



Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde
Mestrado e Doutorado - UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ISABEL CLAUDINO SILVANO

DESENVOLVIMENTO DE FILME POLIMÉRICO CONTENDO EXTRATO DE
***Origanum majorana* PARA APLICAÇÃO COMO DESPIGMENTANTE E**
HIDRATANTE

Tubarão

2018

ISABEL CLAUDINO SILVANO

**DESENVOLVIMENTO DE FILME POLIMÉRICO CONTENDO EXTRATO DE
Origanum majorana PARA APLICAÇÃO COMO DESPIGMENTANTE E
HIDRATANTE**

Linha de pesquisa: Estudos e desenvolvimento de medicamentos e produtos para a saúde.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Luiz Alberto Kanis, Dr

Tubarão

2018

S58 Silvano, Isabel Claudino, 1991-
Desenvolvimento de filme polimérico contendo extrato de *Origanum majorana* para aplicação como despigmentante e hidratante / Isabel Claudino Silvano ; -- 2018.
93 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador : Prof. Dr. Luiz Alberto Kanis.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Produtos para saúde – Desenvolvimento. 2. Hidratação. 3. Melanina. 4. Extrato de plantas – Farmacologia. 5. Origanum – Uso terapêutico. 6. Polifenóis. 7. Agentes dermatológicos. I. Kanis, Luiz Alberto. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 646.72

Ficha catalográfica elaborada por Francielli Lourenço CRB 14/1435



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Desenvolvimento de filme polimérico contendo extrato de *Origanum majorana* para aplicação como despigmentante e hidratante

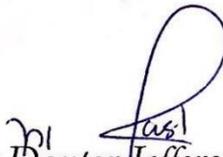
ISABEL CLAUDINO SILVANO
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 28 de setembro de 2018.

Doutor Luiz Alberto Kanis Iser (orientador) _____

Doutora Irene Cledes K. Guerreiro (Avaliador externo - UFRGS) _____

Doutora Fabiana Schuelter Trevisol (avaliador interno) _____


Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

RESUMO

Introdução: Dentre os tratamentos de hiperpigmentações disponíveis no mercado, a hidroquinona é um ativo comumente utilizado, porém pode oferecer riscos de toxicidade celular. Já foi comprovado que a arbutina possui atividades clareadoras similares as da hidroquinona, porém com menos efeitos adversos. A arbutina está presente na planta *Origanum majorana*, que por sua vez possui em suas folhas grandes quantidade de polifenóis, os quais também apresentam atividade antioxidante e de clareamento. Diferentes formas farmacêuticas são utilizadas como base para os ativos e o desenvolvimento de uma formulação a base de gel formador de filme podem aumentar o tempo de exposição dos ativos na pele aumentando sua permeação e atividade.

Objetivo: Desenvolver e avaliar atividade hidratante e despigmentante de um gel formador de filme com extrato de *Origanum majorana* rico em polifenóis e arbutina.

Métodos: Primeiramente foi preparado o extrato de *Origanum majorana* rico em polifenóis e arbutina. Em seguida foram preparados géis formadores de filme com uma blenda polimérica de Poli álcool vinílico (PVA) e Poli vinil pirrolidona (PVP) na proporção de (40:60) contendo 14, 16 e 18%. Foram avaliadas as propriedades do gel formador de filme em relação a viscosidade, tempo de secagem, espessura do filme formado e suas atividades de hidratação cutânea para a seleção da formulação para a incorporação do extrato. O extrato foi incorporado na formulação de acordo com a proporção de glicerol presente na formulação e no extrato. foram repetidos os testes anteriores e determinado uma quantidade de gel formador de filme para aplicação no estudo clínico. Foi realizado um estudo clínico com abordagem quantitativa para determinar atividade hidratante e despigmentante do gel formador de filme com extrato de *Origanum majorana*.

Resultados: O extrato produzido apresentou 1,76% de arbutina e 22,30% de polifenóis. A formulação selecionada para a incorporação do extrato de *Origanum majorana* foi a com 16% de PVA/PVP na formulação (F16OM), resultando na concentração de 0,11% de arbutina. Esta quando aplicada na massa de 5mg/cm² apresentou 5 minutos no tempo de secagem na pele. O estudo clínico foi realizado com amostra de 16 voluntárias para o teste de sensibilidade cutânea (7 dias),

hidratação e despigmentação (30 dias). Houve uma exclusão por esquecimento da aplicação do produto por 6 dias. Os voluntários utilizaram uma formulação em cada antebraço (antebraço esquerdo F16, antebraço direito F16OM). Os sujeitos do estudo não apresentaram nenhuma sensibilidade ou irritação durante a utilização das formulações. Um aumento significativo para a hidratação da pele foi observado, porém sem diferenças entre a formulação controle e F16OM. O gel formador de filme F16OM promoveu redução significativa da pigmentação, sendo duas vezes superior a efeito da formulação controle.

Conclusão: A formulação F16OM apresentou características físico-químicas que proporcionam uma adequada aplicação na pele e resultados significativos de incremento de hidratação e de despigmentação cutânea, apresentando-se como alternativa potencial para tratamento de hiperpigmentações.

Descritores: Polímeros formadores de filme. Hidratação. Melanina. Extrato de *Origanum majorana*. Polifenóis. Arbutina.

ABSTRACT

Introduction: Among the hyperchromic treatments available on the market, hydroquinone is one of the few drugs used, although the risks of cellular toxicity. Arbutin has been shown to have similar bleaching activities as hydroquinone, but with fewer adverse effects. The main ingredient to be found is *Origanum majorana*, which also has antioxidant and whitening activity. Different pharmaceutical forms are used as the basis for the growth and growth of a content forming base which can increase the time of memory exposure of your memory and activity.

Objective: To develop and evaluate the moisturizing and depigmenting activity of a film-forming gel with *Origanum majorana* extract rich in polyphenols and arbutin.

Methods: Firstly, *Origanum majorana* extract rich in polyphenols and arbutin was prepared. Then, film-forming gels were prepared with a polymer blend of PVA and PVP (40:60) containing 14, 16 and 18%. The properties of the film forming gel were evaluated in relation to the viscosity, drying time, thickness of the formed film and its skin hydration activities to the selection of the formulation for the incorporation of the extract. The extract was incorporated into the formulation according to the ratio of glycerol present in the formulation and in the extract. the above tests were repeated and an amount of film-forming gel was determined for application in the clinical study. An open cynic study with a quantitative approach was performed to determine the moisturizing and depigmenting activity of the film - forming gel with *Origanum majorana* extract.

Results: The extract produced 1.76% of arbutin and 22.3% of polyphenols. The formulation selected for the incorporation of the extract of *Origanum majorana* was that with 16% of PVA / PVP in the formulation (F16OM), resulting in the concentration of 0.11% of arbutin. This when applied in the mass of 5mg / cm² presented 5 minutes in the time of drying in the skin. The clinical study was performed with a sample of 16 volunteers for skin sensitivity test (7 days), hydration and depigmentation (30 days). There was a foreclosure exclusion of the application of the product for 6 days. The volunteers used a formulation on each forearm (left forearm F16, right forearm F16OM). The subjects in the study did not show any sensitivity or irritation during the use of the formulations. A significant increase in skin hydration was observed, however with no differences between the control formulation and F16OM. The F16OM film-

forming gel promoted significant reduction of pigmentation, being twice the effect of the control formulation.

Conclusion: The F16OM formulation presented physical-chemical characteristics that provide an adequate application in the skin and significant results of increased hydration and cutaneous depigmentation, presenting as a potential alternative for the treatment of hyperchromias.

Keywords: Film-forming polymers. Hydration. Melanin. Extract of *Origanum majorana*. Polyphenols. Arbutine.

LISTAS

Lista de Abreviaturas e Siglas

% – Por cento

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

µL – Microlitros

2H⁺ – Dois íons de hidrogênio

Abs – Absorbância

ACTH – Hormônio adreno corticotrófico

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

BHT – ButilHidroxiTolueno

CAT – Catalase

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

cm² – Centímetros quadrados

COOH – Ácido carboxílico

CT – Catalase

d^2 – Diferença esperada

DHI – dopa,5,6 diidroxiindol

DHICA – 5,6 diindroxiindol-2-ácido carboxílico

DOPA – 3,4-dihidroxifenilalanina

EMIC DL 2000 – Equipamento de tensão deformação

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ET-1 – Endotelina 1

F14- Formulação contendo 14% de polímeros

F16- Formulação contendo 16% de polímeros

F16OM- - Formulação contendo 16% de polímeros com adição de Extrato de *Origanum majorana*

F18- - Formulação contendo 18% de polímeros

FPS 30 – Fator de proteção solar 30

FNH – Fator natural de hidratação

G1om – Grupo gel formador de filme com extrato de *Origanum majorana*
G2f – Grupo gel formador de filme
G3a – Grupo gel com arbutina
GFF- Gel formador de filme
GOX – Glutaciona oxidada
GP – Glutaciona peroxidase
GP_x – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona reduzida
h – Horas
H₂O – Molécula de água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HOxL – Hidroperóxido lipídico
HQ – Hidroquinona
IL – Interleucina
IL-1 α ou IL-1 β – Interleucina
kDa – kDaltons
L. – Lamiaceae
LIP- Luz intensa pulsada
LPH – Lipotrofina
LVS – Lâmina de vidro seca
mg – Miligramas
mg.L – Miligramas por litro
min. – Minutos
mL – Mililitros
MSH – Hormônio melanócito estimulante
N - Niltons
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
nm – Nanômetros
NO – Óxido nítrico
O – Oxigênio
OH – Hidroxila
O₂⁻ – Radical oxigênio
PG – Prostaglandinas
PGE₂ – Tipo de prostaglandina

PGF_{2α} – Tipo de prostaglandina
 pH – Potencial hidrogeniônico
 POMC – Pré-opriomelanocortina
 PRC – Produto de redução correspondente
 PVA – Poli álcool vinílico
 PVP – Poli vinil pirrolidona
 RL – Radical livre
 RUV – Raios ultravioleta
 RUVA – Raios ultravioleta tipo A
 RUVB – Raios ultravioleta tipo B
 SOD – Superóxido dismutase
 TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
 TRP-1 – Proteína 1 relacionada a tirosinase
 TRP-2 – Proteína 2 relacionada a tirosinase
 U – Unidades
 UA – Unidades arbitrárias
 β – Beta
 β-D-glucopiranosídeo – Beta D-glucopiranosídeo
 μm – micrômetro
 σ – Variância esperada

Lista de quadros

Quadro 1 – Concentração de substâncias predominantes na planta <i>Origanum majorana</i>	32
Quadro 2 – Propriedades físico/químicas e principais finalidades de uso dos polímeros Poli vinil pirrolidona (PVP) e o Poli álcool vinílico (PVA).....	35
Quadro 3 – Composição das formulações testadas no estudo.	41
Quadro 4 – Apresentação das variáveis em estudo	51

Lista de tabelas

Tabela 1- Caracterização do extrato de <i>Origanum majorana</i>	53
Tabela 2– Dados referentes a viscosidade e pH das formulações	53

Tabela 3- Velocidade de secagem (mg/cm ² /min) das formulações F14, F16 e F18.	55
Tabela 4- Composição das formulações F16 e F16OM.	58
Tabela 5- Dados referentes a viscosidade e pH das formulações com e sem a adição do extrato.	58
Tabela 6- Velocidade de secagem (mg/cm ² /min) das formulações contendo 16% de polímeros sem e com a adição do extrato de <i>Origanum majorana</i>	60
Tabela 7– Propriedades mecânicas de módulo de elasticidade, deformação máxima e tensão máxima para ruptura dos filmes formados com as formulações F16 e F16OM.	61
Tabela 8- Variação da hidratação cutânea após 30 dias de uso da formulação F16.	65
Tabela 9– Variação de hidratação cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros com extrato de <i>Origanum majorana</i>	66
Tabela 10– Variação de oleosidade cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros.	67
Tabela 11– Variação de oleosidade cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros com extrato de <i>Origanum majorana</i>	67
Tabela 12- Variação de pigmentação cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros sem extrato de <i>Origanum majorana</i>	69
Tabela 13– Parâmetros obtidos de percentual de redução de pigmentação cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros com extrato de <i>Origanum majorana</i>	70
Tabela 14- Variação média de hidratação, oleosidade e pigmentação proporcionadas pelo filme com 16% de polímeros com e sem a adição do extrato de <i>Origanum majorana</i>	71
Tabela 15- Resultados da satisfação dos voluntários em relação ao uso e as características sensoriais das formulações F16 e F16OM.	74

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema dos mecanismos de formação bioquímica de eumelanina e feomelanina	20
--	----

Figura 2 – Esquema ação antioxidante endógena	28
Figura 3 – Molécula de hidroquinona	30
Figura 4 – Estrutura química de arbutina	31
Figura 5 – Planta <i>Origanum majorana</i>	32
Figura 6 – Fluxograma do delineamento do estudo	38
Figura 7- Métodos de acompanhamento da hidratação e oleosidade cutâneas	43
Figura 8- Equação do tamanho de amostra	45
Figura 9- Molde para a aplicação do produto no teste de sensibilidade e alergenicidade cutânea.	47
Figura 10- Molde confeccionado para a aplicação do produto no teste de variação de hidratação e pigmentação cutânea.	49
Figura 11- Formulações F14, F16 e F18 aplicados em diferentes massas, resultando em diferentes espessuras de filme seco.	54
Figura 12- Variação do tempo de secagem em função da massa de formulação aplicada por área.	55
Figura 13- Hidratação e Oleosidade cutânea obtidas 1 minuto após a remoção do filme formado pela aplicação de diferentes massas das formulações F14, F16 e F18.	56
Figura 14- Formulações F16 (sem extrato) e F16OM (com extrato de <i>Origanum majorana</i>)	59
Figura 15- Formulações F16 e F16OM apresentando o tempo de secagem em função a massa aplicada por área da placa de vidro e da pele.	60
Figura 16- Fotografias feitas com câmera fotográfica.	62
Figura 17- Fotografias feitas com microscópio digital.	62
Figura 18- Hidratação e oleosidade cutâneas em função do tempo após remoção dos filmes da pele.....	63
Figura 19- Microscopia da pele das voluntárias 2, 12 e 15.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1.1 Hiper Cromias	17
1.1.1.1 Melanogênese.....	18
1.1.1.1.1 Ação dos RUV na melanogênese.....	22
1.1.1.1.2 Ação dos hormônios na melanogênese.....	23
1.1.1.2 Melasma	24
1.1.1.3 Hiper cromia pós-inflamatória.....	25
1.1.1.4 Melanose solar	25
1.1.1.5 Efélides	25
1.1.2 Tratamento para hiper cromias	26
1.1.2.1 Antioxidantes.....	27
1.1.2.2 Despigmmentantes	29
1.1.2.2.1 Arbutina.....	30
1.1.3 Origanum majorana	31
1.1.4 Hidratação cutânea	33
1.1.5 Géis formadores de filme	35
2. OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MÉTODOS	38
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	38
3.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO DE <i>Origanum majorana</i>	39
3.2.1 Produção do extrato	39
3.2.2 Caracterização química do extrato	39
3.2.2.1 Teor de polifenóis totais	39
3.2.2.2 Teor de arbutina.....	40
3.2.2.3 pH	40
3.3 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COM POLÍMERO FORMADOR DE FILME	40

3.3.1 Seleção da concentração de polímero formador de filme para produção do gel contendo o extrato	40
3.3.2 Viscosidade	41
3.3.3 pH	41
3.3.4 Tempo de formação do filme	41
3.3.5 Espessura dos filmes	42
3.3.6 Fotos e microscopia	43
3.3.7 Hidratação e oleosidade cutânea	43
3.4 PRODUÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO EM ARBUTINA	44
3.4.1 Caracterização mecânica	44
3.5 ESTUDO CLÍNICO PARA VERIFICAÇÃO DO EFEITO HIDRATANTE E DESPIGMENTANTE	45
3.5.1 Delineamento do estudo	45
3.5.1 População em estudo e tamanho de amostra	45
3.5.2 Critérios de inclusão e exclusão	46
3.5.3 Recrutamento	46
3.5.4 Testes de sensibilidade/alergenicidade do gel formador de filme contendo extrato de <i>Origanum majorana</i>	47
3.5.4.1 Intervenção teste de sensibilidade	47
3.5.5 Avaliação da atividade despigmentante e hidratante do gel formador de filme contendo extrato de <i>Origanum majorana</i>	48
3.5.5.1 Intervenção	48
3.6 FONTE FINANCIADORA	51
3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO	51
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	52
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1- PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	53
4.2 - DESENVOLVIMENTO DE GEL FORMADOR DE FILME POLIMÉRICO	53
4.2.1 Seleção da formulação formadora de filme para a incorporação do extrato	53
4.2.2 Gel formador de filme contendo <i>Origanum majorana</i>	57
4.2.3 Tempo de secagem	59

4.2.4 Efeito da aplicação das formulações sobre hidratação e oleosidade da pele	61
4.3 ATIVIDADE HIDRATANTE E DESPIGMENTANTE DO EXTRATO DE <i>Origanum majorana</i>	65
4.3.1 Hidratação cutânea	65
4.3.2 Oleosidade cutânea	67
4.3.3 Despigmentação cutânea	69
4.3.4 Satisfação dos voluntários em relação ao uso e avaliação das características sensoriais das formulações	73
5. CONCLUSÃO	75
5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	86
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	87
Apêndice B – Tabela de classificação de tonalidade cutânea	91
Apêndice C – Questionário de auto percepção cutânea	92
Apêndice D – Questionário de avaliação do uso do produto	93

1. INTRODUÇÃO

Dermatoses como as hiperchromias, hipochromias e acromias estão relacionadas com a pigmentação da pele¹. As alterações cutâneas de maior prevalência em pessoas fotoexpostas são as hiperchromias² caracterizadas por manchas que surgem na pele com coloração marrom-claro e tendem a progredir para colorações mais escuras. Dentre as hiperchromias destacam-se a melanose solar, melasma, mancha pós-inflamatória e efélides³. Elas se formam a partir do aumento na atividade do melanócito, elevando a produção de melanina e favorecendo o depósito de pigmento no tecido epitelial. Seu desenvolvimento está associado com fatores internos (endógenos) que podem ser causados por alterações atribuídas a hormônios, estresse e predisposição genética; ou a fatores externos (exógenos) tais como poluição, exposição excessiva ao sol, uso de cosméticos e fármacos fotossensibilizantes⁴.

As regiões do corpo mais acometidas pelas hiperchromias são a face, pescoço, mãos e antebraços. Os indivíduos que apresentam referidas dermatoses podem sofrer com alterações psicológicas, que influenciam em sua saúde geral, com redução na resposta terapêutica ao tratamento e em alguns casos, diminuição de contato com outras pessoas. Isso devido ao desconforto com a própria aparência, logo, esses fatores acabam reduzindo a qualidade de vida⁵.

Para diminuir a pigmentação das hiperchromias, diferentes tratamentos são utilizados. Dentre os quais estão os que atuam na remoção da camada mais superficial da pele com a melanina pré-formada, porém esses tratamentos podem provocar lesões inflamatórias que tendem a progredir para uma nova hiperchromia⁶. Uma alternativa terapêutica para reduzir os efeitos da hiperchromia é o uso de produtos com ativos clareadores^{7,8}.

As substâncias com atividade clareadora reduzem a atividade do melanócito e proporcionam a diminuição de riscos em relação aos demais tratamentos⁹. O ativo comumente utilizado é a hidroquinona, que proporciona um clareamento rápido, porém seus efeitos citotóxicos podem substituir a hiperchromia por uma mancha mais acentuada ou, ainda, com redução excessiva da coloração, gerando uma hipochromia, ambos de difícil tratamento¹⁰. Como alternativa à hidroquinona, pode-se utilizar um ativo com atividades semelhantes de clareamento, mas que se mostra mais vantajoso

por ser estável, não apresentar citotoxicidade e permitir utilização por períodos maiores, a arbutina^{9,11,12}. Esta substância pode ser encontrada em grande quantidade nas folhas de *Origanum majorana* Lamiacea (L.)^{13,14}. Além da presença de arbutina, o *Origanum majorana* possui em suas folhas grande quantidade de polifenóis, os quais possuem ação antioxidante e também de clareamento^{15,16}.

Para que se tenha resultado de despigmentação satisfatória faz-se necessária a permanência dos ativos por mais tempo na pele. Diferentes formas farmacêuticas são utilizadas como base para esses ativos, tais como géis, cremes e loções. Entretanto, com essas formulações o tempo de permanência e da atividade do ativo são reduzidos, exigindo reaplicações do produto constantemente¹⁷. Como alternativa para aumentar o tempo de permanência dos ativos na pele tem sido desenvolvidos géis com habilidade de formar película¹⁸. Esses géis apresentam maior benefício quando comparados com as outras formas farmacêuticas, pois possibilitam prolongar o tempo de ação do produto, aumentar a permeação e controlar a quantidade de ativos que são transferidos para a pele^{19,20}.

Por conseguinte, o desenvolvimento de um gel formador de filme (GFF) para liberação diferenciada do extrato de *Origanum majorana* rico em polifenóis e arbutina pode se tornar uma inovação para o tratamento de hiperpigmentações.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Hiperpigmentações

As hiperpigmentações são caracterizadas pelo aumento de pigmentação na pele e podem ser consideradas como superficiais ou profundas²¹. As superficiais são de nível epidérmico e possuem características de manchas castanhas, enquanto as profundas se localizam em nível dérmico e possuem aparência de manchas cinza ou ardósia. A tonalidade azul pode ser adquirida por materiais estranhos como, por exemplo, pigmentos de tatuagem aplicados à derme^{21,22}. Essas hiperpigmentações estão vinculadas aos queratinócitos, melanócitos e aos pigmentos presentes na pele: melanina, caroteno, depósito de hemossiderina e pigmentos da bile³.

As mais comuns são: melanose solar, efélides (sardas), melasma e hiperpigmentações pós-inflamatórias²³.

Os fatores que desencadeiam o processo de aumento de pigmentação na pele podem ser endógenos ou exógenos¹. Os endógenos são caracterizados pelas disfunções ou terapias hormonais, pré-disposição genética, gravidez, fatores emocionais, obesidade. Enquanto que os exógenos se dão pelo excesso de exposição solar, poluição, uso inadequado de cosméticos e substâncias fotossensibilizantes^{4,24}. As hiperchromias superficiais e profundas associam-se ao aumento de atividade do melanócito²³.

O melanócito é a célula responsável pela produção de melanina, dá coloração à pele, pelos e olhos. Ele está presente em quantidades similares de células nas peles claras e nas peles escuras, a diferença da coloração da pele ocorre pela quantidade de melanina formada nas diferentes etnias²⁵⁻²⁸. Essa diferença está associada com o controle genético de mecanismos enzimáticos da formação de pigmentação^{4,29}.

A coloração da pele promovida pelo melanócito também é fonte de fotoproteção endógena³⁰. Quando a pele é exposta ao sol recruta as atividades do melanócito para produção de melanina com maior intensidade. Quanto mais exposição da pele aos raios ultravioleta (RUV) maior será a quantidade de pigmentos produzida. A exposição da pele aos RUV pode causar tanto o bronzeamento, quanto o fotoenvelhecimento e doenças cutâneas (melanoma, ceratoses actíneas e ceratoses seborreicas). Como os cosméticos fotoprotetores, a melanina difrata ou reflete os RUV, protegendo o material genético das células, porém quando muito recrutada ou produzida desordenadamente pode gerar hiperchromia⁴. A compreensão da formação do pigmento depende do entendimento do processo de melanogênese e dos eventos que ocorrem dentro dos melanossomas²⁶.

1.1.1.1 Melanogênese

É chamado de melanogênese o processo de formação de melanina pelos melanócitos²⁵. Existem três fatores que influenciam esse processo: fatores genéticos, hormonais e a ação dos RUV²⁵. Os fatores genéticos estão envolvidos em todos os estágios da formação do pigmento, os melanossomas são codificados pelos seus genes naturalmente e acabam replicando características hereditárias⁴. Mais de 120 genes podem estar envolvidos em diferentes estágios do processo de produção da melanina^{25,29,31}.

Os melanócitos são células dendríticas derivadas da crista neural e migram ao longo do embrião durante seu desenvolvimento³². Estão localizados predominantemente na camada basal da epiderme numa proporção de um melanócito para dez queratinócitos basais. Possuem dendritos que os possibilitam enviar melanina para 36 queratinócitos. Os dendritos não se proliferam ou migram, para que haja aumento é necessário um estímulo, geralmente por RUV ou disfunções hormonais³³. A síntese de melanina ocorre principalmente pela ação da enzima tirosinase e é feita nos melanossomos que, por sua vez, são produzidos continuamente no complexo de Golgi^{3,33}.

Os melanócitos possuem estruturas chamadas de melanossomos, caracterizados como compartimentos sub-celulares que tem a função de sintetizar e estocar polímeros de melanina²⁶. Os pigmentos de melanina são transferidos do melanócito para os queratinócitos para exercerem atividade de proteção solar³⁰. Esses pigmentos se degradam conforme o queratinócito se diferencia, fazendo com que o melanócito trabalhe na produção de melanina em harmonia com a diferenciação dos queratinócitos²⁶.

A diferenciação dos queratinócitos e o estímulo do melanócito para a produção de melanina são influenciados por fatores biológicos³¹. Dentre estes fatores estão as interleucinas, fatores de crescimento e as prostaglandinas, responsáveis por verificar se houve formação de melanina suficiente para proteção e qual o tipo de pigmento foi formado³⁴.

Dois tipos de pigmentos podem ser produzidos no processo de melanogênese, a eumelanina e a feomelanina. Isso se dá porque os melanossomos se diferenciam em duas formas, elípticos e esféricos. Os elípticos produzem eumelanina (coloração marrom a preto). Já os esféricos produzem feomelanina (coloração amarelo a avermelhado)³. A eumelanina é precursora da melanina, caracterizada por um polímero protéico que é gerado a partir da oxidação da tirosina pela ação da tirosinase, pode ser formada com diferentes tamanhos, densidades e quantidades^{22,34}.

A tirosinase é a enzima responsável pela síntese de pigmentos da pele³³. Está localizada no cromossomo 11 e é expressa como um peptídeo precursor de 529 aminoácidos. Essa enzima possui seis sítios de glicosilação e, quando madura, possui peso molecular de 70kDaltons (kDa)³⁶. Está presente em várias etapas do processo de formação de melanina e é controlada naturalmente por fatores genéticos. Também

é encontrada em animais, plantas e fungos, porém com atividades menos marcantes³⁵.

O início da formação do pigmento depende de diversos fatores e ocorrências intracelulares no melanócito. A Figura 1 representa o processo de formação que ocorre em três fases principais.

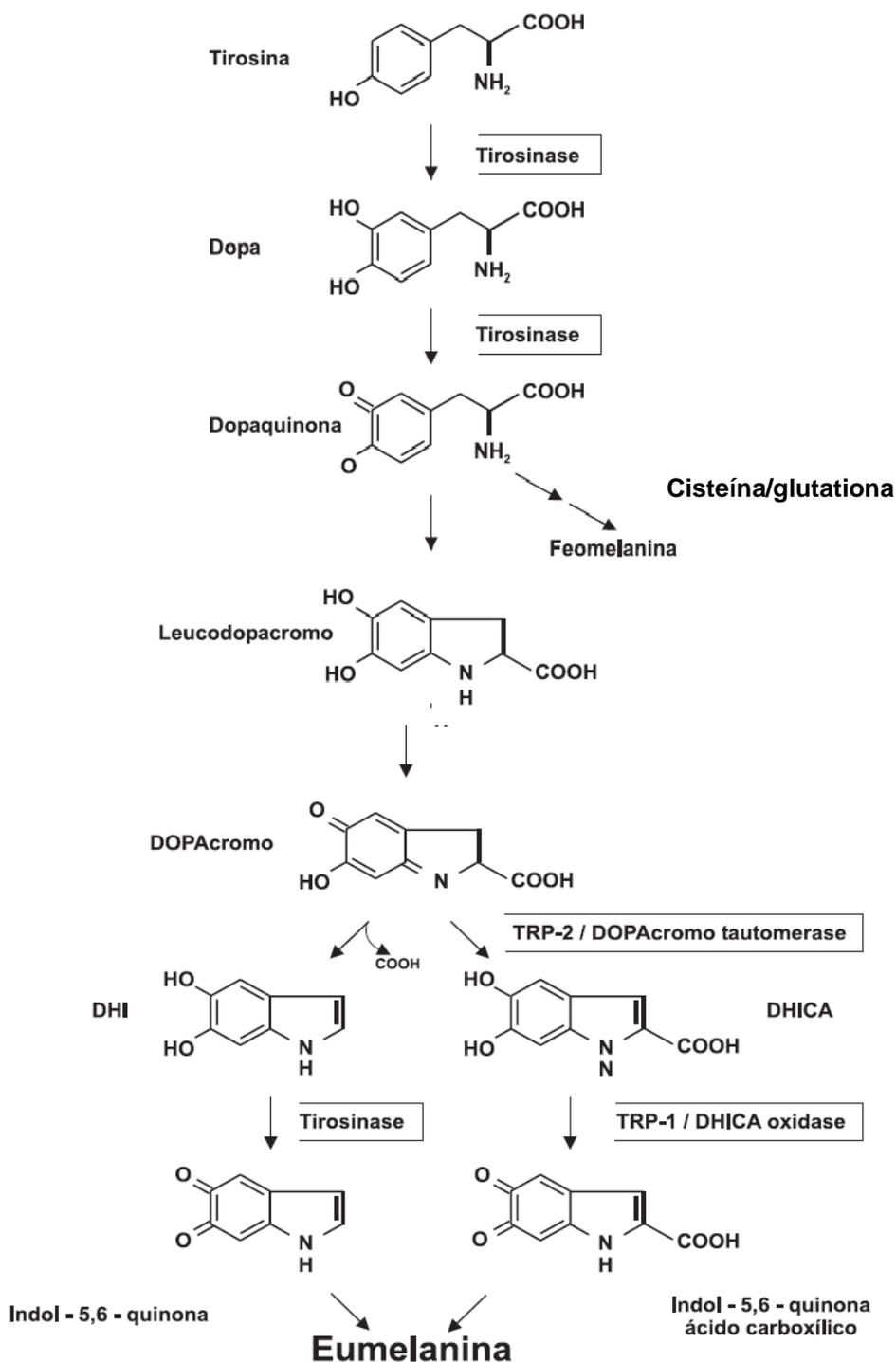


Figura 1 – Esquema dos mecanismos de formação bioquímica de eumelanina e feomelanina.

Fonte: Adaptado de Oliveira³⁵.

1) A fase inicial é desencadeada após a hidroxilação do substrato L-tirosina, com liberação de uma molécula de água, catalisada por tirosinase. Ao se oxidar a tirosina com a enzima desencadeiam um processo de transformação da molécula para um agente intermediário, a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). Quando na ausência da cisteína (glutathione) a DOPA se diferencia em DOPAquinona que é convertida em leucoDOPAcromo (ciclodopa) e esta, em DOPAcromo. Na presença de cisteína, a DOPA é convertida em cisteinildopa e, dependendo da quantidade de cisteína presente, essa conversão pode ser mais ou menos intensa²⁶.

2) A segunda é a oxidação da cisteinildopa para a formação da feomelanina³⁶.

3) A última fase é a produção de eumelanina, que se inicia depois da maioria de cisteinildopa ser decomposta. Existem duas vias para a degradação de DOPAcromo: **a)** forma DOPA 5,6 diidroxindol (DHI) que se dá em maior proporção; **b)** forma 5,6 diidroxindol-2-ácido carboxílico (DHICA) em menor quantidade. Esse processo é catalisado no melanossomo que expressa as proteínas relacionadas com a tirosinase 1 (TRP-1) e 2 (TRP-2), a TRP-2 age no DOPAcromo tautomerase formando a DHICA, a TRP-1 age na DHICA; o DHI sofre ação da tirosinase e ambos são oxidados em eumelanina, em processo de cascata³⁴. A eumelanina se deposita sobre a feomelanina pré-formada. A relação entre feomelanina e eumelanina é determinada pela ação da tirosinase e disponibilidade de cisteína ou glutathione no melanócito³⁶.

Durante a síntese de melanina, a partir da L-tirosina são formados agentes potencialmente citotóxicos, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres (RL), quando esse processo é estimulado pela radiação solar acaba liberando ainda mais RL, além de mediadores inflamatórios pelos queratinócitos, dentre eles prostaglandinas (PG) e óxido nítrico (NO)³⁷.

Os radicais livres são moléculas ou átomos altamente reativos, são desemparelhados por conter número ímpar de elétrons na camada elétrica. Esse não-emparelhamento de elétrons confere a eles alta reatividade com outros átomos e moléculas. Derivam, em significativa parte, após o metabolismo do oxigênio, nesses casos, são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs)³⁸.

Prostaglandinas (PG) são compostos lipídicos produzidos por diferentes eventos celulares⁴⁰. As prostaglandinas (PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$) estimulam a formação de dendritos nos melanócitos potencializados com a ação dos RUV³⁹. Enquanto que o radical NO atua estimulando maior produção de melanina³⁷. Os queratinócitos produzem também a endotelina 1 (ET-1), que são peptídeos derivados das células

endoteliais⁴¹. A produção de ET-1 estimula intrinsecamente os melanócitos a produzirem pigmento. Esse fator é iniciado naturalmente após a exposição da pele aos RUV ou a interleucinas (IL-1 α ou IL-1 β)⁴⁰.

1.1.1.1.1 Ação dos RUV na melanogênese

O mecanismo de formação de eumelanina e feomelanina recebe influência direta da radiação solar³⁰, que se acumula em alguns receptores do tecido epitelial e provoca reações metabólicas liberando RL³⁹. Com o aumento de RL, principalmente EROs, os RUV aceleram as ações de hidroxilação da L-tirosina e acabam acelerando o processo de melanogênese²⁶. Além disso, repetidas exposições da pele aos RUV podem provocar queimaduras, insolações, hiperpigmentações e dermatoses fotoestimuladas³⁰.

A radiação solar é policromática e possui diferentes comprimentos de onda no espectro eletromagnético que variam de 100 a 10.000 nanômetros (nm). A radiação solar se difraciona em RUV tipo B (RUVB) e tipo A (RUVA) curto e longo. Ambos possuem diferentes comprimentos de onda, os RUVB e RUVA curtos alcançam as camadas mais superficiais da epiderme, estimulam a tirosinase, promovem eritema e são os principais responsáveis pelo efeito de bronzeamento (pigmentação direta)^{3,41}. Os RUVA longos alcançam a pele durante todo o dia, inclusive em dias nublados, sendo menos intensos quando a exposição é nos horários em que o sol está localizado mais horizontalmente, liberam RL e atingem as camadas mais profundas da pele⁴.

No Brasil, não raramente pessoas se expõem ao sol sem o uso adequado da fotoproteção⁴², por vezes desconhecem os riscos proporcionados pela exposição exagerada aos RUV. As áreas do corpo mais acometidas por fotodermatoses são as que ficam descobertas mais tempo nas diferentes estações do ano. No inverno geralmente a pele do rosto e mãos ficam expostas, no outono e primavera essa exposição se amplia para os antebraços, pernas, pescoço e colo, enquanto que no verão, as coxas e braços também acabam sendo descobertos. No verão, o sol está mais próximo da superfície terrestre, associado a esse fator tem-se a redução da proteção da camada de ozônio provocada pela degradação⁴³⁻⁴⁵.

Pessoas com pele clara, produzem mais feomelanina e possuem menos fotoprotetor endógeno, o que as tornam vítimas frequentes de queimaduras solares e

danos epidérmicos induzidos pelos RUV⁴⁴. Enquanto que os indivíduos com peles mais escuras tendem a bronzear a pele com facilidade, produzem maior quantidade de melanina para proteção celular e, conseqüentemente, hiperpigmentam mais e se queimam menos que os de pele clara^{36,46}. Além dos agravantes proporcionados pelo sol na produção das hiperchromias, os processos inflamatórios e as alterações hormonais são estimuladores em potencial à formação do pigmento⁴⁷.

1.1.1.2 Ação dos hormônios na melanogênese

Vários hormônios possuem relação com a produção de melanina. Dentre eles estão o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a lipotrofina (LPH) e o hormônio melanócito estimulante (MSH)²⁵.

O MSH está diretamente relacionado com a melanogênese, é produzido na região posterior da glândula hipófise. Uma vez que o MSH se liga na superfície dos receptores do melanócito, pode aumentar a atividade celular em até 100 vezes. Como responsável pela melanização ao receber sinalização de aumento do número de queratinócitos ele estimula a produção e a migração de melanossomos do melanócito para dentro dos queratinócitos⁴⁷.

O hormônio ACTH é um hormônio liberado pela adeno-hipófise e durante sua síntese regula a produção de cortisol. A tendência é que quando o indivíduo apresenta níveis elevados de cortisol o ACTH também esteja aumentado. O ACTH possui sequências peptídicas semelhante ao MSH, quando encontrado em grandes concentrações pode se ligar em receptores do MSH resultando em pigmentação da pele⁴⁸.

Quando há algum tipo de alteração em hormônios sexuais como, estrogênio e progesterona, as hiperchromias tendem a aparecer no rosto, genitais e aréola mamária, aumentando o número de melanócitos ativos e de melanogênese nessas regiões. Essas características prevalecem em mulheres gestantes e/ou lactantes e são chamadas de melasma ou cloasma⁴.

A lipotropina (LPH) está associada com a formação do hormônio melanócito estimulante. Ambos são gerados na hipófise e hipotálamo, após o estímulo de clivagem de um pré-hormônio chamado pré-opiomelanocortina (POMC).

Dentre os tipos de hiperpigmentações mais comuns estão as efélides, o melasma, a melanose solar e a hiperpigmentação pós-inflamatória³.

1.1.1.2 Melasma

O melasma é uma doença de pele adquirida que acomete áreas mais frequentemente expostas aos raios RUV. Quando se forma nos períodos gestacionais recebe o nome de cloasma²⁴. É mais comum surgir na região frontal, zigomática e maxilar. Caracterizado por manchas marrom escuras de contorno irregular³⁴, se apresenta como uma hiperpigmentação epidérmica pelo aumento da melanogênese na superfície da pele e em casos menos frequentes pode haver depósito de melanina em derme⁸.

O melasma se manifesta em ambos os sexos³⁴, porém é mais prevalente em mulheres do que em homens²³. Pode estar associado ao aumento do estresse oxidativo⁴⁹, histórico familiar, exposição aos RUV, associação de diferentes medicações para terapia hormonal, uso de contraceptivos orais, mulheres em idade fértil ou em período gestacional e é mais frequente em pessoas com fototipos entre III e VI da classificação de *Fitzpatrick*^{50,51}. O clima também influencia no aparecimento dessa hiperpigmentação, regiões geográficas com maior exposição ao sol, com climas mais secos e quentes apresentam mais casos de melasma que em regiões com temperaturas mais amenas²⁴.

Devido ao seu envolvimento facial frequente, a hiperpigmentação apresenta impacto de redução da qualidade de vida dos pacientes⁵². Esse impacto associa-se ao sentimento de o indivíduo estar menos atraente e incomodado com a hiperpigmentação ao se olhar no espelho^{5,53,54}. Quando o tratamento de clareamento escolhido é muito agressivo, o melasma pode associar-se a uma hiperpigmentação pós-inflamatória, migrar pigmentos para a derme e gerar uma coloração ainda mais intensa^{6,10}. Para evitar o reaparecimento da hiperpigmentação, a orientação dada é de não expor a área acometida ao sol sem a devida proteção, evitar locais que ofereçam mais calor, procurar acompanhamento de um médico para verificar os níveis hormonais e corrigi-los quando necessário e cuidar da pele com cosméticos clareadores para controlar a pigmentação⁸.

1.1.1.3 Hiperchromia pós-inflamatória

As hiperchromias pós-inflamatórias são uma consequência de resíduos de processos inflamatórios que acometem a epiderme e a derme. Essas inflamações podem ser derivadas de queimaduras, cirurgias, dermatites ou acne vulgar. São consideradas alteração secundária ao processo inflamatório⁵⁵. Essa hiperchromia resulta da ação de diversos fatores, como ET-1, mediadores inflamatórios IL-1 α ou IL-1 β , EROs e oxido nítrico (NO) que agem estimulando a melanogênese³⁷.

O tratamento de hiperchromia pós-inflamatória comumente é feito por substâncias clareadoras e com atividade de afinamento da pele^{15,56}. Essas hiperchromias são confundidas com o melasma e a melanose solar. Para identificar a natureza da lesão, é necessário uma investigação do histórico e hábitos de vida do indivíduo para, então, definir qual o tipo da hiperchromia⁵⁷.

1.1.1.4 Melanose solar

A melanose solar é uma mancha senil, provocada pelo acúmulo de radiação solar ao longo da vida. Está dentre as alterações cutâneas mais comuns a partir dos 50 anos de idade, juntamente com as queratoses seborreicas². Na faixa dos 90 anos de idade, a melanose solar está entre a queixa secundária de dermatoses mais prevalente⁵⁸.

Para tratar essas hiperchromias a terapia precisa ser mais intensa. Pelo fato de se originarem por efeitos cumulativos de exposição ao sol geralmente situam-se em profundidade de derme, o que as torna difícil de tratar com cosméticos tópicos. Para alcançar a profundidade dessa lesão, terapias mais agressivas são utilizadas, tais como peelings químicos profundos e Laser de CO² fracionado, que necessitam geralmente ser associadas aos cosméticos com atividade cicatrizante, anti-inflamatória e calmante para evitar manchas pós-inflamatórias no local da lesão⁵⁹.

1.1.1.5 Efélides

As efélides, também conhecidas como sardas, são hiperchromias com coloração levemente avermelhadas ou castanho-claras⁶¹, estão associadas a fatores

genéticas, são potencializadas com a exposição aos RUV e apresentam-se mais intensas no verão^{60,61}. O número de efélides varia de poucas unidades a centenas de manchas que se estendem da face para o colo e braços⁶². O tratamento com substâncias clareadoras auxiliam na redução dessa hiperpigmentação, porém o uso de fotoproteção é indispensável para diminuir o escurecimento e surgimento de novas efélides¹.

1.1.2 Tratamento para hiperpigmentações

A fotoproteção é primordial nos casos de prevenção das hiperpigmentações⁶². Porém, quando a hiperpigmentação já se faz presente, existem tratamentos disponíveis para sua redução, em geral visam as seguintes ações:

- Inibição de tirosinase⁶³;
- Inibição de NO e EROs⁶³;
- Inibição da formação da melanina⁶³;
- Remoção de melanina pré-formada³²;
- Remoção de queratinócitos pigmentados³²;
- Inibição de formação dos melanossomos³⁹;
- Alteração na estrutura dos melanossomos³⁹;
- Degradação de melanossomos³⁹;
- Redução do transporte de grânulos de melanina³⁹;

Os tratamentos são classificados em físicos e químicos. Dentre os físicos estão o *peeling* de diamante ou de cristal, *laser*⁶ e luz intensa pulsada (LIP)⁵⁹, equipamentos que buscam a remoção da melanina pré-formada ou a degradação seletiva de pigmento. Os tratamentos químicos são compostos por *peelings* químicos e fórmulas farmacêuticas de uso tópico com incorporação de ativos, que buscam tanto a remoção da melanina já depositada quanto a inibição da formação de pigmento^{6,64}. Os ativos mais utilizados possuem ação antioxidante, despigmentante, clareadora, fotoproteção e nos casos de peles ressecadas ativos hidratantes, umectantes e emolientes se fazem necessários para a eficácia do tratamento⁶⁵.

Dentre os tratamentos químicos, diferentes fórmulas farmacêuticas são utilizadas, desde cremes, géis, sérums, loções até formas mais elaboradas com o intuito de aumentar a permeação dos ativos, denominadas de máscaras. As máscaras são aplicadas com uma camada mais espessa e os ativos incorporados a essa

formulação ficam expostos a pele de 15 a 20 minutos, após esse período o produto é removido com água^{21,66}.

Devido aos contínuos estímulos endógenos e exógenos recebidos, no caso das hiperpigmentações os ativos precisam estar disponíveis por mais tempo na pele, geralmente, necessitando de reaplicações. Porém, alguns despigmentantes possuem efeitos colaterais evidentes, o que faz com que sua reaplicação não seja indicada¹⁰. Os principais problemas já identificados são a toxicidade dos ativos ao melanócito, irritação e aumento da sensibilidade da pele, além de comumente possuírem potencial carcinogênico⁹. Com o intuito de minimizar esses riscos, a associação de ativos antioxidantes e clareadores de pele está sendo utilizada na região acometida pela hiperpigmentação^{63,67}.

1.1.2.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas responsáveis pela redução do estresse oxidativo. O sistema antioxidante cutâneo é composto por substâncias enzimáticas e não-enzimáticas. Os antioxidantes enzimáticos que se destacam são a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Entre os antioxidantes não-enzimáticos estão o betacaroteno, vitaminas A, C e E, a melatonina (responsável pelo relógio biológico e pela indução da síntese de glutathione peroxidase) e o estradiol (possui atividade semelhante à da vitamina E)⁶⁸.

O mecanismo de ação do sistema antioxidante da pele funciona em sinergia. A SOD consegue converter a $ERO\ O_2^-$ em H_2O_2 , prevenindo os danos que poderiam ser causados por esse radical⁷⁰. Imediatamente após essa reação, a enzima CAT faz a decomposição do H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2) resultando em duas moléculas de água, uma de glutathione oxidada (GOX) e uma de produto correspondente (PRC) que não possui atividade tóxica⁶⁹ (Figura 2).

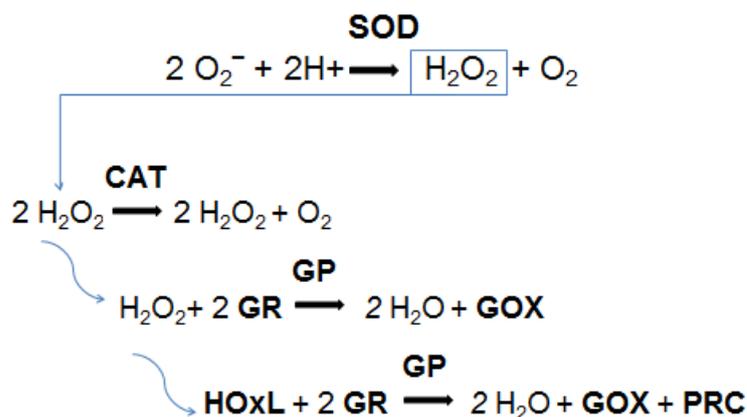


Figura 2 – Esquema ação antioxidante endógena. 1) Dismutação de radical oxigênio (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por ação da superóxido dismutase (SOD). 2) Ação da catalase e glutatona na decomposição do H_2O_2 . Ação da glutatona peroxidase (GP), glutatona reduzida (GR), hidroperóxido lipídico (HOxL), resultando em transformação de duas moléculas de água (H_2O), uma de glutatona oxidada (GOX) e produto de redução correspondente (PRC).

Fonte: Adaptado de Guaratini et al⁶⁹.

Os antioxidantes endógenos nem sempre estão em quantidade suficiente para contornar o estresse oxidativo produzido por agressões exógenas, fazendo-se necessária a reposição de antioxidantes através de alimentos ou cosméticos com ativos para essa finalidade⁷⁰. As atividades antioxidantes externas são encontradas mais frequentemente em extratos de plantas com alto teor de polifenóis, flavonoides e vitaminas. Dentre elas estão *Syzygium cumini* (nome popular jambolão)⁷¹, *Origanum majorana* (nome popular manjerona)⁷², *Hymenaea stigonocarpa* (nome popular jatobá)⁶³.

Os polifenóis se caracterizam por compostos fenólicos com atividade antioxidante elevada, dentre eles estão os flavonoides, que apresentam interação no processo de clareamento da pele¹⁵. O mecanismo de ação dos compostos fenólicos se dá através da inibição não competitiva da tirosinase, e sua atividade antioxidante está relacionada a sua estrutura química, no qual a presença de anel benzênico associado a grupos de hidroxilas em estrutura cíclica agem doando átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando radicais livres (RL) em substâncias estáveis. Assim, os compostos fenólicos apresentam propriedades de redução do estresse oxidativo e atividade quelante de metais⁷³.

Pelo fato de extratos ricos em polifenóis proporcionarem atividade quelante de metais, esta atividade pode ter auxiliado na inibição da tirosinase através da

quelação do íon cobre, precursor da ativação da enzima tirosinase no processo de produção de melanina⁶³.

O uso de antioxidantes no tratamento de hiperpigmentações vem sendo empregado com o intuito de inibir a tirosinase de forma não competitiva e assim, inibir o processo de formação de melanina em diferentes fases, reduzindo a oxidação de DOPA, diminuindo a atividade da tirosinase e a oxidação de cisteinildopa^{8,15,34,74}. A associação dos antioxidantes com despigmentantes se mostra eficaz no clareamento de hiperpigmentações⁵⁶.

1.1.2.2 Despigmentantes

Agentes despigmentantes agem como redutores da atividade da tirosinase³². Essa inibição pode ser reversível ou irreversível. A reversível pode ser do tipo não competitivo ou competitivo. Os competitivos possuem características similares a do substrato, competem com ele na ligação com a enzima e impedem a formação do produto, porém dependendo da quantidade de enzima e substrato no tecido eles não são muito eficazes. Quanto mais substrato, mais ativo competitivo reversível se faz necessário⁷⁵.

O não competitivo reversível não compete com o substrato. Ele precisa da ligação do substrato com a enzima, nesse caso, ele só funciona com quantidades suficientes de substrato. O inibidor irreversível se liga no sítio ativo da enzima irreversivelmente formando ligações covalentes e pode destruir grupos funcionais importantes, pode ser progressivo até determinada concentração atingindo a inibição máxima da enzima⁷⁵.

O princípio ativo com finalidade despigmentante utilizado com mais frequência no tratamento das hiperpigmentações é a hidroquinona (HQ) (Figura 3). A HQ é conhecida como um dos inibidores mais eficazes de melanogênese⁷⁶.

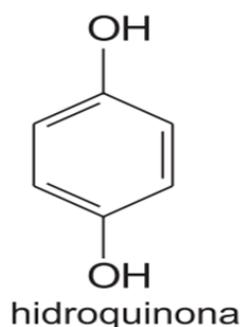


Figura 3- Molécula de hidroquinona.

Fonte: Assalin e Silva⁷⁷.

Para iniciar o processo de melanogênese é necessária a hidroxilação de L-tirosina, quando se expõe a HQ em relação a tirosina, elas competem e a HQ em concentrações suficientes prevalece ligando-se na enzima tirosinase e impede a ligação com o substrato tirosina, não permitindo que haja formação de pigmentos nos melanócitos ativos⁷⁸. Após ligar-se a enzima, a HQ se oxida e apresenta-se ao tecido em formato tóxico. Por isso, o uso excessivo da HQ pode induzir ao aparecimento de hipocromias (ausência de cor), aumentar a sensibilidade da pele, provocar manchas pós-inflamatórias e estimular o aparecimento de ocronose exógena (mancha cinza escuro)¹⁰.

Devido aos riscos proporcionados pela HQ, outros ativos estão sendo utilizados para o clareamento de manchas. Entre eles está a arbutina, que pode atuar em diferentes fases da formação do pigmento⁷⁹.

1.1.2.2.1 Arbutina

A arbutina é um β -D-glucopiranosídeo natural com estrutura semelhante à hidroquinona (Figura 4). É um dos principais constituintes da planta *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-ursi) e é encontrada em quantidades significativas em *Origanum majorana* (manjerona)¹⁴.

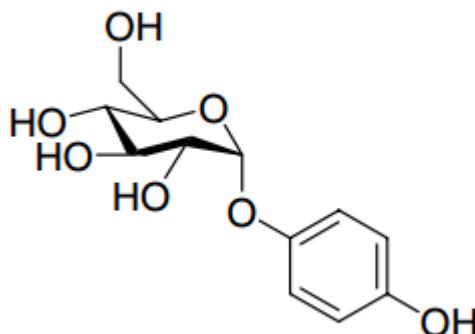


Figura 4- Estrutura química de arbutina: (hidroquinona-O- β -D-glucopiranosídeo), formada pela junção de uma molécula de glucose com hidroquinona.

Fonte: Wang e colaboradores⁸⁰.

Possui atividade despigmentante pela inibição da tirosinase desde o início da formação do pigmento até a maturação da eumelanina. A arbutina se mostra mais vantajosa por ser uma molécula estável e não ser tóxica após reagir com a enzima^{12,33,81,82}, ao invés de ser citotóxica age como citoestática, inibindo a hidroxilação da tirosina e a atividade de DOPA oxidase da tirosinase⁸³. Por isso é utilizada como substituta da HQ nos tratamentos de hiperpigmentações^{67,79}. Enquanto a HQ possui capacidade de interferir no processo inicial da diferenciação do melanócito até a formação da melanina, a arbutina não provoca diferenciação da estrutura da célula, apenas suprime elevações da tirosinase⁸⁴.

1.1.3 *Origanum majorana*

A planta *Origanum majorana* é conhecida popularmente como manjerona, manjerona-doce, manjerona verdadeira (Figura 5). Espécie da família das Lamiaceae (L.) é uma planta herbácea nos climas nórdicos, apresenta-se com folhas verde-claras de aroma agri-doce e flores brancas ou púrpuras, sua altura varia de 15 a 60 cm e cresce em forma de touceiras⁸⁵. Cresce naturalmente no Egito, países do Mediterrâneo Oriental e pode ser cultivada na Europa do Norte e países com clima tropical. As partes da planta utilizadas com maior frequência em estudos são as folhas, flores e óleo essencial¹³.



Figura 5- Planta *Origanum majorana*⁸⁶.

A planta *Origanum majorana* apresenta concentração considerável de arbutina^{13,14} e é rica em fenóis, um dos grupos mais importante de antioxidantes naturais. Dentre os compostos fenólicos presentes nessas ervas aromáticas, destacam-se os flavonoides e tocoferol, sendo que suas concentrações no óleo essencial ou extrato da planta podem variar dependendo das formas de extração⁸⁷.

A caracterização química de *Origanum majorana* mostra diferentes concentrações de substâncias em seus extratos e óleos essenciais^{87,88}. O Quadro 1 apresenta alguns percentuais da concentração de substâncias presentes nos extratos e óleos essenciais da planta.

Quadro 1 - Concentração de substâncias predominantes na planta *Origanum majorana*. (continua)

Substância	Porcentagem %	Forma analisada	Referências (AUTOR, ano)
Terpinen-4-ol	38,40	Óleo essencial	Vera, Chane-Ming, 1999 ⁸⁸ .
	3,6	Óleo essencial	Sarer, Scheffer, Svendsen, 1982 ⁸⁷ .
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	14,95	Óleo essencial	Vera, Chane-Ming, 1999 ⁸⁸ .
	1,6	Óleo essencial	Sarer, Scheffer, Svendsen, 1982 ⁸⁷ .
p-Cymene	7,01	Óleo essencial	Vera, Chane-Ming, 1999 ⁸⁸ .
<i>γ</i> -Terpinene	6,89	Óleo essencial	Vera, Chane-Ming, 1999 ⁸⁸ .
Linalool	76,6	Óleo essencial	Sarer, Scheffer, Svendsen, 1982 ⁸⁷ .

Flavonóides*	0,53	Extrato	Vági et al, 2005 ⁷² .
Taninos*	6,45	Extrato	Vági et al, 2005 ⁷² .
Polifenóis*	11,66	Extrato	Vági et al, 2005 ⁷² .
Arbutina	4	Extrato	Lukas et al, 2010 ¹³
	3 à 6	Extrato	Lamien-meda et al, 2009 ¹⁴

*Estudo não apresentou análise das substâncias isoladamente.

Fonte: Adaptado pela autora, 2018.

O extrato dessa planta é utilizado na farmacologia com diferentes finalidades, dentre elas a ação antifúngica⁸⁹, antibacteriana⁹⁰ e antioxidante⁹¹, também é utilizado como especiaria culinária, mostrando-se eficaz na redução de oxidação de alimentos em concentração de 0,25%⁹¹. A espécie *Origanum* se mostra eficaz na inibição da enzima tirosinase^{92,93}, acredita-se que por ser rica em arbutina a *Origanum majorana* também possa apresentar essa ação.

Devido às concentrações consideráveis de arbutina^{13,14} e substâncias antioxidantes^{72,91}, o uso do extrato de *Origanum majorana* em formulações cosméticas poderá apresentar resultados significativos nos tratamentos de hiperpigmentações. A atividade do extrato ainda poderá ser potencializada em associação com formulações com capacidade de incremento da hidratação cutânea com a tecnologia da forma farmacêutica de géis formadores de filme.

1.1.4 Hidratação cutânea

O processo de hidratação natural da pele ocorre durante o processo de diferenciação celular na epiderme, no qual os queratinócitos basais sofrem a redução de aproximadamente 80% de seu peso original, caracterizando essa redução principalmente pela perda de água presente dentro das células⁹⁴. Ao chegarem na superfície da epiderme as células se tornam anucleadas e achatadas e se sobrepõem compondo a camada córnea, sem líquido em seu interior²¹.

A epiderme está em constante renovação, eliminando células da camada córnea na medida em que há diferenciação dos queratinócitos basais¹. A eliminação das células da camada córnea ocorre quando estruturas responsáveis pelo aumento da coesão entre os queratinócitos (desmossomos) são desligados das membranas celulares através da ação de enzimas proteolíticas⁹⁴. As enzimas fazem a quebra da filagrina (proteína ligada aos desmossomos) e esta proteína degradada forma o fator natural de hidratação (FNH). Além do FNH, a hidratação cutânea está diretamente

relacionada com a presença de lipídeos intercelulares, juntos eles formam o manto hidrolipídico^{21,95}. O manto hidrolipídico é responsável pela manutenção da barreira cutânea, protegendo o organismo de agressões exógenas⁹⁴.

Quando a pele está desidratada as células ficam agrupadas em blocos, formando rugosidades na superfície da epiderme com aparência de formatos geométricos, podendo apresentar também descamação em blocos, ficando visível o processo descamativo e a pele pode apresentar aparência xerótica quando observadas com microscopia⁹⁶. Quanto maior o espaço formado entre estes grupamentos, maior a desidratação do tecido⁹⁴.

Um fator que pode influenciar na permeação de ativos na pele é a hidratação cutânea reduzida, quanto mais ressecadas estiverem as células e a matriz extracelular da camada córnea da epiderme, menor será a difusão dos ativos aplicados sobre a pele, fazendo com que estes ativos fiquem mais concentrados na camada córnea e com que não atinjam as camadas adjacentes⁹⁷.

A remoção ou a alteração da estrutura dos lipídios intercelulares do estrato córneo pode também danificar os desmossomos, reduzindo a barreira de proteção epidérmica e modificando a permeabilidade da pele⁹⁷. Este efeito também pode reduzir a coesão dos corneócitos e diminuir a formação do FNH da pele⁹⁸.

Para que os ativos dermocosméticos permeiem a pele, são desenvolvidas formulações que apresentem afinidade com a barreira cutânea⁹⁷. Geralmente são utilizados agentes promotores de oclusão, emolientes, umectantes e óleos biocompatíveis com baixo peso molecular para facilitar a permeação dos ativos^{21,66,99}. A presença de óleos essenciais na formulação pode aumentar a permeação dos ativos na pele, devido suas características lipofílicas se associarem com os lipídeos presentes na barreira cutânea e na matriz extra-celular¹⁸.

Além dessas características, estão sendo desenvolvidas formas de permeação dos ativos através da oclusão cutânea²¹. Os géis formadores de filme fazem oclusão na pele e influenciam no aumento da permeação de ativos na pele com uma taxa de difusão muito mais rápida e com continuidade de liberação do ativo por mais tempo¹⁰⁰.

1.1.5 Géis formadores de filme

Os géis formadores de filme são formulações que têm sido utilizadas em cosméticos e produtos farmacêuticos de uso tópico por seus efeitos de melhora da permeação dos ativos e por apresentarem características de fácil aplicabilidade¹⁰¹. Além disso, possibilitam o controle da liberação dos ativos pelo veículo e a formação de filme sobre a pele¹⁰²⁻¹⁰⁴. Para a formação desses géis podem ser utilizados polímeros hidrofílicos, que quando incorporados apresentam características de aumentar a viscosidade nas preparações¹⁰³.

Para que o produto seja aceito pelo consumidor final algumas características devem ser alcançadas quanto ao comportamento do produto sob a pele, dentre elas estão:

- Tempo de secagem dos filmes;
- Manutenção da integridade da pele;
- Formação de oclusão;
- Bioadesão;
- Aparência estética com filmes finos e transparentes;
- Propriedades mecânicas adequadas; (aplicação fácil, permissão de movimentos do corpo/pele, fácil remoção)¹⁰⁵.

Para desenvolvimento de filmes finos de uso dermatológico para entrega de ativos são utilizados diversos polímeros. Dentre eles o poli vinil pirrolidona (PVP) e o poli álcool vinílico (PVA)¹⁰¹. Algumas propriedades e principais finalidades de uso estão apresentados na Quadro 2.

Quadro 2 - Propriedades físico/químicas e principais finalidades de uso dos polímeros Poli vinil pirrolidona (PVP) e o Poli álcool vinílico (PVA) (continua)

	PVP	PVA
Propriedades:	ampla gama de solubilidade, não iônico, coadjuvante de mucoadesão, propriedades altas de absorção de água	pó granular com coloração branco à creme; solúvel em água; sintético; não-iônico; propriedades mucoadesivas moderadas
Finalidades de uso	formação de película junto com PVA; maior flexibilidade	filmes muito flexíveis; muito utilizado em preparações

	de películas; em diferentes proporções com outros polímeros possibilita o controle de liberação de fármacos.	oftalmológicas; alongamento mais alto em relação aos valores de ruptura ¹⁰¹ .
--	--	--

Fonte: Adaptado de Karki e colaboradores¹⁰¹.

Esses polímeros podem ser utilizados em forma de blenda polimérica, que se caracterizam pela junção de dois ou mais polímeros que interagem apenas de forma secundária, sem a presença de ligações covalentes entre as moléculas¹⁰⁰. Nessas blendas podem ser acrescentados polímeros cristalinos (moléculas organizadas paralelamente, são mais duros e opacos) e/ou amorfos (moléculas ficam organizadas entrelaçadas, geralmente são transparentes) formando estruturas semi-cristalinas (junção das propriedades dos cristalinos com amorfos)^{106,107}, que permitem que as características desejáveis dos produtos sejam alcançadas, dentre elas a capacidade de dissolução rápida ou permanência prolongada no local de administração, biocompatibilidade, não toxicidade, estabilidade e carga dos fármacos adequada^{103,104,108,109}.

Os géis formadores de filme estão classificados como sistemas matriciais de liberação de ativos. Nesse sistema os ativos são incorporados dentro da formulação, juntamente com os polímeros, solventes e plastificantes. Suas propriedades se modificam de acordo com concentração de polímeros e temperatura utilizada para a produção das formulações¹¹⁰⁻¹¹².

Para que o cosmético com base de gel formador de filme tenha boa atratividade cosmética, precisa apresentar um tempo de secagem de aproximadamente 5 minutos. Bem como formar filmes finos e transparentes que tenham propriedades mecânicas adequados para terem bioadesão e mesmo assim serem removidos da pele sem apresentar lesões na pele e nem apresentar rompimento do filme.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar atividade hidratante e despigmentante de um GFF com extrato de *Origanum majorana* rico em polifenóis e arbutina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar o extrato de *Origanum majorana*;
- Desenvolver formulação de GFF contendo extrato de *Origanum majorana*;
- Analisar o tempo de secagem de formulações com diferentes concentrações de polímeros formadores de filme com e sem extrato de *Origanum majorana*;
- Identificar se a adição de extrato de *Origanum majorana* modifica o pH e viscosidade da base polimérica do GFF.
- Identificar se a adição de extrato de *Origanum majorana* modifica as propriedades mecânicas do filme formado
- Investigar o efeito hidratante do GFF contendo extrato de *Origanum majorana*;
- Investigar o efeito despigmentante em pele humana do GFF contendo extrato de *Origanum majorana*;
- Identificar reações adversas em pele humana e sua associação com o uso do GFF contendo extrato de *Origanum majorana*.
- Identificar satisfação dos voluntários em relação a aplicabilidade do GFF contendo extrato de *Origanum majorana*.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

A pesquisa é classificada quanto ao nível como descritiva, quanto à abordagem como quantitativa e quanto ao procedimento como experimental. Foi dividida em três etapas, sendo a primeira, a de produção e caracterização do extrato de *Origanum majorana*, a segunda, o desenvolvimento de uma formulação contendo polímeros formadores de filme para incorporação do extrato realizadas no laboratório do grupo de pesquisa Tecnologia Farmacêutica – TECFARMA, localizado na Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, Tubarão/SC.

A terceira etapa consiste na avaliação da atividade hidratante e despigmentante da formulação desenvolvida. Foi realizada no Laboratório de Cosmetologia e Estética, localizado no bloco C (Policlínica) da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, no município de Tubarão/SC. O fluxograma do estudo está na Figura 6.

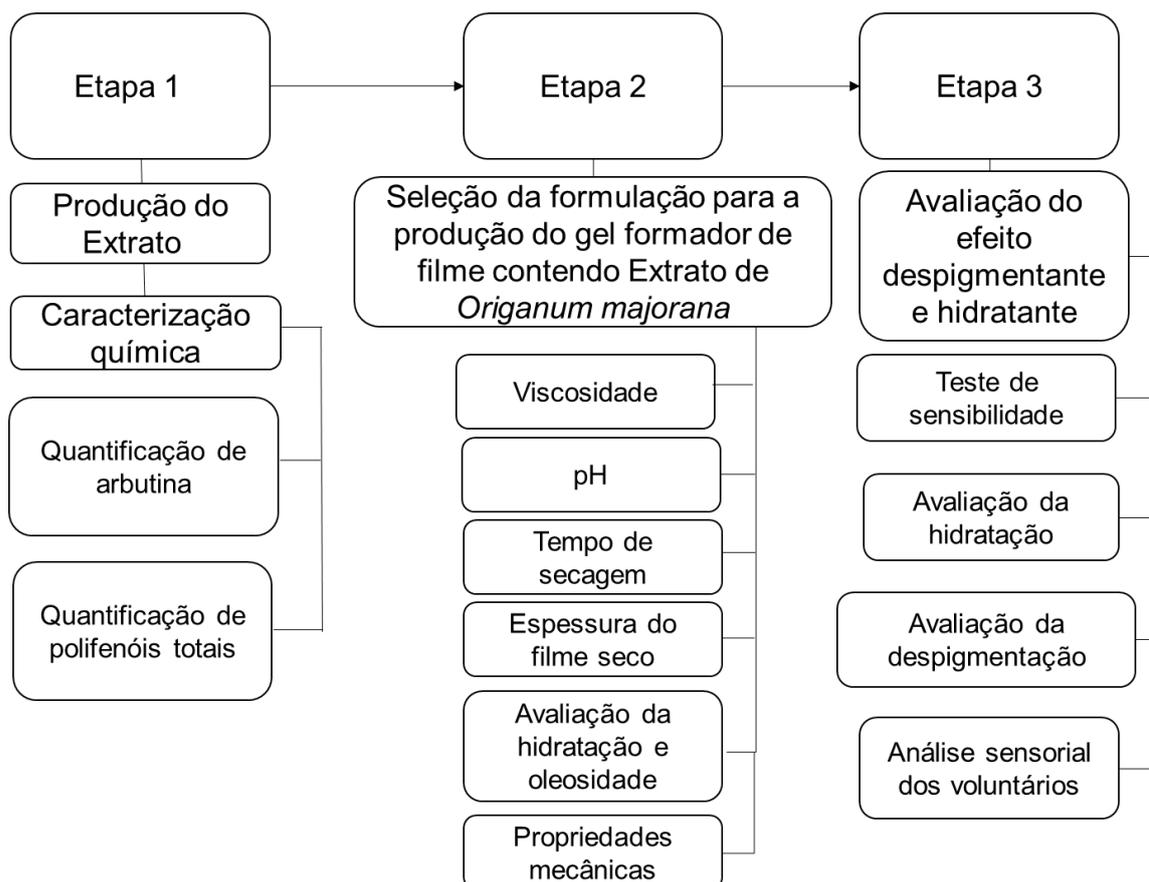


Figura 6 - Fluxograma do delineamento do estudo.

3.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO DE *Origanum majorana*

3.2.1 Produção do extrato

A planta seca *Origanum majorana* foi adquirida da empresa Estação dos Grãos Ltda., as folhas secas foram moídas em um liquidificador e tamisadas, selecionando as partículas ≤ 850 micrômetro (μm) para a preparação do extrato.

Foram pesados 500g da planta seca moída e tamisada, em seguida foram separadas 100 g. Para a extração foram preparados 500g de solução extratora (etanol:glicerina:água;8:1:1). Para a extração foram utilizadas 500g de solução extratora com 100g de planta seca e tamisada, totalizando massa de 600g. A planta seca foi mantida em contato com o líquido extrator por um período de 24 horas em agitador (Heidoph®). Em seguida foi realizada uma filtração sob pressão reduzida por utilizando filtro da marca Unifil®, com espessura de 0,16mm, gramatura de 80g/m² e velocidade de filtração DIN 53137(s):20-25, o etanol utilizado foi evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40°C por 3 horas (Banho Dubhnoff DB-100®). Foram adicionadas 0,25% de conservante Neolone PE®, seguido de agitação por 2 minutos em agitador magnético Fisatom® e reservado o extrato em um frasco de vidro âmbar¹¹³.

3.2.2 Caracterização química do extrato

3.2.2.1 Teor de polifenóis totais

Para a quantificação do teor de fenólicos foi utilizado metodologia descrita na literatura, segundo a qual 1 mL de solução da amostra foi adicionada em balão volumétrico e diluída com água destilada para 50 mL. Em seguida 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu foi adicionado e os conteúdos do frasco foram misturados. Após 3 minutos, foram adicionados 3 mL de Na₂CO₃ (2%) e a mistura foi deixada em repouso durante 2 minutos. A absorvância foi medida a 760nm em espectrofotômetro. As concentrações de compostos fenólicos totais nas amostras foram determinados como mg equivalente de ácido gálico usando equação obtida a partir curva de calibração de

ácido gálico padrão: Absorvância = 0,0053 × Total de fenóis [Ácido gálico equivalente (mg)] - 0,0059¹¹⁴.

3.2.2.2 Teor de arbutina

A arbutina foi quantificada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O sistema cromatográfico utilizado foi um Shimadzu A10, detector UV-visível, fase móvel água:metanol:HCL0,1M (90:9:1), coluna C18 sub-3, comprimento de onda 275nm, temperatura 35°C e fluxo de 1mL /min. O cálculo das concentrações dessas substâncias no extrato foi realizado pela construção das curvas de calibração padrão preparadas na faixa de 30 à 50µg/mL. O método foi previamente validado¹¹³.

3.2.2.3 pH

Para determinação do pH do extrato as análises foram realizadas diretamente no produto. Todas as análises foram realizadas em triplicata com o equipamento *Bel engineering W3B pH meter*® previamente calibrado com solução tampão de pH 7 e 4. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

3.3 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COM POLÍMERO FORMADOR DE FILME

3.3.1 - Seleção da concentração de polímero formador de filme para produção do gel contendo o extrato

Com o objetivo de definir qual a melhor concentração de material polimérico para formação de filme foram estudadas formulações contendo a relação PVA/PVP (40:60 %). Os polímeros foram pesados e adicionadas ao solvente (água), mantidos em agitador magnético por 6 horas com aquecimento a 90°C. Após este período foram adicionados a formulação o plastificante o glicerol, e ao final do preparo da formulação foi adicionado como tensoativo o Olivem 400®. Foram estabelecidas para os testes 3 diferentes concentrações poliméricas de acordo com o quadro 1.

Quadro 3 – Composição das formulações testadas no estudo.

	Formulação		
	F14	F16	F18
PVA (%)	5,6	6,4	7,2
PVP (%)	8,4	9,6	10,8
Glicerol (%)	2,8	3,2	3,6
Água (%)	83,2	80,6	78,4
Olivem 400® (%)	0,2	0,2	0,2

Os géis produzidos foram caracterizados em função da sua viscosidade, pH capacidade de formar filmes, bem como o tempo de secagem e a capacidade de hidratação imediata.

3.3.2 Viscosidade

A viscosidade dos géis foi determinada em viscosímetro rotativo Visco Star R (Fungilab, Barcelona) utilizando spindle tipo R3 com agitação inicial de 50 rpm a temperatura de 25°C.

3.3.3 pH

Para determinação do pH dos géis formadores de filme amostras foram diluídas na proporção 1:10 em água de osmose reversa. Todas as análises foram realizadas em triplicata com o equipamento *BEL engineering W3B pH meter*® previamente calibrado com solução tampão de pH 7 e 4. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

3.3.4 Tempo de formação do filme

A determinação da formação do filme foi feita utilizando teste visual de adaptação da metodologia descrita por Shoeder e colaboradores¹⁰⁵. Foi aplicado o

GFF sob uma superfície de vidro com divisórias paralelas com diferentes espessuras. Para a aplicação do produto na placa foi utilizado uma pipeta volumétrica para gotejamento do gel no vidro e utilizada outra placa de vidro para espalhamento. A quantidade de produto aplicada por milímetros quadrados (mm^2) foi mensurada através do peso da placa antes e imediatamente após a aplicação do produto. A placa foi mantida com temperatura de 30 ± 2 °C durante o tempo de acompanhamento da secagem do produto e consequente formação do filme.

O tempo de secagem e formação do filme foi verificado com o auxílio de uma lâmina de vidro seca (LVS). A cada 10 segundos foi apoiado a LVS sob a placa com o produto, sem fazer pressão no gel e removida em seguida. Após remoção da LVS, foi verificado a existência ou não de material líquido aderido a LVS com auxílio de papel toalha. O filme foi considerado formado e seco quando a LVS não apresentou material líquido após ser apoiada sob o gel.

Após verificar a quantidade de massa do filme que foi aplicada na placa, foi feito uma média da massa aplicada por centímetro quadrado da placa com a finalidade de utilizar a mesma massa para a verificação do tempo de secagem do filme na pele de voluntários. Para quantificar o tempo de secagem do filme na pele foi utilizado o mesmo processo com a LVS, citado anteriormente.

Foi realizado um ensaio prévio para a determinação de tempo de secagem do produto na pele utilizando o mesmo processo do teste de tempo de secagem do produto no vidro. Foram aplicadas massas semelhantes às utilizadas nas placas de vidro. A coleta dos dados foi feita em triplicata.

3.3.5 Espessura dos filmes

As espessuras dos filmes formados foram mensuradas com micrômetro manual *Outside micrometer*[®] OM-25 (0-25x0.001mm). Foram marcados 4 pontos para mensuração da espessura dos filmes formados nas placas de vidros, e mensurados os 4 pontos sem a aplicação do produto. Após a formação do filme na placa de vidro foram coletados nos mesmos pontos previamente marcados no vidro, obtendo o resultado equivalente a espessura do vidro somado a espessura do filme. Para determinar a espessura do filme, foi subtraído o valor da espessura da placa de vidro de cada ponto de medição.

3.3.6 Fotos e microscopia

As fotos e microscopias dos filmes bem como da pele foram capturadas utilizando câmera digital de 12 MP do celular Iphone 7® e Microscópio Digital Eletronic Magnifer®. Para o ajuste da aplicação da imagem feita pelo microscópio, foram feitas as regulagens do equipamento utilizando uma régua que serviu como escala para as microscopias.

3.3.7 Hidratação e oleosidade cutânea

Para selecionar a formulação a ser incorporado foram realizados testes de hidratação e oleosidade cutâneas proporcionadas pelos filmes imediatamente após a remoção do filme formado com diferentes massas aplicadas. O objetivo foi verificar se a quantidade aplicada é suficiente para produzir certa oclusão e alteração do manto hidrolípido. Para o teste foi utilizado um termômetro digital *ScanTemp*® para o acompanhamento da temperatura de pele (no mesmo ponto localizado na região central da área, antes da aplicação e após a remoção do filme) e o equipamento *Skin analyser*®, o qual determina a quantidade de água e óleo presentes na pele através da velocidade e força da passagem de correntes galvânicas pelo tecido. Para mensurar a hidratação e oleosidade, o equipamento foi apoiado sobre a pele na mesma região antes da aplicação do filme, e um minuto após a remoção do filme formado, em três pontos antes da aplicação e após a remoção do filme, representados na Figura 7.



Figura 7- Métodos de acompanhamento da hidratação e oleosidade cutâneas. Letras significam: A- Marcação da área para aplicação do filme; B- equipamento *Skin analyser*®; C- Termômetro digital.

3.4 PRODUÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO EM ARBUTINA

Para seleção da formulação a ser incorporado o extrato de *Origanum majorana* foi estabelecido que a formulação que apresentasse menor tempo de secagem, aliado a capacidade de produzir um aumento da hidratação da pele imediatamente após a retirada do material bem como tivesse uma adequada espalhabilidade na superfície da pele seria a escolhida.

Desta forma, para adicionar o extrato na formulação final selecionada foram utilizadas as mesmas quantidades de glicerol das formulações utilizadas nos testes, ajustando-se a quantidade de extrato no GFF de acordo com a quantidade de glicerol disponível no extrato.

A formulação final selecionada foi então caracterizada em relação a tempo de secagem, viscosidade, capacidade de hidratação de acordo com o descrito nos itens 3.3.2 ao 3.3.7 e comparada com a formulação isento do extrato para verificar se os componentes da formulação proporcionaram modificações destas propriedades. Além disto, foi determinado as propriedades mecânicas dos filmes formados.

Para o acompanhamento da variação da hidratação e oleosidade foram feitos testes de acompanhamento durante 12 horas após a remoção do filme. Para este teste o filme foi mantido em contato com a pele durante 6 horas e foram coletados dados referentes a hidratação logo após a remoção do filme, após 15, 30 minutos, 1,2,4 e 12 horas. A temperatura da sala foi mantida em 24°C e umidade do ar em 75%, para a manutenção do ambiente climatizado foram utilizados umidificador de ar, ar-condicionado e termo higrômetro, durante as coletas.

3.4.1 Caracterização mecânica

Para determinar as propriedades mecânicas do filme, estes foram formados sobre placas de vidro em triplicata e, após a secagem, foram removidos e analisados em equipamento de tensão deformação EMIC DL 2000® (Emic, Brasil). Foram utilizadas peças retangulares com medidas de 1 x 6 cm dos filmes contendo ou não o extrato de *Origanum majorana*. Foram obtidos os parâmetros de módulo da elasticidade, deformação e tensão máxima na ruptura.

3.5 ESTUDO CLÍNICO PARA VERIFICAÇÃO DO EFEITO HIDRATANTE E DESPIGMENTANTE

3.5.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo experimental com abordagem quantitativa para determinar a capacidade de hidratação e despigmentação do gel desenvolvido contendo extrato de *Origanum majorana*. O estudo foi delineado para que cada voluntário recebesse em região pré determinada do antebraço esquerdo o gel sem o extrato e no antebraço direito o gel contendo o extrato. O estudo foi realizado no período entre 17 de julho de 2018 e 27 de agosto de 2018.

3.5.1 População em estudo e tamanho de amostra.

O cálculo amostral foi baseado na variação dos níveis de melanina total conforme equação demonstrada na Figura 6 considerando um erro alfa(α) de 5% (0,05) e beta(β) de 20% (0,20). Detecção de uma variância esperada(σ) de 50UA e a diferença esperada(d) de 10UA entre as médias da variável quantitativa estudada¹¹⁵.

$$n = \frac{(\alpha + \beta)^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$n = \frac{(0,05 + 0,20)^2 50^2}{10}$$

$$n = 15,625$$

Figura 8 – Equação tamanho de amostra

Fonte: Adaptado de Azevedo, 2008¹¹⁵.

3.5.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram considerados como critérios de inclusão:

- ambos os gêneros,
- idade acima de 18 anos,
- fototipo entre II e IV conforme classificação de Fitzpatrick,

- não estar gestante ou lactante,
- ausência de doenças de pele pré-existentes,
- não ter hipersensibilidade aos componentes da fórmula,
- não estar em tratamento com corticoide, vitamina A, retinóides, alfa-hidroxiácidos ou qualquer tipo de despigmentante,
- que não faça uso abusivo de álcool
- que não seja fumante
- Pele hígida.

Foram excluídos do estudo: mulheres que entrassem no período gestacional durante a pesquisa, início de algum dos parâmetros previstos pelos critérios de inclusão, esquecimento de uso do produto por cinco ou mais dias consecutivos, outras condições que não possibilitassem a continuidade na pesquisa e não comparecimento as datas estabelecidas para coleta de dados.

3.5.3 Recrutamento

Os voluntários foram recrutados através de mensagem eletrônica em redes sociais na internet e divulgação por meio de cartazes explicativos que foram distribuídos em locais próximos ao laboratório em que foram feitas as análises. Os interessados puderam entrar em contato com o pesquisador por e-mail e telefone disponibilizados nos anúncios.

Foi agendado dia, local e horário para explicação da pesquisa aos interessados, e apresentado um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para a participação no estudo (Apêndice A). Após retiradas as dúvidas referentes ao estudo e os interessados que concordaram participar do estudo preencheram e assinaram o TCLE foi verificado se eles se enquadram nos critérios de inclusão.

3.5.4 Testes de sensibilidade/alergenicidade do gel formador de filme contendo extrato de *Origanum majorana*

Para o teste de sensibilidade/alergenicidade ao GFF e ao GFF contendo extrato de *Origanum majorana*, foram aplicados os produtos no antebraço de

voluntários com pele íntegra. Foram verificados presença ou ausência de hiperemia, prurido, ardência e formação de bolhas na pele.

O acompanhamento da sensibilidade e alergenicidade dos produtos foi feito pelo registro fotográfico da área que recebeu a aplicação dos produtos e pelo relato dos participantes.

Não havendo sensibilização da pele em função do uso das formulações, os voluntários foram considerados elegíveis para o próximo teste que visou verificar a atividade despigmentante e hidratante do produto.

3.5.4.1 Intervenção teste de sensibilidade

Todos os voluntários receberam as orientações quanto ao modo de uso e um molde para identificar a região para a aplicação do produto, Figura 9. Os voluntários foram orientados a marcarem a área de aplicação dos produtos com caneta para que fosse sempre aplicado na mesma região.

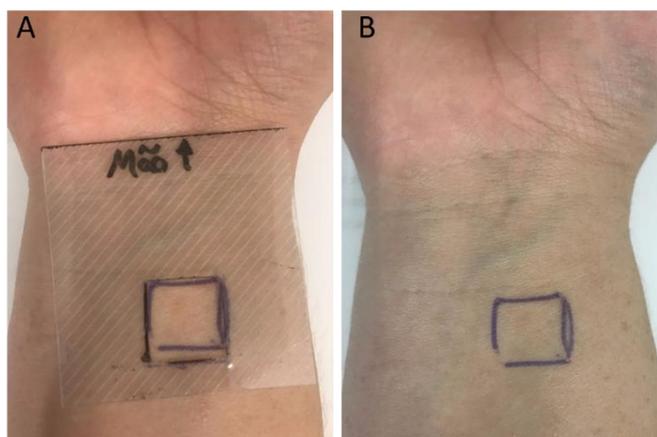


Figura 9- Molde para a aplicação do produto no teste de sensibilidade e alergenicidade cutânea. Letras significam: A – Molde posicionado na linha formada pela dobra do punho mais próxima da mão; B- Marcação com caneta da região para reaplicação do produto.

O produto foi aplicado em pele íntegra e sem a presença de hiperemias na região que recebeu a aplicação dos produtos. Além da formulação que foi utilizada para os testes, todos os participantes receberam um protetor solar com FPS 30 para

utilizar durante a pesquisa em caso de exposição solar da região tratada sem proteção física (roupa com manga comprida).

Foi feito o teste de sensibilidade com a metodologia do Teste aberto de aplicação repetida (TAAR): os voluntários utilizaram o produto na pele, na região volar (antebraço) por um período de 7 dias, duas vezes por dia, com orientação de cessar o uso em caso de lesão dermatológica. O tempo de leitura foi de 30 minutos para a primeira leitura, e o os demais com 24 horas de intervalo. A interpretação das reações foi considerada positiva para lesão em caso de a pele apresentar edema acompanhado de eritema ou de vesículo-pápulas¹¹⁶.

Os voluntários foram orientados de que em caso de ocorrência de alguma reação antes de completarem as 24 horas, o produto deveria ser imediatamente removido com água corrente e os pesquisadores deveriam ser comunicados para providenciar os devidos cuidados e passar as orientações pertinentes ao controle da reação.

Não foram conduzidos teste de sensibilidade ao protetor solar FPS30, pois foram utilizados produtos comerciais com registro na ANVISA, consequentemente autorizados para uso contínuo.

3.5.5 Avaliação da atividade despigmentante e hidratante do gel formador de filme contendo extrato de *Origanum majorana*

3.5.5.1 Intervenção

Foram retiradas fotografias sempre com o mesmo ângulo, distância e iluminação nos tempos 7 e 37 com e sem a tabela de classificação de tonalidade cutânea (Apêndice B), utilizada como auxiliar dos registros fotográficos para a classificação da coloração da pele conforme classificação de fototipo cutâneo (escala de *Fitzpatrick*), para descrição dos voluntários.

Todos os voluntários receberam as orientações quanto ao modo de uso e outro molde para identificar a região para a aplicação do produto. O voluntário permaneceu com a palma da mão virada para baixo com a região do antebraço apoiada sobre uma superfície reta fazendo ângulo de 90° no cotovelo. A mesma

orientação de marcação da pele com caneta dada para o teste de sensibilidade foi dada nesta fase do estudo, para que os voluntários sempre aplicassem o produto na mesma região.

O molde serviu como guia para indicar o local para aplicação do produto e para mensurações de hidratação, oleosidade e pigmentação cutâneas. O molde apresentou formato triangular, a cliente foi posicionada com o antebraço totalmente apoiado sob uma superfície reta, com a palma da mão para baixo. A base do triângulo foi posicionada logo acima das protuberâncias ósseas ulna e rádio. Foi selecionada uma área de 3cm² para a aplicação do produto na região medial do antebraço conforme Figura 10.



Figura 10- Molde confeccionado para a aplicação do produto no teste de variação de hidratação e pigmentação cutânea. Letras significam: A- Molde confeccionado aplicado com a base posicionada nas protuberâncias ósseas (ulna e rádio) próximas da mão; B- Coleta de dados referentes a pigmentação; C- Marcação da área para aplicação do produto.

A quantidade de produto aplicada sobre a pele foi determinada conforme resultados prévios de formação de filme, sendo selecionadas para a aplicação de 2 gotas do produto em uma área de 3cm², equivalendo à aplicação de 5mg/cm².

A aplicação dos produtos foi feita 10 minutos após a limpeza da pele no período noturno, durante o período de 30 dias. Após a formação do filme o produto ficou exposto na pele entre 6 e 8 horas consecutivas, e posteriormente foi removido com água. Quando o voluntário não fosse utilizar roupas com mangas longas, foi

orientado o uso de protetor solar FPS 30 no local para evitar interferência na pigmentação cutânea.

Nos dias marcados para a coleta das variações de hidratação e pigmentação cutâneas, os voluntários foram orientados a estar com a pele livre de produtos e sujidades, fazendo a lavagem da região com água 1 hora antes da coleta dos dados para a primeira coleta. Para a coleta após 30 dias de uso do produto, o voluntário foi orientado a remover o produto da pele 5 horas antes da coleta e lavar a pele 1 hora antes da coleta dos dados.

As coletas de hidratação e oleosidade cutâneas foram coletadas com o equipamento *Skin analyser*[®], em três pontos da região em que foi aplicado o produto, sendo 0,5, 1,5 e 2,5 cm a partir da lateral do molde. Para as medidas de hidratação da pele em particular, a presença de pelos corporais pode interferir com o contato entre o sensor e a pele, o que pode influenciar os valores medidos⁹⁸, por isso foi feito afastamento dos pelos antes de acoplar o eletrodo do equipamento para não haver erro na coleta.

Para as coletas de pigmentação cutânea foi utilizado o equipamento *Soft plus – Skin analysis System Callegari*[®] em seis pontos na região em que foi aplicado o produto em 0,25, 0,75, 1,25, 1,75, 2,25 e 2,75 cm do molde.

As microscopias foram feitas no último dia de coleta, sendo registradas as imagens da área da pele localizada a um centímetro de distância da lateral externa da marcação da área que recebeu a aplicação das formulações e no centro da área delimitada para a aplicação do produto.

Após o término das coletas referentes ao uso das formulações F16 e F16OM, os voluntários foram questionados em relação a autopercepção cutânea e sobre as facilidades/dificuldades da aplicabilidade do produto, bem como sobre características relacionadas ao odor das formulações.

O questionário de auto percepção cutânea (Apêndice C) serviu para verificar como os voluntários perceberam a pele em relação a textura, maciez, ressecamento, hidratação, oleosidade e coloração. Ao final da pesquisa as pontuações dadas pelos voluntários foram analisadas para verificar se houve diferença em relação a percepção da pele. Enquanto que o questionário de avaliação do uso do produto (Apêndice D) serviu para que o participante informasse características relacionadas a facilidades/dificuldades na aplicabilidade, textura, atratividade cosmética das formulações e relatasse a frequência de uso.

3.6 FONTE FINANCIADORA

Esta pesquisa foi realizada com financiamento próprio dos pesquisadores.

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 4 – Apresentação das variáveis do estudo.

Variável	Classificação	Tipo	Proposta de utilização
Concentração arbutina no extrato de <i>Origanum Majorana</i>	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão
Inibição de DPPH	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão
Concentração de Polímeros	Dependente	Quantitativa contínua	%
Tempo de formação de filme	Dependente	Quantitativa contínua	Minutos
Melanina	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão
Hidratação	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão
Oleosidade	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão
Reações adversas relacionadas ao produto	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão
Presença ou ausência do Extrato de <i>Origanum Majorana</i> no gel	Independente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão
Propriedade mecânica	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados coletados foram cadastrados em banco de dados com auxílio do software *Microsoft Excel 2010*. A análise estatística foi feita com o software *Microsoft Excel 2010* e com o *Origin 8.0*. Para a apresentação dos dados das variáveis quantitativas de desenvolvimento da formulação foram aplicados os testes estatísticos

de ANOVA seguido de teste *Turkey* em caso de distribuição normal. Para o estudo clínico, foi utilizado o teste T *Student* pareado, que compara os valores das amostras através de média e desvio padrão dos resultados. Quanto ao nível de significância foi de 95%.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Sul de Santa Catarina e seguiu os critérios apresentados na Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde. Após receber parecer de aprovação do projeto sob número de parecer: 2.666.154 e CAAE: 87650718.7.0000.5369, foi feito o recrutamento dos indivíduos que tiveram interesse em participar do estudo. Os voluntários tiveram autonomia em participar ou não do estudo, sendo que o aceite foi dado mediante assinatura do TCLE. O ensaio clínico apenas foi realizado após comprovação de segurança do produto que foi feita para verificar sensibilidade/alergenicidade do produto. O voluntário foi orientado para que em caso de qualquer intercorrência durante o estudo, avisasse os pesquisadores por meio de contato telefônico ou e-mail disponibilizado no TCLE, para que estes o encaminhassem para acompanhamento médico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Na Tabela 1 estão observar a caracterização do extrato de *Origanum majorana*.

Tabela 1: Caracterização do extrato de *Origanum majorana*.

		(%)
Arbutina (mg/mL)	17,6±0,11	1,76±0,01
Polifenóis totais (mg/mL)	223 ± 14,1	22,3 ± 1,4
pH	4,54±0,01	

Os resultados mostram que o extrato apresenta concentrações de arbutina próxima a quantidade encontrada em estudos anteriores com metodologia semelhante para a produção do extrato rico em arbutina^{13,113}. Por ser rico em polifenóis, o extrato apresenta atividade antioxidante, e conseqüentemente por ser antioxidante pode influenciar no clareamento da pele de forma não competitiva com a enzima tirosinase¹⁵.

4.2 - DESENVOLVIMENTO DE GEL FORMADOR DE FILME POLIMÉRICO

4.2.1 Seleção da formulação formadora de filme para a incorporação do extrato

Os resultados referentes a viscosidade e pH das formulações do GFF com diferentes concentrações de polímeros estão na Tabela 2.

Tabela 2– Dados referentes a viscosidade e pH das formulações.

	FORMULAÇÃO		
	F14	F16	F18
Viscosidade (cP)	333,3±20,8 ^a	816,7±23,1 ^b	8023±106,9 ^c
pH	5,5±0,01 ^a	5,5±0,02 ^a	5,5±0,02 ^a

^{a, b} letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) determinada por ANOVA seguido de teste Tukey.

A viscosidade do produto aumentou significativamente de acordo com o aumento da concentração de polímeros na formulação de 14 para 18%. Em relação ao pH não foi observada diferença significativa. A concentração de PVA e PVP em solução modifica a viscosidade do produto devido suas propriedades reológicas de forma não homogênea. Soluções mais concentradas favorecem interações intercadeias resultando em um aumento da viscosidade, podendo também, conduzir a uma ordenação na solução e conseqüente modificação do comportamento reológico, fato que explica porque a viscosidade passa de 816 para 8023 cp quando a concentração dos polímeros muda de 16 para 18%¹¹⁷.

A concentração de polímero afeta a viscosidade mas também a espessura do filme formado após secagem. No caso de uso dermatológico esta característica é importante pois a oclusão é necessária para acelerar a permeação dos ativos na pele^{18,118}. Os resultados da variação da espessura do filme formado sobre placa de vidro em função da massa aplicada por área das diferentes formulações estudadas estão na Figura 11.

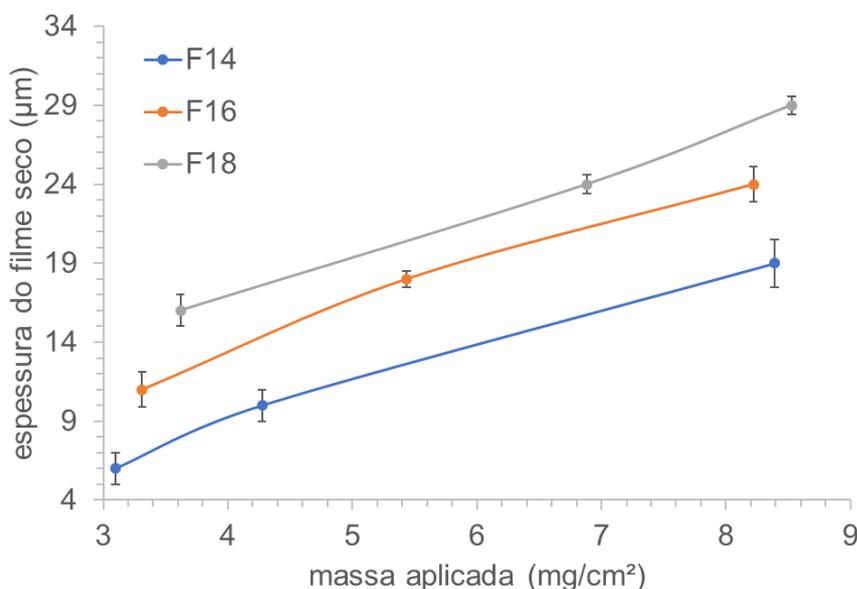


Figura 11- Formulações F14, F16 e F18 aplicados em diferentes massas, resultando em diferentes espessuras de filme seco.

Os resultados demonstram que para todas as formulações a espessura do filme aumenta proporcionalmente de acordo com o aumento da quantidade de massa aplicada por área. Um aumento proporcional também é observado com o aumento da concentração de polímero. O uso de produtos formadores de filme na área dermatológica exige que o tempo para secagem e formação desta película não seja

muito longo, pois isto dificultaria adesão ao uso do produto¹¹⁹. Na Figura 12 estão apresentadas as variações do tempo de secagem em função da massa aplicada por área das formulações testadas.

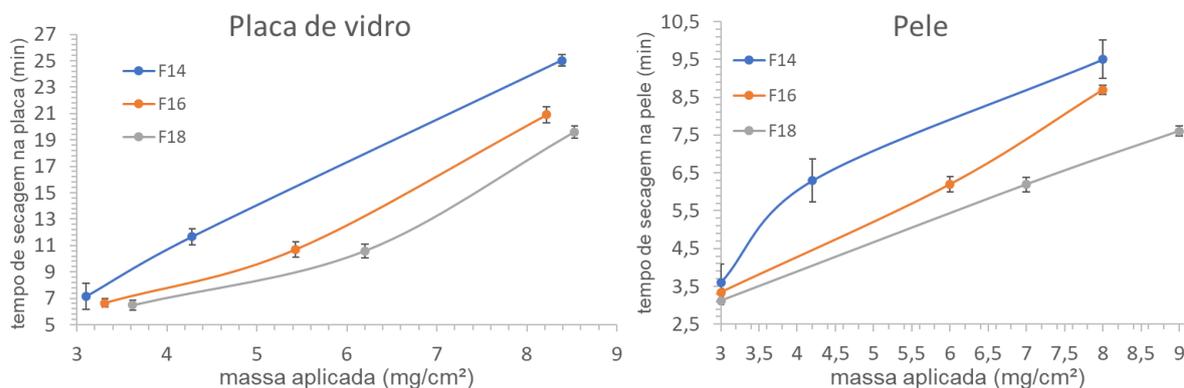


Figura 12- Variação do tempo de secagem em função da massa de formulação aplicada por área.

Pode-se observar uma tendência linear de aumento do tempo de secagem em função da quantidade de massa aplicada por área tanto quando aplicado na placa de vidro como na pele. Comportamento esperado, já que maior quantidade de material aplicada exige maior tempo para evaporação do solvente e formação do filme. Entretanto, o aumento da concentração de polímeros na formulação resulta em uma redução do tempo de secagem tanto na placa de vidro como na pele. Na Tabela 3 estão apresentados a velocidade de secagem ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{min}$) das formulações.

Tabela 3- Velocidade de secagem ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{min}$) das formulações F14, F16 e F18.

	Velocidade de secagem ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{min}$)		
	FORMULAÇÃO		
	F14	F16	F18
Placa de vidro	0.29	0.33	0.35
pele	0.85	0.93	1.33

Os estudos conduzidos na placa de vidro foram realizados em temperatura de 30 ± 2 °C, enquanto os estudos de secagem na pele foram realizados em temperatura média da pele de 33 ± 1 °C. Os resultados demonstram que a velocidade de secagem na pele foi aproximadamente 3 vezes superior do que na placa de vidro. Comportamento que pode ser explicado pela temperatura superior mas também por que ocorre difusão do solvente para a pele acelerando o processo de secagem¹²⁰.

O aumento da velocidade de secagem com o aumento das concentrações de polímero pode ser explicado pelo aumento de substâncias sólidas totais nas formulações, e conseqüente redução de quantidade do solvente. Desta forma existe uma menor quantidade de solvente para evaporar refletindo na redução do tempo da secagem do produto.

A formação de uma película de material polimérico sobre a pele pode alterar a as características do manto hidrolipídico e a espessura do filme está diretamente associada a este fato¹²¹.

A variação da hidratação e oleosidade da pele de voluntário imediatamente após a secagem e retirada de filmes produzidos com diferentes massas aplicadas estão apresentados na Figura 13.

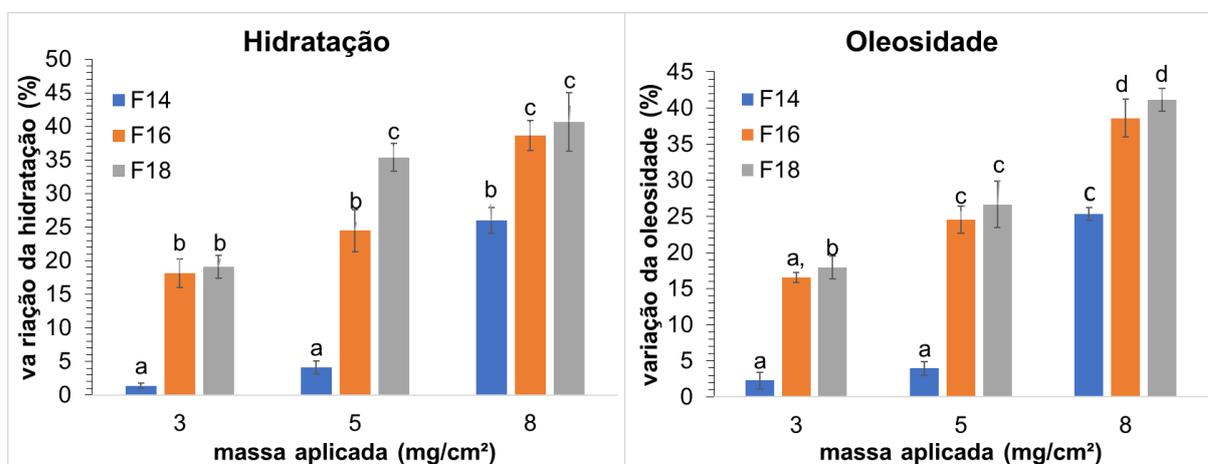


Figura 13- Hidratação e Oleosidade cutânea obtidas 1 minuto após a remoção do filme formado pela aplicação de diferentes massas das formulações F14 contendo 14%, F16 com 16% e F18 com 18% de polímeros. (a,b letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) determinada por ANOVA seguido de teste Tukey).

A hidratação e oleosidade que formam o manto hidrolipídico cutâneo aumentaram conforme o aumento da massa dos filmes aplicados. A formulação F14 com menor concentração de polímero quando aplicados até 5 mg/cm² de gel apresentam uma baixa capacidade de aumentar hidratação e oleosidade imediata. Entretanto, o aumento para 8 mg/cm² produz um significativo incremento desta propriedade. Pode-se observar que as formulações F16 e F18 tiveram comportamentos semelhantes em relação ao incremento de hidratação e oleosidade cutânea quando aplicadas em diferentes massas, apresentando diferença apenas na hidratação da pele com a massa de 5mg/cm².

Filmes com menores concentrações de polímeros tiveram menor capacidade de manutenção do manto hidrolipídico, proporcionando menor hidratação e oleosidade. Estes efeitos de incremento de hidratação e oleosidade estão relacionados com o efeito de oclusão produzidos pelos filmes, mostrando que quanto maior a massa aplicada e maior a espessura do filme formado conseqüentemente elevando a hidratação e oleosidade cutâneas no tecido¹²¹.

Além dos efeitos de hidratação da pele, foram levados em consideração o sensorial e facilidade da aplicação dos produtos para a escolha da formulação em que foi adicionado o extrato. Em relação a formulação F14 foi observado que ao gotejar o produto sobre a pele, o mesmo escorria, dificultando a espalhabilidade homogênea na pele, comportamento explicado pela reduzida viscosidade desta formulação. Por esta razão, e pelo fato de necessitar de maiores massas aplicadas por área para proporcionar uma oclusão da pele, esta formulação não foi considerada adequada para a incorporação do extrato. Em relação a formulação F18, a alta viscosidade dificultou o espalhamento na superfície da pele e apresentou um sensorial desagradável devido a formação de uma camada muito espessa na superfície da pele. A formulação F16 apresentou boa espalhabilidade, e não escorreu pela pele após o gotejamento, em relação a espessura do filme seco, a formulação F16 não proporcionou desconforto durante a exposição do filme sobre a pele. Além disto, com a aplicação de massas de 3 mg/cm² já foram observados efeitos sobre a hidratação, indicativos de que oclusão era alcançada.

De acordo com Schroeder (2007)¹⁰⁵ o tempo de secagem do GFF para ser considerado com uma boa atratividade pode ser classificado como ideal (<5 min), aceitável (5-7 min), e ruim (>7 min). Baseado nesta classificação podemos afirmar que a formulação F16 obteve classificação de tempo de secagem ideal com a formação de um filme mais fino do que a F18.

4.2.2 Gel formador de filme contendo *Origanum majorana*

Para a definição da quantidade máxima do extrato que poderia ser incorporado na formulação foi levado em consideração a quantidade de glicerol no extrato produzido para que ficasse equivalente a quantidade de glicerol testada na elaboração da base do GFF em ensaios prévios. Desta forma foi possível incorporar

6,4 % de extrato que gerou uma formulação contendo 1,1 mg/g de arbutina. Na Tabela 4 estão as formulações F16 e F16 com incorporação do extrato de *Origanum majorana* (F16OM).

Tabela 4- Composição das formulações F16 e F16OM.

	FORMULAÇÃO	
	F16	F16OM
PVA (%)	6,4	6,4
PVP (%)	9,6	9,6
Glicerol (%)	3,2	-
Extrato de <i>Origanum majorana</i> a 17 mg/mL de arbutina (%)	-	6,4
Água (%)	80,6	77,4
Olivem 400® (%)	0,2	0,2
Optiphem (%)	0,2	0,2

A viscosidade e o pH da formulação F16 e F16OM estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Dados referentes a viscosidade e pH das formulações com e sem a adição do extrato.

	FORMULAÇÃO	
	F16	F16OM
Viscosidade (cP)	816,7±23,1 ^a	841,7±2,89 ^b
pH	5,5±0,02 ^a	5,3±0,01 ^b

^{a, b} letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) determinada por ANOVA seguido de teste Tukey.

Após a adição do extrato na formulação foi observado um pequeno mas significativo aumento da viscosidade e uma redução significativa no pH da formulação. O aumento da viscosidade pode estar associado a presença de componentes químicos do extrato que aumentam o teor de sólidos totais na formulação. Além disto o pH foi reduzido pois o extrato puro apresenta pH mais ácido que a formulação base. O pH usual de arbutina para efeitos despigmentantes é de 5 a 8, o extrato desenvolvido apresentou pH levemente mais baixo que o usual, porém, ao adicionar o extrato na formulação do GFF o pH foi estabilizado acima de 5, correspondendo ao usual para arbutina em cosméticos²¹. Entretanto, o pH final está dentro de uma faixa aceitável para aplicação na pele²¹.

Na Figura 14 estão apresentados frascos contendo as formulações produzidas bem como os filmes gerados com este material.

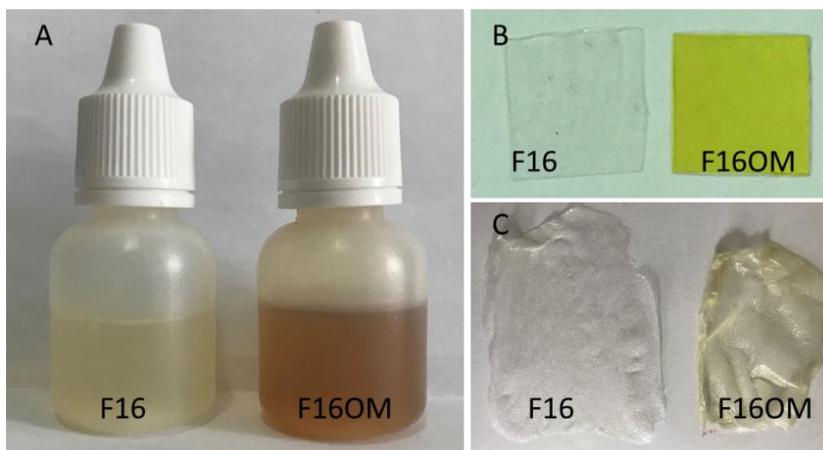


Figura 14- Formulações F16 (sem extrato) e F16OM (com extrato de *Origanum majorana*), apresentadas em frasco de envasamento (A), filme formado removido da placa de vidro (B), filme formado removido da pele (C).

A formulação F16 apresentou características de coloração levemente amarelada, enquanto que a formulação com extrato de *Origanum majorana* apresenta-se com coloração levemente marrom devido a incorporação do extrato. Após secagem na placa de vidro o filme da formulação F16 apresenta-se incolor enquanto que a F16OM apresenta coloração amarelada. Após remoção do filme formado na pele pode-se observar uma coloração levemente amarelada migrando para coloração marrom na formulação F16OM e incolor na formulação F16.

Em relação ao odor das formulações, após a adição do extrato pode-se identificar um odor característico da planta, associado ao fato de que o *Origanum majorana* é considerado uma planta aromática rica em óleos aromáticos voláteis^{87,88,122}.

4.2.3 Tempo de secagem

O tempo de secagem das formulações F16 e F16OM foram comparados e apresentados na Figura 15.

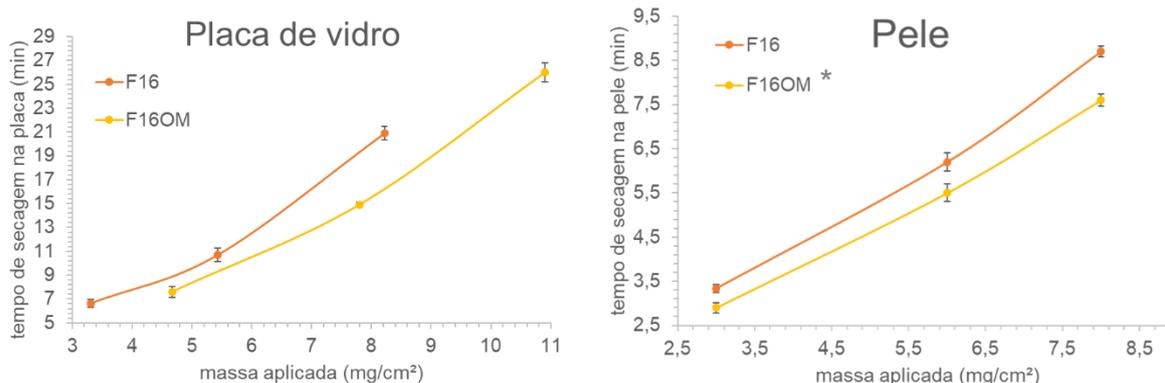


Figura 15- Formulações F16 e F16OM apresentando o tempo de secagem em função a massa aplicada por área da placa de vidro e da pele. (*) Diferença significativa do tempo de secagem.

A Figura 15 mostra uma tendência linear no aumento do tempo de secagem em função da massa aplicada para ambas as formulações tanto na secagem sobre placa de vidro bem como na superfície da pele. Indicativo de que a adição de extrato não proporcionou grande modificações nestas propriedades. A velocidade da secagem das formulações F16 e F16OM estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Velocidade de secagem (mg/cm²/min) das formulações contendo 16% de polímeros sem e com a adição do extrato de *Origanum majorana*.

	Velocidade de secagem (mg/cm ² /min)	
	FORMULAÇÃO	
	F16	F16OM
Placa de vidro	0,33	0,33
pele	0,93	1,06

Os resultados de regressão linear da quantidade de massa aplicada por área em função do tempo de secagem, demonstram que a quantidade de material seco por minuto é a mesma para ambas formulações quando secas sobre o vidro. Porém quando aplicados sob a pele a formulação F16OM uma velocidade de secagem superior apresentando diferença significativa. Este fato pode ser explicado devido a presença de maior quantidade de substancias solidas derivadas do extrato presente na formulação.

A velocidade de secagem sobre a pele foi em torno de 3 vezes superior a velocidade de secagem no vidro. Este fato pode estar associado com a capacidade de absorção de água na camada mais superficial da epiderme e dissolução dos ativos para a pele¹²¹.

A incorporação de extratos em formulações formadoras de filme pode alterar as propriedades físico-químicas e mecânicas do filme gerado^{123,124}. Na Tabela 7 estão apresentados os resultados de elasticidade, deformação e tensão máxima para ruptura das formulações F16 e F16OM.

Tabela 7- Propriedades mecânicas de módulo de elasticidade, deformação máxima e tensão máxima para ruptura dos filmes formados com as formulações F16 e F16OM.

Formulação	Módulo de elasticidade (MPa)	Deformação máxima (%)	Tensão máxima (N)
F16	0,217±0,012 ^a	452,5±12,2 ^a	9,95± 0,15 ^a
F16OM	0,245 ±0,016 ^a	406,9±14,07 ^b	8,80±0,45 ^a

^{a, b} letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) determinada por ANOVA seguido de teste Tukey.

Os resultados demonstram que a adição do extrato nesta concentração não produziu alterações significativas no módulo de elasticidade bem como na tensão máxima dos filmes formados. Uma pequena redução significativa na deformação máxima foi observada, porém nada que pudesse tornar o filme com propriedade diferente na pele daquilo observado para formulação pura.

4.2.4 Efeito da aplicação das formulações sobre hidratação e oleosidade da pele

O comportamento de aplicação do filme sobre a pele de um voluntário bem como o efeito sobre a hidratação e oleosidade foi realizado previamente ao estudo clínico com objetivo de verificar como o material se comportava na pele e se este produziria algum efeito sobre a hidratação.

Na Figura 16 estão apresentadas as imagens obtidas por câmera fotográfica do filme formado sobre a pele no mesmo voluntário no dorso da mão direita e esquerda.

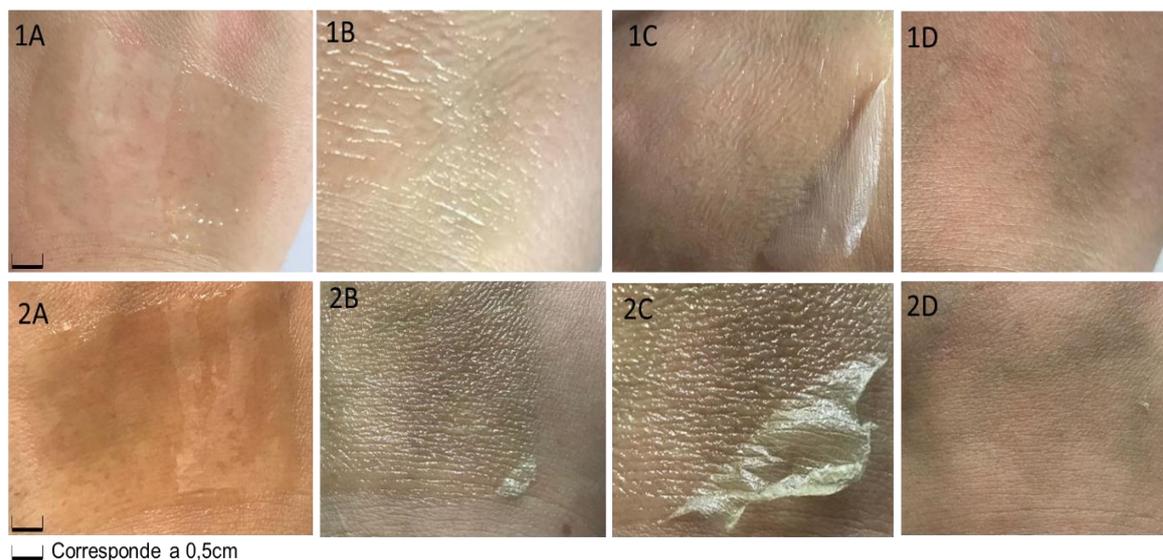


Figura 16- Fotografias feitas com câmera fotográfica. Os números significam: 1- formulação F16; 2- a formulação F16OM. As letras significam: A- filme recém aplicado sob a pele; B- filme seco sob a pele; C- remoção integral do filme seco sem ruptura; D- pele após remoção do filme.

Ambos os filmes apresentaram boa bioadesividade, porém puderam ser removidos completamente da pele, sem ocasionar ruptura do filme durante a remoção ou ocasionar alguma sensação desconfortável.

A Figura 17 mostra as fotografias feitas com o microscópio digital da pele antes da aplicação do filme e imediatamente após a remoção.

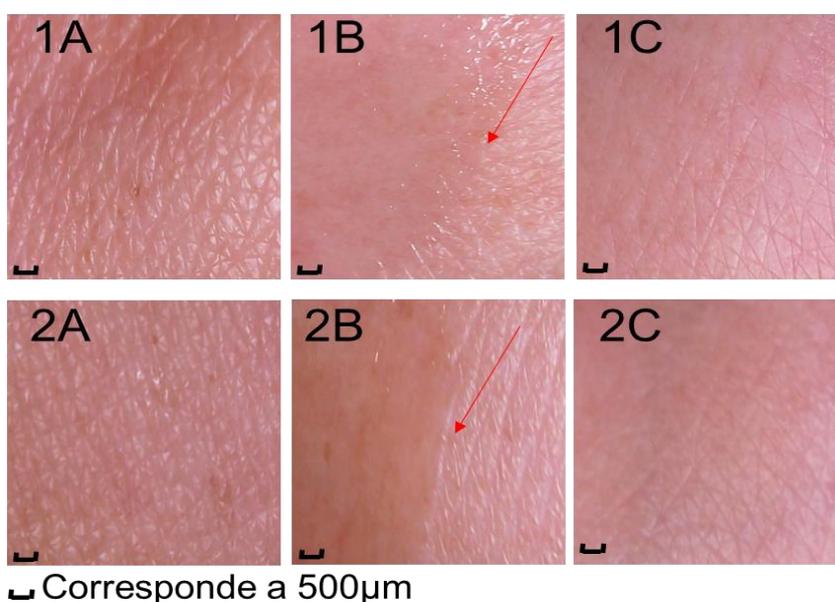


Figura 17- Fotografias feitas com microscópio digital. Os números significam: 1- formulação F16; 2- a formulação F16OM. As letras significam: A- pele antes da aplicação do produto; B- filme recém aplicado sob a pele com seta indicando presença do filme no lado esquerdo da figura e pele sem a presença do filme no lado direito da figura; C- pele após remoção do filme.

Após a remoção do filme seco pode-se observar uma modificação na estrutura da pele vista pelo microscópio digital reduzindo as rugosidades cutâneas. Este fato pode estar associado pelo efeito de oclusão do tecido e consequente redução da perda de água transepidérmica. Os corneócitos são considerados altamente hidrofílicos, apresentando facilidade na absorção de água na camada córnea da epiderme, isso é confirmado pela capacidade de modificação da hidratação cutânea⁹⁵. Isso influencia na redução das rugosidades cutâneas vistas em microscopia, pois ao absorver a água os corneócitos e a matriz extracelular inflam, deixando os espaços das rugosidades cutâneas menores⁹⁶.

O fator que pode ter influenciado no aumento da hidratação e oleosidade, é associado ao efeito de oclusão proporcionado pela formação dos filmes^{125,126}. A oclusão reduz a perda de água transepidérmica, aumentando a capacidade de hidratação cutânea¹²¹. Os ativos com capacidade de oclusão são utilizados em diversos dermocosméticos com a finalidade de hidratação cutânea e geralmente são associados a ativos umectantes e hidratantes¹²⁷. Este efeito umectante associado ao efeito oclusivo aumenta a capacidade de retenção da água no manto hidrolipídico¹²¹.

O efeito da aplicação do filme sobre a hidratação e oleosidade da pele foi verificado imediatamente após a retirada do filme e acompanhado durante 12 horas, com o objetivo de verificar o efeito residual de apenas uma aplicação. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

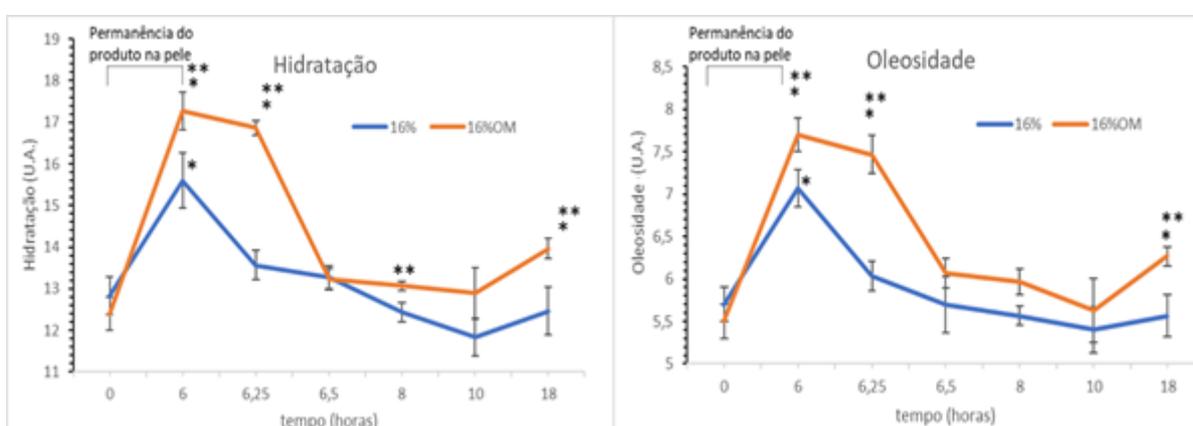


Figura 18- Hidratação e oleosidade cutâneas em função do tempo após remoção dos filmes da pele. Diferença significativa entre valor e tempo 0, correspondente aos valores antes da aplicação do produto (*). Diferença significativa entre os grupos (**).

Imediatamente após a remoção dos filmes houve um aumento significativo da hidratação e oleosidade cutâneas para ambas as formulações. Após

15 minutos da remoção dos filmes a formulação F16OM continuou com diferença significativa em relação a hidratação e oleosidade de antes da aplicação da formulação. Diferente disto, a formulação F16 começou a reduzir progressivamente seus valores de hidratação e oleosidade. Entre 30 minutos até 4 horas após a remoção do produto, houve uma redução da hidratação e oleosidade de ambas as formulações.

Após 12 horas da remoção do filme F16OM, a hidratação e oleosidade da pele voltou a aumentar significativamente. A formulação contendo extrato de *Origanum majorana* apresentou aumento significativo para hidratação e oleosidade ($p=0,013$ e $p=0,012$, respectivamente) quando comparados o tempo final de coleta com o valor anterior à aplicação do produto, enquanto que o filme sem o extrato não apresentou diferença ($p=0,57$ e $p=0,64$ respectivamente).

Os resultados demonstram diferença significativa entre as formulações testadas, prevalecendo o aumento de hidratação e oleosidade mais proeminente na formulação contendo extrato de *Origanum majorana* nos tempos de 15min, 2horas e 12 horas. A aplicação de óleos essenciais na pele proporcionam aumento da hidratação^{90,122}, fato que pode ter influenciado na manutenção e incremento das propriedades do manto hidrolipídico nos primeiros 15 minutos de acompanhamento da variação de hidratação e oleosidade cutâneas quando comparadas a formulação F16 e F16OM.

Fatores internos e externos podem interferir na aferição da hidratação da pele, tais como ventilação do ambiente, umidade relativa do ar, temperatura ambiente, estação do ano, além da transpiração por influências térmicas, físicas e emocionais⁹⁸. Levando em consideração a comparação da atividade hidratante das formulações com uma aplicação em ambiente com temperatura e umidade do ar controlados, a interação dos ativos do extrato na pele podem ter influenciado na melhora de hidratação da pele, visto que após 12 horas da exposição a formulação F16OM apresentou incremento de hidratação e oleosidade cutâneas, enquanto que a formulação F16 continuou com redução da hidratação e oleosidade.

Para a seleção da massa de formulação aplicada por área para o estudo clinico, foi selecionada a massa de $5\text{mg}/\text{cm}^2$ de formulação, que também é recomendada pela OCDE para estudos de absorção cutânea¹²⁸. Esta quantidade selecionada para a aplicação no estudo clinico também foi considerada suficiente para promover hidratação cutânea e apresentou tempo de secagem ideal, conforme descrito por Schroeder (2007)¹⁰⁵.

4.3 ATIVIDADE HIDRATANTE E DESPIGMENTANTE DO EXTRATO DE *Origanum majorana*

Ao todo foram selecionadas 16 voluntárias do sexo feminino, com idade de Idade $31,9 \pm 15,4$, das quais 8 apresentavam Fototipo II, 6 apresentavam Fototipo III e 1 voluntária apresentava Fototipo IV conforme classificação de *Fitzpatrick*.

O teste de sensibilidade foi realizado no período de 17 de julho de 2018 a 24 de julho de 2018. As voluntárias fizeram uso do produto na mesma região por 7 dias. Não houve relato de sensibilização ou geração de edema da pele em relação ao uso dos produtos e durante o tempo de uso não foram observadas alterações de sensibilidade na pele das voluntárias.

O teste de hidratação e despigmentação cutânea foi realizado no período de 24 de julho de 2018 à 27 de agosto de 2018. Houve uma exclusão após o início do teste de hidratação e pigmentação cutâneas por esquecimento de aplicação do produto por 6 dias consecutivos (Voluntária 9, 21 anos, Fototipo II).

4.3.1 Hidratação cutânea

Nas Tabelas 8 e 9 estão os resultados de variação de hidratação cutânea após uso das formulações F16 e F16OM consecutivamente.

Tabela 8- Variação da hidratação cutânea após 30 dias de uso da formulação F16.

Voluntários	Formulação F16			
	Hidratação antes (U.A)	Hidratação depois (U.A)	Variação (%)	P
1	11,23 \pm 0,51	13,60 \pm 1,93	21,07	0,102
2	11,03 \pm 0,12	12,20 \pm 0,46	10,57	0,033*
3	10,37 \pm 0,38	12,47 \pm 0,68	20,26	0,037*
4	10,47 \pm 0,35	12,23 \pm 0,45	16,88	0,018*
5	13,03 \pm 0,91	13,63 \pm 0,85	4,60	0,009*
6	14,47 \pm 0,74	16,10 \pm 0,62	11,29	0,162
7	10,83 \pm 0,31	12,07 \pm 0,64	11,38	0,051
8	10,83 \pm 0,50	12,57 \pm 0,45	16,00	0,066
10	10,27 \pm 0,45	12,97 \pm 0,32	26,30	0,013*
11	10,77 \pm 0,51	13,20 \pm 0,32	22,60	0,020*
12	10,23 \pm 0,38	12,70 \pm 0,20	24,10	0,030*
13	10,50 \pm 0,10	13,53 \pm 0,66	28,89	0,051
14	11,07 \pm 0,29	12,70 \pm 1,17	14,76	0,106

15	10,67±0,55	12,10±0,75	13,44	0,037*
16	11,93±0,64	14,67±0,52	22,91	0,023*
MEDIA±dp	11,18±0,79	13,12±0,8	17,67±5,65	
p	2,94308E-08**			

*Valores que representam diferença significativa quando comparado a hidratação da pele do voluntário antes e depois de 30 dias utilizando o produto. **Valor significa diferença significativa de aumento da hidratação da pele do grupo após 30 dias utilizando o produto.

Tabela 9– Variação de hidratação cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros com extrato de *Origanum majorana*.

Voluntários	Formulação F16OM			
	Hidratação antes (U.A)	Hidratação depois (U.A)	Variação (%)	p
1	9,90±0,70	11,63±0,25	17,51	0,023*
2	11,33±0,50	13,53±0,67	19,41	0,037*
3	10,63±0,32	12,47±0,67	17,24	0,012*
4	10,57±0,42	12,10±0,36	14,51	0,071
5	12,53±0,21	12,80±0,70	2,13	0,646
6	11,47±0,46	15,50±0,89	35,17	0,025*
7	11,00±0,17	14,30±0,36	30,00	0,002*
8	10,82±0,30	13,07±1,42	20,76	0,074
10	13,50±1,01	17,93±0,74	32,84	0,040*
11	11,80±0,70	13,27±0,45	12,43	0,033*
12	10,70±0,50	13,03±0,70	21,81	0,026*
13	10,70±0,10	13,13±0,86	22,74	0,043*
14	10,67±0,21	13,23±0,91	24,06	0,032*
15	10,93±0,64	12,20±0,35	11,59	0,019*
16	11,33±0,21	15,23±0,49	34,41	0,011*
MEDIA±dp	11,19±0,64	13,56±1,16	21,10±7,10	
p	1,26131E-06**			

*Valores que representam diferença significativa quando comparado a hidratação da pele do voluntário antes e depois de 30 dias utilizando o produto. **Valor significa diferença significativa de melhora da hidratação da pele do grupo após 30 dias utilizando o produto.

4.3.2 Oleosidade cutânea

Nas Tabelas 10 e 11 estão apresentados os resultados referentes a variação de oleosidade cutânea em função da aplicação da formulação F16 e F16OM respectivamente.

Tabela 10– Variação de oleosidade cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros.

Voluntários	Formulação F16			
	Oleosidade antes (U.A)	Oleosidade depois (U.A)	Variação (%)	p
1	4,83±0,12	4,90±0,10	1,38	0,529

2	6,40±0,52	7,43±0,35	16,15	0,170
3	4,83±0,06	5,40±0,35	11,72	0,077
4	4,80±0,10	5,43±0,25	13,19	0,042*
5	5,90±0,36	6,03±0,47	2,26	0,808
6	4,97±0,42	7,10±1,22	42,95	0,083
7	4,83±0,12	5,47±0,21	13,10	0,019*
8	4,70±0,17	5,50±0,36	17,02	0,035*
10	5,57±0,32	6,20±0,10	11,38	0,042*
11	4,80±0,26	5,90±0,10	22,92	0,024*
12	4,63±0,06	5,50±0,36	18,71	0,039*
13	4,67±0,06	5,77±0,25	23,57	0,019*
14	4,97±0,12	5,67±0,31	14,09	0,094
15	4,73±0,23	5,37±0,23	13,38	0,042*
16	4,97±0,76	6,23±0,25	25,50	0,068
MEDIA±dp	5,04±0,37	5,86±0,5	16,12±6,74	
p	0,00078512**			

*Valores que representam diferença significativa quando comparado a oleosidade da pele do voluntário antes e depois de 30 dias utilizando o produto. **Valor significa diferença significativa de melhora da oleosidade da pele do grupo após 30 dias utilizando o produto.

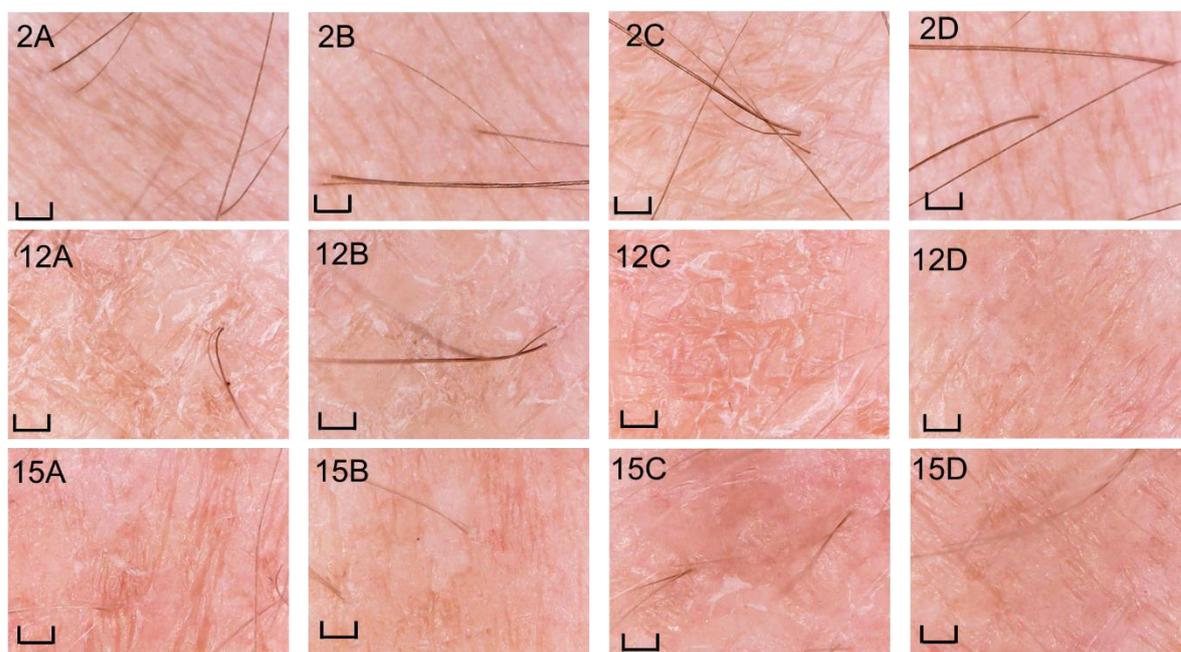
Tabela 11– Variação de oleosidade cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros com extrato de *Origanum majorana*.

Formulação F16OM				
Voluntários	Oleosidade antes (U.A)	Oleosidade depois (U.A)	Variação (%)	p
1	6,17±0,45	6,40±0,36	3,78	0,667
2	4,73±0,15	5,17±0,06	9,15	0,069
3	4,73±0,15	5,57±0,31	17,61	0,011*
4	4,77±0,23	5,47±0,31	14,69	0,149
5	5,60±0,10	5,70±0,30	1,79	0,678
6	5,13±0,23	6,93±0,42	35,06	0,028*
7	4,87±0,15	7,10±1,04	45,89	0,082
8	4,80±0,10	5,43±0,21	13,19	0,034*
10	5,77±0,25	6,33±0,21	9,83	0,003*
11	5,20±0,36	5,93±0,15	14,10	0,079
12	4,77±0,46	5,90±0,35	23,78	0,136
13	4,70±0,10	5,67±0,60	20,57	0,099
14	4,77±0,12	5,90±0,44	23,78	0,040*
15	4,97±0,45	6,17±0,32	24,16	0,102
16	5,03±0,12	6,00±0,26	19,21	0,008*
MEDIA±dp	5,07±0,34	5,98±0,41	18,43±8,44	
p	2,43328E-05**			

*Valores que representam diferença significativa quando comparado a oleosidade da pele do voluntário antes e depois de 30 dias utilizando o produto. **Valor significa diferença significativa de melhora da oleosidade da pele do grupo após 30 dias utilizando o produto.

Na Figura 19 estão imagens de microscopia óptica da pele das voluntárias 2, 12 e 15, em região cutânea que não recebeu a aplicação das formulações e regiões após 30 dias de uso das formulações. Os voluntários não tiveram efeito de remoção

da camada córnea da epiderme promovida pela retirada do filme, pois o filme foi removido com água, logo os resultados referentes a hidratação são promovidos pelo produto e não pela exposição de uma camada mais profunda da epiderme que naturalmente contém mais água.



└┘Corresponde a 500µm

Figura 19- Microscopia da pele das voluntárias 2, 12 e 15, em região cutânea que não recebeu a aplicação das formulações e regiões após 30 dias de uso das formulações. Letras significam: A- pele do antebraço esquerdo sem aplicação da formulação F16; B- pele do antebraço esquerdo após 30 dias de uso da formulação F16; C- pele do antebraço direito sem aplicação da formulação F16OM; D- pele do antebraço direito após 30 dias de uso da formulação F16OM.

Os resultados da Figura 19 demonstram que há redução da rugosidade cutânea após 30 dias de uso das formulações F16 e F16OM. A voluntária 2 apresentou maior variação de aumento da hidratação e oleosidade cutâneas que as voluntárias 12 e 15. A voluntária 12 apresentava áreas descamativas evidentes na pele sem a aplicação do filme, e as placas descamativas reduziram após o uso das formulações, porém a melhora do aspecto cutâneo é mais evidente na pele em que foi utilizada a formulação F16OM. O mesmo comportamento pode ser observado na pele da voluntária 15, porém a condição inicial da pele da voluntária 15 apresenta-se com menos descamações.

A hidratação do extrato córneo é modificada conforme modificações étnicas, idade e localização corporal¹²⁹. O aumento da hidratação da pele da

voluntária 2 foi superior que o aumento de hidratação das voluntárias 12 e 15 pode estar associado a idade das voluntárias (idades de 19, 54 e 51 respectivamente).

O glicerol que foi utilizado com plastificante da formulação para melhorar as características mecânicas do filme, é um ativo comumente utilizado em dermocosméticos com a finalidade de umectação da pele²¹. Pelo fato deste ativo ser utilizado como plastificante nas formulações do atual estudo, sua presença pode ter influenciado no incremento de hidratação e oleosidades cutâneas obtidas com a aplicação das formulações F16 e F16OM.

4.3.3 Despigmentação cutânea

Na Tabela 12 estão as variações de pigmentação cutânea após 30 dias de uso da formulação F16.

Tabela 12- Variação de pigmentação cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros sem extrato de *Origanum majorana*.

Voluntários	Formulação F16			
	Pigmentação antes (U.A)	Pigmentação depois (U.A)	Varição (%)	p
1	21,5±1,87	23,2±2,04	7,75 [□]	0,0798
2	29,3±2,50	26,2±3,43	-10,79	0,0838
3	17,67±1,03	13,67±1,03	-22,64	0,0015*
4	60,67±1,7	57,3±2,34	-5,49	0,0702
5	15±2,37	10,67±0,82	-28,89	0,0104*
6	15,8±1,33	10,67±1,37	-32,63	0,0003*
7	21±3,03	21,83±2,64	3,97 [□]	0,5166
8	20,67±2,42	21,5±2,26	4,03 [□]	0,3632
10	16±2,45	17,17±1,94	7,29 [□]	0,4196
11	33,34±2,58	23,33±2,50	-30	0,0010*
12	29,5±4,8	19,17±3,54	-35,03	0,0130*
13	35,67±1,2	27,17±1,47	-23,83	7,61E-05*
14	44,83±3,0	34,17±3,54	-23,79	2,45E-05*
15	34±2,28	23±1,41	-32,35	0,0003*
16	14,83±3,71	14±2,28	-5,62	0,4017
MEDIA±dp	27,32±0,79	22,86±7,23	-15,20±14,34	
p	0,002386958**			

[□] Aumento da pigmentação da pele durante os 30 dias de uso do produto.

*Valores que representam diferença significativa quando comparado a pigmentação antes e depois de 30 dias utilizando o produto. ** Valor significa diferença significativa de pigmentação da pele do grupo após 30 dias utilizando o produto.

A pigmentação cutânea apresentou redução significativa quando comparado as médias dos voluntários antes e após 30 dias de uso da formulação F16.

Porém, 4 voluntários apresentaram aumento da pigmentação cutânea no período. O resultado de redução da pigmentação do grupo foi de aproximadamente 15% após 30 dias de uso da formulação F16.

Na Tabela 13 estão as variações de pigmentação cutânea após 30 dias de uso da formulação F16OM.

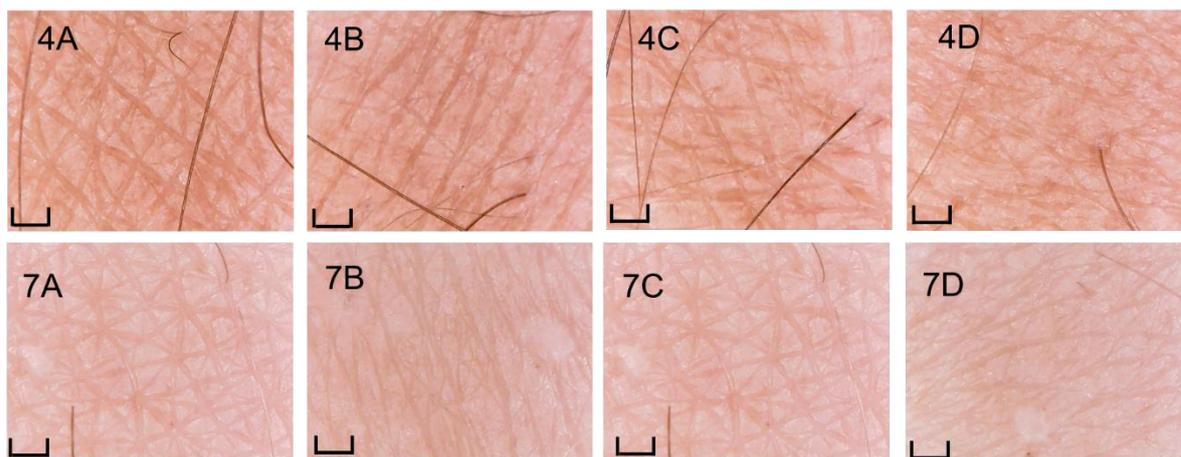
Tabela 13– Parâmetros obtidos de percentual de redução de pigmentação cutânea após 30 dias de uso dos filmes com 16% de polímeros com extrato de *Origanum majorana*.

Voluntários	Formulação F16OM			
	Pigmentação antes (U.A)	Pigmentação depois (U.A)	Variação (%)	<i>p</i>
1	18,83±3,19	14,83±2,14	-21,24	0,0163
2	30,67±3,67	25,67±5,57	-16,30	0,0318
3	14,83±1,83	7,83±1,17	-47,19	0,0001
4	61,17±0,75	49,33±3,39	-18,68	0,0002
5	17,50±0,84	9,00±2,28	-48,57	0,0006
6	19,33±1,97	9,83±1,94	-49,14	0,0001
7	17,00±1,67	12,67±1,97	-25,49	0,0081
8	17,33±1,97	15,67±1,51	-9,62	0,0305
10	19,00±2,61	15,33±1,63	-19,30	0,0354
11	43,00±3,58	24,33±3,08	-43,41	0,0001
12	35,33±4,46	20,33±4,18	-42,45	0,0003
13	48,00±7,69	26,17±1,47	-45,49	0,0011
14	40,33±3,08	25,17±2,23	-37,60	0,0004
15	40,17±2,48	28,67±5,13	-28,63	0,0098
16	11,33±1,63	8,50±1,05	-25	0,0053
MEDIA±dp	28,92±0,64	19,55±8,37	-31,87±12,09	
<i>p</i>	3,969E-05*			

Todos os voluntários apresentaram redução significativa da pigmentação após o uso do produto contendo extrato de *Origanum majorana* no período de 30 dias.

*Valor significa diferença significativa de pigmentação da pele do grupo após 30 dias utilizando o produto.

Em relação a pigmentação cutânea, pode-se observar que todos os voluntários que utilizaram a formulação F16OM contendo extrato de *Origanum majorana* apresentaram redução significativa da pigmentação cutânea após 30 dias de uso. A média de redução foi de 31,9 %. Apesar de ocorrer uma redução significativa de pigmentação apenas uma leve alteração visual é observada nas fotos retiradas dos sujeitos 4 (fototipo 4) e 7 (fototipo 2), como mostra a Figura 20.



└┘ Corresponde a 500µm

Figura 20- Microscopia digital da pele de voluntárias. Número 4 corresponde a voluntária 4 e número 7 corresponde a voluntária 7. Letras significam: A- pele do antebraço esquerdo sem aplicação da formulação F16; B- pele do antebraço esquerdo após 30 dias de uso da formulação F16; C- pele do antebraço direito sem aplicação da formulação F16OM; D- pele do antebraço direito após 30 dias de uso da formulação F16OM.

A variação média de hidratação, oleosidade e pigmentação cutâneas após o uso das formulações F16 e F16OM bem como os valores de p relativos a comparação estatística entre os grupos estão na Tabela 14.

Tabela 14- Variação média de hidratação, oleosidade e pigmentação proporcionadas pelo filme com 16% de polímeros com e sem a adição do extrato de *Origanum majorana*.

	Formulação		p
	F16	F16OM	
Varição de Hidratação (%)	17,67±5,65	21,10±7,10	0,256
Varição de Oleosidade (%)	16,12±6,74	18,43±8,44	0,55
Varição de pigmentação (%)	-15,20±14,34	-31,87±12,09	0,0045*

*Valor significa diferença significativa de pigmentação da pele entre os grupos após 30 dias utilizando o produto.

Não houve diferença significativa de hidratação e oleosidade cutâneas na comparação do uso da formulação F16 com a F16OM. Este resultado acontece principalmente pelo fato da variação de hidratação e oleosidade estarem associados principalmente ao efeito de oclusão da pele e conseqüente redução da perda de água transepidérmica.

Quando comparados os resultados dos grupos em relação ao percentual de redução de pigmentação observou-se diferença significativa entre os grupos. O

grupo que recebeu a formulação F16OM apresentou uma redução de pigmentação 2 vezes superior que a F16.

Um dos fatores que pode favorecer a redução da pigmentação é o processo de oclusão o qual propicia um acúmulo de água no local e conseqüentemente a solubilização e drenagem da melanina do local. Este comportamento pode explicar o porque da redução de pigmentação cutânea após a utilização da formulação F16. Além disto, aparência da pele é a resposta de luz refletida, essa interação entre a luz e a pele sofre dispersão conforme alterações presentes no extrato córneo¹³⁰. O extrato córneo é geralmente claro e incolor, com absorção de luz nessa camada. A dispersão da luz na superfície do estrato córneo é causada pela heterogeneidade óptica da rugosidade da superfície cutânea, bem como pela microestrutura do extrato córneo, quando a pele está hidratada ocorre uma melhora na homogeneidade da coloração do local com conseqüente aumento de refração de luz¹³⁰. Logo, o efeito de redução da rugosidade do extrato córneo proporcionado pela hidratação pode ter produzido uma leve alteração da reflexão quantificada pelo sensor utilizado para as análises e produzir um leve aumento. Esta hipótese não é suportada até o momento por outros autores entretanto é um comportamento factível de ocorrer.

A concentração de arbutina usual em cosméticos para clareamento de pele, variam de 1 a 3% com início de aparecimento dos resultados após 60 dias de uso^{9,131}. No estudo a concentração de arbutina presente na formulação gel desenvolvida foi de 0,11%, 10 vezes inferior a menor dose usual. Ao formar o filme (evaporar 80% de água) a concentração alcança 0,55%, entretanto ainda inferior. Porém, foi observado redução significativa da pigmentação cutânea em 30 dias de uso do produto.

Este clareamento em menor tempo pode estar associado a melhor propriedade de entrega de ativos proporcionada pelos géis formadores de filme quando comparados aos géis tradicionais ou *patches*, bem como a oclusão proporcionada que normalmente acelera a permeação de ativos¹³².

Os géis formadores de filmes ao serem aplicados na pele funcionam como uma forma farmacêutica semi-sólida tradicional auxiliando na permeação imediata dos ativos, contudo, após secarem e formarem um filme propiciam a oclusão, a manutenção do ativo no local e prolonga seu tempo de ação, comportamento similar aos *patches*¹¹⁹.

Assim, o prolongamento do efeito associado a oclusão pode ter acelerado a permeação da arbutina e auxiliado a este produzir efeitos em concentrações

inferiores aquelas normalmente utilizadas. Além disto, o gel continha 1,43% de polifenóis totais, que quando formado o filme na pele alcançavam 7,15, aumentando também a concentração final de polifenóis. Estudos tem demonstrado que o efeito antioxidante de polifenóis pode proporcionar um efeito despigmentante através da inibição não competitiva da tirosinase, atividade quelante de íons de cobre, e atividade antioxidante reduzindo a oxidação de cisteinildopa^{63,74}.

4.3.4 Satisfação dos voluntários em relação ao uso e avaliação das características sensoriais das formulações

A boa atratividade cosmética em relação ao sensorial dos produtos é crucial para a adesão dos indivíduos nos tratamentos de discromias¹³³. Em caso de desconfortos proporcionados pelos dermocosméticos há um aumento nas chances de desistência ou interrupções intermitentes do uso do produto.

Pelo fato das discromias serem facilmente consideradas dermatoses recorrentes e de difícil tratamento, um cuidado especial faz-se necessário em relação a formulação dos dermocosméticos e ao sensorial do produto. O mesmo quando aplicado sobre a pele e após sua remoção devem apresentar um sensorial que possibilite movimentos naturais da pele, melhorando a atratividade cosmética e facilitando o seu uso.

A Tabela 15 mostra os resultados da satisfação dos voluntários em relação ao uso e as características sensoriais das formulações F16 e F16OM.

Tabela 15- Resultados da satisfação dos voluntários em relação ao uso e as características sensoriais das formulações F16 e F16OM.

Questionário	Formulação	
	F16 Pontuação(n)	F16OM Pontuação(n)
Macies	8,6±0,9	8,8±0,88
Textura	8,4±0,96	8,6±0,88
Qualidade geral da pele	8,6±0,77	8,7±0,68
Hidratação	8,8±0,8	8,8±0,8
Clareamento da região	6,9±1,84	8,2±0,56
Cheiro do produto	9,8±0,32	9,6±0,53
Cheiro da pele após remoção	10	10
Aplicação	10	10

Remoção	10	10
Pontuação variou de 1 a 10, sendo entre 1 a 3= menor pontuação/ruim/não gostou/insatisfeito; 4 a 7= pontuação mediana/bom/ gostou pouco/pouco satisfeito; e entre 8 a 10= maior pontuação/ótimo/gostou muito/muito satisfeito.		

Em relação a percepção dos voluntários quanto ao uso do filme com extrato de *Origanum majorana* observa-se que a média de satisfação ficou entre muito satisfeito e gostou muito (8 a 10) para a maioria das variáveis, considerando o produto como ótimo, não apresentando diferença significativa na avaliação do uso do produto entre as formulações F16 e F16OM.

Todos os voluntários classificaram as formulações como fácil aplicação e fácil remoção. Em relação a tolerabilidade do produto aplicado sobre a pele, os voluntários relataram que não houve efeitos adversos durante o uso dos géis formadores de filme F16 e F16OM.

O bom sensorial, tolerabilidade e a ausência de efeitos adversos a formulação despigmentante se fazem necessários para a adesão ao tratamento e para que o resultado seja alcançado^{133,134}. As formulações F16 e F16OM foram consideradas como boa atratividade cosmética e conseqüentemente isso favorece a adesão ao uso dos produtos.

5. CONCLUSÃO

O método utilizado para a produção do extrato proporcionou um extrato de *Origanum majorana* rico em polifenóis 22% e arbutina 1,7%.

O aumento da concentração dos polímeros de 14 para 16, e 18% proporcionaram aumento da viscosidade, sem alteração do pH. O tempo de secagem das formulações foi menor a medida em que foi aumentada a concentração de polímeros na formulação.

O estudo da secagem dos géis formadores de filme na placa de vidro apresentou a mesma tendência em relação ao tempo de secagem na pele, porém com velocidade de secagem 3 vezes mais rápida na pele.

Foi selecionada a concentração de 16% de polímeros (F16) para a incorporação do extrato de *Origanum majorana*, devido a suas características de tempo de secagem, facilidade na aplicação do produto e pelo aumento de hidratação serem melhores do que os alcançados com a F14 e similares com a F18, e por apresentar um filme formado mais fino sob a pele do que a F18.

Após a adição do extrato no gel formador de filme houve uma pequena diferença significativa de aumento da viscosidade e redução do pH da formulação, porém sem alterar a velocidade de secagem bem como as propriedades mecânicas do filme formado.

Os dados do estudo puderam confirmar que a formulação proposta de gel formador de filme contendo o extrato de *Origanum majorana* produziu um aumento de hidratação cutânea, atribuído provavelmente ao efeito de oclusão. A formulação apresentou resultado de despigmentação cutânea superior ao efeito da formulação que não possui extrato.

O gel formador de filme contendo extrato de *Origanum majorana* demonstrou ser potencial alternativa para o tratamento de hiperpigmentações.

5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Sugerem-se estudos com o uso da formulação em voluntários acometidos de hiperpigmentações para verificar sua atividade na pele não hígida.

REFERÊNCIAS

1. Habif TP. Dermatologia clínica: guia colorido para diagnóstico e tratamento. Elsevier. Rio de Janeiro; 2012. 1056 p.
2. Dinato SLM, Oliva R, Dinato MM, Soares AM, Bernardo WM. Prevalência de dermatoses em idosos residentes em instituição de longa permanência. Rev Assoc Med Bras. 2008;54(6):543–7.
3. Azulay RD. Dermatologia. Guanabara. Rio de Janeiro: 6.ed; 2013.
4. Nicoletti MA, Orsine EMDA, Duarte ACN, Buono GA. Hiper Cromias: Aspectos Gerais e uso de despigmentantes cutâneos. Cosmet Toilet (Edição em Port [Internet]. 2002 [cited 2017 Feb 8];14:46–51.
5. Tabora ML, Weber MB, Lisboa AP, Teixeira KAM, Welter E de Q. Avaliação da qualidade de vida e do sofrimento psíquico de pacientes com diferentes dermatoses em um centro de referência em dermatologia no sul do país. An Bras Dermatol. 2010;85(1):52–6.
6. Morais OO de, Lemos ÉFL, Costa IMC, Gomes CM, Sousa MC dos S, Paula CDR de. O uso de lasers ablativos no tratamento do melasma facial. An Bras Dermatol. 2013;88(2):240–5.
7. Suh KS, Baek JW, Kim TK, Lee JW, Roh HJ, Jeon YS, et al. The Inhibitory Effect of Phytoclear-EL1 on Melanogenesis. Ann Dermatol [Internet]. 2009 Nov [cited 2016 Oct 20];21(4):369–75.
8. Kang HY, Ortonne J-P. What should be considered in treatment of melasma. Ann Dermatol [Internet]. 2010 Nov [cited 2016 Oct 11];22(4):373–8.
9. Draelos ZD. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. Dermatol Ther [Internet]. 2007 Nov 28 [cited 2016 Sep 28];20(5):308–13.
10. Ribas J, Cavalcante M de SM, Schettini APM. Ocronose exógena induzida por hidroquinona: relato de quatro casos. An Bras Dermatol [Internet]. 2010 [cited 2016 Sep 29];85(5):699–703.
11. SCCS, Degen GH. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Opinion on the safety of the use of β -arbutin in cosmetic products. Regul Toxicol Pharmacol [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Feb 8];73(3):866–7.
12. Maeda K, Fukuda M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. J Pharmacol Exp Ther. 1996;276(2).
13. Lukas B, Schmiderer C, Mitteregger U, Novak J. Arbutin in marjoram and oregano. Food Chem [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Oct 20];121(1):185–90.
14. Lamien-Meda A, Lukas B, Schmiderer C, Franz C, Novak J. Validation of a quantitative assay of arbutin using gas chromatography in *Origanum majorana* and *Arctostaphylos uva-ursi* extracts. Phytochem Anal [Internet]. 2009 Sep

- [cited 2016 Sep 28];20(5):416–20.
15. Peretti SC, Moreira MAL, Barreto GR, Moraes CAP. Resveratrol para cosméticos no clareamento da pele. *Interface- Saúde, Meio Ambient e Sustentabilidade* [Internet]. 2015 [cited 2017 Feb 8];10(1).
 16. Costa A, Moisés TA, Cordero T, Alves CRT, Marmirori J. Associação de emblica, licorice e belides como alternativa à hidroquinona no tratamento clínico do melasma. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2017 Feb 8];85(5):613–20.
 17. Sato MEO, Gomara F, Pontarolo R, Andreazza IF, Zaroni M. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. *Rev Bras Ciências Farm Brazilian J Pharm Sci.* 2007;43(2).
 18. Morais MMRF, Veiga F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Rev Bras Ciências Farm Brazilian J Pharm Sci.* 2002;38(1).
 19. Andrews GP, Lavery TP, Jones DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(3):505–18.
 20. Souza LK, Bruno CH, Lopes L, Pulcinelli SH, Santilli C V, Chiavacci LA. Ureasil-polyether hybrid film-forming materials. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2016 Sep 28];101:156–61.
 21. Ribeiro CJ. *Cosmetologia aplicada a dermoestética*. 2nd ed. Pharmabook, editor. São Paulo; 2010.
 22. Gonchoroski DD, Correa GM. Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. *Infarma.* 2005;17(3/4):84–8.
 23. Ishiy PS, e Silva LR, Penha MÁ, Handel AC, Miot HA. Doenças de pele relatados pelos trabalhadores do campus UNESP em Rubião Jr, Botucatu-SP (Brasil). *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):529–31.
 24. KrupaShankar DSR, Somani VK, Kohli M, Sharad J, Ganjoo A, Kandhari S, et al. A cross-sectional, multicentric clinico-epidemiological study of melasma in India. *Dermatol Ther (Heidelb)* [Internet]. 2014 Jun [cited 2016 Sep 28];4(1):71–81.
 25. Sturm RA, Teasdale RD, Box NF. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene.* 2001;277(1):49–62.
 26. Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2016 Sep 29];6(1):97–108.
 27. Sturm RA, Frudakis TN. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends Genet.* 2004;20(8):327–32.
 28. Tully G. Genotype versus phenotype: Human pigmentation. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):105–10.

29. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet* [Internet]. 2007 Dec 21 [cited 2016 Sep 29];39(12):1443–52.
30. Liu JJ, Fisher DE. Lighting a path to pigmentation: mechanisms of MITF induction by UV. *Pigment Cell Melanoma Res* [Internet]. 2010 Dec [cited 2017 Feb 10];23(6):741–5.
31. Sturm RA. A golden age of human pigmentation genetics. *Trends Genet*. 2006;22(9):464–8.
32. Parvez S, Kang M, Chung H-S, Cho C, Hong M-C, Shin M-K, et al. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phyther Res* [Internet]. 2006 Nov [cited 2016 Oct 10];20(11):921–34.
33. Bae-Harboe Y-SC, Park H-Y. Tyrosinase: a central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2012;132(12):2678–80.
34. Miot LDB, Silva MG da, Miot HA, Marques MEA. Fisiopatologia do melasma [Internet]. Vol. 84, *An Bras Dermatol*. São Paulo; 2009 [cited 2016 Sep 28]. Report No.: 6.
35. Oliveira LJJ, Rocha IM, Guillo LA. Ensaio radiométrico de tirosinase. *Rev Bras Farm*. 2004;85(1):5–6.
36. Ito S. A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Res* [Internet]. 2003 Jun [cited 2016 Sep 29];16(3):230–6.
37. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte Function and Its Control by Melanocortin Peptides. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2002 Feb [cited 2017 Feb 10];50(2):125–33.
38. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 1997 Mar [cited 2017 Feb 10];43(1):61–8.
39. Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M, LaPoint R. Proteinase-Activated Receptor-2 Stimulates Prostaglandin Production in Keratinocytes: Analysis of Prostaglandin Receptors on Human Melanocytes and Effects of PGE2 and PGF2 α on Melanocyte Dendricity. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2004 May [cited 2017 Feb 10];122(5):1214–24.
40. Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem*. 1992;267(34):24675–80.
41. Marrot L, Meunier J-R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2008 May [cited 2017 Feb 10];58(5):S139–48.
42. Pimenta SPC. Reflexões sobre corporeidade e padrões de beleza a partir de Merleau-Ponty. *Rev Hist (Costa Rica)*. 2012;4(2):133–45.
43. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Análise de dados das campanhas de

- prevenção ao câncer da pele promovidas pela Sociedade Brasileira de Dermatologia de 1999 a 2005. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2017 Feb 10];81(6):533–9.
44. Souza SRP de, Fischer FM, Souza JMP de. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2004 Aug [cited 2017 Feb 10];38(4):588–98.
 45. Pompeu GF, Bortolança PC, Gringnoli CRE, Simionato, Maria Inês Vilhena Gringnoli LCE. Estudo comparativo sobre a conscientização dos hábitos de fotoproteção e dos fatores de risco da carcinogênese de pele em trabalhadores de rua. *Rev Científica da UNIARARAS v* [Internet]. 2013 [cited 2017 Feb 10];1(2).
 46. Thody AJ, Graham A. Does α -MSH Have a Role in Regulating Skin Pigmentation in Humans? *Pigment Cell Res* [Internet]. 1998 Oct [cited 2016 Sep 29];11(5):265–74.
 47. Spencer JD, Chavan B, Marles LK, Kauser S, Rokos H, Schallreuter KU. A novel mechanism in control of human pigmentation by α -melanocyte-stimulating hormone and 7-tetrahydrobiopterin. *J Endocrinol* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2016 Oct 20];187(2):293–302.
 48. Videira IF dos S, Moura DFL, Magina SBLMV, Videira IF dos S, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis*. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Feb 10];88(1):76–83.
 49. Seçkin HY, Kalkan G, Baş Y, Akbaş A, Önder Y, Özyurt H, et al. Oxidative stress status in patients with melasma. *Cutan Ocul Toxicol* [Internet]. 2014 Sep 22 [cited 2017 Feb 10];33(3):212–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15569527.2013.834496>
 50. Damevska K. New Aspects of Melasma/Novi aspekti melazme. *Serbian J Dermatology Venereol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2016 Sep 28];6(1):5–18.
 51. Handel AC, Lima PB, Tonolli VM, Miot LDB, Miot HA. Risk factors for facial melasma in women: a case-control study. *Br J Dermatol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2017 Feb 10];171(3):588–94.
 52. Yalamanchili R, Shastry V, Betkerur J. Clinico-epidemiological Study and Quality of Life Assessment in Melasma. *Indian J Dermatol* [Internet]. 2015 [cited 2016 Sep 28];60(5):519.
 53. Cruz FJS, Camacho GPV, Pedrero MLP, Acar MR, Sánchez MM. Calidad de vida en hombres con melasma. *Rev Cent Dermatol Pascua* [Internet]. 2013 [cited 2016 Sep 28];22(3):94–9.
 54. Lieu TJ, Pandya AG. Melasma Quality of Life Measures. *Dermatol Clin* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Feb 8];30(2):269–80.
 55. Grimes PE. Management of Hyperpigmentation in Darker Racial Ethnic Groups. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. 2009 Jun [cited 2017 Feb 10];28(2):77–85.

56. Gonchoroski DD, Côrrea GM. Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. *Infarma*. 2005;17(3/4).
57. Souza V, Antunes Jr D. Ativos Dermatológicos - Dermocosméticos e nutracêuticos. Pharmabook. São Paulo; 2013. 01-9 p.
58. Sittart JA de S, Zanardi FHT. Prevalência das dermatoses em pacientes da 4ª idade. *Rev Soc Bra Clin Med*. 2008;6(4):14-125–9.
59. Silva JB, Baronio J, Lacerda F, Bueno V. O efeito da luz intensa pulsada em manchas senis: um relato de caso [Internet]. Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI; 2012 [cited 2017 Feb 8]. Available from: [http://siaibib01.univali.br/pdf/Janaina Bastos, Jussara Baronio.pdf](http://siaibib01.univali.br/pdf/Janaina_Bastos,_Jussara_Baronio.pdf)
60. Lucena EE de S, Castro AC de Q, Farias DB de, Lima PT de, Silveira ÉJD da, Lima KC de, et al. Prevalence of lip and perioral Ephelides in beach workers. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Feb 10];88(1):56–63. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962013000100056&lng=en&nrm=iso&tlng=en
61. Yang S, Xu S-X, Xiao F, Du W-H, Hao J-H, Wang H-Y, et al. Prevalence and familial risk of ephelides in Han Chinese adolescents. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 2008 Feb [cited 2017 Feb 10];300(2):87–90.
62. Lakhdar H, Zouhair K, Khadir K, Essari A, Richard A, Seité S, et al. Evaluation of the effectiveness of a broad-spectrum sunscreen in the prevention of chloasma in pregnant women. *J Eur Acad Dermatology Venereol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2016 Sep 28];21(6):738–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2007.02185.x>
63. Miranda AR, Castro CFS, Silvério MDO. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). *Rev Bras Plantas Med* [Internet]. 2014 [cited 2016 Sep 29];16(3):693–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000700009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
64. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Sep 28];89(5):771–82.
65. Rebello T. Guia de produtos cosméticos. Editora Se. São Paulo; 2004.
66. Gomes R, Damazio M. Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos. 3.ed.,rev. LMP. São Paulo; 2009. 198-372 p.
67. Ertam I, Mutlu B, Unal I, Alper S, Kivçak B, Ozer O. Efficiency of ellagic acid and arbutin in melasma: A randomized, prospective, open-label study. *J Dermatol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2016 Sep 29];35(9):570–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1346-8138.2008.00522.x>
68. Reiter RJ. Aging and oxygen toxicity: Relation to changes in melatonin. *Age (Omaha)* [Internet]. 1997 Oct [cited 2017 Feb 10];20(4):201–13.

69. Guaratini T, Medeiros MHG, Colepicolo P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Quim Nova* [Internet]. 2007 Feb [cited 2017 Feb 10];30(1):206–13.
70. Fries AT, Frasson APZ. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. *Context Saúde*. 2010;10(19):17–23.
71. Soares J de J, Denardin ELG. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels [Internet]. FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA; 2013 [cited 2016 Sep 29].
72. Vági E, Rapavi E, Hadolin M, Vászrhelyiné Perédi K, Balázs A, Blázovics A, et al. Phenolic and Triterpenoid Antioxidants from *Origanum majorana* L. Herb and Extracts Obtained with Different Solvents. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005 Jan [cited 2016 Oct 20];53(1):17–21.
73. Sousa CMDM, Silva HRE, Vieira GM, Ayres MCC, Da Costa CLS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova*. 2007;30(2):351–5.
74. Avanci JMTM. Efeitos de extratos do gênero *Passiflora* sobre a atividade de tirosinase [Internet]. Universidade Federal do Pará; 2012 [cited 2017 Feb 9].
75. Marques PRB de O, Yamanaka H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Quim Nova* [Internet]. 2008 [cited 2017 Feb 10];31(7):1791–9.
76. Stratford MRL, Ramsden CA, Riley PA. The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2012 Jul [cited 2017 Feb 10];20(14):4364–70.
77. Regina Assalin M, Lima da Silva P. Comparação da eficiência do processo de ozonização catalítica (Mn II e Cull) na degradação de fenol. *Quim Nov*. 2006;29(1):24–7.
78. Palumbo A, D'Ischia M, Misuraca G, Prota G. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 1991 Jan 23 [cited 2016 Oct 10];1073(1):85–90.
79. Crocco E, Veasey J, Boin M, Lellis R, Alves R. A Novel Cream Formulation Containing Nicotinamide 4%, Arbutin 3%, Bisabolol 1%, and Retinaldehyde 0.05% for Treatment of Epidermal Melasma. *Cutis* [Internet]. 2015;96(5):337–42.
80. Wang Z-X, Shi X-X, Chen G-R, Ren Z-H, Luo L, Yan J. A new synthesis of α -arbutin via Lewis acid catalyzed selective glycosylation of tetra-O-benzyl- α -d-glucopyranosyl trichloroacetimidate with hydroquinone. *Carbohydr Res* [Internet]. 2006 Aug [cited 2016 Oct 20];341(11):1945–7.
81. Kim H, Choi H-R, Kim D-S, Park K-C. Topical hypopigmenting agents for pigmentary disorders and their mechanisms of action. *Ann Dermatol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Sep 28];24(1):1–6.

82. Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T. Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2004 Apr [cited 2016 Oct 20];27(4):510–4.
83. Chawla S, Kvalnes K, DeLong MA, Wickett R, Manga P, Boissy RE. DeoxyArbutin and its derivatives inhibit tyrosinase activity and melanin synthesis without inducing reactive oxygen species or apoptosis. *J Drugs Dermatol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 Feb 16];11(10):e28-34.
84. Inoue Y, Hasegawa S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, et al. Analysis of the Effects of Hydroquinone and Arbutin on the Differentiation of Melanocytes. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2013 [cited 2017 Feb 10];36(11):1722–30.
85. Cardoso M das G, Castro DP de, Aguiar PM, Silva V de F, Salgado APSP, Muniz FR, et al. Plantas aromáticas e condimentares [Internet]. Universidade Federal de Lavras/UFLA; 2003.
86. Manjerona | Terra das Plantas [Internet]. 2010 [cited 2016 Oct 20]. Available from: <https://plantamania.wordpress.com/2010/05/31/manjerona/>
87. Şarer E, Scheffer J, Baerheim Svendsen A. Monoterpenes in the Essential Oil of *Origanum majorana*. *Planta Med* [Internet]. 1982 Dec 29 [cited 2016 Oct 20];46(12):236–9.
88. Vera RR, Chane-Ming J. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. Vol. 66, *Food Chemistry*. 1999.
89. Santin R, Mello JRB, Cleff MB. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família lamiaceae [Internet]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.; 2013 [cited 2016 Oct 20]. Available from: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/75649>
90. Busatta C, Julgadora C, Vladimir de Oliveira J, Luís Cansian R, Regina Alves Rodrigues M, de Oliveira D, et al. Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de oregano e manjerona. 2006;
91. Kufner DE, Luccio M Di, Cansian RL. Atividade antioxidante do extrato aquoso de manjerona (*organum majorana* L.), em linguiça frescal de frango. [Internet]. URI - CAMPUS ERECHIM DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS; 2010 [cited 2016 Sep 29]. Available from: http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2123.pdf
92. Rao GV, Mukhopadhyay T, Annamalai T, Radhakrishnan N, Sahoo MR. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. *Pharmacognosy Res*. 2011;3(2):143.
93. Liang C-H, Chou T-H, Ding H-Y. Inhibition of melanogenesis by a novel organoside from *Origanum vulgare*. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2010 Mar [cited 2016 Oct 20];57(3):170–7.
94. Harris MIN de C. Pele: do nascimento à maturidade. Editora Se. São Paulo;

2016. 301 p.
95. Shahzad Y, Louw R, Gerber M, Du Plessis J. Breaching the skin barrier through temperature modulations. *J Control Release*. 2015;202:1–13.
 96. Gal A, Nussinovitch A. Plasticizers in the manufacture of novel skin-bioadhesive patches. *Int J Pharm*. 2009;370(1–2):103–9.
 97. Soares M, Vitorino C, Sousa J, Pais A. Permeação cutânea: Desafios e oportunidades. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl*. 2015;36(3):337–48.
 98. Du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, et al. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Ski Res Technol*. 2013;19(3):265–78.
 99. Estanqueiro M, Jaime C, Amaral MH, Lobo JMS. Chapter 12 - The role of liposomes and lipid nanoparticles in the skin hydration. *Nanobiomaterials Galen Formul Cosmet*. 2016;10:297–326.
 100. Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Feb 12];91:9–15.
 101. Karki S, Kim H, Na S-J, Shin D, Jo K, Lee J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2016 Oct [cited 2017 Feb 10];11(5):559–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087616300368>
 102. Avgoustakis K. Engineered polymers and polymeric systems in controlled drug delivery and targeting. Vol. 71, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009. p. 407–8.
 103. Villanova JCO, Oréface RL, Cunha AS. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. 2010;20:51–64.
 104. Santos CG, Roggia I, Fernandes L da S, Raffin RP. Uso de blendas poliméricas em nano e microencapsulação. *Discip Sci Série Nat e Tecnológicas, St Maria* [Internet]. 2015 [cited 2017 Feb 12];16(2):311–23.
 105. Schroeder IZ, Franke P, Schaefer UF, Lehr C-M. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(1):111–21.
 106. Bergamaski K, Castro REN, Rubiara AF, Muniz EC. Cristalização e miscibilidade de Blendas de PEO/PVC [Internet]. Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá. 2000 [cited 2017 Feb 12]. Available from: <http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/1070/>
 107. Simielli ER. Principais características das blendas poliméricas fabricadas no Brasil. *Polímeros Ciência e Tecnol* [Internet]. 1993 [cited 2017 Feb 12];
 108. Barbu E, Verestiuc L, Nevell TG, Tsibouklis J. Polymeric materials for ophthalmic drug delivery: trends and perspectives. *J Mater Chem* [Internet].

- 2006 [cited 2017 Feb 12];16(34):3439.
109. Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, Andrieu V. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2013 Nov 16 [cited 2017 Feb 12];39(11):1599–617.
 110. Palermo LT, Sanchez EMS, Felisberti MI. Avaliação da miscibilidade de blendas PVA/PVP em solução a partir de medidas viscosimétricas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS. São Paulo; 2000. p. 54701–7.
 111. Corrêa NM, Camargo Jr FB, Ignácio RF, Leonardi GR. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Rev Bras Ciências Farm Brazilian J Pharm Sci*. 2005;41(1):73–8.
 112. Lămătic I-E, Bercea M, Morariu S, Poni P. INTRINSIC VISCOSITY OF AQUEOUS POLYVINYL ALCOHOL SOLUTIONS. *Rev Roum Chim*. 2009;54:11–2.
 113. Nogareti RM, Kanis LAK, Kwiecinski MR. Obtenção e padronização de extrato de *Origanum majorana* L. enriquecido em arbutina [Internet]. Tubarão, SC.; 2014.
 114. Photobioch GHN, Karikas GA, Euerby MR, Waigh RD. Isolation of Piceoside from *Arctostaphylos uva-ursi* Major Cardenolide Glycosides in Embryogenic Suspension Cultures of *Digitalis lanata*. 1986;307(1):1986–7.
 115. Azevedo RS. Qual o tamanho da amostra ideal para se realizar um ensaio clínico? *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2008 Aug [cited 2016 Oct 26];54(4):289–289.
 116. Motta AA, Kalil J, Barros MT. Testes Cutâneos. *Rev bras alerg imunopatol*. 2005;28(2):73–8.
 117. Vij NN, Saudagar RB. Formulation, development and evaluation of film-forming gel for prolonged dermal delivery of terbinafine hydrochloride. *Int J Pharma Sci Res* [Internet]. 2014;5(9):537.
 118. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release* [Internet]. 2004 Sep [cited 2017 Mar 26];99(1):53–62.
 119. Kathe K, Kathpalia H. Film Forming Systems for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Asian J Pharm Sci*. 2017;12:487–97.
 120. Park KR, Nho YC. Preparation and characterization by radiation of hydrogels of PVA and PVP containing Aloe Vera. *J Appl Polym Sci*. 2004;91(3):1612–8.
 121. Sparr E, Millecamps D, Isoir M, Burnier V, Larsson Å, Cabane B. Controlling the hydration of the skin through the application of occluding barrier creams. *J R Soc Interface*. 2013;10(80):0–9.
 122. de Oliveira JLT, de Fátima Melo Diniz M, de Oliveira Lima E, de Souza EL, Trajano VN, Santos BHC. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum*

- majorana L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2009;52(1):45–50.
123. Kanis LA, Rabelo BD, Moterle D, Custódio KM, de Oliveira JG, de Lemos AB, et al. Piper ovatum (Piperaceae) extract/starch-cellulose films to control *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2018;122(May):148–55.
 124. Cruz-Gálvez AM, Castro-Rosas J, Rodríguez-Marín ML, Cadena-Ramírez A, Tellez-Jurado A, Tovar-Jiménez X, et al. Antimicrobial activity and physicochemical characterization of a potato starch-based film containing acetic and methanolic extracts of *Hibiscus sabdariffa* for use in sausage. *Lwt* [Internet]. 2018;93(March):300–5.
 125. Golda N, Koo J, Maibach HI. Effects and uses of occlusion on human skin: An overview. *Cutan Ocul Toxicol.* 2005;24(2):91–104.
 126. Zhai H, Maibach HI. Occlusion vs. skin barrier function. *Ski Res Technol.* 2002;8(1):1–6.
 127. DRAELOS ZK. *Dermatologia cosmética: Produtos e procedimentos.* Santos. São Paulo; 2012. 550 p.
 128. OECD. *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies.* OECD Environ Heal Saf Publ [Internet]. 2004;2(28):1–31.
 129. Diridollou S, de Rigal J, Querleux B, Leroy F, Holloway Barbosa V. Comparative study of the hydration of the stratum corneum between four ethnic groups: influence of age. *Int J Dermatol.* 2007;46 Suppl 1:11–4.
 130. Jiang ZX, DeLaCruz J. Appearance benefits of skin moisturization. *Ski Res Technol.* 2011;17(1):51–5.
 131. Jeon JS, Lee MJ, Yoon MH, Park JA, Yi H, Cho HJ, et al. Determination of Arbutin, Niacinamide, and Adenosine in Functional Cosmetic Products by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Lett.* 2014;47(10):1650–60.
 132. Lunter D, Daniels R. In vitro skin permeation and penetration of nonivamide from novel film-forming emulsions. *Skin Pharmacol Physiol.* 2013;26(3):139–46.
 133. Ayres EL, Costa A, Jorge ACF, Júnior JEG, Szrajbman M, Sant’Anna B. Estudo monocêntrico, prospectivo para avaliar a eficácia e a tolerabilidade de formulação cosmeceutica em pacientes com melasma. *Surg Cosmet Dermatology.* 2016;8(3):232–40.
 134. Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. The potential of polymeric film-forming systems as sustained delivery platforms for topical drugs. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2017 Feb 12];13(3):349–60.
 135. L’Oréal Brasil. *Especialista em tipos de pele e cabelos do mundo inteiro - L’Oréal Brasil - Grupo L’Oréal* [Internet]. [cited 2017 Feb 16].

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa que tem como título **“DESENVOLVIMENTO DE FILME POLIMÉRICO CONTENDO EXTRATO DE *Origanum majorana* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESPIGMENTANTE E HIDRATANTE”**. O estudo será realizado no laboratório de Estética localizado no Bloco C da UNISUL, campus de Tubarão, SC.

A primeira fase do estudo tem o interesse em avaliar o tempo de secagem do produto na pele e a sensibilidade/alergenicidade da formulação de gel formador de filme contendo extrato de *Origanum majorana* rico em arbutina e polifenóis. As substâncias utilizadas no produto já foram testadas e consideradas seguras para uso dermatológico, porém necessita-se deste estudo para comprovação da segurança destes componentes associados.

Para você poder ser incluído no estudo deverá realizar uma triagem que consiste em verificar se você se enquadra nos critérios de inclusão da pesquisa. Dentre estes critérios de inclusão estão:

- idade acima de 18 anos,
- fototipo entre II e IV conforme classificação de Fitzpatrick,
- não estar gestante ou lactante,
- ausência de doenças de pele pré-existentes,
- não ter hipersensibilidade aos componentes da fórmula,
- não estar em tratamento com corticoide, vitamina A, retinóides, ácidos que possuem finalidade de afinamento da pele ou qualquer tipo de produto despigmentante/clareador de pele,
- que não faça uso abusivo de álcool
- que não seja fumante.

Serão excluídas do estudo mulheres que entrem no período gestacional durante a pesquisa, os que esquecerem o uso dos produtos por 6 dias consecutivos, começarem a apresentar algum dos parâmetros previstos pelos critérios de inclusão que não possibilite continuidade na pesquisa e faltas consecutivas às análises de pele.

Após verificarmos se você se enquadra nos critérios da pesquisa será agendado um dia para o teste de sensibilidade e de tempo de secagem do produto. Será feita a aplicação do produto e agendado o retorno para verificar se houve alguma reação de hipersensibilidade. Será aplicado uma formulação em cada braço dos voluntários, será aplicado no braço direito a formulação contendo gel formador de filme e no braço esquerdo o gel formador de filme com extrato de *Origanum majorana*. O produto deverá ficar em contato com a pele por pelo menos 6 horas por dia no período noturno, por 15 dias consecutivos em casa. Após 48 horas da última aplicação o produto deverá ser aplicado na pele e permanecer por 24 horas sem remoção. Em seguida você retornará ao laboratório, onde será avaliado pelo dermatologista e pelos pesquisadores para verificar a sensibilidade e alergenicidade.

Dentre as reações estão: ardência, pinicação, inchaço, coceira, vermelhidão ou pequenas bolhas nesta região, indicativos de uma potencial reação alérgica. Caso ocorra alguma reação antes de completarem as 24 horas, o produto deverá ser imediatamente removido com água e sabonete. Caso a limpeza da pele não cesse a reação ocorrida você será encaminhado para avaliação com médico especialista para definição de conduta. Os tratamentos podem ser a aplicação de produtos no local da reação, ou uso de medicamentos pela via oral ou injetável, sendo frequente o emprego de anti-histamínicos e corticoides para este fim. E sendo necessário tratamento específico você terá o tratamento custeado pelos proponentes da pesquisa.

A orientação é que seja feita uma comunicação aos pesquisadores nos primeiros sinais de irritação ao produto. Os canais de comunicação com os pesquisadores estão registrados ao final deste documento. Esta informação é essencial para que o acompanhamento seja feito o quanto antes.

Antes de usar o produto você deve estar com a pele higienizada. Havendo transcorrido 24 horas você deverá retornar ao laboratório de Estética da UNISUL, para uma análise visual da pele onde foi aplicado o produto testado.

Após o teste de sensibilidade/alergenicidade, caso não apresente reações adversas e queira continuar no estudo, passará para a fase do teste de atividade despigmentante e hidratante.

Você receberá dois frascos contendo um gel (produto para o teste) para utilizar durante o estudo e um protetor solar com FPS 30 para ser utilizado na região do tratamento em dias que a área tratada ficar exposta ao sol.

O uso de algum tipo de proteção solar se faz necessário durante a pesquisa, pois o sol tem muita influência no processo de pigmentação da pele, e isto pode interferir nos resultados de forma negativa. Dentre os métodos de proteção estão: protetor solar com FPS 30 e tecidos que cubram a região que recebe o sol.

Um gel será aplicado no antebraço direito (ver rótulo do produto) e o outro gel no antebraço esquerdo (ver rótulo do produto) deverá ser aplicado 1 vez ao dia, em período noturno e deverá permanecer com período mínimo de 6 horas em contato com a pele. A aplicação deverá ser em uma área específica do seu antebraço, previamente demarcada com o molde. Esta área será mensurada e fotografada para registro da evolução da coloração e hidratação da pele durante o estudo.

Você virá em pelo menos cinco encontros no laboratório de Estética – UNISUL para a coleta de dados. No primeiro encontro iremos explicar como acontecerão os testes e dividiremos os grupos. O segundo encontro será para a coleta de dados de sensibilidade e dados referentes a região que será tratada antes do início do tratamento (tempo 0). Em seguida o terceiro encontro será programado com período de 15 dias após o início do tratamento para acompanharmos a evolução (tempo 15). O quarto encontro será para encerramento da coleta de dados e para finalizarmos os testes (tempo 30). Em cada encontro você receberá questionários referentes a pesquisa.

Os resultados serão disponibilizados a você após o término da pesquisa. É importante lembrar que até 72 horas após o estudo podem aparecer reações, tais como sensações de desconforto que sinalizam uma irritação como ardência, prurido/coceira, dor, ou alérgica como a vermelhidão, inchaço e formação de elevação na pele. E havendo qualquer reação no local de aplicação, mesmo após remoção do produto, você poderá entrar em contato com os pesquisadores para as devidas orientações e cuidados.

Ao integrar esta pesquisa você deverá responder aos questionamentos propostos na ficha de acompanhamento que serão entregues a você em cada encontro. Estas serão utilizadas para registro de informações referentes a atratividade cosmética do produto, pontos positivos/negativos da formulação.

A sua participação não lhe traz nenhuma remuneração, pois este estudo não tem interesse financeiro. Sua participação no estudo não é obrigatória e para fazer parte deste, é indispensável assinar este termo de consentimento.

Você poderá desistir a qualquer momento de participar da pesquisa. Você pode solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma. Os resultados desta pesquisa serão publicados em revista científica, mas seu nome será mantido em sigilo (segredo).

Este estudo está rigorosamente fundamentado nos direitos enquanto sujeitos que fizeram parte do estudo nas Normas e Diretrizes da Pesquisa com Seres Humanos (Resolução 466/12 – CNS/MS).

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar desse estudo como sujeito. Fui informado (a) e esclarecido(a) pela pesquisadora sobre o tema e o objetivo da pesquisa, assim como a maneira como ela será feita e os benefícios e os possíveis riscos decorrentes de minha participação. Recebi a garantia de que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto me traga qualquer prejuízo.

Eu permito que os pesquisadores relacionados abaixo obtenham fotografia de minha pessoa para fins de pesquisa científica, médica e/ou educacional.

Eu concordo que o material e informações obtidas relacionadas à minha pessoa possam ser publicados em aulas, congressos, eventos científicos, palestras ou periódicos científicos. Porém, a minha pessoa não deve ser identificada, tanto quanto possível, por nome ou qualquer outra forma.

As fotografias, vídeos e gravações ficarão sob a propriedade do grupo de pesquisadores pertinentes ao estudo e sob sua guarda.

Nome por extenso: _____

RG: _____

Local e Data: _____

Assinatura: _____

Isabel Claudino Silvano

Acadêmico (a) responsável pela pesquisa

Contato: (48) 98821-7037 (telefone e Whatsapp)

e-mail: isabel.silvano51@gmail.com

Luiz Alberto Kanis

Pesquisador (a) responsável pela pesquisa

Contato: (48) 3621-3284

Apêndice B – Tabela de classificação de tonalidade cutânea

1	7	13	19	25	31	37	43	49	55	61
2	8	14	20	26	32	38	44	50	56	62
3	9	15	21	27	33	39	45	51	57	63
4	10	16	22	28	34	40	46	52	58	64
5	11	17	23	29	35	41	47	53	59	65
6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66

Fonte: Adaptado de L'Oréal¹³⁵.

Apêndice C - Questionário de auto percepção cutânea

1. Dê uma pontuação entre 1 e 10, sendo entre 1 e 3= menor pontuação/ruim/não gostou/insatisfeito; 4 e 7= pontuação mediana/bom/gostou pouco/pouco satisfeito; e entre 8 e 10= maior pontuação/ótimo/gostou muito/muito satisfeito; para os seguintes critérios relacionados aos efeitos proporcionados pelo produto para a sua pele:

Ao Toque (pele macia):

Ao Toque (pele lisa):

Melhora na qualidade geral da pele:

Melhora de hidratação:

Redução de pigmentação:

Cheiro/odor durante o contato com o produto:

Cheiro/odor após remoção do produto:

Facilidade de aplicação:

Facilidade de remoção:

Apêndice C – Questionário de avaliação do uso do produto

Data:

Pesquisador: _____

Voluntário: _____

1. Houve algum dia, nos últimos quinze dias, o esquecimento da aplicação do produto? () Sim () Não
2. Quantos dias foram esquecidos?
3. Houve algum dia, nos últimos quinze dias, o esquecimento da aplicação de proteção solar? () Sim () Não
4. Quantos dias foram esquecidos? _____
5. Você apresentou algum efeito colateral? () Sim () Não, se sim, quais? () Ardência () Vermelhidão () Descamação () Coceira () Outros. Qual?
6. Durante o tratamento você fez uso de alguma medicação via oral? Qual?
7. Neste período (15 dias) você introduziu algum tipo de produto cosmético para clareamento?
8. O produto sofreu alguma modificação (cor/odor/consistência) durante o tratamento?
9. Você considera o produto de fácil aplicação? () Sim () Não
10. Você considera o produto de fácil remoção? () Sim () Não