

**JOANA MARGARIDA ERSE DE FARIA GODINHO
FERREIRA**

**METODOLOGIAS DINÂMICAS PARA AVALIAÇÃO
DA HIDRATAÇÃO CUTÂNEA**

Orientadora: Professora Doutora Catarina Rosado

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Departamento de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa
2014**

**JOANA MARGARIDA ERSE DE FARIA GODINHO
FERREIRA**

**METODOLOGIAS DINÂMICAS PARA AVALIAÇÃO
DA HIDRATAÇÃO CUTÂNEA**

Dissertação apresentada para a obtenção de
Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas
no curso de Mestrado Integrado de Ciências
Farmacêuticas conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientadora: Professora Doutora Catarina
Rosado

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Departamento de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2014

Agradecimentos

Aos pais Jorge e Rosário um agradecimento especial pela oportunidade que me proporcionaram de investir na minha formação e pelo apoio ao longo de todo o percurso.

Ao irmão Jorge por estar sempre a meu lado, físico ou em pensamento, e por todo o apoio e motivação.

À grande amiga Luísa pela motivação e grande amizade.

Ao namorado Nuno pela transmissão de força e confiança em todos os momentos.

À minha orientadora, Professora Doutora Catarina Rosado, pelo seu apoio, disponibilidade e competência nas revisões e sugestões que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A todos os que directa ou indirectamente ajudaram ao longo deste meu percurso académico.

Obrigada.

Resumo

A pele é o maior órgão e o mais importante do nosso organismo, uma vez que nos protege contra, não só de agressões externas, como também da perda excessiva de água e electrólitos. Esta função de barreira é exercida pela sua camada mais externa, a epiderme, existindo diversos equipamentos de bioengenharia cutânea que permitem a sua medição.

A primeira parte deste trabalho baseou-se na tentativa de optimização do protocolo do POST, pela redução do tempo total da experiência através da recolha de um maior número de pontos na fase inicial do estudo.

A segunda parte deste trabalho baseou-se na confirmação de que o tempo de recolha de dados se demonstrou suficientemente sensível na avaliação da eficácia de dois tipos diferentes de cremes hidratantes, humectante e oclusivo.

Palavras-chave: PTEA, POST, Estrato Córneo, Permeação cutânea, Creme hidratante.

Abstract

Skin is the greater and foremost important organ in the human body, since it protects us from, not only, external agressions but excessive water loss as well. The barrier function depends mostly of the epidermis, and there are several bioengineering equipments that enable its assessment.

The first part of this research was based on the optimization of the POST protocol, by reducing the total time of experience by taking a greater amount of data in the initial state of the study.

The second part of the study was based on the confirmation that reducing the time of the initial part of the study was possible during the evaluation of two moisturizing creams, one of them humectant and the other occlusive.

Keywords: TEWL, POST, Stratum Corneum, Cutaneous permeation, Moisturizer cream.

Abreviaturas e Siglas

EC: Estrato Córneo

PTEA: Perda Transepidérmica de Água

POST: Plastic Occlusion Stress Test

$t_{1/2 \text{ evap}}$: Tempo de semi-vida de evaporação

K_{1-2} : Microconstante

K_{2-1} : Microconstante

B: Efeito baseline

I: Parâmetro multiplicativo comum às exponenciais

K_{evap} : Constante de evaporação na avaliação da função barreira

K_{hidr} : Constante de hidratação relacionada com a distribuição de água pelos 2 compartimentos.

DMA: Dinâmica de massa de água

AUC: Área sobre a curva

Índice

Ítem	Página
Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Abreviaturas e Siglas	6
Introdução	9
1. Métodos de avaliação da PTEA	12
1.1. Evaporimeter Servomed	12
1.2. Tewameter	13
1.3. Aquaflux e VapoMeter	14
1.3.1. AquaFlux	14
1.3.2. VapoMeter	15
2. Metodologias Dinâmicas	17
2.1. POST	17
2.2. MAT	18
3. Metodologia POST – Optimização do protocolo	19
3.1. Introdução	20
3.2. Materiais e Métodos	22
3.3. Resultados e Conclusões	24
4. Metodologia POST aplicada à avaliação da eficácia de dois produtos cosméticos	26
4.1. Introdução	27

4.2. Materiais e Métodos	29
4.3. Resultados e Conclusões	31
Conclusões Gerais	34
Bibliografia	36

Introdução

A pele, um dos órgãos mais importantes e maiores do nosso organismo protege, não só o indivíduo contra diversos agentes ambientais agressivos, mas também contra a excessiva perda de água, tendo, deste modo, a principal função de barreira. ⁽¹⁻³⁾

Este órgão é constituído por várias camadas, sendo a mais superficial, a Epiderme, onde por sua vez, a camada mais externa se denomina Estrato Córneo (EC). Esta última camada, comparativamente com o conteúdo hídrico das camadas mais internas da pele, apresenta menor quantidade de água.

A Epiderme apresenta diferente espessura consoante a localização no nosso corpo. No entanto, apresenta 5 camadas, do interior para a superfície: Estrato Germinativo ou Basal, Estrato Espinhoso, Estrato Granuloso, Estrato Lúcido e Estrato Córneo. O Estrato Germinativo ou Basal é composto por queratinócitos em paliçada e células cúbicas e é onde se encontram os melanócitos e as células de Merkel, sendo responsável pela proliferação e diferenciação. O Estrato Espinhoso apresenta células de Malpighi, proteínas ricas em cisteína e células de Langerhans. No Estrato Granuloso é onde se encontram os grânulos de querato-hialina; enquanto que no Estrato Lúcido, encontrando-se principalmente nas palmas das mãos e pés, apresentam queratina. Por fim, o Estrato Córneo, o mais superficial, é onde se encontram os corneócitos e é a camada responsável pela renovação e descamação e a função de barreira da pele, pela presença das cerca de 20 camadas de corneócitos que constituem o EC, uma vez que mantêm os tecidos vivos adequadamente hidratados, permitindo a sobrevivência do indivíduo mesmo em ambientes muito secos. Assim, no turn-over celular as células basais replicam-se em cada 200 a 400 horas e as células resultantes levam 14 dias a atingir o EC e outros 14 a descamar. ^(1, 2)

A baixa quantidade de água à superfície da pele, no EC, é alterada pelas condições de temperatura e humidade ambientais e pelas condições de integridade de barreira cutânea, sendo criado um fluxo passivo de vapor de água que é alterado consoante estas condições- a perda transepidérmica de água (PTEA). A quantidade de água à superfície da pele influencia a humidade retida no EC, e é regulada pelos componentes do Factor Humectante Natural, que possuem uma natureza higroscópica.. ⁽¹⁻³⁾

A quantidade de vapor de água total que se encontra à superfície da pele provém da difusão passiva através da pele, bem como da água da secreção de suor. Originalmente, o

termo PTEA referia-se à quantidade de vapor de água à superfície do EC por difusão passiva; no entanto, nos dias de hoje, refere-se à apenas à quantidade de água que é perdida pela pele. ⁽¹⁻⁷⁾

A Lei da difusão de Fick é utilizada na abordagem da PTEA, pois sob um ponto de vista fisiológico, $dm/dt = -D.A.(d\sigma/dl)$, onde dm/dt representa a quantidade de água transportada por unidade de tempo, A a área de superfície de contacto e $d\sigma/dl$ a alteração da densidade por unidade de comprimento ambas proporcionais à corrente de difusão e por último, D sendo a constante de difusão do vapor de água no ar atmosférico.

1. Métodos de avaliação da PTEA

Como referido anteriormente, a PTEA consiste na perda de água através do EC por difusão passiva. ^(1, 4, 5)

A partir do final do século XX foram desenvolvidos equipamentos e metodologias de bioengenharia cutânea por avaliação da sua difusão passiva; tendo-se destacado três abordagens no que diz respeito à câmara: a não-ventilada, a ventilada e a aberta.

A câmara não-Ventilada, uma vez que tende a causar oclusão da pele, não permite a medição contínua dos valores de PTEA. A câmara ventilada, por outro lado, permite a medição contínua dos dados. No entanto, ambas interferem com o microclima à superfície da pele no local de medição, influenciando a quantidade da perda hídrica cutânea. Por fim, a câmara aberta, permite a medição contínua dos dados, à temperatura ambiente, com mínima alteração da quantidade de água à superfície da pele, não alterando significativamente os valores de medição. Este tipo de câmara, a aberta, permite um uso mais apropriado, e deste modo mais vantajoso, na quantificação da PTEA ⁽⁴⁻¹⁰⁾

No mercado existem diversos instrumentos não invasivos que têm sido estudados e desenvolvidos na medição da PTEA.

1.1. Evaporimeter Servomed

O aparelho mais utilizado até finais do século XX, era o evaporímetro ServoMed (SeroMed AB, Estocolmo, Suécia) baseado no método de evaporação de câmara aberta. ^(4, 5)

O princípio fundamental de medição consiste no facto do gradiente de pressão do vapor de água imediatamente acima da superfície da pele ser proporcional à diferença entre as pressões medidas em duas diferentes alturas perpendiculares acima da pele na zona de difusão. ^(5, 7)

Este aparelho consiste numa sonda de medição móvel conectada a uma unidade processadora de sinal. A cápsula de Teflon, como indicado na Figura 1, apresenta uma câmara cilíndrica de medição aberta em ambas as extremidades, incorporada com um par de sensores emparelhados (higroscensores e termosensores) na determinação da humidade

relativa e temperatura em dois níveis distintos acima da superfície da pele, a 3 e 9mm. ^(5, 6, 7, 8)

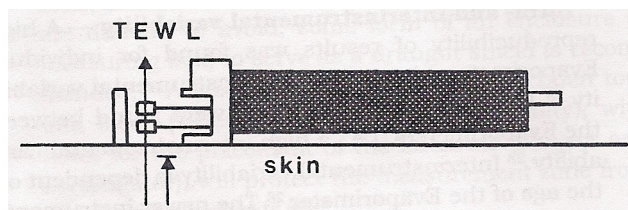


Figura 1: Esquematização da sonda do Evaporimeter (ServoMed, Estocolmo, Suécia)

A medição da PTEA com o Evaporimeter é válida nos limites da camada de difusão à superfície de todo o corpo. No entanto, a profundidade desta camada de difusão depende de certas condições ambientais. Deste modo, quaisquer variáveis ambientais ou instrumentais podem influenciar esta profundidade e, conseqüentemente, os valores de PTEA. Mais ainda, a elevada sensibilidade do aparelho leva a que alterações no microclima acima da pele, quer sejam devidas a variáveis ambientais, instrumentais ou relacionadas com o indivíduo, sejam imediatamente detectadas e assim, consideradas erros nos níveis de medição deste parâmetro. ⁽⁴⁻⁸⁾

1.2. Tewameter

Posteriormente, foi desenvolvido outro instrumento de câmara aberta baseado no mesmo princípio de medição de gradiente de evaporação, o Tewameter (Courage-Khazaka GmbH, Colónia, Alemanha), e baseado no Evaporímetro. ^(4, 5, 6, 8)

Este aparelho consiste numa sonda de medição móvel ligada a uma unidade processadora, também esta móvel, e pode ser ligada a um computador para gestão dos dados. Apresenta uma câmara de medição cilíndrica e aberta ligada à sonda com duas unidades de sensores posicionados a 3 e 8mm da superfície cutânea. É fornecida uma pinça que permite o suporte da sonda numa posição fixa no momento da medição à superfície da pele. ^(5, 8)

Comparando o Evaporimeter com o Tewameter, em condições experimentais standardizadas e controladas, ambos são adequados na avaliação da integridade da pele como função de barreira. Como indicado no estudo de A. O. Barel e P. Clarys ⁽⁵⁾ ambos os

aparelhos proporcionam resultados com precisão, sensibilidade e reprodutibilidade. No entanto, o Tewameter apresenta recolha de dados da PTEA em função do tempo e permite a medição da temperatura da pele, sendo, deste modo, mais fácil e conveniente o seu uso. ^(4, 5, 8)



Figura 2: Tewameter TM300 (Courage-Khazaka, GmbH, Colónia, Alemanha)

1.3. Aquaflux e VapoMeter

Recentemente, já no século XXI, têm sido desenvolvidos diferentes aparelhos que consistem na medição de um volume de ar fechado, com o aumento da humidade relativa no interior da câmara e com evaporação de água, que impede a perturbação da zona de difusão por movimentos do ar do meio ambiente e, deste modo, mantém o microclima controlado à superfície da pele. Assim, mantém-se os valores de humidade, temperatura e fluxo do ar controlado não influenciando grandemente a medição dos valores de PTEA.

1.3.1. AquaFlux

O aparelho AquaFlux (Biox Systems Ltd, London, U.K.) utiliza um condensador electrónico arrefecido no interior da câmara, onde a sonda é constituída por um anexo cilíndrico fechado no topo e aberto na base, em contacto com a pele. O condensador encontra-se no topo da sonda e traduz-se numa placa de metal arrefecida abaixo do ponto de

congelamento da água na tentativa de absorver a mesma sob a forma de vapor e, deste modo, criar um microclima estável e controlado e manter os valores conhecidos de humidade no interior da câmara.



Figura 3: AquaFlux (Biox Systems Ltd, London, U.K.)

1.3.2. VapoMeter

O aparelho VapoMeter (Delfin Technology, Kuopio, Finland), por outro lado, mede o aumento da humidade relativa no interior da cor da c crada. O aparelho apresenta pares de sensores emparelhados, higroscensores e termosensores, no interior de uma sonda portma sondam a presença de cabos e com um microprocessador que funciona com uma bateria, sendo possível a extensão para um computador.

No final de cada medição dos valores da PTEA é aconselhável que a sonda seja retirada da superfície da pele para permitir que o vapor de água acumulado no seu interior seja retirado, o que impede a medição contínua dos dados. Além disso, é importante que neste tipo de câmaras o tempo de medição dos dados da PTEA seja curto, uma vez que um tempo de medição mais longo geraria um efeito de saturação do ar no interior da câmara. ^(9, 10)



Figura 4: VapoMeter (Delfin Technology, Kuopio, Finland)

A inovação deste tipo de aparelhos baseados no princípio de medição de gradiente de evaporação de câmaras fechadas tem vindo a desafiar os métodos de câmara aberta, preferidos até hoje, devido a apresentarem algumas dificuldades. Destas, a mais relevante é o modo como o microclima imediatamente à superfície da pele influencia as medições da PTEA. Parte do problema tem sido por se aperceber que as medições de PTEA são indirectas, uma vez que se mede o fluxo de vapor de água à superfície do EC e não o fluxo de vapor de água que realmente atravessa o EC para a superfície cutânea. Outra limitação substancial reside na vulnerabilidade da perturbação dos movimentos de ar do microclima à superfície da pele durante a medição dos valores de PTEA, que se tenta corrigir com a utilização de caixas protectoras para os voluntários. Na tentativa de correcção destas limitações têm sido desenvolvidas guidelines, o que minimiza os erros e aumenta a consistência dos resultados nos voluntários. No entanto, estas novas tecnologias conseguem contornar algumas destas medições. ^(9, 10)

2. Metodologias Dinâmicas

A maioria das vezes são utilizadas abordagens que recorrem a métodos estáticos, mas estas são condicionadas ao facto de não identificarem a origem da água detectada e apenas produzirem dados instantâneos. Os testes de stress são comumente utilizados em estudos fisiológicos da pele, aumentando a dinâmica comportamental da pele e, deste modo, a resposta da mesma a diversos estímulos. Exemplos desses testes são os Plastic Occlusion Stress Test (POST) e Moisture Accumulation Test (MAT).^(3, 11)

2.1. POST

Alguns testes de stress baseiam-se na oclusão da pele, resultando num aumento hídrico cutâneo por inibição da evaporação da mesma pela epiderme. O POST, é um método que permite quantificar, não só, a hidratação e eficácia do EC, como também a integridade da pele na sua função de barreira, método este baseado numa modelação matemática de dados da PTEA, através de parâmetros cinéticos. O teste consiste em colocar um patch (adesivo oclusivo), como esquematizado na Figura 2, no local estabelecido na superfície da pele e mantendo-o por períodos entre 6 a 24h para permitir total oclusão da pele e, deste modo, aumentar o conteúdo hídrico por saturação do estrato córneo. Uma vez removido o patch oclusivo, o excesso de água que evapora pela superfície da pele pode ser medido com o auxílio de um equipamento que meça a PTEA. De seguida, a análise dos dados é então feita através do auxílio de um modelo matemático bi-compartimental e de um software de ajuste MS Excel Solver.^(3, 11, 13, 14) No entanto, existem outras abordagens matemáticas mais simples, como a transformação dos valores das medições em logaritmos para um decaimento mais linear com o auxílio de uma análise de regressão.⁽⁷⁾



Figura 5: Esquema do patch oclusivo colocado na superfície da pele.

Embora simples de executar, esta metodologia consome muito tempo, uma vez que normalmente envolve a recolha de dados durante, pelo menos, 30 minutos, o que se torna incómodo tanto para os voluntários como para os investigadores, traduzindo-se num estudo dispendioso.⁽³⁾

2.2. MAT

Este teste dinâmico, abordado desde 1990, retrata o comportamento da pele após a breve oclusão da sua superfície, levando ao rápido aumento da hidratação da epiderme,

As medições da capacitância da superfície cutânea são realizadas com o auxílio de uma sonda que é revestida com uma camada impermeável e que é colocada na superfície da pele durante períodos mais prolongados, causando oclusão. Normalmente, as medições são feitas em intervalos regulares, num total de 45 segundos, observando-se um aumento acentuado da capacitância nos primeiros segundos que tende posteriormente a estabilizar, sugerindo uma função exponencial. Assim, este teste trata-se de um indicador do influxo de água para o EC, sendo depois analisados os dados pelo cálculo da área sob a curva dos valores de hidratação obtidos ao longo do tempo. ^(3, 11)

3. Metodologia POST – Optimização do protocolo

3.1. Introdução

A pele é um órgão multifuncional no corpo humano que é constituído por vários estratos, sendo que o mais superficial, o EC, que confere a função de barreira que é tão importante para o nosso organismo, como referido no capítulo anterior.^(1, 2)

O EC contém uma proporção relativamente baixa de água, comparativamente com o conteúdo hídrico das camadas mais profundas da epiderme e, tanto as proteínas como os lípidos que o formam, actuam como uma barreira eficaz contra a perda de água e electrólitos, bem como contra o ingresso de material exógeno prejudicial. No entanto, apesar da barreira e da fraca permeabilidade, este estrato possui plasticidade e elasticidade que permite os movimentos da pele.^(1, 2, 6)

A baixa quantidade de água que se encontra no EC permite um fluxo passivo de água, a qual se evapora depois para o meio ambiente em grau variável, dependendo das condições climáticas e da integridade da barreira cutânea. Parte desta humidade é retida no EC pelo factor humectante natural enquanto que a perspiração não visível afecta, de forma variável, a quantidade de água evaporada na superfície cutânea. Neste trabalho, decidimos utilizar um Tewameter, método que se baseia no gradiente de evaporação de câmara aberta, para nos auxiliar nas medições da PTEA, quer em situações basais quer após a aplicação de substâncias que alteram a eficácia da barreira cutânea.^(3, 5, 13)

Foram desenvolvidas diversas metodologias para avaliar a eficácia de produtos hidratantes. A maioria das vezes são utilizadas abordagens que recorrem a métodos estáticos, mas estas estão condicionadas ao facto de não identificarem a origem da água detectada e apenas produzirem dados instantâneos.⁽¹³⁾

Neste trabalho é revista uma metodologia baseada na modelação matemática de dados de PTEA após a realização de um POST, para avaliar a dinâmica hídrica cutânea através de parâmetros cinéticos. Embora simples de executar, esta metodologia consome muito tempo, uma vez que normalmente envolve a recolha de dados durante, pelo menos 30 minutos, tornando-se incómodo tanto para os voluntários como para os investigadores, o que se traduz num estudo dispendioso, como já foi referido no capítulo anterior. Através da análise de estudos anteriores, em que se recorre a esta metodologia dinâmica do POST, pode-se comprovar o seu incómodo.^(3, 11, 12, 13)

Esta investigação tem como objectivo optimizar o protocolo do POST, reduzindo o tempo total da experiência através da recolha de mais pontos na fase inicial do estudo.

3.2. Materiais e Métodos

Vinte e três voluntários do sexo feminino participaram neste estudo (idade média de $22,3 \pm 2,6$ anos), após consentimento informado. O procedimento seguido estava em conformidade com os padrões éticos do Comité de Ética da ULHT responsável pela experimentação em humanos e segundo a Declaração de Helsínquia. Todas as voluntárias foram submetidas a um POST que consistiu na aplicação de um penso oclusivo, como já referido no capítulo anterior e esquematizado na Figura 2, no antebraço, durante 24h. Este penso era composto por compressa, ParafilmTM (Neenah, Wisconsin, Estados Unidos da América), papel aderente (Pingo Doce, Lisboa, Portugal) e novamente ParafilmTM, sendo depois aplicado na pele com adesivo Durapore (3M, Nadarzyn, Polónia).

O local escolhido para o estudo foi a região média do antebraço ventral dos voluntários, tendo sido aleatorizado o lado esquerdo e direito. O local foi coberto pelo penso oclusivo durante 24h e, imediatamente após remoção do mesmo, foi medida a PTEA, utilizando um Tewameter TM300 (Courage+Khazaka electronics GmbH, Colónia, Alemanha). Foram registadas medições de PTEA a cada 2 segundos nos primeiros 2 minutos, a cada 30 segundos nos seguintes 5 minutos, a cada 60 segundos até aos 20 minutos e nos últimos 10 minutos foram feitas medições de 5 em 5 minutos. Foram aplicadas 4 análises de protocolos, sendo analisados valores de 0, 5, 10, 15 e 30 minutos. O parâmetro mais relevante, a $t_{1/2}$ de evaporação ($t_{1/2}$ evap), foi comparado com todos os protocolos, utilizando como software de ajuste o MS Excel Solver.

O modelo bi-compartimental utilizado neste estudo tem como objectivo simular os mecanismos fisiológicos complexos de distribuição de água, onde se analisam os dados das curvas de decaimento experimental de PTEA. O penso oclusivo induz uma oclusão prolongada da pele levando a alterações do balanço de água nos 2 compartimentos. O modelo leva à estimulação da barreira e das camadas mais interiores da pele como dois conteúdos de água distintos. O primeiro compartimento representa a barreira da pele com baixo teor em água; enquanto que o segundo representa as camadas mais interiores da pele, com maiores níveis de água. A transferência de água destes 2 compartimentos é regulada por 2 microconstantes ($K_{2 \rightarrow 1}$ e $K_{1 \rightarrow 2}$); e a eliminação de água para o exterior é regulada por a microconstante $K_{1 \rightarrow 0}$. As curvas de decaimento da PTEA podem ser descritas pela equação (1):

$$PTEA = B + I(e^{-K_{evap} \times t} - e^{-K_{hidr} \times t}) \quad (1)$$

onde B, efeito baseline; I, parâmetro multiplicativo comum às exponenciais; K_{evap} , constante de evaporação na avaliação da função barreira; K_{hidr} , constante de hidratação relacionada com a distribuição de água pelos 2 compartimentos.

Com o intuito de se simplificar a interpretação dos dados, a K_{evap} é transformada em $t_{1/2evap}$ (tempo de semi-vida de evaporação), equação (2):

$$t_{1/2evap} = \frac{\ln(2)}{K_{evap}} \quad (2)$$

Onde $t_{1/2evap}$ representa o tempo necessário para que o organismo reduza a sua perda de água para metade.

Outro parâmetro relevante na análise de dados, destinado à comparação, é a dinâmica da massa de água (DMA) a qual representa a massa de água relevante envolvida no processo de desadsorção. Este parâmetro é obtido através da área sobre a curva (AUC) do t_{max} até ao final da experiência (3):

$$DMA = \int_{t_{max}}^T (B + I \times (e^{-K_{evap} \times t} - e^{-K_{hidr} \times t})) dt \quad (3)$$

Após a remoção do penso oclusivo procedeu-se ao ajuste do modelo matemático aos dados experimentais da PTEA obtidos, permitindo obter os parâmetros K_{evap} , $t_{1/2evap}$ e DMA. (12, 13, 14)

3.3. Resultados e Conclusões

A partir da análise dos resultados obtidos podemos concluir que o modelo bi-compartimental descreveu bem os pares de dados e o valor mais baixo de R^2 obtido foi de 0,74. Os valores de $t_{1/2 \text{ evap}}$ obtidos nos 4 protocolos foram muito semelhantes e a análise estatística não demonstrou grande diferença nos conjuntos de dados recolhidos (Figura 6). Esta diferença nas condições funcionais da barreira pode ser observada em cada voluntário pelo valor superior obtido do desvio padrão. No entanto, este valor não apresentou grande relevância nos resultados finais, uma vez que os dados foram analisados em pares.

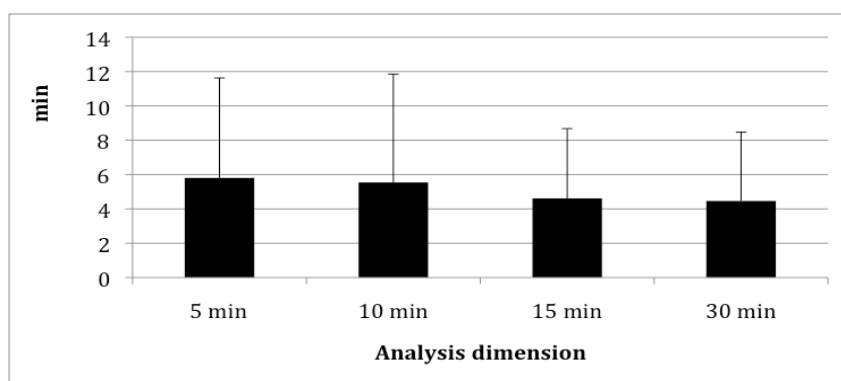


Figura 6: $t_{1/2 \text{ evap}}$ obtidas nos diferentes protocolos (média $\pm$ SD, n=23)

A maior parte da perda de água ocorre nos primeiros minutos após remoção do penso oclusivo. Deste modo, a forma típica da curva desta dinâmica encontra-se formada após os primeiros 5 minutos das medições, ou seja, o período de tempo abrangido pelo primeiro protocolo. Como pode ser observado na Tabela 1, há diferenças significativas entre o protocolo mais curto e os mais prolongados (15 e 30 minutos). No entanto, quando se estende o tempo de análise para os 10 minutos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os parâmetros obtidos nos protocolos mais prolongados, o que leva a concluir que a duração da recolha de dados de PTEA pode ser efectivamente diminuída de 30 minutos para apenas 10 minutos.

Tabela 1: Análise estatística dos resultados de $t_{1/2\text{evap}}$ fornecidos pela análise dos diferentes protocolos

	5 min	10 min	15 min	30 min
5 min	-	0.101	0.031	0.033
10 min	-	-	0.248	0.107
15min	-	-	-	0.287

A função de barreira é normalmente avaliada por medições instantâneas de PTEA, no entanto, alguns estudos têm relatado uma baixa correlação entre os danos causados à pele e alterações nos valores de PTEA. Desenvolvimentos sobre a modelação matemática das curvas de PTEA que resultam de um POST, contribuíram para uma descrição quantitativa mais precisa do equilíbrio cutâneo da massa de água ao longo do tempo. Esta metodologia utiliza a oclusão durante 24 horas com um adesivo impermeável para causar a acumulação de água na pele. Quando ocorre a remoção do sistema, grandes quantidades de água se evaporam a partir da superfície da pele até que o equilíbrio seja restabelecido. O tempo necessário para atingir este equilíbrio é principalmente dependente do balanço de água dinâmica estabelecida entre as camadas mais profundas e as estruturas superficiais da pele e, assim sendo, os parâmetros cinéticos obtidos por esta metodologia espelham a competência da barreira epidérmica. ^(14, 15, 16)

A metodologia dinâmica que assenta no POST é uma técnica muito utilizada na avaliação da PTEA. No entanto, esta tem a sua aplicabilidade condicionada pelo longo tempo de recolha de dados que é tradicionalmente requerido. ^(11, 12, 17)

Após a análise dos dados, por modelação matemática, podemos concluir que a maior perda de água ocorre nos primeiros segundos e que, aumentando o conjunto de dados recolhido nesta fase, pode haver redução do tempo de leitura dos dados para 10 minutos, em vez dos 30 minutos convencionais.

Com este trabalho pretendemos otimizar esta metodologia avaliando se é possível haver redução do tempo de análise, o que se veio a comprovar possível. Este desenvolvimento é vantajoso tanto para os investigadores, como para os voluntários, uma vez que, por um lado, se consegue uma redução acentuada dos custos de investigação, bem como se proporciona um maior conforto dos participantes no estudo. ⁽¹⁵⁾

4. Metodologia POST aplicada à avaliação da eficácia de dois produtos cosméticos

4.1. Introdução

Neste trabalho pretendeu aplicar-se a análise da PTEA após a realização de um POST, com o auxílio de um modelo matemático que se baseia na avaliação da dinâmica hídrica através de parâmetros cinéticos à análise da eficácia de produtos cosméticos hidratantes. Foi também reavaliada a metodologia do POST, pois foi demonstrado em estudos prévios que o protocolo de POST poderia ser otimizado para apenas 15 minutos de análise por recolha de maior número de dados iniciais, como indicado no capítulo 2. ^(3, 5, 12, 13, 14)

Os cremes hidratantes são produtos cosméticos utilizados em larga escala em dermatologia e no tratamento de patologias da pele. Estes produtos são substâncias oleosas agradáveis aplicadas na pele, usadas na reposição de óleos naturais e que fornecem um filme protector reconfortante. Estas substâncias permitem atrasar a evaporação da água das camadas mais superiores da pele, mantendo assim a hidratação e melhorando a aparência e propriedades tácteis da pele seca e envelhecida. ^(18, 19)

Os cremes hidratantes são substâncias que potenciam os mecanismos de reparação do EC, traduzindo-se em 4 passos principais: reparação da barreira da pele, aumento do conteúdo hídrico, redução da PTEA e restauro da capacidade dos lípidos de atrair, armazenar e redistribuir a água. Estas formulações cosméticas são combinações de substâncias emolientes, oclusivas ou humectantes para alcançarem o seu benefício terapêutico. No entanto, neste trabalho vamos avaliar a eficácia dos cremes hidratantes humectantes e oclusivos. ⁽¹⁸⁻²²⁾

As substâncias Oclusivas reduzem a PTEA no EC por criarem uma barreira hidrofóbica à superfície da pele e contribuírem para a matriz entre os corneócitos. Por outro lado, as substâncias Humectantes atraem água de duas fontes: potenciam a absorção de água da derme para a epiderme e em certas condições de humidade permitem que o EC absorva água do ambiente exterior. ^(18, 19)

O hidratante ideal deveria apresentar elevada eficácia, hidratando o EC na redução e prevenção da PTEA; permitir a restauro da barreira lipídica; ser cosmeticamente elegante; hidratar todos os tipos de pele, incluindo as sensíveis, sendo hipoalergénico, sem odor, não comedogénico e não sensibilizante; económico; com longo período de validade; e de rápida absorção permitindo imediata hidratação. ^(18, 19)

Esta investigação tem como objectivo a confirmação de que o tempo de recolha de dados se demonstra suficientemente sensível na avaliação da eficácia de dois tipos diferentes de cremes hidratantes.

4.2. Materiais e Métodos

Quinze voluntários do sexo feminino participaram neste estudo (idade média $22,1 \pm 2,8$ anos), após consentimento informado. O procedimento seguido encontra-se em conformidade com padrões éticos do Comité responsável pela experimentação em humanos e segundo a Declaração de Helsínquia.

No dia 0, as voluntárias foram submetidas à aplicação de um penso oclusivo, nos antebraços ventrais dos voluntários, durante 24 horas. Após a remoção do penso, foi medida a PTEA, continuamente, por 15 minutos. A medição deste parâmetro foi feita com um Tewameter TM300 (Courage+Khazaka electronics GmbH, Colónia, Alemanha). Foram registadas medições de PTEA a cada 2 segundos nos primeiros 2 minutos, a cada 30 segundos nos primeiros 5 minutos e, por fim, a cada 60 segundos até aos 15 minutos. Em seguida, cada voluntário aplicou 2 tipos diferentes de cremes hidratantes, produto A e B, com ingredientes humectantes e ingredientes oclusivos, respectivamente, em locais pré-determinados nos antebraços, 2 vezes por dia, durante 15 dias.

O penso era composto por compressa, ParafilmTM (Neenah, Wisconsin, Estados Unidos da América), papel aderente (Pingo Doce, Lisboa, Portugal) e novamente ParafilmTM, aplicando-se depois na pele com adesivo Durapore (3M, Nadarzyn, Polónia), como esquematizado na Figura 2.

No dia 15, foi aplicado um novo penso oclusivo durante 24 horas e após remoção foram novamente recolhidos dados da PTEA.

A análise de dados da PTEA foi efectuada com o auxílio de um modelo bi-compartimental, sendo que os parâmetros mais relevantes, $t_{1/2 \text{ evap}}$ e DMA, foram comparados com associação entre os resultados obtidos nos protocolos similares efectuados e os 15 minutos de duração da experiência, com o auxílio do software de ajuste MS Excel Solver.

Neste estudo recorremos a um modelo bi-compartimental que tem como principal objectivo simular os mecanismos fisiológicos complexos de distribuição de água, analisando os dados das curvas de PTEA. A indução da oclusão prolongada da pele por parte do penso oclusivo promove alteração do balanço hídrico nos 2 compartimentos. Este modelo permite

uma estimulação da barreira e camadas mais interiores da pele simbolizando dois conteúdos hídricos distintos, como já indicado no capítulo anterior.

Após a remoção do penso oclusivo procedeu-se ao ajuste do modelo matemático dos dados experimentais da PTEA obtidos, obtendo os parâmetros cinéticos mais relevantes ao estudo: $t_{1/2\text{evap}}$ e DMA. ⁽¹²⁻¹⁴⁾

4.3. Resultados e Conclusões

Ao analisar os dados obtidos podemos concluir que nos locais tratados com os cremes hidratantes, a PTEA foi mantida com valores elevados, o que se traduziu em valores também elevados de $t_{1/2 \text{ evap}}$.

A maior parte da perda de água ocorre nos primeiros instantes após a remoção do penso oclusivo, traduzindo-se em curvas de dinâmica hídrica formadas logo após os primeiros minutos de recolha de dados.

Em relação às diferenças estatísticas, não foi demonstrada nenhuma diferença nos parâmetros obtidos com os protocolos mais longos, o que mais uma vez confirma que o tempo de experiência pode ser significativamente diminuído. No entanto, foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p=0,096$) entre o $t_{1/2 \text{ evap}}$ dos dois diferentes tipos de cremes hidratantes, estando relacionados com os diferentes mecanismos de acção das 2 formulações (Figura 7).

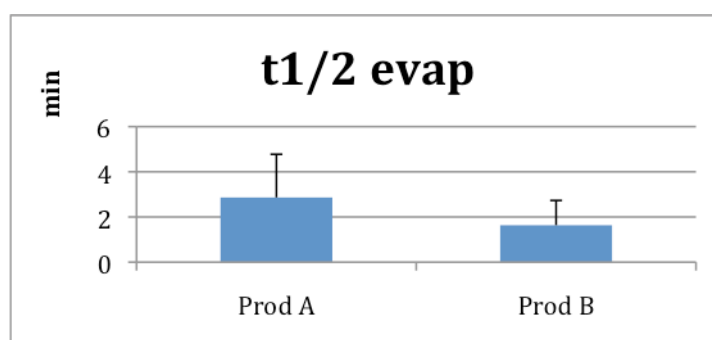


Figura 7: $t_{1/2 \text{ evap}}$ obtido através de 2 formulações diferentes * $p<0,05$

Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas para a DMA ($p=0,1912$) (Figura 8).

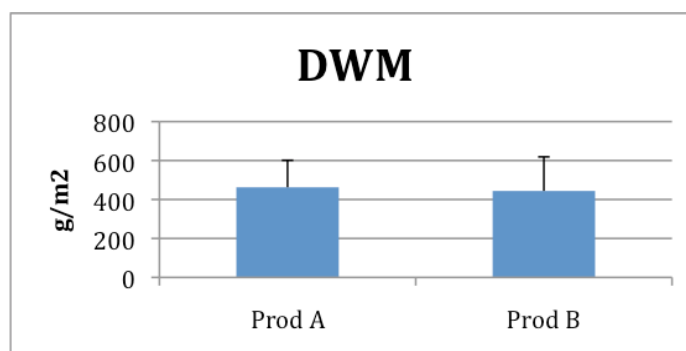


Figura 8: DMA obtido através das 2 formulações (média $\pm$ SD, n=15)

As medições de PTEA são usadas para avaliar a função de barreira, sendo este um valor importante na activação da eficácia de formulação cosméticas.

Desenvolvimentos sobre a modelação matemática das curvas de PTEA que resultam de um POST, em estudos anteriores, contribuíram para a reavaliação desta técnica, permitindo uma descrição mais precisa do equilíbrio cutâneo da massa de água ao longo do tempo. Esta metodologia mantém a oclusão por 24 horas com um adesivo impermeável para permitir a acumulação de água na pele. Após a remoção do adesivo, elevadas quantidades de água são evaporadas e captadas pelo Tewameter até que o equilíbrio seja restabelecido. Deste modo, o tempo necessário de medição desta técnica apresenta-se dependente do balanço de água dinâmica entre as camadas mais profundas da pele e as mais superficiais, permitindo que os parâmetros cinéticos obtidos nesta técnica espelhem a função de barreira da pele.

Trata-se de uma metodologia muito utilizada na medição e avaliação da PTEA, no entanto apresenta-se inconveniente devido ao longo período de medição, como foi comprovado no capítulo anterior.

Este trabalho experimental confirma que a maior perda de água ocorre nos primeiros 15 minutos de medição da PTEA, em vez dos 30 minutos requeridos inicialmente, permitindo assim a confirmação da optimização da técnica. Esta melhoria na metodologia permite a redução dos custos, proporcionando um maior conforto aos voluntários, o que se torna vantajoso tanto para os investigadores como para os voluntários, como referido anteriormente.

Neste trabalho experimental também pudemos analisar a eficácia de 2 formulações cosméticas diferentes: um creme hidratante humectante e um creme hidratante oclusivo. Através da análise dos parâmetros mais relevantes para este estudo, $t_{1/2 \text{ evap}}$ e DMA, pudemos concluir que o $t_{1/2 \text{ evap}}$ para o produto A foi superior do que para o produto B, devido aos diferentes mecanismos de acção destas diferentes formulações, o que se traduz num tempo de permanência mais prolongado na pele. No entanto, não se verificam diferenças marcadas nos valores de DMA tanto para o produto A como para o produto B.

Assim, e em modo de conclusão, concluímos que este estudo, para além de permitir a confirmação da reavaliação da presente metodologia de POST, permite também confirmar a aplicabilidade da metodologia ao avaliar a eficácia de 2 formulações diferentes.

Conclusões gerais

Este trabalho teve vários objectivos, sendo os principais a optimização da metodologia do POST e utilizar esta metodologia optimizada na avaliação da eficácia de dois produtos cosméticos.

Numa primeira parte deste trabalho, foi possível verificar a optimização da metodologia do POST por recolha de maior número de dados iniciais, uma vez que a curva de decaimento da PTEA é mais acentuada nos primeiros 10 minutos e posteriormente tende a estabilizar. Esta metodologia, apesar de ser de simples execução e muito utilizada na avaliação da dinâmica hídrica cutânea, consome muito tempo uma vez que envolve a recolha de dados durante 30 minutos. Assim, tornou-se importante confirmar a redução do tempo de análise, sendo vantajoso tanto para os investigadores, como para os voluntários, uma vez que, por um lado, se consegue uma redução acentuada dos custos de investigação, bem como se proporciona um maior conforto dos participantes no estudo.

Outro objectivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de dois tipos diferentes de formulações cosméticas através da análise da PTEA após a realização de um POST, confirmando que o tempo de recolha de dados se demonstra suficientemente sensível na avaliação da eficácia desses mesmos dois tipos de cremes hidratantes, humectante e oclusivo. Os valores de PTEA recolhidos para os diferentes tipos de cremes hidratantes permitiram concluir que, devido aos diferentes mecanismos de acção das formulações cosméticas, o tempo de permanência das mesmas na pele era diferente, sendo mais elevada para o produto humectante do que para o oclusivo.

Bibliografia

1. Parra-Juez, J. L. et al. (1995). *Ciencia Cosmética – Bases Fisiológicas y critérios prácticos*, Madrid, Ed. Cons. Gen. Colegios Oficiales de Farmaceuticos.
2. Firooz, A. et al. (2012). Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender and Body Region. *Scientific World Journal*: article ID-386936, 5 pages.
3. Rosado, C, et al. (2005). Modeling TEWL- desorption curves: a new practical approach for the quantitative *in vivo* assessment of skin barrier. *Experimental Dermatology*, 14, 386-390.
4. Pinnagoda, J. (1995). Measurement of the Transepidermal Water Loss, *Department of Dermatology*, 173-178.
5. Barel, A. O., Clarys, P. (1995). Comparison of Methods of Transepidermal Water Loss. In Serup J, Jemec GBE, Grove GL (eds.) *Non-Invasive Methods and the Skin*, CRC Taylor and Francis, *Boca Raton*, 179-184.
6. Pinnagoda, J. et al. (1990). Guidelines for Transepidermal Water Loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis*, 22, 164-178.
7. Pinnagoda, J. (1994). Hardware and Measuring Principles: Evaporimeter, 4, 51-58.
8. Tupker, R. A., Pinnagoda, J. (2006). Measurement of Transepidermal Water Loss by Semiopen Systems. In Serup J, Jemec GBE. Grove GL (eds.) *Non-Invasive Methods and the Skin*, CRC Taylor and Francis, *Boca Raton*, 383-392.
9. Nuutinen, J. (1995). Measurement of Transepidermal Water Loss by Closed-Chamber Sstems. In Serup J, Jemec GBE, Grove GL (eds.) *Non-Invasive Methods and the Skin*, CRC Taylor and Francis, *Boca Raton*, 393-396.
10. Imhof, R. E., Jesus, M. E. (2009). Closed-Chamber transepidermal Water Loss measurement: microclimate, calibration and performance. *International Journal of Cosmetic Science*, 31, 97-118.
11. Berardesca, E., Elsner, P. (1994). Dynamic Measurements: the Plastic Occlusion Stress Test (POST) and the Moisture Accumulation Test (MAT), 9, 97-102.

12. Pinto, P. et al. (2011). Is there any impairment in sensitive skin?: a quantitative analysis of sensitive skin by mathematical modeling of transepidermal water loss desorption curves, 17, 181-185.
13. Rosado, C. et al. (2009). Assessment of moisturizers and barrier function restoration using dynamic methods, *Skin Research and Technology*, 15 (1), 77-83.
14. Pinto, P. C. et al. (2002). Testing the discriminative capacity of compartmental modelling for the analysis of the in vivo epidermal water content changes following topical application under occlusion. *IFSCC Magazine*, 5, 1-6.
15. Lotte, C. et al. (1987). *In vivo* relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: effect of anatomic site. *Arch Dermatol Res*, 279, 351-356.
16. Chilcott, R. P. et al. (2002). Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function in vitro. *J Invest Dermatol*, 118, 871-875.
17. Pennick, G. et al. (2010). Superior effect of isostearyl isostearate on improvement in stratum corneum water permeability barrier function as examined by the plastic occlusion stress test. *International Journal of Cosmetic Science*, 32, 304-312.
18. Kraft, J. N., Lynde C. W. (2005). Moisturizers: What They Are and a Practical Approach to Product Selection, *Skin Therapy Letter*, 10 (5).
19. Lynde, C. W. Moisturizers: What They Are And How They Work. *Dermatology*, Toronto, Canada.
20. Draelos, Z. D. (2000). Therapeutic Moisturizers. *Dermatologic Clinics*, 18, 597-607.
21. Tabata, N. et al. (2000). Biophysical Assessment of Persistent Effects of Moisturizers after Their Daily Applications: Evaluation of Corneotherapy. *Dermatology*, 200, 308-313.
22. Lóden, M. (2003). Role of Emollients and Moisturizers in the Treatment of Dry Skin Barrier Disorders. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4 (18), 771-788.