



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações  
fotoprotetoras com antioxidantes naturais nanoencapsulados**

**ELISA DA CRUZ FELIPPIM**

**Ribeirão Preto  
2019**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**ELISA DA CRUZ FELIPPIM**

**Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações fotoprotetoras  
com antioxidantes naturais nanoencapsulados**

Ribeirão Preto  
2019

**ELISA DA CRUZ FELIPPIM**

**Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações fotoprotetoras  
com antioxidantes naturais nanoencapsulados**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

**Orientada:** Elisa da Cruz Felippim

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia M.B.G. Maia Campos

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Ribeirão Preto  
2019

FELIPPIM, E.C	<b>Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações fotoprotetoras com antioxidantes naturais nanoencapsulados</b>	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRPUSP 2019
------------------	---	---	------------------------------

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Felippim, Elisa Da Cruz

Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações fotoprotetoras com antioxidantes naturais nanoencapsulados. Ribeirão Preto, 2019.

183 p.; 30cm.

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

Orientador: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves

1. Cosmetologia. 2. Eficácia Clínica. 3. Carreadores lipídicos Nanoestruturados. 4. Quercetina 5. FPS

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Elisa da Cruz Felippim

Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações fotoprotetoras com antioxidantes naturais nanoencapsulados

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maia Campos pela confiança, apoio, oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional ao longo de todos os anos de convivência.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Priscyla Daniely Marcato Gaspari por toda dedicação e ao seu trabalho de coorientadora

A todos os amigos feitos no NEATEC pelo companheirismo, aprendizados e ajuda em todos os momentos.

Ao Grupo Nanobiolab pelo acolhimento e colaboração com o meu trabalho.

Aos meus amigos pessoais por todo apoio ao longo do desenvolvimento desse trabalho e em todos os outros momentos.

A todas as participantes do estudo clínico, sem elas o trabalho não seria possível.

Às empresas MCassab, Univar, Basf, Croda, Mapric, Chemyunion e Galena que gentilmente forneceram matérias-primas utilizadas neste trabalho.

Ao Lucas, Beatriz e Camila e toda equipe da Allergisa pelo suporte técnico.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – docentes e servidores, pela oportunidade e apoio para este trabalho. Ao Dr. João Carlos Lopes Simão pelo suporte no comitê de ética

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FAPESP, pelo auxílio à pesquisa no laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## RESUMO

FELIPPIM, E.C. **Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações fotoprotetoras com antioxidantes naturais nanoencapsulados**. 2019. 183 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O desenvolvimento de fotoprotetores visa a proteção contra os danos na pele decorrentes da radiação solar, comprovado que é um dos fatores que contribui para o desequilíbrio da homeostasia celular, principalmente relacionados a alterações pigmentares, queimaduras solares e ao dano oxidativo responsáveis pelo fotoenvelhecimento, estudos recentes comprovam os benefícios do uso de matérias-primas de origem vegetal para proteção contra os danos da radiação ultravioleta (UV). Neste contexto, o desenvolvimento de formulações multifuncionais como os fotoprotetores acrescidos de antioxidantes, podem ampliar o espectro de proteção da radiação solar, incluindo não só a proteção UV mas também do visível (VIS) e infravermelho (IV), prevenindo alterações provenientes do estresse oxidativo. Dentre os antioxidantes, a quercetina se destaca por ser um flavonoide que apresenta propriedades anti-inflamatória e pode proteger contra os danos induzidos pela radiação UV. No entanto, a adição de antioxidantes em formulações de uso tópico ainda é um desafio, devido à instabilidade e solubilidade nas formulações. Dessa forma, o encapsulamento da quercetina em nanopartículas é uma alternativa inovadora que tem sido utilizada para superar os desafios da administração tópica de antioxidantes, pode favorecer aspectos relacionados à estabilidade física, química e propriedades sensoriais. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar a eficácia clínica de formulações fotoprotetoras contendo o antioxidante quercetina nanoencapsulado no aumento da proteção solar. Para tal, foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras contendo ou não quercetina nanoencapsulando; as quais foram avaliadas em relação as propriedades físico-mecânicas, sensoriais e fator de proteção solar (FPS) *in vivo*. Além disso, foi realizado um estudo de eficácia clínica com as formulações estáveis contendo ou não CLNs com antioxidantes. O estudo clínico foi realizado em participantes do sexo feminino, 20-35 anos, fototipos II e III, com hábitos de fotoproteção e após 60 dias de aplicação. Foram feitas medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo, perda de água transepidérmica, ecogenicidade, microrrelevo, viscoelasticidade e eritema da pele. Os resultados obtidos mostraram que a formulação desenvolvida foi estável e apresentou um comportamento reológico pseudoplástico. Além disso, a correlação do comportamento reológico, perfil de textura e propriedades sensoriais possibilitou a escolha correta das matérias-primas e, conseqüentemente, melhora do FPS sem aumentar a quantidade de filtros UV. Os resultados obtidos no estudo clínico mostraram que a presença de CLNs contendo ou não quercetina aumenta a eficácia da mesma. Por fim, o uso de CLNs para administração de quercetina na pele auxiliou no aumento do FPS quando adicionadas a uma formulação fotoprotetora convencional, além de atuar no aumento da hidratação e proteção da barreira cutânea.

Palavras chaves: Eficácia Clínica; Filtro Solar; Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; Quercetina, FPS.

## ABSTRACT

FELIPPIM, E.C. **Development and clinical efficacy of photoprotective formulations with natural antioxidants nanoencapsulated**. 2019. 183 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The development of photoprotectors aims to protect against skin damage caused by solar radiation, proven to be one of the factors that can contribute to the imbalance of cellular homeostasis, mainly related to pigmentation, sunburn and oxidative damage responsible for photoaging, recent studies prove the benefits of using plant-based raw materials to protect the skin against damage from ultraviolet (UV) radiation. In this context, the development of multifunctional formulations such as antioxidant-enhanced photoprotectors can provide greater protection, including not only UV but also visible (VIS) and infrared (IR) protection, preventing changes from oxidative stress. Among antioxidants, quercetin stands out for being a flavonoid that has antioxidant, anti-inflammatory properties and protection against damage induced by UV radiation. However, the addition of antioxidants in topical formulations still a challenge due the instability and solubility in formulations. Thus, encapsulation of quercetin in nanoparticles is an innovative alternative that has been used to overcome challenges of topical administration of antioxidants, as well as favoring aspects related to physical-chemical stability and sensory properties. In this context, the aim of the present study was to develop and evaluate the clinical efficacy of photoprotective formulations containing nanoencapsulated quercetin, to increase sun protection. Photoprotective formulations were developed with or without Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) quercetin; which were evaluated physical-mechanical parameters, sensory properties and sun protection factor (SPF) *in vivo*. Subsequently, clinical efficacy was performed with stable formulations containing or not NLCs with quercetin. The clinical study was conducted with female participants, 20-35 years old, phototypes II and III, with photoprotection habits and after 60 days of application. Measurements were made of stratum corneum water content, transepidermal water loss, skin echogenicity, microrelief, viscoelasticity and erythema of the skin. The results showed that the developed formulation was stable and presented a pseudoplastic rheological behavior. Moreover, the correlation of rheological behavior, texture profile and sensory properties allowed the correct choice of raw materials and, consequently, improved SPF without increasing the amount of UV filters. Furthermore, the results obtained in the clinical study showed that the presence of NLCs containing or not quercetin increases its efficacy. Finally, the use of NLCs for the administration of quercetin to the skin helped increase SPF when added to a conventional photoprotective formulation, as well as increasing hydration and protection of the skin barrier.

Keywords: Clinical Efficacy, Sunscreen; Nanostructure lipid carriers; Quercetin, SPF.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Índice UV do Brasil ao meio-dia durante solstício de inverno e de verão, para condições de céu claro (sem nuvens) .....	07
<b>Figura 2.</b> Estrutura esquemática da pele .....	08
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da quercetina.....	18
<b>Figura 4.</b> Diferentes tipos de CLN: I – Tipo Imperfeito, II – Tipo Amorfo, III - Tipo Múltiplo .....	23
<b>Figura 5.</b> Fluxograma do desenvolvimento das formulações e fases seguintes do estudo.....	42
<b>Figura 6.</b> Regiões da face em que foi realizado o estudo de eficácia em longo prazo...	53
<b>Figura 7.</b> Curva de deformação da pele obtida com o equipamento Cutometer® dual MPA 580.....	57
<b>Figura 8.</b> Distribuição de tamanho de partícula: A (sem antioxidante encapsulado) e B (com antioxidante encapsulado) determinado pelo espalhamento dinâmico da luz após 24 horas de preparação.....	61
<b>Figura 9.</b> Reogramas obtidos na análise das formulações F1 após 24 horas e 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina).....	64
<b>Figura 10.</b> Reogramas obtidos na análise das formulações F2 após 24 horas e 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina).....	64
<b>Figura 11.</b> Reogramas obtidos na análise das formulações F3 após 24 horas e 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).....	65
<b>Figura 12.</b> Viscosidade Mínima Aparente das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem	

nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina).....	66
<b>Figura 13.</b> Viscosidade Mínima Aparente das formulações F2 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina).....	67
<b>Figura 14.</b> Viscosidade Mínima Aparente das formulações F3 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).....	68
<b>Figura 15.</b> Índice de Consistência das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina).....	69
<b>Figura 16.</b> Índice de Consistência das formulações F2 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina) ....	70
<b>Figura 17.</b> Índice de Consistência das formulações F3 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).....	71
<b>Figura 18.</b> Índice de Fluxo das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina).....	72

- Figura 19.** Índice de Fluxo das formulações F2 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina).. 73
- Figura 20.** Índice de Fluxo das formulações F3 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).... 74
- Figura 21.** Área de histerese das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina)..... 75
- Figura 22.** Área de histerese das formulações F2 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina).... 76
- Figura 23.** Área de histerese das formulações F3 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina)..... 77
- Figura 24.** Valores de Firmeza e Coesividade das formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura..... 78
- Figura 25.** Valores de Elasticidade (A) e Trabalho de Cisalhamento (B) das formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura..... 79
- Figura 26.** Valores de Pegajosidade (A) e Dureza (B) das formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura..... 79

<b>Figura 27.</b> Valores de Firmeza das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura.....	80
<b>Figura 28.</b> Valores do parâmetro Trabalho de Cisalhamento das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura.....	80
<b>Figura 29.</b> Valores da Coesividade das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura.....	80
<b>Figura 30.</b> Valores do parâmetro Dureza das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura.....	81
<b>Figura 31.</b> Valores do parâmetro Pegajosidade das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador com quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura.....	81
<b>Figura 32.</b> Valores do parâmetro Dureza das formulações F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador com quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura.....	81
<b>Figura 33.</b> Valores do FPS <i>in vivo</i> das formulações.....	82
<b>Figura 34.</b> Porcentagem de participantes que utilizam ou não protetor solar (n=100) ...	83
<b>Figura 35.</b> Frequência de reaplicação do protetor solar durante o dia (n=100) .....	84
<b>Figura 36.</b> Porcentagem do tempo de exposição ao sol diariamente das participantes (n=100) .....	84
<b>Figura 37.</b> Porcentagem do motivo da exposição ao sol das participantes (n=100) .....	85
<b>Figura 38.</b> Regiões de aplicação do protetor solar (n=100) .....	85
<b>Figura 39.</b> Fator de Proteção Solar (FPS) que as participantes utilizam no rosto (n=100) .....	86

<b>Figura 40.</b> Principais características do rosto que incomodam as participantes (n=100) .....	86
<b>Figura 41.</b> Diagrama de fluxo da etapa clínica.....	87
<b>Figura 42.</b> Propriedades sensoriais das formulações F2-VE (formulação F2 fotoprotetora sem substâncias ativas), F3-VE (formulação F3 sem substâncias ativas); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina) e F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina), após a aplicação quanto aos parâmetros: Ausência de Pegajosidade, Sensação ao Toque, Facilidade de Espalhar, Resíduo Branco e Maciez. Sendo atribuído as notas: 1 - Péssimo, 2 – Ruim, 3 - Regular, 4 - Bom, 5- Excelente (n = 60).....	88
<b>Figura 43.</b> Propriedades sensoriais das formulações F2-VE (formulação F2 fotoprotetora sem substâncias ativas), F3-VE (formulação F3 sem substâncias ativas); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina) e F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina), após 5 minutos da aplicação quanto aos parâmetros: Brilho, Sensação de Esfarelamento, Resíduo Oleoso, Aspectos Visuais e Toque Aveludado. Sendo atribuído as notas: 1 - Péssimo, 2 – Ruim, 3 - Regular, 4 - Bom, 5- Excelente (n = 60).....	89
<b>Figura 44.</b> Avaliação da intenção de compra das formulações F2-VE (formulação F2 fotoprotetora sem substâncias ativas), F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina) e F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).....	89
<b>Figura 45.</b> Perda de água transepidérmica antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina) .....	90
<b>Figura 46.</b> Conteúdo aquoso do estrato córneo antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).....	90
<b>Figura 47.</b> Topografia da pele antes e depois da aplicação das formulações: A (F3-VE), B (F3-QT), C (F3-CLN VZ) e D (F3-CLN) .....	91

<b>Figura 48.</b> Descamação da pele (SEsc) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina) .....	92
<b>Figura 49.</b> Macies da pele (SEsm) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina) .....	92
<b>Figura 50.</b> Número e largura das rugas (SEw) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina) .....	93
<b>Figura 51.</b> Parâmetro Ser (Rugosidade da pele) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).....	93
<b>Figura 52.</b> Perda transepidérmica de água (TEWL) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), Grupo 3 (F3-CLN) .....	94
<b>Figura 53.</b> Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), Grupo 3 (F3-CLN) .....	95
<b>Figura 54.</b> Rugosidade da pele (SER) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	95
<b>Figura 55.</b> Topografia da pele antes da utilização das formulações (T0) depois de 30 dias (T30) e 60 dias depois (T60) da aplicação das formulações: Grupo 1- Formula F3-CLN VZ, Grupo 2- Formula F3-VE, Grupo 3- Formula F3-CLN.....	96
<b>Figura 56.</b> Descamação da pele (SEsc) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	97

<b>Figura 57.</b> Parâmetro Rt-2 (Rugosidade da pele) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	97
<b>Figura 58.</b> Maciez da pele (SESM) malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	98
<b>Figura 59.</b> Rugas da pele (SEW) malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	98
<b>Figura 60.</b> Índice de Eritema da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	99
<b>Figura 61.</b> Índice de Melanina da pele da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	99
<b>Figura 62.</b> Imagens de alta resolução da pele com o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha) obtida de uma participante do Grupo 2 (formulação F3-VE) antes (T0) e depois de 60 dias (T60) da utilização da formulação do rosto e região malar direita. ....	100
<b>Figura 63.</b> Imagens de alta resolução da pele com o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha) obtida de uma participante do Grupo 3 (formulação F3-CLN) antes (T0) e depois de 60 dias (T60) da utilização da formulação do rosto e região malar direita.....	101
<b>Figura 64.</b> Imagens de alta resolução da pele com o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha) obtida de uma participante do Grupo 1 (formulação F3-CLN VZ) antes (T0) e depois de 60 dias (T60) da utilização da formulação do rosto e região malar direita.....	102
<b>Figura 65.</b> Imagens da capacitância da pele obtida de uma participante do Grupo 2 (formulação F3-VE) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.....	103
<b>Figura 66.</b> Imagens da capacitância da pele obtida de uma participante do Grupo 3 (formulação F3-CLN) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação .....	103

<b>Figura 67.</b> Imagens da capacitância da pele obtida de uma participante do Grupo 1 (formulação F3-CLN VZ) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.....	104
<b>Figura 68.</b> Parâmetro GrayIndex na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	104
<b>Figura 69.</b> Parâmetro Anisotropia na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	105
<b>Figura 70.</b> Parâmetro Mean GL (nível de cinza) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	105
<b>Figura 71.</b> Elasticidade bruta da pele (R2: $U_a/U_f$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	106
<b>Figura 72.</b> Elasticidade líquida da pele (R5: $U_v/U_e$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	106
<b>Figura 73.</b> Viscoelasticidade da pele (R6: $U_v/U_e$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	107
<b>Figura 74.</b> Elasticidade biológica da pele (R7: $U_r/U_f$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	107
<b>Figura 75.</b> Relação de ecogenicidade (número de pixels baixos/ número total de pixels) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	108
<b>Figura 76.</b> Espessura da derme da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).....	108

<b>Figura 77.</b> Imagens ilustrativas do ultrassom Dermascan® de participantes do Grupo 2 (formulação F3-VE) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.....	109
<b>Figura 78.</b> Imagens ilustrativas do ultrassom Dermascan® de participantes do Grupo 3 (formulação F3-CLN) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.....	110
<b>Figura 79.</b> Imagens ilustrativas do ultrassom Dermascan® de participantes do Grupo 1 (formulação F3-CLN VZ) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.....	111
<b>Figura 80.</b> Distribuição do parâmetro “Hidratação” antes do início do estudo clínico (T0) e após 60 dias (T60) de utilização das formulações de cada grupo avaliado.....	112
<b>Figura 81.</b> Frequência do parâmetro “Manchas” antes do início do estudo clínico (T0) e após 60 dias (T60) de utilização das formulações de cada grupo avaliado.....	112
<b>Figura 82.</b> Distribuição do parâmetro “Maciez” antes do início do estudo clínico (T0) e após 60 dias (T60) de utilização das formulações de cada grupo avaliado.....	113
<b>Figura 83.</b> Frequência sobre os efeitos observados pelas participantes após 60 dias (T60) de utilização das formulações.....	114
<b>Figura 84.</b> Avaliação da intenção de compra das formulações objeto do estudo clínico	114

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Critérios de inclusão e exclusão do estudo clínico.....	50
Quadro 2 – Questões pré-definidas na entrevista de recrutamento.....	51

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Fototipos cutâneos.....	11
<b>Tabela 2</b> – Composição (%) das formulações desenvolvidas sem a adição das substâncias ativas (veículo).....	43
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros relacionados à superfície da pele fornecido pelo equipamento Visioscan® VC 98.....	53
<b>Tabela 4</b> – Parâmetros fornecidos pelo equipamento Cutometer® dual MPA 580.....	58
<b>Tabela 5</b> – Diâmetro, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) de carreadores lipídicos nanoestruturados sem antioxidante encapsulado e 12mg de antioxidante.....	61
<b>Tabela 6</b> -Valores de pH das formulações F1 desenvolvidas.....	62
<b>Tabela 7</b> - Valores de pH das formulações F2 desenvolvidas.....	63
<b>Tabela 8</b> - Valores de pH das formulações F3 desenvolvidas.....	63
<b>Tabela 9</b> -Valores obtidos para o FPS <i>in vivo</i> .....	82
<b>Tabela 10</b> - Características das participantes alocadas no estudo.....	87

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Anvisa	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BEMT	Bis-ethylhexymetoxypheyl triazine
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLN-QT	Carreadores lipídicos nanoestruturados encapsulando quercetina
COLIPA	European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association
DEM	Dose Eritematógena Mínima
DHHB	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate
EHT	Ethylhexyl triazone
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
EE%	Eficiência de Encapsulamento
FDA	Food and Drug Administration
FPS	Fator de Proteção Solar
IV	Infravermelha
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
MBBT	Methylenebis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MPE	Mean Photo Effect – foto efeito médio
nm	Nanômetro
PdI	Índice de polidispersão
QT	Quercetina
TEWL	Perda Transepidermica de Água
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Lista de figuras</b> .....	iii
<b>Lista de quadros</b> .....	xii
<b>Lista de tabelas</b> .....	xiii
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1 Radiação Solar e a Pele.....	6
2.2 Fotoproteção.....	12
2.3 Quercetina.....	17
2.4 Nanopartículas em Produtos Cosméticos.....	20
2.5 Desenvolvimento e Eficácia Clínica de Cosméticos.....	25
2.6 Técnicas de Biofísica e Análise de Imagem da Pele.....	28
<b>3. OBJETIVO</b> .....	33
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 Matérias Primas.....	36
4.2 Equipamentos e Acessórios.....	37
4.3 Preparação dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	39
4.4.1 Caracterização dos CLNs.....	39
4.4.2 Eficiência de Encapsulação.....	39
4.4 Desenvolvimento das Formulações.....	40
4.5 Testes Preliminares de Estabilidade.....	44
4.4.1 Centrifugação.....	44
4.4.2 Determinação do pH.....	44
4.4.3 Avaliação Visual.....	44
4.5 Estudo de Estabilidade Física por Determinação do Comportamento Reológico... ..	45
4.6 Determinação do Perfil de Textura das Formulações.....	46
<b>5. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	47
5.1 Determinação do Fator de Proteção (FPS) in vivo.....	48
5.2 Triagem das participantes.....	49
5.3 Avaliação Sensorial.....	52
5.4 Protocolos dos Estudos de Eficácia Clínica.....	52
5.4.1 Avaliação dos Efeitos Imediatos.....	52
5.4.2 Avaliação dos Efeitos em Longo Prazo.....	53
5.5 Técnicas de Biofísica e Análise de Imagem Aplicadas.....	54
5.5.1 Determinação do Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo.....	54
5.5.2 Determinação da Perda Transepidérmica de Água (TEWL) .....	54
5.5.3 Determinação do Microrrelevo Cutâneo.....	55
5.5.4 Quantificação de Melanina e Eritema.....	56
5.5.5 Avaliação por Imagem da Capacitância da Pele.....	56
5.5.6 Avaliação das Características da Derme por Ultrassom de Alta Frequência.....	56
5.5.7 Avaliação das Propriedades Mecânicas da Pele – Viscoelasticidade.....	57
5.6 Percepção da Eficácia Clínica.....	58

5.7 Análise Estatística.....	59
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
6.1 Desenvolvimento e Caracterização dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) .....	61
6.2 Desenvolvimento das Formulações.....	62
6.3 Testes preliminares de Estabilidade.....	62
6.3.1 Centrifugação.....	62
6.3.2 Determinação do pH.....	62
6.3.3 Avaliação Visual.....	63
6.4 Estudo de Estabilidade Física por Determinação do Comportamento Reológico...	63
6.5 Determinação do Perfil de Textura das Formulações.....	78
6.6 Determinação do FPS <i>in vivo</i> .....	82
6.7 Triagem das Participantes.....	83
6.8 Análise Sensorial.....	88
6.9 Avaliação dos Efeitos Imediatos.....	90
6.9.1 Perda Transepidérmica de Água.....	90
6.9.2 Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo.....	90
6.9.3 Avaliação do Microrrelevo Cutâneo.....	91
6.10 Avaliação dos Efeitos em Longo Prazo.....	94
6.10.1 Perda Transepidérmica de Água.....	94
6.10.2 Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo.....	94
6.10.3 Avaliação do Microrrelevo Cutâneo.....	95
6.10.4 Quantificação de Melanina e Eritema.....	99
6.10.5 Avaliação por Imagem da Capacitância da Pele.....	103
6.10.6 Elasticidade da Pele.....	106
6.10.7 Ecogenicidade e Espessura da Derme.....	108
6.11 Percepção da Eficácia Clínica.....	112
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>115</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>137</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>139</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>154</b>
Anexo A: Parecer Substanciado do Comitê de Ética.....	155
Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	159

# 1. INTRODUÇÃO

---

Os danos causados pela radiação solar ao longo dos anos podem acumular e causar efeitos irreversíveis, sendo necessário o uso de fotoprotetores. Esses efeitos têm sido associados à radiação ultravioleta (UV), especificamente UVA e UVB. A maior parte dos produtos disponíveis no mercado absorve a radiação solar no espectro UVB (290-320nm), relacionados com danos nas primeiras camadas da pele; e a radiação UVA (320- 400nm) com danos nas camadas mais profundas da pele, a derme por exemplo.

Entretanto, a incidência de radiação solar no Brasil é elevada ao longo do ano todo, sendo possível identificar sinais precoces do fotoenvelhecimento na população. Além disso, a exposição à radiação ultravioleta altera uma variedade de eventos de sinalização celular, causando modificações na estruturas celulares como ácidos nucléicos, proteínas celulares e lipídeos e reações inflamatórias responsáveis pelo fotoenvelhecimento, resultando em rugas, alterações no padrão de pigmentação da pele e, com a exposição excessiva, podem desencadear o câncer de pele (BALOGH et al, 2011; CORRÊA, 2015).

Neste contexto, há uma intensa busca de medidas com intuito de prevenir, retardar e amenizar as consequências da exposição solar, oferecendo diversos benefícios para pele em um único produto. Assim, a área de pesquisa e desenvolvimento de cosméticos busca o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras seguras, estáveis e eficazes com alta capacidade de proteção, havendo a necessidade de conhecer as matérias primas que compõe a formulação e como elas interagem. Além disso, estudos tem demonstrado que a incorporação de antioxidante às formulações fotoprotetoras pode fornecer maior proteção, devido a neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas pela radiação solar. Portanto, a associação de filtro solares e antioxidantes pode ser eficaz para potencializar o efeito fotoprotetor (SOUZA & CAMPOS, 2017).

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona), é um flavonoide encontrado em maior quantidade em vegetais e frutas, apresenta propriedades antiapoptótica, anti-inflamatório, antibacteriano e antioxidante, responsável principalmente à sua capacidade em eliminar radicais livres, inibição da peroxidação lipídica e quelação de íons metálicos (MAITI et al., 2005; VICENTINI et al., 2010). Desta maneira, a quercetina possui potencial para ser empregado em formulações com finalidades fotoprotetoras, agindo principalmente nos danos causados na pele pela exposição à radiação UV. Apesar dessas atividades promissoras, a quercetina apresenta baixa solubilidade em água e incapacidade de penetrar na pele, além de apresentar fotossensibilidade, uma vez que a quercetina pode ser degradada pela radiação UV e formar produtos que podem exibir efeitos pró-

apoptóticos (CASAGRANDE et al., 2006; VICENTINI et al., 2011; HATAHET et al, 2016). Assim, algumas estratégias têm sido desenvolvidas, como por exemplo o encapsulamento da quercetina em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

A nanotecnologia tem sido apontada como promessa na área cosmética, tendo em vista alcançar maior eficácia das substâncias ativas, além de oferecer características sensoriais diferenciados ao produto. O potencial dos CLNs para aplicação tópica tem sido demonstrado em vários estudos. Devido à natureza lipídica, tamanho reduzido das partículas e elasticidade, o carreador protege a quercetina da degradação decorrente da exposição à luz e dos demais componentes da formulação, auxiliando na estabilidade do produto e na liberação gradual da quercetina evitando possíveis irritações locais que poderiam ocorrer no caso de formulações convencionais (VITORINO et al., 2013; HATAHET et al, 2016). Sendo assim, além da possibilidade de aumentar a permeação na pele da quercetina, possibilitando sua aplicação tópica, o encapsulamento da quercetina em carreadores lipídicos nanoestruturados também é uma maneira de aumentar sua estabilidade química e sua fotoestabilidade (VITORINO et al., 2013).

O desenvolvimento de formulações fotoprotetoras envolve a combinação de dois ou mais filtros solares para a obtenção de formulações com alto fator de proteção solar (FPS), envolvendo a escolha criteriosa das matérias-primas a fim de alcançar produtos estáveis e com propriedades sensoriais adequadas às finalidades propostas. Diante disso, o estudo das propriedades físico-mecânicas das formulações em desenvolvimento é fundamental para a seleção das matérias-primas, bem como correlacionar com as características sensoriais, permitindo desenvolver formulações com sensorial diferenciado, permitindo a continuidade no tratamento cosmético e boa espalhabilidade na pele (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016). Para isso, a análise do perfil de textura utilizando o equipamento texturômetro TA. XT plus é fundamental para avaliação da consistência e espalhabilidade das formulações, permitindo assim analisar a influencia dos componentes nas propriedades mecânicas das formulações (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016; CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017). Além disso, a análise reológica, que vem sendo muito utilizada nas indústrias cosmética e farmacêutica, garante que a consistência e o espalhamento dos produtos podem ser reproduzidos de lote para lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto acabado (BRUMMER, 2006; CALIXTO et al, 2018a).

Além disso, é de fundamental importância a realização de estudos clínicos de eficácia para a comprovação da eficácia clínica das formulações propostas (SHIRATA &

MAIA CAMPOS, 2016). Assim, as técnicas de biofísica e de análise de imagem são técnicas não invasivas que permitem avaliar as características da pele e a eficácia clínica de produtos cosméticos nas reais condições de uso. Para a avaliação de eficácia vários parâmetros são avaliados, tais como o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda de água transepidérmica, o microrrelevo e as propriedades mecânicas da pele, a ecogenicidade da derme e as características morfológicas e estruturais da epiderme.

Apesar do amplo conhecimento sobre o potencial uso dos nanocarreadores e as propriedades antioxidantes da quercetina, existem poucos estudos clínicos que avaliem a eficácia clínica contendo esses ingredientes combinados. Assim, a proposta do presente trabalho, o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras contendo quercetina nanoencapsuladas em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs), apresenta como contribuição a elucidação das características físico-mecânicas das formulações e a avaliação da eficácia das mesmas por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele visando o desenvolvimento de produtos mais estáveis, eficazes e compatíveis com a pele.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

## 2.1 RADIAÇÃO SOLAR E A PELE

A pele sofre com o processo de envelhecimento intrínseco relacionado ao processo cronológico e, por estar exposta ao ambiente, é suscetível a diversas agressões do ambiente, como poluição, tabagismo e exposição ao sol, que levam ao envelhecimento extrínseco. Neste contexto, os danos causados pelo Sol ao longo dos anos podem acumular e causar danos ao DNA, sendo necessário o uso de fotoprotetores.

O espectro solar terrestre compreende em três faixas em relação ao comprimento de onda: a radiação ultravioleta (UV) (100 - 400 nm) detectada através das reações fotoquímicas, radiação visível (VIS) (400 - 780 nm) com as diferentes cores do sistema óptico e a radiação infravermelha (IV) (>780 nm) percebida sob a forma de calor. A energia da radiação solar aumenta com a diminuição do comprimento de onda ( $\lambda$ ), portanto, a radiação UV é a mais energética e de maior propensão à indução de reações fotoquímicas. O espectro da radiação UV se apresenta subdividido, por conveniência didática, em: UVC (100 - 290 nm), UVB (290 - 320 nm) e UVA (320 - 400 nm) (BALOGH et al, 2011).

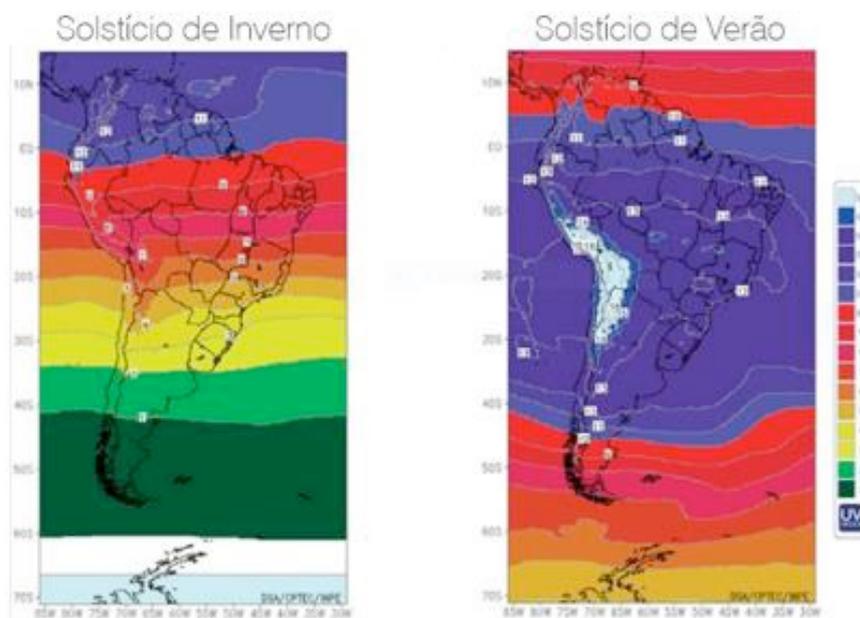
No entanto, o Ozônio (O<sub>3</sub>) é capaz de realizar a fotoabsorção de 100% da radiação UVC, 90% da radiação UVB, mas praticamente não absorve a radiação UVA dirigida à superfície da Terra. A formação das moléculas de ozônio ocorre pela combinação de uma molécula de O<sub>2</sub> com um átomo de oxigênio (STIEFEL & SCHWACK, 2015). Estes últimos provem da foto dissociação de O<sub>2</sub>, isto é, da quebra de uma molécula de O<sub>2</sub> por um átomo de radiação UVC com comprimento menor que 242nm. Porém, nos últimos anos, o nível de ozônio na atmosfera tem diminuído anualmente, em consequência principalmente do uso de substâncias químicas responsáveis pela depleção da camada de ozônio, alterando o balanço natural de ozônio provocando aumento na quantidade de radiação UV que atinge a Terra. (OKUNO, & VILELA, 2005; BALOGH et al, 2011).

A incidência da radiação solar na superfície da terra depende de fatores temporais, geográficos e meteorológicos. Os principais são: hora do dia, estação do ano, latitude e altitude. Em geral, a radiação solar apresenta maior intensidade próxima ao Equador, sendo que a cada grau de latitude em direção ao Equador acrescentam-se mais 3% de incidência da radiação solar, e a cada 1 km de aumento na altitude somam-se 6% na sua incidência. No verão a radiação solar apresenta maior intensidade sendo que a maior quantidade de energia solar alcança a Terra entre 11 horas e 16 horas, e especificamente a radiação UVB entre 10 e 14 horas. O índice UV é uma ferramenta importante para

conscientizar a população sobre os riscos da exposição excessiva à radiação UV e alertar sobre a necessidade de adotar medidas de proteção (Figura 1) (SOUZA, 2016; WHO, 2019).

A maior parte do território brasileiro encontra-se entre o trópico de capricórnio e a linha do equador, com eixo do planeta de aproximadamente de 23° em relação ao Sol, o que caracteriza o Brasil como uma região que recebe um dos maiores índices de radiação solar ao longo de todo ano. Essa condição eleva o risco do envelhecimento precoce e o desenvolvimento de diversas doenças de pele, como tumores malignos e benignos de pele. Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, o câncer de pele não melanoma (não maligno), causado pelo sol, responde por 33% de todos os diagnósticos de câncer no Brasil (SBD, 2019). Em 2018, foram registrados 6.260 novos casos de melanoma (maligno), sendo 2.920 homens e 3.340 mulheres. No Brasil, o melanoma e entre outras neoplasias malignas de pele foram responsáveis pela morte de 1.958 pessoas em 2015, sendo 1.137 homens e 821 mulheres (INCA, 2019).

Figura 1. Índice UV do Brasil ao meio-dia durante solstício de inverno e de verão, para condições de céu claro (sem nuvens) (Adaptado de CORRÊA, 2015)

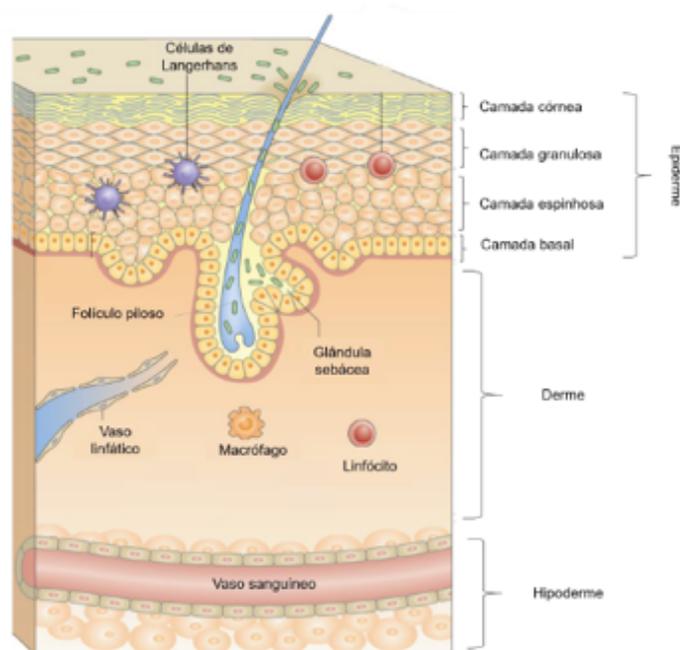


Por ser o maior órgão do corpo humano, a pele tem papel fundamental na proteção do organismo contra microrganismos patógenos, a radiação solar, poluição, além de atuar na manutenção do equilíbrio térmico, homeostático e produção de vitamina D do organismo (BERKEY et al, 2017). É constituída de três camadas: uma porção de origem ectodérmica, a epiderme, e outra mesodérmica, a dérmica. Abaixo da derme está

localizado também o tecido subcutâneo, sendo que este não faz parte da pele propriamente dita, mas serve como suporte e une a pele aos órgãos subjacentes (MERCURIO & MAIA CAMPOS, 2009).

A epiderme é um epitélio estratificado, pavimentoso, avascular e queratinizado, que passam por um processo vertical de diferenciação, sendo a camada mais externa da pele responsável pela produção de um estrato córneo protetor que permite o contato com o ambiente externo. De acordo com a morfologia dos queratinócitos e seu arranjo em relação aos tipos celulares, as camadas da epiderme são definidas como: basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida (presente apenas em peles espessas, como a sola dos pés e mãos) e córnea. Na epiderme, também se encontra os melanócitos, responsáveis pela síntese da melanina, células de Langerhans (defesa imunológica) e as células de Merkel, receptoras do tato, ligadas às terminações nervosas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013)

Figura 2. Estrutura esquemática da pele (adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013)



A derme é formada por tecido conjuntivo denso e matriz extracelular localizado entre a epiderme e o tecido subcutâneo subjacente, apresenta uma superfície externa irregular formado por fibroblastos, responsáveis pela produção das proteínas da matriz extracelular (como colágeno, elastina e proteoglicanas estruturais), e pelas células do sistema imunológico, tais como mastócitos e macrófagos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Nesta camada estão presentes as raízes dos pelos, as glândulas, terminações

nervosas, arteríolas e vênulas. É subdividida em derme papilar, uma camada delgada que nutre e suporta a epiderme constituída por tecido conjuntivo frouxo e, a derme reticular, constituída por tecido conjuntivo denso com vasos sanguíneos de maior calibre, caracterizada por fibras de elastina mais espessa e colágeno importantes para a flexibilidade e distensão da pele (MENON & KLIGMAN, 2009).

Neste contexto, com a variedade de estruturas, funções e tecidos, é essencial a manutenção de uma pele saudável, permitindo uma proteção adequada com o meio externo. A população é diretamente exposta à radiação ultravioleta (UV), principalmente quando não protegida por vestimentas e fotoprotetores. Ao atingir a pele desprotegida, a radiação solar pode ser refletida, espalhada ou absorvida por diversos cromóforos na pele, tais como o DNA, RNA, porfirinas, ácido urocânico, aminoácidos aromáticos como a tirosina e o triptofano. A absorção da radiação promove reações fotoquímicas responsáveis pelas alterações cutâneas relacionadas ao envelhecimento precoce. Com passar dos anos, sucessivas exposições a radiação UV diminuem a eficiência do sistema antioxidante endógeno, o que culmina na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo ser agudas ou crônicas (VICENTINI et al., 2010; BALOGH et al., 2011; ROMANHOLE et al., 2016).

A radiação UVA corresponde a 80% da radiação ultravioleta, apresenta maior comprimento de onda e uma baixa quantidade energética (320 a 400 nm), o que faz com que seja capaz de penetrar em camadas mais profundas na junção dérmico-epidérmica (JDE), prejudicando o colágeno e o tecido elástico (BURKE, 2018). Atua diretamente na geração de radicais livres que irão posteriormente ser responsáveis pela peroxidação lipídica, diminuição da produção de ácido hialurônico (HA) e aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), responsáveis pelos sinais clínicos do fotoenvelhecimento, como as rugas, flacidez, pigmentação e pelo efeito de bronzeamento imediato e persistente na superfície da pele devido ao escurecimento da melanina e dano oxidativo da leucomelanina. (RINNERTHALER, et al, 2015; SOUZA, 2016; FOSSA SHIRATA et al, 2019).

A radiação UVA ainda é classificada na literatura em dois comprimentos de onda: UVA-I (315-340 nm) apresenta maior capacidade de penetração, com alto potencial para causar danos na estrutura do DNA; e UVA-II (340-400nm), que assemelha-se à radiação UVB por sua capacidade eritematogênica, ou seja, o potencial de causar queimadura na pele, bem como afetar o sistema imunológico (OKUNO; VILELA, 2005; SCHALKA et al., 2014; WANG et al., 2010).

Embora apenas 5 a 10% dos raios atingem a superfície terrestre, a radiação UVB apresenta um comprimento de onda menor e uma quantidade de energia maior que a radiação UVA (280 a 320nm) penetrando principalmente até as camadas mais superficiais da epiderme. Ao contrário da radiação UVA que permanece com intensidade bastante consistente ao longo do dia, a radiação UVB apresenta intensidade máxima entre 10 e 16 horas. É responsável pelos danos agudos como eritema (queimadura solar) e edema devido a liberação de mediadores inflamatórios dos queratinócitos; e crônicos da pele, tais como pigmentação tardia, queimaduras, câncer de pele e o fotoenvelhecimento (EMRI et al., 2018; BURKE, 2018).

Os danos gerados pela exposição à radiação solar são determinados pelos diferentes fototipos cutâneos, classificados quanto à energia mínima e o tempo necessário para o surgimento do eritema (STIEFEL & SCHWACK, 2015). A melanina é responsável pela coloração da pele, que pode se apresentar com diferentes tonalidades. A produção de pigmentação na pele é controlada por uma série de fatores tanto internos como externos, incluindo a exposição solar. A produção aumentada de melanina em resposta à estimulação é uma reação defensiva da pele contra as agressões solares. Após irradiação os melanossomas se reagrupam em torno do núcleo para proteger o material genético da célula (BURKE, 2018).

Em 1983 Fitzpatrick e Mosher classificaram os tipos de pele em categorias de I a VI, que vão desde o tipo de pele extremamente sensível ao sol, até tipos de pele que apresentam grande tolerância à radiação solar (FITZPATRICK, 1983) (Tabela 1). Esta classificação também tem se tornado útil em indicar o risco de câncer de pele fotoinduzido. Para completar a classificação, também são levadas em conta características como a cor de cabelo e dos olhos, permitindo a subdivisão da população nos diferentes fototipos (SOUZA, 2016).

Desta forma, as reações fotoquímicas apresentam efeitos importantes sobre a pele humana, envolvendo danos no DNA, geração de espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete, superóxido, radicais peroxila, radicais hidroxila e peroxinitrito), melanogênese, apoptose, depleção de células de Langerhans, indução da síntese de metaloproteinases que causam degradação de colágeno resultando em rugas, e causam disfunção de melanócitos originando alterações no padrão de pigmentação da pele podem ser benignas, pré malignas ou malignas. A principal causa do envelhecimento extrínseco é a exposição aos raios ultravioletas (UV) e sabe-se que até 80-90% do envelhecimento da pele é devido aos efeitos deletérios da luz solar (BALOGH, 2011; CHOMICZEWSKA-SKÓRA et al,

2013; FOSSA SHIRATA et al, 2019). O único benefício amplamente estabelecido da radiação UV na pele é a síntese de vitamina D, iniciada pela conversão induzida pelos raios UVB do 7-deidrocolesterol na epiderme em pré vitamina D3 durante um período de 12 a 24 horas. (DUPONT et al., 2013; STIEFEL & SCHWACK, 2015).

**Tabela 1 – Fototipos cutâneos (FITZPATRICK, 1993)**

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

O fotoenvelhecimento é o termo usado para descrever alterações clínicas, histológicas e funcionais na pele cronicamente exposta ao sol de adultos de meia idade e idosos. A impotência do fotoenvelhecimento reside no seu impacto no desenvolvimento de novos cosméticos e, conseqüentemente, na influência psicossocial em uma grande porcentagem dos adultos. Com o envelhecimento da população, a manutenção da aparência jovem é altamente desejada. Em 2020, o mercado global de produtos anti-envelhecimento deve chegar a U\$ 275 bilhões com os Estados Unidos respondendo como o maior mercado. Os sinais clínicos do fotoenvelhecimento são associados à função de barreira defeituosa, atrofia do colágeno, perda da elasticidade da pele, especialmente no rosto, rugas e lentigos, além de alterações na vasculatura como telangiectasias e hematomas. No entanto, sabe-se que a profundidade e a gravidade das alterações do envelhecimento variam com o fototipo da pele (POON et al., 2015; CHIEN et al, 2018).

Diante dos efeitos prejudiciais à pele e a excessiva exposição à RUV, as medidas de prevenção recomendadas incluem evitar a exposição ao sol, utilizar roupas e acessórios adequados, tais como chapéus, camisas de mangas compridas e óculos de sol e, principalmente, utilizar protetores solares de amplo espectro com reaplicação (WHO, 2019). Assim, o uso e o desenvolvimento de novos produtos, eficientes e seguros, para prevenção dos danos do sol é fundamental para diminuir e prevenir os efeitos danosos da radiação UV sobre o material genético (BALOGH et al, 2011).

## 2.2 FOTOPROTEÇÃO

A Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), define que protetores solares constituem a primeira linha de prevenção e proteção d frente aos efeitos danosos da radiação ultravioleta, sendo fator chave na prevenção de queimaduras solares, fotoenvelhecimento e o câncer de pele. São produtos de uso externo destinada a entrar em contato com a pele e lábios, capazes de refletir e dispersar a radiação UV, absorver comprimentos de onda, contém mecanismos estabilizadores e interceptam os radicais livres limitando o dano fotoquímico (GONZÁLEZ et al, 2008). Classificados como produtos Grau 2, sua eficácia deve ser comprovada através de testes in vivo e in vitro do FPS e FP-UVA aplicando estritamente os guias atualizados disponibilizados pela FDA (Food and Drug Administration) COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) antes da sua comercialização (BRASIL, 2012b).

Apesar de ser um tema extremamente atual, as pessoas buscavam a proteção do sol principalmente para evitar a dor causada pela queimadura solar ou simplesmente porque a pele mais escura estava associada à menor posição social, sendo as primeiras referências relacionadas a patologias cutâneas e radiações UV datam de 1894. O filtro solar físico, composto de argilas inorgânicas e pós minerais, já era usado pelos egípcios para essa finalidade, enquanto os gregos antigos aplicavam uma mistura protetora de óleo e areia (DUPONT et al., 2013). Já os primeiros produtos para proteção solar datam de 1928, composto de uma combinação de salicilato de benzila e cinamato de benzila. Na segunda guerra mundial, soldados alocados em climas tropicais, com a finalidade de evitar queimaduras solares, utilizavam petrolato veterinário vermelho, PABA (ácido 4-aminobenzoico) e ácidos paradimetilaminobenzoicos (GONZÁLEZ et al, 2008). Neste período, vários trabalhos descrevem patologias da pele induzidas por radiação solar e incluem degenerações cutâneas, fotossensibilização e fototoxicidades. Mas apenas em 1963 é que de fato falou pela primeira vez em fator de proteção solar (FPS), surgindo no final da década de 1970 FPS 20 (STIEFEL & SCHWACK, 2015). Na virada do século XXI finalmente atingiu-se uma boa proteção contra os raios UVA e UVB e novas evidencias relatavam que o envelhecimento da pele era o resultado de fatores intrínsecos e extrínsecos. Por tanto, decorrem mais de 100 anos entre a primeira alusão de lesões pré-cancerosas de pele e a confirmação do efeito protetor dos filtros solares (SCHALKKA & REIS, 2011; DUPONT et al., 2013; CORRÊA, 2015).

Estudos evidenciam que o uso adequado e regular de fotoprotetores reduz o número de casos de queratose actínica, carcinoma de células escamosas e atenua o desenvolvimento de novos nevos. Adicionalmente, o uso regular de fotoprotetores evita o envelhecimento precoce da pele (BALOGH et al, 2011). Para uma boa proteção contra os raios UV, o protetor deve ser fotoestável, deve possibilitar a dissipação da energia absorvida de modo eficiente por vias fotofísicas e fotoquímicas evitando a formação de oxigênio singlete, EROs e outros intermediários reativos; não deve penetrar na pele pois pode causar reações cutâneas como dermatites, reações fototóxicas não imunológicas, alergias e reações fotoalérgicas; deve ser capaz de bloquear os raios UVA e UVB (POON et al., 2015; STIEFEL & SCHWACK, 2015).

A regulamentação dos produtos de proteção solar difere de país para país, não existe uma definição geral obrigatória para protetores solares em todo mundo, mas muitos países usam a regulamentação Europeia de cosméticos número 1223/2009. Em alguns países, como a União Europeia, China, Índia, África do Sul, Japão, países do sudeste asiático e do Mercosul, os filtros solares são regulamentados como cosméticos. Em contraste, nos EUA, Austrália e na Nova Zelândia, os filtros são regulamentados como drogas (STIEFEL & SCHWACK, 2015).

Como a proteção natural da pele se torna ineficaz após um curto período de tempo (dependendo do tipo de pele, entre 10 a 40 minutos), é necessário considerar diferentes aspectos do filtro solar para uma maior adesão do consumidor, como a avaliação do desempenho, em especial do FPS e UVA, o custo, otimização do produto (testes de eficácia, avaliações sensoriais, estabilidade física e química e segurança) e a formulação do veículo que, muitas vezes, é determinante para a eficácia do protetor solar. Normalmente, os filtros solares contêm uma combinação de filtros orgânicos e inorgânicos, classificados, respectivamente, como filtros UV químicos e físicos, que garantem uma proteção eficaz em toda a faixa UVA e UVB.

Os filtros inorgânicos são representados pelo dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e o óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ), utilizados há mais de 40 anos na proteção solar e são apresentados na forma de partículas ultrafinas ou micronizadas. A combinação de absorção e espalhamento leva a uma cobertura de “amplo espectro” (UVA e UVB) para filtros solares inorgânicos (DRANSFIELD, 2000; STIEFEL & SCHWACK, 2015). Suas principais qualidades são a baixa permeação cutânea e a elevada fotoestabilidade, alto poder de cobertura, dispersão eficaz para a luz ultravioleta e são amplamente utilizados em formulações cosméticas, como maquiagens (SCHALKA & REIS, 2011).

O dióxido de titânio é o filtro inorgânico mais utilizado em formulações para proteção, pois é um pigmento branco que não provoca fotosensibilização, porém forma uma película branca na pele, pouco estética e indesejável pelo consumidor (CORRÊA, 2015). A fim de melhorar proteção UV, além de evitar o aspecto esbranquiçado, desde a década de 90 vem sendo utilizado matérias-primas em escala manométrica (na faixa de 70 a 200 nm), reduzindo o efeito esbranquiçado e com propriedade fotoprotetoras melhores (CORRÊA, 2015; STIEFEL & SCHWACK, 2015; SAKAMOTO et al, 2017).

O grupo de filtros UV orgânicos inclui diferentes classes de substâncias, que podem ser divididas em filtros UVA e UVB devido às suas características específicas de absorção. A maioria dos filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados a um grupo carbonila e a um radical nas posições “orto” ou “para”. A excitação de elétrons no respectivo anel de benzeno leva à absorção na faixa UV em um determinado comprimento de onda, passando para um estado excitado de maior energia. Ao retornarem ao estado fundamental (de menor energia), emitem a energia absorvida para a atmosfera em um maior comprimento de onda (normalmente na região do VIS, IV ou UV alto), menos prejudicial à pele. Ao voltar para o estado fundamental, recuperam a capacidade de absorver a radiação UV repetidamente (fototoestabilidade) (BAREL et al., 2009; SHAATH, 2010; CORRÊA, 2015).

Segundo a sua estrutura química, os filtros orgânicos são classificados em: ácido p-aminobenzóico e derivados, derivados do ácido cinâmico, salicilatos, benzofenonas, derivados da cânfora, derivados do dibenzoilmetano e antranilatos (CORRÊA, 2015). Atualmente, existem no mercado de filtros solares que visam à proteção com amplo espectro (UVA/UVB), além de uma elevada fotoestabilidade, cujo elevado peso molecular promove uma reduzida penetração na pele. (STIEFEL & SCHWACK, 2015). Como exemplos, podemos citar o Tinosorb® (S e M), e o Uvinul® (T150 e A Plus). Desta forma, a indústria de cosméticos tem à disposição diversos filtros solares orgânicos, os quais representam a maior parte das moléculas utilizadas em protetores solares (SOUZA & CAMPOS, 2017).

Porém, para garantir a eficácia do protetor solar é preciso que haja uma conformidade com relação à quantidade do produto que deve ser aplicada na pele, a uniformidade e a frequência de aplicação. O filtro deve ser aplicado na quantidade de 2,0 mg/cm<sup>2</sup> e reaplicados a cada 2 horas. No entanto, estudos têm demonstrado que a população aplica, em média, apenas um quarto (1/4) desta dose e, neste caso, a proteção

atingida pelos usuários é menor do que a apresentada no rótulo do produto (SCHALKA & REIS, 2011; SCHALKA et al., 2014; CORRÊA, 2015).

De acordo com a ANVISA, a eficácia de um fotoprotetor pode ser definida como a capacidade de proteger a pele contra a queimadura causada pela radiação UV. O FPS pode ser definido como o quociente entre a dose eritematógena mínima (DEM) na pele protegida com o fotoprotetor em análise e a DEM na pele ausente de proteção. O DEM é a quantidade de energia efetiva, expressa em Joules/cm<sup>2</sup>, requerida para a produção da primeira reação eritematógena perceptível e com bordas claramente definidas, identificadas por profissional habilitado e treinado, observado entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta (BALOGH et al, 2011; ANVISA, 2012; CORRÊA, 2015). Com relação a metodologia, no Brasil não existe uma metodologia padronizada para determinação da proteção UVA, a Resolução da ANVISA 237 de 2002 apenas menciona que a quantificação da proteção UVA deverá ser realizada por meio de metodologias reconhecidas e devidamente validadas (BALOGH et al, 2011).

Existem requisitos adicionais para o fotoprotetor para que se ajustem às necessidades do consumidor, como sensação de uso, estabilidade e segurança. O fotoprotetor deve ser incorporado a um veículo, sendo fundamental que os filtros dissolvam ou dispersem facilmente, obtendo preparações que formem um filme uniforme e homogêneo na superfície da pele, com aderência suficiente para resistirem à remoção pela água ou transpiração (FLOR et al 2007). A eficiência de um filtro solar incorporado em uma formulação é influenciada principalmente pelo emulsificante e pelos componentes graxos. Os emolientes influenciam na capacidade de espalhamento e penetração de fotoprotetores no estrato córneo. Assim, quanto maior a polaridade do emoliente, maior o poder de solubilização do filtro solar, além de aumentar a absorção do filtro na região UV, melhorando o FPS. Do mesmo modo, emolientes menos polares podem deslocar o comprimento de onda de absorbância máxima fora da faixa UV e possuem pouco poder solubilizante (KHURY & BORGES, 2013; SOUZA, 2016).

Além disso, os emulsificantes são capazes de interferir no comportamento da tensão superficial durante a fase de formação da película, modificando o comportamento reológico da emulsão e na distribuição homogênea e completa sobre a pele, além de controlar a resistência à água e contribuem para a compatibilidade do produto com a pele (DAHMS, 1996) Neste sentido, a escolha adequada das matérias-primas da formulação exerce um papel fundamental nas características finais de um protetor solar.

O mercado de cuidados com o sol constitui aproximadamente 3% do mercado global de cuidados pessoais e, as altas exigências em termos de desempenho, como alto valor de FPS, proteção UVA e UVB, resistência à água e a fotoestabilidade, em conjunto com as altas expectativas do consumidor em relação às propriedades sensoriais, exigem que os formuladores sejam inovadores e criativos no desenvolvimento de novas formulações fotoprotetoras (OSTERWALDER et al., 2014). Normalmente os filtros solares são materiais lipofílicos, o que requer uma grande quantidade de solventes oleosos para formulação, mas a sensação oleosa é indesejável pelo consumidor e filtros solares em pó deixam uma aparência esbranquiçada. Como resultado, os consumidores tendem aplicar uma menor quantidade do produto, o que prejudica na proteção solar correta. Dessa forma, inovações em termos de propriedades sensoriais ou formatos de aplicações foram introduzidas ao longo da última década para atrair os consumidores e melhorar a performance (SAKAMOTO, et al, 2017)

Atualmente observa-se uma tendência em associar aos filtros solares substâncias com atividade antioxidante visando combate à inflamação, estresse oxidativo, danos ao DNA e supressão da resposta imune, induzidos pela radiação UV. Assim o uso dos antioxidantes em fotoprotetores pode ser uma alternativa para prevenir danos fotoquímicos, porém existem poucos estudos in vivo que demonstrem o efeito dessa associação na pele humana (BALOGH et al, 2011; SOUZA & CAMPOS, 2017).

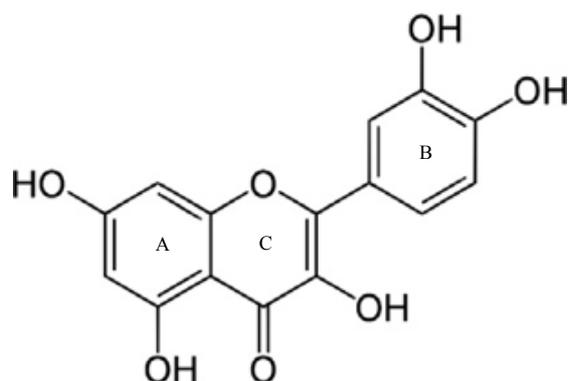
## 2.3 QUERCETINA

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com a concentração de um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação deste substrato. A aplicação tópica ou oral de antioxidantes representa uma estratégia interessante de proteção cutânea para manutenção do balanço redox celular, representando uma estratégia bem-sucedida não enzimática para prevenir, reparar e reduzir a gravidade dos efeitos deletérios relacionados ao estresse oxidativo gerados pelas espécies reativas (EROs), como sequestro de metais pesados, a interceptação das espécies pró-oxidantes iniciais, reparo de macromoléculas e renovação celular (GUARATINI et al., 2007; SOUZA & CAMPOS, 2017).

Os flavonoides (flavonas, flavonóis, isoflavonas, catequinas, flavanonas e chalconas) constituem uma importante classe de polifenóis presentes nos metabolitos secundários de vegetais que diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis e pela presença ou não de ligação dupla e carbonila. (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Apresentam núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono (C2-C3-C4). Nos últimos anos tem recebido muita atenção devido aos vários efeitos benéficos, responsáveis por retardar o dano oxidativo e a morte celular, eliminação de EROs, inibição da peroxidação lipídica, quelação de íons metálicos e modulação da resposta antioxidante celular (KANTER et al., 2012; EMBUSCADO, 2015; COSTA & SANTOS, 2017).

A quercetina (3,5,7,30,40-penta-hidroxi-flavona) apresenta-se como um pó amarelo-alaranjado com peso molecular de cerca de 302.238g/mol, representa cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos encontrado principalmente na forma de glicosídeo em uma ampla variedade de alimentos, como a cebola, uvas, maçã, cereja, frutas cítricas, brócolis e alcaparras. (WU et. al, 2015; HAO et al., 2017). Entre os flavonoides, é o mais comum na natureza e apresenta maior atividade antioxidante, além da capacidade em reduzir os efeitos nocivos da irradiação UV, atribuído à inibição de enzimas chave da sinalização, como por exemplo, proteína quinase C, tirosina quinase e fosfoinositídeo 3-quinase (CASAGRANDE et al., 2006; VICENTINI et al., 2011; HATAHET et al., 2016, PIVETTA et al, 2019).

FIGURA 3 - Estrutura básica da quercetina (BEHLING et al, 2004)



As propriedades biológicas dos flavonoides estão estritamente relacionadas à sua estrutura química. Os flavonoides podem ser subdivididos em diferentes subgrupos, dependendo do carbono do anel C no qual o anel B está ligado e do grau de insaturação e oxidação do anel C (Figura 3). A quercetina apresenta dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel (C) e cinco grupos hidroxilas. No anel B, encontra-se o grupo catecol o qual proporciona a formação de radicais fenoxil mais estáveis após a doação do átomo de hidrogênio; a dupla ligação entre os C2 – C3 em conjugação com o grupo 4-carbonil presente no anel C, que permite o deslocamento de um elétron do radical fenoxil no anel B para o anel C; e além da presença do grupo 3-OH em combinação com a dupla ligação entre os C2 – C3, o que aumenta a estabilização por ressonância dos elétrons deslocados sobre a molécula (BEHLING et al, 2004; VICENTINI, 2009).

A atividade pró-oxidante dos flavonoides é diretamente proporcional ao número total de grupos hidroxilas. Hanasaki et al. (1994) demonstrou que mono e dihidroxi flavonoides não apresentam atividade pró-oxidante detectável, enquanto que múltiplos grupos hidroxila, especialmente presentes no anel B, aumentaram significativamente a produção de radicais hidroxil, responsável pelos efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos dos flavonoides. Assim, o mesmo atributo estrutural que aumenta a capacidade antioxidante pode também exacerbar o estresse oxidativo e os danos funcional e estrutural das moléculas celulares (BEHLING et al, 2004).

Concentrando-se nos efeitos da quercetina sobre a pele, um grande número de estudos indica sua aplicação tópica para redução do dano oxidativo cutâneo causado pelo aumento da formação de radicais livres e outras espécies reativas induzidas pela exposição solar, oxigênio singlete e radicais de diferentes origens (PALECO et al., 2014). Em um estudo comparativo de três flavonoides, catequina, quercetina e diosmetina, a quercetina demonstrou maior atividade anti-radical em relação a radicais hidroxila,

ânions peroxila e ânions superóxido, devido à presença de três grupos funcionais ativos em sua estrutura (MOREL et al., 1993). A expressão de metaloproteinase de matriz (MMPs), responsável por rugas e perda de elasticidade na pele, também foi observada reduzida pela quercetina nos níveis de RNAm e proteína (SIM et al., 2007). Estes fatos, juntamente com sua origem natural, tornam a quercetina um candidato para incorporação em formulações destinadas à administração tópica (BOSE et al., 2013).

A quercetina absorve radiação UV com absorbância máxima UVA ( $\lambda_{\text{Max}}$  365nm) e UVC ( $\lambda_{\text{Max}}$  256nm) sugerindo um mecanismo fotoprotetor pela absorção direta da radiação UV, impedindo a formação de EROs e o dano direto ao DNA. O mecanismo envolve principalmente a capacidade dos flavonoides em eliminar os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, devido à presença de grupos hidroxil fenólicos (FAHLMAN & KROL, 2009). Estudos anteriores a respeito das propriedades da fotoproteção da quercetina e seu glicosídeo, rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), mostraram que 10% de quercetina e rutina em cremes apresentaram valores de FPS *in vitro* semelhantes ao homosalato, um agente protetor solar sintético (CHOQUENET et al., 2008; SAEWAN & JIMTAISONG, 2013).

Apesar das amplas propriedades farmacológicas, a aplicação da quercetina é limitado devido a baixa solubilidade em água (0.17–7.7  $\mu\text{g/mL}$ ) (HATAHET et al., 2016). O coeficiente de partição é  $1,82 \pm 0,32$ , devido à presença de grupos não-polares em sua estrutura, o que pode dificultar sua biodisponibilidade e limita sua permeação na pele (VICENTINI et al., 2008; LIN et al., 2012; BOSE et al., 2013). Assim como outros flavonoides, a quercetina é fotossensível podendo ser degradada pela radiação UVA e formar produtos que podem exibir efeitos pró-apoptóticos (MAIANI, 2012). Pivetta e colaboradores (2019) desmontaram no teste de fototoxicidade de absorção de vermelho neutro 3T3 que a quercetina apresentou valores de MPE (mean photo effect – foto efeito médio) 0,284 e 0,324 indicando ser uma substância fototóxica (OECD, 2004). Esta é uma desvantagem, especialmente para uso tópico em fotoprotetores, uma vez que a degradação induzida pela luz pode reduzir seu poder de proteção contra os danos fotoxidativos (SCALIA & MEZZENA, 2009).

No entanto, Pool e colaboradores (2012) avaliaram nanopátulas poliméricas de quercetina e catequina, demonstrando que flavonoides em nanopartículas estão protegidas do oxigênio molecular que pode ser produzido durante o processo de armazenamento, apresentando-se como um novo sistema para a proteção e entrega de uma gama de produtos químicos hidrofóbicos (CHEN-YU et al, 2012).

## 2.4 CARREADORES LIPIDICOS NANOESTRUTURADOS

A nanociência corresponde ao estudo dos fenômenos naturais que regem o comportamento de átomos, moléculas e estruturas com tamanho de partícula no intervalo de 1 a 100nm, mas para propósitos de administração de substâncias ativas, as nanopartículas na faixa de 50 – 500nm são aceitáveis dependendo da via de administração (UCHECHI et al, 2014). Um nanômetro é um bilionésimo de um metro e as propriedades dos materiais neste nível atômico diferem significativamente das propriedades dos mesmos materiais nas dimensões normais. Essas propriedades novas ou alteradas podem afetar o desempenho, a qualidade, a segurança e/ou a eficácia e, recentemente, a atenção tem sido voltada para sua aplicação farmacêutica, especialmente na área cosmética (NAFISI & MAIBACH, 2017).

No segmento cosmético a nanotecnologia tem encontrado inúmeras aplicações. Nanocosmético pode ser definido como sendo uma formulação cosmética que veicula substâncias ativas ou demais componentes nanoestruturados e que apresenta propriedades superiores quanto a sua performance em comparação com produtos convencionais. Internacionalmente a empresa pioneira a introduzir um cosmético com base nanotecnológica foi a L'Oréal em 1995, com o lançamento de um creme constituído por nanocápsulas de vitamina E para combater o envelhecimento da pele (FRONZA et al, 2007). No Brasil, a primeira empresa a desenvolver e colocar no mercado um nanocosmético foi O Boticário, com o “Nano Sérum” uma formulação antienvelhecimento para área dos olhos contendo vitamina A, C e K e substância para despigmentação da pele (SOUZA, 2016).

As nanopartículas são utilizadas como carreadores de substâncias ativas em formulações cosmético com o intuito de transportar compostos hidrofóbicos e lipofílicos, aumentar a penetração cutânea de moléculas, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade, melhorar estabilidade física e química (SOUTO & MÜLLER, 2007; UCHECHI et al, 2014). Além disso, apresentam propriedades adesivas e oclusivas que criam uma película protetora promovendo o controle da perda de água transepidérmica (TEWL) e permitem a manutenção adequada da hidratação. (PARDEIKE et al., 2009; ZIELINSKA & NOWAK, 2016). Por esta razão, podem ser utilizados com sucesso na indústria cosmética, em cosméticos coloridos melhorando a uniformidade das preparações com cor, em perfumes prolongando a liberação de fragrâncias, e produtos com filtros UV (NESSEEM, 2011; ZIELINSKA & NOWAK, 2016)

Os lipídios são um grupo quimicamente diversificado de compostos com alta solubilidade em solventes não polares e baixa solubilidade em água e desempenham um papel importante na formação de elementos estruturais básicos, como membranas biológicas, vitaminas, hormônios, cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, além de fazerem parte da nossa dieta. Isso indica claramente que os lipídios são biocompatíveis e não tóxicos para o nosso corpo (CARVALHO et al., 2019).

A natureza química dos lipídios e sua concentração influenciam na incorporação das substâncias ativas e o tamanho das partículas. Geralmente são de natureza anfifílica e o ponto de fusão aumenta, normalmente, com o aumento do seu peso molecular (comprimento da cadeia de hidrocarbonetos) e diminui com a insaturação (a presença de ligações duplas) (MÜLLER et al, 2000; GARCÊS et al., 2018). Os lipídios de composição mais complexa, como as misturas de mono, di e triacilgliceróis e misturas de diferentes ácidos graxos formam cristais com muitas imperfeições, oferecendo mais espaço para acomodar as moléculas das substâncias ativas. Entretanto, triacilgliceróis constituídos por um tipo de ácido gordo originam estruturas organizadas com poucos locais para acomodar as moléculas das substâncias ativas, induzindo a sua expulsão da matriz lipídica sólida (ATTAMA et al, 2012). Entre os lipídios utilizados no desenvolvimento de nanopartículas encontram-se matérias-primas de origem natural, como a manteiga de Illipê e o óleo de Calêndula.

O óleo de calêndula é obtido através da extração das flores secas de *Calendula officinalis* L., nativas da região do Mediterrâneo é conhecida também por “mal-me-quer” ou “maravilha dos jardins” (MONTANARI JUNIOR, 2000; GAZIM et al., 2008). Entre os constituintes químicos potencialmente ativos da calêndula são citadas as saponinas, flavonoides, rutina carotenoides, mucilagens e resinas, fazendo dela uma boa fonte de antioxidantes naturais (RODRIGUES et al., 2004).

A manteiga de illipê, é uma gordura vegetal obtida a partir do caroço das sementes das árvores *Shorea stenoptera* encontradas nas florestas de Bornéu no sudeste asiático. Sua composição química e aplicação se assemelham à manteiga de cacau, como hidratantes labiais, sabão em barra e cremes, com cerca de 40 a 60% de ácidos graxos saturados, como o ácido esteárico (39-46%), ácido oleico (34-37%) e o ácido palmítico (18-21%) (GUNSTONE, 2011; BAHARI & AKOH, 2018). É oxidativamente estável e apresenta-se sólida à temperatura ambiente tendo ponto de fusão em torno de 34°-38°C. Essas características fazem com que a manteiga de illipê melhore a flexibilidade e elasticidade da pele, aumente a hidratação e apresente propriedades antioxidantes.

Entretanto, a sensação oleosa da manteiga é uma das suas principais desvantagens (RAHMAN et al., 2010).

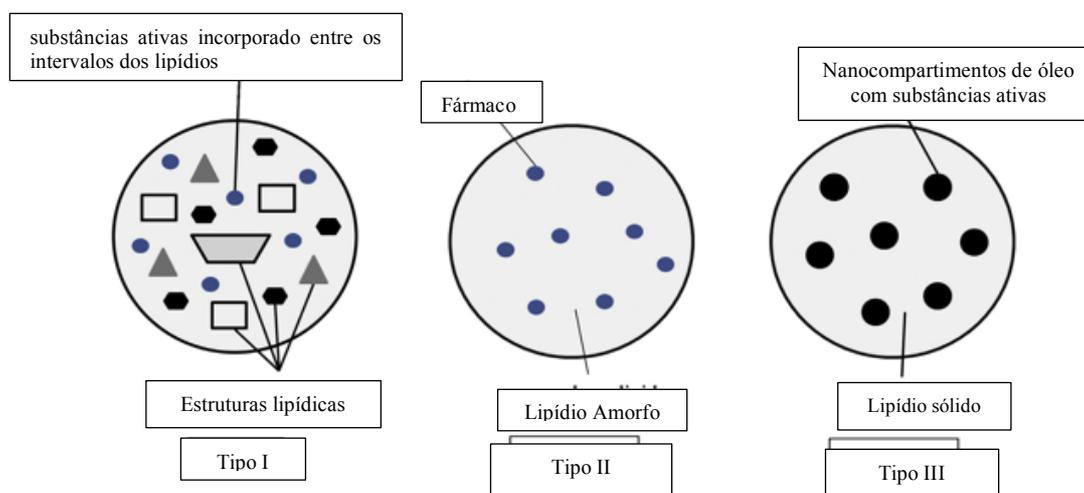
Dentre os carreadores lipídicos, os NLS (Nanopartícula lipídica sólida) são compostos de lipídios sólidos à temperatura ambiente e apresentam estrutura semelhante à das nanoemulsões, exceto que o lipídio líquido interno da nanoemulsão é substituído por um lipídeo sólido nas concentrações de 0,1% a 30%, dispersos em uma fase aquosa e estabilizados por um surfactante (0,5% a 5%) apresentando tamanho médio entre 20–500nm, o que permite uma distribuição sustentada do fármaco. (ZIELINSKA & NOWAK, 2016; LEMOS et al, 2018). São empregados principalmente em cosméticos, devido às suas vantagens que incluem a liberação controlada das substâncias ativas, melhora da estabilidade minimizando problemas relacionados às incorporações de substâncias ativas em formulações, facilidade de preparo, boa biocompatibilidade, menor citotoxicidade, menor uso de solventes orgânicos, alta hidratação da pele e capacidade de encapsular substâncias ativas hidrofílicas quanto lipofílicas. (NASERI et al, 2015; GARCÊS et al, 2018).

No entanto, as formulações NLSs apresentam muitas desvantagens, incluindo a estrutura cristalina que pode sofrer transição polimórfica, a vida útil curta, baixa eficiência de encapsulação, alto teor de água (70-99%) o que pode levar a vários problemas de estabilidade dos produtos finais, interações celulares e a possibilidade de expulsão das substâncias ativas durante o armazenamento (COSTA & SANTOS, 2017). Durante a preparação das NLSs, ocorre a fusão do lipídio, seguida pelo resfriamento da formulação. Ao iniciar o processo de solidificação, a viscosidade do lipídio fundido aumenta progressivamente, tornando-se mais difícil acomodar as moléculas lipídicas, o que origina cristais lipídicos com diferentes graus de organização tridimensional, isto é, com diferentes formas polimórficas. Parte das partículas cristalizam e formam estruturas tridimensionais de alta energia ( $\alpha$ ,  $\beta'$  ou  $\beta$ ). A forma  $\alpha$  (hexagonal) é a menos estável, com menor ponto de fusão e calor latente. A forma  $\beta$  (tricíclica) é a mais estável, com maior ponto de fusão e maior calor latente. Durante o armazenamento, as transformações podem ser de  $\alpha$  para  $\beta'$  (ortorrômbica) e desta para  $\beta$ , na qual o número de imperfeições na rede cristalina é menor e o espaço para acomodar a substância ativa é reduzido, o que leva à expulsão da substância ativa (PARDEIKE et al., 2009; MARCATO, 2009; GARCÊS et al., 2018). Como alternativa novas formas baseadas em lipídicos foram desenvolvidos, dentre elas os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs).

Desenvolvidos em 1999, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) fazem parte da segunda geração de nanopartículas lipídicas, para superar as imperfeições dos NLS, estes sistemas apresentam menor temperatura de fusão, pois com a adição de lipídeos líquidos na formulação resultam em um maior teor lipídico, frequentemente na proporção de 70:30 até 99.9:0.1, reduzindo consideravelmente o teor de água na formulação. Conseqüentemente, reduz o risco de expulsão do medicamento durante o armazenamento, permitem uma maior capacidade de carga do fármaco e um tamanho de partícula entre 100- 500nm. (MÜLLER et al., 2011; CZAJKOWSKA-KOSNIK et al., 2019).

Os CLNs dividem-se em três diferente estrutura, o primeiro modelo, conhecido como CLN imperfeito, consiste em uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos. Essa mistura aumenta a distância entre as cadeias dos lipídios ocasionando imperfeições na partícula, que geram mais espaço para acomodar o ativo, aumentando a eficiência do encapsulamento (MARCATO, 2009). O segundo modelo, chamado de CLN amorfo, é composto pela mistura de lipídeos sólidos com lipídeos líquidos (óleo) que permite minimizar a expulsão do ativo durante a estocagem, já que o processo de cristalização do lipídio da forma polimórfica  $\alpha$  para a forma polimórfica  $\beta$  não ocorre nessas condições. O terceiro modelo é chamado de múltiplo CLN, formado pela dispersão de alta quantidade de óleo em lipídio solido, na qual a solubilidade das moléculas de óleo no lipídeo solido é excedida levando a uma separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lipídica solida (UNER ET AL, 2007; MARCATO, 2009; NASERI et al, 2015).

Figura 4 - Diferentes tipos de CLNs (CZAJKOWSKA-KOSNIK et al. 2019)



Assim como os NLS, os CLNs podem aumentar a estabilidade de substâncias ativas sensíveis à luz, oxidação e hidrólise e permitindo a liberação controlada da

substância ativa, porém os CLNs têm sido descritos como sistemas eficientes para melhorar a hidratação da pele, devido ao tamanho nanométrico das partículas que proporciona um contato próximo ao estrato córneo (TICHOTA et al, 2014; CZAJKOWSKA-KOSNIK et al., 2019). Em geral, o desenvolvimento de formulações cosméticas contendo NLSs e CLNs são idênticas. Os produtos podem ser obtidos pela mistura das nanopartículas a formulações semi-sólidas existentes, adição como intensificadores de viscosidade à fase aquosa ou na produção direta de um produto final contendo apenas nanopartículas (PARDEIKE et al., 2009; CZAJKOWSKA-KOSNIK et al., 2019).

Souza & Campos (2017) sugeriram o uso cosmético de uma formulação de NLS para melhorar a função barreira da pele. Os autores observaram uma diminuição significativa da perda de água transepidermica (TEWL) e aumento do conteúdo de água do estrato córneo após 28 dias de aplicação da formulação. Em outro estudo, Tichota et al. (2014) desenvolveu uma dispersão de CLN usando óleo de argan e posteriormente foi incorporado em um gel para aplicação cutânea. Os estudos in vivo, em voluntários sadios, demonstraram que a formulação com nanopartículas melhorou a hidratação da pele após 30 dias de aplicação, sendo sugerida a existência de sinergismo entre as propriedades hidratantes do NLC e óleo de argan.

Huang e colaboradores (2017) encapsularam a quercetina e o óleo de linhaça em CLNs pela técnica de homogeneização a alta pressão. Adição de óleo de linhaça melhorou a atividade antioxidante in vitro dos CLNs carregados com quercetina e a liberação in vitro exibiu padrão sustentado, além de diminuir a oxidação lipídica. Resultados semelhantes foram relatados por Bose et al. (2013) e Chen-Yu et al. (2012), que demonstraram que tanto os sistemas NLS quanto CLN poderiam promover a penetração cutânea da quercetina, potencializando sua ação antioxidante e efeito anti-inflamatório. Portanto, os CLNs podem melhorar a solubilidade e estabilidade química dos compostos lipofílicos, melhorando a biodisponibilidade.

Em resumo, mesmo em formas nanoestruturadas a quercetina não apresenta evidências de liberação transdérmica na pele humana. Contudo, formas de nanodosagem foram capazes de aumentar a retenção da pele da quercetina através do efeito oclusivo e maior área superficial das partículas, dessa forma a quercetina exerça sua atividade de proteção contra o estresse oxidativo, fotoenvelhecimento e inflamação da pele (HATAHET et al., 2016).

## 2.5 DESENVOLVIMENTO E EFICÁCIA CLÍNICA DE COSMÉTICOS

Atualmente, os cosméticos apresentam-se em destaque no comércio, dentro da economia brasileira pode-se dizer que é um dos segmentos mais dinâmicos. Isso se deve à participação mais ativa e constante dos consumidores e por estar em evidência, tanto na mídia quanto nos lares das pessoas. Dentro da categoria de produtos para proteção solar, tem aumentado a procura por produtos com consistência leve e fácil de espalhar, mantendo a pele com textura seca e sem brilho (ABIHPEC, 2018).

Dentro dessa perspectiva, a escolha criteriosa das matérias-primas utilizadas durante o desenvolvimento de um fotoprotetor é fundamental, uma vez que determina como o produto final irá se apresentar, incluindo as suas características físicas, sensorial e efeitos clínicos. As três categorias principais de componentes exigidas nos protetores solares são filtros UV, emolientes e emulsificadores; componentes secundários como fotoestabilizadores, formadores de filme, e modificadores de sensorial. A escolha de cada componente deve ser realizada com base em pesquisas bibliográficas, a partir das quais é possível compreender as características físico-químicas e microbiológicas de cada ingrediente, concentrações de uso e incompatibilidades.

Ainda na etapa do desenvolvimento, a avaliação da estabilidade do cosmético tem como finalidade orientar seu desenvolvimento por meio da exposição dos produtos a condições que acelerem seu processo de degradação (ANVISA, 2012). Um dos métodos para acelerar possíveis instabilidades é submetê-lo ao estresse térmico por meio do armazenamento em temperaturas extremas e analisar alterações na cor, odor, uniformidade e pH.

Além disso, a avaliação do comportamento reológico tem uma importância fundamental no caso de fotoprotetores, pois a formação de um filme uniformemente distribuído é influenciada pelas propriedades de fluidez da formulação (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003). A reologia pode ser definida como o estudo do comportamento de fluxo e deformação da matéria. A relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento define o tipo de fluido apresentado, newtoniano ou não-newtoniano. Uma substância é pseudoelástica não newtoniana se o aumento da tensão de cisalhamento induzir um aumento desproporcional na taxa de cisalhamento. Com o aumento do gradiente de velocidade, a viscosidade diminui. No entanto, a baixas taxas de cisalhamento, a viscosidade de cisalhamento de uma substância pseudoplástica é constante. A diminuição subsequente da viscosidade pode ser explicada por mudanças

estruturais, como partículas de forma irregulares ou instabilidades na formulação (BRUMMER, 2006).

No entanto, a adição de filtros UV e substâncias ativas podem influenciar as características do produto final, porém não deve afetar o sensorial da formulação. Para que as formulações cosméticas sejam de fato eficazes e para continuidade da utilização do produto, é indispensável entender que essas características podem afetar a eficácia do produto e mudanças nas características da formulação podem afetar diretamente as propriedades sensoriais, aceitação e adesão pelos consumidores (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016; CALIXTO et al, 2018a). A avaliação da textura com o aparelho Texturômetro TA. XT plus é um método direto que permite analisar a influência dos componentes nas suas propriedades mecânicas, bem como comparar estes resultados com análises sensoriais (CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017). Através da análise do perfil de textura parâmetros como dureza, adesividade, elasticidade, firmeza, consistência, entre outros podem ser avaliados e relacionados com o sensorial e a reologia (GILBERT et al., 2013; VITORINO et al, 2013). A reologia e a análise de textura usadas em combinação podem ser úteis para melhorar a escolha de matérias-primas de formulações cosméticas. Dentro dessa perspectiva é importante entendermos se a motivação dos consumidores está estritamente relacionada com melhora da aparência e também à melhora da qualidade de vida e saúde da pele. Isto permite o desenvolvimento de formulações com sensorial diferenciado, que conseqüentemente favoreçam a continuidade da sua utilização.

Os testes sensoriais são altamente priorizados no desenvolvimento de cosméticos. Durante a fase inicial do desenvolvimento, testes descritivos são tipicamente empregados ou, testes de aceitação é frequentemente utilizado. As matérias-primas usadas em um produto e os processos de fabricação afetam as propriedades sensoriais táteis de um cosmético, permitindo que os atributos sensoriais sejam otimizados e que um perfil sensorial desejado seja alcançado (HUBER, 2017). Ao aplicar produtos cosméticos na pele, os consumidores têm uma série de expectativas que estão relacionadas as suas características sensoriais, como espessura, rigidez, efeitos da sua aplicação na pele, eficácia e também experiências emocionais (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016; CARNEVALE, 2017).

A segunda característica que vem se mostrando desejável em formulação fotoprotetoras é a presença de antioxidantes, já que essas substâncias tem a propriedade de trazer benefícios complementares contra os danos provocados pelos raios solares. A comprovação da eficácia destes produtos é de suma importância para o mercado

consumidor, que deseja ver concretizado o apelo de venda que o impulsiona para o ato da compra. A auto avaliação dos voluntários ou avaliação do examinador é muito subjetiva, necessitando de técnicas que podem ser mensuradas por um método objetivo, permitindo a detecção de mudanças na morfologia e função da pele que não detectadas na avaliação sensorial e que forneça informações mais precisas e reprodutíveis (GONÇALVES & MAIA CAMPOS, 2009; ABIHPEC, 2018).

Durante a última década, vários dispositivos instrumentais destinados à medição in vivo da anatomia e fisiologia da pele tornaram-se comercialmente disponíveis. Devido à sua abordagem não invasiva, essas técnicas fornecem informações referentes a diferentes locais do corpo, sem influenciar nos efeitos do cosmético. Os mesmos locais da pele podem ser estudados simultaneamente por diferentes técnicas, cada uma avaliando vários aspectos do produto cosmético (DE MELO & MAIA CAMPOS, 2016a). Assim, as técnicas de biofísica e análise de imagem da pele têm sido amplamente empregadas para avaliação dos efeitos desses cuidados e processos na pele ao longo do tempo, baseadas na medida das diferentes propriedades físicas da pele, como transporte de água, capacitância elétrica, as propriedades mecânicas da pele (viscoelasticidade), além das técnicas de imagem que utilizam câmeras que possuem luzes de diferentes comprimentos de onda para obtenção de imagens macro e microscópicas, como a avaliação do microrelevo cutâneo e a ultrassonografia de alta frequência para avaliação da pele.

Contudo, a pesquisa clínica é uma área de atuação relativamente nova no Brasil, com crescente interesse, tanto por pesquisadores inseridos nas instituições acadêmicas como pela iniciativa privada, principalmente das indústrias farmacêuticas. (ACCETTURI & LOUSANA, 2002). No Brasil, o Conselho Nacional de Saúde (CONEP) é responsável pela regulamentação das pesquisas envolvendo seres humanos através da RDC nº 466, de 12 de dezembro de 2012, baseando-se em documentos internacionais, em especial a Declaração de Helsinque, e nacionais, entre elas a Constituição Federal do Brasil. Assim, o objetivo é garantir o respeito à pessoa, não só o sujeito da pesquisa, mas o pesquisador e a sociedade como um todo. Por fim, todas as metodologias descritas são essenciais para garantir que o produto em desenvolvimento atinja todas as características descritas nas regulações nacionais e que ele também esteja de acordo com a expectativa dos consumidores ao comprar um produto.

## 2.6 TÉCNICAS DE BIOFÍSICA E ANÁLISE DE IMAGEM DA PELE

A grande variedade de equipamentos e tecnologias descobertos e desenvolvidos nas últimas décadas apresentam uma contribuição significativa na dermatologia e apresentam potencial para o desenvolvimento de pesquisas para o estudo da biologia da pele e desenvolvimento de dermocosméticos, baseado em um entendimento robusto da fisiologia cutânea, suas variações e suas respostas aos tratamentos, a fatores intrínsecos e aos mais diferentes estímulos ambientais (DE MELO & CAMPOS, 2016b). As técnicas de biofísica e de análise de imagem são técnicas não invasivas que permitem avaliar as condições da pele, e os efeitos de produtos cosméticos nas reais condições de uso, de forma totalmente não invasiva, em tempo real. Dentre elas, a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, da perda transepidérmica de água, avaliação por imagens da capacitância da pele, propriedades mecânicas (viscoelasticidade), conteúdo de melanina e eritema na pele, propriedades morfológicas e estruturais da epiderme, ecogenicidade da derme, entre outras.

O conteúdo de água e a proteção da sua função de barreira são fatores essenciais para a saúde e a manutenção da aparência da pele. Fatores ambientais, como tempo seco, exposição ao vento, temperaturas baixas e doenças são condições que afetam diretamente a pele. A parte da pele mais afetada nesses casos é a camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, composto por 15 a 20 camadas de corneócitos com espessura total de 6 a 20  $\mu\text{m}$ . Como a epiderme é continuamente renovada a partir da camada granular e os corneócitos mais externos descamam gradualmente na superfície. Essa estrutura combinada com a grande capacidade de retenção de água resultado de fatores naturais de hidratação e uma bicamada lipídica intracelular, que, quando estão funcionando em harmonia, garantem a integridade e a hidratação da pele. A análise da função barreira da pele é importante para avaliar os efeitos de formulações aplicadas na pele (XHAUFLAIRE-UHODA & PIÉRARD, 2009; CLARYS & BAREL, 2017)

As propriedades elétricas da pele dependem do teor de água do estrato córneo da epiderme. Dentre os métodos utilizados para avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo, o método da capacitância é o mais utilizado, pois utiliza corrente de baixa frequência e é pouco afetado pela temperatura e umidade relativas (DAL'BELO et al, 2006). Dentre os equipamentos utilizados, o Corneometer® (Courage & Khazaka, Alemanha) ganhou aceitação mundial por ser um equipamento eficiente para medir a variação do conteúdo de água do estrato córneo, utilizando uma corrente de baixa

frequência, sendo pouco afetado pela temperatura e umidade relativa do ambiente. O princípio da capacitância trabalha de acordo com a corrente dielétrica da água, capaz de medir uma profundidade entre 10-20  $\mu\text{m}$  do estrato córneo e sua sonda exerce uma pressão constante na superfície cutânea de 3,5N, e cobre uma área de 49  $\text{mm}^2$ . Nele, uma lâmina de vidro separa duas placas metálicas da pele e quando aplicada sobre a superfície cutânea, é formado um campo elétrico, sendo que uma das placas fica com carga positiva e outra, negativa, possibilitando assim, medir a constante dielétrica de água que é convertida em unidades arbitrárias, o conteúdo aquoso do estrato córneo (CLARYS & BAREL, 2017; DE MELO & MAIA CAMPOS, 2018).

A análise da função de barreira da pele é importante para avaliar os efeitos da formulação tópica. Essa característica garante proteção contra a desidratação e os fatores ambientais. O movimento normal de água do estrato córneo para atmosfera é chamado de perda de água transepidermica (TEWL). Por meio do equipamento Tewamater®, o gradiente de evaporação é medido por uma sonda que é colocada perpendicularmente na região de estudo da pele. A sonda é composta por um cilindro aberto com dois sensores, um de temperatura e outro de umidade, permitindo a obtenção do valor da perda de água em g/h.m. A diferença entre a pressão de vapor nos dois sensores é diretamente relacionada à taxa de evaporação, de forma que quanto maior o valor medido, menor a integridade da barreira (DAL'BELO et al, 2006; DE MELO & CAMPOS, 2016a; CLARYS & BAREL, 2017).

Além dos métodos que permitem a investigação de camadas internas da pele com resoluções variando da dimensão celular para a dimensão tecidual, nos últimos anos um novo equipamento tem dedicado apenas à imagem da superfície da pele sob o título de MoistureMap®. Este novo método, iniciado por Lévêque e Querleux, baseia-se em medições eletrométricas ajustadas das propriedades da superfície da pele que permite visualizar a capacitância da superfície da pele correspondente à hidratação da superfície da pele de maneira não invasiva. Quando a placa de medição é posicionada na superfície da pele, são produzidas imagens correspondentes ao mapa de hidratação da pele. Essas imagens são codificadas em 256 níveis de cinza, com pixels mais escuros representando alta capacitância e os claros os valores mais baixos de capacitância. O nível médio de cinza (MeanGL) dos histogramas da imagem permite medir a hidratação média da superfície da pele (LÉVÊQUE et al, 2006; XHAUFLAIRE-UHODA & PIÉRARD, 2009; CLARYS & BAREL, 2017).

As propriedades mecânicas da pele são de grande importância para sua função protetora. Ela varia de acordo com a idade, sexo e local do corpo, condições fisiológicas e patológicas da pele. Através de dispositivos modernos de bioengenharia, funções mecânicas da pele são fornecidas aos pesquisadores medidas objetivas, quantitativas, sensíveis e reprodutíveis. O equipamento Cutometer® (Courage Khazaka, Alemanha), por meio da pressão negativa exercida pelo equipamento, a pele é succionada para a abertura na sonda. No interior da sonda, a medida de penetração da pele é determinada por medição ótica por um sistema que consiste de uma fonte de luz e um receptor, e por dois prismas voltados um para o outro, que projetam a luz do transmissor ao receptor (DOBREV, 2014).

A unidade principal contém uma bomba de vácuo com sensor de pressão. A carga do vácuo (pressão negativa do ar), a taxa de aumento ou diminuição, duração da sucção (tempo) e relaxamento, e o número de ciclos de medição durante uma avaliação podem ser definidos no software do Cutometer®, fornecendo resultados quantitativos de acordo com o perfil de distensão e retorno da pele de diversos parâmetros relacionados à viscoelasticidade e firmeza da pele. As sondas de medição apresentam diferentes aberturas que variam de 2 a 8mm de diâmetro. As menores aberturas menores (2-4 mm) são usadas para avaliar as camadas superiores da epiderme, chegando a avaliar a derme papilar, enquanto que a maior abertura (8 mm) permite a avaliação de camadas mais profundas da pele (DOBREV, 2000; DOBREV, 2014).

A superfície da pele é caracterizada por um microrrelevo especial que representa a organização da derme e do tecido subcutâneo tridimensional. Pelo fato de a superfície da pele não apresentar aspecto homogêneo, sendo variável, dependendo do local a ser analisado, as linhas primárias do microrrelevo e as rugas finas representam uma organização especial de feixes de colágeno na derme superficial e há uma relação entre as propriedades mecânicas da pele e seu aspecto no microrrelevo (FERREIRA et al, 2010). Para quantificação dessas alterações, é utilizado o equipamento Visioscan VC98® (Courage & Khazaka, Alemanha), que é uma câmera de vídeo especial de alta resolução UVA na faixa de 380 a 395 nm com um pico de 387nm, desenvolvida para estudar diretamente a superfície da pele, permitindo a avaliação quantitativa e qualitativa sob condições fisiológicas (DE MELO & MAIA CAMPOS, 2018). A distribuição do nível de cinza da imagem é usada para avaliar os parâmetros SELS (Surface evaluation of the Living Skin) como maciez (SESM), rugosidade (SER), aspereza e descamação da pele

(SESC), entre outros (PIÉRARD et al., 2015; FOSSA SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2017).

A pigmentação pode ser quantificada medindo a intensidade de luz refletida da pele em comprimentos de onda específicos e através de padrões conhecidos de absorção de luz de pigmentos, como melanina, hemoglobina, bilirrubina e caroteno (MARTINE et al, 2017). A quantificação de alterações de cor induzidas experimentalmente é um método amplamente utilizada na pesquisa dermatocósmica, pois a resposta de cor pode ser usada como um indicador das propriedades da pele (integridade da barreira e sensibilidade da pele), propriedades da substância ativa (vasodilatação, biodisponibilidade), propriedades do veículo (formulações intensificadoras) e propriedades de proteção da pele (filtros solares). Vários instrumentos estão disponíveis, entre eles o Mexameter® MX 18, no qual 16 diodos emissores de luz dispostos circularmente emitem luz em três comprimentos de onda definidos: 568 nm (verde), 660 nm (vermelho) e 880 nm (infravermelho). Um fotodetector mede a luz refletida pela pele, o princípio óptico é baseado na medição da luz absorvida e refletida nos comprimentos de onda verde e no vermelho para hemoglobina e vermelho e infravermelho para a melanina. A área de medição da pele tem 5mm de diâmetro (superfície 0,20 cm<sup>2</sup>), a sonda é aplicada na superfície da pele com pressão constante usando uma mola de 91 g/cm<sup>2</sup>. O índice de melanina é calculado a partir da intensidade da luz absorvida e refletida em 660 e 880nm respectivamente. Já o índice de eritema é calculado a partir da intensidade da luz absorvida e refletida em 560 e 660nm. Cada índice aumenta à medida que a pele se torna mais eritematosa ou mais pigmentada (CLARYS et al., 2000; JUNKER et al., 2014).

A ultrassonografia tem sido usada na medicina por mais de 50 anos, é uma das ferramentas de diagnóstico mais frequentemente aplicadas, por ser um método não invasivo que permite uma avaliação *in vivo* dos aspectos fisiológicos e patológicos da pele. Alexander e Miller demonstraram em 1979 a utilização de um equipamento unidimensional de 15 MHz (A scan) que media a espessura da pele com precisão semelhante à técnica radiológica, método não invasivo mais preciso até o momento (CRISAN, et al., 2012; BAGATIN et al, 2013).

O ultrassom de alta frequência permite a identificação de variações na espessura da pele e na ecogenicidade. As alterações da matriz extracelular, consistindo em variações na densidade dérmica e ecogenicidade ao longo do processo fisiológico de envelhecimento, cicatrizes, celulite, fotoenvelhecimento, feridas, entre outros podem ser

facilmente identificadas com o uso do ultrassom de alta frequência (CRISAN, et al., 2012).

O equipamento DermaScan C (Cortex Technology, Dinamarca) é constituído de um ultrassom de 20 MHz (alta frequência) bidimensional (B-Scan), com um transdutor de foco utilizado para obter imagens transversais bidimensionais que são mostradas no software específico do instrumento (DE MELO & CAMPOS, 2016b). A onda ultrassónica é parcialmente refletida pelas estruturas da pele, resultando em ecos de amplitudes diferentes, que é visualizada como uma imagem bidimensional. A escala de cores são: branco>vermelho>amarelo>verde>azul>preto. As imagens são apresentadas com uma escala numérica que varia de 0 a 255. Nesta escala, a área de pixel de baixa ecogenicidade corresponde a 50-150, e os pixels de alta ecogenicidade no intervalo de 200-255 (GNIADOCKA et al.,1994; CRISAN, et al., 2012; BAGATIN et al, 2013).

A ecogenicidade pode ser avaliada pelo seu valor absoluto ou pela razão da ecogenicidade, calculada pela razão entre os pixels de baixa ecogenicidade e o número de pixels totais. Em uma imagem cutânea normal, a ecogenicidade epidérmica aparece como uma banda branca, a derme é expressa como uma composição de duas cores: amarelo e/ou vermelho, e a camada subcutânea aparece verde ou preto. Normalmente, a velocidade do ultrassom na pele humana é reduzida quando o teor de água é maior, e aumentada com aumento da concentração de colágeno (CRISAN, et al., 2012 BAGATIN et al, 2013; SOUZA & CAMPOS, 2017).

### 3. OBJETIVO

---

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar a eficácia clínica de formulações fotoprotetoras contendo quercetina nanoencapsulada em Carreadores Lipídios Nanoestruturados (CLNs) na redução das alterações cutâneas decorrentes do fotoenvelhecimento.

*Objetivos Específicos:*

- *Desenvolver e caracterizar formulações fotoprotetoras contendo ou não antioxidantes nanoencapsulandos;*
- *Avaliar a estabilidade preliminar das formulações;*
- *Caracterizar suas propriedades físico- mecânicas e correlacionar com as propriedades sensoriais;*
- *Determinar o FPS in vivo do protetor solar;*
- *Avaliar a eficácia clinica das formulações utilizando técnicas de biofísica e análise de imagem da pele;*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

## 4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas descritas, a seguir, estão de acordo com o INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) e quando necessário também estão descritos os nomes comerciais e o fornecedor/fabricante.

- Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer (Permulen TR-2<sup>®</sup>) - Lubrizol do Brasil Aditivos Ltda-São Paulo, SP, Brasil;
- Água destilada e deionizada;
- Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (Aristoflex AVC<sup>®</sup>) – Clariant Personal Care;
- Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate (Nikkomulse<sup>®</sup> 41) - Nikkol Chemicals Co. Ltd, Japan;
- Álcool etílico absoluto (Synth)
- Benzyl alcohol (and) Xylitol (and) Caprylic acid, (Hebeatol BA<sup>®</sup>) - Chemyunion, Sorocaba-SP, Brasil;
- Bis-Etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (Bemotrinizol), (Tinosorb S<sup>®</sup>) BASF Personal Care (Monheim, Germany);
- Butilhidroxitolueno, (BHT) - Mapric, Brasil, SP;
- Butilenglycol (Butilenoglicol) - Mapric, Brasil, SP
- Calendula Officinalis Flower Extract, Helianthus Annuus Seed Oil, (Óleo de Calêndula), Derma Clean;
- Caprylic/Capric triglyceride, (Crodamol GTCC<sup>®</sup>) – Croda do Brasil Ltd (Campinas, SP);
- C12-15 Alkyl benzoate, (Crodamol AB<sup>®</sup>) - Croda do Brasil Ltd (Campinas, SP);
- Corn Starch Modified, Amido,
- Cyclopentasiloxane, (DC245<sup>®</sup>) - Dow Corning;
- Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer, (DC 9040<sup>®</sup>) - DowCorning;
- Dimethicone, (Xiameter PMX-200D<sup>®</sup>) - Dow Corning;
- Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl benzoate, (Univul<sup>®</sup> A Plus) - BASF Personal Care (Monheim, Germany);
- Dissodium EDTA, (EDTA Dissódico) - Mapric, Brasil, SP;
- Ethylhexyl triazone (Uvinul<sup>®</sup> T150), BASF Personal Care (Monheim, Germany);

- Glycerin, (Glicerina) - Mapric, Brasil, SP
- KCl 1mM (1:39)
- Methylene Bisbenzotriazolyl, Tetramethylbutylphenol Water, Decyl Glucoside,
- Propylene Glycol, Xanthan gum; Tinosorb M<sup>®</sup>, BASF;
- Paraffinum Liquidum (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol, (Base líquida) - Croda do Brasil Ltda (Campinas, SP);
- Polyglyceryl-6 Distearate (and) Jojoba Esters (and) Polyglyceryl-3 Beeswax (and) Cetyl Alcohol, Emullium Mellifera<sup>®</sup>, Gattefossé, France;
- Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer, Pluronic F68, Sigma-Aldrich;
- Propylene Glycol (Propilenoglicol) – Mapric, Brasil, SP;
- Silica, MSS-500W<sup>®</sup> - Kobo Brasil Ltda., SP;
- Shorea Stenoptera Seed Butter, Manteiga de Illípe, Polytechno Indústrias Químicas Ltda
- 2-(3,4-Dihydroxyphenyl) -3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one dihydrate, 3,3',4',5,7 Pentahydroxyflavone dihydrate, (Quercetina) – Sigma, Aldrich;

#### **4.2 Equipamentos e Acessórios**

- Agitador mecânico, Heidolph<sup>®</sup>, RZR 2021;
- Agitador Mecânico 713D, Fisatom;
- Balança de precisão eletrônica Marte, modelo AS 2000C;
- Balança analítica eletrônica Ohaus, modelo AS200S;
- Balança Analítica Mettler Toledo modelo AL-204
- Bisnagas de PVC opacas com capacidade para 30 gramas;
- Centrífuga Centribio modelo 802B, 4000 RPM, frequência 60 Hz;
- Centrífuga Excelsa Baby II modelo 206-R;
- Chapa de aquecimento;
- Corneometer CM, Courage & Khazaka, Alemanha;
- Cutometer dual MPA 580, Courage & Khazaka, Alemanha;
- Dermascan C, ultrassom de 20 MHz, Cortex Technology, Dinamarca;
- Detector ultravioleta de eritema-efetivo PMA 2103LLG, Solar Light Company, Philadelphia, EUA;
- Estufa termostatizada com controle de umidade e fotoperíodo, modelo II FC de

45°C, Eletrolab;

- Mexameter<sup>®</sup> MX16, Courage & Khazaka Electronic GmbH, Alemanha
- MoistureMap<sup>®</sup> MM 100, Courage & Khazaka Electronic GmbH, Alemanha
- Peagâmetro, Digimed<sup>®</sup>, modelo DM 20
- Pipeta 10-100µL Gilson, modelo Microman M100;
- Radiômetro Solar Light PMA2100;
- Reômetro modelo DV-III (tipo Cone & Placa), marca Brookfield, acoplado ao software Rheocalc, versão V1.01, Brookfield e spindle CP 52;
- Simuladores solares Multiport 601, Solar Light Co, equipado com lâmpada de arco de xenônio, filtros Schott WG320 e UG11
- Sistema purificador de água Osmose reversa OS10LX com deionizador Gehaka;
- Sonicador de ponta (Sonics VCX, ponta de 13 mm e amplitude de 40%)
- Termômetro;
- Texturômetro TA. XT plus (Stable Microsystems, Reino Unido)
- Tewameter R TM 210, Courage & Khazaka Electronic GmbH, Alemanha;
- Vidrarias em geral
- Visioface 100D, Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha;
- Visioscan<sup>®</sup> VC 98, Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha.
- Zetasizer, da Malvern (série NanoZS), Malven Instruments Limited, Worces, Inglaterra.

### **4.3 PREPARAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)**

Para preparação das CLNs, com ou sem quercetina, foi desenvolvida uma emulsão a quente seguida de sonicação, previamente padronizada por PIVETTA et al (2018). A fase oleosa contendo manteiga Illipe 1% e óleo de Calêndula e a fase aquosa contendo Pluronic F68 (1% p/v) foram aquecidas separadamente a 50°C. Depois, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, na mesma temperatura e adicionada a quercetina. A dispersão foi sonicada durante 10 minutos com um sonicador de ponta (Sonics VCX, ponta de 13 mm e amplitude de 40%). Os CLNs foram formados após resfriamento da dispersão até 25°C. Os CLNs sem a quercetina foram preparados seguindo o mesmo procedimento, mas sem adição da quercetina na fase oleosa.

#### **4.3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS CLNs**

Os CLNs desenvolvidos, contendo ou não quercetina, foram caracterizados quanto ao diâmetro médio das partículas, carga superficial das nanopartículas (potencial zeta) e índice de polidispersividade (Pdl), através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS), também chamada de Espectroscopia de Correlação de Fótons (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), utilizando o aparelho NanoSize ZS90 (Malvern, UK). Todas as medidas foram feitas com amostras diluída em solução de KCl 1mM 24horas após o preparo (GASPARI et al., 2014; PIVETTA et al., 2018).

#### **4.3.2. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

Para avaliar a eficiência de encapsulamento foi utilizado uma metodologia de espectroscopia UV-VIS validada anteriormente a partir de uma curva de calibração de quercetina a 373 nm, de acordo com a Resolução nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira. A quercetina encapsulada foi avaliada por um método indireto após centrifugação a 5000xg dos CLNs utilizando o sistema de filtragem Microcon com ultrafiltração membrana com limite de massa molar de 10.000 g / mol (Millipore) (MARCATO et al., 2011). A eficiência de encapsulação (EE%) da quercetina foi determinada de acordo com a seguinte Equação 1:

$$EE (\%) = \frac{Q_t - Q_n}{Q_t} \times 100$$

Onde,  $Q_t$  é a quantidade total de quercetina adicionada aos CLNs durante a preparação e  $Q_n$  é a quantidade total de quercetina não encapsulada (solúvel e insolúvel

na fase aquosa) todas as medições foram feitas em triplicado preparado nas mesmas condições de ensaio (BRASIL, 2003; GASPARI et al., 2014; PIVETTA et al., 2018).

#### 4.4. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Foram desenvolvidas emulsões do tipo O/A conforme Tabela 2 pelo método de inversão de fases. A escolha das matérias-primas as quais serão referidas no texto pela nomenclatura INCI) foi feita com base em um levantamento técnico envolvendo ingredientes mais usados em formulações fotoprotetoras e compatíveis com o nanocarreador. Assim foram considerados: a interação química entre as matérias-primas, a capacidade do sistema emulsionante, a faixa de pH compatível com a pele e com os nanocarreadores, visando a maior estabilidade da formulação fotoprotetora final e das características sensoriais, uma vez que pode influenciar na rotina do consumidor mesmo sabendo dos benefícios do produto.

Os filtros UV Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato (Univul A Plus<sup>®</sup>), Metileno Bisbenzotriazolil Tetrametilbutilfenol Água, Decil Glucosídeo, Propilenoglicol, Xantana A goma (Tinosorb M<sup>®</sup>), Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina (Tinosorb S<sup>®</sup>) e Etilhexil Triazona (Univul T150<sup>®</sup>) foram selecionadas considerando-se o valor do Fator de Proteção Solar (FPS) de 30+, previamente estimado utilizando o *Sunscreen Simulator on-line* (BASF) .

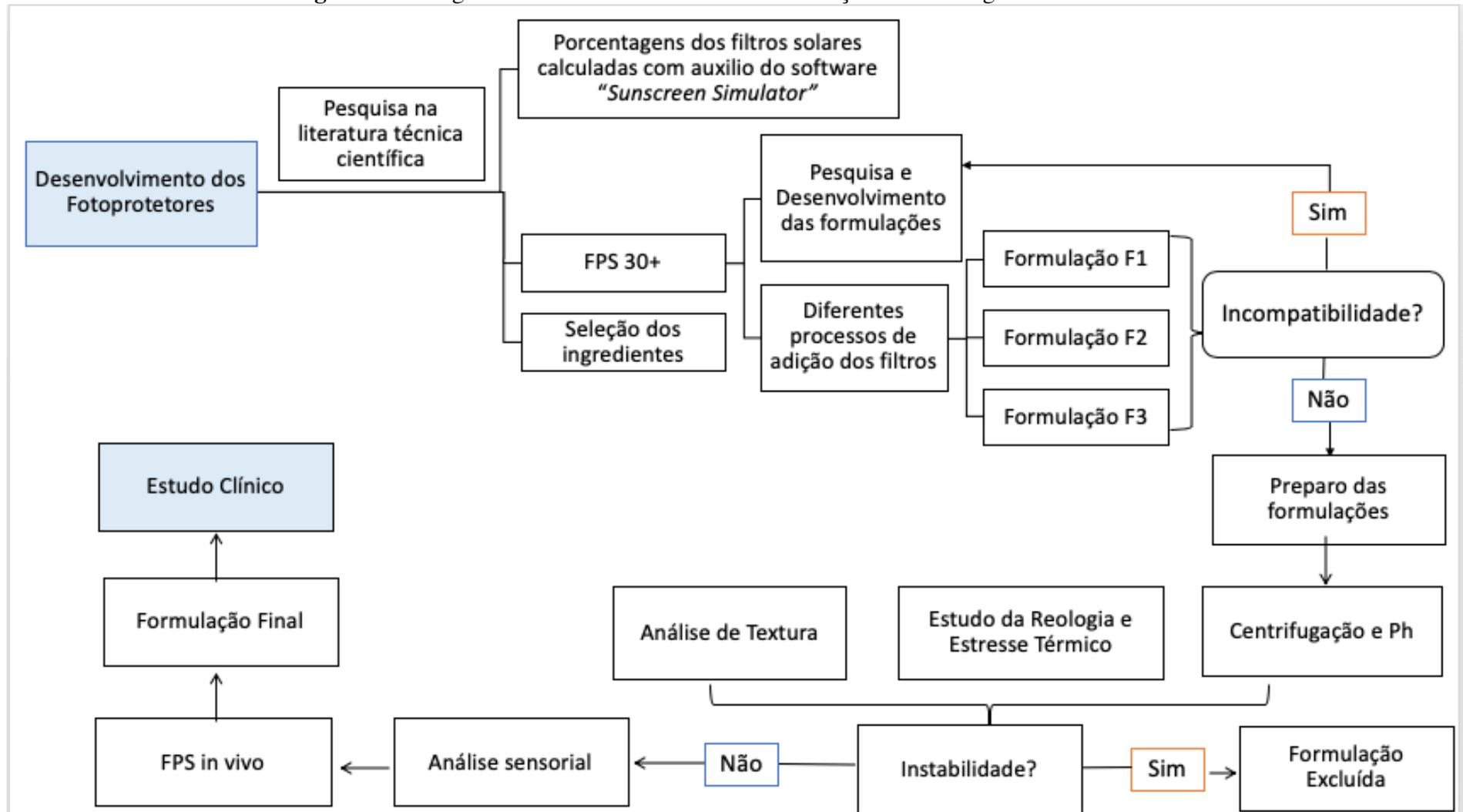
O fluxograma a seguir (Figura 6), representa o processo do desenvolvimento das formulações de estudo e as fases seguintes do projeto. Considerando que o modo de preparo da formulação pode influenciar nas características físicas, foram avaliadas diferentes maneiras de preparo levando-se em consideração a adição dos filtros.

Desta maneira, na formulação F1 e F2 os filtros solares foram dispersos diretamente na fase oleosa. Cada fase da emulsão foi aquecida separadamente, até a temperatura de 75°C. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob constante agitação à 950 rpm (101xg) por 30 minutos e, posteriormente à 1200 rpm (161xg) por 30 min para incorporação do restante dos componentes da formulação. Como agente modificador de sensorial, na formulação F1 foram utilizados o Corn Starch Modified e o Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer. Já a formulação F2 foi utilizado o Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer e o Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer.

Para o desenvolvimento da formulação F3, os filtros solares foram dispersos em base de absorção de lanolina (Paraffinum Liquidum (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol) imediatamente após a emulsificação (GIANETI, 2013). Cada fase foi aquecida separadamente até atingirem temperatura de 75°C. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob constante agitação à 950 rpm (101xg) por 30 minutos e, posteriormente à 1200 rpm (161xg) por 30 min para incorporação do restante dos componentes da formulação. Como agente modificador de sensorial, foram utilizados a Silica Mss-500W e o Acrrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer.

A quercetina livre (QT) e os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), contendo ou não quercetina, preparado 24 horas antes, foram incorporados ao final do processo de desenvolvimento, após adequada solubilização das matérias-primas à temperatura de 25°C, substituindo 10% da fase aquosa por 10% da dispersão do CLN (2.5ml) ou QT (2.5ml), obtendo as formulações VE (filtro solar, sem adição de quercetina e nanocarreador); CLN (filtro solar com carreadores lipídicos nanoestruturados de quercetina), QT (Veículo com quercetina dispersa) e CLN VZ (filtro solar com carreadores lipídicos nanoestruturados sem quercetina). A concentração final de quercetina nas formulações foi de 0,06% (p/p).

**Figura 5.** Fluxograma do desenvolvimento das formulações e fases seguintes do estudo



**Tabela 2.** Composição (%) das formulações desenvolvidas sem a adição das substâncias ativas (veículo)

Nome Comercial	INCI name	F1	F2	F3
Emullium Mellifera	Polyglyceryl-6 Distearate (and) Jojoba Esters (and) Polyglyceryl-3 Beeswax (and) Cetyl Alcohol	3	3	3
Crodamol GTCC	Caprylic/Capric Triglyceride	3	5	5
Crodamol AB	C12-15 Alkyl Benzoate	5	4	4
Tinsorb S	Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	8	8	8
Univul A Plus	Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate	6	6	6
Nikkomulse 41	Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	3	3	3
Univul T150	Ethylhexyl Triazone	-	4	4
Tinosorb M	Methylene Bisbenzotriazolyl Tetramethylbutylphenol Water, Decyl Glucoside, Propylene Glycol, Xanthan gum	8	8	8
Silicone DC 245	Cyclopentasiloxane	1	2	2
Xiameter PMX-200	Dimeticone	-	1	1
Base de absorção de Lanolina	Paraffinum Liquidum (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol	-	-	4
Silica Mss-500W	Silica	-	-	1
BHT	Butylated hydroxytoluene	0,05	0,05	0,05
Silicone 9040	Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer	1	-	-
Aristoflex AVC	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	0,3	0,3	-
Permulen TR-2	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	-	-	0,2
Butilenoglicol	Butylene Glycol	5	5	2
EDTA dissódico	Dissodium EDTA	0,05	0,05	0,05
Hebeatol BA	Benzyl alcohol (and) Xylitol (and) Caprylic acid	0,8	0,8	0,8
Propilenoglicol	Propylene Glycol	-	-	0,5
Glicerina	Glycerin	6	6	3
Amido	Corn Starch Modified	5	-	-
Água Destilada	Water	qsp.100	qsp.100	qsp.100

## **4.5 TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE**

Todas as formulações desenvolvidas foram analisadas quanto a estabilidade por testes preliminares. Cada amostra foi subdividida em alíquotas de aproximadamente 30g e acondicionadas em embalagens de vidro hermeticamente fechadas, mantendo aproximadamente um terço do volume total da embalagem um espaço vazio (head space) para permitir possíveis trocas gasosas (BRASIL, 2012a).

As amostras foram submetidas ao estresse térmico de  $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  em estufa com controle de umidade 70% de UR (marca Eletrolab modelo 111FC) e  $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  (refrigerador com temperatura controlada), sendo uma amostra de cada lote permaneceu sob temperatura ambiente monitorada, protegida da luz, sob  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ , sendo esta utilizada como padrão de comparação. As análises nas formulações desenvolvidas ocorreram após 24 horas de preparação e 7, 14, 21 e 28 dias. (BRASIL, 2012a).

### **4.4.1 Centrifugação**

Durante 30 dias, 3 g das formulações foram submetidas a 3 ciclos de centrifugação a velocidade de 3000 rpm (correspondente a 800 vezes a gravidade), por 30 minutos utilizando a centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 0,044Kw, após 24 horas e 7, 14, 21 e 28 dias (BRASIL, 2012a).

### **4.4.2 Avaliação do pH**

A avaliação do pH das formulações foi realizada utilizando Peagômetro Digimed, modelo DM 20 utilizando-se as amostras diluídas em água destilada (10%), realizadas 24 horas após o preparo das formulações e também nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias (BRASIL, 2012a).

### **4.4.3 Avaliação visual**

Para a avaliação visual, as amostras das formulações objeto foram observadas visualmente durante 24 horas após o preparo e também 7, 14, 21 e 28 dias as seguintes alterações: cor, ocorrência de separação de fases e homogeneidade (BRASIL, 2012a).

## 4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA POR DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

O comportamento reológico foi determinado utilizando um reômetro Brookfield DV3T (Brookfield, EUA) tipo cone e placa equipado com um spindle CP-52 e acoplado ao software Rheocalct<sup>®</sup>. Em cada análise, 0,5 g de formulação foram depositados na placa. A velocidade de rotação foi progressivamente aumentada de 0 a 5 rpm com 10 segundos entre cada velocidade, formando uma curva ascendente. A curva descendente foi gerada com uma diminuição inversa da velocidade. As áreas de histerese dessas curvas foram estudadas para avaliar a influência dos filtros UV e dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) no comportamento reológico imediato e de longo prazo nas formulações (CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017).

Após o preparo, as formulações potes separados e hermeticamente fechados e armazenadas à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ,  $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e  $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  por um período de 24 horas após a preparação e após 7, 14, 21 e 28 dias para determinação do comportamento reológico.

A integração numérica das curvas dos reogramas obtidos foi realizada no *Software Microcal Origin* e a área sob a curva foi obtida para o cálculo da área de histerese (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003). A viscosidade aparente foi obtida a partir do reograma e as curvas foram ajustadas de acordo com o modelo de Ostwald (Equação 2) para obtenção do índice de fluxo e índice de consistência (CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017). Para melhor visualização das alterações sofridas pelas formulações ao longo do experimento, os valores de viscosidade aparente, índice de consistência e índice de fluxo, foram plotados em gráficos com auxílio dos *softwares GraphPad Prism5*.

$$\text{Equação 2. } \tau = K (\dot{\gamma})^n$$

onde,  $\tau$  = tensão de cisalhamento (shear stress) (D/cm<sup>2</sup>);

$\dot{\gamma}$  = taxa de cisalhamento (shear rate) (1/Sec.);

K = índice de consistência;

n = índice de fluxo

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA DAS FORMULAÇÕES

A análise de textura foi realizada utilizando um analisador de textura TA. XT plus (Stable Microsystems, Reino Unido) equipado com três sondas: equipamento de espalhabilidade TTC HDP/SR, equipamento de retro-extrusão A/BE 35 mm e o teste de dureza utilizando probe P/45C à temperatura ambiente. As análises foram realizadas 24h após desenvolvimento das formulações armazenadas a 25°C e as propriedades texturais das formulações foram calculadas através do software do instrumento Texture Exponent 3.0.5.0 (VITORINO et al, 2013; CALIXTO et al, 2018b).

Na análise de espalhabilidade foi avaliado o trabalho de cisalhamento (Work of shear) das formulações, obtido a partir da área sob a curva positiva. Para isso, a distância de retorno utilizada foi de 25 mm, a velocidade de retorno foi de 20 mm/seg e a força de contato foi de 30g. Os dados obtidos da curva negativa foram analisados como valores absolutos. A quantidade de formulação utilizada na avaliação foi de cerca de 30-40g e o foi realizado três medidas para cada amostra (CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017).

No segundo teste foi avaliado os parâmetros: firmeza e coesão (razão da área sobre o tempo de força em curva produzida por uma segunda compressão) (TAI et al, 2014). Em um recipiente de 125 mL com 50 mm de diâmetro e preenchido em 75% de sua capacidade, com disco de 40 mm de diâmetro. As condições da sonda foram: distância de retorno de 100 mm, velocidade de retorno de 20 mm/seg e força de contato de 30 g. Foram realizadas três medições para obter a média de cada amostra (CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017).

Por fim, o terceiro teste avaliou os seguintes parâmetros de textura: dureza (g. Force) dada pela força máxima durante o primeiro ciclo de compressão; pegajosidade (g. Force) e elasticidade (cm), trabalho necessário para superar as forças entre a superfície da amostra e a superfície da sonda. O método foi conduzido sob as seguintes condições: velocidade pré-teste, 2 mm/seg; velocidade pós-teste, 1 mm/seg; distância do teste de ruptura, 1%; distância de medição, 40% de deformação; força, 0,10kg; e força de gatilho automática, 0,020 kg. A distância da plataforma foi de 65mm, com compressão dupla realizada em intervalos de 10 segundos entre duas compressões Cinco medições foram realizadas em cada amostra para obter a média das medidas à temperatura ambiente (VITORINO et al, 2013; SAMAKRADHAMRONGTHAI et al, 2017).

## 5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

## 5.1 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO (FPS) *in vivo*

De acordo com a regulamentação brasileira, RDC nº 30/2012 (BRASIL, 2012b) a determinação do Fator de Proteção (FPS) de um cosmético deve ser realizada seguindo métodos *in vitro*, aplicando metodologia padronizada e validada internacionalmente (FDA ou COLIPA). O teste FPS *in vivo* das formulações filtros solares foi realizada de acordo com o método COLIPA (COLIPA, 2011) pela empresa Allergisa (Campinas, SP, Brasil).

A avaliação foi conduzida em um protocolo de estudo de controle paralelo, randomizado, mono-cego, usando dez participantes de ambos os sexos, saudáveis com fototipo I, II e III (escala de Fitzpatrick) entre 18 e 40. Os critérios de exclusão foram históricos de reação fototóxica ou fotoalérgica, histórico pessoal ou familiar de câncer de pele, bronzeamento nas últimas duas semanas e durante todo o estudo, hiperchromia e hipochromia na área estudada, nevo, ceratose seborreica ou excesso de pelos.

As formulações testadas (formulas F3-VE, F3-QT, F3-CLN VZ e F3-CLN) e a formulação controle, com valor de FPS variando de 14,2 a 19,0, de acordo com a diretriz ISO 24444: 2010 contendo 7,0% de etilhexil dimetil PABA e 3,0% de oxibenzona, foram aplicadas na região dorsal dos participantes (região dorsal infra-escapular), em regiões diferentes com 30cm<sup>2</sup> na concentração de 2,0 mg/cm<sup>2</sup> cada. Após 15 a 30 minutos, as áreas foram irradiadas usando um simulador ultravioleta solar Multiport 601 com lâmpada de arco de xenônio, filtros Schott WG320 e UG11 (Solar Light Company Filadélfia, EUA) com seis saídas independentes que reproduz espectro solar UV de 290 até 390nm. A dose de radiação foi ajustada por um detector ultravioleta de eritema-efetivo PMA 2103LLG.

A formação de eritema foi avaliada após 16 a 24 horas após a irradiação. O valor do FPS foi calculado de acordo com a Equação 3, onde MED é a dose mínima eritematosa da pele protegida e não protegida de radiação ultravioleta capaz de gerar os primeiros sinais de eritema perceptível com bordas claramente definidas. A média e o desvio padrão do FPS final das amostras e do controle foram calculados utilizando o teste t-Student. com intervalo de confiança de 95% (SOUZA & CAMPOS, 2017).

Equação 3.

$$FPS = \frac{MED_p \text{ (pele protegida)}}{MED_u \text{ (pele não protegida)}}$$

## 5.2 TRIAGEM DAS PARTICIPANTES

Durante os meses de janeiro/2019 – maio/2019 foram avaliados os efeitos imediatos e a longo prazo das formulações. O recrutamento das participantes foi realizado com base nos critérios de inclusão e exclusão designados para o estudo. Foram incluídos no estudo participantes saudáveis, ou seja, que não apresentavam enfermidades, do sexo feminino, pele de fototipo II e II de acordo com a escala de Fitzpatrick (Tabela 1), com idades entre 20 e 35 anos e que utilizavam diariamente fotoprotetor.

Antes de iniciar o estudo, 100 participantes foram orientadas sobre os objetivos e da pesquisa e entrevistadas sobre seus hábitos de fotoproteção (Quadro 2), e concordando em participar da mesma, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) elaborado segundo a declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de ética em Comitê de Ética em Pesquisa (FCFRP / CEP 2.598.709, CAAE: 79025417.4.0000.5403) (Anexo A) (BRASIL, 2012c). Todos os estudos de eficácia foram realizados sob supervisão do médico dermatologista Dr. João Carlos Lopes Simão (CRM: 94214).

Na seleção das participantes foram considerados os seguintes critérios de exclusão (Quadro 1): tabagismo, gravidez ou aleitamento, indivíduos com histórico anterior de reações adversas com o uso de produtos cosméticos, indivíduos em uso de medicamentos passíveis de produzir resposta cutânea anormal ou que tenham feito uso de cosméticos despigmentante duas semanas antes do início do estudo, doenças dermatológicas localizadas ou generalizadas e excesso de pelos nas regiões de estudo.

**Quadro 1.** Critérios de inclusão e exclusão do estudo clínico

Critérios de Inclusão
<ul style="list-style-type: none"><li>- Sexo: Feminino</li><li>- Faixa etária: 20-35 anos</li><li>- Ter disponibilidade para estar no laboratório nos dias agendados</li><li>- Uso de protetor solar diariamente.</li></ul>
Critérios de Exclusão
<ul style="list-style-type: none"><li>- Gestantes</li><li>- Lactantes</li><li>- Fumantes</li><li>- Doenças dermatológicas ou generalizada</li><li>- Lesões, cicatrizes, tatuagens e/ou excesso de pelos na região de estudo</li><li>- Exposição solar durante os dias que antecedem o estudo e/ou ter um bronzado persistente</li><li>- Histórico de reação adversa a produtos cosméticos</li><li>- Histórico de procedimento cirúrgico, peeling, dermoabrasão, eletrocoagulação, laser na região face nos últimos seis meses</li><li>- Histórico de procedimentos estéticos na região da face nos últimos seis meses anteriores às medidas.</li><li>- Histórico de procedimento dermatológico na região da face nos últimos seis meses</li><li>- Histórico de uso de medicamentos que possam resultar em alterações cutâneas na região da face</li><li>- Histórico de uso de produtos clareadores na região da face nos últimos seis meses</li><li>- Histórico de uso de produtos cosméticos (com exceção de produtos de higiene e protetor solar) ou medicamentos de uso tópico na região da face nos últimos 14 dias anteriores às medidas.</li><li>- Utilizar medicamentos corticoides, anti-histamínicos, tratamento de hiper ou hipotireoidismo, diuréticos, antibióticos, analgésicos, beta bloqueadores, anticoagulantes e terapia imunossupressora.</li></ul>

## Quadro 2. Questões pré-definidas na entrevista de recrutamento

- Idade

-Tipo de pele

Normal, Oleosa, Seca, Mista ou Sensível.

- Fototipo Cutâneo

I, II, III, IV, V ou VI.

- Você utiliza protetor solar no rosto?

Sim ou Não.

- Qual o Fator de Proteção Solar do filtro solar (FPS) que você usa no rosto?

FPS 15; 20; 30; 50; 60, Outro.

- Você reaplica o protetor solar durante o dia?

Não; Sim, uma vez; Sim, duas vezes; Somente quando vou à praia ou piscina.

- Quanto tempo você se expõe ao sol diariamente?

Menos de 1 hora por dia; Entre 1 hora e 3 horas por dia; Entre 3 horas e 6 horas por dia; Mais de 6 horas por dia.

- Qual o motivo da sua exposição solar?

Bronzeamento; Lazer; Forma ocupacional (Trabalho); Prática de exercícios físicos/esportes; Apenas para me deslocar de um lugar para outro; Outros.

- Já fez bronzeamento artificial?

Sim ou Não.

- Já sofreu queimaduras solares (vermelhidão, bolhas)?

Não; Sim, em qual região do corpo?

- Possui algum caso de câncer de pele na família?

Sim ou Não.

### 5.3 AVALIAÇÃO SENSORIAL

Para definir a formulação tópica que resultaria em uma maior adesão ao estudo clínico foi realizada a análise sensorial com as formulações veículos resultantes do teste preliminar de estabilidade. Esta análise foi realizada na região anterior dos antebraços divididos em 5 quadrantes de 4cm<sup>2</sup> de 60 participantes e em cada região foi aplicada 10 µL de forma randomizada as seguintes formulações: F2- VE (fotoprotetor com filtros adicionados diretamente na fase oleosa), F3-VE (Formulação com filtros UV dispersos em *Paraffinum Liquidum (e) Lanolina Álcool (e) Álcool Oleílico* e com Sílica); F3-CLN VZ (fotoprotetor com nanocarreador sem quercetina), F3-QT (fotoprotetor com quercetina) e F3-CLN (fotoprotetor com nanocarreador com quercetina), nos antebraços.

Anteriormente a análise, as participantes foram orientadas a fazer dez movimentos circulares, em movimentos ordenados para espalhar as formulações. As formulações foram avaliadas quanto aos parâmetros: resíduo branco, maciez, ausência de pegajosidade, oleosidade, facilidade de espalhamento e sensação ao toque. Após 5 minutos de aplicação, as formulações foram avaliadas quanto: brilho, resíduo oleoso, toque aveludado, pele macia, sensação de esfarelamento e intenção de compra. Os parâmetros foram pontuados seguindo os critérios: 1 - Péssimo, 2 - Ruim; 3 - Regular, 4 - Bom, 5- Excelente (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

### 5.4 PROTOCOLO DOS ESTUDOS DE EFICÁCIA CLÍNICA

#### 5.4.1 Avaliação dos efeitos imediatos

Nesta etapa do estudo consistiu na avaliação dos efeitos imediatos da formulação objeto de estudo (formulação F3-VE) comparativamente as formulações adicionadas com quercetina (F3-QT), nanocarreador de quercetina (F3-CLN) e nanocarreador sem quercetina (F3-CLN VZ). Para avaliação dos efeitos imediatos, foram realizadas medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo (Corneometer<sup>®</sup> CM 825), a perda transepidérmica de água (Tewameter<sup>®</sup> TM 210) e o microrrelevo cutâneo (Visioscan<sup>®</sup> VC 98) no antebraço das participantes.

Foram aplicadas de forma randomizada 10µL das formulações em 4 regiões previamente divididas aleatoriamente nos antebraços de 60 participantes com auxílio de uma micropipeta. A espalhabilidade foi realizada em 10 movimentos circulares no

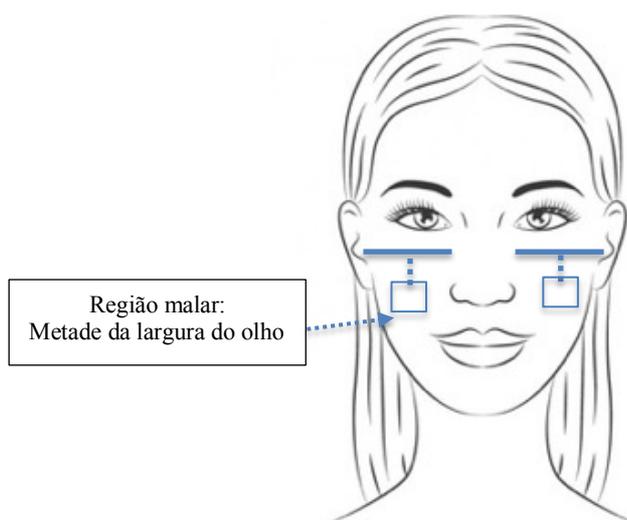
sentido horário. As medidas foram feitas antes da utilização das formulações e após 30 minutos da aplicação das mesmas. Todas as medidas foram realizadas após 15 minutos de aclimação em temperatura e umidade do ar controlado (20-24°C e 45-55%, respectivamente).

#### 5.4.2 Avaliação dos efeitos em longo prazo

Foi conduzido um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado para avaliação dos efeitos em longo prazo, no qual as 60 participantes selecionadas foram randomizadas em 3 grupos. Assim, um dos grupos recebeu a formulação acrescida dos nanocarreadores com quercetina (Grupo 3, formulação F3-CLN), segundo grupo recebeu a formulação acrescida dos nanocarreadores sem quercetina (Grupo 1, formulação F3-CLN VZ) e o terceiro grupo recebeu a formulação fotoprotetora sem adição de nenhuma substância ativa (Grupo 2, formulação F3-VE)

A região malar é uma área do corpo que está frequentemente exposta à radiação solar e é comumente utilizada para se avaliar os efeitos do fotoenvelhecimento (CARNEVALE, 2017). Dessa forma, conforme descrito na Figura 7 a avaliação foi randomizada entre lado direito e esquerdo na região malar, uma região de 0,8cm<sup>2</sup> e 2cm abaixo da metade da largura dos olhos das participantes, e foram realizadas medidas no tempo inicial (medidas basais, anteriormente ao uso da formulação), após 30 dias e 60 dias de utilização diária da formulação.

**Figura. 6.** Regiões da face em que foi realizado o estudo de eficácia em longo prazo



As participantes foram orientadas a não utilizar nenhum outro produto cosmético 28 dias antes e durante o período do estudo, exceto o filtro solar, e aplicar o produto na

face todos os dias duas vezes ao dia, pela manhã e a tarde, espalhar a formulação por toda a face até a completa absorção e se for utilizar maquiagem utilizar a formulação fotoprotetora primeiro.

Antes de efetuar cada medida, as participantes foram orientadas a lavar o rosto duas horas antes da avaliação. Os testes foram realizados após aclimatação de 15 minutos em temperatura e umidade do ar controlado (20-24°C e 45-55%, respectivamente). Os seguintes parâmetros foram avaliados: conteúdo aquoso do estrato córneo (Corneometer<sup>®</sup> CM), perda transepidermica de água (Tewameter<sup>®</sup> TM 210), quantificação de melanina e eritema (Mexameter<sup>®</sup> MX16), avaliação por Imagem da capacitância da pele, determinação das características do microrrelevo cutâneo (Visioscan<sup>®</sup> VC 98), distribuição da hidratação da superfície e topografia da pele (MoistureMap<sup>®</sup> MM 100), propriedades viscoelásticas da pele (Cutometer<sup>®</sup> dual MPA 580, espessura da derme e ecogenicidade (Dermascan<sup>®</sup> C, Cortex Technology).

## **5.5 TÉCNICAS DE BIOFÍSICA E ANÁLISE DE IMAGEM APLICADAS**

### **5.5.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo**

Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento Corneometer<sup>®</sup> CM 825, baseado no princípio da medida da capacitância elétrica, ou seja, na variação da constante dielétrica da água. Os resultados foram fornecidos em unidades arbitrárias (UA) onde se estima que 1 UA corresponda a 0,2 - 0,9 mg de água por grama de estrato córneo. Foram efetuadas 5 medições na região malar, sendo calculada a média dos valores obtidos (DE MELO & MAIA CAMPOS, 2018).

### **5.5.2 Determinação da perda transepidermica de água (TEWL)**

Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento Tewameter<sup>®</sup> TM 210, acoplado a um software, cuja função é medir a perda transepidermica de água (TEWL), baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick em 1855. Os valores são dados em  $\text{g}\cdot\text{m}^2\cdot\text{h}^{-1}$ . A sonda do aparelho permaneceu por 20 segundos sobre a pele na região malar, e a média das 3 medidas foi empregado nos cálculos posteriores (DAL'BELO et al., 2006; SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

### 5.5.3 Determinação do microrrelevo cutâneo

Neste estudo foi utilizado o equipamento Visioscan® VC98 (Courage & Khazaka, Alemanha) para a determinação do microrrelevo cutâneo. Este equipamento permite a avaliação quali e quantitativa da superfície da pele nas condições fisiológicas por meio de técnicas de profilometria óptica, as quais utilizam um processo de digitalização de imagem obtida por uma câmera de vídeo equipada com uma unidade que emite luz ultravioleta e a imagem captada fornece um histograma que apresenta uma distribuição de diferentes níveis de cinza, quantificando os pontos escuros, que corresponde, à rugosidade e pontos claros, aos platôs do microrrelevo cutâneo.

A partir de cálculos realizados pelo software interno SELS (*Surface Evaluation of the Living Skin*) (Tabela 3), parâmetros relacionados à rugosidade (SEr - calcula os níveis de cinza acima do limite em comparação com a imagem inteira, reflete a “aspereza” da pele), rugas (SEw - calculado a partir da proporção de rugas horizontais e verticais), descamação (SEsc – nível de falta de hidratação do estrato córneo). É o número de pixels em que o nível de cinza é maior do que o seu limiar) e maciez da pele (SEsm - calculado a partir da largura e profundidade média das rugas), e Rt (rugosidade) relacionado à profundidade das rugas. Foi utilizado a média de 3 medidas (FOSSA SHIRATA & CAMPOS, 2017; DE MELO & MAIA CAMPOS, 2018).

**Tabela 3-** Parâmetros relacionados à superfície da pele fornecido pelo equipamento Visioscan® VC 98

<b>Parâmetros</b>	<b>Definições</b>
<b>SEr - aspereza</b>	Porção de pontos escuros que representam as rugas
<b>SEw – textura</b>	Número e largura das rugas, sendo que quanto maior o número de rugas maior é este valor
<b>SEsm – maciez</b>	Refere-se à forma e a largura das rugas, sendo que quanto maior o valor dessa variável melhor a textura e maciez da pele
<b>RT – rugosidade</b>	Profundidade das rugas

### **5.5.4 Quantificação de melanina e Eritema**

O índice de eritema foi medido pelo equipamento Mexameter<sup>®</sup> MX16, um equipamento que mede o conteúdo da melanina e hemoglobina (eritema) 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. Comparando-se a quantidade de luz vermelha e verde refletida, pode ser obtido um índice que depende, principalmente, do conteúdo de sangue da derme. A intensidade da pigmentação varia de 0-1000 (CLARYS et al., 2000; JUNKER et al., 2014).

### **5.5.5 Avaliação por Imagem da capacitância da pele**

A distribuição da hidratação da superfície e topografia da pele foi analisada pelo equipamento MoistureMap<sup>®</sup> MM 100. O sensor fornece informações gráficas sobre a distribuição da hidratação e da microtopografia da pele. Quando a placa de medição é aplicada perto da superfície da pele e, o material condutor, a água, produzirá imagens correspondentes ao mapa de hidratação da superfície da pele. Tais imagens são codificadas em 256 níveis de cinza com os pixels mais escuros representando alta capacitância, maior conteúdo de água no estrato córneo e os claros representam os valores mais baixos da capacitância, ou seja, menor conteúdo de água no estrato córneo (LÉVÊQUE et al., 2006).

### **5.5.6 Avaliação das características da derme por ultrassom de alta frequência**

A espessura da derme e a ecogenicidade foram determinadas pelo ultrassom de 20 MHz Dermascan C<sup>®</sup> (Cortex, Hadsund, Dinamarca) com um transdutor de foco utilizado para obter imagens transversais bidimensionais que são mostradas no software de modo-B específico do instrumento.

A onda de ultrassom (com velocidade de 1,580 m/s) é parcialmente refletida pela estrutura da pele, dando origem a ecos de diferentes amplitudes. Para calcular a ecogenicidade, foi calculada como a razão entre o número de pixels ecogênicos baixos (abaixo de 30 – próximo à coloração preta) e o número de pixels ecogênicos totais (LEP/TEP) (GIANETI, 2013). A escala de cores de ecogenicidade é: branco > amarelo >

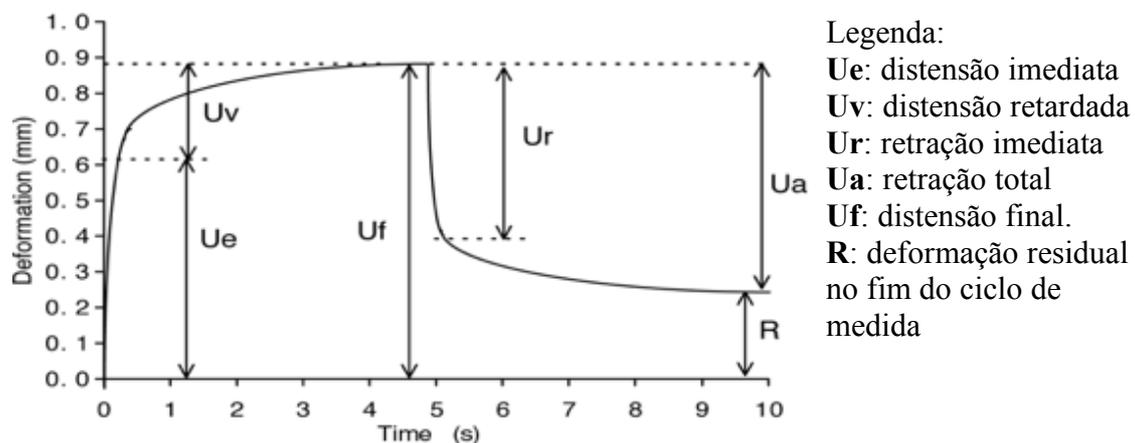
vermelho> verde> azul> preto. Para estes parâmetros, quanto mais próximo de 1, menor a ecogenicidade (DE MELO & MAIA CAMPOS, 2018).

### 5.5.7 Avaliação das propriedades mecânicas da pele – viscoelasticidade

Foram realizadas medidas utilizando o aparelho Cutometer® dual MPA 580 (Courage + Khazaka electronic GmbH - Colônia, Alemanha), equipado com uma sonda de 4 mm diâmetro contendo um sistema de leitura óptico, que mede a deformação da pele em resposta à sucção, ou seja, a sonda exerce uma pressão negativa sobre a pele, sendo que a intensidade de luminosidade captada é proporcional à penetração da pele no dispositivo (DOBREV, 2000; GIANETI et al, 2013).

Os valores das medidas são calculados a partir desta curva de sucção da pele/interrupção, exemplificada na Figura 8. Apesar de o equipamento fornecer várias variáveis, que estão descritas na Tabela 4, nem todas foram empregadas neste estudo, sendo utilizados os parâmetros R2, R5, R6 e R7. Foram obtidas 3 medidas da região malar das participantes e a média dos valores obtidos utilizadas nos cálculos posteriores.

**Figura 7.** Curva de deformação da pele obtida com o equipamento Cutometer® dual MPA 580



**Tabela 4.** Parâmetros fornecidos pelo equipamento Cutometer® dual MPA 580

Variáveis	Significado
$R0 = Uf$	Amplitude Máxima, ponto mais elevado da curva (Firmeza da pele).
$R1 = Uf - Ua$	Amplitude Mínima.
$R2 = Ua/Uf$	Parte situada entre a amplitude máxima e a capacidade de recuperação da pele (elasticidade bruta). Quanto mais perto o valor estiver de 1 (100%), mais elástica é a curva.
R3	É a última amplitude máxima.
R4	É a última amplitude mínima.
$R5 = Ur/Ue$	Elasticidade líquida. Quanto mais perto o valor estiver de 1 (100%), maior é a elasticidade.
$R6 = Uv/Ue$	Razão entre a viscoelasticidade cutânea e a distensão imediata.
$R7 = Ur/Uf$	Elasticidade biológica. Habilidade da pele em retornar à sua posição inicial, após deformação.
$R8 = Ua$	Área acima da curva, dada por UF e pelo tempo de sucção. Quanto menor o valor, mais elástica é a curva.

## 5.6 PERCEPÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA

Além das medidas objetivas para analisar a eficácia das formulações objeto de estudo, a percepção subjetiva das participantes também foi avaliada através da resposta ao questionário modelo CATA (check all that apply) com a percepção das participantes anteriormente ao uso da formulação e ao final do período de 60 dias de uso.

O questionário avaliou:

- Efeitos ao longo prazo na pele: diminuição ou aumento da hidratação, diminuição ou aumento das manchas, diminuição ou aumento da maciez da pele.
- Efeitos adversos: irritação da pele, vermelhidão, coceira, descamação e ardência.
- Avaliação dos efeitos da formulação testada: Péssima, Ruim, Regular, Boa, Muito Boa ou Excelente.
- Intenção de compra: sim ou não.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais obtidos foram inicialmente submetidos à verificação do tipo de distribuição amostral encontrada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk a partir dos valores basais de cada variável. A partir do resultado, a comparação da homogeneidade das variâncias entre os diferentes grupos de intervenção a cada tempo foi realizada por análise de variância (ANOVA one way) para os dados paramétricos e Kruskal-Wallis para os não paramétricos, realizados no software estatístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software – California USA), com nível de significância estabelecido em 5%. Os resultados foram apresentados em gráficos de barra e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

## 6. RESULTADOS

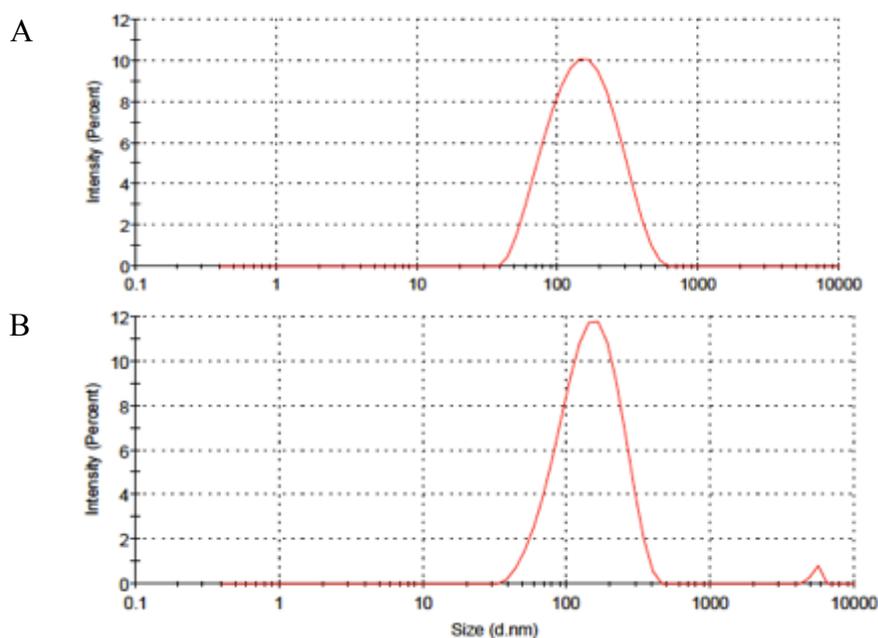
---

## 6.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)

Dentre as nanopartículas à base de lipídios, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), segunda geração de nanopartículas, são considerados uma alternativa para transporte de substâncias ativas. A Tabela 5

e a Figura 9 mostram as características (diâmetro, índice de polidispersão -PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação) de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ou não a quercetina ativa, de acordo com a metodologia de PIVETTA et al. (2018). O diâmetro das CLNs foi de 137,4nm, PDI de 0,241, potencial zeta -22mV ( $\pm 0,48$ ) e eficiência de encapsulação de 98%.

**Figura 8.** Distribuição de tamanho de partícula: A (sem antioxidante encapsulado) e B (com antioxidante encapsulado) determinado pelo espalhamento dinâmico da luz após 24 horas de preparação



**Tabela 5** – Diâmetro, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) de carreadores lipídicos nanoestruturados sem antioxidante encapsulado e 12mg de antioxidante.

CLN	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulamento (EE%)
Sem antioxidante encapsulado	131,9 $\pm$ 0,22	0,195 $\pm$ 0,06	-18 $\pm$ 0,75	-
Com antioxidante encapsulado	137,4 $\pm$ 0,24	0,241 $\pm$ 0,09	-22 $\pm$ 0,48	98%

## 6.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Para o desenvolvimento das formulações em estudo, foi realizada uma pesquisa de mercado sobre as matérias primas com a finalidade de obtenção de um produto com alta proteção, sensorial agradável para ser aplicado na pele e que permita a melhoria das condições da pele, bem como na literatura técnica das mesmas resultando em formulações estáveis e que possibilitaram a adição dos nanocarreadores.

Após vinte e oito dias de armazenamento a  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ,  $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e  $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , todas as formulações desenvolvidas foram estáveis após o teste de centrifugação, porém as formulação F3 foram selecionada para uso no estudo clínico, uma vez que apresentavam características mais próximas ao desejado em composição, avaliação visual e sensorial.

## 6.3 TESTES PRELIMINARES DE ESTABILIDADE

### 6.3.1 Centrifugação

As formulações F1, F2 e F3 acrescidas ou não dos carreadores e/ou quercetina não apresentaram sinais de instabilidade após o teste de centrifugação.

### 6.3.2 Determinação do pH

Os valores de pH obtidos para as formulações submetidas aos testes de estabilidade encontram-se nas tabelas abaixo e estão dentro da faixa de estabilidade de formulações cosméticas (pH 5,5 a 7), sem oscilações significativas após 0, 7, 14, 21 e 28 dias (Tabelas 6 a 8).

**Tabela 6:** Valores de pH das formulações F1 desenvolvidas

	Temperatura Ambiente			Geladeira 4°C			Estufa 45°C		
	F1 VE	F1 CLN	F1 QT	F1 VE	F1 CLN	F1 QT	F1 VE	F1 CLN	F1 QT
T0	6.0	6.02	5.72	6.0	6.02	5.72	6,0	6.02	5.72
T7	6.25	6.02	6.11	5.95	5.95	5.94	5.96	6.10	5.65
T14	6.0	6.10	6.15	5.95	6.01	6.03	6.35	6.15	6.01
T21	6.0	6.15	6.5	6.35	6.03	5.9	6.2	6.20	6.27
T28	6.03	6.01	6.2	6.2	6.02	6.04	6.2	6.16	6.32

**Tabela 7:** Valores de pH das formulações F2 desenvolvidas

	<i>Temperatura Ambiente</i>				<i>Geladeira 4°C</i>				<i>Estufa 45°C</i>			
	F2 VE	F2 CLN	F2 CLN VZ	F2 QT	F2 VE	F2 CLN	F2 CLN VZ	F2 QT	F2 VE	F2 CLN	F2 CLN VZ	F2 QT
T0	5.95	6.02	6.04	5.97	5.95	6.02	5.84	5.97	5.95	6.02	5.84	5.97
T7	5.98	6.05	6.07	6.15	5.90	6.15	6,05	5.94	5.93	6.15	5,96	5.95
T14	5.96	6.04	5.98	6.2	6.04	6.12	6.14	6.07	6.06	6.12	6.04	6.01
T21	5.94	6.05	5.90	6.2	5.94	6.07	5.87	6.07	6.09	6.12	6.19	6.07
T28	6,03	6.04	5.97	5.91	5.97	6.02	5.87	5.91	6.12	6.14	6.17	6.02

**Tabela 8:** Valores de pH das formulações F3 desenvolvidas

	<i>Temperatura Ambiente</i>				<i>Geladeira 4°C</i>				<i>Estufa 45°C</i>			
	F3 VE	F3 CLN	F3 CLN VZ	F3 QT	F3 VE	F3 CLN	F3 CLN VZ	F3 QT	F3 VE	F3 CLN	F3 CLN VZ	F3 QT
T0	6.14	6.13	6.10	6.13	6.14	6.13	6.10	6.13	6.14	6.13	6.10	6.13
T7	6.18	5.97	6.10	6.18	6.3	6.10	6.05	6.4	6.20	6.15	6.09	6.45
T14	6.18	6.13	6.2	6.14	6.24	6.13	6.14	6.28	6.24	6.17	6.04	6.28
T21	6.10	6.04	6.05	6.13	6.15	6.04	6.18	6.01	6.10	6.15	6.19	6.01
T28	6.08	6.09	6.14	6.10	6.10	6.09	6.07	5.97	6.16	6.04	6.17	5.97

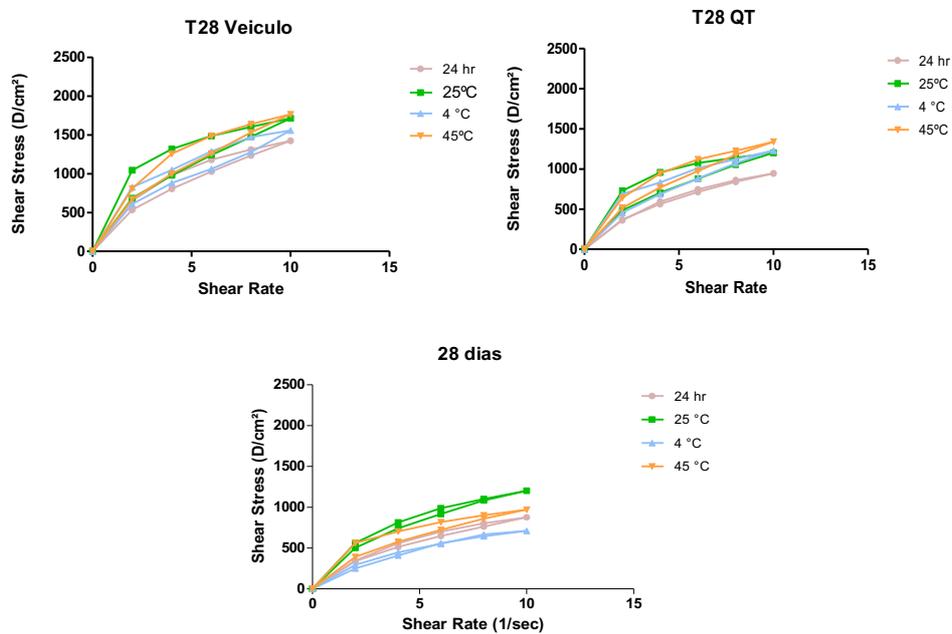
### 6.3.3 Avaliação Visual

Não foram observadas alterações de cor, odor e separação de fases nas formulações avaliadas durante todo o período de armazenamento à temperatura ambiente, 4°C e 45°C, sendo consideradas estáveis frente a este teste.

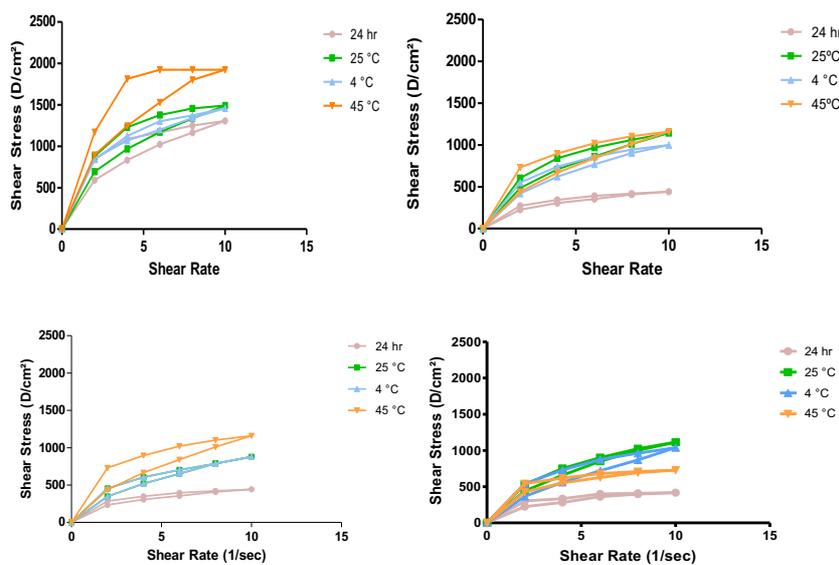
## 6.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA POR DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Com base nos resultados apresentados nas Figuras 2 e 3 as formulações F1, F2 e F3 são fluidos não newtonianos com comportamento pseudoplástico, o que significa que com o aumento da taxa de cisalhamento, a viscosidade diminui. Ademais, as formulações apresentavam área de histerese ou tixotropia, característica natural das formulações pseudoplásticas e consideradas adequadas em certos produtos cosméticos para aumentar a estabilidade e facilitar a aplicação do produto, indicando a variação reversível da viscosidade com o tempo (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003; SOUZA & CAMPOS, 2017). Entretanto, a análise do comportamento reológico mostrou que as formulações F1 apresentou diferenças na sua estabilidade geral quando comparada com as formulações F2 e F3.

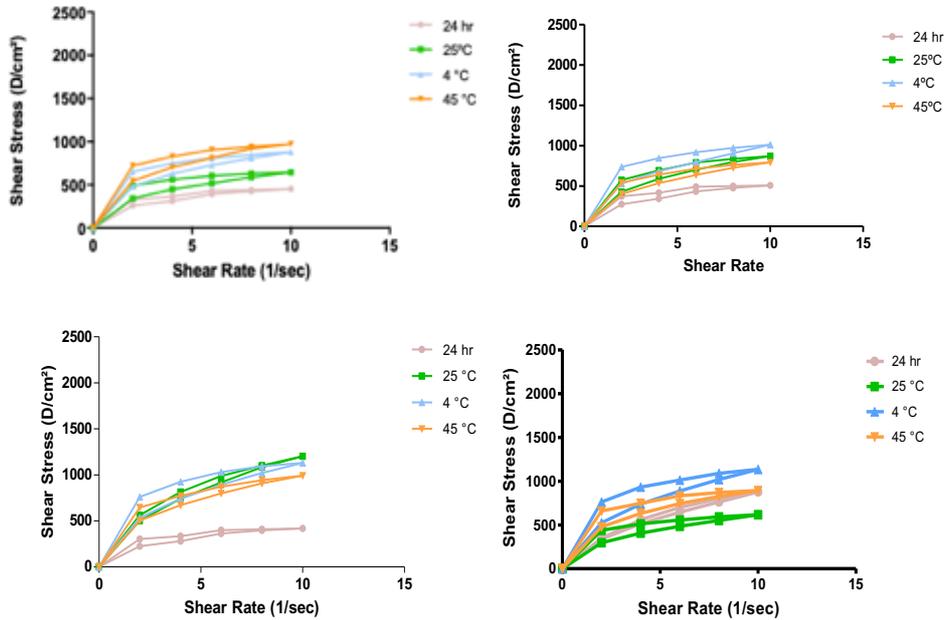
**Figura 9.** Reogramas obtidos na análise das formulações F1 após 24 horas e 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina).



**Figura 10:** Reogramas obtidos na análise das formulações F2 após 24 horas e 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina).

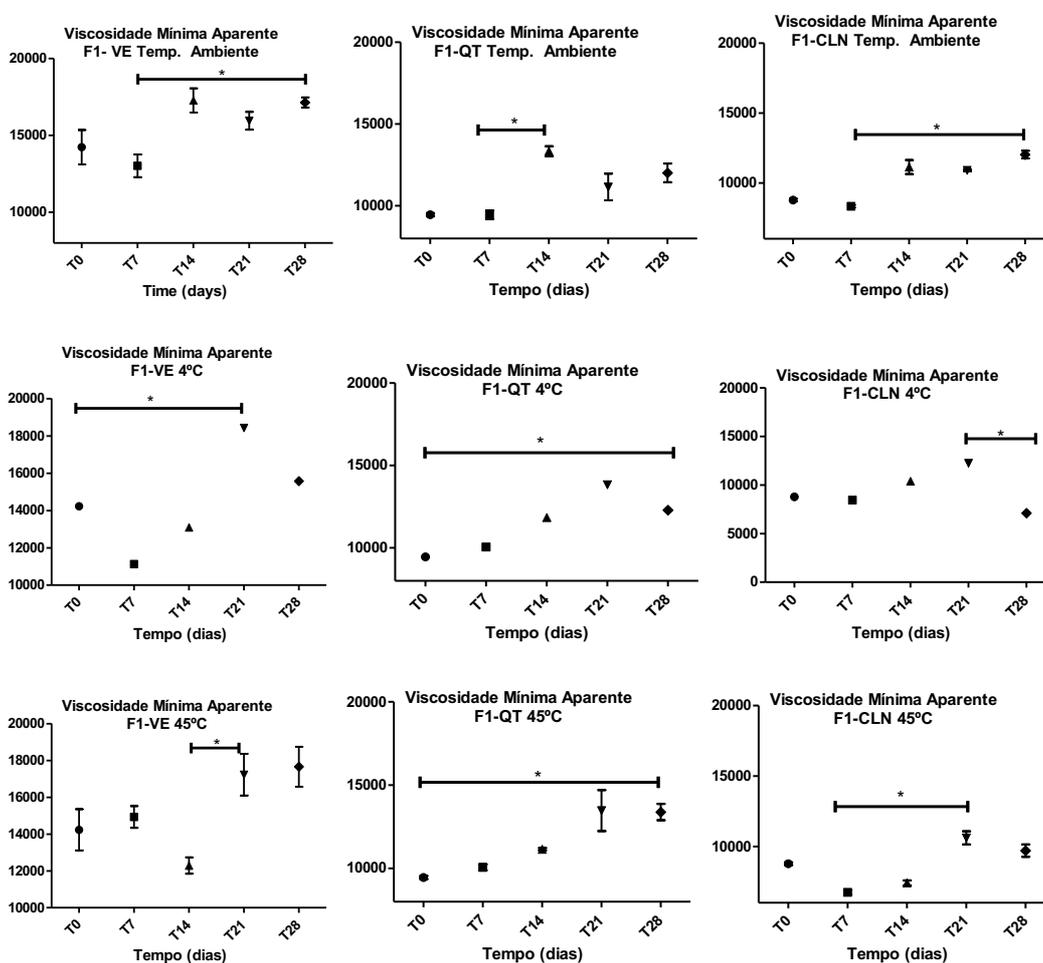


**Figura 11.** Reogramas obtidos na análise das formulações F3 após 24 horas e 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).

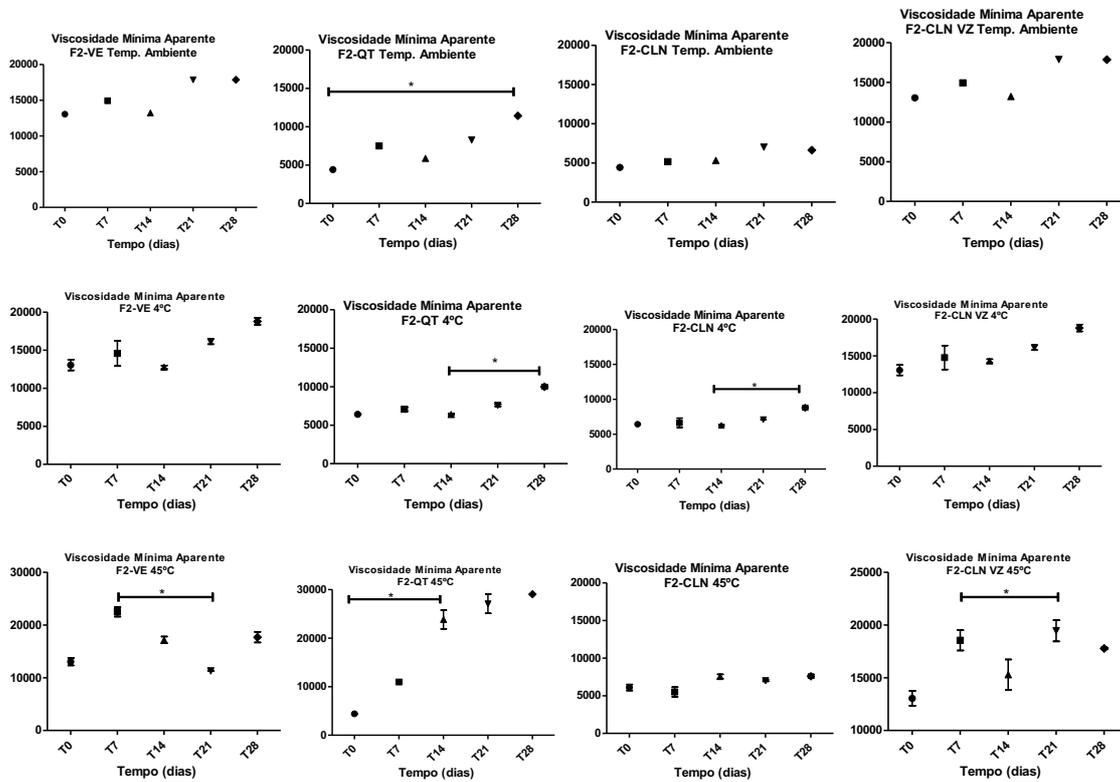


Na análise da Viscosidade Mínima Aparente, apenas as formulações F3 não apresentou diferenças significativas entre o tempo inicial e o final de análise. Variações significativas foram notas nas diferentes temperaturas ambiente das formulações F1 e F2 (Figuras 12, 13, 14).

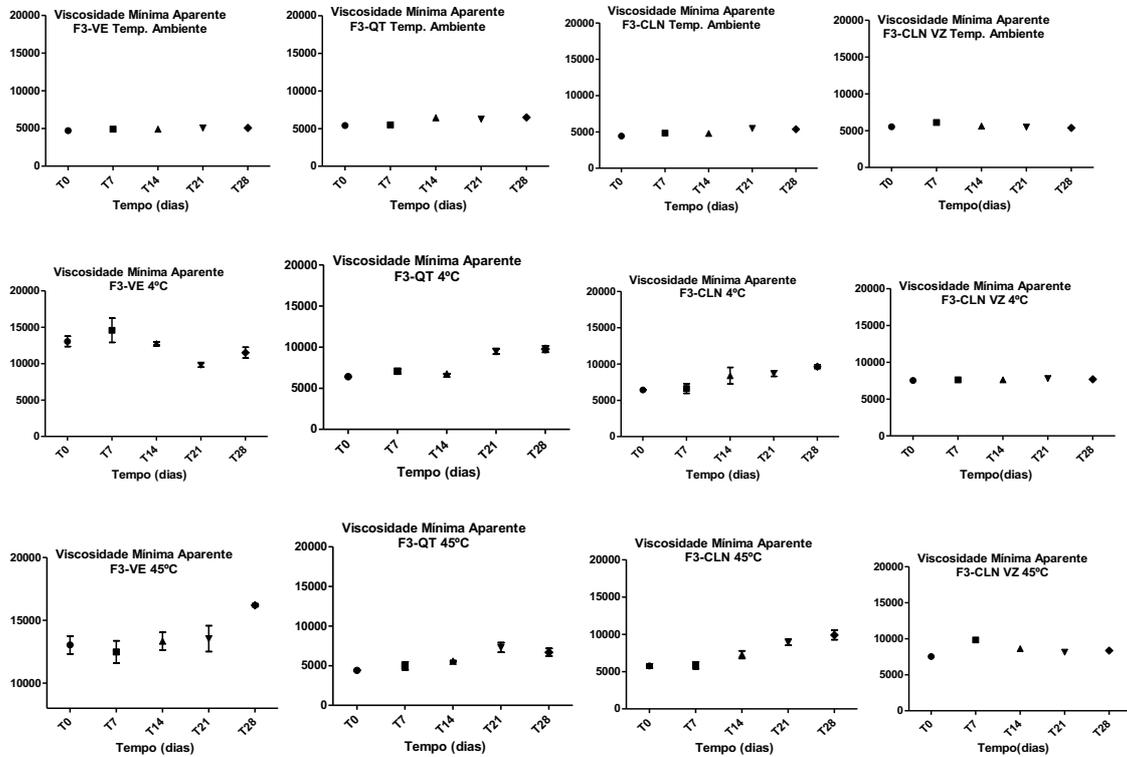
**Figura 12.** Viscosidade Mínima Aparente das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina). \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



**Figura 13.** Viscosidade Mínima Aparente das formulações F2 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina). \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.

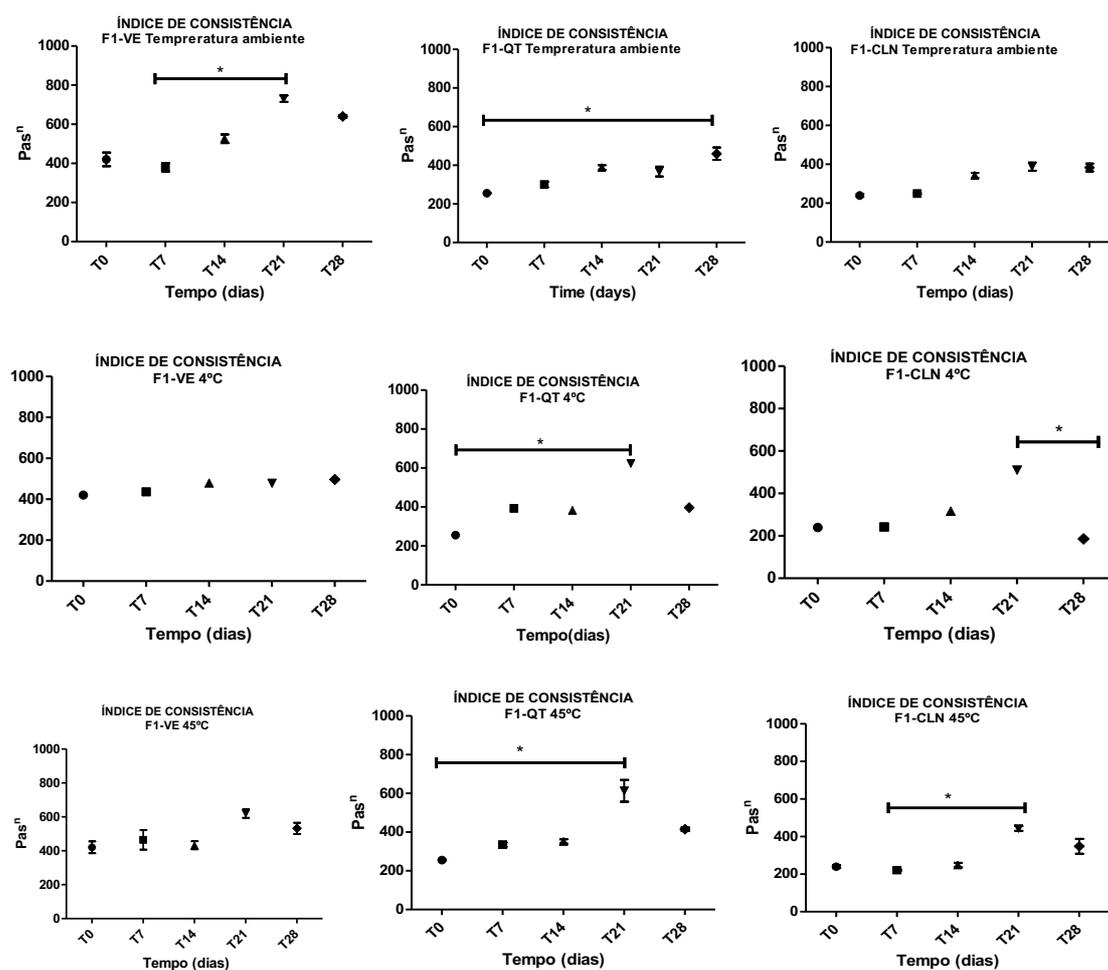


**Figura 14.** Viscosidade Mínima Aparente das formulações F3 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).



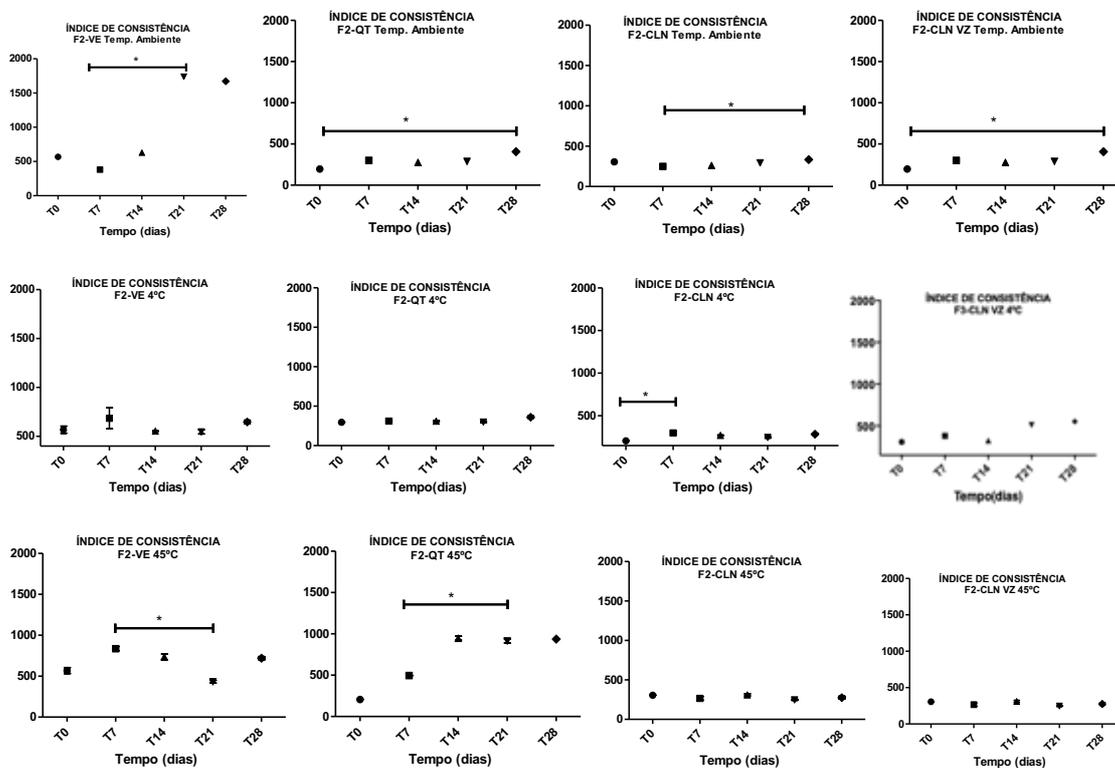
Na análise do índice de consistência, diferenças significativas entre o tempo inicial e final de estudo foram notadas nas formulações F1 e F2. Já a formulação F3 manteve sua estabilidade ao longo do tempo de estudo (Figuras 15, 16, 17).

**Figura 15.** Índice de Consistência das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina). \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



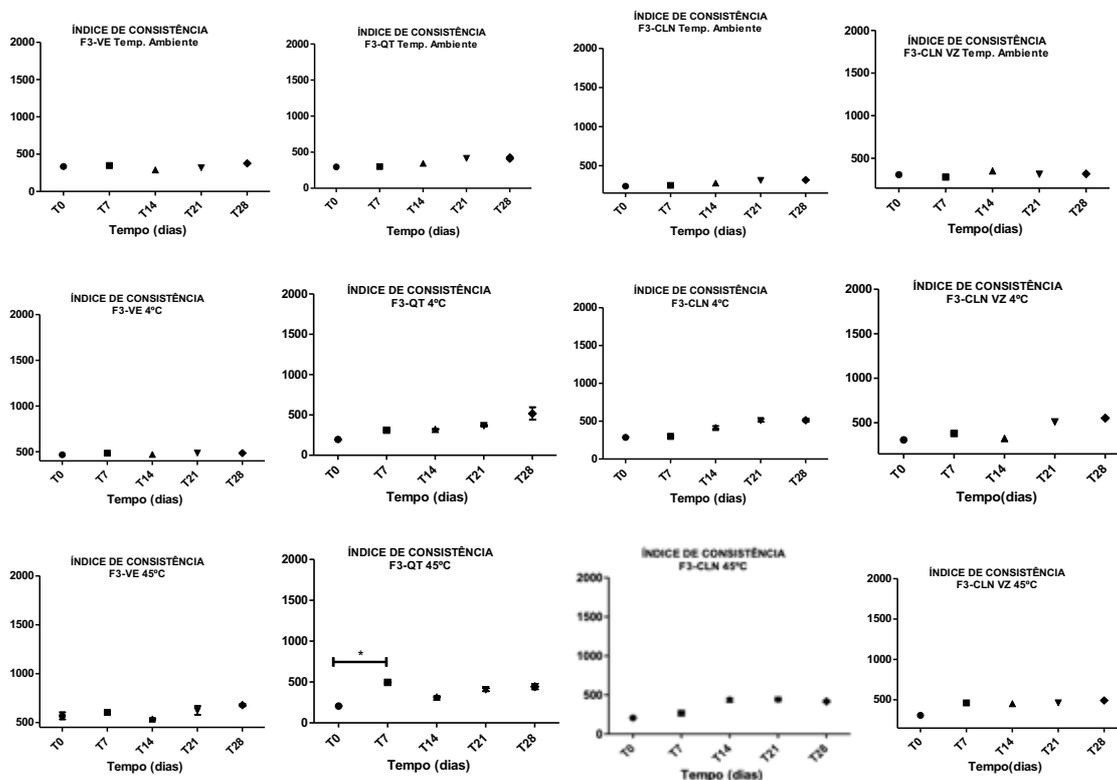
**Figura 16.** Índice de Consistência das formulações F2 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina).

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



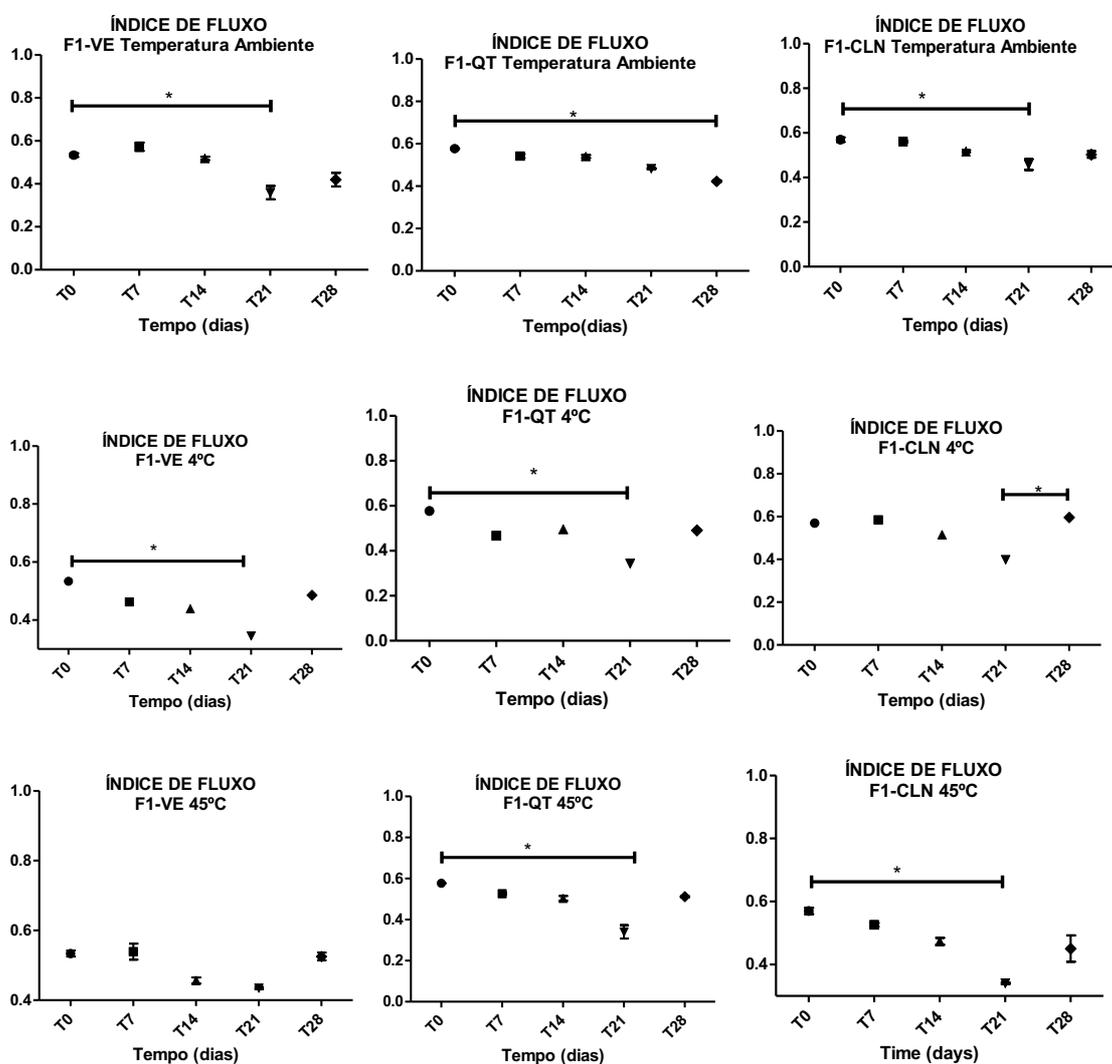
**Figura 17.** Índice de Consistência das formulações F3 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.

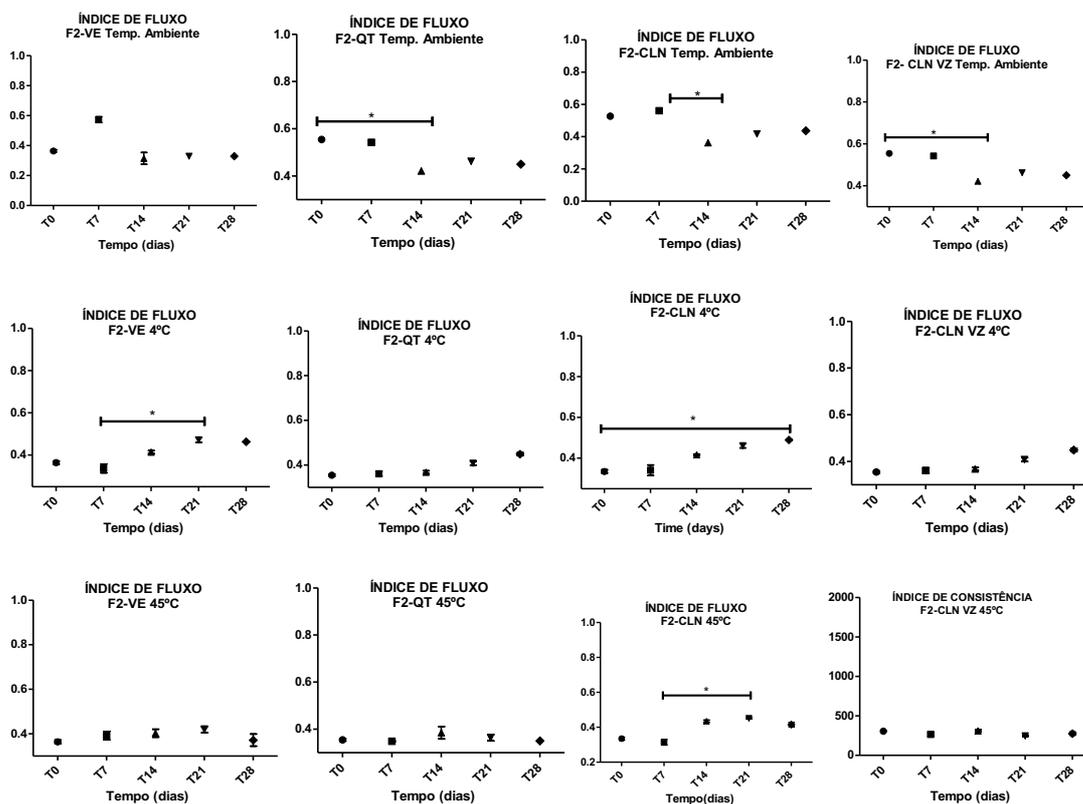


No estudo do índice de fluxo das formulações desenvolvidas, foram notadas algumas oscilações significativas entre os tempos de análise, principalmente nas formulações F1 e F2. De modo geral, as formulações F3 mantiveram seus valores, sem picos de instabilidade, indicando estabilidade física (Figuras 18, 19, 20).

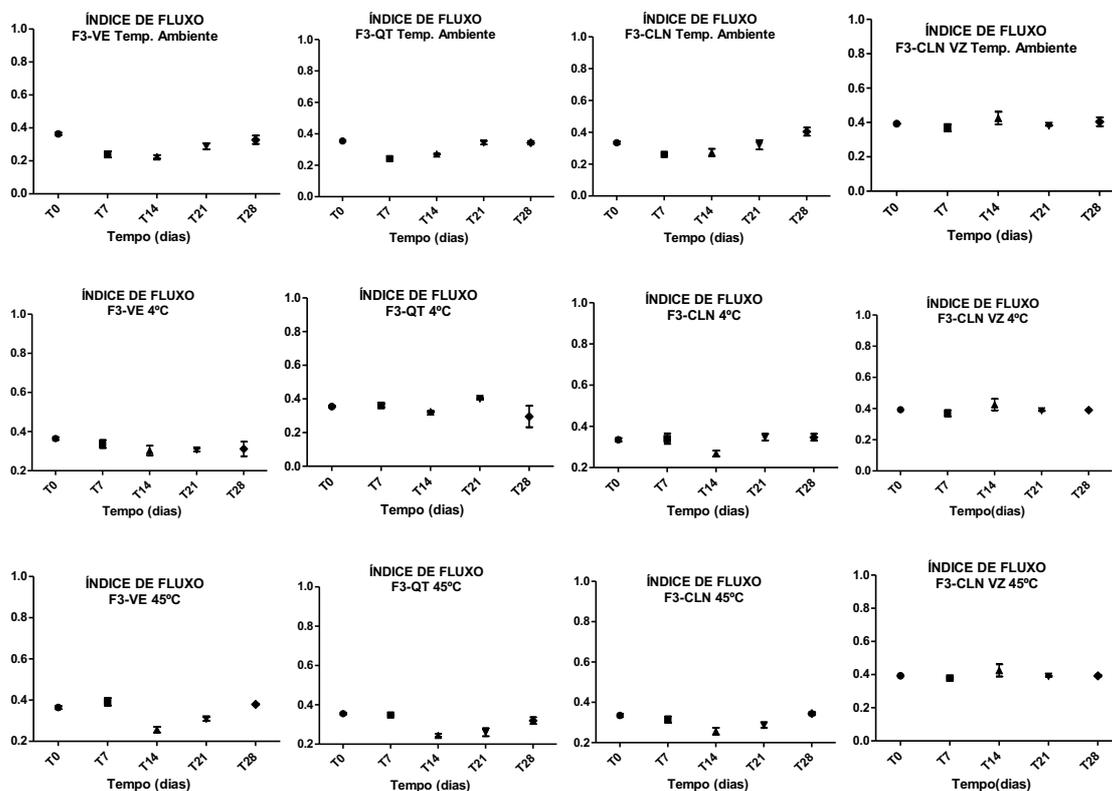
**Figura 18.** Índice de Fluxo das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina). \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



**Figura 19.** Índice de Fluxo das formulações F2 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina). \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.

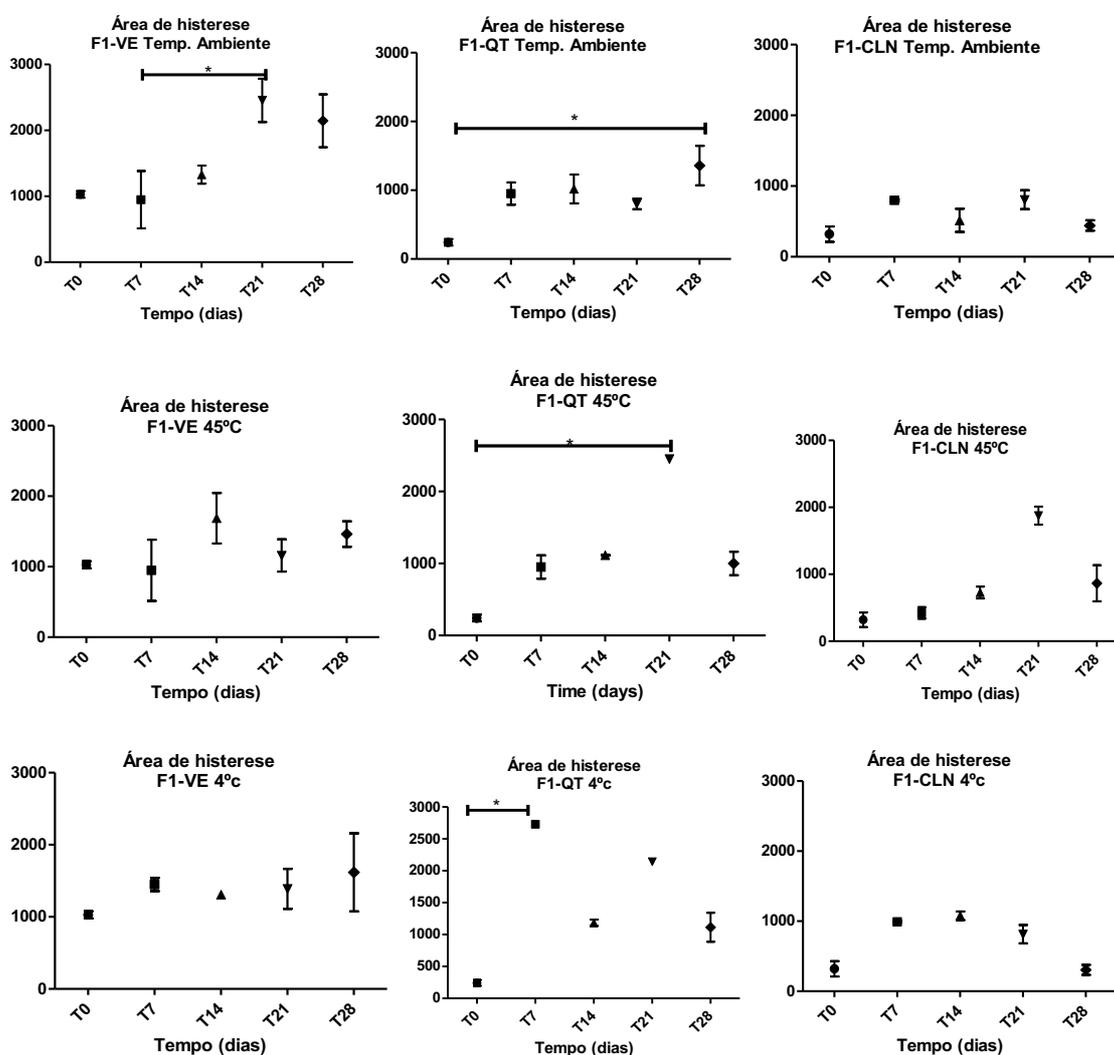


**Figura 20.** Índice de Fluxo das formulações F3 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).

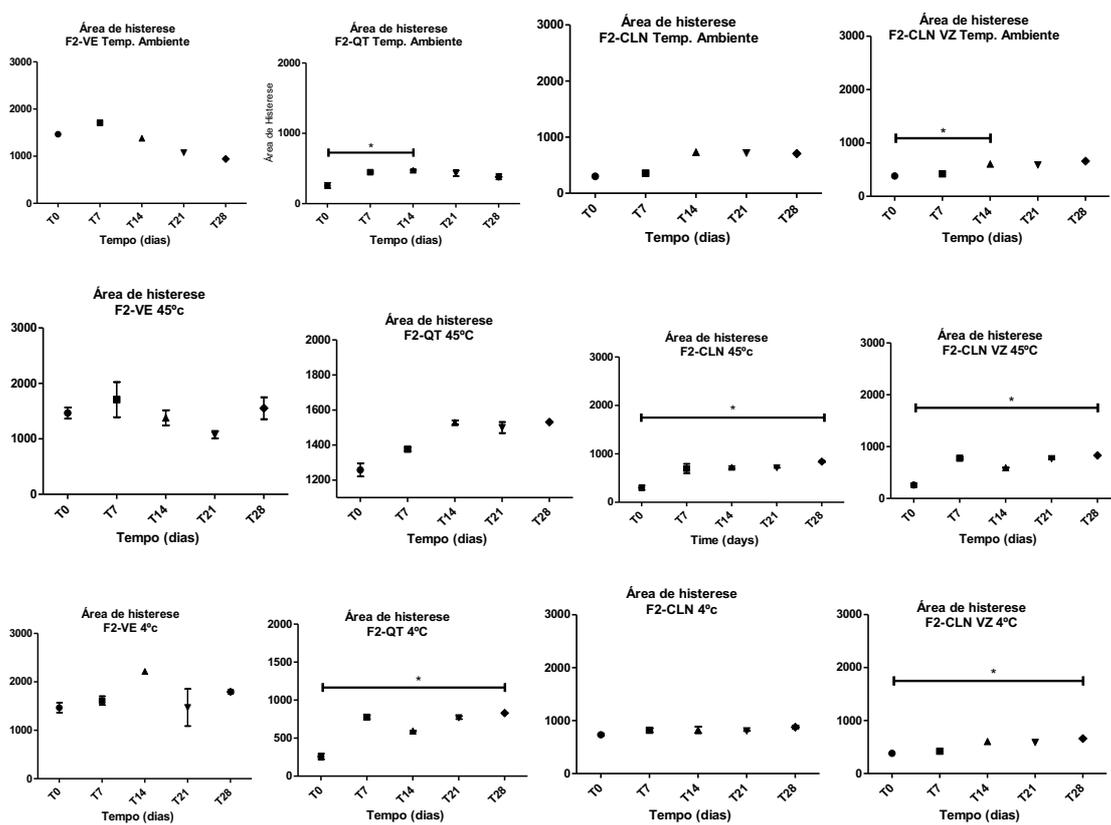


Por fim, os resultados da área de histerese para as formulações F1 foram superiores que as formulações F2 e F3 e apresentaram variações significativas ao longo do tempo, assim como as formulações F2. Já as formulações F3 mantiveram seus valores de área de histerese sem picos de instabilidade, indicando estabilidade física (Figuras 21, 22, 23).

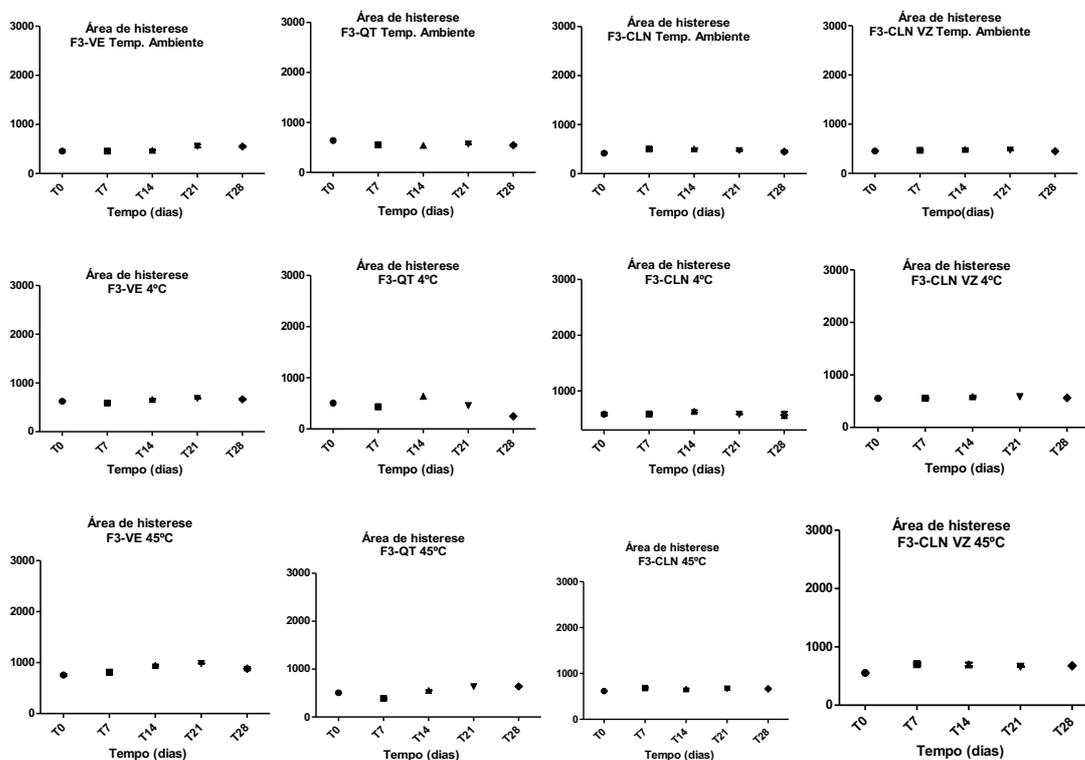
**Figura 21.** Área de histerese das formulações F1 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F1-VE (formulação F1 sem nanocarreador e quercetina); F1-QT (formulação F1 com quercetina); F1-CLN (formulação F1 com CLN contendo quercetina). \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



**Figura 22.** Área de histerese das formulações F2 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F2-VE (formulação F2 sem nanocarreador e quercetina); F2-QT (formulação F2 com quercetina); F2-CLN (formulação F2 com CLN contendo quercetina), F2-CLN VZ (formulação F2 com CLN sem quercetina).\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



**Figura 23.** Área de histerese das formulações F3 após 24 horas e após 28 dias nas temperaturas ambiente (25°C), 4°C e 45°C, F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina), F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina).

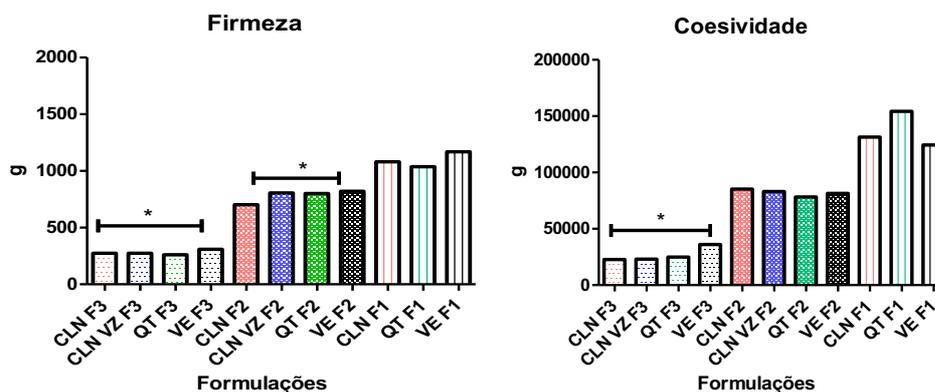


## 6.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA DAS FORMULAÇÕES

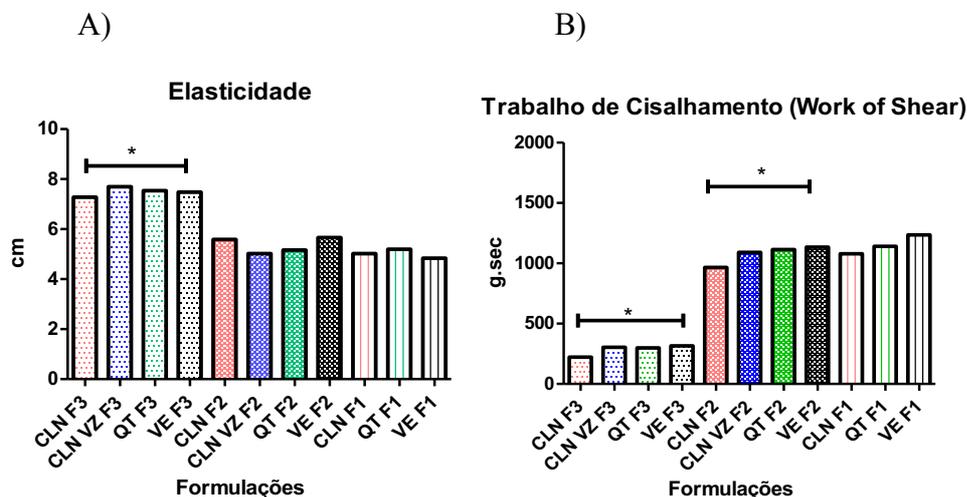
A análise de textura é relevante para a caracterização mecânica de formulações farmacêuticas semi-sólidas, a fim de determinar as interações entre os componentes da formulação, sendo um bom complemento para a informação reológica (MARTO et al, 2016). Dessa forma, parâmetro de rigidez (firmeza) e adesividade (parâmetro de coesividade) podem ser comparados entre si e análise sensorial (TAI et al., 2014).

De acordo com o resultado do teste de espalhabilidade, as formulações F1 apresentaram valores de trabalho de cisalhamento e firmeza maior que as formulações F2 e F3 (Figura 24 e 25). Comparando os resultados do teste de dureza, as formulações de F3 obtiveram menores valores de pegajosidade e coesividade, no entanto apresentou valores maiores de elasticidade, sugerindo que a maneira de adicionar os filtros solares e a incorporação de portadores lipídicos sólidos pode influenciar nas características físicas do cosmético, melhorando a espalhabilidade (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

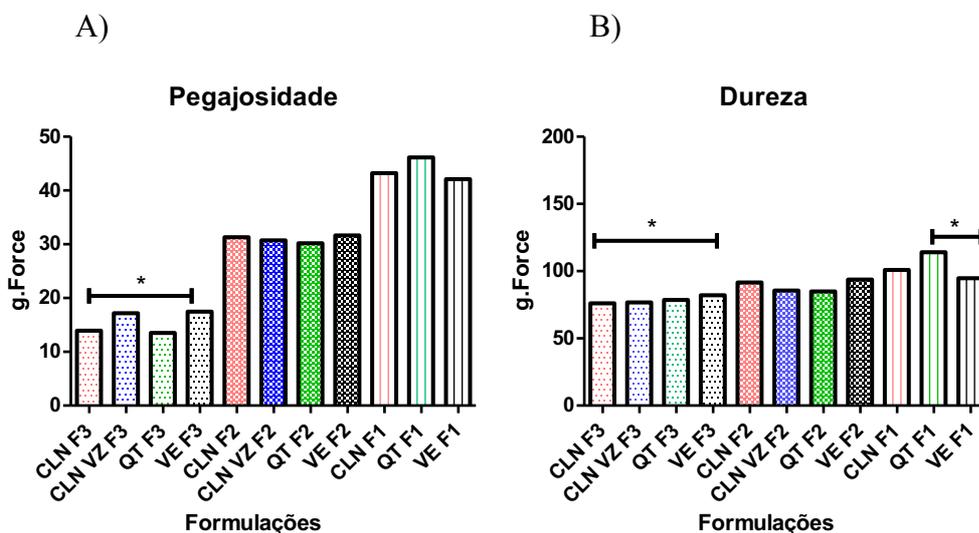
**Figura 24.** Valores de Firmeza e Coesividade das formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



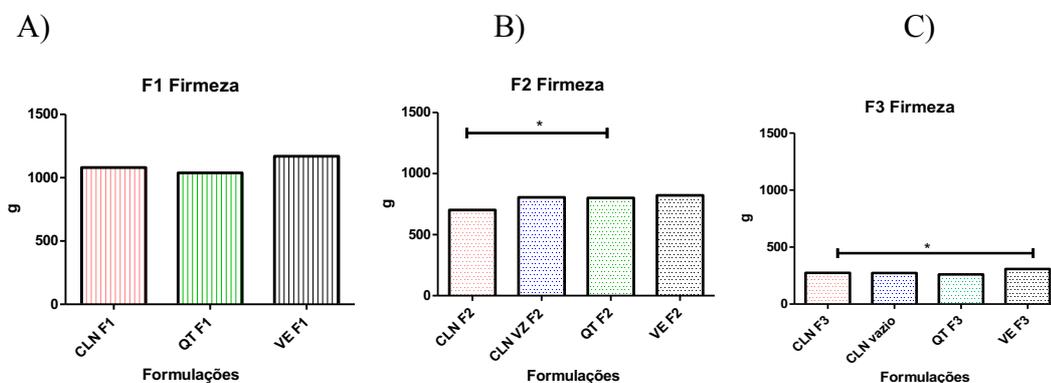
**Figura 25.** Valores de Elasticidade (A) e Trabalho de Cisalhamento (B) das formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



**Figura 26.** Valores de Pegajosidade (A) e Dureza (B) das formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.

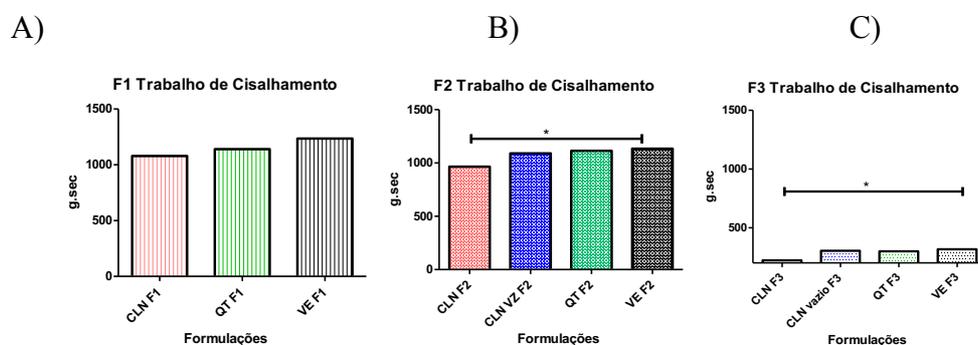


**Figura 27.** Valores de Firmeza das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.

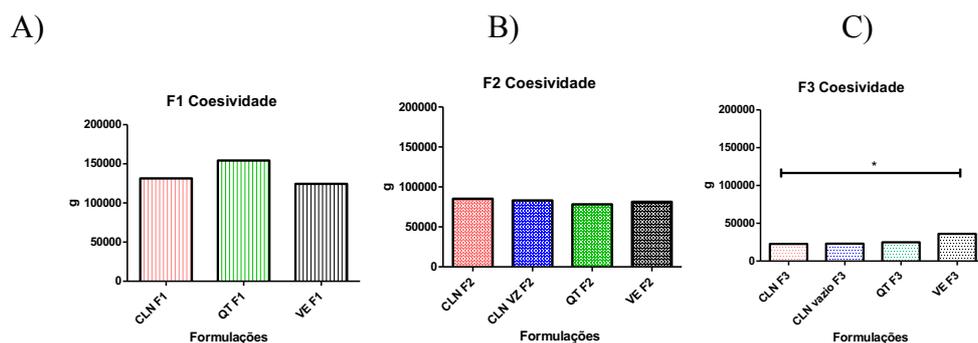


**Figura 28.** Valores do parâmetro Trabalho de Cisalhamento das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura.

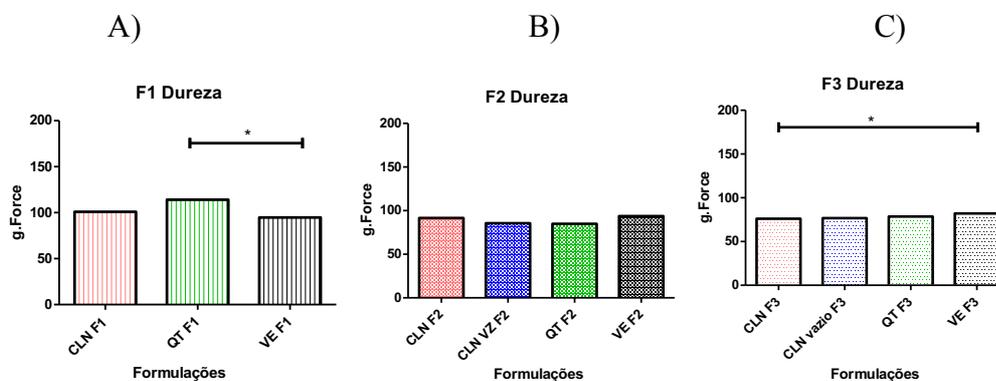
\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



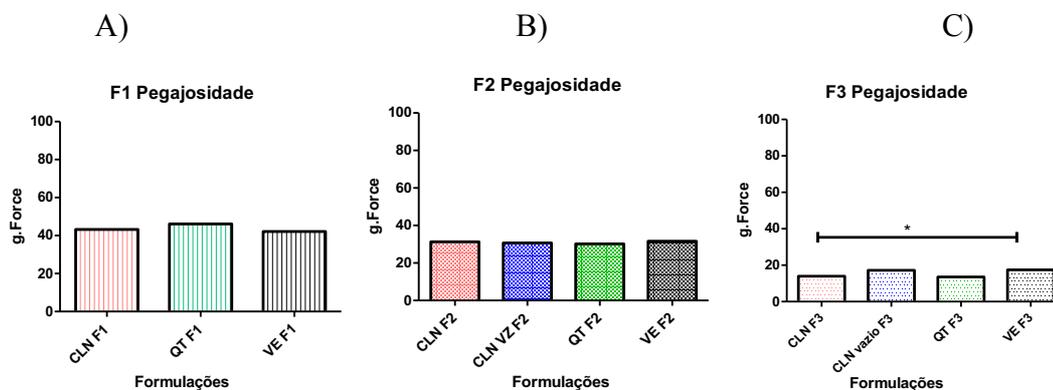
**Figura 29.** Valores da Coesividade das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



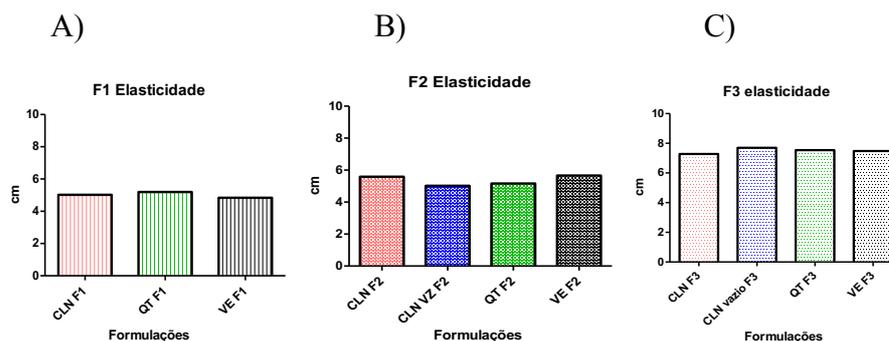
**Figura 30.** Valores do parâmetro Dureza das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador de quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



**Figura 31.** Valores do parâmetro Pegajosidade das formulações fotoprotetoras F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador com quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



**Figura 32.** Valores do parâmetro Dureza das formulações F1 (A), F2 (B) e F3 (C) sem substâncias ativas (VE), adicionadas com quercetina (QT), nanocarreador com quercetina (CLN) ou nanocarreador sem quercetina (CLN) obtidas pela análise de Textura. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.



## 6.6 DETERMINAÇÃO DO FPS *IN VIVO*

Na tabela 9 são apresentados os resultados de FPS *in vivo* das formulações F3-VE (formula com os filtros solares adicionados após a dispersão em *Paraffinum Liquidum (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol*), F3-QT (fotoprotetor com quercetina livre), F3-CLN VZ (fotoprotetor contendo nanopartículas sem quercetina) e F3-CLN (fotoprotetor contendo nanopartículas carregadas com quercetina)

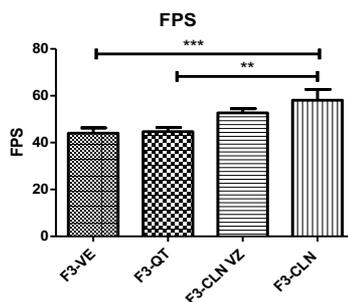
O valor do FPS determinado para fórmula padrão da COLIPA correspondeu ao seu FPS teórico e o valor de IC (%) foi menor que 17% para todas as formulações, validando o teste de FPS *in vivo* para as formulações. Ao comparar as formulações, observa-se que o resultado do FPS das formulas F3-VE e F3-QT foi de cerca de 44, mas o FPS *in vivo* das formulações F3-CLN VZ e F3-CLN apresentou valores ligeiramente superiores, o que caracteriza que a formulação proposta com nanocarreadores apresenta maior eficácia fotoprotetora.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados foram escolhidos devido a sua capacidade de proteger substâncias ativas instáveis ou com baixa permeação cutânea, como a quercetina, e promover a liberação de maneira controlada devido as propriedades oclusivas dos lipídios, além de apresentar propriedades bloqueadoras da radiação UV (JOSE & NETTO, 2019).

Tabela 9: Valores obtidos para o FPS *in vivo* para as formulações F3-VE (fotoprotetor sem nanocarreadores e quercetina, F3-QT (fotoprotetor com quercetina livre), F3-CLN (fotoprotetor com carreadores lipídicos nanoestruturados de quercetina) e F3-CLN VZ (fotoprotetor com carreadores lipídicos nanoestruturados sem quercetina).

Produto	FPS <i>in vivo</i>			
	Amostra		Padrão COLIPA	
	Valor	IC (%)	Valor	IC (%)
F3-VE	44,0	11,6	15,2	14,8
F3-QT	44,5	8,6	16,4	5,4
F3-CLN	59,0	9,1	14,7	8,1
F3-CLN VZ	57,0	9,4	14,7	8,1

**Figura 33** - Valores do FPS *in vivo* das formulações. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações analisadas.

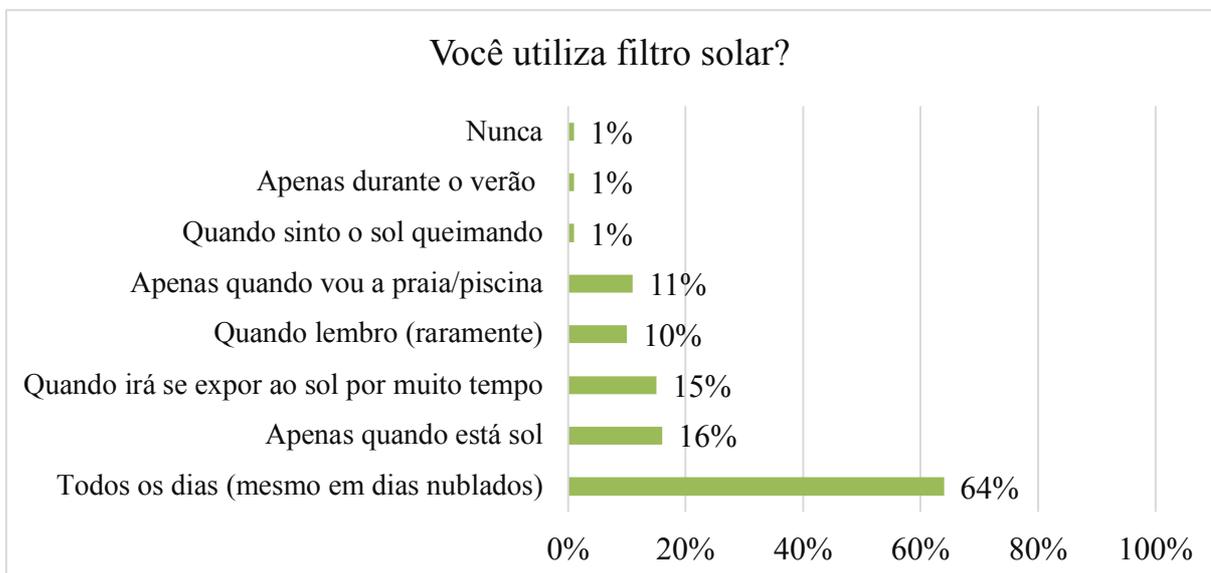


## 6.7 TRIAGEM DAS PARTICIPANTES

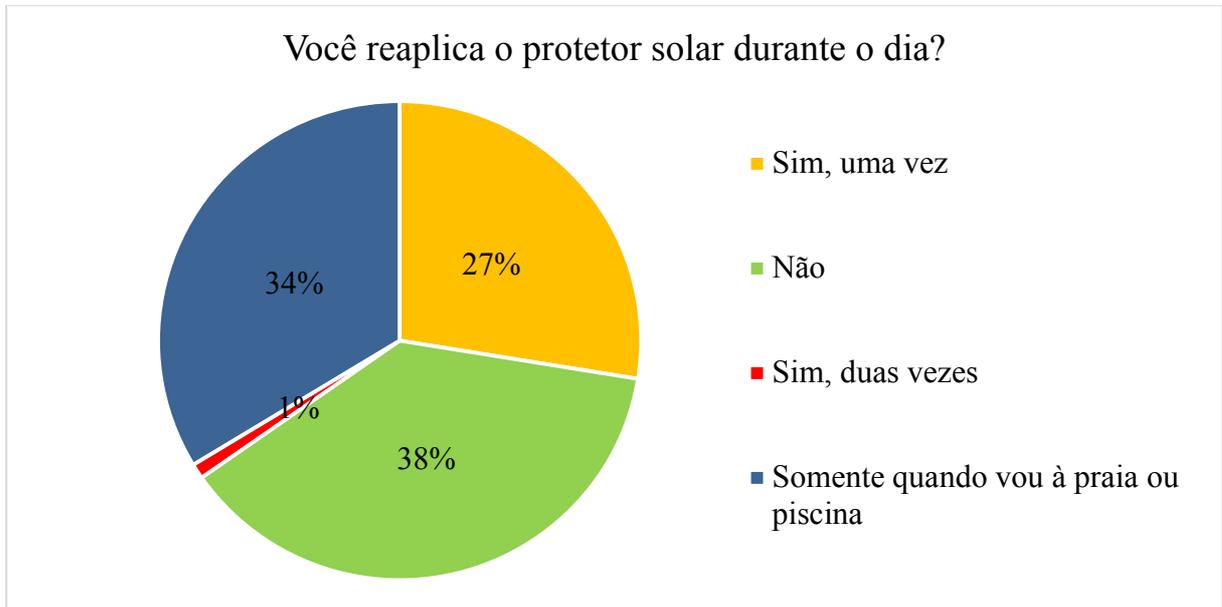
Foram recrutados 100 participantes para o estudo do sexo feminino, com idade entre 20 e 35 anos, entretanto 40 participantes condiziam com algum critério de exclusão descrito, o mais comum foi não utilizar fotoprotetor diariamente e 60 participantes, todas mulheres, condiziam com os critérios de inclusão para participação da avaliação dos efeitos imediatos e a longo prazo das formulações. O tempo diário de exposição ao sol, frequência a exposição, o uso de protetor solar, FPS que as participantes utilizam e locais de aplicação são mostrados nas Figuras 34 a 40.

A frequência de bronzamento tem reduzido ao longo dos anos, entretanto o uso de protetor solar aumentou. No que se refere aos hábitos de fotoproteção, 60% das participantes recrutadas utilizam diariamente filtro solar (Figura 34), entretanto 38% das participantes não reaplicavam o filtro solar durante o dia e 34% reaplicava apenas quando vão para praia ou piscina (Figura 35). 49% das voluntárias se expõe diariamente menos de 1 hora por dia (Figura 36) e a grande maioria (80%) para se descolar de um local para outro (Figura 37).

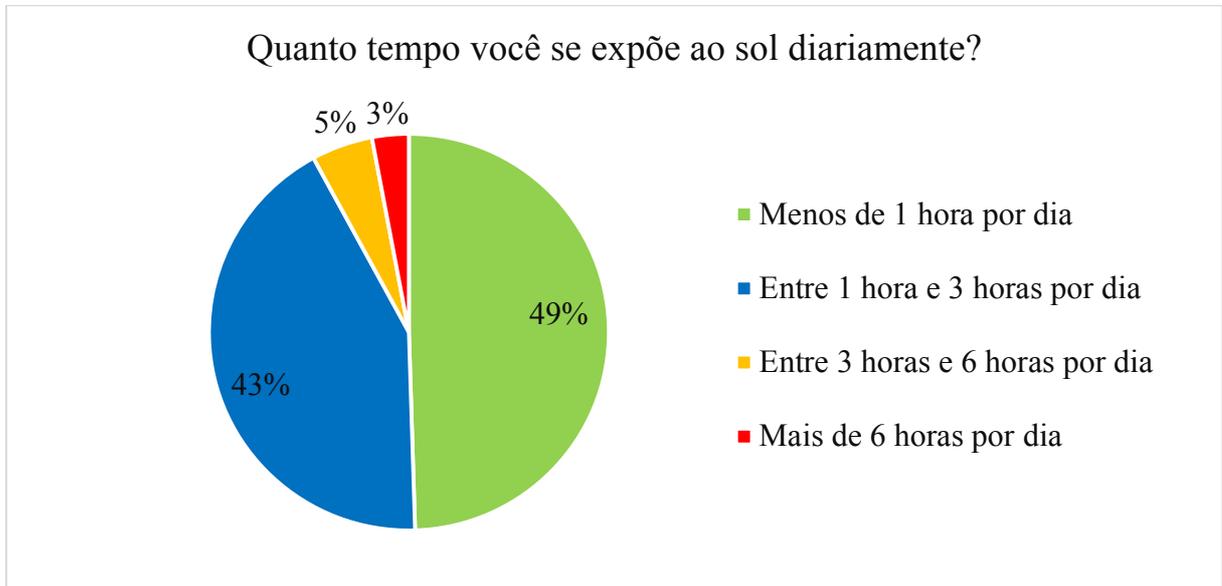
**Figura 34.** Porcentagem de participantes que utilizam ou não protetor solar (n=100)



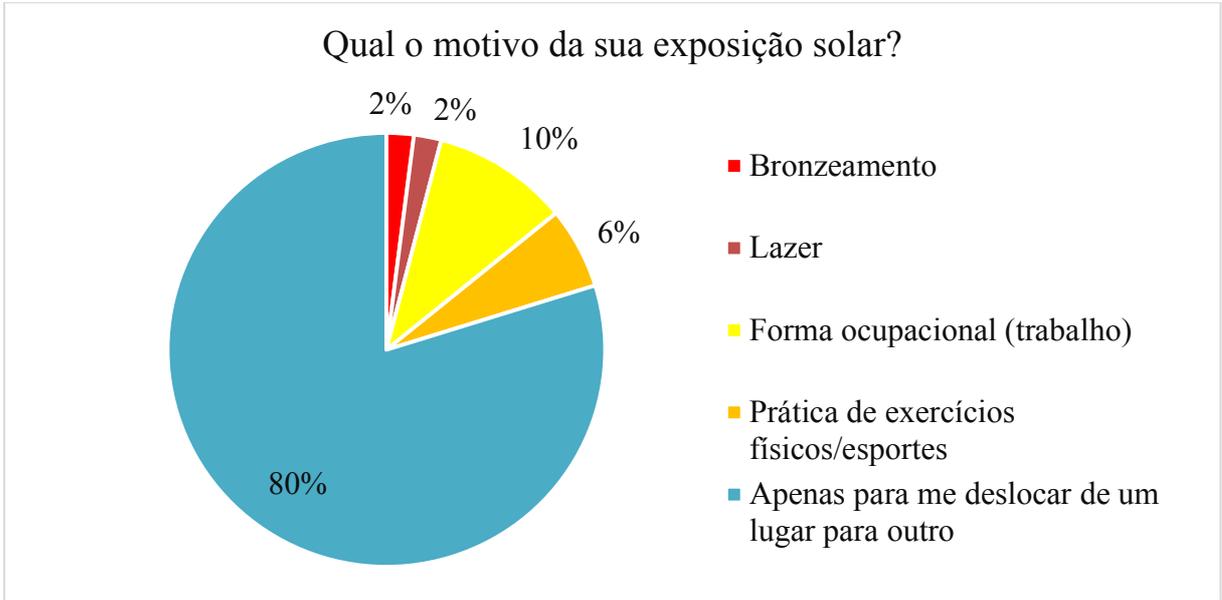
**Figura 35.** Frequência de reaplicação do protetor solar durante o dia (n=100)



**Figura 36.** Porcentagem do tempo de exposição ao sol diariamente das participantes (n=100)

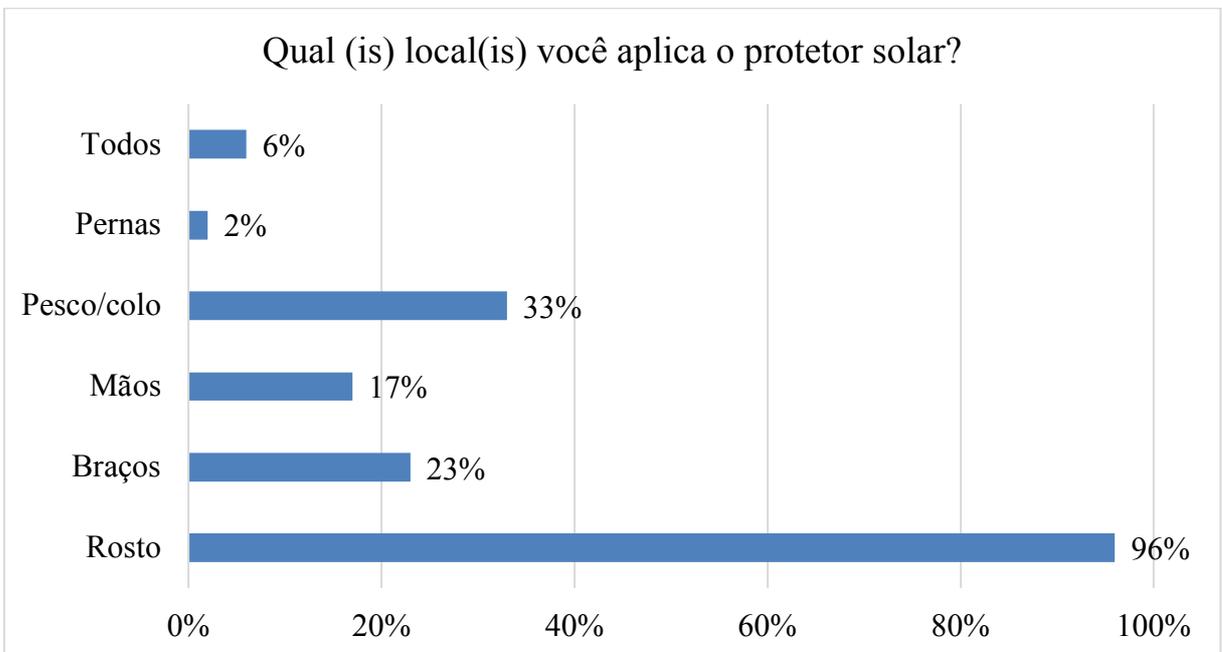


**Figura 37.** Porcentagem do motivo da exposição ao sol das participantes (n=100)

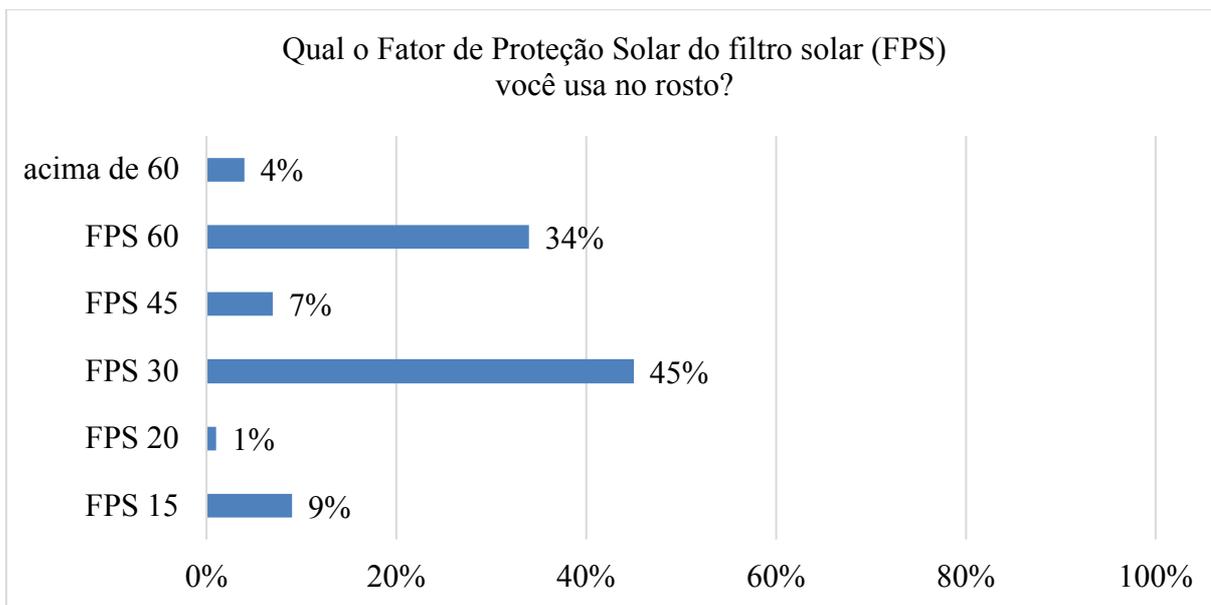


As participantes foram questionadas sobre o local de aplicação do filtro solar, 96% das participantes relataram usar filtro solar no rosto (Figura 38), sendo 45% das participantes utilizam protetores solares com FPS 30 e 34% com FPS 60 (Figura 39).

**Figura 38.** Regiões de aplicação do protetor solar (n=100)

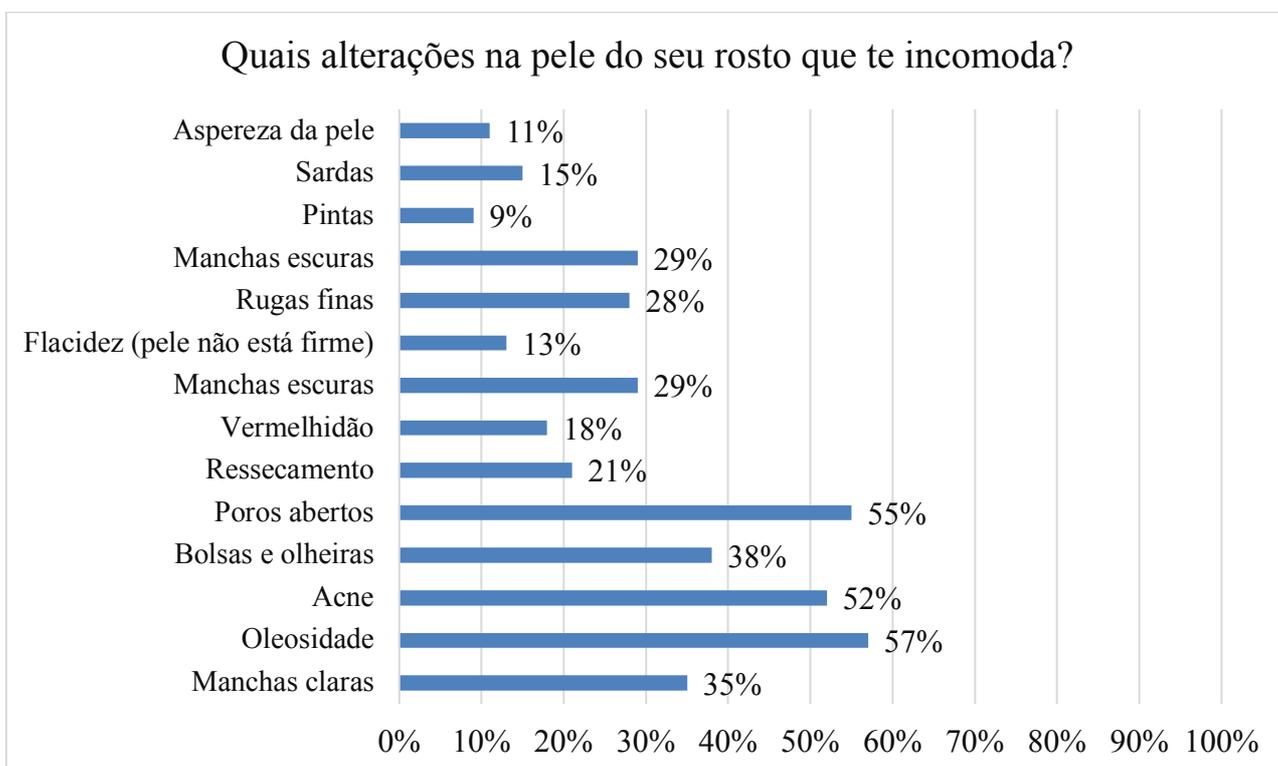


**Figura 39.** Fator de Proteção Solar (FPS) que as participantes utilizam no rosto (n=100)



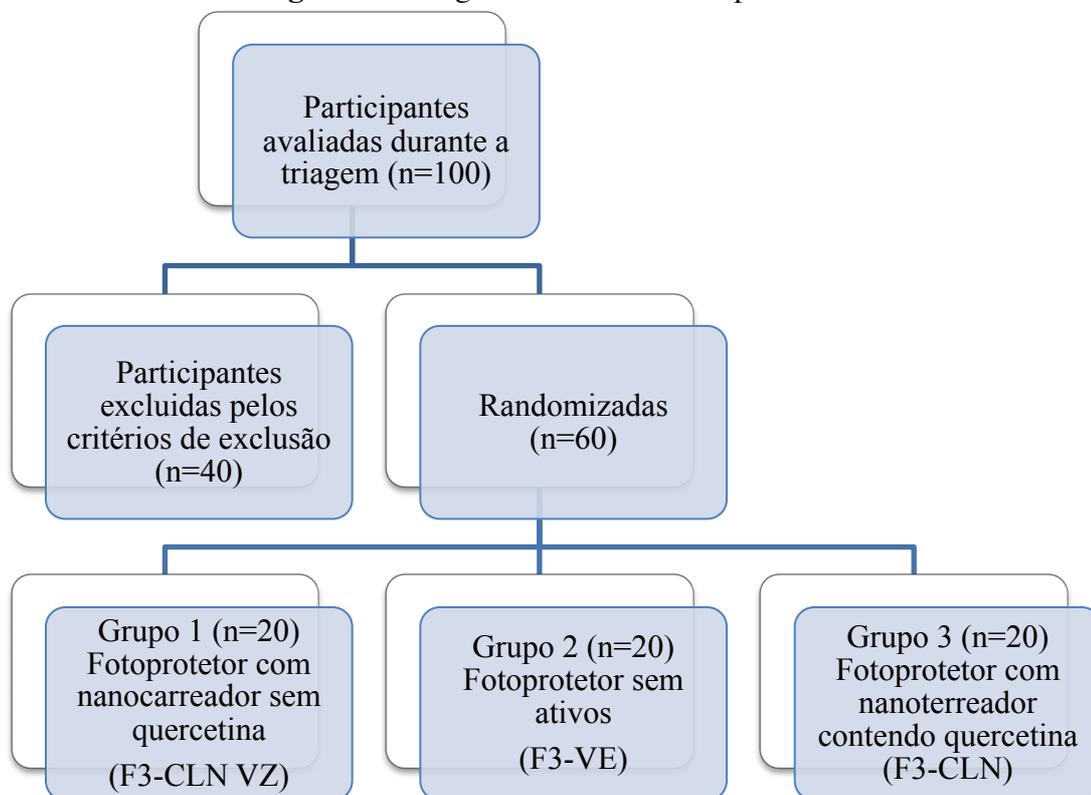
Quando as participantes foram questionadas sobre as principais alterações na pele do rosto que as incomodavam, as principais características foram: oleosidade (57%), poros abertos (55%), acne (52%), bolsas e olheiras (38%) e manchas claras (35%) (Figura 40).

**Figura 40.** Principais características do rosto que incomodam as participantes (n=100)



As características das participantes alocadas no estudo estão apresentadas na Tabela 10 e a divisão das participantes nos grupos do estudo clínico a longo prazo na Figura 41

**Figura 41.** Diagrama de fluxo da etapa clínica



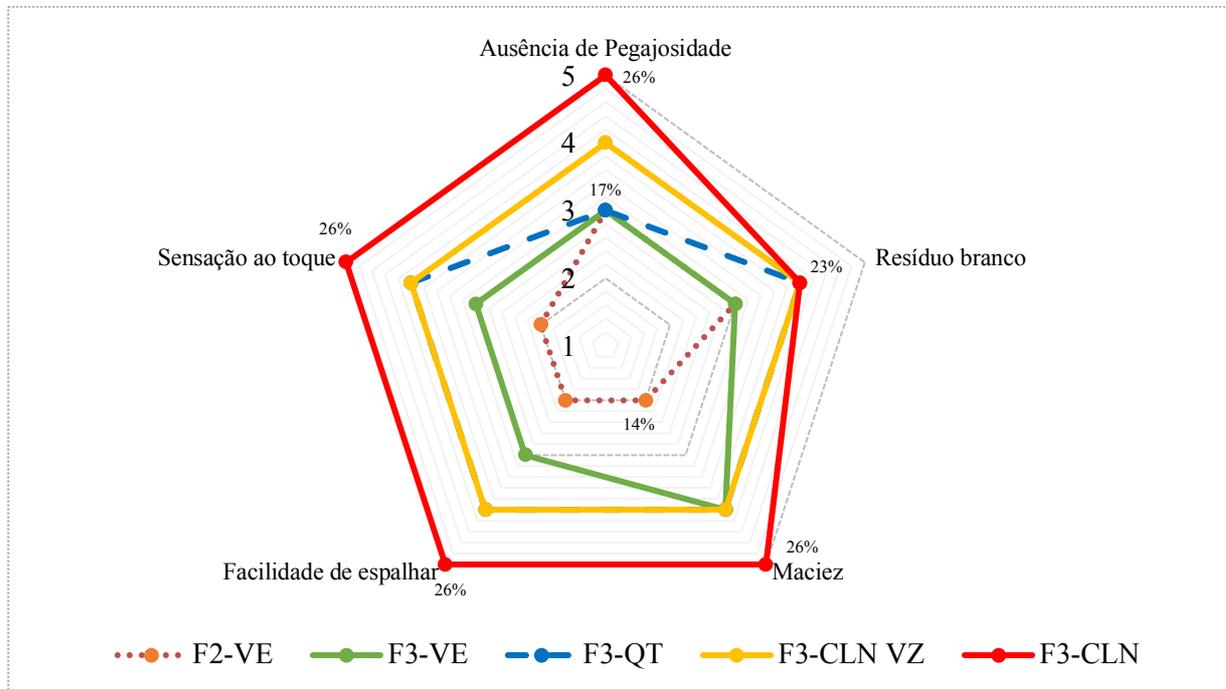
**Tabela 10.** Características das participantes alocadas no estudo (n=60)

	Número de participantes	%
Idade, Media (DP)	27,5± 2	
Fototipo (Fitzpatrick)		
III	35	58,3%
II	25	41,6%
Tipo de pele		
Normal	12	20%
Mista	23	38,3%
Oleosa	22	36,6%
Sensível	3	5%

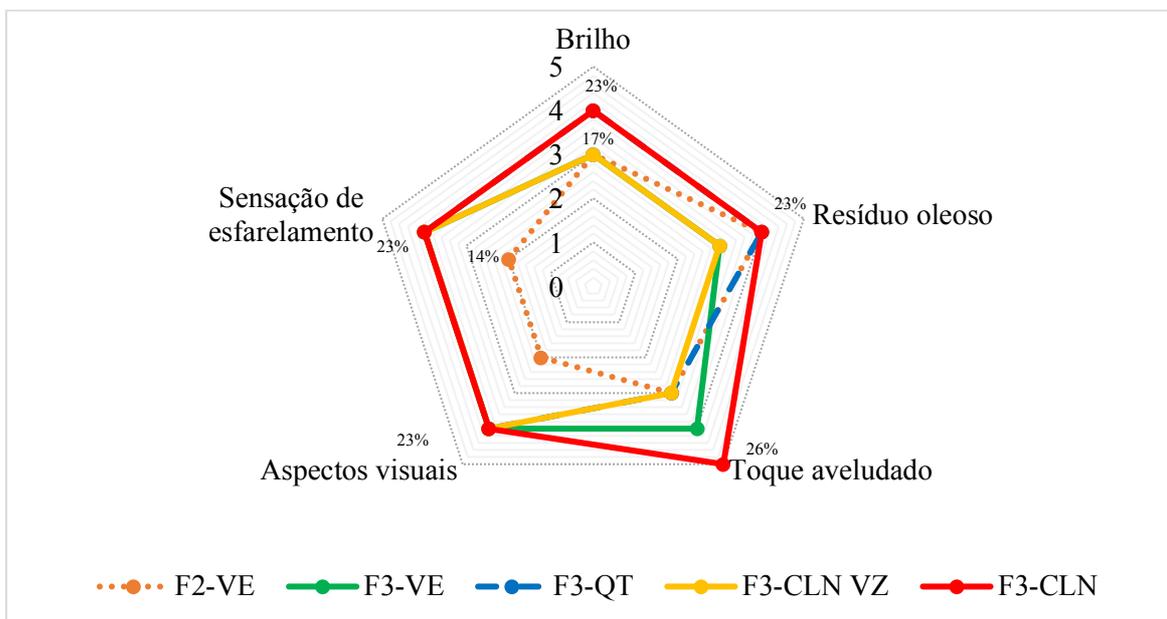
## 6.8 ANÁLISE SENSORIAL

Com a análise dos resultados (Figuras 42 a 44) foi possível notar que as formulações no geral tiveram boa porcentagem de aceitação pelas participantes do estudo. As formulações F3- QT, F3-CLN VZ e F3-CLN apresentaram características sensoriais semelhantes, destacando os parâmetros "Maciez", "Facilidade de espalhar" e "Sensação ao Toque" bem como sensação após 5 minutos de aplicação no parâmetro "toque aveludado" que foram mais significativos na formulação F3-CLN com 53% dos participantes declarando intenção de compra. Relacionando o resultado da análise sensorial ao resultado da reologia e textura, foi possível desenvolver uma formulação bem aceita pelos participantes, conforme demonstrado pelos parâmetros "Fácil de Aplicar" e "Suavidade" (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

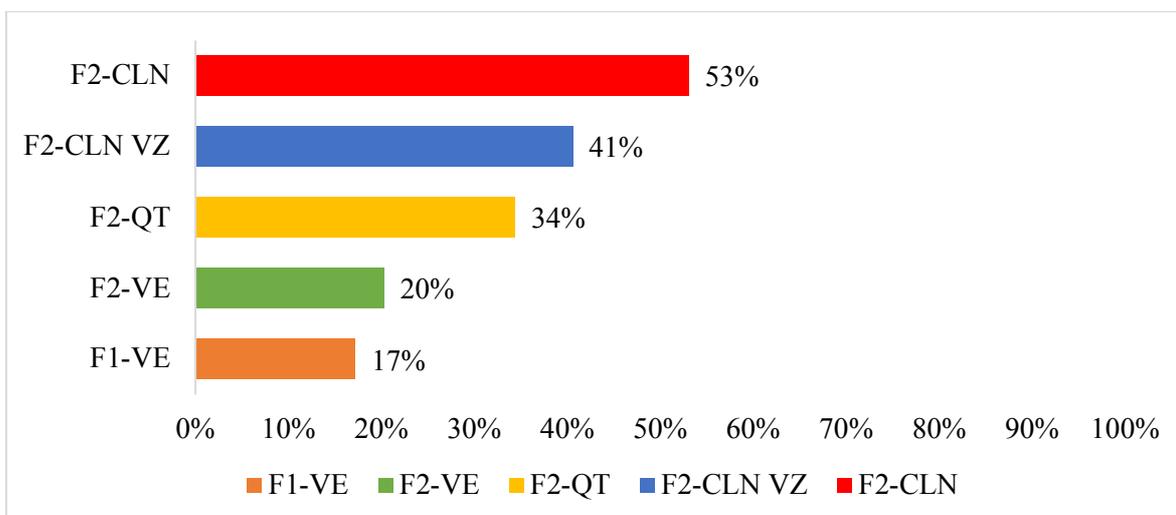
**Figura 42.** Propriedades sensoriais das formulações F2-VE (formulação F2 fotoprotetora sem substâncias ativas), F3-VE (formulação F3 sem substâncias ativas); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina) e F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina), após a aplicação quanto aos parâmetros: Ausência de Pegajosidade, Sensação ao Toque, Facilidade de Espalhar, Resíduo Branco e Maciez. Sendo atribuído as notas: 1 - Péssimo, 2 – Ruim, 3 - Regular, 4 - Bom, 5- Excelente (n = 60).



**Figura 43.** Propriedades sensoriais das formulações F2-VE (formulação F2 fotoprotetora sem substâncias ativas), F3-VE (formulação F3 sem substâncias ativas); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina) e F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina), após 5 minutos da aplicação quanto aos parâmetros: Brilho, Sensação de Esfarelamento, Resíduo Oleoso, Aspectos Visuais e Toque Aveludado. Sendo atribuído as notas: 1 - Péssimo, 2 – Ruim, 3 - Regular, 4 - Bom, 5- Excelente (n = 60).



**Figura 44.** Avaliação da intenção de compra das formulações F2-VE (formulação F2 fotoprotetora sem substâncias ativas), F3-VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); F3-QT (formulação F3 com quercetina); F3-CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina) e F3-CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina) (n = 60).

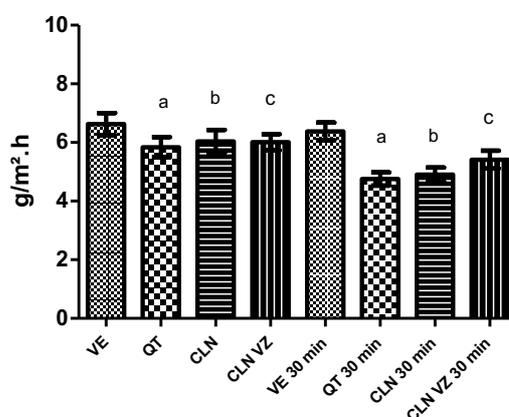


## 6.9 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMEDIATOS

### 6.9.1 Perda transepidermica de água

Após 30 minutos de aplicação das formulações F3-QT, F3-CLN e F3-CLN VZ diminuíram a perda transepidermica de água (TEWL) ( $p < 0,05$ ) (Figura 45).

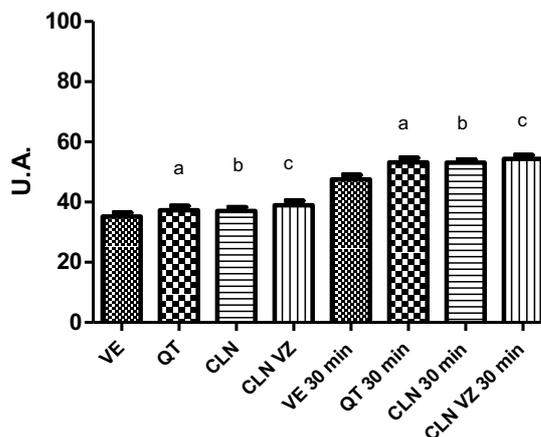
**Figura 45.** Perda de água transepidermica antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina). Mesma letra são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) ( $n = 60$ ).



### 6.9.2 Conteúdo aquoso do estrato córneo

Em relação ao conteúdo aquoso do estrato córneo, as formulações F3-QT, F3-CLN e F3-CLN VZ aumentaram significativamente conteúdo aquoso do estrato córneo (Figura 46) sugerindo que a presença de nanocarreadores e quercetina na formulação, melhorou a função de barreira da pele, permitindo a manutenção do nível adequado de hidratação.

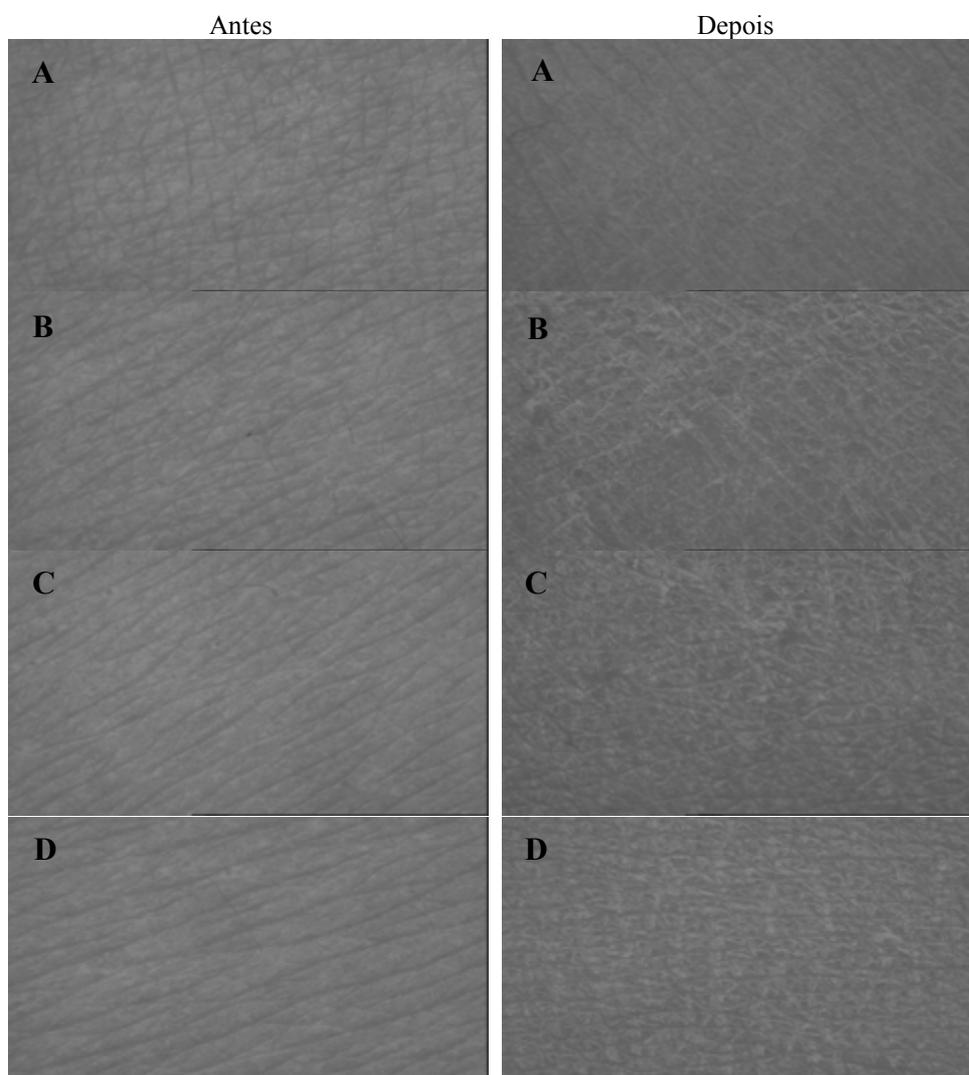
**Figura 46.** Conteúdo aquoso do estrato córneo antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina). Mesma letra são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) ( $n = 60$ ).



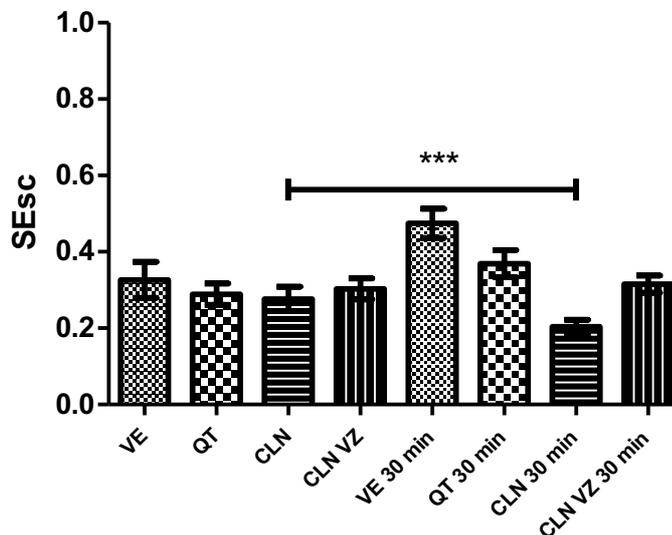
### 6.9.3 Avaliação do microrrelevo cutâneo

Os valores para SEsc (descamação da pele), SEsm (maciez da pele) e SEw (número e largura das rugas) (Figuras 48, 49 e 50), diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ) após a aplicação da formulação F3-CLN. Por outro lado, os valores do SER (Figura 51) aumentaram, quando comparados com outras formulações e os valores basais.

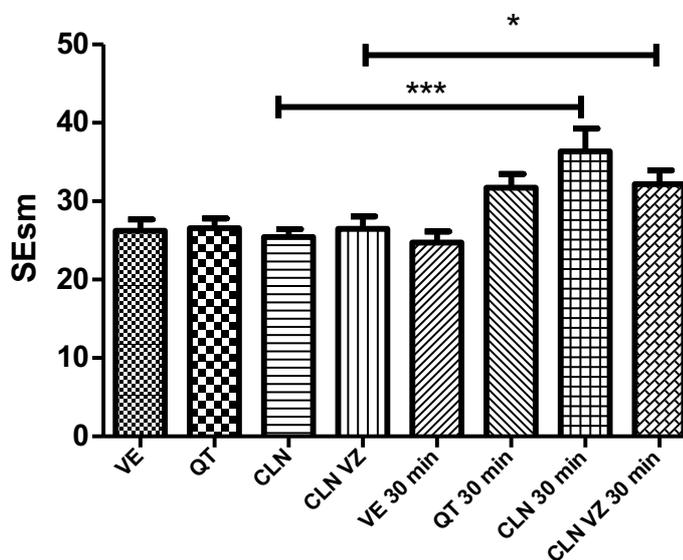
**Figura 47.** Topografia da pele antes e depois da aplicação das formulações: A (F3-VE), B (F3-QT), C (F3-CLN VZ) e D (F3-CLN)



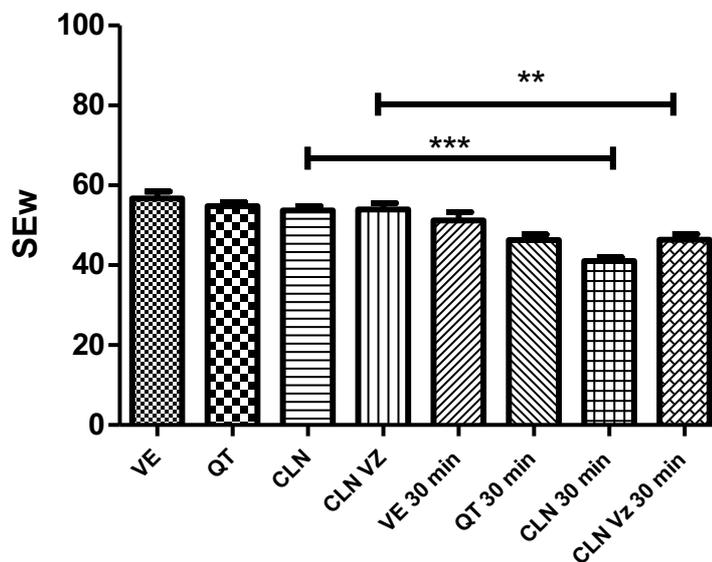
**Figura 48.** Descamação da pele (SEsc) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina) \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p \leq 0,05$ ).



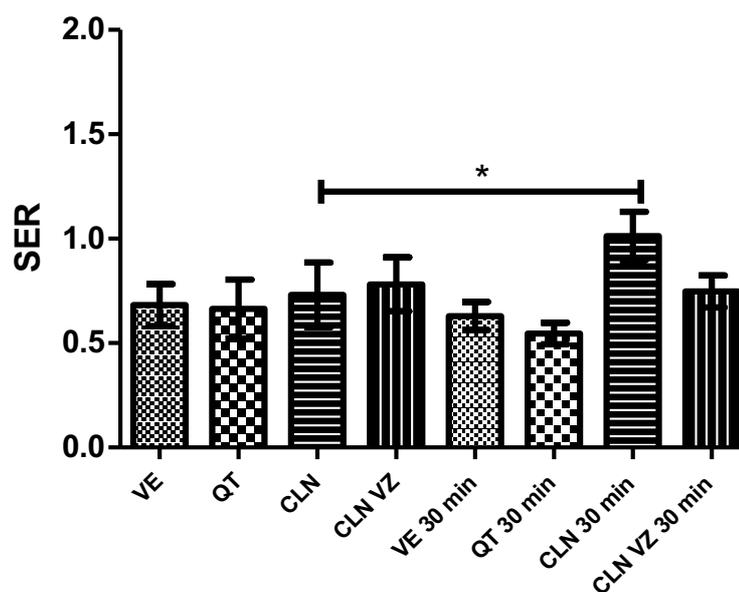
**Figura 49.** Maciez da pele (SEsm) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina) \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 50.** Número e largura das rugas (SEw) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 51.** Parâmetro SER (Rugosidade da pele) antes e 30 minutos após a aplicação das formulações: VE (formulação F3 sem nanocarreador e quercetina); QT (formulação F3 com quercetina); CLN (formulação F3 com CLN contendo quercetina); CLN VZ (formulação F3 com CLN sem quercetina). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p \leq 0,05$ ).

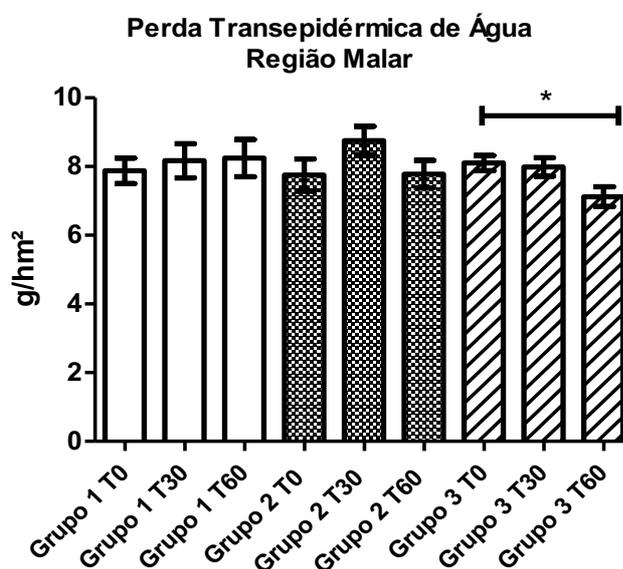


## 6.10 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EM LONGO PRAZO

### 6.10.1 Perda transepidérmica de água

Após 60 dias de utilização das formulações desenvolvidas, foram observadas diferenças significativas nos valores de TEWL do grupo 3 que utilizou a formulação F3-CLN (fotoprotetor com nanopartículas contendo quercetina) quando comparados com os valores basais (Figura 52).

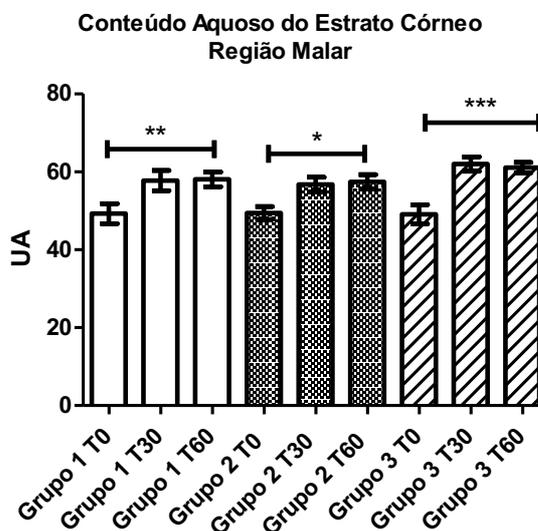
**Figura 52.** Perda transepidérmica de água (TEWL) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), Grupo 3 (F3-CLN) \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



### 6.10.2 Conteúdo aquoso do estrato córneo

No parâmetro de conteúdo aquoso do estrato córneo, foi possível observar que houve aumento estatisticamente na hidratação com aplicação das formulações F3-VE (Grupo 2), F3-CLN VZ (Grupo 1), porém a formulação F3-CLN (Grupo 3) teve elevação significativamente superior quando comparado aos valores (Figura 53).

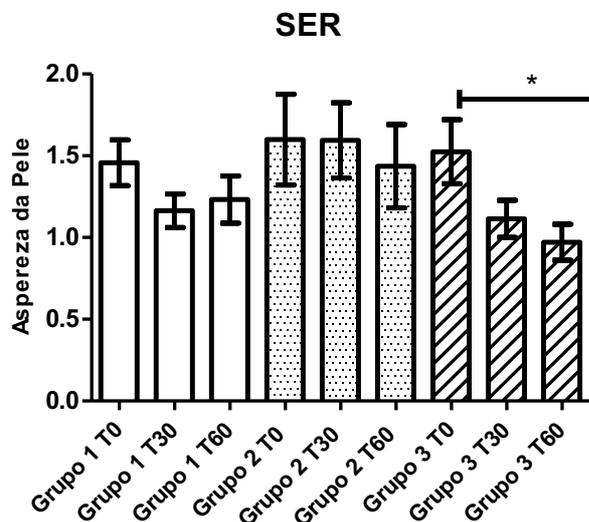
**Figura 53.** Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), Grupo 3 (F3-CLN) \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



### 6.10.3 Avaliação do microrrelevo cutâneo

No estudo do microrrelevo cutâneo, foi possível notar diferenças significativas no parâmetro da rugosidade da pele (SER) (Figura 54) no grupo 3 que utilizou a formulação fotoprotetora com nanopartículas contendo quercetina após 60 dias quando comparado com os valores basais. Os outros grupos não sofreram alterações estatisticamente significativas quando comparados com os valores basais.

**Figura 54.** Rugosidade da pele (SER) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).

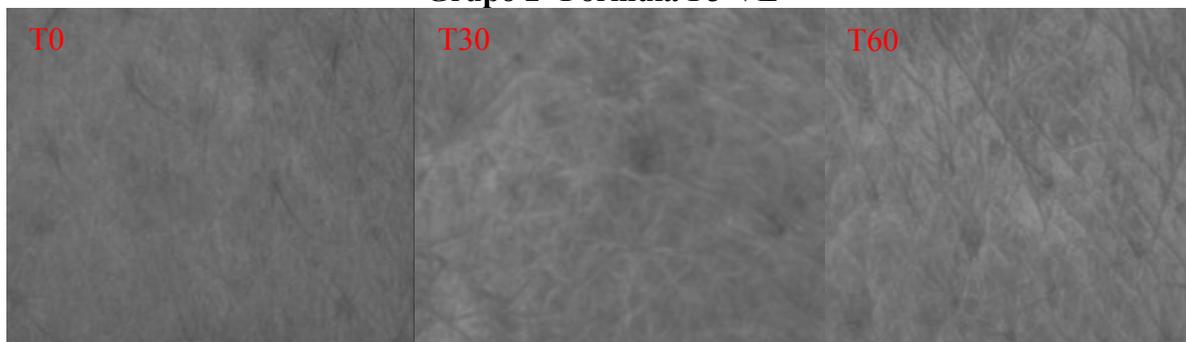


**Figura 55.** Topografia da pele antes da utilização das formulações (T0) depois de 30 dias (T30) e 60 dias (T60) da aplicação das formulações: Grupo 1- Formula F3-CLN VZ, Grupo 2- Formula F3-VE, Grupo 3- Formula F3-CLN.

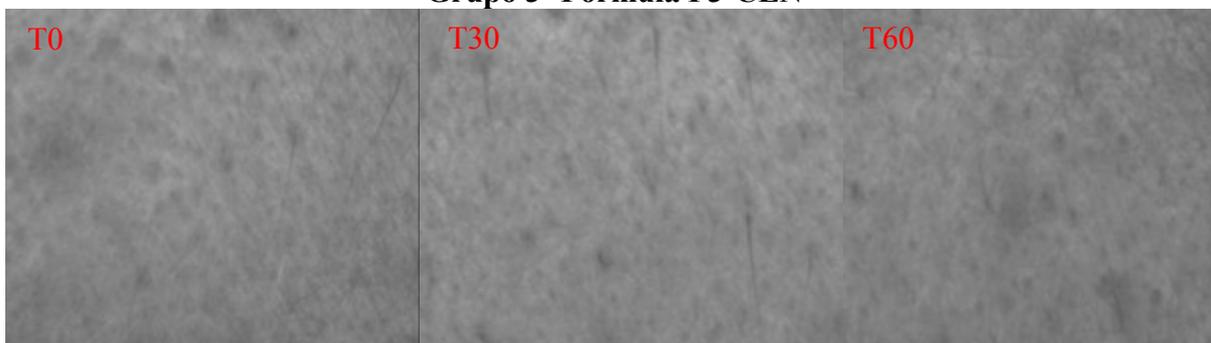
**Grupo 1- Formula F3-CLN VZ**



**Grupo 2- Formula F3-VE**

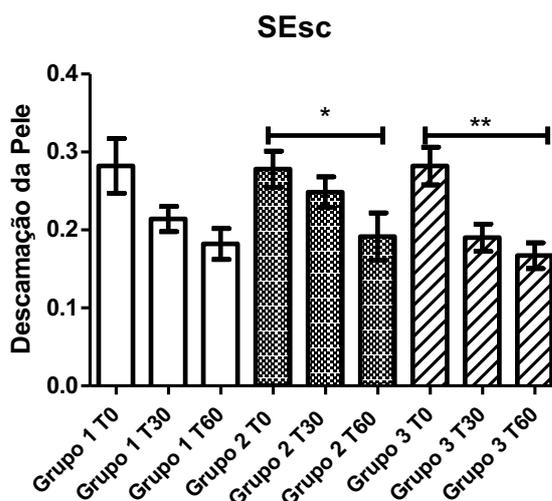


**Grupo 3- Formula F3-CLN**

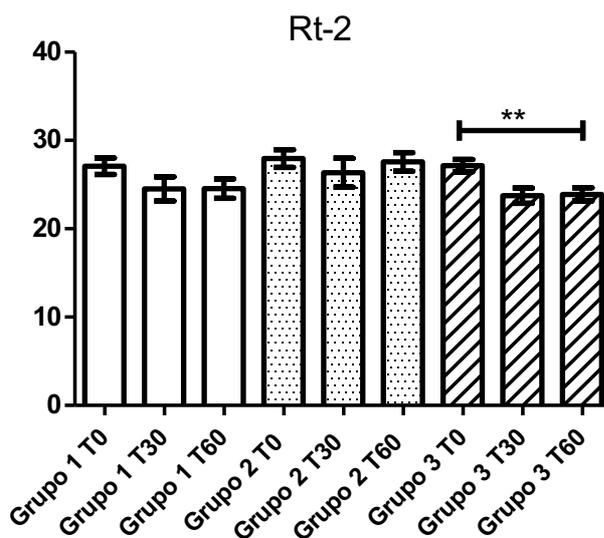


No parâmetro de descamação da pele (SEsc) (Figura 56), foi possível notar diferenças significativas nos grupos 1 (formulação F3-VE) e grupo 3 (formulação F3-CLN) e tendência a diminuição do grupo 2 (formulação F3-CLN VZ). Já o parâmetro CR-2 (rugosidade da pele) (Figura 57) apresentou diminuição significativa para o grupo 3 com relação aos valores basais.

**Figura 56.** Descamação da pele (SEsc) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).

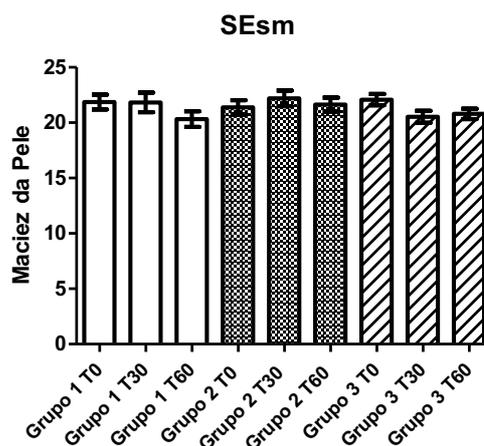


**Figura 57.** Parâmetro Rt-2 (Rugosidade da pele) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).

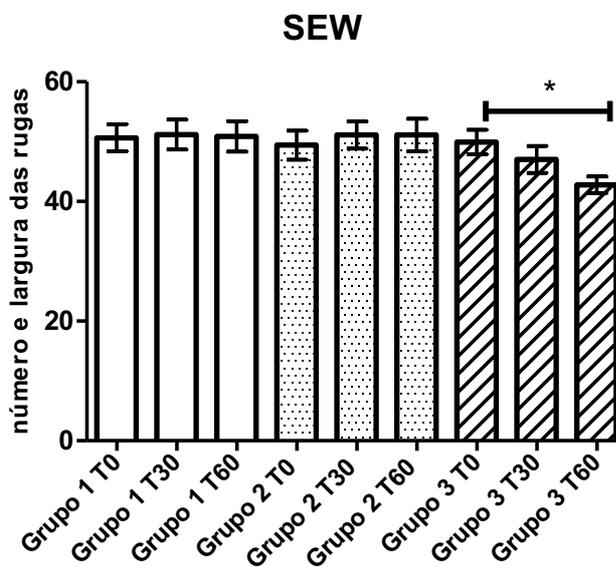


Para o parâmetro de maciez da pele (SEsm) (Figura 58) não foram notadas diminuições significativas nos grupos de estudo, porem no parâmetro SEW (Número e rugosidade da pele) (Figura 59) foi possível observar diminuição significativa do grupo 3 (formulação F3-CLN) após 60 dias.

**Figura 58.** Maciez da pele (SEsm) malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).



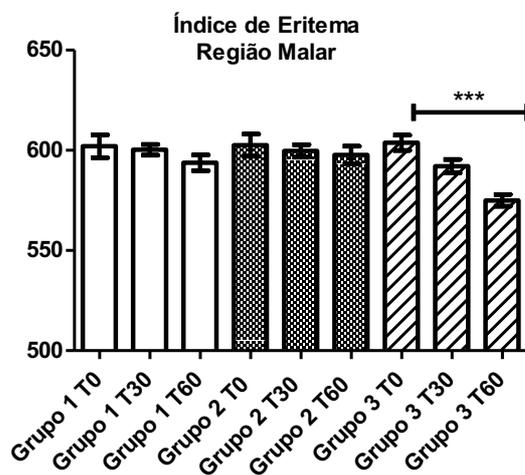
**Figura 59.** Rugas da pele (SEW) malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



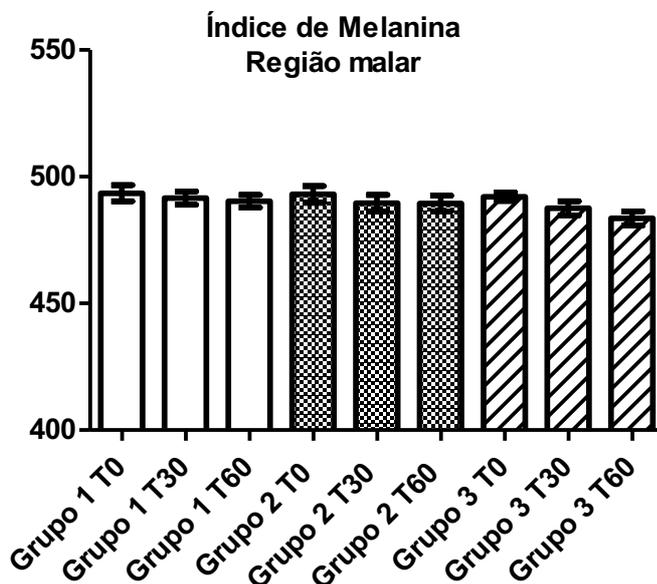
#### 6.10.4 Quantificação de melanina e Eritema

Na análise do índice de eritema (Figura 60) dos diferentes grupos foi observado diminuição significativa apenas no grupo 3 que utilizou a formulação com nanopartículas com quercetina após 60 dias. Já o índice de melanina não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém foi observado uma tendência do grupo 3 na diminuição desse parâmetro (Figura 61). Entretanto, conforme observado pelas imagens obtidas pelo equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha) foi possível observar clareamento das manchas do rosto das voluntárias do grupo 3 (Figuras 62 a 64).

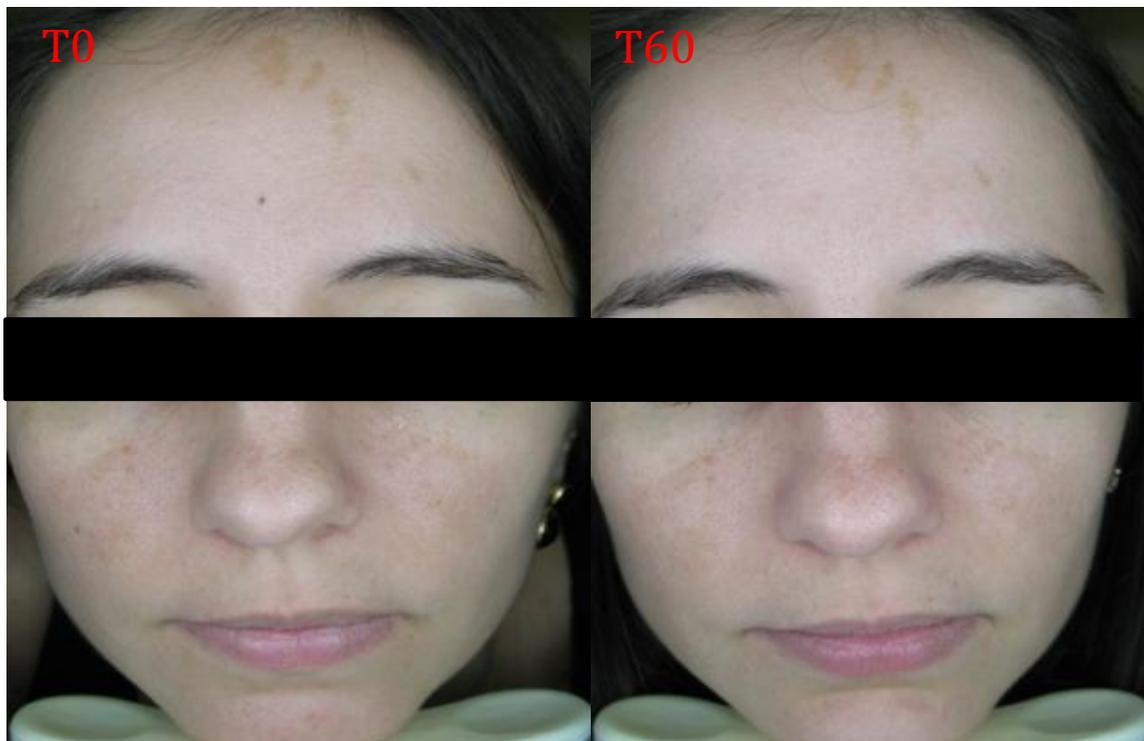
**Figura 60.** Índice de Eritema da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



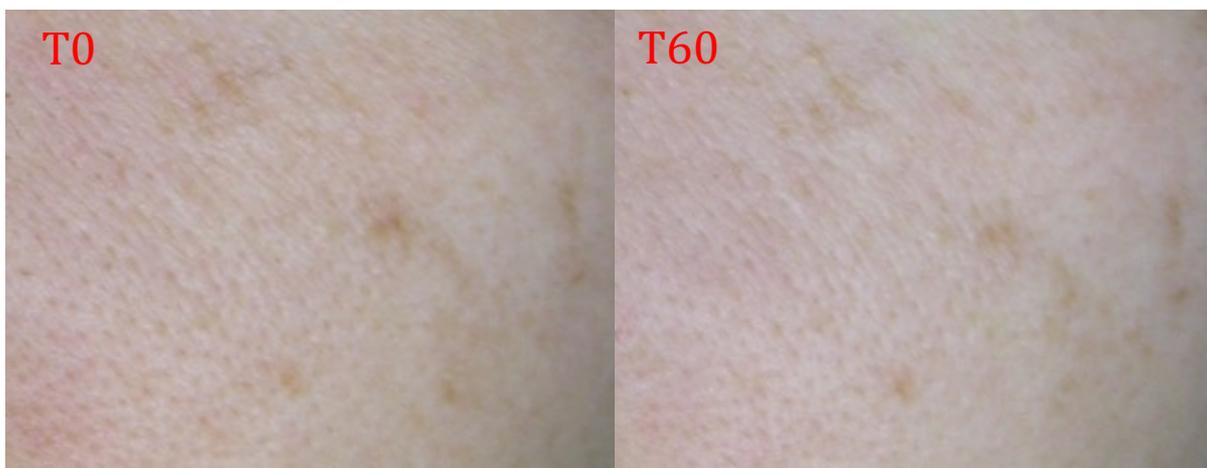
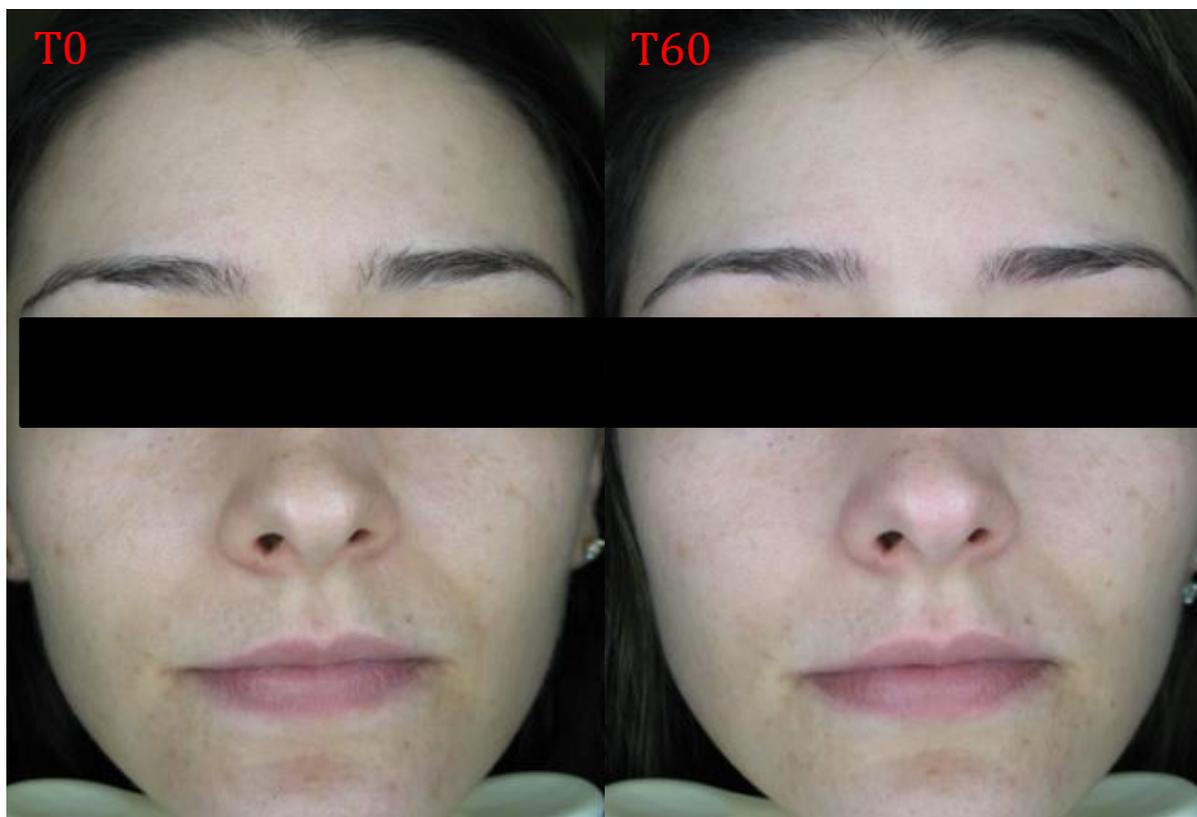
**Figura 61.** Índice de Melanina da pele da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



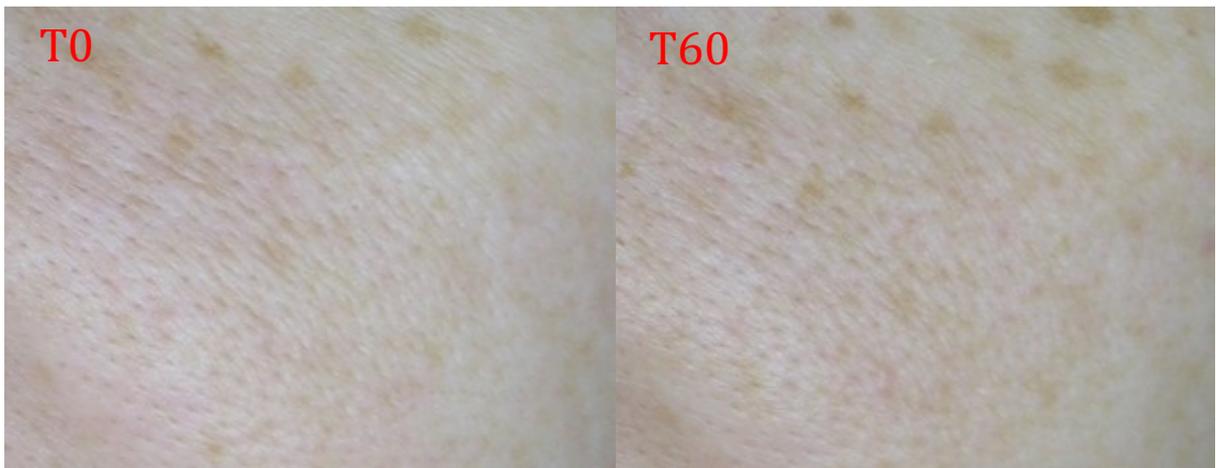
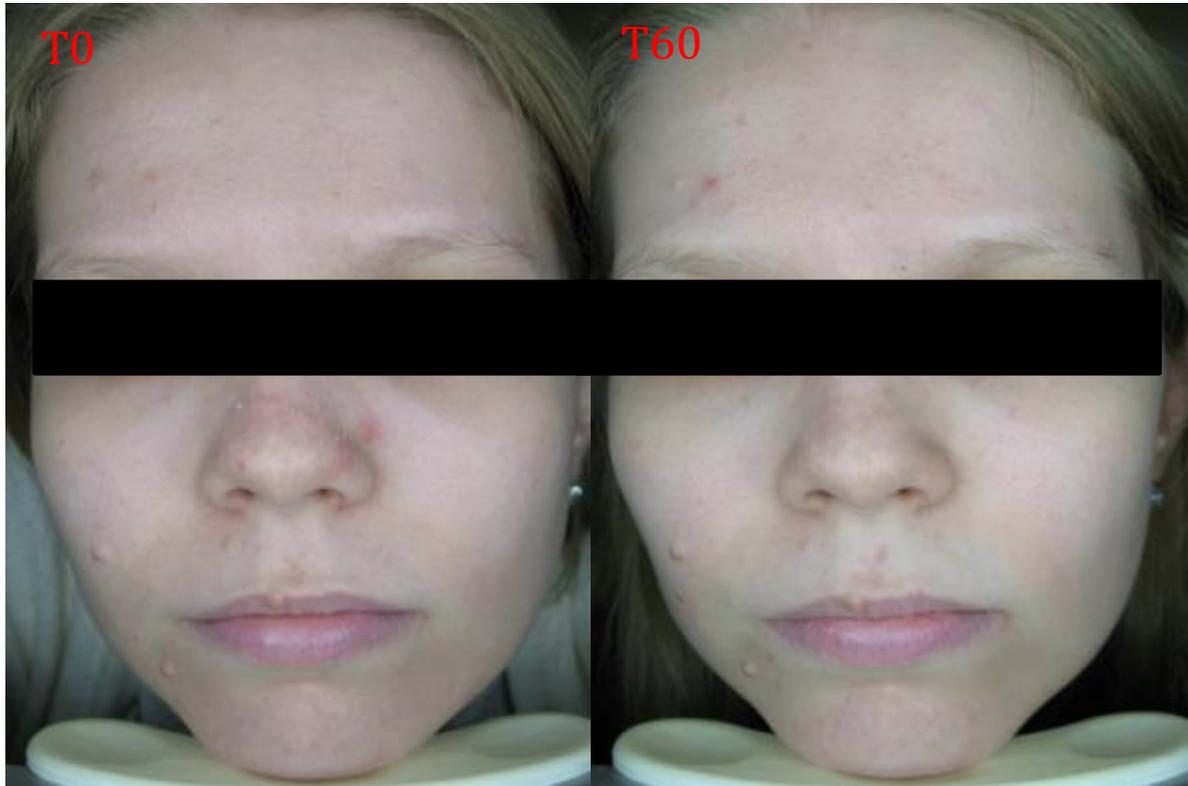
**Figura 62.** Imagens de alta resolução da pele com o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha) obtida de uma participante do Grupo 2 (formulação F3-VE) antes (T0) e depois de 60 dias (T60) da utilização da formulação do rosto e região malar direita.



**Figura 63.** Imagens de alta resolução da pele com o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha) obtida de uma participante do Grupo 3 (formulação F3-CLN) antes (T0) e depois de 60 dias (T60) da utilização da formulação do rosto e região malar direita.



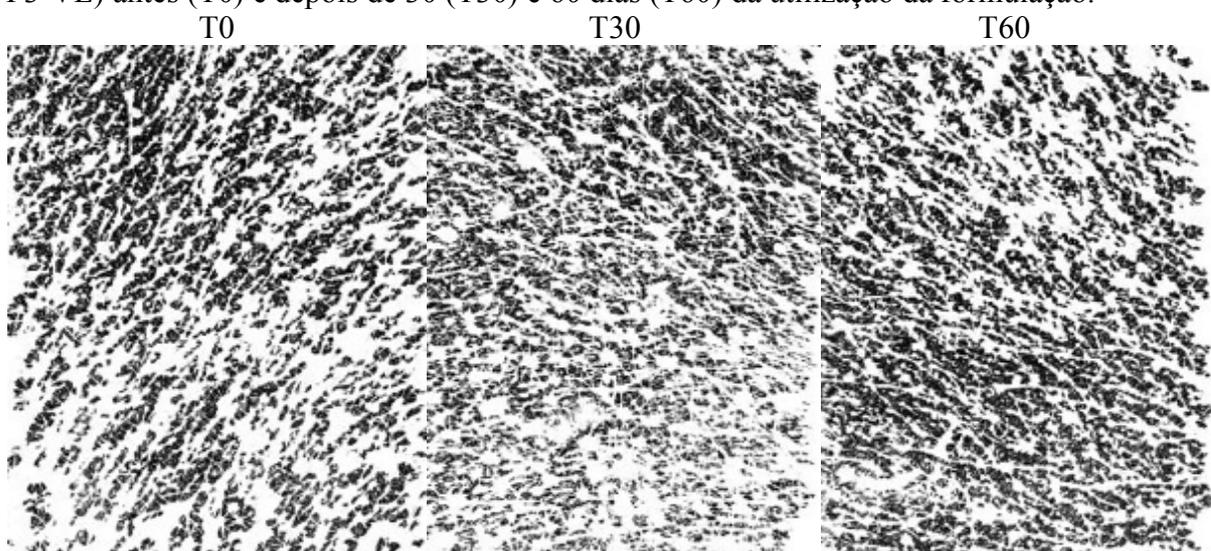
**Figura 64.** Imagens de alta resolução da pele com o equipamento Visioface® 1000 D (Courage-Khazaka, Alemanha) obtida de uma participante do Grupo 1 (formulação F3-CLN VZ) antes (T0) e depois de 60 dias (T60) da utilização da formulação do rosto e região malar direita.



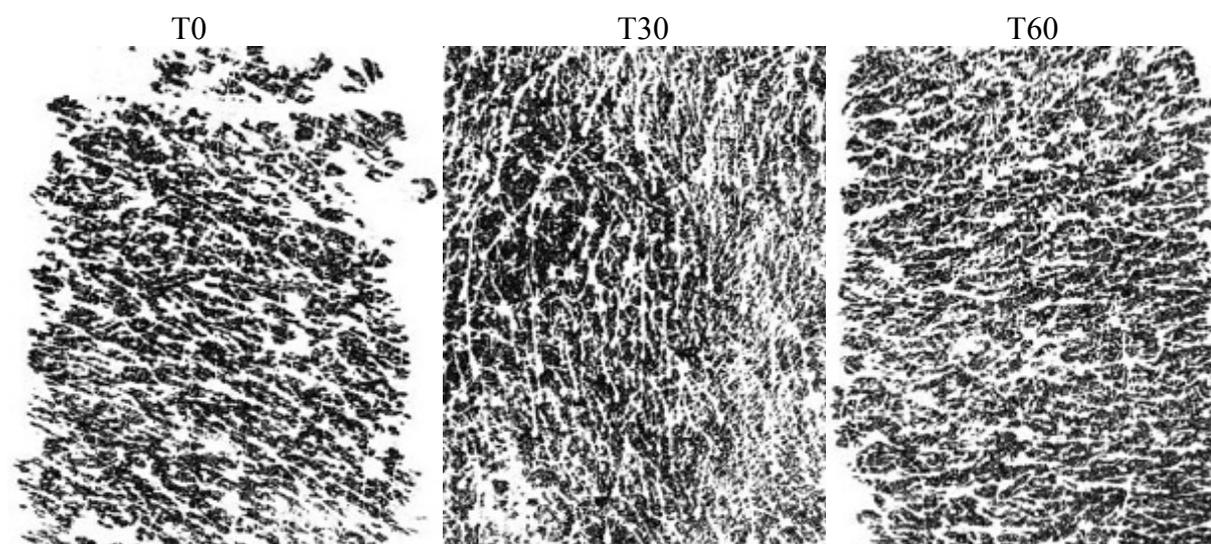
### 6.10.5 Avaliação por Imagem da capacitância da pele

Na avaliação por imagens da capacitância da pele na região malar da face, foi notada uma diminuição significativa do parâmetro Mean GL (Figura 70) e aumento do parâmetro Gray Index do grupo 3 (Figura 68). Bem como, foi observado uma diminuição da anisotropia do grupo 1 (formulação com nanocarreadores sem quercetina) e grupo 3 (formulação com nanocarreadores com quercetina) após 30 e 60 dias de uso (Figura 69).

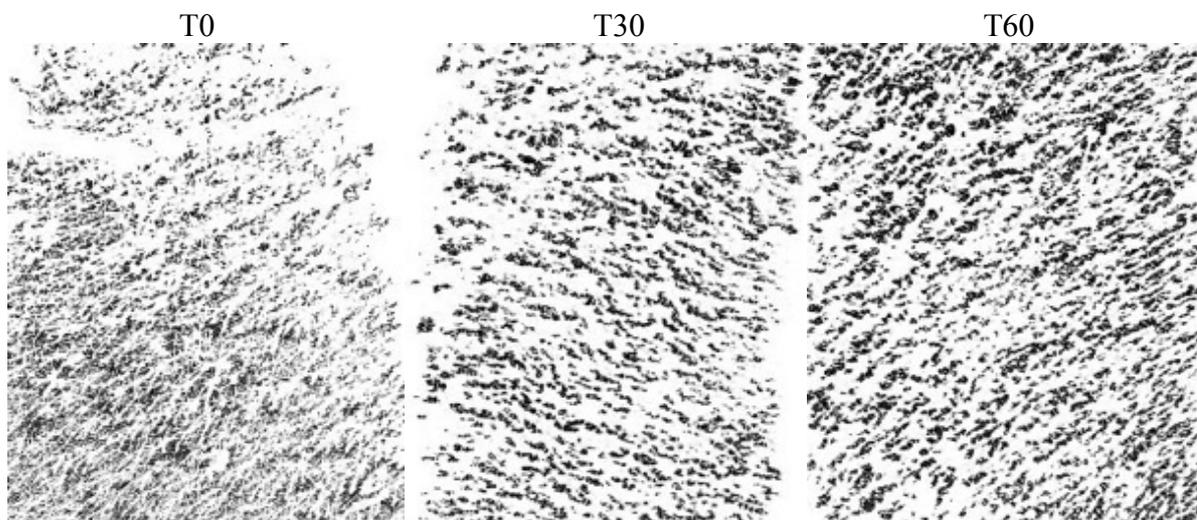
**Figura 65.** Imagens da capacitância da pele obtida de uma participante do Grupo 2 (formulação F3-VE) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.



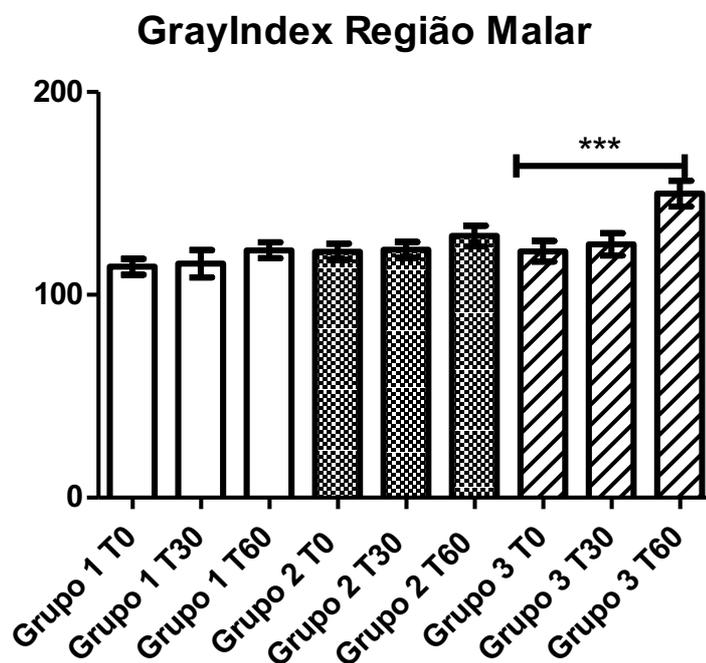
**Figura 66.** Imagens da capacitância da pele obtida de uma participante do Grupo 3 (formulação F3-CLN) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.



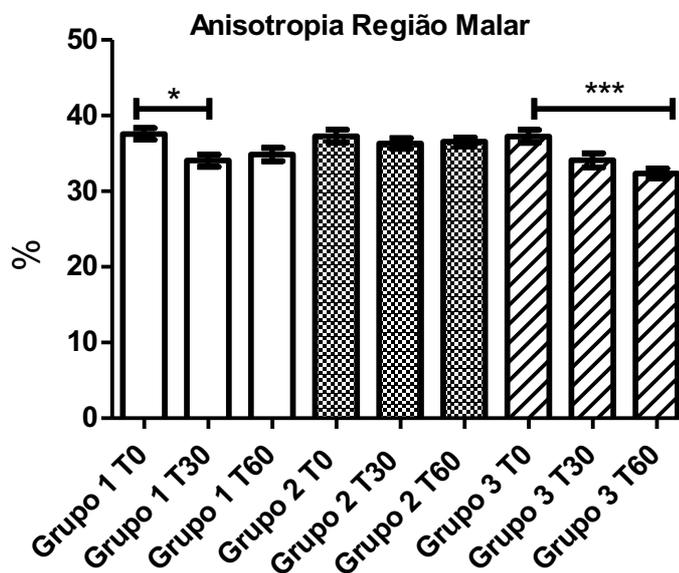
**Figura 67.** Imagens da capacitância da pele obtida de uma participante do Grupo 1 (formulação F3-CLN VZ) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação.



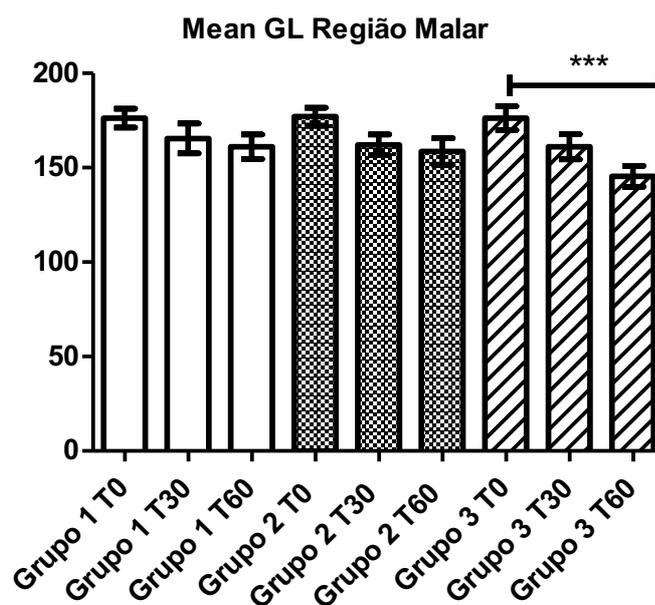
**Figura 68.** Parâmetro GrayIndex na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 69.** Parâmetro Anisotropia na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



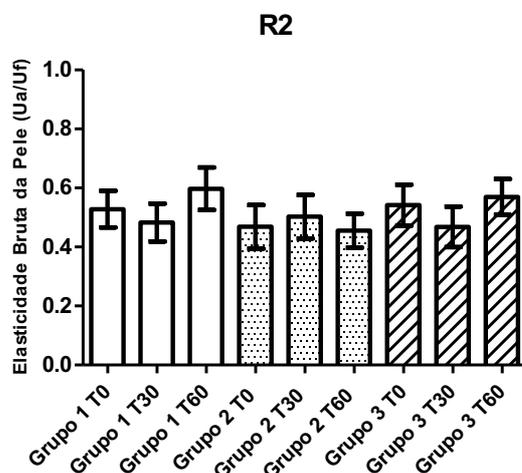
**Figura 70.** Parâmetro Mean GL (nível de cinza) na região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



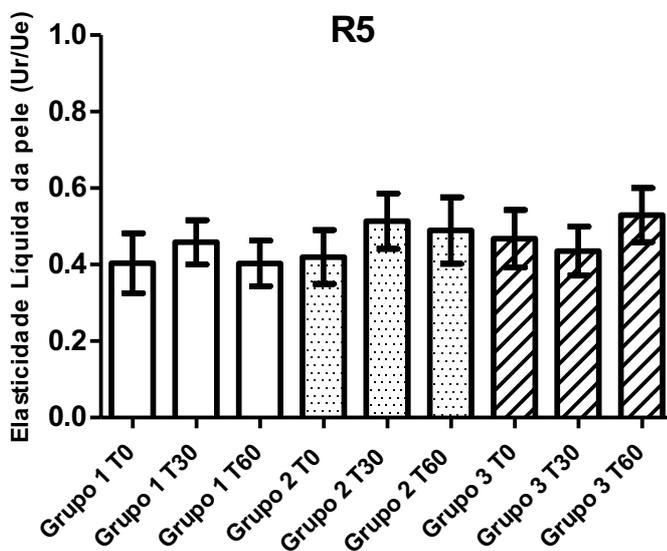
### 6.10.6 Elasticidade da pele

Com base na análise dos dados dos diferentes parâmetros pode-se observar que após 60 dias da utilização das formulações houve um aumento da viscoelasticidade da pele (R6) (Figura 73) do grupo 3 que utilizou a formulação F3-CLN. Já o parâmetro elasticidade biológica da pele (R7) (Figura 74) apresentou uma tendência no aumento do grupo 3. Os demais parâmetros, R2 (Figura 71) e R5 (Figura 72), não apresentaram alterações significativas.

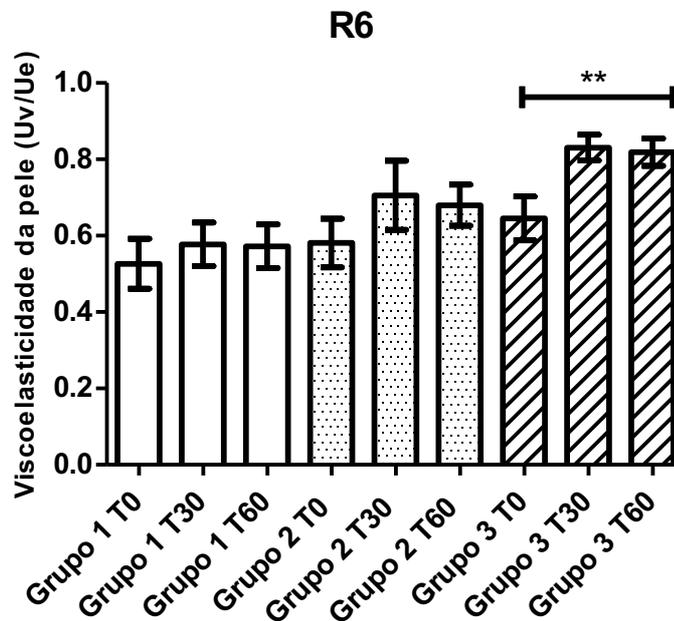
**Figura 71.** Elasticidade bruta da pele (R2:  $U_a/U_f$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).



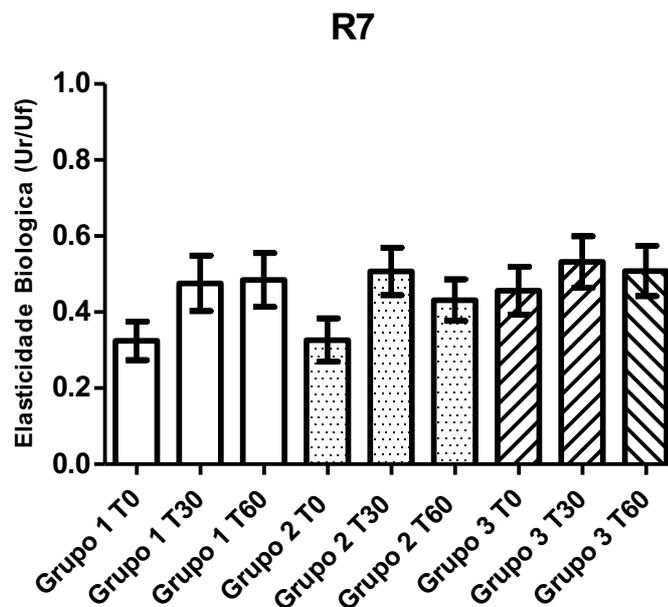
**Figura 72.** Elasticidade líquida da pele (R5:  $U_v/U_e$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).



**Figura 73.** Viscoelasticidade da pele (R6:  $Uv/Ue$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



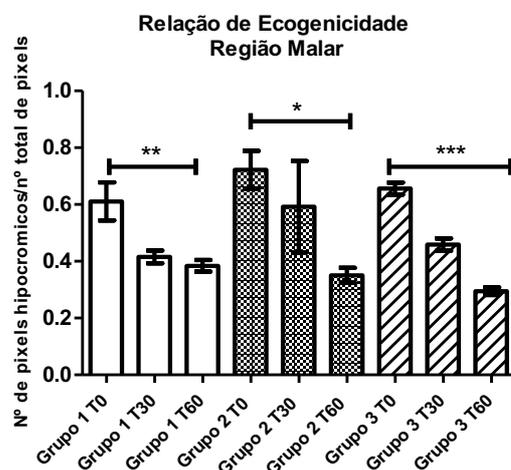
**Figura 74.** Elasticidade biológica da pele (R7:  $Ur/Uf$ ) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).



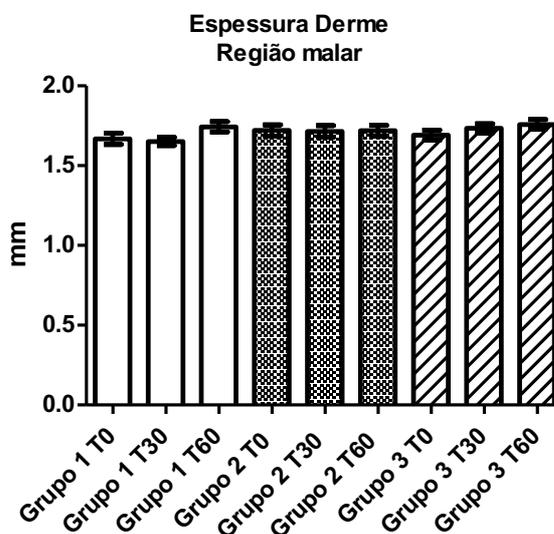
### 6.10.7 Ecogenicidade e espessura da derme

Após a análise dos grupos de estudo com o ultrassom de alta frequência, foi possível observar que não houve alteração na espessura da derme na região malar dos grupos (Figura 75). No parâmetro relação de ecogenicidade foi possível notar um aumento significativo após 60 dias em todos os grupos, destacando o grupo 3 que apresentou uma diminuição significativa após 60 dias de uso (Figura 76).

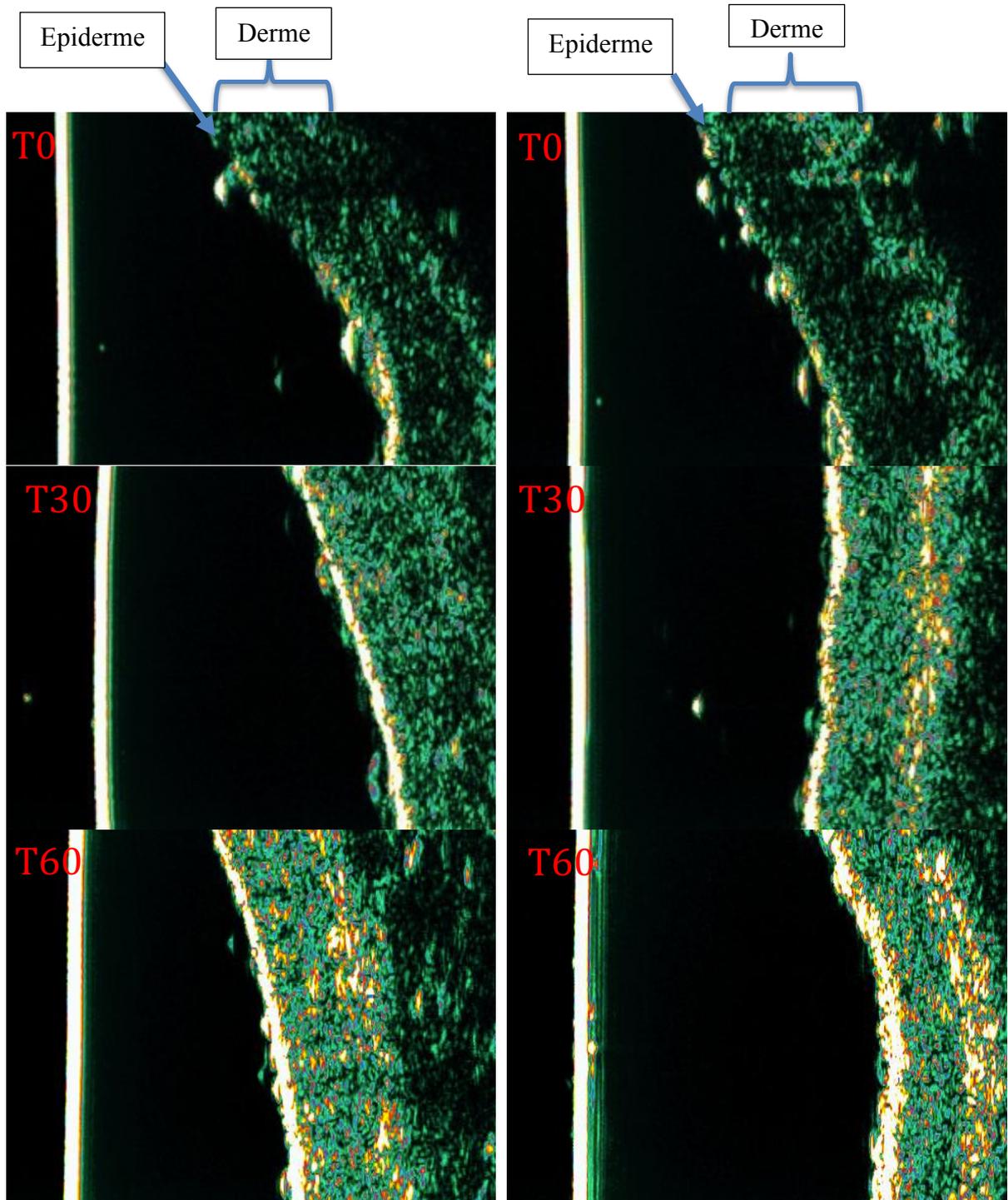
**Figura 75.** Relação de ecogenicidade (número de pixels baixos/ número total de pixels) da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN). \* Diferença significativa em relação à medida inicial (basal) ( $p < 0.05$ ).



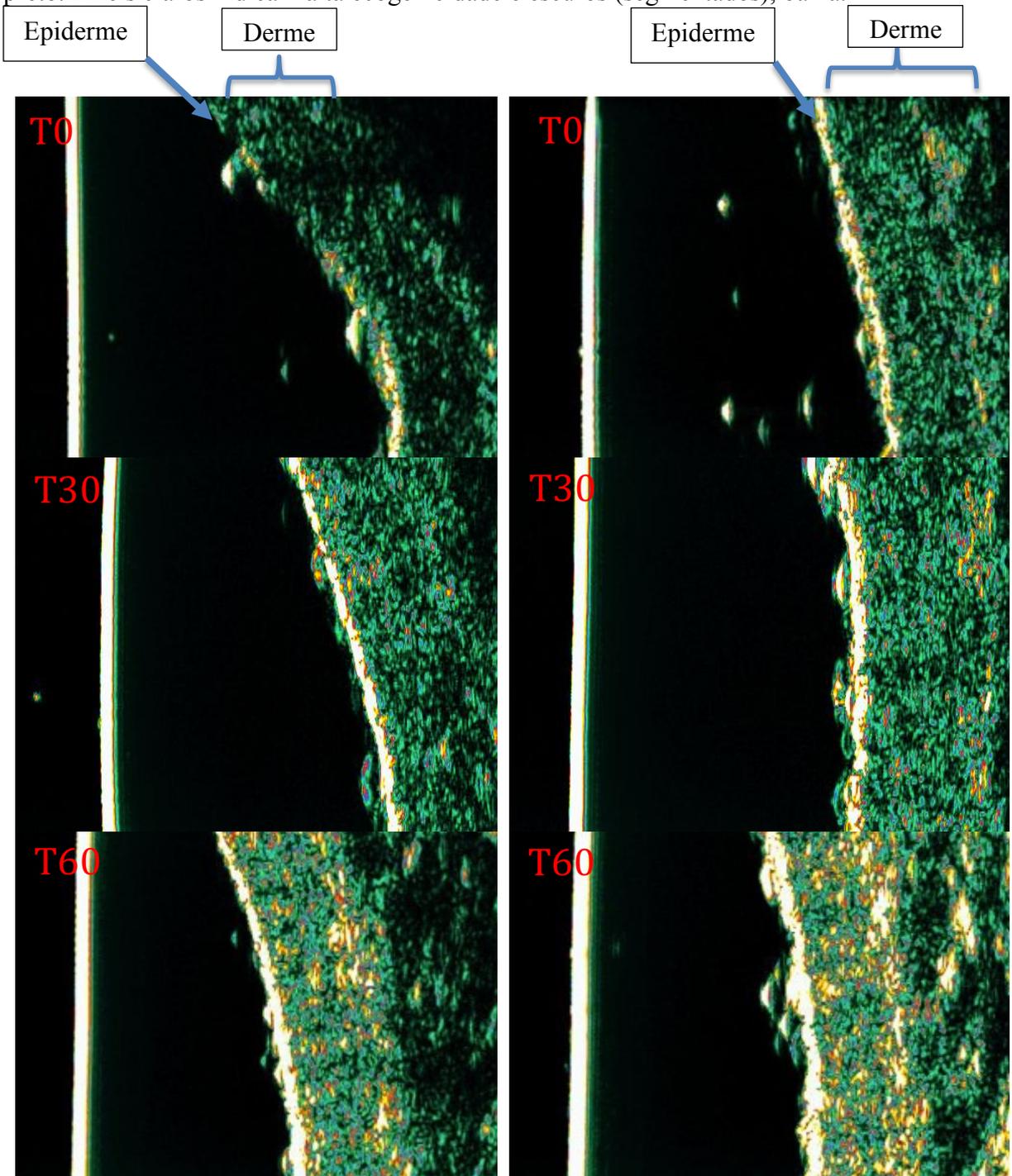
**Figura 76.** Espessura da derme da região malar da face nos tempos iniciais e após 30 e 60 dias da utilização das formulações (média + DP): Grupo 1 (F3-CLN VZ), Grupo 2 (F3-VE), e Grupo 3 (F3-CLN).



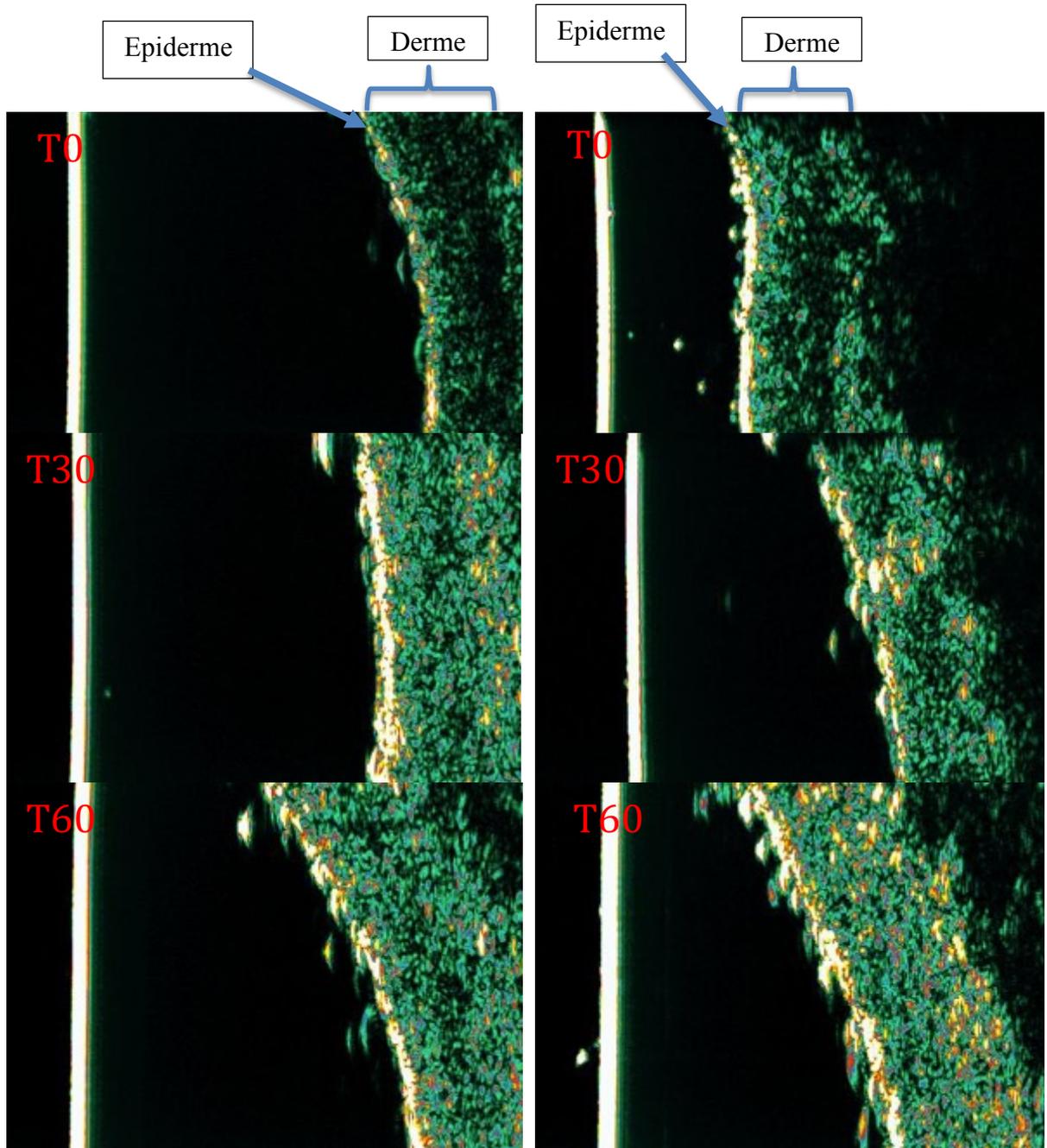
**Figura 77.** Imagens ilustrativas do ultrassom Dermascan® de participantes do Grupo 2 (formulação F3-VE) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação. Escala de cores da ecogenicidade: branco > amarelo > vermelho > verde > azul > preto. Pixels claros indicam alta ecogenicidade e escuros (segmentados), baixa.



**Figura 78.** Imagens ilustrativas do ultrassom Dermascan® de participantes do Grupo 3 (formulação F3-CLN) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação. Escala de cores da ecogenicidade: branco > amarelo > vermelho > verde > azul > preto. Pixels claros indicam alta ecogenicidade e escuros (segmentados), baixa.



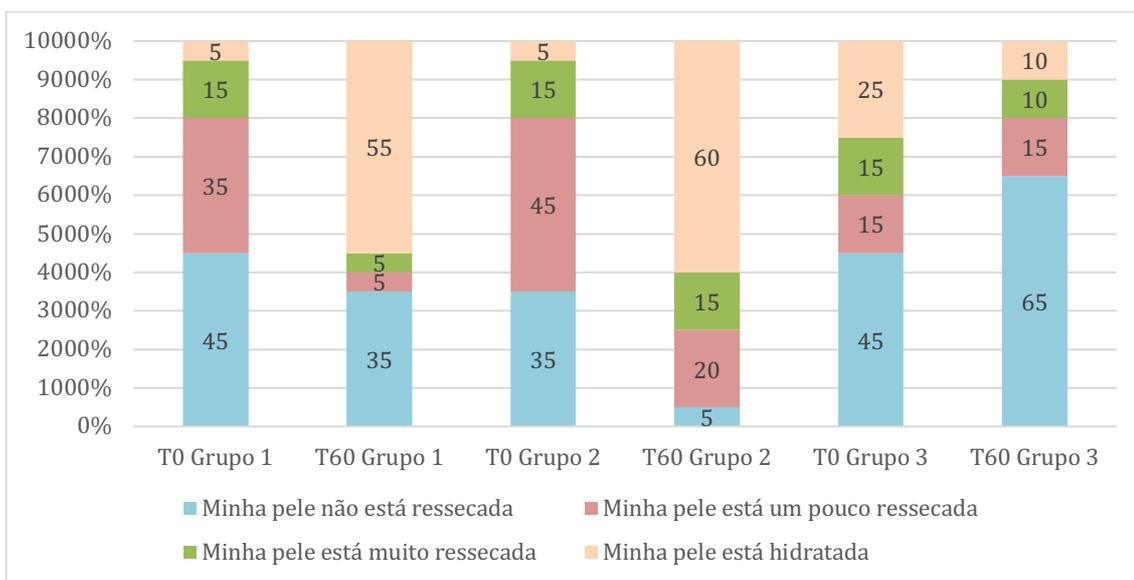
**Figura 79.** Imagens ilustrativas do ultrassom Dermascan® de participantes do Grupo 1 (formulação F3-CLN VZ) antes (T0) e depois de 30 (T30) e 60 dias (T60) da utilização da formulação. Escala de cores da ecogenicidade: branco > amarelo > vermelho > verde > azul > preto. Pixels claros indicam alta ecogenicidade e escuros (segmentados), baixa.



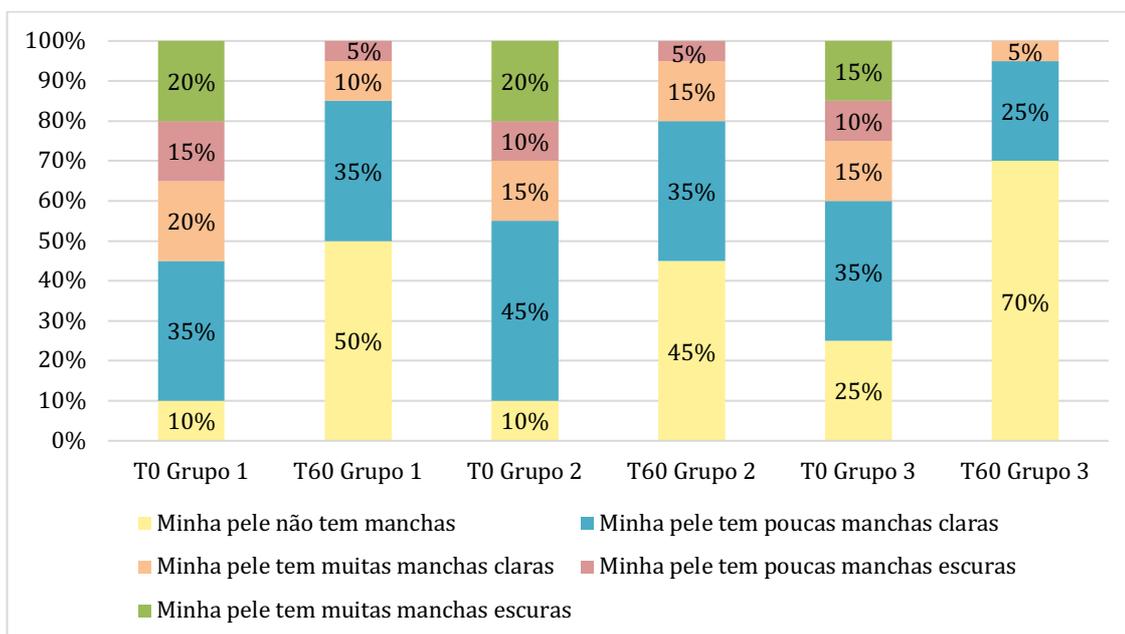
## 6.11 PERCEÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA

Neste estudo, as participantes compararam por meio de um questionário, como elas percebiam sua pele antes e após o uso das formulações. Nas Figuras 81 a 83 estão as porcentagens sobre hidratação, manchas e maciez da pele antes (T0) e depois de 60 dias (T60) em relação a cada grupo.

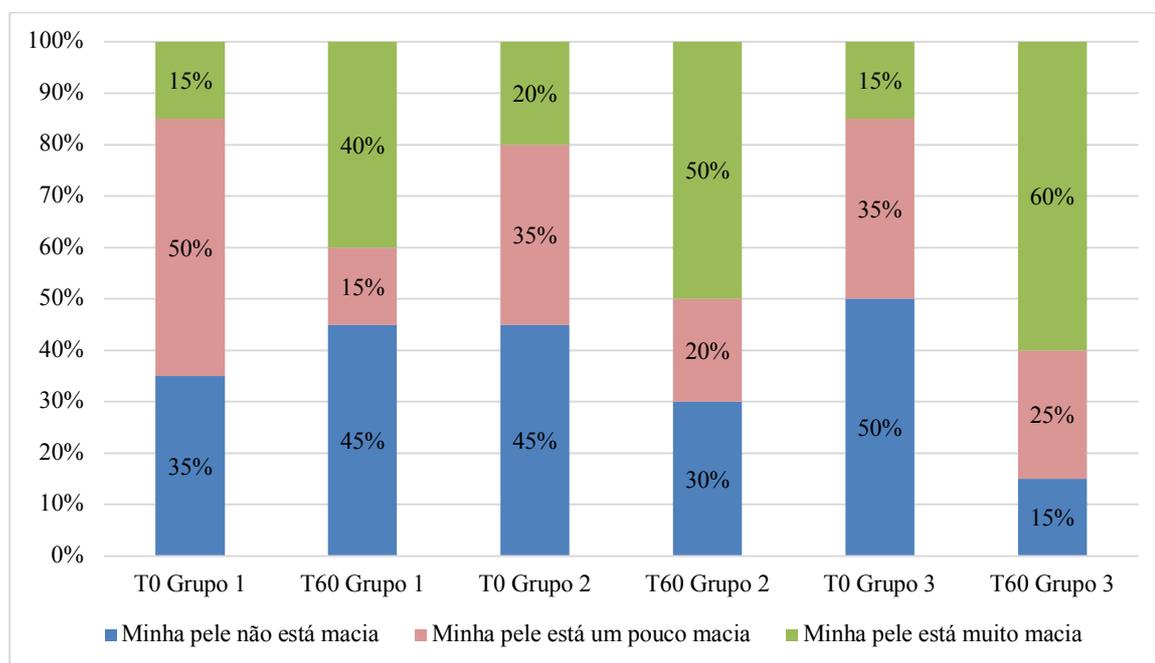
**Figura 80.** Distribuição do parâmetro “Hidratação” antes do início do estudo clínico (T0) e após 60 dias (T60) de utilização das formulações de cada grupo avaliado.



**Figura 81.** Frequência do parâmetro “Manchas” antes do início do estudo clínico (T0) e após 60 dias (T60) de utilização das formulações de cada grupo avaliado.

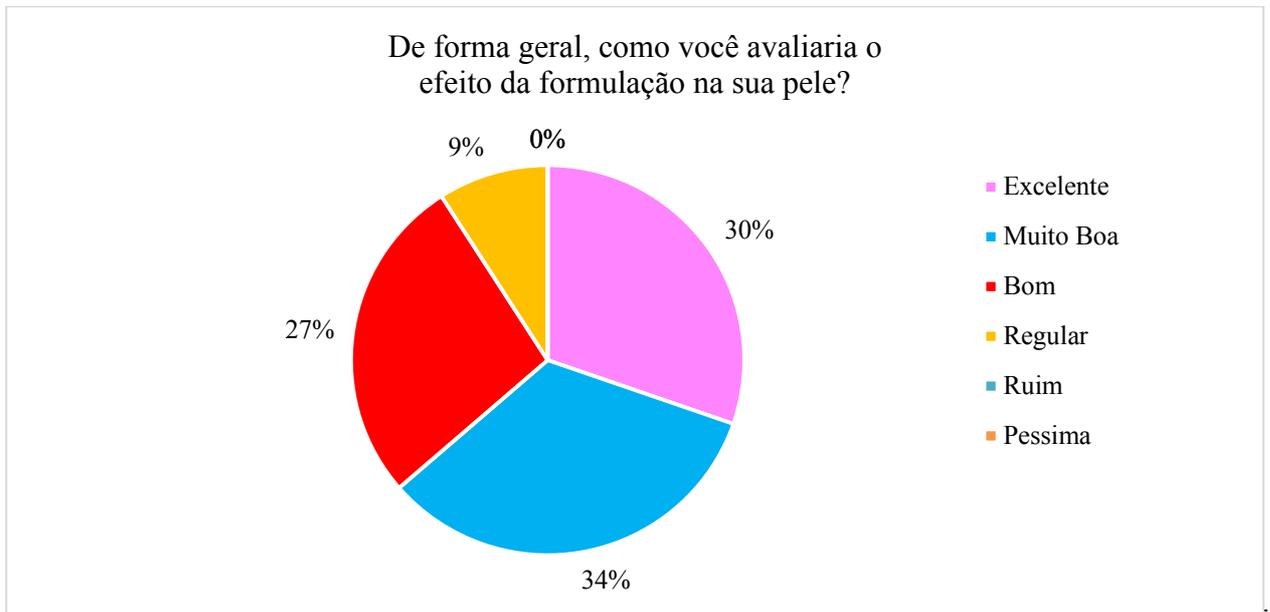


**Figura 82.** Distribuição do parâmetro “Maciez” antes do início do estudo clínico (T0) e após 60 dias (T60) de utilização das formulações de cada grupo avaliado.



As participantes do grupo 3 relataram os maiores índices para “Maciez” (Figura 82), “Hidratação” (Figura 80) e “Manchas” (Figura 81) após 60 dias de utilização da formulação F3-CLN. Os outros grupos também obtiveram aumento nesses índices. No geral, foi observado que as participantes avaliaram os efeitos da formulação utilizada como “Excelente” (30%) e “Muito boa” (27%) (Figura 83) e 75% relataram que comprariam a formulação avaliada durante o estudo clínico (Figura 84).

**Figura 83.** Frequência sobre os efeitos observados pelas participantes após 60 dias (T60) de utilização das formulações.



**Figura 84.** Avaliação da intenção de compra das formulações objeto do estudo clínico



## 7. DISCUSSÃO

A pesquisa e desenvolvimento de formulações fotoprotetoras seguras, estáveis e eficazes, com alta capacidade de proteção é fundamental para evitar queimaduras solares, envelhecimento da pele e fotodermatoses. Para tal, é necessária a escolha criteriosa das matérias primas que compõe a formulação, como elas interage, considerando sua influência na aceitação do produto e adesão do mesmo (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

Uma formulação fotoprotetora é capaz de absorver e/ou refletir a luz UV e pode exibir diferentes texturas de acordo com o veículo. Dessa forma, é necessário o conhecimento da morfologia e fisiologia da pele, além das matérias-primas da formulação, pois a interação entre o produto cosmético e o sistema biológico está diretamente relacionada à segurança e eficácia do mesmo (LUKIC et al, 2012; FOSSA SHIRATA & CAMPOS, 2017). Ao mesmo tempo, a utilização de substâncias de origem natural com atividade antioxidante em formulações cosméticas está em evidência em virtude do seu potencial fotoprotetor. Nesse contexto, no presente estudo foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras, contendo ou não quercetina nanoencapsulada, as quais foram submetidas à análise das propriedades sensoriais e de textura, bem como à estudos de eficácia clínica após uma única aplicação (efeitos imediatos) e após 60 dias.

O projeto foi iniciado pela etapa de desenvolvimento dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) contendo ou não quercetina, a base de lipídios de fontes vegetais, entre eles a manteiga Illipê e o óleo de calêndula. A análise do tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta são critérios importantes durante o desenvolvimento de nanopartículas, pois esses fatores afetam a taxa de liberação da substância ativa encapsulado, a biodisponibilidade, captação celular de água e difusão de proteínas para o interior das nanopartículas (PARDEIKE et al, 2009). Dados da literatura relatam que as CLNs apresentam tamanho em torno de 210nm, enquanto as NLSs apresentam tamanhos superiores (297nm) quando preparados com o mesmo procedimento, tipo e concentrações de tensoativos e lipídios (BAHARI & HAMISHEHKAR, 2016).

Apesar do valor baixo do potencial zeta,  $-18 \pm 0,75$  para partícula sem antioxidante encapsulado e  $-22 \pm 0,48$  para partícula com antioxidante encapsulado, o tensoativo não-iônico utilizado na produção das CLNs, pluronic F68, mantém a formulação estável devido à estabilização eletrostática das nanopartículas. Em geral, valores entre -15 e -30mV são comuns para estabilizar sistemas nanoparticulados, conferindo a estabilidade por carga às partículas, por tanto foram descritos como aceitáveis para administração tópica (GASPARI et al.; 2014; ZIELINSKA & NOWAK, 2016; SOUZA & CAMPOS, 2017).

Além disso, foi observado eficiência de encapsulamento de 98%. Conforme descrito na literatura, nanopartículas com matriz lipídica com muitas imperfeições levam ao aumento da eficiência de encapsulamento da substância ativa, devido a entropia do lipídio que fornece espaço para aprisionamento das moléculas da substância ativa (MÜLLER et al., 2002). As CLNs são biodegradáveis e biocompatíveis com a pele humana, exibem alta estabilidade física, são facilmente escalonáveis e podem encapsular substâncias ativas insolúveis em água, características obtidas pela composição formada por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos (CARVALHO et al., 2019).

Na etapa de desenvolvimento das formulações fotoprotetoras foram estabelecidos alguns critérios para seleção das matérias primas e escolha das concentrações ideais de cada um deles, visando a obtenção de formulações fotoprotetoras com alta proteção, sensorial agradável e com efeitos clinicamente comprovados. Tais critérios compreenderam: as formulações deveriam ser emulsões O/A, permanecerem estáveis frente à adição dos filtros solares e dos nanocarreadores e apresentar propriedades sensoriais compatíveis às finalidades propostas, sem deixar resíduo oleoso ou esbranquiçado na pele possibilitando maior adesão às participantes durante o estudo clínico. Além disso, as formulações deveriam ter os valores de pH das compatíveis com os nanocarreadores e com a pele, além de apresentar FPS 30 e espectro de ação que incluía a radiação UVA e UVB.

Inicialmente, foi desenvolvida uma formulação fotoprotetora denominada F1. As porcentagens de cada componente foram definidas com prévia consulta aos seus respectivos informes técnicos, na qual foi avaliado o *Corn Starch Modified* (amido de milho) e *Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer* como modificador reológico, e a base auto emulsionante *Polyglyceryl-6 Distearate (and) Jojoba Esters (and) Polyglyceryl-3 Beeswax (and) Cetyl Alcohol*, o qual apresenta boas propriedades sensoriais e é compatível com as demais matérias-primas da formulação. Porém, após 30 dias do estudo de estabilidade da formulação, observou-se diminuição da viscosidade, característica resultado principalmente pela presença do *Corn Starch Modified*.

Com relação aos filtros solares da formulação F1, optou-se inicialmente pela associação dos filtros *Bis-Ethylhexymethoxyphenyl Triazine* (BEMT - Tinosorb S<sup>®</sup>), *Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate* (DHBB - Univil A Plus<sup>®</sup>), e *Methylenebis-benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol* (MBBT – Tinosorb M<sup>®</sup>), com um valor de FPS estimado de 30, segundo simulador online da Basf, *Sunscreen Simulator*. No entanto, durante a avaliação do comportamento reológico e perfil de textura foi observado sinais de instabilidade. Assim, foi

utilizado o filtro *Ethylhexyl Triazone* (EHT – Univil T150®) em associação com os demais filtros para melhor estabilidade das formulações, mantendo o mesmo FPS estimado de 30 para as formulações F2 e F3. Os filtros BEMT e MBBT são absorvedores da radiação UV de amplo espectro, eficazes contra os raios UVA e UVB, o DHHB é um filtro UVA e o EHT é um filtro UVB, proporcionando uma boa proteção na região UV (SOUZA, 2006).

Dando continuidade aos estudos, foi desenvolvida a formulação F2, na qual foi o *Corn Starch Modified* foi substituído pelo emulsificante polimérico *Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer* (Pemulen TR2®), o qual é utilizado no desenvolvimento de fotoprotetores como estabilizador de emulsão óleo em água e auxilia no sensorial (LUBRIZOL, 2012). Além disso, foram utilizados dois sistemas emulsionantes: *Polyglyceryl-6 Distearate (and) Jojoba Esters (and) Polyglyceryl-3 Beeswax (and) Cetyl Alcohol* (Emullium Melifera®) e *Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate* (Nikkomulse 41®), e feitos ajustes na concentração dos silicones, butilenoglicol, glicerina e a incorporação dos filtros solares foi feita diretamente na fase oleosa da emulsão.

A base emulsionante *Polyglyceryl-6 Distearate (and) Jojoba Esters (and) Polyglyceryl-3 Beeswax (and) Cetyl Alcohol* apresenta em sua composição ésteres de cera de jojoba, cera de abelha e poligliceral, com certificação ECOCERT® GREENLIFE de acordo com o padrão COSMOS de cosméticos orgânicos e naturais (GATTEFOSSÉ, 2017). Entretanto, a base é isenta de PEG e, devido a alta carga oleosa dos filtros solares, foi utilizado associado a base autoemulsionante *Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate*, a qual promove estabilidade das formulações em ampla faixa de temperatura, pois forma uma estrutura reticular de gel acompanhada por cristais líquidos lamelares e também apresenta boa compatibilidade com a pele sendo utilizado principalmente em fotoprotetores resistentes à água (NIKKOL, 2005).

Por fim, para o cumprimento dos objetivos relacionados à avaliação da eficácia clínica e propriedades sensoriais agradáveis, foi desenvolvida a formulação F3, acrescentando sílica à formulação a fim de melhorar as propriedades sensoriais e obter uma formulação sem resíduo oleoso. Uma vez que o modo de preparo e demais componentes adicionados às formulações fotoprotetoras podem influenciar nas características físicas-mecânicas, alterar o FPS e a eficácia da mesma, foram avaliadas diferentes maneiras de incorporação dos filtros solares à formulação. Desta maneira, de acordo com a experiência do grupo de pesquisa, durante o desenvolvimento da formulação F3 os filtros solares foram incorporados à fase oleosa após

dispersão em *Paraffinum Liquidum (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol* (base de absorção de lanolina) (GIANETI, 2013).

Após o desenvolvimento das formulações F1, F2 e F3 foi realizado estudo de estabilidade preliminar para garantir que as formulações desenvolvidas possuíssem valores de pH, aspectos de homogeneidade e organolépticas adequadas para aplicação cosmética e com estabilidade adequada para utilização durante o estudo clínico. As formulações F2 e F3 foram avaliadas acrescidas com os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo quercetina (CLN), quercetina livre (QT), acrescidas Carreadores Lipídicos Nanoestruturados sem quercetina (CLN-VZ) e a formulação fotoprotetora sem substâncias ativas (VE). Já a formulação F1 foi avaliada apenas acrescida com os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo quercetina (F1-CLN), quercetina livre (F1-QT) e a formulação fotoprotetora sem substâncias ativas (F1-VE).

Após trinta dias de armazenamento a  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ,  $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e  $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , a inspeção visual das formulações F1, F2 e F3 contendo ou não CLNs ou quercetina, não mostrou sinais de instabilidade na aparência, cor, odor e o teste de centrifugação não resultou em separação de fases ou precipitação. Os valores de pH permaneceram dentro da faixa ótima de pH para formulações tópicas, entre 5.5 e 6.5, sem oscilações significativas no período demonstrando que todas as formulações apresentaram comportamento estável.

O estudo reológico de formulações fotoprotetoras desempenha papel fundamental na avaliação da estabilidade e eficiência desses produtos, pois com esse estudo é possível analisar se a formulação manteve suas propriedades físicas ao longo de determinado período de tempo e em diferentes condições de temperatura (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003). Por meio do estudo reológico é possível avaliar o desempenho do produto desenvolvido sob uma variedade de condições, como as propriedades sensoriais, a capacidade de espalhabilidade na pele e a facilidade de remoção do produto da embalagem final.

Com base nos resultados obtidos, foi possível notar que as formulações F1, F2 e F3 são fluidos não newtonianos, o que significa que sua viscosidade é dependente da taxa de cisalhamento, com índice de fluxo menor que 1, o que é desejável em produtos cosméticos, pois, pode facilitar sua aplicação e espalhamento e conferir um sensorial agradável (MARTO, 2016). Entretanto, os parâmetros reológicos evidenciaram instabilidade na formulação F1, uma vez que esta apresentou diferenças na análise reológica quando comparada com as formulações F2 e F3. O índice de consistência, viscosidade mínima aparente e a área de histerese das formulações F1 aumentaram após a armazenagem a  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ,  $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e  $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ,

o qual foi mais evidente quando foi adicionado os carreadores lipídicos (F1-CLN) o qual apresentou maiores variações durante o período de estudo.

Depois da celulose, o amido é o segundo biopolímero mais abundante na natureza e possui características de gelatinização e filmógena. Devido a essa capacidade, são amplamente utilizados em formulações cosméticas como modificadores reológicos auxiliando no aumento da estabilidade e como modificadores de sensorial (ALVES et al, 2007). Após o aquecimento associado ao excesso de água ocorre o intumescimento irreversível, porém limitado dos grânulos, os quais se tornam muito sensíveis a estresses mecânicos e térmico ou à acidez do meio, podendo agrupar os polímeros de amido e danificar o gel formado (CEREDA, 2002; SILVA et al., 2006). Dessa forma, as redes poliméricas do amido conseguem manter os filtros sem separação de fase, mas há uma possível agregação de partículas que resulta em uma instabilidade e comprometimento das características físico-mecânicas da formulação F1.

A viscosidade mínima aparente é considerada a medida da resistência de um material ao fluxo, sendo que, formulações com altos valores de viscosidade são mais difíceis de espalhar e pegajosas devido a resistência da formulação ao fluxo (LEE et al., 2009; CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017). As formulações F3, contendo ou não CLNs ou quercetina apresentou os menores valores de viscosidade mínima aparente, o qual é calculado a partir do ponto máximo de cisalhamento, e não apresentou variações nesse parâmetro durante todo período de estudo, ao contrário da formulação F1 e F2.

As formulações apresentaram área de histerese, ou tixotropia, uma característica natural de formulações pseudoplásticas e adequado em determinados produtos cosméticos para aumentar a estabilidade ou facilitar aplicação do produto, produzindo uma película protetora sob a superfície da pele, característica importante para um FPS mais alto (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003; SOUZA & CAMPOS, 2017). Porém a tixotropia das formulações F1 e F2 foi maior quando comparados com as formulações e F3 que apresentaram menores variações ao longo do tempo. Emulsões com altos valores de tixotropia em geral podem apresentar valores de FPS mais baixos, por não haver recuperação suficiente da estrutura para formar um filme uniformemente distribuído, pois a formulação continua a fluir através dos sulcos da pele (HEWITT & DAHMS, 1996).

Dahms (1994) estudou a influência da tixotropia na absorção do UV de formulações de emulsão de proteção solar comparando os valores de FPS *in vitro* e observou que a proteção ideal da pele só é possível quando a preparação cobre toda a área a ser protegida. No entanto, áreas de histerese maiores implicam em posterior recuperação da viscosidade e consequentemente baixa uniformidade do filme e ao fluxo do produto sobre a pele. Gaspar &

Maia Campos (2003) relataram que emulsões com altos valores de tixotropia apresentaram valores mais baixos de FPS. Sendo assim, as formulações ideais seriam aquelas com menor tixotropia, ou seja, menor área de histerese, e o efeito de proteção UV na pele também é dependente do comportamento reológico da formulação.

A maneira como os filtros UV foram incorporados e a associação da quercetina e CLNs influenciaram no comportamento, bem como na estrutura organizacional da formulação. A formulação F2 precisou de 14 dias para organizar sua estrutura e se tornar estável e apresentou valores maiores de tixotropia após 30 dias de avaliação. Por outro lado, a formulação F3 apresentou menor variação ao longo do tempo e menor tixotropia, indicando uma formulação mais estável. Osterwalder et al (2014) relataram influência benéfica de espessantes em formulações fotoprotetoras, afirmando que dependendo da escolha dos emolientes e emulsificantes a fórmulação apresenta alterações no comportamento reológico relacionados à diminuição da viscosidade o que pode contribuir com o aumento da área de histerese.

As diferenças observadas entre os valores da taxa de tensão e cisalhamento entre os fotoprotetores contendo quercetina e as nanopartículas são resultado das forças entre as nanopartículas retidas e do tipo de interações entre elas (eletrostáticas versus estéricas) que controlam o comportamento de escoamento das formulações semi-sólidas. O tipo de lipídio afeta a viscosidade da formulação, devido às diferenças na estrutura química e ao comprimento das cadeias de ácidos graxos lipídicos usados para formular os CLNs e o tamanho de partícula maior dos CLNs poderia contribuir no bloqueio da radiação UV. Portanto, a incorporação de CLNs com quercetina em uma formulação fotoprotetora aumenta o tempo para reconstituir sua viscosidade após o espalhamento, gerando uma película protetora sobre a pele, contribuindo para a estabilidade e desempenho do produto (KAMEL & MOSTAFA, 2015; JOSE & NETTO, 2019).

Souza & Campos (2017) observaram que as nanopartículas incorporadas em cosméticos são estabilizadas pelas estruturas de rede tridimensionais do creme, o que poderia impedir a aglomeração entre as partículas após a incorporação em uma formulação semi-sólida. Ao fornecer pressão à amostra, a estrutura confere ao sistema alguma rigidez e o sistema se comporta como uma emulsão, colaborando para a formação de película na pele e subsequente efeito de oclusão relatado para nanopartículas lipídicas (MARTIN, 1993; PARDEIKE et al., 2009). Portanto, avaliando o conjunto de variáveis que fazem parte do estudo reológico, a formulação F3, desenvolvidas com os filtros solares dispersos em base de absorção de lanolina, contendo ou não carreadores lipídicos foi considerada mais estável, pois apresentou menores variações nos parâmetros analisados.

Em paralelo ao estudo reológico foi realizado a avaliação do perfil de textura, definida como uma combinação de características mecânicas, geométricas e superficiais de um produto percebido por meio de receptores mecânicos, sendo uma ferramenta de grande importância para o desenvolvimento de formulações tópicas, pois possibilita entender qual a contribuição de determinados componentes na formulação, além de ser um bom complemento para o estudo reológico e sensorial (TAI et al, 2014; CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017).

Quando a análise de textura é realizada há o movimento de intrusão, onde o probe analítico penetra na formulação a ser analisada, e o de extrusão, que é o retorno desse probe. Os parâmetros de firmeza e consistência são relacionados ao primeiro movimento da análise representando as características de rigidez da formulação. Consequentemente, quanto maiores seus valores, maior a viscosidade que ela apresentará e, desta forma, mais difícil será para uma aplicação correta e agradável do produto cosmético (LUKIC et al, 2012; TAI et al, 2014; SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

Os resultados mostram valores maiores no trabalho de cisalhamento, firmeza, dureza, coesividade e pegajosidade para as formulações F1 (preparadas com amido de milho) e F2 (com os filtros solares adicionados diretamente na fase oleosa durante o preparo). Para a área cosmética esse tipo de característica não é muito bem aceita pelo consumidor e até mesmo no processo de produção, pois indica que as formulações poderão apresentar problemas na espalhabilidade, o que pode influenciar afetar as taxas de liberação dos CLNs e do seu desempenho na proteção solar (MARTO et al., 2016).

Em relação ao trabalho de cisalhamento, a perda de viscosidade causada pela adição do amido de milho na formulação F1 teve como consequência um maior trabalho de cisalhamento. Podemos justificar estas alterações físicas e mecânicas pela perda de componentes aquosos em uma formulação, onde há um rearranjo da estrutura da emulsão.

Em contraste, as formulações F3 formuladas com sílica, *Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer* e com a adição dos filtros solares após a dispersão em *Paraffinum Liquidum (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol*, foram caracterizadas com parâmetros relacionados ao perfil de textura menores, exceto pela elasticidade. Este fenômeno pode ser relacionado ao polímero emulsionante utilizado na formulação F3 que forma redes poliméricas com a água. Desse modo, quando há adição de filtros de caráter oleoso à formulação, a viscosidade da mesma e o trabalho de cisalhamento diminuem (LUBRIZOL, 2012; SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016). Consequentemente, a utilização da base líquida, uma mistura de esterol derivado de lanolina em uma base inerte contendo agentes de acoplamento e anti-

gelificação, possibilitou melhorar a estabilidade, perfil de textura e aparência da formulação (CRODA, 2003).

Nesse contacto, a escolha das matérias-primas é um dos passos mais importantes durante o desenvolvimento de cosméticos, concomitantemente a caracterização físico-mecânica das mesmas. Ceras, polímeros, surfactantes e outros ingredientes podem influenciar significativamente em propriedades importantes das formulações como a estabilidade, toxicidade, comportamento físico, eficácia e percepção sensorial (TAI et al, 2014).

Além das análises de textura e reologia, a avaliação sensorial é fundamental durante o processo de desenvolvimento de cosméticos, uma vez que a aceitação do mercado consumidor frente às características sensoriais é essencial para a escolha e uso contínuo do produto. Foi avaliado as formulações F2-VE, fotoprotetor sem adição de substâncias ativas com filtros solares dispersos diretamente na fase oleosa; F3-VE, F3-CLN, F3-CLN-VZ e F3-QT, fotoprotetores com e sem carreadores com os filtros solares incorporados imediatamente após a emulsificação à fase oleosa após dispersão em base de absorção de lanolina com objetivo de comparar se a forma de adição dos filtros influência no sensorial bem como a incorporação de substâncias ativas que serão utilizados durante o estudo clínico.

Desta maneira, foi possível observar as formulações no geral tiveram boa porcentagem aceitação pelas participantes do estudo, porém a formulação F3 obteve as maiores notas nos parâmetros avaliados que as demais formulações com *Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer* (Permulen TR2®). Logo, o resultado foi coerente com o resultado das análises de Textura e reologia, uma vez que as formulações F3 são mais fluidas e, segundo a literatura, tendem a apresentar melhores propriedades de textura, sensação ao toque e melhor espalhabilidade (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016). No entanto, a formulação F2-VE apresentou valores maiores de cisalhamento e durante a análise sensorial obteve as menores notas, comportamento encontrado em outros trabalhos na literatura (CALIXTO et al., 2018b).

As formulações F3-CLN VZ, F3-QT e F3-CLN apresentaram características sensoriais semelhantes, porém no parâmetro determinante “Intenção de compra” a formulação contendo o nanocarreador de queratina proporcionou melhor espalhamento e devido à menor consistência da formulação (SENGUPTA et al., 2016). Relacionando o presente resultado com os resultados da reologia e textura foi possível desenvolver uma formulação bem aceita pelas participantes do estudo em relação aos parâmetros “fácil de espalhar” e “ausência de pegajosidade”. Isso porque na análise de espalhabilidade a formulação F3-CLN apresentou trabalho de cisalhamento menor do que as formulações que não continham nanopartículas com

quercetina, indicando que a eficácia terapêutica depende também da sua espalhabilidade (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

Além da comprovação das características físico-mecânica desejáveis, a comprovação da eficácia clínica tem grande importância para que o produto final atenda as expectativas relacionadas a melhora visível das condições gerais da pele e melhor proteção solar da formulação. A ANVISA recomenda que a determinação do FPS seja realizada por métodos *in vivo*, aplicando estritamente os guias atualizados disponibilizados pela FDA e COALIPA. Desta forma, após a análise sensorial foi realizada avaliação do fator de proteção solar (FPS) *in vivo* das formulações, uma vez que reflete a eficácia do filtro solar em relação à razão entre a dose mínima pigmentaria na pele quando desprotegida e a dose pigmentaria na mesma pele quando desprotegida (BRASIL, 2012b).

A análise estatística dos valores FPS *in vivo* foram significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para as formulações F3-VE, F3-QT, F3-CLN e F3-CLN VZ. Por outro lado, o FPS das formulações F3-CLN VZ e F3-CLN não foram significativamente diferentes. Considerando que os valores de FPS *in vivo* podem estar diretamente relacionados à reologia, a proteção ideal da pele só é possível quando a formulação cobre uniformemente todo o microrrelevo da pele (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003). Desse modo, o uso dos nanocarreadores permitiu uma diminuição da viscosidade e tixotropia da formulação e proporcionou uma boa distribuição do filtro solar na pele e obtenção de um FPS significativamente maior para as formulações F3-CLN e F3-CLN VZ quando comparado com as formulações F3-VE e F3-QT, que apresentaram valores de tixotropia e taxa de cisalhamento superiores.

Os filtros solares modernos propõem neutralizar vários tipos de danos na pele induzidos pela radiação UV, como reações fotoalérgicas, rugas, queimaduras e ressecamento da pele. Devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, estudos sugerem que a quercetina pode prevenir danos na pele induzidos pela radiação UVB. Porém, Fahlman & Krol (2009) demonstraram que a quercetina sofre lentamente a decomposição induzida pela radiação UV, resultando em produtos da degradação do anel C ao longo de 11 h e, quando a benzofenona é adicionada, ocorre a conversão de 90% dentro de 1h.

A radiação UV penetra profundamente na pele e os ingredientes ativos aplicados topicamente apresentam uma fotoproteção satisfatória quando são capazes de permear através do estrato córneo e alcançar camadas mais profundas da pele. Zhu et al (2016) demonstraram que nanopartículas de PLGA-TPGS carregadas com quercetina podem auxiliar a superar a baixa hidrofobicidade da quercetina e melhorar o seu efeito anti-UVB bloqueando a expressão de cox-2 e a ativação de NF-kB, apresentando um efeito melhor do que a quercetina livre. Ademais, as

nanopartículas de quercetina permearam na epiderme e alcançaram a derme, auxiliando atenuar alterações macroscópicas e histopatológicas associadas à irradiação UVB na pele de camundongos.

Portanto, os valores de FPS *in vivo* obtidos para as formulações fotoprotetoras F3-VE e F3-QT foram próximas provavelmente devido à baixa permeação da quercetina e instabilidade do flavonóide, o que resultou em valores de FPS similares ao obtido na formulação sem a substância ativa. Com relação às formulações contendo nanopartículas lipídicas houve um aumento significativo do FPS quando comparado com a formulação sem quercetina (F3-VE). As nanopartículas lipídicas apresentam alto potencial para inibir a radiação UV, devido a formação de um filme oclusivo na superfície da pele que pode espalhar e refletir a radiação. Uma melhor fotoproteção pode ser obtida após a incorporação de nanocarreadores em formulações fotoprotetoras, atuando como filtros físicos e aumentando o FPS (JOSE & NETTO, 2019).

A evaporação das moléculas de água depende do tamanho das partículas, portanto quando o tamanho das partículas aumenta a taxa de evaporação das moléculas de água também diminui, pois, a superfície das partículas aumenta proporcionalmente, ou seja, há mais superfícies onde a luz é refletida, absorvida ou refletida auxiliando no aumento do FPS (KAMEL & MOSTAFA, 2015; ROBERTS et al., 2017). Assim, a formulação F3-CLN (com quercetina encapsulada) apresentou um tamanho de partícula de  $137,4 \pm 0,24$  e um FPS final de 58, enquanto a formulação F2-CLN VZ (sem quercetina encapsulada) apresentou um tamanho de partícula de  $131,9 \pm 0,22$ nm e o FPS final de 57, indicando que o tamanho das nanopartículas também pode influenciar na formação da camada protetora sobre a pele e contribuiu para o aumento do FPS. Enfim, o uso de nanopartículas em formulação fotoprotetoras apresenta-se como uma opção para aumento do FPS sem aumentar a quantidade de filtros químicos UVA e UVB e, por ser composta por lipídios biocompatíveis com a pele, podem adicionar características multifuncionais à formulação final.

Ao lado do desenvolvimento tecnológico, o estudo da biologia da pele e o estudo das interações entre o produto cosmético e a pele permite a elucidação dos mecanismos de ação, bem como a obtenção de produtos adequados à finalidade de uso. O Brasil é um país com alto índice UV e considerando que a intensidade do fotoenvelhecimento está intimamente relacionada ao grau de exposição aos raios UV, a pele jovem também pode apresentar envelhecimento, o que pode impactar a autoestima e a qualidade de vida dos jovens. Durante a triagem das participantes para o estudo clínico, foi avaliado por meio de questionários os

hábitos de exposição e proteção solar de uma amostra composta por 100 mulheres jovens com média de idade de  $27,5 \pm 2$  anos entre janeiro e maio de 2019.

Observou-se uma maior prevalência na utilização de filtro solar todos os dias, mesmo em dias nublados. Segundo dados da literatura, a utilização de proteção solar é a principal prevenção contra agravamentos como rugas ou perda da elasticidade natural da pele, além do problema de câncer de pele que atinge boa parte da população brasileira, tendo em vista que o Brasil é um país tropical com alta incidência de luz solar (FOSSA SHIRATA et al, 2019).

Estudos apontam que a população brasileira tem consciência desses riscos associados à exposição solar e conhece a importância do fotoprotetor. Porém, não consegue criar o hábito de passar protetor solar ao longo prazo (INFANTE et.al, 2016). As participantes relataram reaplicar o protetor solar apenas quando vão à praia ou a piscina ou não reaplicam no dia a dia, sendo as principais justificativas não se expor muito ao sol, menos de uma hora, e a exposição ao sol é decorrente ao deslocamento de um lugar para outro ao longo do dia. Entre os locais de aplicação do fotoprotetor, a maioria relatou aplicar no rosto o produto principalmente FPS 30 e 60. No entanto, para proteger contra a radiação ultravioleta, é importante aplicar uma quantidade suficiente de protetor solar em todos os locais expostos e, para conseguir isso, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) é importante aplicar o protetor solar antes da exposição ao sol e reaplicar a cada duas horas (HEERFORDT et al, 2018).

De acordo com Hillebrand et. al. (2001) os primeiros sinais de fotoenvelhecimento ocorreram em mulheres japonesas aos 20 anos de idade, com o aparecimento de rugas aos 30 anos. Outros autores mostraram que a origem de todos os sinais faciais de mulheres asiáticas de 20 anos que não estavam relacionadas ao envelhecimento cronológico, mas com a exposição ao sol (FOSSA SHIRATA et al, 2019). Corrêa (2015) demonstrou que as recomendações sobre proteção solar baseadas em pesquisas, principalmente nos EUA e na Europa, não são adequadas à realidade brasileira. O mesmo estudo mostrou que o índice solar na cidade de São Paulo (Brasil) foi significativamente maior do que em Paris (França). Portanto, destaca-se a importância dos hábitos de fotoproteção desde os primeiros anos de vida para retardar o aparecimento de alterações cutâneas causadas pela radiação solar.

Nos questionários de auto avaliação, as participantes relataram maior prevalência de queixas relacionadas à pele oleosa, acne e poros, condizente com estudos anteriores do grupo. A mulher está preocupada com o que determinada alteração em sua pele pode acarretar futuramente, buscando cosméticos que não sejam associados somente com a melhora da aparência, mas também corrijam e/ou evitem determinada alteração como formulações que

reduzam a oleosidade da pele (INFANTE et al, 2016). É importante compreender a interação entre a formulação e a pele do consumidor para uma maior adesão, de modo que o produto final atenda as expectativas do mercado levando em consideração todas as suas peculiaridades (SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2016).

O estudo clínico dos efeitos imediatos da aplicação das formulações possibilita observar a influência dos ingredientes utilizados na formulação sobre hidratação, função barreira e microrrelevo da pele. Em estudos recentes, a uniformidade e a espessura do filme do fotoprotetor aplicado resultante do produto na pele são cruciais para a proteção do sol. Verificou-se que a distribuição do filme de quantidades iguais de filtro solar varia dependendo da relação da fase oleosa e aquosa e das propriedades reológicas da formulação do filtro solar (KORN et al, 2016).

No presente estudo, o Visioscan® VC98, (Courage & Khazaka, Colônia, Alemanha) foi utilizado para avaliar o microrrelevo cutâneo. O equipamento fornece informações objetivas sobre a refletância especular da luz UVA. A luz UVA incidente é em parte transformada em luz fluorescente após a ativação de uma série de fluoróforos específicos presentes na pele, captando uma imagem da pele em 256 níveis de cinza, onde 0 equivale ao preto e 256 ao branco (GIANETI, 2013). O protetor solar UVA depositado na superfície da pele diminuirá a fluorescência que atinge a superfície da pele, indicando a presença de uma formulação sob a pele (PIÉRARD et al., 2015).

No estudo dos efeitos imediatos, as formulações F3-CLN e F3-CLN VZ apresentaram melhora mais pronunciada nos parâmetros rugosidade da pele (SEw) e maciez da pele (SEsm) quando comparada com as formulações F3-VE e F3-QT. Esse resultado confirma os dados da análise sensorial, no qual as participantes deram notas mais altas para o parâmetro “maciez da pele” após 5 minutos da aplicação da formulação CLN e CLN VZ, bem como os dados do FPS *in vivo*, resultado do acúmulo de nanopartículas na superfície da pele que favoreceram a maior uniformidade da barreira na pele e uma maior cobertura sobre os poros, consequência do efeito oclusivo dos CLNs, diminuindo a rugosidade da pele (MÜLLER et al., 2002; PARDEIKE et al., 2009).

Entretanto, para os parâmetros descamação da pele (SEsc) e aspereza da pele (SEr) observou-se que após 30 minutos da aplicação da formulação F3-CLN os mesmos aumentaram. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que os filtros solares são partículas de alto peso molecular e não devem exceder a quantidade recomendada na superfície epidérmica tanto para segurança (evitando possível toxicidade) quanto para eficácia, pois o objetivo dessas substâncias é proteger contra radiação UV na superfície da pele. Consequentemente, a formação

do filme protetor das nanopartículas e deposição dos filtros UV na superfície da pele pode preencher a rugosidade e trazer melhor uniformidade ao microrrelevo da pele (PARDEIKE et al., 2009; FOSSA SHIRATA & MAIA CAMPOS, 2017).

Verificou-se que as formulações CLN, CLN VZ e QT melhoraram a função de barreira da pele em comparação com os valores basais, uma vez que diminuiu o TEWL e aumentaram o conteúdo aquoso do estrato córneo. Devido à característica lipídica dos CLNs e ao seu diâmetro nanométrico, estas partículas podem atuar como oclusivas diminuindo ou evitando a perda de água transepidérmica e conseqüentemente aumentando a hidratação da pele, ocasionado pelo diâmetro menor que 200nm das partículas lipídicas que formam filmes lipídicos mais homogêneos (PARDEIKE et al., 2009; GASPARI et al, 2014; PIVETTA, 2018). Mesmo com o aumento da hidratação da pele e diminuição do TEWL, nos outros parâmetros analisados a formulação com quercetina livre não apresentou diferenças estatisticamente significantes.

Portanto, as nanopartículas lipídicas possuem propriedades adesivas e oclusivas. Eles criam na superfície da pele uma proteção filme, o que reduz a TEWL e permite a manutenção do nível adequado de hidratação. Em formulações cosméticas, CLNs são usados como portadores de substâncias ativas, contribuem para melhorar a penetração e distribuição da substância ativa (ZIELINSKA & NOWAK, 2016; SOUZA & CAMPOS, 2017; GARCÊS et al., 2018).

Além da investigação dos efeitos imediatos, a eficácia clínica das formulações foi avaliada em longo prazo. Existem poucos relatos na literatura que demonstram a eficácia clínica da associação de nanocarreadores em formulações cosméticas utilizando técnicas de biofísica e análise de imagem da pele. Entretanto, apesar dos resultados da formulação F3-QT não demonstrarem instabilidade e comprometimento da segurança, dados da literatura demonstram que a quercetina pode exibir potencial fototóxico e fotoinstável.

Pivetta e colaboradores (2019) avaliaram o potencial fototóxico de uma formulação com quercetina livre, a qual apresentou potencial fototóxico. Porém, na avaliação com a quercetina incorporada em carreador lipídico a mesma é protegida da oxidação química e degradação enzimática e ainda preserva suas propriedades. Dessa maneira, durante o estudo a longo prazo foi avaliada a eficácia clínica das formulações F3-VE, formulação fotoprotetora sem adição da substância ativa, F3-CLN VZ, formulação fotoprotetora com nanocarreador sem quercetina, F3-CLN, formulação fotoprotetora contendo nanocarreador com quercetina. As medidas instrumentais foram realizadas na região malar da face antes e após 30 e 60 dias de uso da formulação para comparar as alterações na pele provocadas pelo produto. Não foi realizado um

grupo controle neste estudo (grupo que não aplicou nenhuma formulação fotoprotetora), devido às questões éticas.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que as formulações F3-CLN e F3-CLN VZ apresentaram melhores resultados na maioria dos parâmetros avaliados. A utilização da formulação F3-CLN VZ provocou melhora significativa da hidratação, por aumento o conteúdo aquoso do estrato córneo e redução da anisotropia, bem como melhora na ecogenicidade da derme. Em função da variação interindividual, em alguns resultados não foram estatisticamente significantes, porém mostraram tendência na diminuição da rugosidade da pele (SER), descamação da pele (Sesc) e MeanGL.

A formulação F3-CLN atuou significativamente na diminuição da perda de água transepidérmica, parâmetro SER (rugosidade da pele), número e largura das rugas (Sew), rugosidade da pele (R2), índice de eritema, anisotropia e Mean GL, além do aumento da hidratação, GrayIndex, viscoelasticidade da pele (R6) e ecogenicidade da derme.

A presença de uma quantidade adequada de água é um requisito essencial para a manutenção da estrutura e funções normais do estrato córneo. Sabe-se que as propriedades elétricas da pele estão relacionadas com o teor de água do estrato córneo. Os hidratantes podem agir de forma oclusivas, impedindo a evaporação da umidade da pele formando um filme gorduroso que evita a perda de água, como é o caso dos óleos e lipídios, ou como umectantes que atuam atraindo a água das outras camadas da epiderme para o estrato córneo. Conseqüentemente, estudos com produtos hidratantes deve avaliar o aumento do teor de água do estrato córneo e também a diminuição do TEWL, a fim de determinar seu mecanismo de ação (DAL'BELO et al., 2006; CLARYS & BAREL, 2017).

Os métodos biofísicos mais utilizados para avaliar a função barreira da pele são o Corneometer® e o Tewameter®. A avaliação da hidratação da superfície da pele fornece informações importantes sobre a quantidade de água presente no estrato córneo. A perda de água transepidérmica (TEWL) representa a perda total de água da epiderme viável e derme, por difusão através do estrato córneo para a superfície, originada das glândulas sudoríparas (DAL'BELO et al., 2006; MACHADO et al., 2010; CLARYS & BAREL, 2017). Entretanto, quando a integridade da pele está danificada, o TEWL tende a aumentar, o que poderia comprometer a eficácia da função barreira do estrato córneo (TICHOTA et al, 2014; SOUZA & CAMPOS, 2017). Logo, as formulações fotoprotetoras sem adição de substâncias ativas (grupo 2) e a formulação fotoprotetora com nanopartículas sem quercetina (grupo 1) apresentaram aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo, enquanto as formulações

adicionadas de nanocarreadores com (grupo 3) promoveu aumento significativo do conteúdo aquoso do estrato córneo e redução significativa do TEWL.

Como apontado por muitos autores, as complexas propriedades de impedância elétrica da camada córnea dependem do teor de água dessa camada, mas também de uma variedade de outros fatores (íons, proteínas, hidratantes, etc.) e qualquer alteração na estrutura do estrato córneo pode estar associada a alterações na função barreira e na capacidade de retenção de água (LÉVÊQUE et al., 2006; CLARYS & BAREL, 2017). Recentemente um novo método de mapeamento da capacitância da pele foi desenvolvido, mostrando as diferenças detalhadas na hidratação do estrato córneo sobre a superfície da pele. O MoistureMap<sup>®</sup> utiliza um sistema de imagem não-óptico da superfície da pele, as imagens são adquiridas e os valores da capacitância são transformados em um intervalo de 256 níveis de cinza para compor uma imagem. Logo, os valores do nível médio de cinza da imagem podem ser correlacionados com os valores dados pelo Corneometer<sup>®</sup> e Tewameter<sup>®</sup> para se determinar o efeito de produtos na função de barreira da pele e no equilíbrio hidrolipídico do estrato córneo (XHAUFLAIRE-UHODA & PIÉRARD, 2009; CLARYS & BAREL, 2017).

Foi observado um aumento significativo no GrayIndex do grupo 3 que utilizou a formulação fotoprotetora contendo nanocarreador com quercetina após 60 dias, indicando uma maior distribuição de água na superfície da pele. Ao mesmo tempo foi observado diminuição do parâmetro MeanGL relacionado com os níveis médio de cinza e, quanto menor o número mais hidratado a pele. Deste modo, podemos sugerir que a formulação F3-CLN foi mais eficaz na manter a função barreira da pele. Este resultado foi decorrente da combinação de agentes oclusivos e umectantes presentes nas formulações objeto de estudo associados com as nanopartículas com quercetina, o que promoveu a formação de um filme oclusivo sobre a pele, prevenindo a perda transepidérmica de água e retendo sob o estrato córneo.

Como demonstrado no estudo dos efeitos imediatos, todas as formulações promoveram hidratação da pele, porém a associação de nanopartículas lipídicas e quercetina levou a uma hidratação mais eficiente por meio da formação de um filme oclusivo que favoreceu a uma maior cobertura sobre os poros. Essas propriedades estão relacionadas à composição fisiológica dos CLNs que podem interagir com o estrato córneo, criando um rearranjo lipídico, o que facilita a penetração das moléculas. A hidratação da pele por meio da aplicação das nanopartículas seria por dois mecanismos: pela formação de um filme oclusivo na superfície do estrato córneo que evita a perda de água transepidermica, e através do reforço da barreira do filme lipídico da pele pela adesão de nanopartículas na superfície da pele (PARDEIKE et al, 2009; GARCÊS et al., 2018).

O grau de oclusão da pele é baseado no tamanho das partículas. Quanto menor o tamanho das partículas, menor a perda de água transepidérmica, enquanto quanto maior o tamanho das partículas, mais água evapora. Porém a associação da quercetina com as nanopartículas proporcionou uma maior uniformidade da cobertura do filtro solar sobre a pele, favorecendo o aumento da proteção solar e manutenção da hidratação (MÜLLER et al., 2002; PARDEIKE et al., 2009; LOO et al, 2013).

O método de sucção do Cutometer® permite a medição da viscoelasticidade da pele humana, a qual é relacionada com a idade, sexo e região anatômica. O princípio de medição baseia-se no método de sucção que consiste na medição da deformação vertical da superfície da pele após a aplicação do vácuo. A avaliação da elasticidade é importante para estudos no campo da dermatologia e cosméticos, ao passo que as propriedades mecânicas da pele desempenham um papel fundamental na manutenção das características normais da pele, incluindo aparência, função de barreira, regulação da temperatura e de funções imunológicas (EZURE et al., 2016; SOUZA, 2016; DOBREV, 2014).

Os resultados da avaliação da elasticidade bruta ( $U_a/U_f - R2$ ), elasticidade líquida ( $U_r/U_e - R5$ ) após 60 dias de utilização das formulações apresentaram valores semelhantes em todos os grupos. As principais diferenças obtidas neste estudo são o aumento significativo da porção viscoelástica da pele ( $U_v/U_e - R6$ ) para o grupo que utilizou a formulação F3-CLN. Além disso foi observado uma tendência ao aumento da recuperação após deformação ( $U_r/U_f - R7$ ) com relação ao grupo que utilizou a formulação F3-CLN, porém em função da variação interindividual, os resultados não foram estatisticamente significantes.

Os parâmetros de viscoelasticidade corroboram com os resultados obtidos sobre na hidratação da pele, uma vez que foi observado um aumento da relação viscoelasticidade/elasticidade da pele ( $U_v/U_e - R6$ ) no grupo 3, que recebeu o fotoprotetor com nanopartículas com quercetina.  $U_e$  está relacionado com a distensão imediata da pele e reflete a espessura da pele e rigidez, diminuindo durante o envelhecimento da pele. No entanto, a aplicação de hidratantes e emolientes induz um aumento no parâmetro  $U_v$ , devido o amolecimento da camada córnea e melhora da plasticidade da camada epidérmica. Ademais, o parâmetro  $U_v$  é relacionado com a viscosidade do fluido intersticial, como resultado da quantidade total de glicosaminoglicanos e colágeno solúvel na derme. (DOBREV, 2000; DOBREV, 2014).

Alguns estudos sugerem que os parâmetros relacionados com a elasticidade da pele, como a elasticidade líquida ( $U_r/U_e - R5$ ), elasticidade bruta ( $U_a/U_f - R2$ ) e elasticidade biológica ( $U_r/U_f - R7$ ), são influenciados principalmente pelo envelhecimento cronológico (LIU, 2007). De acordo com Dobrev (2014) a avaliação da elasticidade biológica ( $U_r/U_f$ ) é um

dos melhores parâmetros para análise da elasticidade cutânea uma vez que leva em consideração também a porção viscoelástica da pele e encontra-se reduzida tanto na pele fotoenvelhecida quanto na envelhecida por fatores cronológicos.

No entanto, considerando que o grupo de participantes era jovem e com hábitos de fotoproteção não foi observado diferenças significativas nos parâmetros R2 e R5. No entanto foi observado uma tendência no aumento do parâmetro R7 no grupo 3 que utilizou a formulação com F3-CLN. O parâmetro R7 representa a razão entre a retração imediata e a distensão final do primeiro período de vácuo ( $U_r/U_f$ ) e pode estar mais intimamente relacionado à elasticidade da pele para o aspecto físico, portanto, tem sido referido com a firmeza da pele (DOBREV; 2014; SOUZA & CAMPOS, 2017). Neste caso, também foi verificado a influência significativa do antioxidante na melhora das condições da pele, o que corrobora com os resultados encontrados nos outros equipamentos.

A anisotropia da pele, condição de variabilidade das propriedades físicas da pele segundo direções diferentes, onde o valor é sempre maior que 1, exceto no caso de uma pele isotrópica, sendo que, quanto mais próximo de 1 menor será a anisotropia, ou seja, menor será a desorganização das fibras elásticas, o que reflete no aumento da firmeza da pele (GIANETI, 2013). Os valores de anisotropia do grupo 1, o qual utilizou a formulação fotoprotetora com nanopartículas, apresentou diminuição significativa após 30 dias de uso, no entanto o grupo 3, que utilizou a formulação fotoprotetora contendo CLN com quercetina, apresentou diminuição significativa após 60 dias. Com os resultados obtidos nesse parâmetro, podemos observar que os dados corroboram com os dados de hidratação e viscoelasticidade da pele, parâmetro ligado com a densidade dos tecidos e a organização das fibras de colágeno (RUVOLO et al, 2007).

A anisotropia da pele foi reconhecida no século 19 por Langer (1861), que mapeou as linhas naturais de tensão que ocorrem na pele. A resistência mecânica da pele é principalmente atribuída à matriz dérmica, que consiste predominantemente de colágeno e elastina, permitindo que a derme se deforme devido à pressão e, ao mesmo tempo, minimize a tensão sobre a pele e espera-se que as propriedades da pele sigam também a anisotropia. Durante a infância, a pele responde isotropicamente à tensão, enquanto na idade adulta esse comportamento tende a regredir devido à perda de elastina e colágeno (KHATYR et al, 2004; RUVOLO et al, 2007).

A análise do microrrelevo cutâneo apresenta grande importância, uma vez que permite por meio da avaliação de imagens obter uma medida indireta quanto a hidratação da pele, pois o intumescimento das células da superfície da pele fica mais uniforme e com menos rugosidades (FERREIRA et al, 2010). No presente estudo, houve melhora da rugosidade da pele devido à diminuição significativa do parâmetro SER (aspereza) após tratamento com a formulação F3-

CLN, e observou-se uma tendência de diminuição também para as formulações F3-CLN VZ e F3-VE. Para o parâmetro relacionado à descamação da pele (SEsc), houve melhora significativa nos grupos que receberam as formulações F3-CLN e F3-VE, correlacionados com os dados observados no estudo imediato e na análise sensorial bem como a análise sensorial. A melhora do microrrelevo da pele por consequência da diminuição da rugosidade e pela formação de filme foi mais pronunciada para a formulação CLN. Na análise de maciez da pele (SEsm), todos os grupos apresentaram resultados semelhantes.

Além disso, observou-se diminuição significativa do número e largura das rugas (Sew) e rugosidade da pele (parâmetro R2) com a aplicação da formulação contendo nanopartículas e quercetina. Considerando que a pele seca é caracterizada pelos altos valores de SER e Sew, podemos sugerir que as formulações contendo nanopartículas e quercetina possuem efeito hidratante, proporcionando um aumento do conteúdo hídrico das camadas mais profundas da epiderme, e melhora da aparência da pele (PARDEIKE et al, 2009; GARCÊS et al., 2018).

Um dos principais efeitos cutâneo resultante do estresse oxidativo é o eritema, que pode ser provocado experimentalmente por meios químicos e físicos, sendo a radiação UV mais potentes na indução de reações eritematosas e podem ser quantificadas com grande precisão por instrumentos que medem a vermelhidão ou a quantidade de fluxo sanguíneo capilar (ANDREASSI et al, 2004). Em relação aos dados do Mexameter® não foram observadas alterações significativas no parâmetro Melanina, porém foi observado uma tendência na diminuição do índice do grupo 3 após 60 dias de utilização da formulação. Já o Índice de Eritema teve uma diminuição significativa para a formulação com nanopartículas e quercetina, isso demonstra os efeitos protetores das formulações e a subsequente redução do eritema é proveniente da utilização da quercetina em nanopartículas que auxilia na estabilidade e proteção UV.

Dados da literatura demonstram que a quercetina exibe capacidade de bloquear a inflamação induzida pela radiação ultravioleta via inativação de NF- $\kappa$ B em queratinócitos primários, além da prevenção de danos na pele induzidos pela radiação UVB (CASAGRANDE et al., 2006; VICENTINI et al., 2011). Porém devido a baixa permeação e solubilidade em água, a utilização de nanoestruturas possibilita melhoria da fotoestabilidade bem como a entrega sustentada. Assim, o uso de carreadores lipídicos nanoestruturados promoveu a liberação controlada de quercetina e protegeu contra a degradação, permitindo a liberação da substância ativa em locais específicos na pele. O filme protetor formado pelas CLNs reduz o tamponamento dos conócitos que abrem algumas lacunas, facilitando a permeação cutânea da substância ativa encapsulado. Pivetta et al (2019) apresentou resultados do ensaio de

penetração utilizando células de difusão de Franz e a quercetina não foi detectada no estrato córneo, no entanto as nanopartículas contendo quercetina aumentaram a penetração da quercetina na pele em camadas mais profundas da epiderme e derme, provavelmente pelo efeito oclusivo que altera a compactação das células levando a penetração da quercetina. Além disso, a ação antioxidante contra o estresse oxidativo, o fotoenvelhecimento e a inflamação da pele promovido pela quercetina ocorre principalmente nas primeiras camadas da pele e não sistêmica (HATAHET et al, 2016). Portanto o uso de nanocarreadores proporcionou maior estabilidade para a quercetina e, por conta da sua atividade antioxidante, e auxiliou na melhora da ecogenicidade da pele.

A espessura e a relação de ecogenicidade da derme estão correlacionadas aos danos causados pela radiação solar e fotoenvelhecimento cutâneo e, portanto, têm sido empregados para avaliar a eficácia de formulações anti-idade e fotoprotetoras empregando-se o ultrassom de 20 MHz (GNIADÉCKA et al., 1994; SOUZA, 2016). A ultrassonografia é um método não invasivo e de custo relativamente baixo. Foi usado pela primeira vez em dermatologia em 1979 para medir a espessura da pele. As unidades de ultrassom de 20MHz (alta frequência) bidimensional (B-scan), disponível desde a década de 1980, devido ao surgimento de transdutores mecânicos que permitiram imagens transversais da pele.

Foi observado que as formulações fotoprotetoras F3-VE, F3-CLN VZ e F3-CLN promoveram alterações significativas na ecogenicidade da derme após 60 dias de aplicação sem alterações significativas na espessura da derme. No entanto, a formulação F3-CLN apresentou resultados mais significativos ao longo dos 60 dias de aplicação da formulação, sugerindo que a associação das nanopartículas com a quercetina ofereceu proteção adicional contra os danos da radiação solar a nível da derme. Além disso, por serem avaliadas mulheres jovens com hábitos de fotoproteção, as imagens iniciais da pele das participantes não apresentavam características de fotoenvelhecimento cutâneo como a formação de uma faixa de baixa ecogenicidade, muito escura, logo abaixo da epiderme.

A radiação UVA penetra profundamente na pele, causando colapso do colágeno, provocando a produção de fibras elásticas anormais que resultam em elastoses. Os vasos sanguíneos dérmicos tornam-se dilatados e distorcidos e, por fim, são quase destruídos. Em humanos, a exposição crônica aos raios UV faz com que a pele fique amarela, enrugada e flácida, uma condição conhecida como fotoenvelhecimento. Estudos anteriores na literatura demonstraram, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, um aumento da eficácia fotoprotetora na região UV após associação de filtros UV e antioxidantes, devido à redução da expressão das metaloproteinases de matriz, de mediadores de processos inflamatórios, bem como da depleção

das células de Langerhan's (CHOMICZEWSKA-SKÓRA et al, 2013; HATAHET et al, 2016; BERKEY et al., 2017). Joshan et al (2013) avaliou a atividade protetora da quercetina contra o fotoenvelhecimento em camundongos, a qual foi responsável por reduzir o efeito do envelhecimento induzido pela radiação UV na pele, o número e profundidade de rugas, atenuou o eritema e diminuiu a perda de água, ou seja, ajudou a aumentar o teor de água na pele.

Souza & Campos (2017) obtiveram resultados semelhantes para utilização de fotoprotetores acedidos com uma combinação dos antioxidantes Spirulina e DMC-NLS melhorou a razão de ecogenicidade da pele do que a formulação fotoprotetora sem substâncias ativas após 84 dias de utilização da formulação, provavelmente devido atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio (EROS) dos antioxidantes Spirulina e DMC. Além disso, outros estudos também relataram que os antioxidantes melhoram a ecogenicidade da derme, preservando a integridade do colágeno do estresse oxidativo (JOSHAN et al, 2013; NGAN et al., 2015; POON et al, 2015). Esses dados corroboram com os resultados obtidos pelo aumento da viscoelasticidade da pele – parâmetro Uv/Ue (R6) e hidratação da pele.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram a importância da proteção solar na prevenção de manchas e outras alterações relacionadas ao fotoenvelhecimento. Martine e colaboradores (2017) mostraram que mulheres jovens que apresentavam alta exposição solar e nenhum hábito diário de uso de protetores solares apresentavam manchas hiperpigmentadas, enquanto que as participantes com menor frequência de exposição ao sol, bem como hábitos diários de uso de protetor solar apresentavam menos manchas. Fossa Shirata e colaboradores (2019) apresentaram dados sobre as alterações morfológicas e estruturais causadas pela radiação solar em jovens, destacando a importância dos hábitos de fotoproteção e o desenvolvimento de produtos dermocosméticos particularmente focados para este tipo de pele, a fim de retardar o aparecimento dos primeiros sinais do fotoenvelhecimento.

Em síntese, a presença das nanopartículas contendo quercetina implicou na melhora da eficácia clínica da formulação fotoprotetora estudada em relação aos parâmetros relacionados à hidratação, função barreira e propriedades mecânicas da pele. Foi possível observar que as formulações contendo nanopartículas tiveram eficácia significativa na melhora das condições da pele em comparação a formulação que não continha a substância ativa objeto de estudo, demonstrando a importância do desenvolvimento de formulações contendo nanopartículas e antioxidantes para obtenção de produtos mais eficazes.

Além disso, a aplicação das técnicas empregadas no presente estudo foram fundamentais para o desenvolvimento e obtenção de uma formulação multifuncional estável e eficaz. A partir dos dados da percepção de eficácia as participantes relataram maior hidratação,

redução das manchas e aumento da maciez da pele em todos os grupos, porém com destaque para as participantes do grupo 3, no qual 60% das participantes relataram melhora no parâmetro maciez e 70% observaram não apresentar manchas na pele. Desse modo, a maior parte das participantes do estudo classificou como excelente e muito boa as formulações e 75% compraria o produto.

Em síntese, o presente trabalho resultou em um produto estável, seguro e eficaz para a proteção solar com alto FPS e abre perspectivas para utilização de nanopartículas contendo quercetina em produtos cosméticos. Além disso, a correlação das técnicas empregadas nesse estudo foi fundamental na definição e obtenção de uma formulação multifuncional estável, com propriedades sensoriais adequadas às finalidades propostas, eficácia clínica comprovada e FPS alto para melhor proteção da pele.

## 8. CONCLUSÃO

---

Nas condições experimentais deste estudo, foi possível concluir que:

Dentre as formulações fotoprotetoras desenvolvidas, as formulações F3 que continham sílica, *Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer* e com a adição dos filtros solares após a dispersão em *Paraffinum Liquidum (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol* foram consideradas estáveis e apresentaram comportamento reológico não newtoniano do tipo pseudoplástico.

Na avaliação do perfil de textura, a adição das substâncias ativas objeto de estudo reduziu o parâmetro trabalho de cisalhamento e, conseqüentemente, melhorou as propriedades sensoriais da formulação, o que favorece a aplicação do fotoprotetor e conseqüente formação de um filme protetor na pele.

A correlação do comportamento reológico e perfil de textura com a análise sensorial das formulações possibilitou a escolha correta das matérias-primas e suas combinações uma vez que pode identificar características importantes para modular o desempenho da formulação, contribuindo para melhora do FPS sem alterar a quantidade de filtros UV. Por meio da formação de um filme oclusivo pelas nanopartículas lipídicas na superfície da pele que aumentam a hidratação imediata e reduziram a perda de água transepidérmica no estudo imediato

Na avaliação da eficácia clínica em longo prazo, a formulação fotoprotetora desenvolvida com CLN e CLN contendo quercetina mostrou eficácia na melhora da hidratação, viscoelasticidade da pele e controle da perda de água transepidérmica. Além disso, foram obtidos resultados significativos na melhora da ecogenicidade e GrayIndex- melhora da hidratação para a formulação com CLN e quercetina quando comparada com as demais formulações.

Por fim, a formulação proposta, contendo CLNs com quercetina, apresentou perfil de textura, comportamento reológico e propriedades sensorial adequadas às finalidades propostas, bem como eficácia clínica imediata e em longo prazo no equilíbrio hidrolipídico da pele e melhora das alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento, como o viscoelasticidade e relação de ecogenicidade da pele. Dessa forma, foi obtida uma formulação inovadora para proteção solar.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABIHPEC, Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, Caderno de tendências 2019-2020. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>. Acesso em 29 de julho de 2019.

ACCETTURI, C., CASTILHO, K., OLIVEIRA, M. S. D., BERARDOCCO, R., CASTILHO, V. C., LOUSANA, G. Pesquisa clínica no Brasil. In *Pesquisa clínica no Brasil*, (2002).

ALVES, Vanessa Dias et al. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, v. 78, n. 3, p. 941-946, 2007.

ANDREASSI, M., STANGHELLINI, E., ETTORRE, A., DI STEFANO, A., & ANDREASSI, L.; Antioxidant activity of topically applied lycopene. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 18, n. 1, p. 52-55, 2004.

ATTAMA, A. A., MOMOH, M. A., & BUILDERS, P. F., Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development. *Recent advances in novel drug carrier systems*, v.5, p.107-140, 2012.

BAGATIN, E.; DE VASCONCELOS, N. C., L.; SOARES, J. L. M., Ultrasound and dermatology: basic principles and main applications in dermatologic research. *Expert Review of Dermatology*, v. 8, n. 5, p. 463-477, 2013.

BAHARI, A.; AKOH, C. C.; Synthesis of a Cocoa Butter Equivalent by Enzymatic Interesterification of Illipe Butter and Palm Midfraction. *J Am Oil Chem Soc*, v.95, p. 547-555, 2018.

BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H.; The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review; *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, n.6, v.2, p.143-151, 2016.

BALOGH, T. S., VELASCO, M. V. R., PEDRIALI, C. A., KANEKO, T. M., BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An Bras Dermatol*, v.86, n.4, p.732-42, 2011.

BADEA, G., LĂCĂTUȘU, I., BADEA, N., OTT, C., & MEGHEA, A., Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, v.67, p.18-24, 2015.

BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. (Ed.). *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, p.869, 2009.

BEHLING, E. V., SENDÃO, M. C., FRANCESCATO, H. D. C., ANTUNES, L. M. G., BIANCHI, M. D. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.15, n.3, p.285-292, 2008.

BERKEY, C.; BINIEK, K.; DAUSKARDT, R. H. Screening sunscreens: protecting the biomechanical barrier function of skin from solar ultraviolet radiation damage. *International journal of cosmetic science*, v. 39, n. 3, p. 269-274, 2017.

BOSE, S., DU, Y., TAKHISTOV, P., & MICHNIAK-KOHN, B., Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *International journal of pharmaceutics*, v.441, n.1-2, p.56-66, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899: Validação De Métodos Analíticos E Bioanalíticos Métodos Analíticos, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2ª edição. Brasília, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Fica aprovado o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos nos termos desta Resolução. *Diário Oficial da União*, Brasília, 04 jun. 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 466, de 12 de dezembro de 2012 que trata de pesquisas e testes em seres humanos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 dez. 2012c.

BRUMMER, R.; *Rheology essentials of cosmetic and food emulsions*. Springer Science & Business Media., 2006.

BURKE, K. E.; *Mechanisms of aging and development—A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants*. *Mechanisms of ageing and development*, v. 172, p. 123-130, 2018.

CALIXTO, L. S., & MAIA CAMPOS, P. M. B. G., Physical–Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties. *International journal of cosmetic science*, v.39, n.5, p.527-534, 2017.

CALIXTO, L. S., CAMPOS, P. M. M., SAVARY, G., PICARD, C.; Interactions between UV filters and active substances in emulsion: Effect on microstructure, physicochemical and in-vivo properties. *International journal of pharmaceutics*, v.553, n.1-2, p.220-228, 2018a.

CALIXTO, L. S., INFANTE, V. H. P., & CAMPOS, P. M. M., Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. *AAPS PharmSciTech*, v.19, n.4, p.1512-1519, 2018b.

CARNEVALE, F. C. S. C. Desenvolvimento de formulações para a proteção da pele a base de ingredientes naturais: avaliação das propriedades físico mecânicas e eficácia clínica por análise de imagem (Universidade de São Paulo), 2017.

CARVALHO, I. P. S., MIRANDA, M. A., SILVA, L. B., CHRYSOSTOMO-MASSARO, T. N., PASCHOAL, J. A. R., BASTOS, J. K., MARCATO, P. D. IN VITRO Anticancer Activity and Physicochemical Properties of SOLANUM LYCOCARPUM Alkaloidic Extract Loaded in Natural Lipid-Based Nanoparticles. *Colloid and Interface Science Communications*, v.28, p.5-14, 2019.

CASAGRANDE, R., GEORGETTI, S.R., VERRI, W.A., DORTA, D.J., DOS SANTOS, A.C., FONSECA, M.J.V., Protective effect of topical formulations containing quercetin against

UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* v.84, p.21–27. 2006.

CHEN-YU, G., CHUN-FEN, Y., QI-LU, L., QI, T., YAN-WEI, X., WEI-NA, L., GUANG-XI, Z., Development of a Quercetin loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. *Int. J. Pharm.* v.430, p.292–298, 2012.

CHIEN, A. L., QI, J., GRANDHI, R., KIM, N., CÉSAR, S. S. A., HARRIS-TRYON, T., RAINER, B. M. Effect of Age, Gender, and Sun Exposure on Ethnic Skin Photoaging: Evidence Gathered Using a New Photonumeric Scale. *Journal of the National Medical Association*, v.110, n.2, p.176-181, 2018.

CHOMICZEWSKA-SKÓRA, D., ADAMUS, A., TRZNADEL-GRODZKA, E., & ROTSZTEJN, H. Effects of ultraviolet radiation on Langerhans cells. *Central European Journal of Immunology*, v.38, n.3, p.393-398, 2013.

CLARYS, P., & BAREL, A. O., Measurement of skin surface hydration. *Agache's Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*, 143-147, 2017

COLIPA. Guidelines. In: *In vitro UV Protection Method Task Force. In vitro method for the in vitro determination of UVA protection factor and critical wavelength values of sunscreen products*, 2011.

CHOQUENET, B; COUTEAU, C; PAPARIS, E; COIFFARD, I.J., Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: Determination of efficacy by an in vitro method. *J Nat Prod*, v.71, p.1117–1118, 2008.

CLARYS, P., ALEWAETERS, K., LAMBRECHT, R., BAREL, A. O., Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin research and technology*, v.6, n.4, p.230-238, 2000.

CORRÊA, M. P.; Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 90, n. 3, p. 297-313, 2015.

COSTA, R.; SANTOS, L.; Delivery systems for cosmetics-From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*, v. 322, p. 402-416, 2017.

CRISAN, D., LUPSOR, M., BOCA, A., CRISAN, M., & BADEA, R., Ultrasonographic assessment of skin structure according to age. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, v.78, n.4, p.519, 2012.

CRODA, Base Líquida, Informe Técnico. Croda do Brasil. 2003

CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A., SZEKALSKA, M., & WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 2018.

DAHMS, G.H., Einflub der Thixotropie auf die Lichtschutzwirkung von Sonnenschutzemulsionen. *Parfuem. Kosmet* v.75, p.675-679, 1994.

DAHMS, G.H. Escolha de emolientes e emulsificantes para produtos solares. *Cosmet. Toil.* (ed Port), São Paulo, v.8, n.4, p.63-68, 1996.

DAL'BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G., Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Research and Technology*, v.12, n.4, p. 241-246, 2006.

DE MELO, M. O.; CAMPOS, P. M.B.G. M., Função de Barreira da Pele e pH Cutâneo. *Cosmetics & Toiletries*. v.28, 2016a.

DE MELO, M. O.; CAMPOS, P. M.B.G. M., Técnicas de Biofísica e Imagens da Pele na Pesquisa Clínica. *Cosmetics & Toiletries*. v.28, 2016b.

DE MELO, M. O.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Characterization of oily mature skin by biophysical and skin imaging techniques. *Skin Research and Technology*, v.24, n.3, p.386-395, 2018.

DOBREV, H. Use of cutometer to assess epidermal hydration. *Skin Res. Technol.*, v.6, p.239-244, 2000.

DOBREV, H. Cutometer®. In: *Non invasive diagnostic techniques in clinical dermatology*. Springer, Berlin, Heidelberg, p.315-338, 2014.

DRANSFIELD, G. P. Inorganic sunscreens. *Radiation protection dosimetry*, v.91, n.1-3, p.271-273, 2000.

DUPONT, E., GOMEZ, J., & BILODEAU, D., Beyond UV radiation: a skin under challenge. *International journal of cosmetic science*, v.35, n.3, p.224-232, 2013.

EMBUSCADO, M.E.; Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - Amini review, J. *Funct. Foods*, v.18, p.811–819, 2015.

EMRI, G., PARAGH, G., TÓSAKI, Á., JANKA, E., KOLLÁR, S., HEGEDŰS, C., REMENYIK, É., Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.185, p.169-175, 2018.

EZURE, T.; YAGI, E.; AMANO, S.; MATSUZAKI, K. Dermal anchoring structures: convex matrix structures at the bottom of the dermal layer that contribute to themaintenance of facial skin morphology. *Skin Res. Technol.*, v.22, p.152–157, 2016.

FAHLMAN, Brian M.; KROL, Ed S. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.97, n.3, p.123-131, 2009.

FERREIRA, M.R.P., COSTA, P.C., BAHIA, F.M., Efficacy of anti-wrinkle products in skin surface appearance: a comparative study using non-invasive methods. *Skin Res Technol*. V.16, p.444-449, 2010.

FITZPATRICK TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.*, p.869-71, 1988.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA): Guidance for Industry Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products, 2014. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-safety-nanomaterials-cosmetic-products>. Acesso em 28 de julho de 2019.

FOSSA SHIRATA, M. M., & CAMPOS, P. M., Influence of UV filters on the texture profile and efficacy of a cosmetic formulation. *International journal of cosmetic science*, v.39, v.6, p.622-628, 2017.

FOSSA SHIRATA, M. M.; ALVES, G. A. D.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Photoageing-related skin changes in different age groups: a clinical evaluation by biophysical and imaging techniques. *International journal of cosmetic science*, 2019.

FRONZA, T.; GUTERRES, S.S; POHLMANN, A.R; TEXEIRA, H. Nanocósméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios, 1 ed. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2007.

GARCÊS, A., AMARAL, M. H., LOBO, J. S., & SILVA, A. C. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.112, p.159-167, 2018.

GASPAR, L.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G., Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *Int. J. Pharm.* n.250, n.1, p.35–44 2003.

GASPARI, P.D.M.; NAAL, R.M.Z.G.; CAMPOS, P.M.B.G.M.; DIAS, J.R.; DEL LAMA, M.P.F.M.; PIVETTA, T.P., Formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados e uso da mesma, Patente: BR 102014026499-0, 23 out, 2014.

GATTEFOSSÉ, EMULIUM MELLIFERA MB, Technical Data Sheet. M/S. GATTEFOSSE SAS, France. 2017

GAZIM, Z. C.; REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R.; SVIDZINSKI, T. I E.; CORTEZ, D. A. G; Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* l. (asteraceae) growing in Brazil; *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.61-63, 2008.

GIANETI, M. D., Estabilidade e eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo filtro solares, vitaminas lipossolúveis e extrato de *Ginkgo biloba* e algas marinhas vermelhas, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

GILBERT, L., SAVARY, G., GRISEL, M., & PICARD, C., Predicting sensory texture properties of cosmetic emulsions by physical measurements. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, v. 124, p. 21-31, 2013.

GNIADECKA, M.; GNIADECKI, R.; SERUP, J.; SONDERGAARD, J. Ultrasound structure and digital image analysis of the subepidermal low echogenic band in aged human skin: Diurnal changes and interindividual variability. *J. Invest. Dermatol.*, v.102, p.362–365, 1994.

GLASAUER, A.; CHANDEL, N.S.; Targeting antioxidants for cancer therapy, *Biochem. Pharmacol.*v.92, p.90–101, 2014.

GOKÇE, E. H., YAPAR, E. A., TANRIVERDI, S. T., & ÖZER, Ö., Nanocarriers in cosmetology. In *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics* William Andrew Publishing, p. 363- 393, 2016.

GONÇALVES, G. M. S., & CAMPOS, P. M. B. G. M. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.45, n.1, p.1-10, 2009.

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

GUNSTONE, F.D., *Vegetable Oils in Food Technology Composition, Properties and Uses*, Willy-Blackwell, CRC Press, p.291-343, 2011.

GONZÁLEZ S, FERNÁNDEZ-LORENTE M, GILABERTE-CALZADA Y. The latest on skin photoprotection. *Clin Dermatol.*; v.26: p.614-26, 2008.

HAN, S. B.; KWON, S. S.; JEONG, Y. M.; YU, E. R.; PARK, S. N., Physical characterization and in vitro skin permeation of solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of quercetina. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 36, p. 588-597, 2014.

HAO, J., GUO, B., YU, S., ZHANG, W., ZHANG, D., WANG, J., & WANG, Y. Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *LWT-Food Science and Technology*, v.85, p.37-44, 2017.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, New York, v. 16, p. 845-850, 1994.

HATAHET, T., MORILLE, M., HOMMOSS, A., DEVOISSELLE, J.M., MÜLLER, R.H., BÉGU, S., Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* V.108, p.41–53, 2016.

HEERFORDT, I. M., TORSNES, L. R., PHILIPSEN, P. A., & WULF, H. C., Sunscreen use optimized by two consecutive applications. *PloS one*, v. 13, n. 3, p. e0193916, 2018.

HEWITT, J., & DAHMS, G. H., Rheology-its effect on physical SPFs. *Soap Perfumery and Cosmetics*, v.69, v.3, p.23, 1996.

HILLEBRAND, G.G, LEVINE, M.J. AND MIYAMOTO, K. The age-dependent changes in skin condition in African Americans, Caucasians, East Asians, Indian Asians and Latinos. *IFSCC Mag.* v.4, p.259-266, 2001.

HUANG, J; WANG, Q; LI, T; XIA, N.; XIA, Q; Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies; *Journal of Food Engineering*, v.215, p.1-12, 2017.

HUBER, P. Sensory measurement: evaluation and testing of cosmetic products. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*, p.617-633, 2017.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. 2019. Brasília. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acesso 12 de maio. 2019.

INFANTE, V. H. P., CALIXTO, L. S., & CAMPOS, P. M. B. G. M., Comportamento de homens e mulheres quanto ao consumo de cosméticos e a importância na indicação de produtos e adesão ao tratamento. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, v.8, n.2, p.134-141, 2016.

International Standard ISO 24444, In Vivo Determination of the Sun Protection Factor (SPF), 2010.

JOSE, J.; NETTO, G. Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics. *Journal of cosmetic dermatology*, v. 18, n. 1, p. 315-321, 2019.

JOSHAN, Deepinderjeet Singh; SINGH, Sachin Kumar. Investigational study of Juglans regia extract and quercetin against photoaging. *Biomedicine & Aging Pathology*, v.3, n.4, p.193-200, 2013.

JUNG, M.K., HUR, D.A., SONG, S.B., PARK, Y., KIM, T.S., BANG, S.I., KIM, S., SONG, H.K., PARK, H., CHO, D.H., Tannic acid and quercetin display a therapeutic effect in atopic dermatitis via suppression of angiogenesis and TARC expression in NC/Nga mice. *J. Invest. Dermatol.* V.130, p.1459–1463, 2010.

JUNQUEIRA, L. C., & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10ª. Ed. Guanabara Koogan SA., Rio.,2013.

JUNKER, J. P., PHILIP, J., KIWANUKA, E., HACKL, F., CATERSON, E. J., & ERIKSSON, E. Assessing quality of healing in skin: review of available methods and devices. *Wound Repair and Regeneration*, v.22, p.2-10, 2014.

KAMEL, R., & MOSTAFA, D. M., Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.153, p.59-66, 2015.

KANTER, M., AKTAS, C., & ERBOGA, M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food and chemical toxicology*, v.50, n.3-4, p.719-725, 2012.

KHATYR, F., IMBERDIS, C., VESCOVO, P., VARCHON, D., & LAGARDE, J. M. Model of the viscoelastic behaviour of skin in vivo and study of anisotropy. *Skin research and technology*, v.10, n.2, p.96-103, (2004).

KHURY, E.; BORGES, E. Protetores solares. *Rev. Bras. Med.*, p. 4-18, 2013.

KORN, V.; SURBER, C.; IMANIDIS, G.; Skin surface topography and texture analysis of sun-exposed body sites in view of sunscreen application. *Skin pharmacology and physiology*, v. 29, n.6, p. 291-299, 2016.

LEE C.H.; MOTURI, V.; LEE, Y.; Thixotropic property in pharmaceutical formulations, *Journal of Controlled Release*, v.136 p.88–98, 2009.

LEMOIS, C. N., PEREIRA, F., DALMOLIN, L. F., CUBAYACHI, C., RAMOS, D. N., & LOPEZ, R. F. Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization. In *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs* William Andrew Publishing., p. 187-248, 2018.

LÉVÊQUE, J.L.; XHAUFLAIRE, E.; PIERARD, G., Skin capacitance imaging, a new technique for investigating the skin surface. *European Journal of Dermatology*, v. 16, n. 5, p.500-6, 2006.

LIN, C.F., LEU, Y.L., AL-SUWAYEH, S.A., KU, M.C., HWANG, T.L., FANG, J.Y., Antiinflammatory activity and percutaneous absorption of quercetin and its polymethoxylated compound and glycosides: the relationships to chemical structures. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.47, p.857–864, 2012.

LOHAN, S. B., MÜLLER, R., ALBRECHT, S., MINK, K., TSCHERCH, K., ISMAEEL, F., MEINKE, M. C., Free radicals induced by sunlight in different spectral regions–in vivo versus ex vivo study. *Experimental dermatology*, v.25, n.5, p.380-385, 2016.

LOO, C. H., BASRI, M., ISMAIL, R., LAU, H. L. N., TEJO, B. A., KANTHIMATHI, M. S., CHOO, Y. M., Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *Int J Nanomed.*, v.8, p.13, 2013.

LUBRIZOL, Permulen TR-2., Technical Data Sheet. Lubrizol Advanced Materials, Inc. USA, 2012.

LUKIC, M., JAKSIC, I., KRSTONOSIC, V., CEKIC, N., & SAVIC, S., A combined approach in characterization of an effective W/O hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and in vivo skin performance. *Int J Cosmet Sci.* v.34, n.2, p.140-149, 2012.

MACHADO, M.; HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. *Int. J. Cosm. Sci.*, v.32, p.397-409, 2010.

MAIANI, S.; HODGSON, H. L.; KROL, E. S. “The UVA and aqueous stability of flavonoids is dependent on B-ring substitution”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.6966-6976, 2012.

MARCATO, P. D., Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, p. 01-37, 2009.

MARCATO, P. D., CAVERZAN, J., ROSSI-BERGMANN, B., PINTO, E. F., MACHADO, D., SILVA, R. A.; JUSTO, G. Z.; FERREIRA, C. V.; DURÁN, N., Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 11(3), 1880-1886. 2011.

MARTIN, A., Rheology, in: *Physical Pharmacy*, Martin, A.E., Ed., Fourth Ed. Lea and Febiger: Philadelphia. p.453-476, 1993.

MARTINE, A.P., MERCURIO, D.G., MAIA CAMPOS, P.M.B.G., Assessment of skin pigmentation by confocal microscopy: Influence of solar exposure and protection habits on cutaneous hyperchromias. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v.16, p.364-369, 2017.

MARTO, J., GOUVEIA, L. F., GONÇALVES, L., CHIARI-ANDRÉO, B. G., ISAAC, V., PINTO, P., Ribeiro, H. M., Design of novel starch-based Pickering emulsions as platforms for skin photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.162, p.56-64, 2016.

MENON, G. K., KLIGMAN, A. M. Barrier functions of human skin: a holistic view. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 22, n. 4, p. 178–189, 2009.

MERCURIO, D. G.; MAIA-CAMPOS, P. M. B. G.; A importância da cosmetologia na qualidade de vida. *Caderno de Resumos*, 2009.

MERCURIO, D. G., & MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Reflectance confocal microscopy as a support for the clinical evaluation of the changes caused by aging skin. *Surg Cosmet Dermatol*, 7(3), 236-40, 2015.

MOMIC T., J. SAVIC, U. CERNIGOJ, P. TREBSE & V. VASIC, Collection of Czechoslovak Chemical Communications. V.72, n.11, p.1447-1460, 2007.

MONTANARI JUNIOR, I.; Aspectos do cultivo comercial de calêndula. *Revista Agroecológica*, v.1, n.2, p.24-25, 2000

MOREL, I., LESCOAT, G., COGREL, P., SERGENT, O., PASDELOUP, N., BRISSOT, P., CILLARD, P., CILLARD, J., Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* v.45, p.13–19, 1993.

MÜLLER, R. H., SCHWARZ, C., MEHNERT, W., & LUCKS, J. S., Production of solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. In *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, v.20, p. 480-1, 1993.

MÜLLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S.; Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery — a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v.50 n.1, p.161–177, 2000.

MÜLLER, R. H., RADTKE, M., & WISSING, S. A., Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International journal of pharmaceutics*, v.242, n.1-2, p.121-128, 2002.

MÜLLER RH, SHEGOKAR R, KECK CM., 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol*; v.8, p.207–27, 2011.

NAFISI, S., AND H. I. MAIBACH., Nanotechnology in cosmetics. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. V. 337. Elsevier, 2017.

NASERI N, VALIZADEH H, ZAKERI-MILANI P., Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Adv Pharm Bull*; v.5, v.3, p.305–13, 2015.

NESSEEM, D., Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Cosmet. Sci.* v.33, n.1, p.7079, 2011.

NGAN, C.L., BASRI, M., TRIPATHY, M., ABEDI, K.R., ABDUL-MALEK, E., Skin intervention of fullerene-integrated nanoemulsion in structural and collagen regeneration against skin aging. *Eur. J. Pharm. Sci.* V.70, p.22–28, 2015.

NIKKOL, Nikkomulse 41. Informe Técnico. Nikkol Chemicals Co. Ltd, Japan. 19 Nov. 2005

OKUNO, E. VILELA, M. A. C.; Radiação ultravioleta: características e efeitos. Editora Livraria da Física, 2005.

OSTERWALDER, U., SOHN, M., & HERZOG, B., Global state of sunscreens. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, v.30, n.2-3, p.62-80, 2014.

PALECO, R., VUČEN, S. R., CREAN, A. M., MOORE, A., & SCALIA, S, Enhancement of the in vitro penetration of quercetin through pig skin by combined microneedles and lipid microparticles. *International journal of pharmaceutics*, v.472, n.1-2, p.206-213, 2014.

PARDEIKE J, HOMMOSS A, MÜLLER RH., Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*; v.366, p.170–84, 2009.

PIÉRARD, G. E.; KHAZAKA, D.; KHAZAKA, G., Sunscreen remanence on the skin: a noninvasive real time in vivo spectral analysis assessing the quenching of specular ultraviolet A light reflectance. *Journal of cosmetic dermatology*, v. 15, n. 1, p. 3-9, 2016.

PISOSCHI, A.M.; POP, A.; The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *Eur. J. Med. Chem.* v.97, p.55–74, 2015.

Pivetta, T. P., Simões, S., Araújo, M. M., Carvalho, T., Arruda, C., & Marcato, P. D. Development of nanoparticles from natural lipids for topical delivery of thymol: Investigation of its anti-inflammatory properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 164, 281-290, 2018.

PIVETTA, T. P., SILVA, L. B., KAWAKAMI, C. M., ARAUJO, M. M., DEL LAMA, M. P. F., NAAL, R. M. Z., MARCATO, P. D., Topical formulation of quercetin encapsulated in natural lipid nanocarriers: Evaluation of biological properties and phototoxic effect. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, p.101148, 2019.

POOL, H.; QUINTANAR, D.; FIGUEROA, J. D., Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, v. 2012.

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

PUGLIA C, BLASI P, RIZZA L, SCHOUBBEN A, BONINA F, ROSSI C, Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation. *Int J Pharm*; v.357, p.295–304, 2008.

RAHMAN, N. F. A.; BASRI, M.; RAHMAN, M. B. A.; RAHMAN, R. N. Z. R.; SALLEH, A. B., High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. *Bioresource Technology*, v.102, p. 2168–2176, 2010.

RINNERTHALER, M., BISCHOF, J., STREUBEL, M., TROST, A., RICHTER, K., Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, v.5, n.2, p.545-589, 2015.

ROBERTS, M.S.; MOHAMMED, Y.; PASTORE, M.N.; NAMJOSHI, S.; YOUSEF, S.; ALINAGHI, A.; HARIDASS, I.N.; ABD, E.; LEITE-SILVA, V.R.; BENSON, H.A.E.; GRICE, J.E., Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of controlled release*, v.247, p.86-105, 2017.

RODRIGUES, P. O., Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Acta Farm. Bonaerense*, v.23, n.1, p27-31, 2004.

ROMANHOLE, R. C., ATAIDE, J. A., CEFALI, L. C., MORIEL, P., & MAZZOLA, P. G. Photostability study of commercial sunscreens submitted to artificial UV irradiation and/or fluorescent radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.162, p.45-49, 2016.

RUVOLO JR, E. C.; STAMATAS, G. N.; KOLLIAS, N. Skin viscoelasticity displays site-and age-dependent angular anisotropy. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 20, n. 6, p. 313-321, 2007.

SAEWAN, N., & JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v.3, n.9, p.129-141, 2013.

SAKAMOTO, K., LOCHHEAD, R., MAIBACH, H., & YAMASHITA, Y., *Cosmetic science and technology: theoretical principles and applications*. Elsevier, 2017.

SAMAKRADHAMRONGTHAI, R., THAKEOW, P., KOPERMSUB, P., & UTAMA-ANG, N. Application of multi-core encapsulated *Michelia alba* DC flavor powder in Thai steamed dessert (Nam Dok Mai). *Chiang Mai Journal of Science*, v.44, n.2, p.557-572, 2017.

SCALIA, S.; MEZZENA, M.; Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical-stability, *J. Pharm. Biomed. Anal.* V.49, p.90–94, 2009.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane–octyl methoxycinnamate. *Photochemistry and photobiology*, v.86, n.2, p.273-278, 2010.

SCHALKA, S.; REIS, V.M.S., Fator de proteção solar: significado e controvérsias. *An. Bras. Dermatol.*, v.86, n.3, p.507-15, 2011.

SCHALKA, S., STEINER, D., RAVELLI, F. N., STEINER, T., TERENA, A. C., MARÇON, C. R., DUARTE, I., Brazilian consensus on photoprotection. *Anais brasileiros de dermatologia*, v.89, n.6, p.1-74, 2014.

SENGUPTA, S., BANERJEE, S., SINHA, B., & MUKHERJEE, B., Improved skin penetration using in situ nanoparticulate diclofenac diethylamine in hydrogel systems: in vitro and in vivo studies. *AAPS PharmSciTech*, v.17, n.2, p.307-317, 2016.

SIM, G.S., LEE, B.C., CHO, H.S., LEE, J.W., KIM, J.H., LEE, D.H., KIM, J.H., PYO, H.B., MOON, D.C., OH, K.W., YUN, Y.P., HONG, J.T., Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. *Arch. Pharm. Res.* V.30, p.290–298, 2007.

SHAATH, N. A. Ultraviolet Filters. *Photochem Photobiol Sci*, v.9, p.464-469, 2010.

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

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N.; Potential applications of antioxidants - A review, *J. Pharm. Res.* V.7, p.828–835, 2013.

SBD, Sociedade Brasileira de Dermatologia. Disponível em: <https://www.sbd.org.br>, Acesso em 29 de julho de 2019.

SOUTO, E. B., WISSING, S. A., BARBOSA, C. M., & MÜLLER, R. H. (2004). Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 58(1), 83-90

SOUTO, E.B., MÜLLER, R.H., Lipid nanoparticles (solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers) for cosmetic, dermal, and transdermal applications. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. Informa Healthcare, p. 213-233, 2007.

SOUZA, Carla. Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores com ação em toda a região do espectro solar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

SOUZA, C., & CAMPOS, P. M. M. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants Spirulina and dimethylmethoxy chromanol on sun-induced skin damage. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.104, p.52-64., 2017.

STIEFEL, C.; SCHWACK, W, Photoprotection in changing times – UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *Int. J. Cosm. Sci.*, v.37, p.2-30, 2015.

TAI, A., BIANCHINI, R., & JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *International journal of cosmetic science*, v.36, n.4, p.291-304, 2014.

TICHOTA, D.M., SILVA, A.C., SOUSA LOBO, J.M., AMARAL, M.H, Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. *Int. J. Nanomedicine* v.9, p.3855–3864, 2014

UCHECHI, O., OGBONNA, J.D.N., ATTAMA, A.A., Nanoparticles for dermal and transdermal drug delivery. *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv. InTech* p.193–235, 2014.

UNER, M.; RADTKE, M.; WISSING, S. A., Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers, v.10, p.43-56, 2007.

VICENTINI, F.T.M.C., SIMI, T.R.M., DEL CIAMPO, J.O., WOLGA, N.O., PITOL, D.L., IYOMASA, M.M., BENTLEY, M.V.L.B., FONSECA, M.J.V., Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v.69, p.948–957. 2008.

VICENTINI, F. T. M. C. Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

VICENTINI, F.T.M.C., FONSECA, Y.M., PITOL, D.L., IYOMASA, M.M., BENTLEY, M.V.L.B., FONSECA, M.J. V, Evaluation of protective effect of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin against UVB-induced damage in hairless mice skin. *J. Pharm. Pharm. Sci.* v.13, p.274–285, 2010.

VICENTINI, F.T.M.C., HE, T., SHAO, Y., FONSECA, M.J.V., VERRI, W.A., FISHER, G.J., XU, Y., Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- $\kappa$ B pathway. *J. Dermatol. Sci.* V.61, p.162–168, 2011.

VITORINO, C., ALMEIDA, J., GONÇALVES, L. M., ALMEIDA, A. J., SOUSA, J. J., & PAIS, A. A. C. C., Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: from experimental design to the molecular detail. *Journal of controlled release*, v.167, n.3, p.301-314, 2013.

WANG, S.Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. *Dermatol. Ther.*, v.23, n.1, p.31-47, 2010.

WILSON, B. D., MOON, S., & ARMSTRONG, F., Comprehensive review of ultraviolet radiation and the current status on sunscreens. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, v.5, n.9, p.18, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE), Disponível em: <https://www.who.int/uv/en/>. Acesso em agosto de 2019.

WU, C. H., SHIEH, T. M., WANG, K. L., HUANG, T. C., & HSIA, S. M. Quercetin, a main flavonoid in onion, inhibits the PGF<sub>2</sub>a-induced uterine contraction in vitro and in vitro and in vivo. *Journal of Functional Foods*, v.19, p.495-504, 2015.

XHAUFLAIRE-UHODA E, PIÉRARD GE., Skin capacitance imaging. In: Barel AO, Paye M, Maibach HI, editors. *Handbook of cosmetic science and technology*. New York: Informa; p.141–9, 2009.

ZHENG, M., FALKEBORG, M., ZHENG, Y., YANG, T., & XU, X., Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.430, p.76-84, 2013.

ZHU, X., ZENG, X., ZHANG, X., CAO, W., WANG, Y., CHEN, H., HE, S., The effects of quercetin-loaded PLGA-TPGS nanoparticles on ultraviolet B-induced skin damages in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 3, p. 623-632, 2016.

ZIELINSKA, A.; NOWAK, I., Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel carriers for cosmetic ingredients. In: *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*. William Andrew Publishing, p. 231-255, 2016

ZUANAZZI, J., & MONTANHA, J. A. Flavonoides. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. SIMÕES, CMO et al. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, p.45-74, 2003.

## ANEXOS

## Anexo A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética



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

Of. CEP/FCFRP nº. 015/2018  
kms

Ribeirão Preto, 30 de agosto de 2018.

À Pós-graduanda  
Elisa da Cruz Felippim  
Orientadora: Profª. Drª. Patrícia M. B. G. Maia Campos  
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “DESENVOLVIMENTO E EFICÁCIA CLÍNICA DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS COM ANTIOXIDANTES NATURAIS NANOENCAPSULADOS”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 455 - CAAE nº 79025417.4.0000.5403, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 176ª reunião ordinária, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 2.598.709.

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

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

Atenciosamente,

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



USP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações fotoprotetoras com antioxidantes naturais nanoencapsulados

**Pesquisador:** ELISA DA CRUZ FELIPPIM

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 79025417.4.0000.5403

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.598.709

##### Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado é relevante para área do conhecimento na qual está inserido. De acordo os pesquisadores, o desenvolvimento de fotoprotetores tem como base o conceito de proteção contra os danos na pele decorrentes da radiação ultravioleta, que é comprovado como um dos principais fatores que podem desencadear alterações no padrão de pigmentação, queimaduras solares e estresse oxidativo, que estão os responsáveis pelo fotoenvelhecimento e lesões pré-malignas e malignas. A literatura abordada na fundamentação do estudo tem comprovado os benefícios do uso de antioxidantes para a proteção da pele contra os danos da radiação UV (inclusive com a descrição de estudos prévios da quercetina em humanos). Porém, a adição de antioxidantes presentes em extratos de origem natural, como a quercetina (alvo principal do estudo) ainda é um desafio no desenvolvimento de produtos cosméticos, tanto em termos tecnológicos como biológicos. Portanto, a proposta de pesquisa apresentada propõe o desenvolvimento de novas formulações cosméticas para a proteção da pele utilizando-se da nanotecnologia e substâncias de origem vegetal.

Os proponentes apresentam uma boa justificativa para a condução do estudo, com um forte embasamento científico (ressaltando a importância do desenvolvimento/aprimoramento de agentes protetores contra os danos decorrentes da contínua exposição da pele à radiação UV) e boas perspectivas de aplicabilidade clínica de curto-médio prazo de produtos utilizando a nanotecnologia. Os proponentes realizaram algumas modificações e o desenho experimental

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



Continuação do Parecer: 2.598.709

proposto parece adequado, e os resultados obtidos poderão ser bem relevantes para área da pesquisa.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste estudo será desenvolver e avaliar a eficácia clínica de formulações fotoprotetoras contendo antioxidantes de origem vegetal nanoencapsulados na redução das alterações cutâneas decorrentes do fotoenvelhecimento.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos aos quais os voluntários desta pesquisa estarão submetidos serão àqueles relacionados à aplicação tópica das formulações (reações tóxicas e/ou alérgicas resultantes da sensibilidade cutânea dos indivíduos). Os benefícios são relacionados à fotoproteção adicional da pele (eliminação dos radicais livres).

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os pesquisadores realizaram as correções sugeridas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi apresentado um novo TCLE corrigido, com as informações que estavam faltando.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 176ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, Intercorrência ou Interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, Item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE. Cabe ao pesquisador responsável manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

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



Continuação do Parecer: 2.596.709

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1008489.pdf	15/02/2018 20:06:35		Aceito
Outros	Carta_Comite_etica_ElisaFelppim_versao3.pdf	15/02/2018 20:04:29	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao3.pdf	15/02/2018 20:01:10	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_ElisaFelppim_versao2.pdf	11/12/2017 22:06:12	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao2.pdf	11/12/2017 21:59:30	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_elisa.pdf	09/10/2017 12:23:20	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Outros	declaracao_medico_Elisa_Felppim.pdf	03/10/2017 15:31:28	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Outros	carta_de_envio_Elisa_Felppim.pdf	03/10/2017 15:31:07	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Outros	declaracao_ciencia_Elisa.pdf	03/10/2017 15:30:28	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_ELISA_FELIPPIM_FINAL.pdf	03/10/2017 15:28:42	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Elisa_Felppim.pdf	03/10/2017 15:21:48	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Orçamento	orcamento_Elisa_Felppim.pdf	03/10/2017 15:21:24	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_pesquisador_Elisa_Felppim.pdf	03/10/2017 15:20:27	ELISA DA CRUZ FELIPPIM	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

## Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1

**Pesquisadora responsável:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia M. B. G. Maia Campos (CRF: 11922)

**Médico responsável:** Dr. João Carlos Lopes Simão (CRM: 94214)

**Pesquisador principal:** Elisa da Cruz Felippim

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Elisa da Cruz Felippim, sou aluna de Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e gostaria de convidar para participar da minha pesquisa como voluntária. Estou desenvolvendo a pesquisa "Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo antioxidantes naturais", na qual avaliarei a pele dos participantes por métodos não invasivos, ou seja, os mesmos não causarão desconforto e nenhuma dor ou lesão na pele.

O objetivo desse trabalho é desenvolver e avaliar a eficácia clínica de formulações cosméticas contendo nanoemulsões com queratina, antioxidante de origem natural, e filtros na pele fotoenvelhecida (envelhecimento da pele pela exposição solar excessiva). Você poderá participar de um desses três grupos: o grupo que receberá o produto com filtro solar e queratina em tamanho reduzido, grupo que receberá uma formulação com filtro solar e nanopartículas sem queratina, ou o grupo que receberá o produto com filtro solar sem queratina. Dentre os 60 (sessenta) participantes envolvidos na pesquisa, você poderá participar da avaliação sensorial das formulações desenvolvidas, que contará com 10 participantes (dez) que receberão o produto para ser aplicado na região anterior do antebraço. As formulações serão avaliadas: se deixa resíduo branco na pele, brilho, firmeza, pegajosidade, consistência, oleosidade, espalhabilidade, sensação ao toque e intensão de compra durante a aplicação.

Você receberá uma formulação, um fotoprotetor para ser aplicado em quantidade suficiente na região do rosto e que deverá usar todos os dias. A aplicação do produto vai começar após a primeira visita ao Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, sala 039A-A no bloco A, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, no endereço: Avenida do café s/n, bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto/SP. As medidas serão realizadas antes da aplicação das formulações e após 30 (trinta) e 60 (sessenta) dias, quando ocorrerá a última visita, totalizando 4 visitas no total. Serão analisados nesse estudo a "quantidade de água na pele", a "perda de água pela pele", o "relevo da pele", "avaliação da espessura da pele", "elasticidade da pele", "coloração da pele", "manchas cutâneas", "porcentagem de poros, linhas e rugas", utilizando-se equipamentos que avaliam a pele de maneira não invasiva, ou seja, sem causar corte, dor ou qualquer tipo de desconforto, pois possuem sensores especiais, que são somente encostados na pele durante a leitura. O tempo de cada visita é de aproximadamente 1 (uma) hora e meia.

Os principais benefícios do uso destas formulações são a melhora na hidratação, evitar manchas e lesões causadas pelo sol, redução do número e tamanho de poros na pele do rosto da participante do estudo.

Este estudo será realizado sob a supervisão do médico dermatologista, Dr. João Carlos Lopes Simão (CRM: 94214), uma vez que produtos de uso tópico poderiam causar eventuais reações adversas na pele das participantes do estudo, como por exemplo, irritação, coceira e vermelhidão. O contato com o médico será realizado pelos pesquisadores por meio do telefone e endereço abaixo informados.

Em caso de qualquer reação ao uso do produto, você deve interromper o uso do produto, será excluída da pesquisa e tomaremos todas as providências necessárias para a recuperação do estado normal da sua pele. Qualquer reação ao produto você deverá informar para a pesquisadora responsável nos telefones informados neste documento para encaminhamento aos cuidados do médico responsável por esta pesquisa, e seremos responsáveis, se houver despesas. Em caso de gravidez durante a participação do estudo, você deverá interromper a utilização da formulação, encerrar sua participação e avisar os pesquisadores imediatamente.

Em caso de dúvidas éticas, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto– USP, no endereço Avenida do Café s/n Campus Universitário, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto–SP, ou pelo telefone (16) 3315-4213, de segunda a sexta-feira das 8h00 às 12h00. O CEP é um órgão de caráter consultivo, normativo, deliberativo e educativo, com intuito de defender os interesses dos participantes da pesquisa e contribuir para desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões ético-científicos.

Qualquer dúvida sobre o estudo ou caso não queira mais fazer parte do mesmo, poderá entrar em contato comigo por meio dos telefones (16) 3315-4197 e (16) 99143-5455 ou no endereço Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, Bloco A, sala 39A-A. Poderá entrar também em contato com o médico João Carlos Lopes Simão nos telefones (16) 3236-3734 e

(16) 98124-0441 ou no endereço Rua São José, 3200 – Alto da Boa Vista, Ribeirão Preto – SP.

Com o término das avaliações clínicas, você receberá uma ficha para avaliação da eficácia do produto utilizado, na qual dará notas para os sobre hidratação da pele e presença manchas e pequenas rugas no rosto. Ao participar do estudo, suas informações serão confidenciais, ou seja, seus dados não podem ser divulgados, sendo usados somente dentro da pesquisa e somente serão utilizadas neste trabalho, e se houver interesse de sua parte.

EU:

R. G. n<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_, tenho ciência do exposto acima e concordo em participar da pesquisa.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura da participante da pesquisa

Elisa da Cruz Felippim  
PESQUISADORA PRINCIPAL

TCLE – versão 3

