais	65
5.2.4.5. Camada córnea	70
5.2.4.6. Epitélio total	73
5.2.5. Análise histopatológica	76
5.2.5.1. Descrição da pele do animal de experimentação (controle)	76
5.2.5.2. Grupo que recebeu aplicação do veículo	77
5.2.5.3. Grupos que receberam a aplicação das formulações acrescidas de ácido retinóico	78
5.2.5.4. Grupos que receberam a aplicação das formulações acrescidas de palmitato de retinila	79
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÃO	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ANEXO

RESUMO

Gomes, M.L.C. Influência de diferentes concentrações de retinóides em formulações dermocosméticas nos efeitos benéficos e/ou colaterais na pele de camundongos sem pêlo.

2007, 108 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Os retinóides têm sido amplamente utilizados na clínica dermatológica e nos produtos cosméticos com finalidades preventivas e reparadoras dos efeitos indesejáveis do envelhecimento cutâneo. Considerando que a concentração de retinóides, como por exemplo, o ácido retinóico ou o palmitato de retinila, pode influenciar na eficácia e segurança de uso dos mesmos em formulações tópicas, é de fundamental importância o desenvolvimento e avaliação dos efeitos benéficos e/ou colaterais de formulações dermocosméticas contendo diferentes concentrações de ácido retinóico (0,025%, 0,05% e 0,1%) e palmitato de retinila (0,25%, 0,5% e 1,0%), visando a obtenção de uma concentração que proporcione a máxima eficácia possível e risco mínimo à pele. Assim, o presente trabalho tem por objetivos avaliar a influência de diferentes concentrações de retinóides (ácido retinóico ou palmitato de retinila) em formulações dermocosméticas com finalidades antienvelhecimento, na pele de camundongos sem pêlo, por estudos histopatológicos, morfométricos, estereológicos e por Bioengenharia Cutânea. Para tal foram preparadas três formulações de géis creme à base de hidroxietilcelulose (HEC) e microemulsão de silicone e octanoato de octila (formulações de nos 1 e 3) e à base de complexo lipídico contendo álcool batílico e lecitina de soja, HEC e octanoato de octila (formulação de nº 2) as quais foram submetidas a testes preliminares de estabilidade. A formulação de nº 1 (F1) foi considerada a mais estável e, portanto, selecionada como veículo para a avaliação dos efeitos do ácido retinóico e do palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo. Para a realização do ensaio biológico, amostras das formulações, acrescidas ou não (veículo) de 0,025; 0,05 ou 0,1% ácido retinóico ou 0,25; 0,5 ou 1,0% de palmitato de retinila foram aplicadas no dorso de camundongos sem pêlo. Após cinco dias da aplicação diária destas formulações, foram obtidas medidas de índice de

eritema pelo equipamento Mexameter® MX16 e medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo pelo equipamento Corneometer® CM825. Em seguida, os camundongos foram mortos e posteriormente foram colhidos fragmentos de pele das áreas que receberam aplicação das formulações, bem como da área que não foi aplicada nenhuma formulação (controle) e, a seguir, obtidos cortes histológicos para a realização dos estudos histopatológicos, morfométricos e estereológicos. De acordo com as metodologias empregadas, foi possível observar que, na avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, somente as formulações que continham ácido retinóico em diferentes concentrações, provocaram mudanças significativas, reduzindo este conteúdo, ou seja, ocasionou um ressecamento na superfície da pele. Apenas as formulações contendo 0,025 e 0,1% de ácido retinóico e 1,0% de palmitato de retinila provocaram um aumento no índice de eritema. Além disso, tanto o ácido retinóico quanto o palmitato de retinila, atuaram na epiderme, porém de modo e intensidade diferentes, sendo que, o ácido retinóico teve um efeito mais pronunciado em relação às variáveis estudadas. As três diferentes concentrações de ácido retinóico e de palmitato de retinila ocasionaram aumento significativo da espessura das camadas epiteliais, sem alteração da camada córnea. O ácido retinóico e o palmitato de retinila atuaram ainda aumentando os volumes nuclear, citoplasmático e celular, um dos fatores que ocasionou aumento da espessura do epitélio. Finalizando, ao analisar todas as variáveis histopatológicas, morfométricas e estereológicas, bem como o índice de eritema e o conteúdo aquoso do estrato córneo estudados, podemos sugerir que as formulações que continham as concentrações intermediárias, tanto do ácido retinóico (0,05%) quanto do palmitato de retinila (0,5 %), foram as que apresentaram melhores resultados, principalmente no que se refere a uma relação risco / benefício adequada e aceitável.

Palavras chave: Ácido Retinóico, Palmitato de retinila, Cosméticos, Histopatologia, Bioengenharia Cutânea, Eficácia.

ABSTRACT

Gomes, M.L.C. **Influence of different concentrations of retinoids in dermocosmetic formulations in their beneficial and/or collateral effects in hairless mice skin.** 2007, 108 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Retinoids has been widely used in dermatological clinic and in cosmetics products with preventive purposes as well as for the repairmen of the cutaneous aging undesirable effects. Considering that the concentration of retinoids, i.e., the retinoic acid or the retinyl palmitate, can influence their efficacy and safety in topical formulations, the development and evaluation of the beneficial and/or collateral effect of dermocosmetic formulations containing different concentrations of retinoic acid (0.025%, 0.05% e 0.1%) and retinyl palmitate (0.25%, 0.5% e 1.0%) is very important, aiming at the attainment of a concentration that provides to the maximum possible efficacy and minimum risk to the skin. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of different concentrations of retinoids (retinoic acid or retinyl palmitate) in dermocosmetics formulations with antiaging purposes, in hairless mice, using histopathological, morphometric and stereologic studies and Skin Bioengineering Techniques. For this purpose, three gel cream formulations were developed, containing hydroxyethylcellulose (HEC) and silicone microemulsion and octyl octanoate (formulations nº 1 and 3) and a complex lipidic based formulation containing batyl alcohol and lecithin, HEC and octyl octanoate (formulation nº 2), which were submitted to preliminary stability tests. The formulation nº1 (F1) was considered the most stable, therefore, it was selected as the vehicle for the evaluation of the effects of the retinoic acid and the retinyl palmitate in hairless mice skin. For the accomplishment of the biological assay, samples of the formulations, supplemented or not (vehicle) of 0.025, 0.05 or 0.1% retinoic acid or 0.25, 0.5 or 1.0% retinyl palmitate were applied in the dorsal skin of hairless mice. After five days of daily application of these formulations, the erythema index was measured by reflectance

spectrophotometry using a Mexameter[®] MX16 as well as the water content of the stratum corneum using *Corneometer*[®] CM825. After that, the hairless mice were sacrificed and later skin fragments were obtained for each area that received application of the formulations, as well as of the area that was not applied any formulation (control) and, after that histologic sections were obtained and submitted to histopathological, morphometric and stereologic studies. In accordance with the used methodologies, it was possible to observe that in the evaluation of the water content of the stratum corneum, only the formulations that contained retinoic acid in different concentrations provided significant changes, enhancing skin surface dryness. Only the formulations containing 0.025 and 0.1% of retinoic acid and 1.0% of retinyl palmitate provided an increase in erythema index. Moreover, both retinoic acid and retinyl palmitate acted in the epidermis, however in different intensity and way, since retinoic acid had more pronounced effects in relation to the studied variables. The three different concentrations of retinoic acid and retinyl palmitate caused a significant increase of the epithelial layers thickness, without alteration of the horny layer. Retinoic acid and retinyl palmitate also increased the nucleus, cytoplasmic and cell volumes, which was one of the factors that influenced the increase of the epithelium thickness. Finishing, when analyzing all the histopathological, morphometric and stereologic variables, as well as the erythema index and the water content of the stratum corneum studied, we can suggest that the formulations that contained the intermediate concentrations (such as 0.05% of retinoic acid and 0.5% of retinyl palmitate) presented the best results, mainly when an adequate and acceptable risk/benefit relationship is considered.

Key-words: Retinoic acid, Retinyl palmitate, Cosmetics, Histopathology, Skin Bioengineering Techniques, Efficacy.

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida da população humana tem aumentado e os efeitos do envelhecimento, seja por fatores internos ou externos (envelhecimento precoce) têm sido uma preocupação constante, em termos de prevenção e tratamento, visando à manutenção da qualidade de vida no decorrer dos anos. A exposição actínica tem efeitos deletérios à saúde da pele. No Brasil, a exposição à luz UV devido à geografia e ao clima dos trópicos é bastante significativa. Apesar de grande parte da população brasileira ter uma proteção natural maior devido a melanina presente na pele, casos de câncer de pele ocorrem com muita freqüência e tendem a aumentar no futuro devido ao aumento da expectativa de vida.

Assim, é de grande importância o estudo de formulações contendo substâncias ativas que são conhecidas como protetoras da pele contra os raios solares, seja por proteção direta (filtros solares) ou indireta, substâncias que combatem os radicais livres e melhoram as condições gerais da pele.

As vitaminas têm tido grande interesse em formulações dermocosméticas com finalidades preventivas e até mesmo reparadoras dos efeitos indesejáveis do fotoenvelhecimento, em função de suas propriedades farmacodinâmicas no tecido cutâneo (COUNTS, 1988; KELLER; FENSKE, 1998; LUPO, 2001).

Dentre elas, os retinóides, por atuarem na proliferação, diferenciação e ceratinização da célula, e ainda na secreção de sebo, nas inflamações, nas reações imunológicas e até mesmo na prevenção de certas neoplasias, tem tido destaque na terapia tópica de diferentes alterações cutâneas (TÖRMA; VAHLQUIST, 1990; BERGFELD, 1998).

Em dermatologia, os retinóides estão entre os mais importantes agentes terapêuticos, em função dos seus efeitos na melhoria das condições da pele (KLIGMAN, 1998), principalmente em relação às alterações cutâneas que preocupam o paciente pelo caráter inestético, tais como acne, rugas e alterações do padrão normal de pigmentação (manchas) (ORFANOS, 1997; STEINER, 1998). Sendo assim, a vitamina A na sua forma éster (palmitato de retinila) e o ácido retinóico, têm sido freqüentemente prescritos nas mais diferentes formulações de uso tópico em concentrações de 0,1 a 1,0% para o palmitato de retinila e de 0,01 a 0,1% para o ácido retinóico (IDSON, 1993; KELLER; FENSKE, 1998; ORFANOS, 1997). Para se ter uma idéia da importância que lhes tem sido atribuída, somente nos últimos 15 anos, aproximadamente 2500 novos retinóides foram sintetizados pela indústria farmacêutica (KLIGMAN, 1998). Além disso, devido a este interesse, grandes esforços têm sido realizados na pesquisa de retinóides para uso tópico (HERMITTE, 1992) conforme comprovam trabalhos científicos anteriormente realizados (MAIA CAMPOS et al., 1999; KUNCHALA et al., 2000; GIMENO et al., 2004; SORG et al., 2006).

A aplicação tópica de retinóides não se restringe à clínica médica, pois estes também vêm sendo bastante utilizados em formulações cosméticas para os cuidados da pele, visando a manutenção da eudermia, ou seja, das condições de normalidade da pele. Porém em cosmetologia, apenas o retinol, o retinal e o palmitato de retinila, em concentrações definidas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), são utilizados, ou seja, o ácido retinóico não é permitido em produtos cosméticos, restringindo-se, portanto, apenas à área médica. De acordo com o parecer sobre retinóides da Câmara Técnica de Cosméticos

(ANVISA, 2004) as concentrações permitidas estão na faixa de 0,1% a 1,0% para o retinol e palmitato de retinila e de 0,5% para o retinal.

Dentre os retinóides permitidos para uso em produtos cosméticos, o derivado de retinol na forma éster, o palmitato de retinila, tem sido o mais utilizado, devido a sua maior estabilidade em comparação com a forma álcool, bem como uma boa relação segurança x eficácia (KANG et al., 1995; VALQUIST et al., 1999).

Vários estudos vêm sendo realizados visando à avaliação dos efeitos dos retinóides na pele (ELIAS; WILLIAMS, 1981; EICHNER et al., 1996; LEONARDI et al. 1998; MAIA CAMPOS et al. 1999; KUNCHALA et al., 2000; GIMENO et al.,2004; SEKULA-GIBBS et al.,2004). Esses estudos incluem diferentes metodologias de avaliação, tais como estudos *in vitro* em diferentes tipos de culturas celulares (GIMENO et al., 2004), onde se avalia, por exemplo, a ação antioxidante destes, estudos “in vivo”, por técnicas histopatológicas (EICHNER et al., 1996) e os estudos clínicos (EICHNER et al., 1996; SEKUTA-GIBBS et al., 2004).

Os estudos histopatológicos são de grande valia para elucidar os efeitos benéficos (renovação celular) bem como possíveis efeitos colaterais (danos às células) e também efeitos que ainda não foram totalmente esclarecidos, quando da aplicação tópica do ácido retinóico e do palmitato de retinila, em diferentes concentrações e principalmente em concentrações maiores, as quais vêm sendo cada vez mais prescritas na prática dermatológica, na tentativa de intensificar os efeitos esperados a curto prazo (EICHNER et al., 1996).

Além desses estudos, as técnicas de Bioengenharia Cutânea, também têm tido grande aplicação, tanto em ensaios clínicos (DAL'BELO et al., 2006) quanto em estudos pré-clínicos de eficácia (GASPAR; CAMPOS, 2006).

Assim, considerando que ainda persistem dúvidas sobre os efeitos biológicos, dos diferentes retinóides, bem como as vantagens e desvantagens do emprego destes, a realização desta pesquisa contribuirá para esclarecer alguns pontos ainda controversos, especificamente em relação a estas substâncias quando aplicadas na pele.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tecido Cutâneo: Aspectos gerais do envelhecimento

A pele é o maior órgão do corpo humano, funciona como uma barreira de proteção, considerando que se encontra em contato, tanto com o meio externo, como com o meio interno, estando sujeita a agressões físicas e químicas. Seu principal papel é proteger o organismo de um lado impedindo a entrada de corpos estranhos e substâncias nocivas, e de outro, evitando a perda excessiva de água, o que levaria a uma desidratação, exercendo desse modo uma função barreira (HALLER, 1989; JASS; ELIAS, 1991). Ela é um órgão de revestimento complexo e heterogêneo, composto essencialmente de três grandes camadas de tecidos: uma camada superior constituída de um epitélio (a epiderme); uma camada intermediária, constituída de uma matriz de tecido conjuntivo (a derme); e uma camada profunda, constituída de tecido adiposo (a hipoderme) (QUIRONGA, 1986). A epiderme é uma camada de epitélio pavimentoso, constituída de células epiteliais dispostas em camadas, as quais de dentro para fora recebem, respectivamente, o nome de germinativa ou basal, espinhosa, granulosa e córnea. Nas regiões palmar e plantar, entre as camadas granulosa e córnea, encontra-se mais uma, a lúcida. Na camada basal originam-se as células epidérmicas, que vão sofrendo modificações graduais na forma e na composição química, passando pelos estratos espinhoso, córneo, granuloso, e pouco a pouco ganham a superfície até se tornarem anucleadas no estrato córneo e se esfoliarem. Ocorre, assim, um deslocamento permanente e repetido de células, que da camada basal atingem gradualmente a superfície da epiderme, para se desprenderem já mortas. Essa diferenciação ocorre em

torno de duas semanas para pessoas jovens, e em torno de 37 dias para pessoas com mais de 50 anos. Durante este processo os corneócitos sintetizam um grande número de proteínas e lipídeos (BECHELLI; CURBAN, 1975; ROTHMAN, 1954; RIEGER, 1992). O ciclo de ceratinização, ou corneificação, consiste na transformação de células epiteliais em células córneas, mortas. No processo de corneificação, em que se forma a ceratina (proteína insolúvel produzida pela epiderme), há progressiva desidratação celular, com decomposição gradual do citoplasma e do núcleo (BECHELLI; CURBAN, 1975).

As células que sofrem corneificação são conhecidas como corneócitos, e dão origem aos lipídeos encontrados no estrato córneo. Na periferia dos corneócitos existem os desmossomas, que garantem a coesão entre as células adjacentes. Entre a membrana celular e a superfície central dessas células, os lipídeos intercelulares interagem de forma covalente com a proteína presente. Entre esses lipídeos, estão as ceramidas, as quais se ligam à proteína do corneócito formando uma estrutura lamelar que participa na retenção de água e, conseqüentemente, na manutenção da hidratação cutânea. A perturbação do estrato córneo e da sua composição pode reduzir a atividade das proteases, desacelerando assim a descamação natural da pele. Assim a retenção de água no estrato córneo é importante para a manutenção de uma pele saudável (WERTZ, 1985; DOWNING, 1991; RIEGER, 1992; SUMMERS, 1996).

A pele jovem é capaz de manter esta camada de lipídeos intacta, mantendo sua proteção contra a desidratação, além de se apresentar firme e elástica. Mesmo assim, não dispensa cuidados especiais de hidratação, nutrição e fotoproteção, tanto para a manutenção da eudermia, quanto para impedir o envelhecimento precoce.

O envelhecimento cutâneo é resultado da influência de uma série de fatores, que podem ser divididos em intrínseco (cronológico) e extrínseco (envelhecimento precoce). O envelhecimento intrínseco é resultante do declínio “geneticamente programado” das funções vitais que garantem o bom funcionamento do organismo. Enquanto que o denominado envelhecimento extrínseco, consiste na exposição da pele a diversas agressões como radiação ultravioleta, poluição atmosférica, hábito de fumar e metabólitos de substâncias ingeridas ou inaladas. As manifestações clínicas correspondentes a essas agressões são irregularidades de pigmentação, rugas e uma variedade de lesões malignas (ENJELKE et al., 1997; STEINER, 1995; YAAR et al., 2002).

Os sinais clínicos do envelhecimento incluem a perda da firmeza e elasticidade cutânea, bem como aprofundamento das linhas de expressão. As principais características histológicas são a atrofia epidérmica, o achatamento da interface derme-epiderme e atrofia dérmica, alterando assim a sua capacidade de proliferação e de reparo (HERMITTE, 1992; GIACOMONI; ALESSIO, 1996).

Cada vez mais, a Ciência tem evoluído buscando por substâncias que possam tanto prevenir como retardar o envelhecimento cutâneo e o fotoenvelhecimento. Tanto na área cosmética como na área dermatológica, os profissionais têm demonstrado especial interesse pelas vitaminas, em função das suas propriedades farmacodinâmicas no tecido cutâneo. Entre elas, os retinóides tem tido destaque na terapia tópica de diferentes alterações cutânea.

2.2. Retinóides e a pele

Sob o termo retinóides englobam-se a vitamina A e todos os seus derivados. O termo vitamina A é utilizado para referir-se ao retinol, forma álcool desta vitamina. Se houver uma função aldeído em lugar de álcool, no grupo polar terminal da molécula da vitamina A, tem-se o retinal, e se houver esterificação tem-se o palmitato de retinila. Caso haja um grupo carboxila, tem-se o ácido retinóico, um metabólito da vitamina A, cuja ação fundamental está associada ao processo de diferenciação das células epiteliais. Existem dois isômeros do ácido retinóico: ácido 11 – trans- retinóico (tretinoína) e o ácido 13 – cis – retinóico (isotretinoína) (HERMITTE, 1992).

As lesões na pele devido à deficiência de vitamina A caracterizam-se por excessiva ceratinização, espessamento e descamação do estrato córneo, provavelmente devido à deficiência do transporte desta vitamina para a pele (DE RITTER et al.1959). Dessa forma, em 1949, tentou-se a aplicação tópica da vitamina A a partir do óleo de fígado de bacalhau observando-se diminuição do ressecamento e conseqüentemente melhoria das condições gerais da pele (GOLDRICK, 1996). Assim iniciou-se o uso tópico da vitamina A na forma livre (retinol) e na forma éster (palmitato de retinila) em pomadas e nas últimas décadas em cremes com finalidades cosméticas.

O ácido retinóico foi o primeiro retinóide a ser utilizado na clínica dermatológica, o qual tem se mostrado, dentre os retinóides, o mais ativo biologicamente, sendo, portanto muito usado em produtos de uso tópico para o tratamento da acne e do fotoenvelhecimento, além do seu vasto espectro clínico (BERGFELD et al. 1998).

Intracelularmente, os retinóides interagem com proteínas citoplasmáticas e receptores nucleares, induzindo a expressão de genes, os quais modulam a expressão de fatores de crescimento e seus receptores (estímulo da proliferação de ceratinócitos). Este mecanismo tem sido bem investigado para o ácido retinóico na sua forma trans (tretinoína), mas ele não pode ser ainda, válido para todos os retinóides (ORFANOS, 1997).

No entanto, a literatura é bastante controversa em relação ao uso dos retinóides, pois, se de um lado inúmeros benefícios são descritos, outros tantos de natureza toxicológica ocupam grande parte dos estudos científicos publicados (RIES; HESS, 1999; NAU, 1993).

Alguns autores iniciaram estudos *in vitro* sobre o efeito de diferentes doses de vitaminas e a sua relação risco x benefício. Entre eles, Gimeno e colaboradores (2004) avaliaram os efeitos dose-dependentes de retinóides em cultura de fibroblastos humanos e observaram que, concentrações maiores que o limite fisiológico causaram danos nestas células, levando-as a apoptose em função do processo oxidativo. Os retinóides estudados foram retinol, retinal, ácido retinóico e palmitato de retinila, sendo que o retinol causou maior dano que o retinal, o ácido retinóico causou um dano menor e o palmitato de retinila não teve efeito significativo.

Porém, nos experimentos *in vitro* as condições do meio de cultura das células não permitem total reprodução do que aconteceria quando da aplicação de uma determinada formulação, pois esses meios não contêm diversos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, hormônios, células do sistema imunológico e, principalmente, não apresentam estrato córneo, a principal barreira contra a penetração de substâncias na pele.

Além disso, pesquisas *in vitro* recentemente realizadas sugeriram que o ácido retinóico causou um aumento da melanogênese levando a uma hiperpigmentação, fato este indesejável, uma vez que vem crescendo a busca por produtos que mantenham o padrão normal de pigmentação cutânea e que sejam até mesmo clareadores, dependendo da situação da pele a ser tratada (FERNANDES et al., 2004).

Assim, apesar dos estudos *in vitro* que vêm sendo realizados serem de grande valia para a realização de testes preliminares de avaliação de eficácia e segurança de uma formulação ou de uma determinada substância ativa, os estudos *in vivo* são de fundamental importância para a avaliação dos efeitos indesejáveis de produtos dermocosméticos contendo palmitato de retinila e ácido retinóico nas reais condições de uso.

Neste sentido, Eichner e colaboradores (1996) avaliaram *in vivo* os efeitos do tratamento de ácido retinóico em camundongos e sugeriram por técnicas histopatológicas, bioquímicas e técnicas de Bioengenharia Cutânea, uma hiperproliferação epidérmica, seguida por uma modificação e não inibição do programa normal de diferenciação epidérmica, ou seja, modula os estágios finais da diferenciação epidérmica, retardando a morte programada da célula.

Os estudos *in vivo* incluem as metodologias tradicionais de avaliação histopatológica e histométrica e as não invasivas por técnicas de Bioengenharia Cutânea, sendo que estas últimas vêm sendo utilizadas também em estudos clínicos em camundongos (EICHNER et al., 1996).

Com estudos histopatológicos e histométricos é possível avaliar a espessura da epiderme e derme, as características nucleares, a densidade numérica, os volumes celular e

nuclear, edema (MAIA CAMPOS et al., 1999; SILVA; MAIA CAMPOS, 2000; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

As técnicas de Bioengenharia Cutânea permitem a avaliação das condições de hidratação e de eritema cutâneo por métodos não invasivos, podendo ser aplicadas como um complemento à análise histopatológica ou método de escolha na avaliação clínica de produtos dermocosméticos, para a comprovação dos efeitos de substâncias ativas ou produtos dermocosméticos, nas reais condições de uso, ou seja, na pele humana (LEONARDI et al., 2002; SILVER et al., 2003).

Considerando ainda que os retinóides possam atuar como antioxidantes quando associados a outras substâncias com tais propriedades e ainda como pró-oxidantes, dependendo da concentração de uso (GIMENO et al., 2004), muitas vezes é necessário a complementação destes estudos *in vitro* com a realização de estudos *in vivo* (histopatológicos) para elucidar tais efeitos e também efeitos que ainda não foram totalmente esclarecidos, quando da aplicação tópica do ácido retinóico e do palmitato de retinila, em diferentes concentrações.

2.3. Bioengenharia Cutânea

A Bioengenharia Cutânea consiste 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, 2002; OBA et al., 2002; RODRIGUES, 1997; SILVER et al., 2003; WIECHERS; BARLOW, 1999). 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 et al., 1996).

A Bioengenharia Cutânea representa uma complementação importante aos estudos clínicos baseados na avaliação visual e histopatológicos baseados nas análises histométricas, 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 cosméticas (LEONARDI et al., 2002; MIGNINI, 1998).

A medida do eritema tem sido realizada por avaliação visual bem como pela utilização de 2 outros princípios: o espectrofotométrico (absorção e reflexão) utilizando amplo espectro ou apenas alguns comprimentos de onda selecionados, e o princípio da medida do índice $L^*a^*b^*$ ou determinação das cores azul, vermelha e verde refletidas pelas estruturas da pele (FULLERTON et al., 1996).

Os aparelhos que utilizam o princípio espectrofotométrico de amplo espectro são muito caros e de difícil transporte, portanto os mais usados são os que utilizam a

espectrofotometria de apenas 3 comprimentos de onda (melanina e hemoglobina) e os que utilizam índice $L^*a^*b^*$.

Um dos aparelhos que apresenta o princípio de absorção em 3 comprimentos de onda é o *Mexameter*[®] MX16, um aparelho que mede o conteúdo da melanina e hemoglobina na pele, baseado no princípio da absorção. Este princípio baseia no fato da hemoglobina, presente nos vasos sanguíneos da derme ser o maior cromóforo da luz verde. A oxihemoglobina apresenta uma alta absorção de luz na faixa de 520 a 580nm (luz verde), e a absorção de luz vermelha é mínima. Quando o conteúdo de sangue do plexo subpapilar aumenta, resultando no eritema, uma grande quantidade de luz verde é absorvida e, conseqüentemente, menor quantidade de luz verde é refletida. Entretanto, a quantidade de luz vermelha absorvida e refletida apresenta pouca alteração. Sendo assim, pode ser obtido um índice, comparando-se a quantidade de luz vermelha e verde refletidas, que depende, principalmente, do conteúdo de sangue da derme. Os resultados são exibidos pelo aparelho, sendo, “E”: valores de eritema (TREVITHICK et al., 1992). Este princípio é descrito por vários autores (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; DYKES et al., 1995; PEARSE et al., 1990; FULLERTON et al., 1996; LAHTI et al., 1993).

O conteúdo aquoso do estrato córneo é mantido pelo filme hidrofílico 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). Dentre os diversos métodos disponíveis para a avaliação do conteúdo aquoso, tem-se considerado que os mais precisos baseiam-se em medidas da impedância e da capacidade 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*[®] CM825, um equipamento baseado na medida da capacitância, tem sido muito utilizado por apresentar alta sensibilidade (EGAWA et al., 2002; O’GOSHI; SERUP, 2005; SAGIV; MARCUS, 2003).

2.4. Estudos histopatológicos e histométricos

O grande crescimento do setor cosmético e a sua proximidade com a dermatologia têm levado, além da preocupação da tecnologia do produto, ao surgimento de novos termos e novos parâmetros de avaliação que buscam a unificação de ambas as áreas.

Dentre as etapas à Pesquisa e ao Desenvolvimento de novos produtos dermocosméticos, a avaliação histológica dos efeitos das substâncias ativas no tecido cutâneo apresenta grande importância, uma vez que pode orientar a indicação de uso das formulações, evidenciar possíveis efeitos indesejáveis e ainda auxiliar o delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia.

Os estudos histopatológicos e histométricos realizados na maioria das vezes utilizando-se de animais de laboratório permitem a obtenção de resultados de excelente qualidade, bem como possibilitam a interpretação dos efeitos de substâncias na pele, através da análise do tecido epitelial, da derme e também das características celulares (MAIA CAMPOS et al., 1999; SILVA; MAIA CAMPOS, 2000). Assim, essas técnicas têm sido consideradas adequadas para a avaliação de produtos cosméticos, uma vez que possibilitam a detecção de alterações cutâneas que possam ocorrer devido à ação de substâncias ativas.

A coloração dos cortes histológicos com hematoxilina e eosina permite a descrição das fibras colágenas que, com o envelhecimento, adquirem uma tonalidade azulada a esses corantes, tornando-se atroficas e fragmentadas, devido a alterações de caráter degenerativo. Quando ocorre uma nova produção de colágeno, este adquire uma tonalidade mais rósea e torna-se mais espesso. A observação das fibras colágenas é importante quando se pretende

avaliar os efeitos de formulações com finalidade antienvelhecimento, pois elas estão envolvidas com propriedades mecânicas do tecido cutâneo e apresentam-se degeneradas em peles envelhecidas (OBA et al., 2002).

A análise histopatológica consiste na observação visual de biópsias ao microscópio óptico e permite a avaliação qualitativa das diversas estruturas presentes no tecido cutâneo, deve ser complementada pela histometria, por meio da qual é possível determinar, por exemplo, a espessura da epiderme e da derme. Assim, os estudos histométricos consistem em avaliações quantitativas do tecido cutâneo, possibilitando a aplicação de testes estatísticos para analisar se as alterações observadas são estatisticamente significativas em relação ao controle.

As medidas da espessura da epiderme e da derme apresentam grande importância na avaliação dos efeitos de formulações antienvelhecimento, uma vez que em decorrência do envelhecimento, ocorrem alterações de caráter degenerativo na pele, sendo que a redução na sua espessura é um fato relatado na literatura (CHAPPARD et al., 1991). Há dados científicos demonstrando que alterações na epiderme influenciam a formação de rugas no início dos estágios do fotoenvelhecimento (OBAYASHI, 2002).

3. OBJETIVO

Avaliar a influência de diferentes concentrações de retinóides (ácido retinóico ou palmitato de retinila) em formulações dermocosméticas com finalidades antienvhecimento, na pele de camundongos sem pêlo, por estudos histopatológicos, morfométricos, estereológicos e por Bioengenharia Cutânea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas

As matérias-primas mencionadas a seguir estão de acordo com a nomenclatura descrita no Index ABC (Brandão, 2000) e, quando necessário, também está descrito o nome comercial e do fornecedor.

- Microemulsão de silicone, Net FS, Nikko Chemicals
- Hidroxietilcelulose, Natrosol 250 HHR, Galena
- Ácidos cáprico e caprílico, álcool batílico e lecitina de soja, Nikkolipid, Nikko Chemicals
- Octanoato de octila, Dragoxat EH, Symrise
- Glicerina PA
- Propilenoglicol PA
- Fenoxietanol e parabenos, Phenova, Croda
- BHT
- Água destilada e deionizada
- Ácido retinóico (*all-trans*-retinoic acid – Galena – Lote: 7041100581)
- Palmitato de retinila (DSM – Lote: UT04060128)

4.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico, Heidolph[®], RZR 2021
- Balança analítica, Ohaus, modelo AS200
- Balança eletrônica Marte, modelo AS 2000
- Bisturi cirúrgico
- Centrífuga Excelsa Baby II, Fanem, modelo 206-R, potência 0,0440 kw
- *Corneometer*[®] modelo CM825 (*Courage & Khazaka*)
- Chapa de aquecimento
- Estufa termostaticada e com controle de umidade e fotoperíodo Eletrolab, modelo 111FC de 45°C
- Higrômetro, CE
- Lâminas e lamínulas de vidro
- Microscópio óptico Leica DMLB acoplado a uma câmera DC 300
- *Mexameter*[®] modelo MX16 (*Courage & Khazaka*)
- Peagômetro, Digimed[®], modelo DM20
- Pinça cirúrgica
- Potes plásticos com capacidade 30 gramas
- Purificador de água Milli Q
- Termômetro
- Tesoura cirúrgica
- Vidrarias em geral

4.3. Desenvolvimento das formulações

As formulações descritas na Tabela 1 foram preparadas em agitador Heidolph, RZR 2021, a 625 rpm, por 25 minutos, formulações de géis creme à base de hidroxietilcelulose (HEC) e microemulsão de silicone (Net FS) e octanoato de octila (formulações de n^{os} 1 e 3) e à base de complexo lipídico contendo álcool batílico e lecitina de soja (Nikkolipid[®] 81S), HEC e octanoato de octila (formulação de n^o 2), preservantes (fenoxietanol e parabenos) e antioxidantes (BHT). Para a realização dos testes preliminares de estabilidade estas formulações foram acrescidas ou não de 0,025; 0,05 ou 0,1% de ácido retinóico ou de 0,25; 0,5 ou 1,0% de palmitato de retinila.

Tabela 1 – Formulações objeto de estudo

Matérias-primas	Concentrações das matérias-primas % (p/p)		
	Form. n°1	Form. n°2	Form. n°3
Ácidos cáprico e caprílico, Álcool batílico e lecitina de soja	-	3,5	-
Microemulsão de silicone	4,0	-	4,0
Hidroxietilcelulose	2,0	0,5	2,0
Glicerina	3,0	3,0	3,0
Propilenoglicol	3,0	3,0	3,0
Fenoxietanol e parabenos	0,8	0,8	0,8
BHT	0,05	0,05	0,05
Octanoato de octila	3,0	3,0	-
Água deionizada qsp.	100,0	100,0	100,0

4.4. 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 destilada.

4.5. Testes preliminares de estabilidade

4.5.1. Teste de centrifugação

Neste teste preliminar de estabilidade, 5 gramas de cada amostra objeto de estudo foi centrifugada a 3000rpm, por 30 minutos em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440, Fanem (MAIA CAMPOS; BADRA, 1992).

4.5.2. Avaliação das características macroscópicas e organolépticas

As amostras foram observadas, visualmente, quanto às seguintes alterações: cor, separação de fases e homogeneidade. As análises foram realizadas, diariamente, por um período de 7 dias, sendo que as amostras foram mantidas no ambiente e submetidas a 45° em estufa termostaticada e com controle de umidade e fotoperíodo.

4.6. Ensaio biológico

4.6.1. Animais de laboratório

Após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (anexo 1) foram utilizados 25 camundongos sem pêlo, machos, adultos, pesando em média 30 gramas, linhagem HRS / J, Laboratórios Jackson, Bar Harbor, ME, doados pelo laboratório Johnson

& Johnson, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas com água ad libitum e alimentados com ração Nuvlab[®].

4.6.2. Tratamento

Durante cinco dias, amostras da formulação selecionada nos testes preliminares de estabilidade, acrescidas ou não (veículo) de ácido retinóico e/ou palmitato de retinila, foram aplicadas longitudinalmente no dorso dos camundongos diariamente, em quantidades pré-definidas de 5 mg/cm² (TREVITHICK et al., 1992), seguindo o protocolo abaixo:

Grupo I: controle (sem tratamento);

Grupo II: foi aplicado o veículo;

Grupo III: foi aplicada a formulação acrescida de 0,025% de ácido retinóico;

Grupo IV: foi aplicada a formulação acrescida de 0,05% de ácido retinóico;

Grupo V: foi aplicada a formulação acrescida de 0,1% de ácido retinóico;

Grupo VI: foi aplicada a formulação acrescida de 0,25% de palmitato de retinila;

Grupo VII: foi aplicada a formulação acrescida de 0,5% de palmitato de retinila;

Grupo VIII: foi aplicada a formulação acrescida de 1,0% de palmitato de retinila;

4.6.3. Avaliação dos efeitos das formulações na pele de camundongos sem pêlo por Bioengenharia Cutânea

4.6.3.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Para a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo foi utilizado o equipamento *Corneometer*[®] *CM 825* 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 do estrato córneo, sendo estimado que 1 UA corresponde entre 0,2 e 0,9 mg de água por grama de estrato córneo. Foram efetuadas 10 medidas nos camundongos sem pêlo, após 4 horas da última aplicação das formulações objeto de estudo bem como no grupo controle. O número de medições realizadas foi determinado conforme o tamanho da região estudada, de tal forma a garantir que todo o local fosse avaliado.

4.6.3.2. Medida do eritema

Para a determinação do eritema, foram realizadas as leituras do índice de eritema nos camundongos sem pêlo, após 4 horas da última aplicação das formulações objeto de estudo bem como no grupo controle, com a utilização de um equipamento denominado *Mexameter*[®] *MX16*.

Foram efetuadas 6 medidas do índice de eritema, e a média destes valores foi utilizada para as análises posteriores. O índice de eritema está relacionado com o conteúdo de hemoglobina na pele, baseado no princípio da absorção. O Mexameter apresenta uma sonda que emite luz em três comprimentos de onda pré-definidos e um receptor que mede a luz refletida, podendo-se assim, calcular a luz absorvida pela pele. O eritema é medido por dois comprimentos de onda diferentes, um deles corresponde ao pico de absorção da hemoglobina (reflexão verde: 568nm ± 3nm), o outro foi escolhido para evitar influência de outras cores, como por exemplo, a bilirrubina (reflexão vermelha: 660nm ± 3nm). Os resultados são exibidos pelo aparelho como E: valores de eritema.

Os índices eritema (E) são calculados como:

$$E = \frac{500}{\log 5} \left(\log \frac{\text{reflexãovermelho}}{\text{reflexãoverde}} + \log 5 \right)$$

Este princípio de medida do eritema é descrito por Diffey et al. (1984), Fullerton et al. (1996), Schempp et al. (1999), Lahti et al. (1993) entre outros.

4.6.4. Avaliação dos efeitos das formulações na pele de camundongos sem pêlo por técnicas histopatológicas

Após o período de tratamento, os camundongos sem pêlo foram mortos em câmara de CO₂ e foram colhidos fragmentos da pele de 4mm de diâmetro de cada área tratada através da utilização de um punch dermatológico, os quais foram imersos imediatamente em solução fixadora de álcool 80% (85ml), formalina (100ml) e ácido acético (5ml) e deixados a fixar durante 24 horas. Após a fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas e

incluídas em parafina. Posteriormente foram realizados cortes de 6 micrometros de espessura, dos quais foram selecionados 10 cortes por bloco, de modo que cada um destes 10 cortes correspondam a um intervalo de 50 secções. Estes cortes foram então corados com hematoxilina e eosina.

A análise histopatológica do tecido cutâneo foi realizada em microscópio óptico Leica.

4.6.4.1. Técnica morfométrica

4.6.4.1.1. Epiderme

Para obter os diâmetros médios dos núcleos celulares das diversas camadas da epiderme, os cortes foram focalizados ao microscópico Leica com aumento de 100x, e a imagem transferida e congelada na tela de um microcomputador, onde as leituras foram feitas com o uso do software analisador de imagens Image J.

Foram obtidas 50 imagens nucleares para cada camada epidérmica estudada (basal, espinhosa e granulosa) referente a cada um dos cinco animais pertencentes aos diferentes grupos de tratamento. Tais imagens eram obtidas contornando-se com precisão cada um dos núcleos com o *mouse* do microcomputador e tomando-se o cuidado de considerar somente as imagens elípticas. Para o cálculo dos diâmetros nucleares, os eixos maior e menor dessas imagens foram determinados.

Uma vez determinados os diâmetros maior (D) e menor (d), é possível estimar as seguintes variáveis cariométricas (SALA et al., 1994):

a) Diâmetro geométrico médio:

$$M = (D \cdot d)^{1/2}$$

b) Relação entre os diâmetros maior e menor:

$$D/d$$

c) Volume

$$V = \pi \cdot M^3 / 6$$

4.6.4.1.2. Derme

A medida da espessura da derme foi realizada utilizando um microscópio óptico Leica, os cortes foram focalizados com aumento de 20x para a medida da derme, com auxílio do analisador de imagens Image J. Foram selecionadas aleatoriamente 3 imagens por animal em cada aumento e a partir delas foram realizadas 10 medidas por imagem, sendo obtido o valor médio para cada animal (LU, 1999).

4.6.4.2. Técnica estereológica

A fim de obterem-se as medidas estereológicas referentes às camadas basal, espinhosa e granulosa da epiderme submetidas aos tratamentos com as formulações objeto de estudo, foi utilizada uma grade idealizada por MERZ (1968) a qual consiste em um quadrado que limita uma área teste, contendo um sistema de pontos marcados sobre linhas sinuosas formadas por uma sucessão de semicírculos encadeados.

Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico Leica, com objetiva de aumento de acordo com a exigência da análise realizada (1000x). As imagens projetadas referentes às delimitações das camadas basal, espinhosa e granulosa foram obtidas com auxílio do analisador de imagens Image J. Com a finalidade de obter os dados das variáveis estereológicas de interesse para a presente pesquisa, foi realizada com a contagem do número de núcleos presentes nas diversas camadas que coincidiram com os pontos da grade situados nas semicircunferências, bem como o número de intersecções entre as limitações das diversas camadas da epiderme e as linhas sinuosas presentes na grade. Os dados assim obtidos foram então introduzidos em um *software* elaborado por MAIA CAMPOS (1999), o qual soluciona as equações estereológicas necessárias para o presente estudo e das quais resultam as medidas da relação núcleo/citoplasma, volume celular, volume citoplasmático, espessura total da epiderme, densidade de superfície e densidade numérica, as quais serão explicadas a seguir:

a) Relação núcleo / Citoplasma

A relação núcleo/citoplasma (N/C) é dada pela relação entre os volumes relativos do núcleo e do citoplasma, expressa pela equação:

$$N / C = V_{rn} / V_{rcit}.$$

Os volumes relativos foram determinados pelo número de pontos que caíram sobre as estruturas consideradas em relação ao número total de pontos da área teste.

Na verdade, o valor obtido assim é uma sobrestimação do valor real, devido ao chamado “efeito Holmes”, o qual decorre do uso de cortes histológicos de espessura finita. Essa sobrestimação pode ser corrigida, levando-se em consideração o tamanho da estrutura do corte histológico. Assim, HENNING (1957) propôs a seguinte equação para a correção do efeito Holmes, considerando os núcleos como esferas de diâmetro médio S sendo T a espessura do corte:

$$V_{vc} = \frac{V_{rn}}{1 + 3T / 2D}$$

Onde V_{vc} é a fração volumétrica dos núcleos corrigida e V_{rn} é a fração volumétrica observada. O diâmetro é determinado previamente, com o emprego da cariometria.

A relação núcleo/citoplasma corrigida será então:

$$N / C_{corrigida} = V_{vc} / 1 - V_{vc}$$

Sendo $1 - V_{vc}$ a fração volumétrica citoplasmática corrigida.

b) Volume Citoplasmático e Volume da célula epitelial

O volume citoplasmático (V_{ct}) foi estimado a partir do volume nuclear e da relação núcleo/citoplasma corrigida. Por sua vez, a soma dos volumes nuclear e citoplasmático fornecerá o valor estimado para a célula epitelial.

$$V_{ct} = \frac{V_n}{N / C_{\text{corrigida}}}$$

O volume da célula epitelial é:

$$V_{cel} = V_n + V_{ct}$$

c) Espessura Epitelial

A espessura epitelial das camadas epiteliais (E_e) das estruturas estudadas foi estimada mediante o método de WEIBEL (1969):

$$E_e = Pe.L / 2(Is + Ib)$$

Onde Pe é o número de pontos que estão sobre o epitélio, L é o comprimento de linha teste, Is e Ib são o número de intersecções das linhas – teste com a superfície externa do epitélio e com a interface epitélio/conjuntivo, respectivamente.

d) Relação superfície Livre / Camada Basal

Esta relação (SI / Sb) foi estimada pelo quociente entre os números de intercessões das linhas – teste com as respectivas superfícies:

$$SI / Sb = Is / Ib$$

e) Densidade numérica

A densidade da população celular por unidade de volume, uma vez conhecido o número de células por unidade de área tecidual, pode ser avaliada em termos de número médio de células por milímetro cúbico de tecido por meio da relação:

$$N_{cel} / mm^3 = 10^9 / V_{cel}$$

A potência refere-se à transformação de 1 milímetro cúbico em micrômetros cúbicos, uma vez que o denominador (volume celular médio) é dado em micrômetros, sendo necessário harmonizar as unidades de medida.

4.6.5. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos nos estudos de Bioengenharia Cutânea e nas análises morfométrica e estereológica foram submetidos à análise de normalidade da distribuição amostral, sendo selecionado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, realizado por meio de software estatístico (GMC) elaborado por Maia Campos (1999).

5. RESULTADOS

5.1. Testes preliminares de estabilidade

5.1.1. Determinação do pH

Os valores de pH obtidos para as formulações estudadas encontram-se na Tabela 2, onde se pode observar que praticamente todas as formulações apresentam pH levemente ácido na faixa de 4,96 a 6,24.

Tabela 2 – Valores de pH das formulações desenvolvidas acrescidas ou não de ácido retinóico e/ou palmitato de retinila.

	pH						
	Base	Ácido Retinóico			Palmitato de Retinila		
		0,025%	0,05%	0,1%	0,25%	0,5%	1,0%
F1	5,56	5,88	5,93	5,63	5,51	5,38	5,39
F2	5,15	5,26	5,43	5,27	5,06	5,02	4,96
F3	5,91	6,24	6,02	5,25	5,59	5,46	5,43

Legenda: C - controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

5.1.2. Teste de Centrifugação

No teste de centrifugação todas as formulações se mantiveram estáveis, visto que não foi observada separação de fases em nenhuma delas.

5.1.3. Determinação das características macroscópicas e organolépticas

As formulações foram submetidas ao teste preliminar de estabilidade por análise das características macroscópicas e organolépticas.

Após estocagem no ambiente e a 45°C, durante 7 dias, apenas a formulação de nº 1, acrescida de 0,1% de palmitato de retinila ou de 0,01% de ácido retinóico, não apresentou alterações de cores.

As formulações de nº 2 e de nº 3 contendo palmitato de retinila ou ácido retinóico foram excluídas, uma vez que apresentaram uma coloração amarelada no final deste teste de estabilidade.

5.2. Ensaio biológico

Os dados obtidos nos estudos por Bioengenharia Cutânea (para as variáveis: conteúdo aquoso do estrato córneo e eritema) e nas análises morfométrica e estereológica (para as variáveis: volumes nuclear, citoplasmático e celular, espessura da derme, densidade numérica, espessura das camadas epiteliais, da camada córnea e do epitélio total) foram submetidos a análise estatística para verificar se as alterações observadas com aplicação das formulações objeto de estudo foram estatisticamente diferentes entre si.

Os dados experimentais dos estudos por Bioengenharia Cutânea consistiram em 40 valores numéricos, correspondentes a variável: formulações estudadas, que provieram do cruzamento do controle e das 7 formulações objeto de estudo (veículo e veículo acrescido

de 0,025, 0,05 ou 0,1% de ácido retinóico ou 0,25, 0,5 ou 1,0% de palmitato de retinila) x 5 repetições, dando o produto fatorial $8 \times 5 = 40$.

Os dados obtidos nas análises morfométrica e estereológica provieram do cruzamento do controle e das 7 formulações objeto de estudo (controle, veículo e veículo acrescido de 0,025, 0,05 ou 0,1% de ácido retinóico ou 0,25, 0,5, ou 1,0% de palmitato de retinila) x 3 camadas epiteliais (basal, espinhosa e granulosa) x 5 repetições, dando o produto fatorial $8 \times 3 \times 5 = 120$. Quando nos testes interessava o epitélio como um todo, o número de dados se reduzia para 40, porque as 3 camadas eram reunidas num valor único, de modo que os fatores se reduziam a 1 (formulações), igualmente com 5 repetições, dando o produto fatorial $8 \times 5 = 40$. O mesmo se aplica a espessura total do epitélio e da camada córnea, ou seja, o número de dados consistia em 40 valores.

Os testes preliminares para verificação da normalidade da amostra obtida nestes estudos revelaram que a maioria das distribuições não era normal, sendo assim, selecionado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizado para comparações múltiplas de dados não vinculados.

5.2.1. Avaliação dos efeitos das formulações por Bioengenharia Cutânea na pele de camundongos sem pêlo

5.2.1.1. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Os resultados referentes à determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo obtidos, após 5 dias da aplicação ou não das formulações estudadas, na pele de camundongos sem pêlo, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Conteúdo aquoso do estrato córneo (unidades arbitrárias) dos camundongos sem pêlo utilizados como controle e dos que receberam a aplicação das formulações contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo.

Animais	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05 %	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1%
1	31,00	28,80	21,90	14,00	20,00	36,90	25,30	26,40
2	27,10	37,20	27,40	15,00	15,00	27,30	29,10	45,70
3	31,60	27,40	20,70	13,10	17,00	31,40	32,15	29,30
4	28,50	22,80	15,10	12,30	22,30	42,90	22,10	32,11
5	30,70	16,10	13,70	11,40	11,30	25,20	33,10	34,66

Legenda: C - controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para os valores de conteúdo aquoso do estrato córneo estão apresentados na Tabela 4, e na Figura 1, na qual as médias e os intervalos de confiança dos valores obtidos estão apresentados na forma de gráfico tipo colunas.

Tabela 4 – Conteúdo aquoso do estrato córneo - Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Controle x Veículo	4,7000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
Controle x AR 0,025%	14,9000	9,4450	12,7034	16,8109	1%
Controle x AR 0,05%	23,9000	9,4450	12,7034	16,8109	0,1%
Controle x AR 0,1%	16,3000	9,4450	12,7034	16,8109	1%
Controle x PR 0,25%	2,0000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
Controle x PR 0,5%	1,40000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
Controle x PR 1%	4,0000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
Veículo x AR 0,025%	10,2000	9,4450	12,7034	16,8109	5%
Veículo x AR 0,05%	19,2000	9,4450	12,7034	16,8109	0,1%
Veículo x AR 0,1%	11,6000	9,4450	12,7034	16,8109	5%
Veículo x PR 0,25%	6,7000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
Veículo x PR 0,5%	3,3000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
Veículo x PR 1%	8,7000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
AR 0,025% x AR 0,05%	9,0000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	1,4000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	7,6000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	3,4000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
PR 0,25% x PR 1%	2,0000	9,4450	12,7034	16,8109	ns
PR 0,5% x PR 1%	5,4000	9,4450	12,7034	16,8109	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

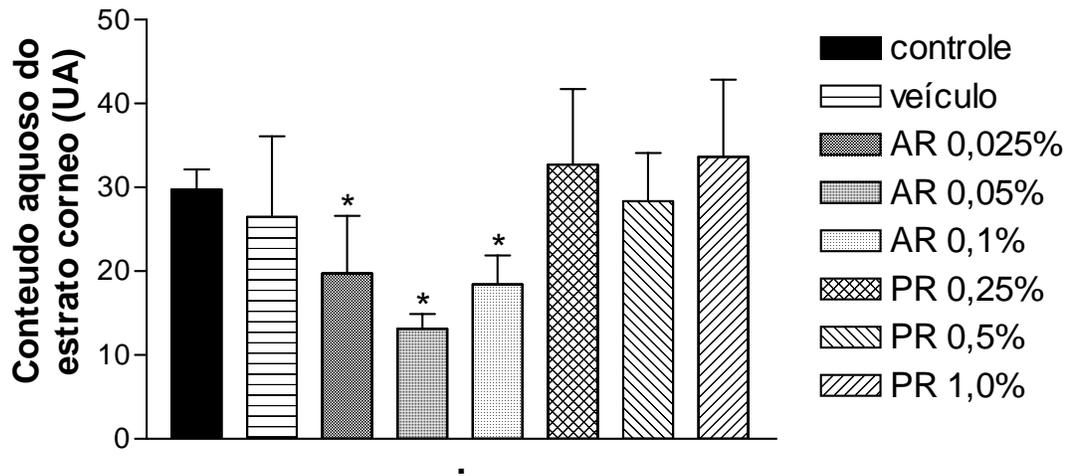


Figura 1. Conteúdo aquoso do estrato córneo obtido após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

A análise estatística indicou que somente a aplicação das 3 concentrações de ácido retinóico (0,025, 0,05 e 0,1%) reduziu, de forma estatisticamente significativa os valores do conteúdo aquoso do estrato córneo quando comparados com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo ($p < 0,05$). Em relação ao palmitato de retinila não houve alterações quando as regiões tratadas com diferentes concentrações desta substância ativa foram comparadas com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo.

5.2.1.2. Medida do eritema

Os resultados referentes aos índices de eritema, após 5 dias da aplicação ou não das formulações estudadas, na pele de camundongos sem pêlo, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Índices de eritema obtidos dos camundongos sem pêlo utilizados como controle e dos que receberam a aplicação das formulações contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo.

Animais	C	V	V + AR	V + AR	V + AR	V + PR	V + PR	V + PR
			0,025%	0,05 %	0,1%	0,25%	0,5%	1%
1	590,33	575,66	598,66	624,83	570,66	580,00	569,16	601,66
2	583,50	564,16	602,34	602,66	586,00	594,66	575,83	599,33
3	587,16	570,83	626,83	601,83	598,16	585,16	587,33	601,66
4	585,50	591,83	598,33	601,50	597,00	572,83	584,83	596,33
5	588,66	588,83	600,50	582,00	593,00	578,16	583,83	598,00

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para os índices de eritema estão apresentados na Tabela 6, e na Figura 2.

Tabela 6 - Índices de eritema - Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Controle x Veículo	6,6000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
Controle x AR 0,025%	17,2000	10,2233	13,7502	18,1961	1%
Controle x AR 0,05%	14,4000	10,2233	13,7502	18,1961	1%
Controle x AR 0,1%	3,2000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
Controle x PR 0,25%	4,2000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
Controle x PR 0,5%	6,0000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
Controle x PR 1%	13,2000	10,2233	13,7502	18,1961	5%
Veículo x AR 0,025%	23,8000	10,2233	13,7502	18,1961	0,1%
Veículo x AR 0,05%	21,0000	10,2233	13,7502	18,1961	0,1%
Veículo x AR 0,1%	9,8000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
Veículo x PR 0,25%	2,4000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
Veículo x PR 0,5%	0,6000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
Veículo x PR 1%	19,8000	10,2233	13,7502	18,1961	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	2,8000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	14,0000	10,2233	13,7502	18,1961	1%
AR 0,05% x AR 0,1%	11,2000	10,2233	13,7502	18,1961	5%
PR 0,25% x PR 0,5%	1,8000	10,2233	13,7502	18,1961	ns
PR 0,25% x PR 1%	17,4000	10,2233	13,7502	18,1961	1%
PR 0,5% x PR 1%	19,2000	10,2233	13,7502	18,1961	0,1%

Legenda: C – controle, V – veículo, AR - ácido retinóico, PR – palmitato de retinila.

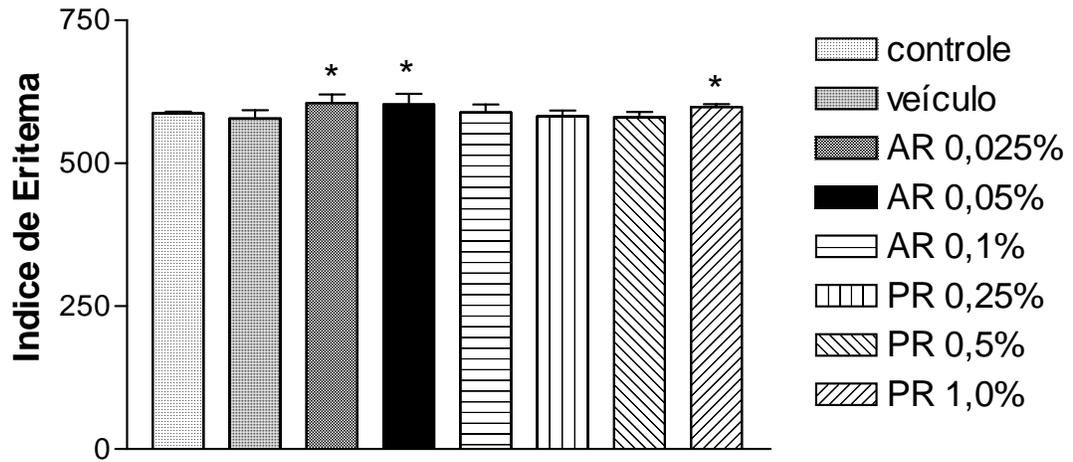


Figura 2. Medidas dos índices de eritema obtidos após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

A análise estatística indicou que apenas as formulações contendo 0,025 e 0,05% de ácido retinóico e 1,0% de palmitato de retinila aumentaram, de maneira estatisticamente significativa, o índice de eritema da pele dos camundongos sem pêlo quando comparados com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo ($p < 0,05$).

Em relação ao ácido retinóico observou-se uma diferença estatisticamente significativa quando foram comparadas as concentrações de 0,025 e 0,1%, 0,05 e 0,1%, já para o palmitato de retinila observou-se uma diferença estatisticamente significativa quando foram comparadas as concentrações de 0,25 e 1,0%, 0,5 e 1,0% (Tabela 6).

5.2.3. Morfometria

5.2.3.1. Epiderme

Os resultados obtidos para as variáveis morfométricas estudadas, diâmetro geométrico médio e volume nuclear, estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente, onde os dados da Tabela 7 (variável: diâmetro geométrico médio) foram utilizados apenas para os cálculos das demais variáveis envolvidas neste estudo.

Tabela 7 – Diâmetros geométricos médios dos núcleos (em μm) das células das camadas epiteliais após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

GRUPOS DE TRATAMENTO								
CAMADAS EPITELIAIS	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
CAMADA BASAL	7,01	7,01	6,94	6,73	7,40	6,17	6,11	5,96
	6,64	7,14	6,58	6,42	8,36	6,44	5,98	5,47
	7,18	6,46	6,32	6,35	7,65	6,22	6,52	5,74
	7,29	6,61	6,41	6,55	7,42	6,55	5,73	5,46
	6,15	6,91	6,29	6,62	7,39	6,14	5,73	5,48
CAMADA ESPINHOSA	6,31	6,62	7,22	6,88	7,35	6,76	5,81	5,75
	6,13	7,08	6,55	6,27	7,84	6,86	5,79	5,68
	6,80	7,20	6,41	6,72	6,99	6,62	5,79	5,93
	7,14	6,64	6,56	6,86	7,63	6,35	5,66	5,61
	6,93	7,02	6,34	7,41	7,12	6,31	5,66	5,74
CAMADA GRANULOSA	3,36	3,87	5,61	4,05	4,45	3,90	3,38	3,05
	3,62	3,78	5,01	4,08	4,98	3,97	3,28	3,10
	4,00	3,20	4,49	4,12	4,94	3,80	3,31	3,15
	3,87	3,45	4,13	3,58	4,35	4,11	3,21	3,16
	3,95	3,82	4,33	3,85	4,41	3,92	3,21	3,09

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 8 – Volume nuclear (em μm^3) das células das camadas epiteliais após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

GRUPOS DE TRATAMENTO								
CAMADAS EPITELIAIS	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
CAMADA BASAL	143,31	132,47	183,83	172,00	223,55	149,27	166,29	193,83
	158,89	127,02	160,01	223,65	221,18	151,65	178,89	185,90
	143,62	147,26	179,14	212,80	244,51	153,17	173,15	173,10
	133,47	159,70	173,32	193,77	225,90	172,13	154,74	195,59
	126,82	139,94	196,60	199,85	220,78	182,53	144,73	168,47
CAMADA ESPINHOSA	126,54	128,83	206,50	177,27	223,91	144,41	167,91	169,52
	106,86	119,14	174,04	204,15	207,23	152,24	156,57	176,95
	117,88	122,42	171,99	169,72	185,19	179,24	145,86	158,58
	111,52	116,95	153,85	179,17	243,01	177,12	179,79	170,78
	128,30	125,67	178,64	224,86	196,94	140,62	159,79	187,08
CAMADA GRANULOSA	94,29	83,29	92,17	97,33	67,70	102,92	76,02	97,88
	76,74	79,30	96,71	68,37	89,68	102,21	97,48	92,43
	85,37	98,62	85,87	88,93	69,65	99,93	101,31	70,51
	99,59	94,28	87,90	71,71	79,22	78,13	68,04	89,34
	103,24	107,36	69,27	86,41	98,44	73,49	100,07	79,34

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para o volume nuclear estão apresentados na Tabela 9, 10 e 11, e na Figura 3.

Tabela 9 - Volume nuclear da camada basal após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Basal					
Controle x veículo	0,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x AR 0,025%	33,4000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x AR 0,05%	45,6000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x AR 0,1%	57,0000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x PR 0,25%	16,8000	14,8454	19,6709	25,4477	5%
Controle x PR 0,5%	18,2000	14,8454	19,6709	25,4477	5%
Controle x PR 1%	35,8000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x AR 0,025%	32,8000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x AR 0,05%	45,0000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x AR 0,1%	57,0000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x PR 0,25%	16,2000	14,8454	19,6709	25,4477	5%
Veículo x PR 0,5%	17,6000	14,8454	19,6709	25,4477	5%
Veículo x PR 1%	35,2000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	12,2000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	24,2000	14,8454	19,6709	25,4477	1%
AR 0,05% x AR 0,1%	12,0000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	1,4000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,25% x PR 1%	19,0000	14,8454	19,6709	25,4477	5%
PR 0,5% x PR 1%	17,6000	14,8454	19,6709	25,4477	5%

Legenda: C – controle, V – veículo, AR - ácido retinóico, PR – palmitato de retinila.

Tabela 10 - Volume nuclear da camada espinhosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Espinhosa					
Controle x veículo	1,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x AR 0,025%	42,0000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x AR 0,05%	52,6000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x AR 0,1%	65,0000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x PR 0,25%	27,8000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x PR 0,5%	30,0000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Controle x PR 1%	38,4000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x AR 0,025%	40,4000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x AR 0,05%	51,0000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x AR 0,1%	63,4000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x PR 0,25%	26,2000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x PR 0,5%	28,4000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
Veículo x PR 1%	36,8000	14,8454	19,6709	25,4477	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	10,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	23,0000	14,8454	19,6709	25,4477	1%
AR 0,05% x AR 0,1%	12,4000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	2,2000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,25% x PR 1%	10,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,5% x PR 1%	8,4000	14,8454	19,6709	25,4477	ns

Legenda: C – controle, V – veículo, AR - ácido retinóico, PR – palmitato de retinila.

Tabela 11 – Volume nuclear da camada granulosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Granulosa					
Controle x veículo	0,4000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x AR 0,025%	6,8000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x AR 0,05%	9,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x AR 0,1%	10,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x PR 0,25%	0,8000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x PR 0,5%	2,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Controle x PR 1%	5,8000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Veículo x AR 0,025%	7,2000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Veículo x AR 0,05%	10,0000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Veículo x AR 0,1%	11,0000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Veículo x PR 0,25%	0,4000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Veículo x PR 0,5%	3,0000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
Veículo x PR 1%	6,2000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
AR 0,025% x AR 0,05%	2,8000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	3,8000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	1,0000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	3,4000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,25% x PR 1%	6,6000	14,8454	19,6709	25,4477	ns
PR 0,5% x PR 1%	3,2000	14,8454	19,6709	25,4477	ns

Legenda: C - controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

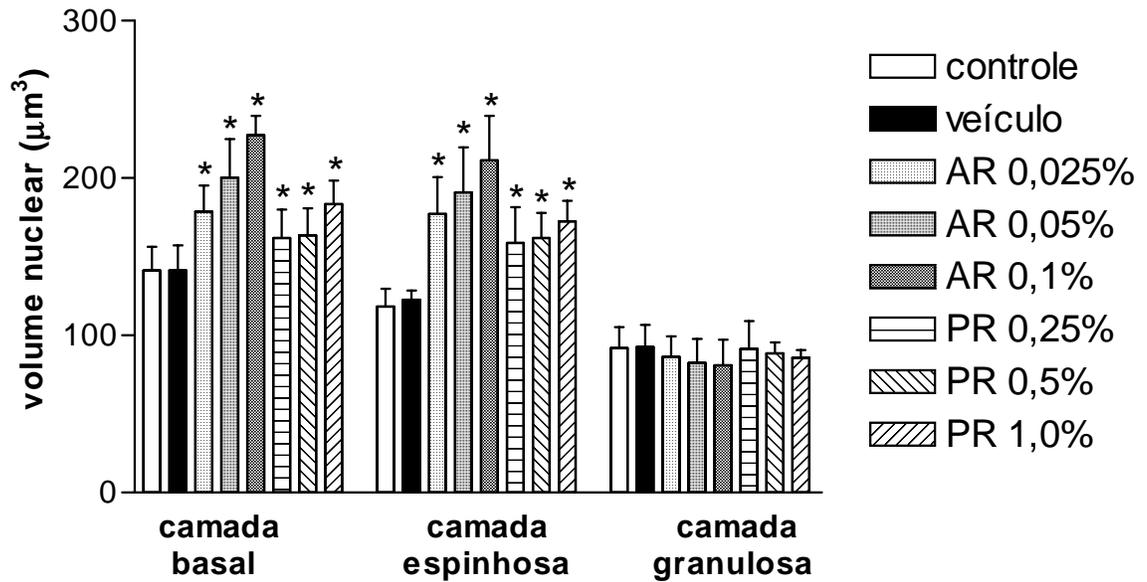


Figura 6. Volume nuclear obtido após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que as diferentes concentrações de ácido retinóico e palmitato de retinila aumentaram o volume nuclear da camada basal e espinhosa. Em relação ao ácido retinóico observou-se uma diferença estatisticamente significativa na camada basal apenas quando foram comparadas as concentrações de 0,025 e 0,1%, já para o palmitato de retinila observou-se uma diferença estatisticamente significativa quando foram comparadas as concentrações de 0,25 e 1,0%, 0,5 e 1,0% (Tabela 9). Na camada espinhosa observou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas quando foram comparadas as concentrações de 0,025% e 0,1% de ácido retinóico (Tabela 10).

Em relação à camada granulosa não foram observadas alterações estatisticamente significativas em nenhum dos grupos estudados.

5.2.3.2. Derme

Os resultados obtidos para a variável morfométrica estudada, espessura da derme, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Espessura (em μm) da derme após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

ANIMAIS	GRUPOS DE TRATAMENTO							
	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
1	359,32	400,24	431,63	243,14	328,64	425,68	484,55	420,18
2	400,67	496,29	299,10	248,33	386,94	427,82	487,11	440,70
3	394,00	356,58	220,57	287,89	343,14	428,61	349,31	408,74
4	427,53	339,69	350,01	287,15	289,39	421,77	329,63	439,08
5	371,72	363,22	369,65	461,12	394,16	433,52	401,08	431,38

Legenda: C - controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a espessura da derme estão apresentados na Tabela 13, e na Figura 7.

Tabela 13 – Espessura da derme após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Controle x veículo	0.6000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Controle x AR 0,025%	6.8000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Controle x AR 0,05%	10.8000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Controle x AR 0,1%	8.0000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Controle x PR 0,25%	9.0000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Controle x PR 0,5%	3.4000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Controle x PR 1%	9.8000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Veículo x AR 0,025%	6.2000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Veículo x AR 0,05%	10.2000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Veículo x AR 0,1%	7.4000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Veículo x PR 0,25%	9.6000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Veículo x PR 0,5%	4.0000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
Veículo x PR 1%	10.4000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
AR 0,025% x AR 0,05%	4.0000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	1.2000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	2.8000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	5.6000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
PR 0,25% x PR 1%	0.8000	13.0100	17.4982	23.1561	ns
PR 0,5% x PR 1%	6.4000	13.0100	17.4982	23.1561	ns

Legenda: C - controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

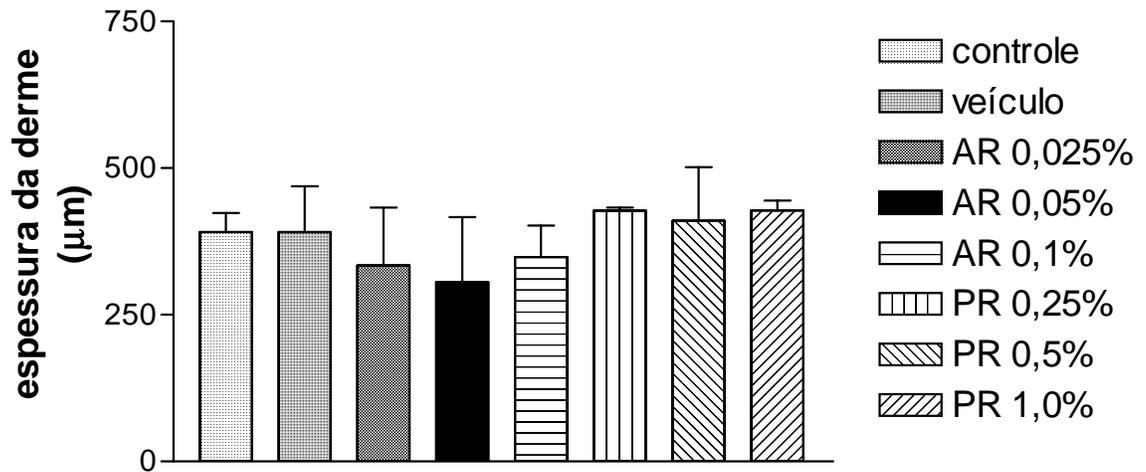


Figura 7. Médias da espessura da derme após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele dos camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

O teste de Kruskal-Wallis indicou nenhuma das formulações em estudo provocou alterações estatisticamente significativas na espessura da derme quando comparadas com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo.

5.2.4. Estereologia

Os resultados obtidos para as variáveis estereológicas estudadas: volume citoplasmático, volume celular, densidade numérica, espessura das camadas epiteliais, espessura da camada córnea e espessura total do epitélio, após 5 dias da aplicação ou não das formulações em estudo, estão representados nas Tabelas 14 a 33, respectivamente.

5.2.4.1. Volume citoplasmático

Tabela 14 - Volume citoplasmático (em μm^3) das células das camadas epiteliais após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

GRUPOS DE TRATAMENTO								
CAMADAS EPITELIAIS	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
CAMADA BASAL	139,64	114,61	411,58	314,72	397,69	234,56	249,83	314,51
	114,02	151,28	331,48	194,93	491,67	264,47	312,58	274,79
	97,33	90,82	271,43	412,12	431,68	250,58	285,20	310,31
	103,67	90,80	279,90	375,60	340,59	281,29	219,13	316,02
	83,36	103,83	257,29	292,72	277,87	262,60	270,16	333,77
CAMADA ESPINHOSA	195,37	181,65	336,36	237,76	235,34	231,07	254,81	210,73
	198,29	195,13	355,92	369,06	373,27	270,10	285,64	269,10
	138,89	136,12	270,01	240,62	266,01	255,12	192,79	231,42
	140,91	206,49	273,96	381,75	325,61	220,34	213,93	303,76
	164,96	135,22	256,78	278,31	373,94	212,93	270,38	267,49
CAMADA GRANULOSA	142,48	175,90	54,38	47,67	99,17	80,19	50,55	56,09
	99,06	145,79	74,63	58,69	50,39	80,22	85,48	56,27
	179,59	101,62	62,73	92,89	59,24	73,95	85,35	75,59
	170,51	135,42	103,20	87,15	79,69	67,41	51,96	73,03
	152,25	180,26	78,00	80,16	84,72	83,36	80,00	99,99

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para o volume citoplasmático estão apresentados na Tabela 15, 16 e 17, e na Figura 8.

Tabela 15 - Volume citoplasmático da camada basal após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Basal					
Controle x veículo	1,9000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
Controle x AR 0,025%	62,1000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x AR 0,05%	63,3000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x AR 0,1%	76,3000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x PR 0,25%	45,3000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x PR 0,5%	49,9000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x PR 1%	65,9000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,025%	60,2000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,05%	61,4000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,1%	74,4000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x PR 0,25%	43,4000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x PR 0,5%	48,0000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x PR 1%	64,0000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	1,2000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	14,2000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	13,0000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	4,6000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,25% x PR 1%	20,6000	16,1297	21,3726	27,6493	5%
PR 0,5% x PR 1%	16,0000	16,1297	21,3726	27,6493	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 16 - Volume citoplasmático da camada espinhosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Espinhosa					
Controle x veículo	0,2000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
Controle x AR 0,025%	41,8000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x AR 0,05%	40,4000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x AR 0,1%	44,2000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x PR 0,25%	20,0000	16,1297	21,3726	27,6493	5%
Controle x PR 0,5%	24,2000	16,1297	21,3726	27,6493	1%
Controle x PR 1%	27,2000	16,1297	21,3726	27,6493	1%
Veículo x AR 0,025%	42,0000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,05%	40,6000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,1%	44,4000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x PR 0,25%	20,2000	16,1297	21,3726	27,6493	5%
Veículo x PR 0,5%	24,4000	16,1297	21,3726	27,6493	1%
Veículo x PR 1%	27,4000	16,1297	21,3726	27,6493	1%
AR 0,025% x AR 0,05%	1,4000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	2,4000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	3,8000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	4,2000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,25% x PR 1%	7,2000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,5% x PR 1%	3,0000	16,1297	21,3726	27,6493	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 17 - Volume citoplasmático da camada granulosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Granulosa					
Controle x veículo	0,4000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
Controle x AR 0,025%	30,8000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x AR 0,05%	30,0000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x AR 0,1%	30,0000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x PR 0,25%	29,5000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x PR 0,5%	31,8000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Controle x PR 1%	32,2000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,025%	30,4000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,05%	29,6000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x AR 0,1%	29,6000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x PR 0,25%	29,1000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x PR 0,5%	31,4000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
Veículo x PR 1%	31,8000	16,1297	21,3726	27,6493	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	0,8000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	0,8000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	0,0000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	2,3000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,25% x PR 1%	2,7000	16,1297	21,3726	27,6493	ns
PR 0,5% x PR 1%	0,4000	16,1297	21,3726	27,6493	ns

Legenda: C – controle, V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

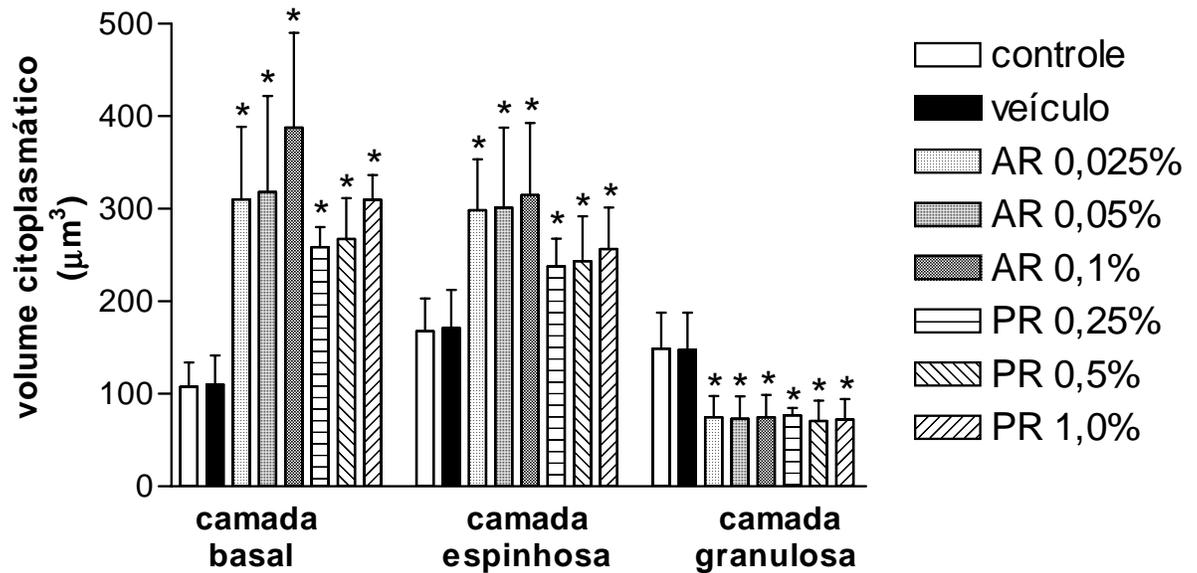


Figura 8. Volume citoplasmático obtido após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que os animais tratados com as diferentes concentrações de ácido retinóico e palmitato de retinila apresentaram um aumento do volume citoplasmático das camadas basal e espinhosa e apresentaram uma redução do volume citoplasmático da camada granulosa quando comparados com o grupo controle e o veículo.

Em relação ao palmitato de retinila observou-se uma diferença estatisticamente significativa na camada basal apenas quando foram comparadas as concentrações de 0,25 e 1,0% (Tabela 15).

5.2.4.2. Volume celular

Tabela 18 – Volume celular (em μm^3) das células das camadas epiteliais após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

GRUPOS DE TRATAMENTO								
CAMADAS EPITELIAIS	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
CAMADA BASAL	320.00	394.98	586.59	474.33	609.87	457.55	569.27	425.36
	257.30	341.87	480.65	533.48	697.59	504.31	424.55	560.48
	291.14	301.98	403.61	646.19	766.09	376.58	430.33	609.33
	275.53	342.02	417.80	522.74	554.49	428.43	417.63	501.25
	385.15	203.58	587.59	444.62	489.19	483.80	468.67	519.93
CAMADA ESPINHOSA	326.92	314.37	633.42	445.66	443.24	392.82	457.50	510.27
	308.90	354.29	603.06	621.38	625.59	439.14	587.27	565.05
	353.53	363.33	439.91	419.44	444.84	507.03	394.42	440.61
	331.50	309.15	421.77	514.33	558.19	354.40	308.87	396.20
	339.22	325.08	390.21	467.30	462.93	444.48	565.32	466.51
CAMADA GRANULOSA	446.82	386.25	270.94	233.81	262.34	299.25	270.76	245.31
	306.47	474.07	271.86	293.36	173.89	192.99	263.96	275.06
	260.12	418.78	191.96	176.01	213.10	258.68	166.34	296.64
	380.09	271.92	239.56	230.24	200.86	303.76	269.27	222.79
	420.51	209.45	235.43	225.07	284.51	224.90	297.31	129.63

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para o volume celular estão apresentados na Tabela 19, 20 e 21, e na Figura 9.

Tabela 19 - Volume celular da camada basal após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Basal					
Controle x veículo	4,8000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x AR 0,025%	52,0000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x AR 0,05%	62,0000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x AR 0,1%	73,6000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x PR 0,25%	44,0000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x PR 0,5%	45,0000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x PR 1%	60,6000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x AR 0,025%	47,2000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x AR 0,05%	57,2000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x AR 0,1%	68,8000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x PR 0,25%	39,2000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x PR 0,5%	40,2000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x PR 1%	55,8000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	10,0000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	21,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	11,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	1,0000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,25% x PR 1%	16,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,5% x PR 1%	15,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 20 - Volume celular da camada espinhosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Espinhosa					
Controle x veículo	0,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
Controle x AR 0,025%	40,2000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x AR 0,05%	43,8000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x AR 0,1%	46,4000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x PR 0,25%	26,2000	22,3116	29,5639	38,2461	5%
Controle x PR 0,5%	33,8000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Controle x PR 1%	39,6000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x AR 0,025%	43,2000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x AR 0,05%	45,8000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x AR 0,1%	25,6000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Veículo x PR 0,25%	33,2000	22,3116	29,5639	38,2461	5%
Veículo x PR 0,5%	39,0000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Veículo x PR 1%	3,6000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	6,2000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	2,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	7,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	13,4000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,25% x PR 1%	5,8000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,5% x PR 1%	3,2000	22,3116	29,5639	38,2461	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 21 - Volume celular da camada granulosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Granulosa					
Controle x veículo	3,2000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
Controle x AR 0,025%	35,4000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Controle x AR 0,05%	37,8000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Controle x AR 0,1%	39,0000	22,3116	29,5639	38,2461	0,1%
Controle x PR 0,25%	31,2000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Controle x PR 0,5%	31,8000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Controle x PR 1%	35,0000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Veículo x AR 0,025%	32,2000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Veículo x AR 0,05%	34,6000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Veículo x AR 0,1%	35,8000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
Veículo x PR 0,25%	28,0000	22,3116	29,5639	38,2461	5%
Veículo x PR 0,5%	28,6000	22,3116	29,5639	38,2461	5%
Veículo x PR 1%	31,8000	22,3116	29,5639	38,2461	1%
AR 0,025% x AR 0,05%	2,4000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	3,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	1,2000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	0,6000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,25% x PR 1%	3,8000	22,3116	29,5639	38,2461	ns
PR 0,5% x PR 1%	3,2000	22,3116	29,5639	38,2461	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

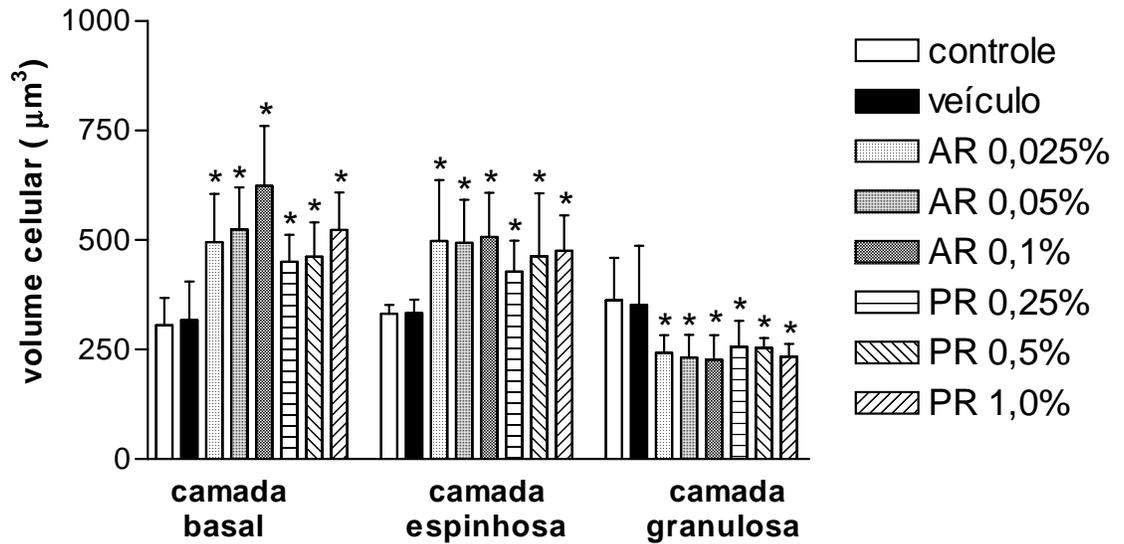


Figura 9. Volume celular obtido após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que os animais tratados com as diferentes concentrações de ácido retinóico e palmitato de retinila, apresentaram um aumento do volume celular das camadas basal e espinhosa, quando comparado com o grupo controle e veículo.

Em relação à camada granulosa, as diferentes concentrações de ácido retinóico e palmitato de retinila, provocaram uma diminuição neste volume, semelhante ao resultado obtido para a variável: volume citoplasmático.

5.2.4.3. Densidade numérica

Tabela 22 – Densidade numérica (em $n^{\circ} \times 10^5 / \text{mm}^3$) das células das camadas epiteliais após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

GRUPOS DE TRATAMENTO								
CAMADAS EPITELIAIS	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
CAMADA BASAL	3,18	3,14	1,16	2,27	0,99	1,58	1,74	1,37
	2,82	2,57	1,37	1,48	1,67	1,66	2,61	1,60
	2,75	2,29	2,38	1,14	1,49	2,44	1,28	1,55
	2,36	3,02	2,14	1,63	1,15	1,37	1,94	1,79
	3,07	2,95	1,71	1,37	0,96	2,56	2,13	2,46
CAMADA ESPINHOSA	2,08	1,81	1,95	1,89	1,04	1,88	1,42	1,55
	1,98	1,95	1,25	1,52	1,53	1,97	1,77	1,68
	2,11	1,87	1,19	1,32	1,44	2,10	1,94	1,46
	2,26	2,54	1,92	1,90	1,71	1,54	2,08	1,82
	1,85	2,19	1,47	1,14	1,33	1,77	1,83	1,90
CAMADA GRANULOSA	0,89	0,81	1,88	2,04	2,07	0,80	1,33	1,45
	1,55	1,73	1,37	1,87	1,87	1,47	1,93	1,96
	1,82	1,42	1,38	1,79	1,68	1,63	1,71	1,58
	1,90	1,69	2,14	1,65	1,63	1,36	0,91	0,89
	1,14	1,84	1,71	1,54	1,99	1,81	1,43	1,71

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a densidade numérica estão apresentados nas Tabelas 23, 24 e 25, e na Figura 10.

Tabela 23 – Densidade numérica da camada basal após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Basal					
Controle x veículo	0,8000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x AR 0,025%	54,3000	35,6405	47,2255	61,0944	1%
Controle x AR 0,05%	70,6000	35,6405	47,2255	61,0944	0,1%
Controle x AR 0,1%	92,0000	35,6405	47,2255	61,0944	0,1%
Controle x PR 0,25%	47,1000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Controle x PR 0,5%	39,5000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Controle x PR 1%	57,5000	35,6405	47,2255	61,0944	1%
Veículo x AR 0,025%	53,5000	35,6405	47,2255	61,0944	1%
Veículo x AR 0,05%	69,8000	35,6405	47,2255	61,0944	0,1%
Veículo x AR 0,1%	91,2000	35,6405	47,2255	61,0944	0,1%
Veículo x PR 0,25%	46,3000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Veículo x PR 0,5%	38,7000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Veículo x PR 1%	56,7000	35,6405	47,2255	61,0944	1%
AR 0,025% x AR 0,05%	16,3000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	37,7000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
AR 0,05% x AR 0,1%	21,4000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	7,6000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,25% x PR 1%	10,4000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,5% x PR 1%	18,0000	35,6405	47,2255	61,0944	ns

Legenda: C – controle, V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 24 – Densidade numérica da camada espinhosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Espinhosa					
Controle x veículo	3,7000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x AR 0,025%	45,5000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Controle x AR 0,05%	47,3000	35,6405	47,2255	61,0944	1%
Controle x AR 0,1%	61,6000	35,6405	47,2255	61,0944	0,1%
Controle x PR 0,25%	18,6000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x PR 0,5%	23,5000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x PR 1%	36,5000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Veículo x AR 0,025%	41,8000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Veículo x AR 0,05%	43,6000	35,6405	47,2255	61,0944	5%
Veículo x AR 0,1%	57,9000	35,6405	47,2255	61,0944	1%
Veículo x PR 0,25%	14,9000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x PR 0,5%	19,8000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x PR 1%	32,8000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
AR 0,025% x AR 0,05%	1,8000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	16,1000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	14,3000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	4,9000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,25% x PR 1%	17,9000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,5% x PR 1%	13,0000	35,6405	47,2255	61,0944	ns

Legenda: C – controle, V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 25 – Densidade numérica da camada granulosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Granulosa					
Controle x veículo	2,3000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x AR 0,025%	15,8000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x AR 0,05%	23,4000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x AR 0,1%	31,3000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x PR 0,25%	7,2000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x PR 0,5%	2,3000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Controle x PR 1%	4,0000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x AR 0,025%	13,5000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x AR 0,05%	21,1000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x AR 0,1%	29,0000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x PR 0,25%	9,5000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x PR 0,5%	4,6000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
Veículo x PR 1%	1,7000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
AR 0,025% x AR 0,05%	7,6000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	15,5000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	7,9000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	4,9000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,25% x PR 1%	11,2000	35,6405	47,2255	61,0944	ns
PR 0,5% x PR 1%	6,3000	35,6405	47,2255	61,0944	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

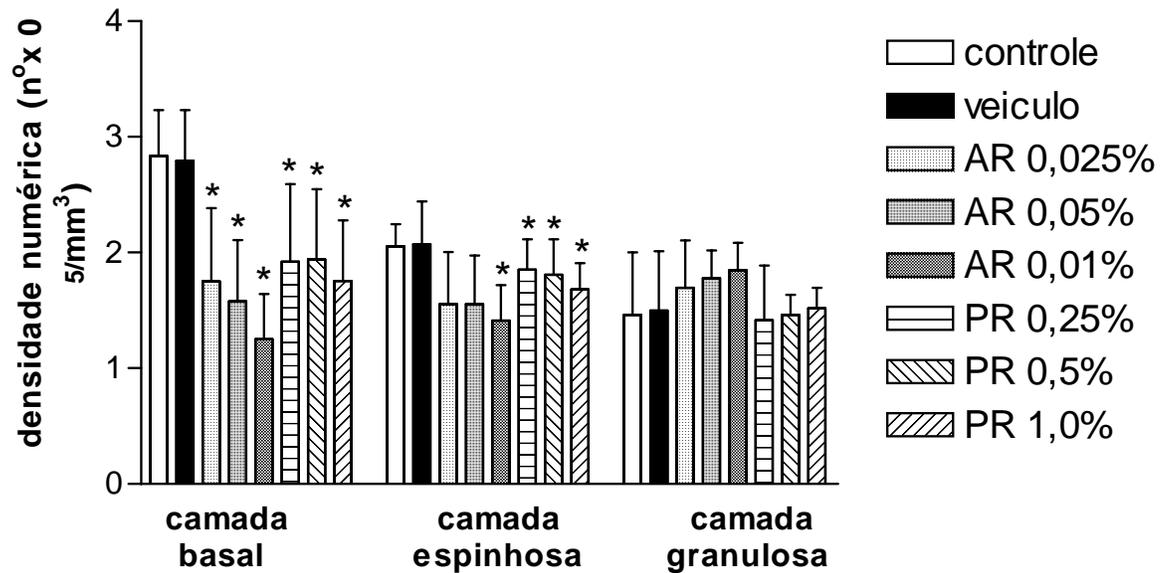


Figura 10. Densidade numérica obtida após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que os animais tratados com as diferentes concentrações de ácido retinóico e de palmitato de retinila apresentaram uma redução da densidade numérica da camada basal quando comparado com o grupo controle e veículo. Quando se comparou as diferentes concentrações do ácido retinóico observou-se uma diferença estatisticamente significativa na camada basal apenas entre as concentrações de 0,025 e 0,1% (Tabela 23).

Todas as concentrações de palmitato de retinila e apenas a concentrações de 0,1% de ácido retinóico provocaram uma redução da densidade numérica da camada espinhosa quando comparado com o grupo controle e veículo (Tabela 24).

A aplicação das formulações em estudo não provocou alterações estatisticamente significativas na densidade numérica da camada granulosa quando comparadas com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo.

5.2.4.4. Camadas epiteliais

Tabela 26 – Espessura das camadas epiteliais (em μm) após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

		GRUPOS DE TRATAMENTO						
CAMADAS EPITELIAIS	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
CAMADA BASAL	7,52	6,99	8,68	14,11	14,57	7,65	9,72	10,85
	5,24	6,71	9,56	10,79	15,31	9,02	9,15	9,75
	6,30	5,35	9,00	16,90	13,96	8,51	8,52	8,28
	5,75	6,59	8,16	14,99	13,84	6,84	10,11	10,94
	6,34	5,82	9,42	12,98	11,82	8,02	7,64	7,98
CAMADA ESPINHOSA	7,60	7,20	8,84	12,07	12,00	6,88	7,20	8,15
	5,89	6,50	8,62	8,61	11,91	8,72	6,54	8,10
	4,37	5,42	8,61	11,10	11,05	8,55	8,99	7,48
	6,13	5,08	8,89	9,18	10,70	6,64	9,67	9,59
	6,21	6,14	9,41	13,25	8,12	8,49	8,19	7,73
CAMADA GRANULOSA	2,94	2,97	4,69	5,58	5,85	4,62	4,46	4,47
	2,95	3,24	3,99	4,97	4,25	4,73	4,33	5,17
	2,68	2,63	4,54	5,40	4,76	4,39	5,30	4,01
	2,72	2,72	5,01	3,74	5,62	4,17	4,00	5,30
	2,83	2,52	4,97	4,69	4,13	3,76	4,38	4,66

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a espessura das camadas epiteliais estão apresentados nas Tabelas 27, 28 e 29, e na Figura 11.

Tabela 27 - Espessura da camada basal após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo, Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Basal					
Controle x veículo	1,8000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
Controle x AR 0,025%	47,6000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x AR 0,05%	61,2000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x AR 0,1%	65,2000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x PR 0,25%	23,2000	14,5174	19,2363	24,8855	1%
Controle x PR 0,5%	36,6000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x PR 1%	40,2000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x AR 0,025%	45,8000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x AR 0,05%	59,4000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x AR 0,1%	63,4000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x PR 0,25%	21,4000	14,5174	19,2363	24,8855	1%
Veículo x PR 0,5%	34,8000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x PR 1%	38,4000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	13,6000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	17,6000	14,5174	19,2363	24,8855	5%
AR 0,05% x AR 0,1%	4,0000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	13,4000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,25% x PR 1%	17,0000	14,5174	19,2363	24,8855	5%
PR 0,5% x PR 1%	3,6000	14,5174	19,2363	24,8855	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 28 - Espessura da camada espinhosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Espinhosa					
Controle x veículo	1,9000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
Controle x AR 0,025%	40,3000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x AR 0,05%	48,5000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x AR 0,1%	52,6000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x PR 0,25%	26,0000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x PR 0,5%	28,9000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x PR 1%	27,8000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x AR 0,025%	38,4000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x AR 0,05%	46,6000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x AR 0,1%	50,7000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x PR 0,25%	24,1000	14,5174	19,2363	24,8855	1%
Veículo x PR 0,5%	27,0000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x PR 1%	25,9000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	8,2000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	12,3000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	4,1000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	2,9000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,25% x PR 1%	1,8000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,5% x PR 1%	1,1000	14,5174	19,2363	24,8855	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Tabela 29 - Espessura da camada granulosa após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Camada Granulosa					
Controle x veículo	0,4000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
Controle x AR 0,025%	20,9000	14,5174	19,2363	24,8855	1%
Controle x AR 0,05%	25,5000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x AR 0,1%	25,5000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Controle x PR 0,25%	15,7000	14,5174	19,2363	24,8855	5%
Controle x PR 0,5%	17,4000	14,5174	19,2363	24,8855	5%
Controle x PR 1%	22,4000	14,5174	19,2363	24,8855	1%
Veículo x AR 0,025%	21,3000	14,5174	19,2363	24,8855	1%
Veículo x AR 0,05%	25,9000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x AR 0,1%	25,9000	14,5174	19,2363	24,8855	0,1%
Veículo x PR 0,25%	16,1000	14,5174	19,2363	24,8855	5%
Veículo x PR 0,5%	17,8000	14,5174	19,2363	24,8855	5%
Veículo x PR 1%	22,8000	14,5174	19,2363	24,8855	1%
AR 0,025% x AR 0,05%	4,6000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	4,6000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	0,0000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	1,7000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,25% x PR 1%	6,7000	14,5174	19,2363	24,8855	ns
PR 0,5% x PR 1%	5,0000	14,5174	19,2363	24,8855	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

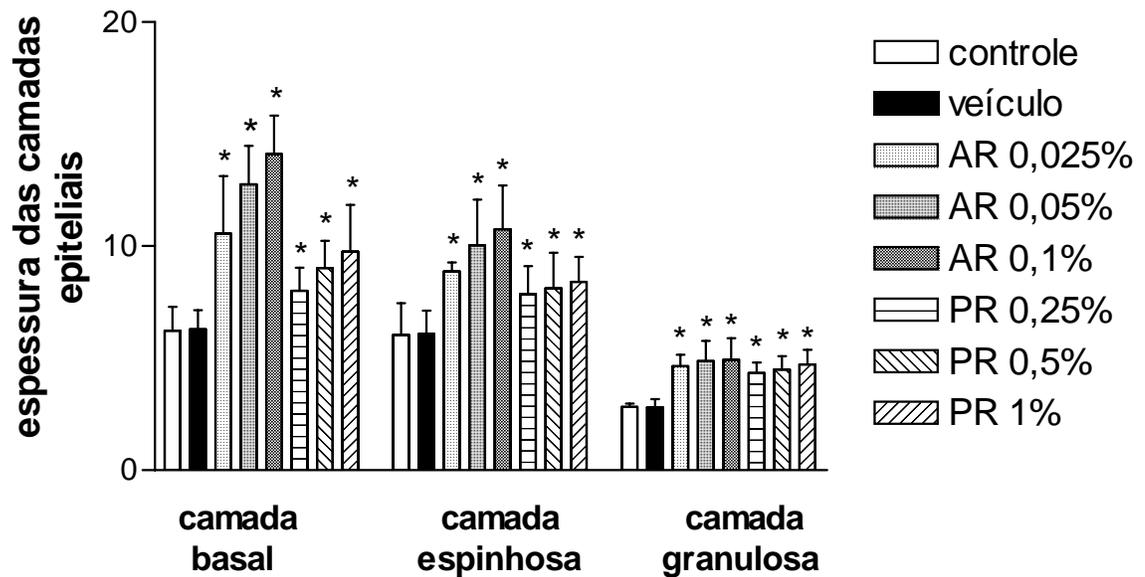


Figura 11. Espessura das camadas epiteliais obtida após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que os animais tratados com as diferentes concentrações de ácido retinóico e de palmitato de retinila provocaram um aumento na espessura das camadas basal, espinhosa e granulosa quando comparados com o grupo controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo.

Em relação ao ácido retinóico observou-se uma diferença estatisticamente significativa na camada basal apenas quando foram comparadas as concentrações de 0,025 e 0,1%, e, para o palmitato de retinila observou-se uma diferença estatisticamente significativa na camada basal apenas quando foram comparadas as concentrações de 0,25 e 1,0% (Tabela 29).

5.2.4.5. Camada córnea

Tabela 30 – Espessura da camada córnea (em μm) após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como do grupo controle.

ANIMAIS	GRUPOS DE TRATAMENTO							
	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
1	11,10	11,87	11,43	7,05	9,60	11,08	9,15	9,08
2	10,10	7,37	9,35	9,38	12,60	9,79	10,42	9,99
3	8,81	10,02	10,66	10,57	12,56	8,67	8,69	9,66
4	10,57	8,98	10,62	8,57	10,14	9,30	8,75	8,73
5	6,61	9,16	8,07	12,72	8,39	10,11	8,73	7,63

Legenda: C – controle; V - veículo; AR – ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a camada córnea estão apresentados na Tabela 31, e na Figura 12.

Tabela 31 – Espessura da camada córnea após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo. Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Controle x veículo	1,9000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Controle x AR 0,025%	3,9000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Controle x AR 0,05%	1,2000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Controle x AR 0,1%	5,3000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Controle x PR 0,25%	0,9000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Controle x PR 0,5%	5,8000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Controle x PR 1%	6,0000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Veículo x AR 0,025%	5,8000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Veículo x AR 0,05%	0,7000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Veículo x AR 0,1%	7,2000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Veículo x PR 0,25%	2,8000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Veículo x PR 0,5%	3,9000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
Veículo x PR 1%	4,1000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
AR 0,025% x AR 0,05%	5,1000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	1,4000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
AR 0,05% x AR 0,1%	6,5000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	6,7000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
PR 0,25% x PR 1%	6,9000	15,7013	21,1179	27,9461	ns
PR 0,5% x PR 1%	0,2000	15,7013	21,1179	27,9461	ns

Legenda: C – controle, V – veículo, AR - ácido retinóico, PR – palmitato de retinila.

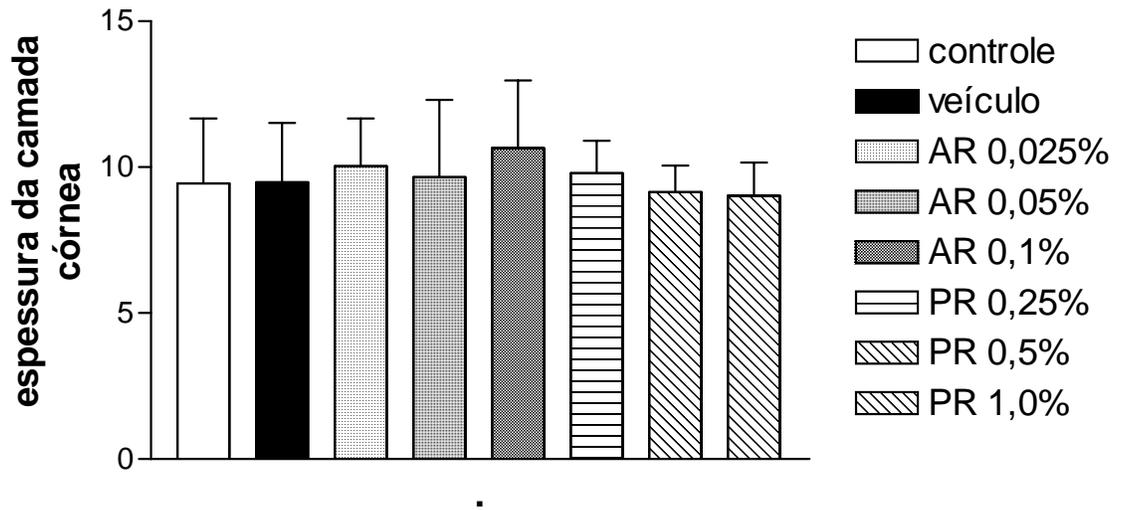


Figura 12. Espessura da camada córnea obtida após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

O teste de Kruskal-Wallis indicou que a aplicação das formulações em estudo não provocou alterações estatisticamente significativas na espessura da camada córnea quando comparadas com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo.

5.2.4.6. Epitélio total

Tabela 32 – Espessura do epitélio total (em μm) após a aplicação das formulações acrescidas ou não do ácido retinóico ou palmitato de retinila, bem como no grupo controle.

ANIMAIS	GRUPOS DE TRATAMENTO							
	C	V	V + AR 0,025%	V + AR 0,05%	V + AR 0,1%	V + PR 0,25%	V + PR 0,5%	V + PR 1,0%
1	20,45	20,85	21,01	23,85	25,77	19,51	26,80	29,59
2	18,30	20,31	27,13	28,24	34,80	21,84	23,57	29,43
3	17,08	17,34	26,39	23,31	38,63	22,55	21,49	21,79
4	18,27	17,59	18,77	24,44	30,90	21,46	22,41	26,51
5	15,41	18,50	25,76	31,03	28,54	25,61	26,99	24,29

Legenda: C – controle; V - veículo; AR - ácido Retinóico; PR – palmitato de retinila.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a camada córnea estão apresentados na Tabela 33, e na Figura 13.

Tabela 33 - Espessura total do epitélio após aplicação ou não das formulações objeto de estudo na pele de camundongos sem pêlo, Teste de Kruskal-Wallis, n=5 (média dos postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparação duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Controle x Veículo	2,2000	8,9001	11,9704	15,8409	ns
Controle x AR 0,025%	16,4000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
Controle x AR 0,05%	22,4000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
Controle x AR 0,1%	30,4000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
Controle x PR 0,25%	11,8000	8,9001	11,9704	15,8409	5%
Controle x PR 0,5%	18,0000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
Controle x PR 1%	22,8000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
Veículo x AR 0,025%	14,2000	8,9001	11,9704	15,8409	1%
Veículo x AR 0,05%	20,2000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
Veículo x AR 0,1%	28,2000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
Veículo x PR 0,25%	9,6000	8,9001	11,9704	15,8409	5%
Veículo x PR 0,5%	15,8000	8,9001	11,9704	15,8409	1%
Veículo x PR 1%	20,6000	8,9001	11,9704	15,8409	0,1%
AR 0,025% x AR 0,05%	6,0000	8,9001	11,9704	15,8409	ns
AR 0,025% x AR 0,1%	14,0000	8,9001	11,9704	15,8409	1%
AR 0,05% x AR 0,1%	8,0000	8,9001	11,9704	15,8409	ns
PR 0,25% x PR 0,5%	6,2000	8,9001	11,9704	15,8409	ns
PR 0,25% x PR 1%	11,0000	8,9001	11,9704	15,8409	5%
PR 0,5% x PR 1%	4,8000	8,9001	11,9704	15,8409	ns

Legenda: C – controle; V – veículo; AR - ácido retinóico; PR – palmitato de retinila.

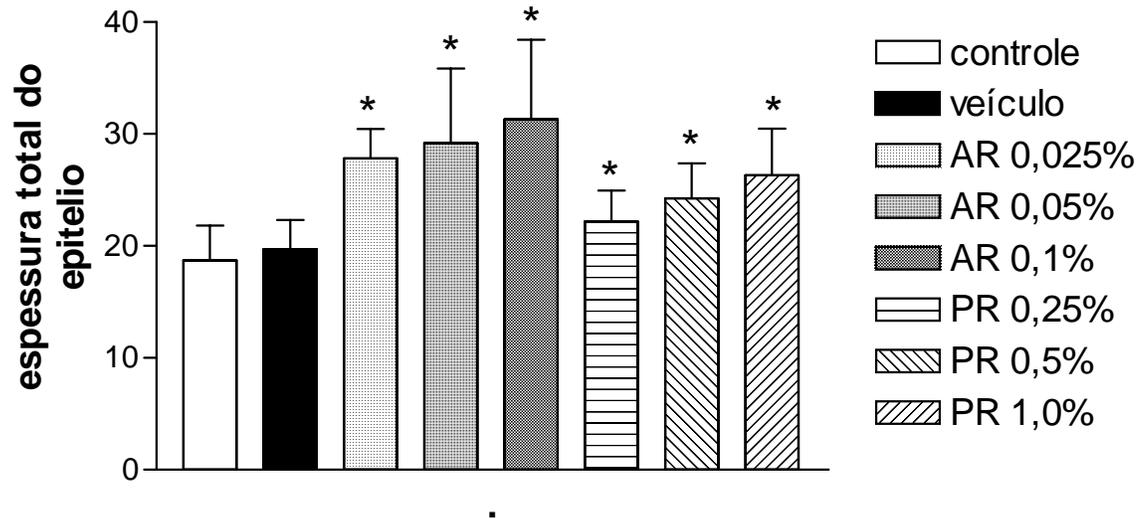


Figura 13. Espessura total do epitélio obtida após a aplicação das formulações objeto de estudo contendo ou não ácido retinóico ou palmitato de retinila na pele de camundongos sem pêlo (mediana e intervalo de confiança de 95%).

* Significativo em relação ao controle e ao veículo ($p < 0,05$)

Os resultados deste teste mostraram que o veículo não provocou um aumento na espessura total do epitélio quando comparado com o controle. Houve um aumento significativo na espessura total do epitélio após a aplicação das formulações contendo diferentes concentrações de ácido retinóico e de palmitato de retinila, quando comparados com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo e com o controle ($p < 0,05$), sendo que o ácido retinóico provocou um aumento mais pronunciado nesses valores.

Em relação ao ácido retinóico observou-se uma diferença estatisticamente significativa na espessura total do epitélio apenas quando foram comparadas as concentrações de 0,025 e 0,1%, para o palmitato de retinila observou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas quando foram comparadas as concentrações de 0,25 e 1,0% (Tabela 33).

5.2.5. Análise histopatológica

5.2.5.1. Descrição da pele do animal de experimentação (controle)

A pele do camundongo sem pêlo (Grupo I) é basicamente constituída de epiderme e derme, além de terminações nervosas e outros tecidos relacionados.

A epiderme é constituída de quatro camadas epidérmicas. Estas camadas (ou estrato) consistem basicamente de células que produzem ceratina, os corneócitos, em vários estágios de diferenciação.

Os estratos podem ser reunidos em duas regiões:

a) De células não ceratinizadas, denominada camada de Malpighi, que é a mais profunda das duas regiões, sendo constituídas de células vivas não ceratinizadas; pode ser dividida em camadas basal ou germinativa, espinhosa e granulosa.

b) A de células ceratinizadas é a mais superficial da epiderme, sendo constituída por células pavimentosas, ceratinizadas mortas, sendo denominada camada córnea.

A camada basal ou germinativa é a camada mais profunda da epiderme, sendo separada da derme pela membrana basal. Os ceratinócitos ou células basais são denominadas células germinativas e constituem esta camada. É nesta camada onde se encontram as células-mães (*stem cells*) que darão origem a todos os ceratinócitos; possui somente uma fileira de células cúbicas ou cilíndricas que apresentam núcleos arredondados ou ovalados.

A camada espinhosa é formada por duas a três camadas de células poligonais com núcleos centrais, que vão se aplainando nas camadas mais superficiais. Ela é formada por basicamente ceratinócitos pós-mitóticos que migraram da camada basal.

A camada granulosa apresenta-se como uma camada escura e é formada por uma a duas camadas de ceratinócitos achatados, com núcleos maiores e mais claros. É o nível mais superficial da parte viva, não-ceratinizada, da epiderme. As células contêm grânulos de ceratohialina intracelulares de tamanho e forma variados.

A camada córnea é a mais superficial da epiderme, sendo formada por células ceratinizadas, ou células corneificadas. Essas células são completamente planas e hexagonais. Não apresentam núcleo e elementos citoplasmáticos, estando completamente cheias de ceratina. A observação dessa camada é dificultada devido ao seu desprendimento da epiderme, o que ocorre devido à técnica de preparação do material histológico.

A derme está constituída por tecido conjuntivo fibroso celular, rico em vasos sanguíneos, nervos e fibras colágenas.

As Figuras 14A e 16A mostram a pele do camundongo sem pêlo evidenciando os aspectos acima descritos.

5.2.5.2. Grupo que recebeu aplicação do veículo

No aspecto geral, a epiderme e a derme dos animais que receberam a aplicação do veículo (Grupo II) mostraram-se bem semelhantes à do animal que não foi tratado (Grupo I) (Figura 14B e 16B).

5.2.5.3. Grupos que receberam a aplicação das formulações acrescidas de ácido retinóico

A epiderme dos camundongos que receberam a aplicação da formulação contendo 0,1% de ácido retinóico mostrou-se bem mais espessa, com hipertrofia celular, quando comparada com o controle e a região tratada com o veículo. A camada espinhosa apresentou-se mais espessa, contendo células e núcleos volumosos. A camada granulosa também se apresentou espessada, com 3 a 4 camadas de células achatadas e repletas de grânulos de ceratohialina (Figura 14E). A derme continha tecido conjuntivo fibroso frouxo, com sinais de edema, apresentava ainda um aumento da proliferação de fibroblastos migrando para a região epitelial, bem como regiões edemaciadas (Figura 16 E).

A epiderme dos camundongos que receberam a aplicação da formulação contendo 0,05% de ácido retinóico apresentava características semelhantes às do grupo tratado com 0,1% de ácido retinóico (Figura 14 D). A derme apresentava tecido conjuntivo mais compacto e condensado, quando comparado aos animais do grupo controle e do grupo tratado com o veículo (Figura 16 D), porém o tecido conjuntivo apresentava-se mais frouxo quando comparado com as regiões que receberam a aplicação da formulação contendo 0,1% de ácido retinóico e com regiões que apresentavam sinais de edema.

O grupo tratado com a formulação contendo 0,025% de ácido retinóico apresentava epitélio um pouco aumentado em relação ao controle. A derme continha tecido conjuntivo fibroso bem compacto, semelhante ao grupo controle (Figura 16 C). Quando se compara este grupo com o tratado com 0,1% de ácido retinóico, observa-se que somente o tratamento com maiores concentrações de ácido retinóico provoca alterações perceptíveis no epitélio do animal de experimentação (Figuras 14 C).

5.2.5.4. Grupos que receberam a aplicação das formulações acrescidas de palmitato de retinila

A epiderme dos camundongos que receberam a aplicação da formulação contendo 1,0% de palmitato de retinila mostrou-se mais espessa, com hipertrofia celular, quando comparada com o controle e a região tratada com o veículo (em uma proporção menor do que a observada com o tratamento com a formulação contendo 0,1% de ácido retinóico) (Figura 15 E). A derme continha tecido conjuntivo fibroso moderadamente menos compacto (mais frouxo) quando comparada com o controle e com a região tratada com o veículo (Figura 17 E).

A epiderme dos camundongos que receberam a aplicação da formulação contendo 0,5% de palmitato de retinila apresentava características semelhantes às do grupo tratado com 1,0% palmitato de retinila (Figura 15 D). A derme apresentava tecido conjuntivo mais frouxo que a dos grupos controle e os tratados com o veículo e com as formulações contendo 0,25% de palmitato de retinila, sendo que algumas áreas apresentavam-se edemaciadas (Figura 17 D).

O grupo tratado com a formulação contendo 0,25% de palmitato de retinila apresentava epitélio um pouco aumentado em relação ao controle. Quando se compara este grupo com o tratado com 1,0% de palmitato de retinila, observa-se que somente o tratamento com maiores concentrações de palmitato de retinila provoca alterações perceptíveis no epitélio do animal de experimentação (Figura 15 C). A derme apresentava tecido conjuntivo bem mais frouxo, quando comparado aos animais do grupo controle e do grupo tratado com o veículo (Figura 17 C).

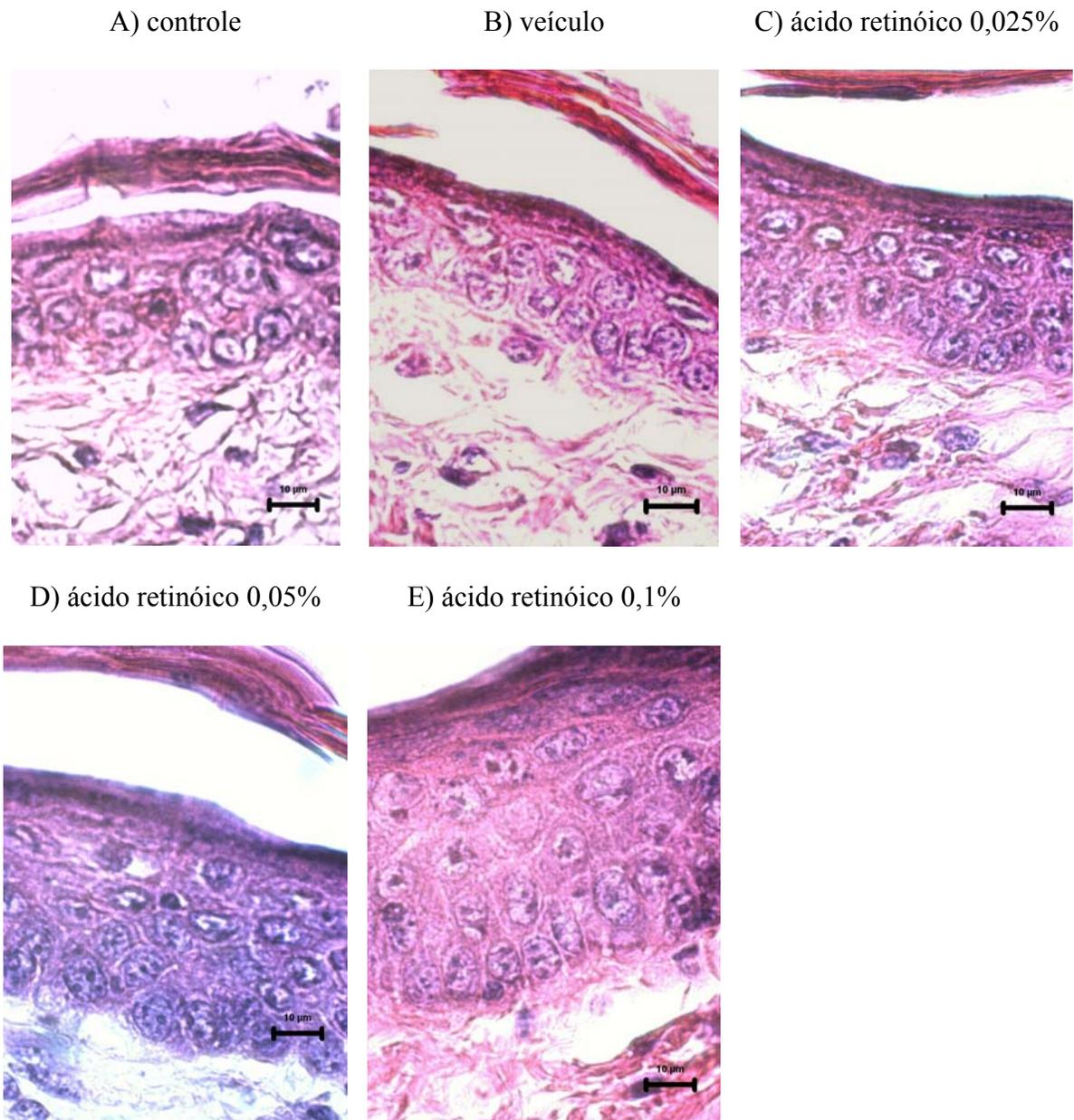


Figura 14. Aspecto histológico da epiderme dos camundongos sem pêlo obtido após 4 horas da aplicação das formulações contendo ou não ácido retinóico a 0,025, 0,05 e 0,1% bem como do grupo controle. Aumento inicial de 1000x, HE.

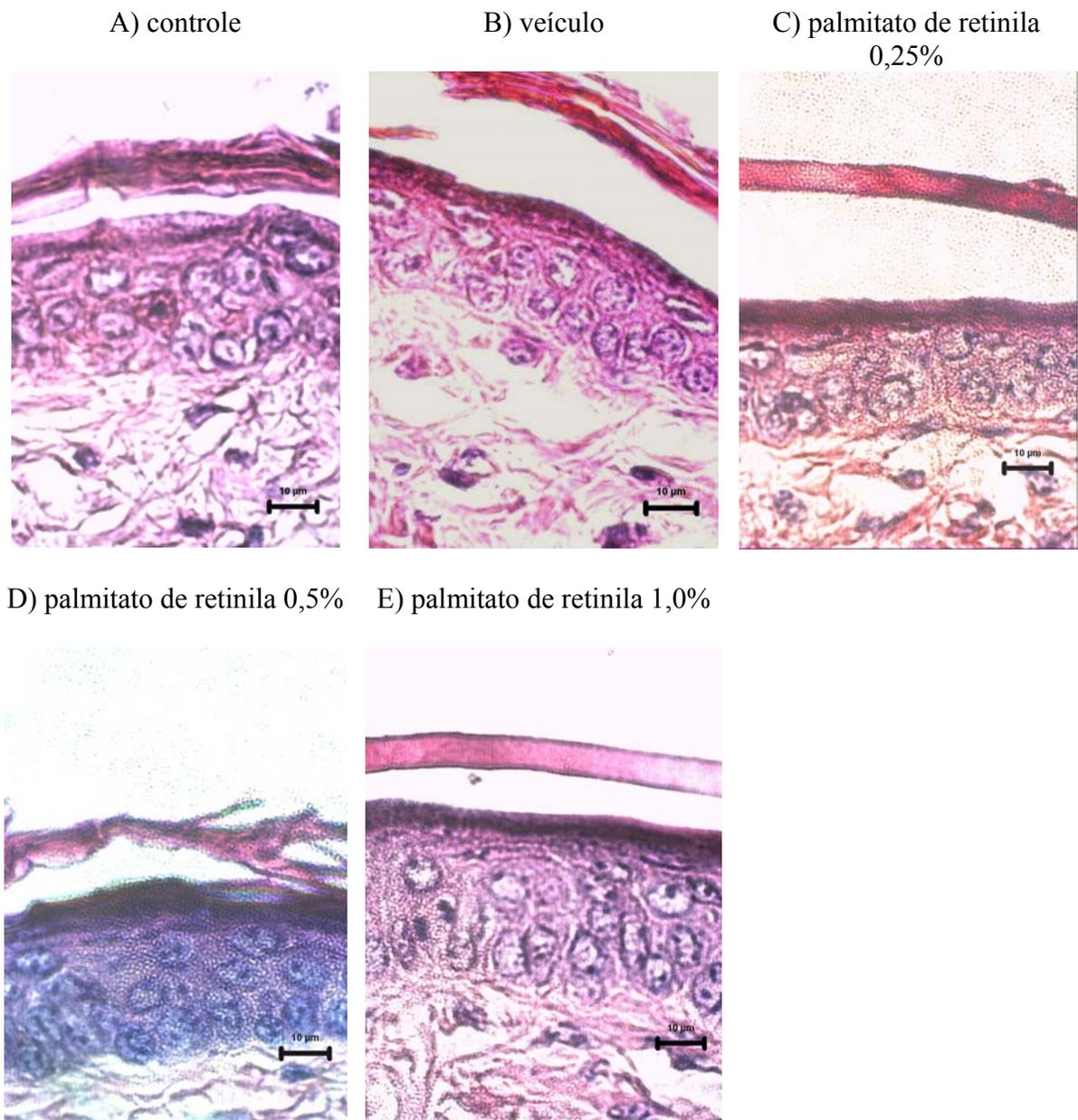


Figura 15. Aspecto histológico da epiderme dos camundongos sem pêlo obtido após 4 horas da aplicação das formulações contendo ou não palmitato de retinila a 0,25, 0,5 e 1,0% bem como do grupo controle. Aumento inicial de 1000x, HE.

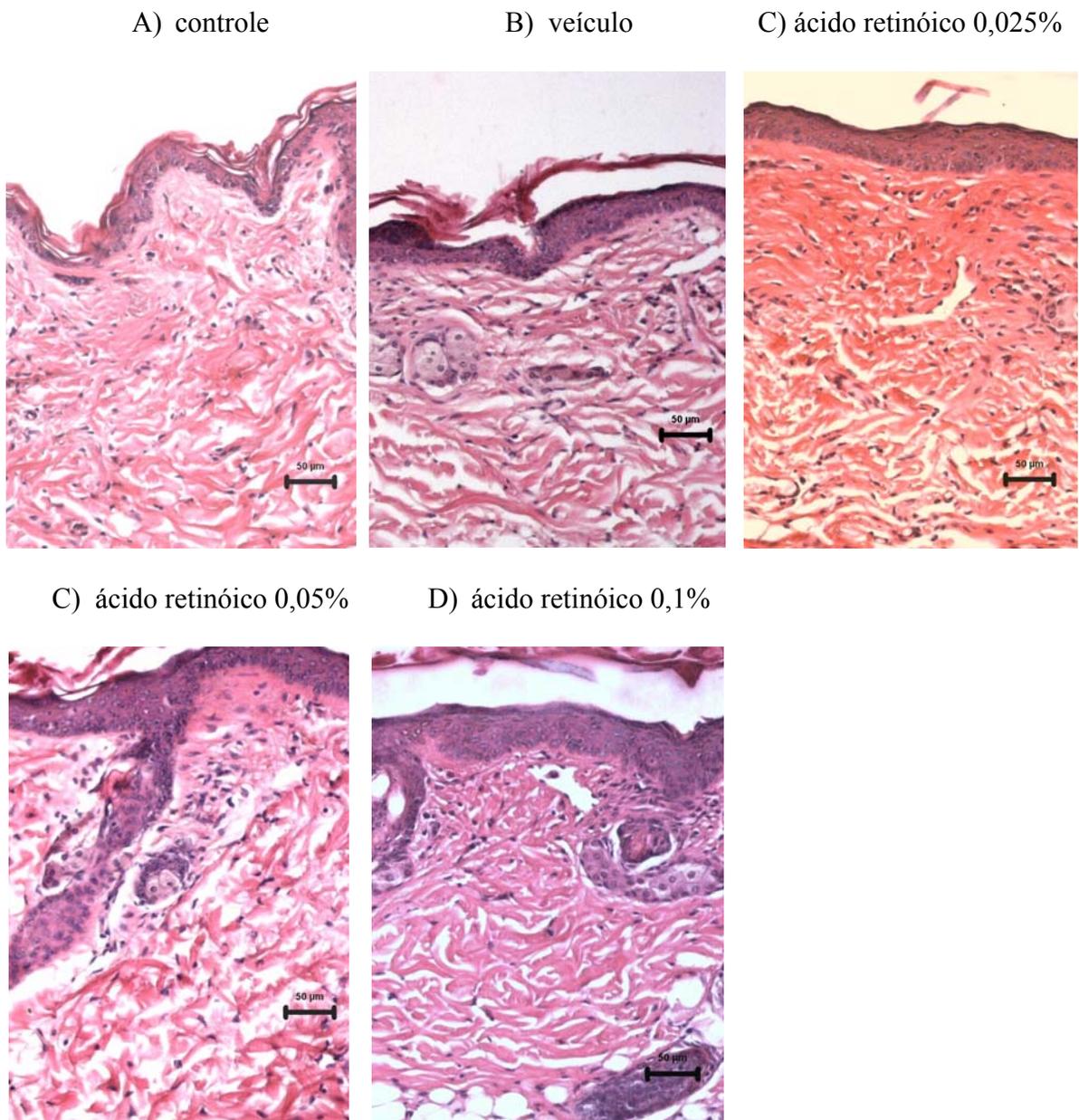


Figura 16. Aspecto histológico da derme dos camundongos sem pêlo obtido após 4 horas da aplicação das formulações contendo ou não ácido retinóico a 0,025, 0,05 e 0,1% bem como do grupo controle. Aumento inicial de 200x, HE.

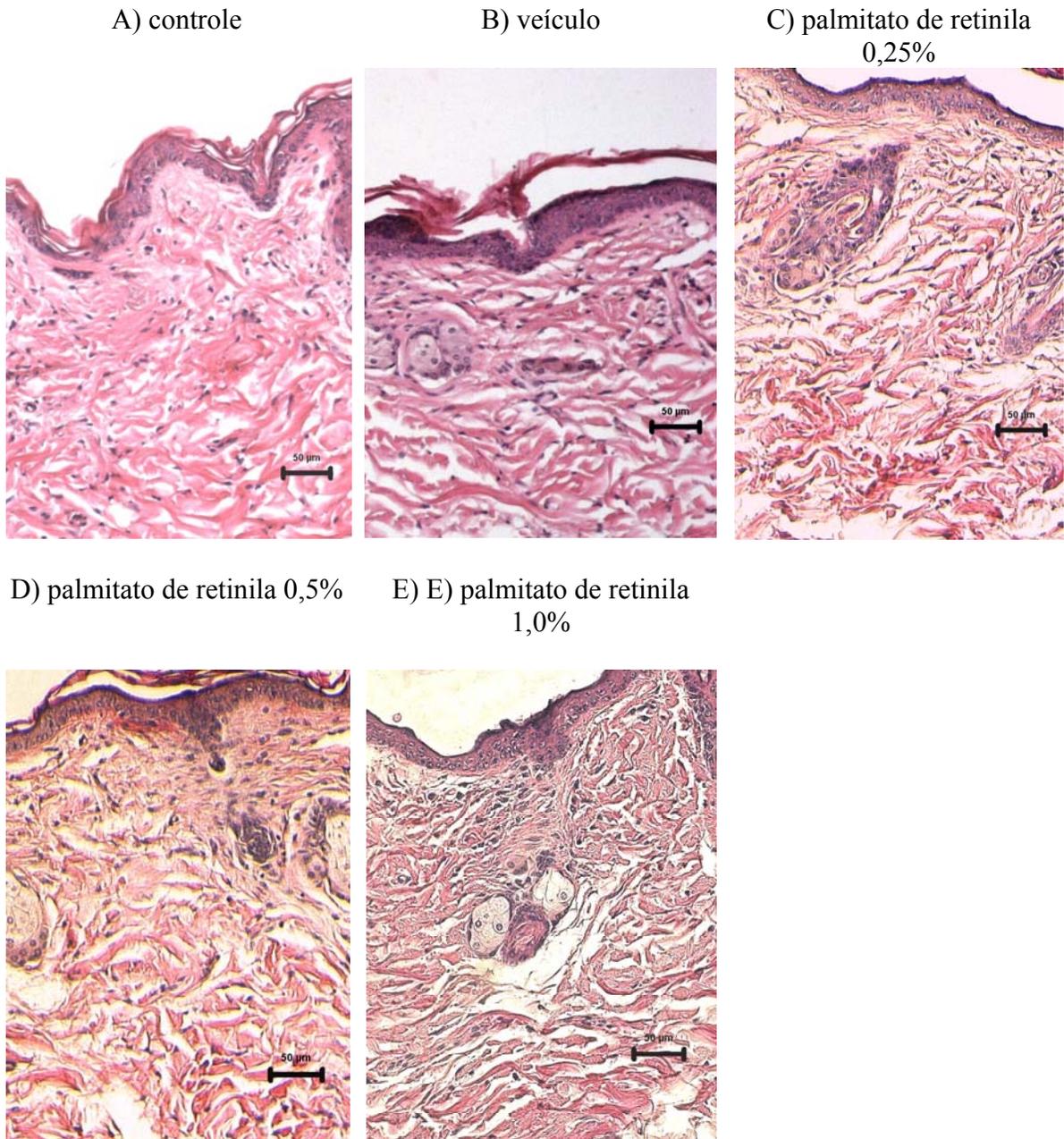


Figura 17. Aspecto histológico da derme dos camundongos sem pêlo obtido após 4 horas da aplicação das formulações contendo ou não palmitato de retinila a 0,25, 0,5 e 1,0% bem como do grupo controle. Aumento inicial de 200x, HE.

6. DISCUSSÃO

Tendo em vista a busca de formulações cada vez mais eficazes na prevenção e tratamento do envelhecimento cutâneo, os retinóides têm sido muito usados em formulações dermocosméticas, nas mais variadas concentrações. Porém deve-se levar em consideração que o aumento da concentração, de fato, deve favorecer que determinado efeito benéfico seja mais pronunciado e principalmente não comprometer a segurança de uso do produto em questão.

As faixas de concentração de uso sugeridas na área dermatológica baseiam-se, em geral em efeitos observados clinicamente ou relatados de acordo com a percepção dos pacientes sendo que, em alguns casos, quando o dermatologista prescreve concentrações maiores, a preocupação, na maioria dos casos, tem se limitado apenas à tentativa de aumentar a eficácia ou garantir a observação de resultados positivos a curto prazo. Porém, o uso de concentrações maiores, além do risco de irritação cutânea, poderia ainda ocasionar danos a nível celular, que, a longo prazo, pode comprometer a fisiologia cutânea normal.

Por outro lado, para produtos cosméticos, os quais o consumidor tem livre acesso, o fabricante, para fins de registro, deve obrigatoriamente seguir os limites de concentrações permitidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que, de certa forma garante a segurança de uso de tais produtos, porém muitas vezes os efeitos não são muito pronunciados e nem tão rápidos, sendo, portanto, necessária à avaliação dos efeitos que concentrações mais altas de retinóides poderiam ocasionar no tecido cutâneo, a fim de se evitar o risco à saúde do consumidor e ainda verificar se, de fato, concentrações menores seriam eficazes na obtenção de melhoria das condições gerais da pele.

Considerando que grande parte dos trabalhos de avaliação dos efeitos tópicos dos retinóides tem sido realizada em cultura de células, assim, os dados encontrados são apenas orientativos, uma vez que com as metodologias *in vitro* não é possível levar em consideração a penetração cutânea, a biodisponibilidade e compatibilidade da substância ativa com a pele e conseqüentemente os efeitos dos produtos nas reais condições de uso.

No protocolo para o delineamento em pesquisa e desenvolvimento, no caso específico de produtos dermocosméticos, são exigidos os itens que se seguem: elaboração das formulações; testes para avaliação da estabilidade (física, química e microbiológica); e testes de avaliação de eficácia e irritabilidade dérmica, conforme determina a portaria 71/96 do Ministério da Saúde.

As concentrações do ácido retinóico na formulação estudada foram estabelecidas em função das concentrações de uso mais freqüentes nos produtos dermatológicos disponíveis no mercado e nos prescritos na clínica dermatológica. Já as concentrações de palmitato de retinila foram definidas em função das concentrações permitidas em cosméticos, definidas pela ANVISA.

A seleção de veículos adequados sob aspectos de estabilidade da formulação final e benefícios à pele (alta eficácia x baixa irritabilidade) tem sido uma busca constante pela comunidade científica (PIACQUADIO; KLIGMAN, 1998; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 1998). Assim foram selecionadas (MAIA CAMPOS et al., 1999) e elaboradas 3 formulações, que consistiam em formulações de géis creme à base de hidroxietilcelulose (HEC) e microemulsão de silicone e octanoato de octila (formulações de n^{os} 1 e 3) e à base de complexo lipídico contendo álcool batílico e lecitina de soja, HEC e octanoato de octila (formulação de n^o 2), acrescidas ou não de diferentes concentrações de ácido retinóico

(0,025, 0,05 e 0,1%). Essas formulações tiveram seus valores de pH analisados e em seguida foram submetidas a testes de estabilidade a fim de escolher uma formulação estável para ser utilizada no ensaio biológico em que consiste o objetivo do estudo.

O pH é importante tanto para a estabilidade da formulação, quanto para a compatibilidade desta com o manto ácido da pele (RODRIGUES, 1997). As formulações objeto de estudo apresentaram pH levemente ácido, portanto adequadas para as finalidades propostas.

No teste de estabilidade por centrifugação, observou-se que todas as formulações se mantiveram estáveis, visto que não foi observada separação de fases em nenhuma delas. Em seguida as formulações foram submetidas à avaliação das características macroscópicas e organolépticas. As formulações de nº 2 e a de nº 3 contendo ácido retinóico ou palmitato de retinila foram excluídas, uma vez que apresentaram uma coloração amarelada no final deste teste preliminar de estabilidade. A formulação de nº 1 foi a única que não apresentou alteração na coloração com adição de ácido retinóico ou palmitato de retinila, sendo, portanto considerada a mais estável. Isso pode estar relacionado ao fato desta conter a associação da microemulsão de silicone com o emoliente octanoato de octila, o qual pode reduzir a condutividade de formulações com alta porcentagem de água, aumentando assim a estabilidade da formulação frente à reações de hidrólise (CARLOTTI et al., 2002).

Para a realização do ensaio biológico, foi utilizado, como modelo experimental, o camundongo sem pêlo, o qual, desde sua primeira descrição em 1850, vem sendo muito utilizado na pesquisa científica, principalmente no estudo da fisiologia da pele e estudos de penetração cutânea (SIMON; MAIBACH, 1998). Além disto, os camundongos sem pêlo têm se mostrado um modelo seguro e confiável na avaliação na toxicidade de produtos

aplicados na pele (BHATT et al., 1997; DENDA et al., 1997; KLIGMAN; KLIGMAN, 1998).

Nessa pesquisa, a escolha desse animal como modelo foi feita principalmente pela vantagem de não haver necessidade de depilação, possibilitando o estudo quantitativo das possíveis alterações do estrato córneo, em consequência da aplicação das formulações dermocosméticas avaliadas, e a possibilidade de se estabelecer um tempo relativamente curto de aplicação das formulações na pele do animal. Enquanto o tempo de renovação do epitélio humano é cerca de 30 dias, em média, a renovação das células epiteliais do camundongo sem pêlo ocorre de 4 a 5 dias (DOWNES et al, 1967). Dessa forma, foi possível analisar os efeitos da substância ativa avaliada, após agirem durante tempo suficiente para que ocorresse no mínimo uma renovação epitelial.

Na avaliação da pele dos camundongos por técnicas de Bioengenharia Cutânea, o palmitato de retinila não provocou nenhuma alteração nos valores do conteúdo aquoso do estrato córneo quando comparados com o controle e o veículo, por outro lado a aplicação das diferentes concentrações de ácido retinóico (0,025, 0,05 e 0,1%) reduziu de forma estatisticamente significativa os valores do conteúdo aquoso do estrato córneo quando comparados com o controle e o veículo. Eichner et al, (1996) demonstraram que a aplicação de uma solução contendo 0,05% de ácido retinóico em camundongos sem pêlo durante 26 semanas provocou um aumento de 8 vezes nos valores de perda de água transepidérmica (TEWL) quando comparado ao controle, sendo assim, o ácido retinóico, ao alterar a barreira cutânea, poderá diminuir também o conteúdo aquoso do estrato córneo. Além disso, um estudo de Flühr et al, (1999) comparou a aplicação tópica de ácido retinóico, com

a de retinaldeído e com a de retinol através de *patch tests* durante 44 dias e observaram que houve um aumento de TEWL com a aplicação de retinaldeído e do ácido retinóico.

Em relação ao eritema observou-se que apenas as formulações contendo 0,025 e 0,05% de ácido retinóico aumentaram o índice de eritema da pele dos camundongos sem pêlo quando comparados com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo. Este aumento do eritema pode ter ocorrido uma vez que o ácido retinóico além de estimular a renovação celular, induz o aumento de vascularização na derme, o que leva à formação de eritema (MARKS et al., 1990; FISHER et al., 1991; GRIFFITHS et al., 1995). Desta maneira, podemos sugerir que, após 5 dias de tratamento, os grupos tratados com as formulações contendo as duas menores concentrações de ácido retinóico ainda estavam em processo de renovação celular acelerado associado ao aumento da vascularização e os grupos tratados com a maior concentração deste já estavam no final do processo e com a vascularização e, conseqüentemente, com o eritema reduzidos. Estes resultados são coincidentes com os obtidos por Griffiths et al. (1995) quando avaliaram os efeitos de formulações contendo diferentes concentrações de ácido retinóico em humanos. Outros autores relatam que estas propriedades irritantes do ácido retinóico poderiam ser, em parte, responsáveis por alguns dos seus efeitos considerados como benéficos (MARKS et al., 1990; FISHER et al., 1991). No presente estudo, também foi observado um aumento do eritema no grupo tratado com a formulação contendo 1,0% de palmitato de retinila, sendo que isto pode ter ocorrido uma vez que o palmitato de retinila é convertido em retinol pelas estearases da pele e depois oxidado em ácido retinóico (CONNOR; SMIT, 1987; TSUNODA; TAKABAYASHI, 1995; DUELL et al., 1996). Assim, nas condições experimentais deste estudo, provavelmente o veículo empregado favoreceu a penetração

cutânea do palmitato de retinila e parte deste pode ter sido convertido à ácido retinóico, o que provocou efeitos semelhantes aos observados nos grupos tratados com 0,1 e 0,025% deste último.

Nos resultados obtidos nos estudos histopatológico, morfométrico e estereológico as formulações contendo diferentes concentrações de ácido retinóico ou palmitato de retinila ocasionaram um aumento significativo da espessura total do epitélio, quando comparadas com o controle e com a região que recebeu apenas a aplicação do veículo, sendo que os efeitos do ácido retinóico foram mais pronunciados que os observados com a aplicação do palmitato de retinila. Observaram-se, ainda, as maiores concentrações de ácido retinóico (0,1%) e de palmitato de retinila (1,0%), utilizadas apresentaram um efeito mais pronunciado da espessura total do epitélio quando comparadas com as menores concentrações utilizadas (0,025% de ácido retinóico e 0,25% de palmitato de retinila, respectivamente). A princípio este fato pode indicar que esta ocorrendo um estímulo na renovação celular, de acordo com trabalhos anteriormente publicados (KANG et al.,1995, FÖRSTER et al.,2000).

Para finalizar a análise da espessura do epitélio, avaliou-se ainda a espessura de cada camada epitelial separadamente.

Quando o ácido retinóico estava presente na formulação, o aumento da espessura das camadas epiteliais (basal, espinhosa e granulosa) foi mais pronunciado quando comparado com as demais formulações objeto de estudo. Considerando que ocorreu uma diminuição na densidade numérica (número de células/mm³ de epitélio) do epitélio dos animais tratados com as formulações contendo ácido retinóico e palmitato de retinila, quando comparadas com a formulação veículo (sem nenhuma substância ativa) e ao controle,

provavelmente o aumento da espessura da epiderme viável não se deu à custa de um aumento do número de células e sim devido a alterações no volume celular, citoplasmático e/ou nuclear, variáveis a serem discutidas a seguir.

O edema intra e extra celular, é uma das possíveis causas do aumento da espessura das camadas epiteliais observado no presente estudo, uma vez que este efeito já foi mencionado anteriormente por Maia Campos et al. (1999), por Silva e Maia Campos (2000) e por Tadini et al. (2006), em estudos histopatológicos para a avaliação dos efeitos de substâncias ativas na epiderme de cobaias e de camundongos sem pêlo.

Os valores de volume nuclear obtidos, mostraram que o ácido retinóico e o palmitato de retinila provocaram um aumento do volume nuclear das células das camadas epiteliais (basal e espinhosa) quando comparados com o controle e com o veículo. As alterações que ocorreram no volume nuclear poderiam indicar uma atuação na funcionalidade do núcleo, ou seja, poderia refletir em um aumento da atividade nuclear (SILVA; MAIA CAMPOS, 2000).

O aumento do volume nuclear, ocasionado pela presença do ácido retinóico e do palmitato de retinila nas formulações, foi acompanhado de um aumento de volume citoplasmático e conseqüentemente um aumento do volume celular, o que confirma a presença de edema intra-celular. Observou-se ainda que principalmente, quando a variável volume nuclear e citoplasmático foram analisadas, os grupos tratados com o ácido retinóico apresentaram efeito mais pronunciado que os grupos tratados com o palmitato de retinila, o que pode ser mais uma indicação do estímulo na renovação celular ligada ao aumento do volume nuclear (SILVA; MAIA CAMPOS, 2000).

Quando as diferentes concentrações de ácido retinóico foram analisadas, observou-se que apenas o grupo tratado com a maior (0,1%) e a menor concentração (0,025%) desta substância, apresentou alterações estatisticamente diferentes, ou seja, a concentração intermediária de ácido retinóico (0,05%) também apresentou um efeito intermediário no volume nuclear das camadas basal e espinhosa, na espessura da camada basal e na densidade numérica da camada basal. Assim os resultados obtidos experimentalmente foram coerentes com os que vêm sendo observados clinicamente, ou seja, a concentração de 0,05% de ácido retinóico, a qual foi considerada mais adequada nas condições experimentais desta pesquisa, é a que vem sendo mais utilizada em produtos de uso tópico e prescritas, em função da obtenção de resultados satisfatórios nesta concentração na clínica médica, principalmente, pelo fato de que quanto maior a concentração maior o risco de irritação cutânea.

Em relação ao palmitato de retinila, este estudo comprovou cientificamente que a maior concentração desta substância ativa (1,0%) apresentou efeitos equivalentes à menor concentração de ácido retinóico (0,025%) nas variáveis morfométricas e estereológicas analisadas. Além disso, observou-se a concentração intermediária de palmitato de retinila (0,5%) provocou efeitos intermediários nos volumes nuclear e citoplasmático da camada basal e na espessura da camada basal, sendo que não provocou eritema na pele dos camundongos sem pêlo.

A aplicação das formulações em estudo, contendo as diferentes concentrações de ácido retinóico ou de palmitato de retinila, não provocaram alterações estatisticamente significativas na espessura da derme quando comparadas com o controle e com o veículo.

Nos estudos histopatológicos, ou seja, na análise visual dos cortes histológicos, foi possível verificar um aumento na espessura da epiderme viável dos animais que receberam a aplicação das formulações contendo ácido retinóico e palmitato de retinila, sendo que os grupos tratados com ácido retinóico apresentaram efeitos mais pronunciados. Em relação à derme, observou-se regiões edemaciadas, principalmente nos grupos tratados com as maiores concentrações do ácido retinóico, o que confirma os efeitos destas substâncias observados nas análises morfométrica e estereológica, tais como na hidratação das camadas profundas da pele (hidratação intracelular) e na renovação celular, acompanhada do aumento da vascularização da derme.

Além disso, observou-se que as formulações contendo ácido retinóico provocaram um aumento no número de fibroblastos acompanhado de um espessamento das fibras colágenas. Estes resultados estão de acordo com Varani et al, (2003) que verificou que o tratamento com uma solução contendo 0,1% de ácido retinóico proporcionou uma maior organização das fibras de colágeno imediatamente abaixo da epiderme após o tratamento por 3 semanas.

Finalizando, este estudo comprovou cientificamente, a influência da concentração de ácido retinóico e de palmitato de retinila na pele sendo que, quando veiculada na formulação em estudo sendo que, com a concentração de 0,05% de ácido retinóico, intermediária entre as demais concentrações avaliadas neste estudo (0,025 e 0,1%), foi possível a obtenção de efeitos na epiderme estatisticamente iguais à concentração mais alta de 0,1%. Assim, a concentração de 0,05% foi considerada a mais adequada para tal finalidade, uma vez que se obtiveram resultados experimentais satisfatórios e, principalmente, pelo fato de que quanto maior a concentração maior o risco de irritação

cutânea. Em relação ao palmitato de retinila, este estudo comprovou cientificamente que a concentração intermediária (0,5%) também foi considerada a mais adequada, uma vez que apresentou efeitos estatisticamente equivalentes à concentração maior utilizada (1,0%) sem provocar irritação cutânea.

7. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais deste trabalho foi possível concluir que:

1 - A formulação de nº 1, a base de HEC, microemulsão de silicone e octanoato de octila, foi considerada a mais estável.

2 - No ensaio biológico, empregando as técnicas de Bioengenharia Cutânea, verificou-se que a as 3 concentrações de ácido retinóico reduziram o conteúdo aquoso do estrato córneo e que, as duas menores concentrações deste (0,025 e 0,05%) e a maior concentração de palmitato de retinila (1,0%), provocaram um aumento no índice de eritema.

3 – O ácido retinóico e o palmitato de retinila ocasionaram aumento significativo da espessura de todas as camadas epiteliais e total do epitélio, o que, em função aumento dos volumes citoplasmático e celular, ocorreu à custa de edema intra-celular.

4 – Não foram observadas alterações na espessura da derme, somente um aumento no número de fibroblastos nesta camada na análise histopatológica.

5 – O ácido retinóico e o palmitato de retinila provocaram aumento do volume nuclear, o que pode sugerir que o núcleo está em intensa atividade e, conseqüentemente, pode estar ocorrendo um estímulo na função celular.

6 – Ao analisar todas as variáveis histopatológicas, morfométricas e estereológicas, bem como o índice de eritema e o conteúdo aquoso do estrato córneo estudados, as formulações que continham as concentrações intermediárias, tanto do ácido retinóico (0,05%) quanto do palmitato de retinila (0,5%), foram as que apresentaram melhores resultados, principalmente no que se refere a uma relação risco / benefício adequada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - Endereço Eletrônico: www.anvisa.gov.br

BHATT, R.H.; MICALI, G.; GALINKIN, J.; PALICHARIA, P.; KOCH, R.L.; WEST, D.P.; SOLOMON, L.M. Determination and correlation of *in vitro* viability for hairless mouse and human neonatal whole skin and stratum corneum/epidermis. **Archives of Dermatological Research**, v.289, n.3, p.170-173, 1997.

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

BERGFELD, W.F. The evolving role of retinoids in the management of cutaneous conditions – Introduction. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n.2, p. 51, 1998 (Supplement).

BRANDÃO, L. **Índex ABC: Ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. 2.ed., São Paulo, SRC, 2000, 1070p.

CARLOTTI, M.E.; ROSSATTO, V.; GALLARATE, M. Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.240, p.85-94, 2002.

CHAPPARD, D.; ALEXANDRE, C.; ROBERT, J.M.; RIFFAT, G. Relationships between bone and skin atrophies during aging. **Acta Anatomica**, Basel, v. 141, p.239-244, 1991.

CONNOR, M.J.; SMIT, M.H. Terminal-group oxidation of retinol by mouse epidermis – inhibition *in vitro* and *in vivo*. **Biochemical Journal**, v.244, n.2, p.489-492, 1987.

COUNTS, D.F.; SKREKO, F.F.; Mc BEE, J.; WHICH, A.G. The effect of retinyl palmitate on skin composition and morphometry. **Journal of the Society of Cosmetic Chemicals**, v.39, n.4, p.235-240, 1988.

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

DE RITTER, E.; MAGID, L.; SLEEZER, P.E. Vitamin in Cosmetics. **American Perfumer & Aromatics**, New York, 73(5): 54-58, 1959.

DENDA, M.; BROW B.E.; ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. Epidermal injury stimulates prenylation in the epidermis of hairless mice. **Archives of Dermatological Research**, v.298, n.2, p.104-110, 1997.

DIFFEY, B.L.; OLIVER, R.J.; FARR, P.M. A portable instrument for quantifying erythema induced by ultraviolet radiation. **British Journal of Dermatology**, v.111, p.663-672, 1984.

DOWNES, A.M., MATOLTSY, A.G.; SWEENEY, T.M. Rate of turnover of the stratum corneum in hairless mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v.49, n.4, p.400-405, 1967.

DOWNING, D.T. Lipids: their role in epidermal structure and function. **Cosmetics & Toiletries**, v.106, n.12, p.63-69, 1991.

DUELL, E.A. et al. Extraction of human epidermis treated with retinol yield retro-retinoids in addition to free retinol and retinyl esters. **Journal of Investigative Dermatology**, v.107, n.2, p.178-182, 1996.

DYKES, P.J.; BLACK, D.R.; YORK, M.; DICKENS, A.D.; MARKS, R.A, Step wise procedure for evaluating irritant materials in normal volunteer subjects. **Human Experimental Toxicology**, n.14, p.204-211, 1995.

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

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

ELIAS, P.M.; WILLIAMS, M.L. Retinoids, cancer, and the skin. **Archives of Dermatology**, v.117, n.1, p.160-175, 1981.

EICHNER, R.; GENDIMENICO, G.J.; KAHN, M.; MALLON, J.P.; CAPETOLA, R.J.; MEZICK, J.A. Effects of long-term retinoic acid treatment on epidermal differentiation *in vivo*: specific modifications in the programme of terminal differentiation. **British Association of Dermatologists**, v.135, n.5, p.687-695, 1996.

FERNANDES, S.S.; ARCURI; MORGADO-DÍAZ, J.A.; BENCHIMOL, M. Increase of melanogenesis by retinoic acid: an ultrastructural and morphometric study. **Tissue Cell**, v.36, n.2, p.95-105, 2004.

FISHER, G.J.; ESMANN, J.; GRIFFITHS, C.E.M. et al. Cellular, immunologic and biochemical characterisation of topical retinoic acid-treated human skin. **Journal Investigative of Dermatology**, v.96, p.699-707, 1991.

FLÜHR, J.W.; VIENNE, M.P.; LAUZE, C.; DUPUY, C. et al. Tolerance profile of Retinol, retinaldehyde and retinoic acid under maximized and long-term clinical conditions. **Journal Investigative of Dermatology**, v.199, p.57-60, 1999.

FÖRSTER, T.; JASSOY, C.; PETERSOHN, D. et al. Investigating the influence of a retinol cream on the skin. **In: Proceeding of XXIst IFSCC INTERNATIONAL CONGRESS 2000**, CD-ROM, Berlin, 2000.

FULLERTON, A.; FISCHER, T.; LAHTI, A.; WILHELM, K.P.; TAKIWAKI, H.; SERUP, J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema: a report from standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.102, p.1-10, 1996.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the Protective Effect of Alpha – Tocopheryl Acetate in a Sunscreen, Preventing Erythema Formation, Transepidermal Water Loss and Sunburn Cell Formation. **IFSCC Magazine**, v.6, n.3, p.213-217, 2003.

GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.G.M. Evaluation of the photostability of different UV filters combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 123-128, 2006.

GIACOMONI, P.U.; D’ALESSIO, P. Open questions in photobiology. IV. Photoaging of the skin. **Journal of Photochemistry and photobiology**, v.33, p.267-272, 1996.

GIMENO, A.; ZARAGOZÁ, R.; VIVÓ-SESÉ, I.; VINÃ, J.R.; MIRALLES, V.J. Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. **Experimental Dermatology**, v.13, n.1, p.45-54, 2004.

GOLDRICK, E.A. The role and application of vitamins in cosmetics. **American Perfumer and Cosmetics**, Oak Park, v.81, n.12, p.43-51, 1996.

GRIFFITHS, C.E.; KANG, S. ELLIS, C.N. et al. Two concentrations of topical tretinoin (retinoic acid) cause similar improvement of photoaging but different degrees of irritation. A double-blind, vehicle-controlled comparison of 0.1% and 0.025% tretinoin creams. **Archives of Dermatology**, v. 131, n.9, p.1037-1044, 1995

HALLER, P.H. Aplicações de lipídeos e fosfolipídeos em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v.1, n.4, p.33-40, 1989.

HENNING, A. feher der oberflächenbestimmung von kerner bei endlicher schmitttdicke. **Mikroskopie**, v.12, p.7-11, 1957.

HERMITTE, R. Aged skin, retinoids and alpha hydroxy acids. **Cosmetics & Toiletries**, v.107, n.7, p.63-67, 1992.

IDSON, B. Vitamins and the skin. **Cosmetics & Toiletries**, v.108, n.2, p.79-94, 1993.

JASS, H.E.; ELIAS, P.M. The living stratum corneum: implications for cosmetic formulation, **Cosmetics & Toiletries**, v.106, n.10, p.47-53, 1991.

KANG, S.; DUELL, E.A.; FISHER, G.J.; et al. Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic acid without measurable retinoic acid levels or irritation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.105, p.549-556, 1995.

KELLER, K.L.; FENSKE, N.A. Uses of vitamins A, C and E and related compounds in dermatology: A review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.39, n.4, p.611-625, part.1, 1998.

KLIGMAN, A.M. The growing importance of topical retinoids in clinical dermatology: a retrospective and prospective analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, (Suppl.), v.39, n.2, p.S2-S7, part.3, 1998.

KLIGMAN, A.M.; KLIGMAN, L.H. A hairless mouse model for assessing the chronic toxicity of topically applied chemicals. **Food Chemical Toxicology**, v.36, n.9-10, p.867-878, 1998.

KUNCHALA, S.R.; SUZUKI, T.; MURAYAMA, A. Photoisomerization of retinoic acid and its influence on regulation of human keratinocyte growth and differentiation. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, n.2, v.37, p.71-76, 2000.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Influence of glycolic acid as a component of a different formulations on skin penetration by vitamin A palmitate. **Journal of Cosmetics Science**, v.49, n.1, p.23-32, 1998.

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. **Journal of Cosmetic Science**, v.53, n.5, p.263-268, 2002.

LAHTI, A.; KOPOLA, H.; HARILA, R.; MYLLYLÄ, R.; HANNUKSELA, M. Assessment of skin erythema by eye, laser Doppler flowmeter, spectroradiometer, two-channel erythema meter and Minolta chroma meter. **Archives of Dermatological Research**, v.285, p.278-282, 1993.

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 Research**, v. 59, n.18, p.4591-4602, 1999.

LUPO, M.P. Antioxidants and Vitamins in Cosmetics. **Clinics in Dermatology**, n.19, p.467-473, 2001.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BADRA, M.V.L. Estudo da Estabilidade Física de Bases Dermatológicas Contendo Ésteres Fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, v.14, n.79, p.8-11, 1992.

MAIA CAMPOS, G. G.M.C. Software versão 7.7. Ribeirão Preto, Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, 1999.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; RICCI, G.; SEMPRINI, M.; LOPES, R.A. Histopathological, morphometric and stereological studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid. **Journal of Cosmetic Science**, v.50, n.3, p.159-170, 1999.

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

MARKS, R.; HILL, S.; BARTON, S.P. The effects of an abrasive agent on normal skin and on photoaged skin in comparison with topical tretinoin. **Brazilian Journal of Dermatology**, v.123, p.457-466, 1990.

MERZ, W.A. Die streckmessung and gerichteten strukturen in mikroskop und ihre anwendung zur bestimmung von oberflächen – volumen relationen im knochengewebe. **Mikroskopie**, v.22, p.132-143, 1968.

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

NAU, H. Embryotoxicity and teratogenicity of topical retinoic acid. **Skin Pharmacology**, v.6, p.35-44, Suppl. 1, 1993.

O'GOSHI, K.; SERUP, J. Inter-instrumental variation of skin capacitance measured with the corneometer. **Skin Research and Technology**, v.11, n.2, p.107-109, 2005.

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-ROOM, Edinburgh, 2002.

OBAYASHI, Y.; KAMBAYASHI, H.; ODAKE, Y.; TAKADA, K. Epidermal changes are more influential than dermal changes in the early stages of wrinkle formation in hairless mouse. In: IFSCC CONGRESS, 22, 2002, Edinburgh, CD-ROOM, Edinburgh, 2002.

ORFANOS, C.E. Current use and future potential role of retinoids in dermatology. **Drugs**, v. 53, n. 3, p. 358-388, 1997.

PEARSE, A.D.; EDWARDS, C.; HILL, S.; MARKS, R. Portable erythema meter and its application to use in human skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v.12, p.63-70, 1990.

PIACQUADIO, D.; KLIGMAN, A. The critical role of the vehicle to therapeutic efficacy and patient compliance. **Journal of the American Academy of Dermatology**, (Suppl.), v.39, n.2, part.3, p.S67 – S73, 1998.

QUIRONGA, M.I.; Guillot, C.F. **Cosmética Dermatológica Prática**, 5ed. Buenos Aires, Ateneo, 1986

RIEGER, M.M. Keratinocyte function - and skin health. **Cosmetics & Toiletries**, v.107, n.7, p.35-43, 1992.

RIES, G.; HESS, R. Retinol: Safety considerations for its use in cosmetic products. **Journal of Toxicology – Cutaneous and Ocular Toxicology**, v.18, n.3, p.169-185, 1999.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: metodologias não invasivas de abordagem da pele. **Revista Cosmiatrica Medicina Estética**, p.26-35, 1997.

ROGIERS, V. The potential use of non-invasive methods in the safety assessment of cosmetics products – The report and recommendations of ECVAM/EEMCO workshop 36 **Alternatives to Laboratory Animals**, 1996.

ROTHMAN, S. Physiology and Biochemistry of the Skin, **Chicago Press**, 1954, p.221-32.

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

SALA, M.A.; KOMESU, M.C.; LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, G. Karimetric study of basal cell carcinoma. **Brazilian Dental Journal**, v.5, n.1, p.11-14, 1994.

SCHEMPP, C.M.; MÜLLER, K.; SCHULTE-MÖNTING, J.; SCHÖPF, E.; SIMON, J.C. Salt water bathing prior to UVB irradiation leads to a decrease of the minimal erythema dose and increased erythema index without affecting skin pigmentation. **Photochemistry and Photobiology**, v.69, n.3, p.341-344, 1999.

SEKULA-GIBBS S.; UPTMORE D.; OTILLAR, L. Retinoids. **Journal American of Academic Dermatology**, v.50, n.3, p.405-15, 2004.

SILVA, G.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Histopatological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skin care formulation. **International Journal of Cosmetic Science**, v.22, p.169-79, 2000.

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

SMITH, W. Stratum corneum barrier integrity controls skin homeostasis. **International Journal of Cosmetic Science**, v.21, p.99-106, 1999.

SIMON, G.A.; MAIBACH, H.I. Relevance of hairless mouse as an experimental model of percutaneous penetration in man. **Skin Pharmacology Applied to the Skin Physiology**, v.11, n.2, p.80-86, 1998.

SORG, O.; KUENZLI, S.; KAYA, G.; SAURAT, J.H. Retinoids in cosmeceuticals. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.19, n.5, p.289-296, 2006.

SPENCER, T.S., Dry skin and skin moisturizers. **Clinics in Dermatology**, v.3, n.6, p.24-28, 1988.

STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. **Cosmetics & Toiletries**, v.7, Jul/Ago, p.29, 1995.

STEINER, D. Vitamin A e a pele. **Cosmetics & Toiletries**, v.10, n.4, p.26, 1998.

SUMMERS, R.S. et al. The effect of lipids, with and without humectant, on skin xerosis, **Journal of the Society Cosmetic Chemistry**, v.47, n.1, p.27-39, 1996.

TADINI, K.A., GASPAR, L.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Epidermal effects of tretinoin and isotretinoin: influence of isomerism. **Pharmazie**, v.61, n.5, p. 453-456, 2006.

TÖRMA, H.; VAHLQUIST, A. Vitamin A esterification in human epidermis: a relation to keratinocyte differentiation. **Society of Investigative Dermatology**, v.94, n.1, p.132-138, 1990.

TREVITHICK, J.R.; XIONG, H.; LEE, S.; SHUM, D.T.; SANFORD, S.E.; KARLIK, S.J.; NORLEY, C.; DILWORTH, G.R. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hair less mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.296, n.2, August 1, p.575-582, 1992.

TSUNODA, T.; TAKABAYASHI, K. Stability of all – trans - retinol; in cream. **Journal of the Society of Cosmetic Chemical**, v.46, n.4, p.191-198, 1995.

VALQUIST, A. What are natural retinoids? **Dermatology**, v.199, n.1-2, p.3-11, 1999.

VARANI, J.; FLIGIEL, H.; ZHANG, J. et al. Separation of retinoid-induced epidermal and dermal thickening from skin irritation. **Archives of Dermatological Research**, v.295, n.6, p.255-262, 2003.

WEIBEL, E.R. Stereological principles morphometry in electron microscopic cytology. **International Journal of cytology**, v.26, p.235, 1969.

WERTZ, P.W. et al. The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. **Journal of Investigative Dermatology**, v.84, n.5, p.410-412, 1985.

WIECHERS, J.W.; BARLOW, T. Skin moisturization and elasticity originate from at least two different mechanisms. **International Journal Cosmetic Science**, v.12, p.425-435, 1999.

YAAR, M.; ELLER, M.S.; GILCHREST, B.A. Fifty Years Skin Aging. **Journal of Investigative Dermatology**, v.7, n.1, p.51-58, 2002.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.175.53.2), intitulado: "Influência de Diferentes Concentrações de Retinóides em Formulações Dermocosméticas nos Efeitos Benéficos e ou Colaterais na Pele de Camundongos sem Pêlo", de autoria de **Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 06.04.05.

Ribeirão Preto, 8 de abril de 2005


Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior


Secretária da CEUA
Maria Angélica S. Depiro