

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

***NOVAS TECNOLOGIAS ASSOCIADAS À TERAPÊUTICA
ANTIENVELHECIMENTO***

Ana Isabel Francisco de Oliveira Gonçalves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de:
Prof. Dra. Ana Grenha

2023

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

***NOVAS TECNOLOGIAS ASSOCIADAS À TERAPÊUTICA
ANTIENVELHECIMENTO***

Ana Isabel Francisco de Oliveira Gonçalves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de:
Prof. Dra. Ana Grenha

2023

Novas tecnologias associadas à terapêutica antienvhecimento

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Ana Isabel Gonçalves)

Copyright © 2023 Ana Isabel Francisco de Oliveira Gonçalves

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família. Ao meu pai e à minha mãe por todas as palavras de incentivo e por sempre quererem o melhor para mim. Por sempre acreditarem e por sempre terem fé que eu seria a “cientista” da família. Por serem um exemplo de resiliência e por demonstrarem que as coisas acontecem a quem se esforça. Aos meus irmãos por todo o *stress* causado, mas também por todas as palavras de incentivo. Jéssica, Elisandra, por me darem forças quando mais precisei, ao Gerson e ao Pedro por todos os momentos de diversão e à minha Carlota, por me obrigar a trabalhar sempre mais, para lhe dar tudo o que ela merece! Um obrigado também a todas as minhas tias e primas.

A todos os meus amigos, um enorme obrigado! Obrigada aos meus melhores amigos, Rita e Bernardo, por todas as palavras de apoio, por sempre me obrigarem a dar o melhor de mim e me impedirem de desistir quando tive quase. Obrigada às amigas que facultade me deu por estarem sempre comigo, tanto nos bons como nos péssimos momentos que tivemos durante estes 5 anos. Um especial abraço à minha amiga Cátia por estar presente em todos os meus *lows*, até na escrita desta dissertação. Não podia deixar de referir a minha amiga Jacira, das principais razões pela qual eu sou, quase, farmacêutica hoje. A pessoa que me incentivou a dar este passo de ir viver para uma cidade totalmente diferente em 2016, decisão essa que mudou radicalmente as nossas vidas para o melhor. Mesmo estando longe, foi um enorme apoio na escrita desta dissertação e durante o mestrado inteiro.

A todos os professores que se cruzaram comigo ao longo deste mestrado, que de uma forma ou outra tiveram influência na profissional que sou hoje, obrigada. À minha orientadora por todo o trabalho que teve na correção desta dissertação. Obrigada pela paciência e compreensão que teve ao longo destes meses.

Por fim, não poderia de deixar de agradecer a mim mesma, por todo o trabalho que desenvolvi ao longo destes 5 anos, por todo o tempo e esforço que dediquei a este curso, a esta dissertação e por todo o esforço que faço todos os dias para ser uma melhor profissional de saúde.

“Everything is hard before it is easy”

– Goethe J.W.

Resumo

A pele é o maior órgão do organismo, estando dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Assume diversas funções, desde a proteção do organismo, à regulação da temperatura corporal, tendo influência na relação do indivíduo com a sociedade.

O envelhecimento conduz a alterações na pele, por diversos mecanismos que podem ser intrínsecos, sendo regulados por fatores genéticos, ou extrínsecos, que incluem exposição a poluição e a radiação UV. Estes fenómenos levam a alterações cutâneas como rugas, manchas e xerose. Os compostos ativos utilizados no combate ao envelhecimento incluem geralmente antioxidantes, hidroxiácidos e compostos fenólicos, mas o uso de proteção solar deve ser diário e a exposição solar direta evitada, já que isso retardará o envelhecimento.

A pele possui uma elevada capacidade de barreira e grande parte dos ativos utilizados no combate ao envelhecimento são instáveis. Assim, tem-se vindo a observar o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de aumentar a estabilidade dos ativos e permitir o seu transporte para camadas mais profundas da pele.

A nanotecnologia é a base de diversos sistemas de veiculação para administração por via cutânea. Em muitos casos, estes sistemas são capazes de atravessar a barreira cutânea sem alterar a sua integridade, tendo vantagens como o aumento da estabilidade e eficácia das moléculas associadas e uma penetração e libertação mais controlada das mesmas. Diversas tecnologias físicas também têm sido utilizadas, sendo alguns exemplos microagulhas que são dispositivos que atravessam diretamente as camadas da pele, iontoforése e eletroporação, ambas tecnologias que utilizam impulsos elétricos de modo a aumentar a permeabilidade celular e a sonoforése que usa ultrassons com o mesmo propósito.

Esta dissertação pretende explorar o envelhecimento enquanto processo biológico, focando em particular nas novas tecnologias que estão associadas ao combate do envelhecimento. Os resultados apresentados nos estudos são indicativos da eficácia e segurança destas tecnologias. É possível observar uma melhoria da estabilidade dos compostos ativos quando utilizados em associação com as nanotecnologias, sendo observada também uma libertação mais prolongada dos mesmos. Foi comprovado o mesmo para as tecnologias físicas, podendo estas ser utilizadas de forma isolada, devido à sua capacidade de estimular a produção de certos constituintes cutâneos.

Palavras-chave: antienvelhecimento, cosmetologia, nanotecnologias, sistemas de libertação cutânea

Abstract

The skin is largest organ of the organism and is divided into three layers: epidermis, dermis, and hypodermis. The skin owns several functions, from the protection of the organism to the regulation of body temperature, influencing the individual's relationships with society.

Aging leads to changes in the skin, through various mechanisms that may be intrinsic, which are regulated by genetic factors, as well as extrinsic, which include exposure to pollution and UV radiation. These mechanisms lead to changes in our skin such as wrinkles, blemishes and xerosis. The active components used in the combat of aging includes antioxidants, hydroxy acids and phenolic compounds but the use of sun protection should be daily and sun exposure avoided, since these actions can delay aging.

Skin has a great barrier capacity and most of the compounds used in the combat of aging therapy are unstable. Thus, we have been witnessing the development of new technologies able to improve the stability of active compounds and allow their transportation to deeper layers of the skin.

Nanotechnology is the foundation of several cutaneous delivery systems. In many cases, these systems can cross the skin barrier without altering its integrity, having advantages such as increased stability and effectiveness of the formulations and a more controlled penetration and release of the compounds. Several physical technologies have also been used, some examples being microneedles that are devices that directly pass through the layers of the skin, iontophoresis and electroporation, both technologies that use electrical pulses to increase the permeability of cells and sonophoresis that uses ultrasounds for the same purpose.

This dissertation intends to explore the theme of aging as a biological process, focusing in particular on new technologies that are associated with the combat of aging. The results presented in the studies prove the effectiveness and safety of these technologies. It is possible to observe an improvement in the stability of the active compounds when used in association with nanotechnologies, as well as a more prolonged release of the same. This has been proven even for physical technologies, which can be used isolated, due to their ability to stimulate the production of certain skin constituents.

Keywords: antiaging, cosmetology, nanotechnologies, skin delivery systems

Índice de conteúdos

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Métodos.....	3
4. Pele.....	4
4.1 Epiderme.....	5
4.1.1 Estrato Basal.....	6
4.1.2 Estrato Espinhoso.....	7
4.1.3 Estrato Granuloso.....	7
4.1.4 Estrato Lúcido.....	8
4.1.5 Estrato Córneo.....	8
4.2 Junção dermal-epidermal.....	8
4.3 Derme.....	9
4.4 Hipoderme.....	10
4.5 Vascularização.....	10
4.6 Apêndices da pele.....	11
4.6.1 Folículos capilares.....	12
4.6.2 Glândulas.....	12
4.6.2.1 Glândulas sudoríparas.....	13
4.6.2.2 Glândulas sebáceas.....	13
4.6.2.3 Unhas.....	14
4.6.2.4 Recetores sensoriais.....	14
4.7 Funções da pele.....	15
4.7.1 Função de barreira e imunitária.....	15
4.7.2 Termorregulação e homeostasia.....	16
4.7.3 Função endócrina.....	17
4.7.4 Função de comunicação e aparência.....	17
5. Envelhecimento cutâneo: mecanismos e consequências.....	18
5.1 Envelhecimento intrínseco.....	18
5.2 Envelhecimento extrínseco.....	19
5.3 Mecanismos de envelhecimento.....	21
5.3.1 Aumento da produção das MMP's.....	21
5.3.2 Diminuição da expressão do fator de crescimento tumoral.....	21

5.3.3	Aumento de espécies reativas de oxigénio	21
5.3.4	Senescência replicativa	23
5.3.5	Alterações ao DNA Mitocondrial	24
5.3.6	Encurtamento de telómeros.....	24
5.3.7	Estilo de vida.....	24
5.4	Tipo de pele.....	25
5.5	Consequências do envelhecimento	25
5.5.1	Epiderme	25
5.5.1.1	Queratinócitos e corneócitos	26
5.5.1.2	Melanócitos.....	26
5.5.2	Derme.....	26
5.5.2.1	Vasculatura da derme.....	27
5.5.2.2	Constituintes da matriz extracelular.....	27
5.5.2.3	Fibroblastos.....	28
5.5.3	Apêndices da pele	28
5.5.4	Função imunitária	28
5.5.5	Regeneração e reparação de lesões	29
6.	Prevenção e Tratamento do envelhecimento	30
6.1	Prevenção	30
6.1.1	Medidas Preventivas	30
6.1.2	Estilo de vida.....	30
6.2	Tratamento	31
6.2.1	Vitaminas e antioxidantes	31
6.2.2	Polifenóis	33
6.2.3	Carotenoides	33
6.2.4	Agentes hidratantes	34
6.2.5	Agentes reparadores de barreira.....	34
6.2.6	α - e β -hidroxiácidos.....	34
6.3	Pele como via de administração.....	36
7.	Novas Tecnologias	37
7.1	Nanotecnologias.....	37
7.1.1	Nanoemulsões	38
7.1.2	Nanopartículas à base de lípidos	41
7.1.2.1	Nanopartículas lipídicas.....	41
7.1.2.1.1	Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)	42
7.1.2.1.2	Transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC).....	45
7.1.2.2	Sistemas vesiculares.....	49
7.1.2.2.1	Lipossomas	49
7.1.2.2.2	Niossomas	53
7.1.3	Nanopartículas à base de polímeros.....	55
7.1.3.1	Nanoesféras e nanocápsulas.....	55
7.1.3.2	Dendrímeros.....	59
7.1.4	Nanocristais.....	61
7.2	Tecnologias físicas.....	64
7.2.1	Iontoforése	64
7.2.2	Eletroporação	66

7.2.3	Sonoforése.....	68
7.2.4	Microagulhas.....	71
8.	Conclusão.....	76
9.	Bibliografia	78

Índice de figuras

Figura 4.1 – Epiderme com 4 camadas. Adaptado de (20).....	5
Figura 4.2 – Epiderme com 5 camadas. Adaptado de (20).....	5
Figura 4.3 – Modelo “parede de tijolos”. Adaptado de (36).....	8
Figura 4.4 – Vascularização da derme e hipoderme. Adaptado de (28).	11
Figura 4.5 – Unidade pilosebácea. Adaptado de (21).	12
Figura 5.1 – Diferenças cutâneas entre o envelhecimento intrínseco e extrínseco. Adaptado de (54).	20
Figura 5.2 – Mecanismo de ação das espécies reativas de oxigênio. Adaptado de (59).	22
Figura 6.1 – Diferentes vias de penetração cutânea. (A) Via trans celular. (B) Via intercelular. (C) Via transapendégeal. Adaptado de (98).	37
Figura 7.1 – Classificação das diferentes nanotecnologias descritas para aplicação na área cosmética. Adaptado de (15).....	38
Figura 7.2 – Representação das nanoemulsões. A) Óleo em água. B) Água em óleo. Adaptado de (106).....	39
Figura 7.3 – Estudos de permeabilidade <i>ex vivo</i> de nanoemulsões CoQ ₁₀ em comparação com o controlo. Adaptado de (112).	40
Figura 7.4 – Quantidade de CoQ ₁₀ extraída da pele dos ratos no fim dos estudos de permeabilidade <i>ex vivo</i> , em comparação com o controlo. Adaptado de (112).	41
Figura 7.5 – Representação de nanopartículas lipídicas sólidas. Adaptado de (106).	42
Figura 7.6 – Perfil de libertação <i>in vitro</i> de resveratrol em solução de etanol e resveratrol em SLN. Adaptado de (116).	43
Figura 7.7 – Absorção cutânea de resveratrol após 12 h de estudo de permeação. * <i>p</i> <0.05. Adaptado de (116).	44
Figura 7.8 – Teste de estabilidade de vitamina A a 25° e pH 6.4. Adaptado de (117).....	45
Figura 7.9 – Representação de transportadores lipídicos nanoestruturados. Adaptado de (106).....	45
Figura 7.10 – Estabilidade física das formulações de vitamina E. Imagem da esquerda: Preparações preparadas recentemente NLC (1) e NE (2). Imagem da direita: Formulações após 3 semanas NLC (1) e NE (2). Adaptado de (121).	46
Figura 7.11 – Percentagem de vitamina E libertada através dos nanotransportadores utilizando uma membrana de diálise. Adaptado de (121).....	47

Figura 7.12 – Quantidade média de vitamina E (ng mL^{-1}) na epiderme e derme humana e no recetor. $p < 0.05$ Adaptado de (121).	48
Figura 7.13 – Percentagem de vitamina E na formulação após exposição ao simulador solar. Adaptado de (121).....	48
Figura 7.14 – Representação de lipossomas. Adaptado de (106).	49
Figura 7.15 – Representação de um niossoma. Adaptado de (106).....	53
Figura 7.16 – Libertação <i>in vitro</i> de composto ativo incorporado em niossoma e em solução. Adaptado de (127).....	54
Figura 7.17 – Quantidade de composto ativo depositado na pele a partir dos composto incorporado em niossomas e da solução Adaptado de (127).	55
Figura 7.18 – Representação de uma nanocápsula. Adaptada de (119).	56
Figura 7.19 – (a) Tamanho de partícula por um período de 28 dias a 4°C e 25°C . (b) Concentração de composto ativo por um período de 28 dias, à luz solar e no escuro. Adaptado de (130).	57
Figura 7.20 – Libertação cumulativa de ácido α -lipóico. Adaptado de (130).....	57
Figura 7.21 – Concentração de ácido α -lipóico distribuído pela pele e permeado. Adaptado de (130).	58
Figura 7.22 – Distribuição do palmitato de retinol nas diferentes camadas da pele após 24 horas de incubação. * $p < 0.05$ em relação ao estrato córneo e recetor. Adaptado de (131).	59
Figura 7.23 – Representação de um dendrímero. Adaptado de (106).	59
Figura 7.24 – Perfis de permeabilidade de EGCG <i>ex vivo</i> . Adaptado de (133).	60
Figura 7.25 – Fotodegradação da tretinoína na solução de metanol, nanoemulsão e nanosuspensão uma hora após radiação UV ($\lambda = 366\text{nm}$). Adaptado de (135).....	63
Figura 7.26 – Quantidade cumulativa de tretinoína retida e permeada nas diferentes camadas da pele do suíno após 8 horas de tratamento oclusivo com as formulações. Adaptado de (135).....	63
Figura 7.27 – Retenção de ácido gálico nas diferentes camadas da pele após 6 horas de permeabilidade Diferentes símbolos representam valores médios estatisticamente significativos ($p < 0.05$). Adaptado de (140).	65
Figura 7.28 – Melhoria na retenção de ácido gálico na epiderme viável. Diferentes símbolos representam valores médios estatisticamente significativos ($p < 0.05$). Adaptado de (140).	66
Figura 7.29 – Impacto da eletroporação nos níveis de expressão de Ki-67 nos queratinócitos da epiderme. ($p < 0.05$). Adaptado de (144).	67

Figura 7.30 – Espessura da epiderme (μm). Adaptado de (144).	67
Figura 7.31 – Impacto da eletroporação na quantidade de colagénio. Adaptado de (144).	68
Figura 7.32 – Impacto da eletroporação na densidade das fibras cutâneas. Adaptado de (144).	68
Figura 7.33 – Representação das diferentes microagulhas. Adaptada de (149).	72
Figura 7.34 – Pontuação de GPS no grupo com microagulhas com ácido ascórbico e no grupo controlo. Adaptado de (151).	73
Figura 7.35 – Resultado da análise cutânea através do visiómetro. Adaptado de (151).	73

Índice de tabelas

Tabela 6.1 – Ativos usados na terapêutica antienvhecimento e a sua função na pele. Adaptado de (5,68,79,88,90,92,93).....	35
Tabela 7.1 – Caracterização das nanoemulsões selecionadas. Adaptado de (112).	40
Tabela 7.2 – Caracterização das nanoemulsões e NLC de vitamina E. Adaptado de (121). ..	46
Tabela 7.3 – Estabilidade de lipossomas de vitamina D ₃ em diferentes momentos e condições de temperatura. Adaptado de (123).....	51
Tabela 7.4 – Estabilidade dos Lipossomas de vitamina D ₃ a 25 e 4500 Lx de luz. Adaptado de (123).	52
Tabela 7.5 – Penetração cumulativa média e retenção de vitamina D ₃ na pele. Adaptado de (123).....	53
Tabela 7.6 – Deposição cutânea de EGCG em diferentes veículos. Adaptado de (133).	61
Tabela 7.7 – Composição da amostra. Adaptado de (135).	62
Tabela 7.8 – Comparação de parâmetros selecionados medido através do MPA. N=16. Adaptado de (146).....	69
Tabela 7.9 – Avaliação da elasticidade da pele 7 semanas apos o tratamento através do Cutometer®. Adaptado de (146).....	71
Tabela 7.10 – Analise quantitativa da espessura da epiderme e proteínas da matriz extracelulares antes e depois do tratamento com a microagulha. Adaptado de (154).	75

Lista de abreviaturas

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
A/O	Água em óleo
AP-1	Proteína ativadora 1, do inglês <i>activator protein 1</i>
CME	Componentes da matriz extracelular
CoQ₁₀	Coenzima Q ₁₀
CoQ₁₀-SLN	Coenzima Q ₁₀ incorporada em SLN
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EE	Eficácia de encapsulação, do inglês <i>encapsulation efficiency</i>
EGCG	EpiGaloCatequina-3-O-Galato
GAG	Glicosaminoglicanos
GPS	Pontuação global de dano solar, do inglês <i>Global Photodamage Score</i>
LUV	Vesícula unilamelar grande, do inglês <i>large unilamellar vesicle</i>
MAPK	Proteína cinase ativada mitoticamente, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MLV	Vesículas multilamelares, do inglês <i>multilamellar vesicles</i>
MMP	Metaloproteinases da matriz, do inglês <i>matrix metalloproteinases</i>
MPA	Adaptador Multi Probe, do inglês <i>MultiProbe adapter</i>
NADPH	Forma reduzida de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NE	Nanoemulsão
NF-κB	Fator nuclear κB, do inglês <i>nuclear factor- κB</i>
NLC	Transportadores lipídicos nanoestruturados, do inglês <i>nanostructured lipid carriers</i>
O/A	Óleo em água
PdI	Índice de polidispersidade, do inglês <i>polydispersity index</i>
PLA	Ácido poliláctico, do inglês <i>polylactic acid</i>
p53	Proteína supressora de tumor
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência, do inglês <i>senescence-associated secretory phenotype</i>
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas, do inglês <i>solid lipid nanoparticles</i>

SPC	Fosfatidilcolina de soja, do inglês <i>soybean phosphatidylcholine</i>
SUV	Pequena vesícula unilamelar, do inglês <i>small unilamellar vesicle</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente a trolox, do inglês <i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TGF-β	Fator transformador de crescimento β , do inglês <i>transforming growth factor β</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases, do inglês <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF-α	Fatores de necrose tumoral α , do inglês <i>tumour necrosis factor α</i>
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta do tipo A
UVB	Ultravioleta do tipo B

1. Introdução

A pele é um órgão complexo que reveste toda a parte externa do corpo. Está sujeito a processos de envelhecimento intrínsecos e extrínsecos, estando bastante vulnerável a estímulos externos. Apesar disso e da pele ter diversos mecanismos de defesa, a eficácia dos mesmos diminui com o passar do tempo resultando nos sinais de envelhecimento que conhecemos como rugas, manchas, entre outros. Uma pele com uma rotina de pele adequada, hidratada e protegida do sol tem a capacidade de resistir aos efeitos de ambos os tipos de processo de envelhecimento, pelo que devem ser implementadas medidas de cuidado de pele adequadas (1–3).

Os referidos sinais de envelhecimento correspondem a alterações físicas que podem levar a alterações psicológicas, emocionais e sociais. Podem afetar relações interpessoais pois podem projetar emoções erradas, que não refletem o verdadeiro sentimento do indivíduo. Isto demonstra que o envelhecimento pode ter influência na autoestima do indivíduo e como este é visto pela sociedade (4).

Um cuidado diário cutâneo promove um aumento da regeneração da pele, da sua elasticidade e suavidade. Com o envelhecimento, os principais componentes da pele como o colagénio e a elastina são degradados, dando origem a rugas, requerendo também que haja um foco na prevenção dessa degradação (5).

O combate do envelhecimento passa pelo uso de substâncias pertencentes a dois grupos, que correspondem a antioxidantes, como vitaminas e flavonoides, que reduzem a concentração de radicais livres, e os reguladores celulares como os retinoides e hormonas, que estimulam a produção de colagénio e elastina. O uso do protetor solar deve ser reforçado pois a radiação solar é a principal causa do envelhecimento (1,5–7).

Recentemente tem-se observado um aumento do interesse dos consumidores em ter uma pele com aparência saudável. Devido a este aumento das necessidades dos consumidores, nas últimas décadas é possível observar um crescimento global do mercado dos cosméticos (8,9).

A formulação de cosméticos tem sido sempre um enorme desafio. A indústria cosmética tem feito imensos progressos no desenvolvimento de novos ativos e mais eficazes, mas apesar deste esforço, devido à configuração e funções da pele, esta continua a ser um fator limitante na penetração e absorção destes componentes. Estes têm uma grande dificuldade em atravessar o estrato córneo, camada mais externa da pele que tem função de barreira, o que limita a absorção de compostos e, conseqüentemente, a sua eficácia (8–11).

Devido a esta dificuldade em atravessar o estrato córneo têm vindo a ser desenvolvidas diversas tecnologias de modo a ultrapassar este problema. Algumas dessas tecnologias são as microagulhas, bem como abordagens de iontoforése, sonoforése, eletroporação e nanotecnologias (8,9,11–14).

A nanotecnologia é uma área que tem sido vastamente explorada nas últimas décadas, para as mais diversas aplicações, entre as quais se incluem a área farmacêutica e a cosmética. Estas tecnologias trazem diversas vantagens ao transporte de ativos nas diferentes camadas cutâneas bem como a possibilidade de aumentar a estabilidade e eficácia da formulação e permitir uma penetração mais eficaz de diversos compostos na pele, o que contribui para um efeito cosmético superior. As microagulhas também têm sido apresentadas no contexto da abordagem antienvhecimento como tecnologia disruptiva. São dispositivos capazes de romper a camada mais externa da pele, atravessando-a diretamente e facilitando assim o transporte de ativos para a epiderme, não sendo necessário o uso de métodos mais abrasivos como *peelings*. Métodos como a iontoforése, a eletroporação e a sonoforése possuem a capacidade de alterar temporariamente a permeabilidade cutânea, aumentando a capacidade de transporte de ativos. Estas áreas são alvo de grande investigação devido às diversas vantagens que apresentam (9,11,15–19).

2. Objetivos

Esta dissertação tem como objetivo principal explorar as inovações existentes ao nível das tecnologias utilizadas na abordagem antienvhecimento. É feita uma abordagem inicial descritiva da estrutura da pele e dos seus apêndices, com menção às suas principais funções. Posteriormente, é abordado o envelhecimento, como processo, fazendo-se a sua descrição e incluindo os mecanismos envolvidos bem como as consequências físicas e psicológicas que dele advêm. Após esta parte introdutória é feita uma breve menção às principais dificuldades na formulação de produtos tópicos para a pele, dando o mote para o tema principal da tese, em que se explicam as tecnologias mais utilizadas e o que há de inovador na área do antienvhecimento.

3. Métodos

Esta dissertação consiste numa revisão bibliográfica da literatura disponível acerca da pele, dos mecanismos e consequências do envelhecimento, da sua abordagem preventiva e do seu combate, terminando nas novas tecnologias associadas ao mesmo.

Para a elaboração da dissertação foram utilizados diversos artigos científicos, artigos de revisão, capítulos de livros e páginas *web* que foram devidamente analisados tendo em conta a sua relevância, informação disponibilizada e atualidade. Foram utilizadas diversas bases de dados como o *PubMed*, *B-On*, *Web of Science* e *Science Direct*. Para selecionar a informação mais relevante foram utilizados os seguintes termos, isolados ou em associação: *skin aging*, *antiaging*, *skin delivery systems*, *skin delivery technologies*, *nanotechnologies*, *topical drug delivery*, *cosmetology*, entre outros.

Todos os artigos, capítulos de livro e páginas *web* estão devidamente citados ao longo do texto, sendo referenciados no capítulo “Referências bibliográficas”.

4. Pele

A pele é o maior órgão humano e cobre toda a parte externa do corpo. Incorpora todos os principais sistemas de suporte como os vasos sanguíneos, nervos e músculos, tendo capacidade imunitária, bem como reatividade psico-emotiva, entre outros. Este conjunto de capacidades permite estabelecer a homeostasia da pele e dos seus apêndices (1,20–22).

É dividida em duas camadas principais: a mais externa, denominada epiderme, que consiste num epitélio estratificado escamoso de queratina em constante renovação; e a mais interna, a derme, que é um tecido fibroso-colagénico-elástico que suporta a epiderme, contém vasos sanguíneos, nervos e recetores sensoriais, sendo esta camada mais sensível à radiação ultravioleta, funções endócrinas, entre outras. A pele possui ainda uma terceira camada, a hipoderme, a camada mais profunda e que consiste em tecido adiposo (20,21,23,24).

Entre a derme e a epiderme é possível encontrar o que é denominado de junção dermal-epidermal. Esta camada é sintetizada pelos queratinócitos basais e fibroblastos da derme e dá suporte mecânico à adesão da derme à epiderme. Atua também como barreira para certas substâncias e células, permitindo a troca de substâncias (21,23).

A pele possui diversos apêndices que derivam da epiderme. Estes apêndices incluem os folículos capilares, as glândulas sebáceas e sudoríparas, e ainda as unhas. O conjunto da pele e dos seus apêndices denomina-se sistema tegumentar (20).

A pele altera a sua cor, espessura e textura em diferentes partes do corpo de acordo com as necessidades específicas, sendo este o motivo pelo qual é possível observar diferenças entre a espessura da pele das palmas das mãos e planta dos pés, e a espessura da pele das pálpebras (20,25).

Existem diversas funções importantes asseguradas pela pele. Esta forma uma barreira física entre o corpo e o ambiente, prevenindo a perda de fluidos corporais importantes, protege o organismo de microrganismos patogénicos e contra a penetração de químicos nocivos. Possui a capacidade de comprimir e esticar, tendo também um papel importante na termorregulação, sistema imunológico e sensorial, sendo ainda capaz de representar “ao vivo” informações sobre a fisiologia humana através de sinais como suor, rubor e palidez (20,21,26,27).

4.1 Epiderme

A epiderme possui quatro tipos de células principais: queratinócitos, os mais abundantes; melanócitos; células de Merkel (ou células táteis) e células de Langerhans (20,21,28).

Dependendo da espessura da pele, a epiderme pode possuir entre quatro ou cinco camadas morfológicamente distintas, como está representado pelas figuras 4.1 e 4.2, respectivamente. A pele espessa possui cinco camadas e é normalmente encontrada na palma da mão e na planta dos pés. Este aumento na espessura permite uma maior tolerância a pressão e fricção, nestas zonas (20,21).

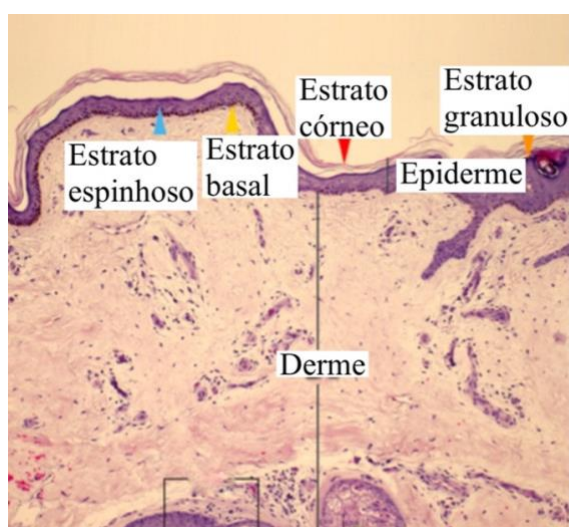


Figura 4.1 – Epiderme com 4 camadas. Adaptado de (20).

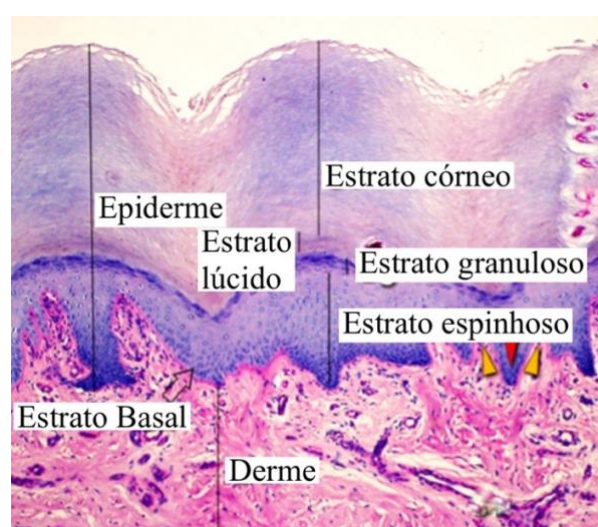


Figura 4.2 – Epiderme com 5 camadas. Adaptado de (20).

As diferentes camadas são formadas devido à diferenciação e queratinização contínua dos queratinócitos. Estes ascendem desde a camada basal a camadas superiores, onde morrem e descamam a partir da superfície. Neste processo eles vão acumulando filamentos de queratina no citoplasma, sendo este composto importante para a proteção da pele, pois, é responsável por manter a estabilidade estrutural e a integridade dos queratinócitos (20,28,29).

A divisão celular das células cutâneas inicia-se pelo estrato basal ou germinativo. Consiste em células mitoticamente ativas que proliferam, migram para superfície e se diferenciam, sequencialmente. Uma célula mantém-se, enquanto a outra é empurrada para cima e diferencia-se até chegar ao estrato espinhoso. Ao migrar para a superfície estas células perdem a capacidade de se dividir e tornam-se maiores e estabelecem conexões intercelulares mais fortes. Os queratinócitos posteriormente alongam-se e tornam-se mais achatados de forma a dar origem ao estrato granuloso. Neste estrato existe a formação de filagrina, que permite a

agregação dos filamentos de queratina em estruturas complexas. No fim, os queratinócitos diferenciam-se em corneócitos, que vão dar origem ao estrato córneo. Durante esta transição as células tornam-se mais achatadas, perdem o seu núcleo e organelos principais e os seus lípidos são libertados para o espaço intercelular (20,22,23,28).

No total, a renovação da epiderme demora em torno de 15 a 30 dias e é influenciada pela idade e região do corpo, entre outros fatores (20).

Da camada mais interior da epiderme até à superfície da pele as camadas são: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido, sendo que este encontra-se apenas presente em zonas onde a pele é mais espessa, e estrato córneo (20,21).

4.1.1 Estrato Basal

Estrato basal, ou estrato germinativo, consiste numa camada única de queratinócitos de forma colunar a cubica, com núcleos grandes. Estas células estão fortemente ligadas à membrana inferior através de hemidesmossomas e às células laterais e adjacentes através de desmossomas (20,21).

Algumas destas células são proliferativas, com atividade mitótica e ficam ligadas à membrana basal como células-tronco enquanto outras diferenciam-se em queratinócitos espinhais do estrato espinhoso e empurram as células superiores para a superfície (20).

Nesta camada podem ser encontrados melanócitos entre as células basais. Os melanócitos são membros do sistema pigmentar da pele e o segundo tipo de célula mais abundante na epiderme. Estas células produzem melanina, um pigmento fotoprotetor, a partir de tirosina e acumulam-na nos melanossomas. Normalmente são células redondas com citoplasma transparente devido à contínua transferência de pigmento de melanina para os queratinócitos (20,21,26,30).

A pigmentação da pele resulta do equilíbrio entre a taxa de transferência de melanossomas para os queratinócitos e a taxa de degradação dos melanossomas nessas mesmas células. Esta transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos assegura a pigmentação da pele, sendo a melanina o único pigmento de coloração que é produzido na própria pele (20,30).

Os melanossomas protegem o DNA dos efeitos da radiação ultravioleta (UV) acumulando-se em forma de “chapéu de chuva” por cima do núcleo. Isto é possível pois a melanina tem a capacidade de absorver e dispersar os raios UV. Estes raios estimulam a produção de melanina e aceleram a sua transferência para os queratinócitos de forma proporcional, ou seja, quanto

maior o contacto com os raios UV, maior, ambos os processos. A exposição solar escurece também os queratinócitos existentes (20,28,31,32).

4.1.2 Estrato Espinhoso

O estrato espinhoso é a camada mais espessa da epiderme e é composta por três a quatro camadas de células. As células da camada basal do estrato espinhoso mostram ter alguma atividade mitótica, semelhante à do estrato basal e por isso, em conjunto, costumam ser referidas como camada Malpighiana. Estas células têm forma de poliedro, possuem núcleos redondos e tornam-se mais achatadas com a sua ascensão à superfície (2,22).

Nesta camada também podem ser encontradas as células de Langerhans. Estas células derivam de monócitos da medula óssea e representam o sistema mononuclear fagocitário da pele. São morfologicamente e funcionalmente semelhantes aos macrófagos e encontram-se mais presentes no estrato espinhoso entre os queratinócitos da camada Malpighiana (20).

Estas células dendríticas são capazes de se ligar, processar e apresentar antigénios às células T, iniciando a resposta imunitária e apresentam um papel importante na resposta a alergias de contacto e outras reações imunitárias da pele mediadas por células (20,21,33).

4.1.3 Estrato Granuloso

O estrato granuloso consiste em entre uma a quatro camadas de células granuladas, achatadas e com forma poligonal. Neste estrato também estão presentes células de Langerhans (20,21,28).

As células deste estrato possuem pequenos grânulos de lípidos lamelares ligados à membrana e libertam o seu conteúdo granular para o espaço intercelular através de exocitose. A substância rica em lípidos presente dentro desta célula preenche o espaço intercelular e forma a maior barreira permeável. Apresentam também uniões íntimas (*tight junctions*) ligadas à lateral da parede das células dos queratinócitos na camada superior do estrato, sendo este um componente importante da barreira da pele (20,34).

4.1.4 Estrato Lúcido

O estrato lúcido é uma camada composta por cinco ou seis filas de células eosinófilas extremamente achatadas que raramente possuem núcleo. É considerado uma subdivisão do estrato córneo (20).

4.1.5 Estrato Córneo

O estrato córneo é composto por 15-20 camadas de células queratinizadas altamente achatadas que perderam o seu núcleo e organelos do citoplasma (20,21).

Esta camada é a principal barreira contra o ambiente externo e é crucial para manter a hidratação cutânea. É descrita como uma “parede de tijolos”, representados na figura 4.3, onde os “tijolos” são corneócitos que estão rodeados por uma “massa”, que consiste numa matriz de lípidos intercelulares contendo ceramidas, colesterol e ácidos gordos livres. Existem ainda outros componentes na barreira cutânea como os corneodesmossomas que ligam, em conjunto com a matriz, os corneócitos entre si (1,24,27,35).



Figura 4.3 – Modelo “parede de tijolos”. Adaptado de (36).

4.2 Junção dermal-epidermal

A junção dermal-epidermal divide-se em duas camadas distintas: a lâmina lúcida, a mais superficial, e a lâmina densa, a mais interior. A lâmina lúcida é composta por filamentos âncora que ligam os hemidesmossomas presentes na membrana plasmática das células basais, à camada mais compacta e interior, a lâmina densa; esta última liga-se à derme a partir de fibras âncora de colagénio (colagénio VII). Nesta junção estão também presentes as *retes ridges* que consistem em extensões epiteliais que se projetam na epiderme e contribuem para a força e conexão da junção dermal-epidermal. (28,37,39).

Esta camada tem como principal função fornecer adesão entre a derme e a epiderme (35).

4.3 Derme

A derme é a camada que fornece suporte e força mecânica à pele, contendo um forte tecido fibro-elástico de suporte. É composta também por feixes de colagénio e outros elementos de tecidos conectivos da derme que se ligam aos da epiderme, criando um limite pouco claro (1,20,27).

A espessura da derme varia de acordo com as diferentes partes do corpo, bem como o género do indivíduo (20,28).

Apresenta duas camadas distintas: a camada papilar, que é a mais superior e a camada reticular, que é a mais inferior. A camada papilar é uma camada fina localizada imediatamente sob a epiderme, que cobre a derme reticular. Esta camada é composta por feixes de colagénio, fibras elásticas, fibrócitos e vasos sanguíneos e tem capacidade de resistir a um elevado stress mecânico. A camada reticular é composta por fibras de colagénio mais densas e compactas e fibras elásticas mais grossas entrelaçadas que lhe conferem elevada resistência (20,21,38).

Os maiores componentes da derme incluem o colagénio, a elastina e o ácido hialurónico, que contribuem para uma pele flexível, suave e macia. O colagénio é o componente presente em maior percentagem, sendo que mais de 90% das fibras presentes na derme são feitas de colagénio intersticial. Existem 20 tipos de colagénios diferentes sendo os mais prevalentes os colagénios tipo I e tipo III, que correspondem a 8-90% e 10-20%, respetivamente. Outros colagénios presentes na pele incluem o V, VI, XII, XIV e XVI presentes na derme e IV, VII, XV e XVIII presentes na camada basal. Estas fibras de colagénio fornecem firmeza, força, resistência mecânica e flexibilidade à pele. O ácido hialurónico é responsável por manter a hidratação da pele, tendo a capacidade de preencher os espaços livres da matriz da pele com água, dando uma aparência mais jovem e firme. A elastina, entre outras fibras elásticas, é responsável pela elasticidade da pele e pela sua capacidade de voltar ao estado normal após deformação. Outras fibras incluem a oxilatina, presente principalmente na camada papilar da derme e a eulanina, presente principalmente na camada reticular da derme. Em conjunto, estas fibras dão origem à rede de microfibras elásticas (34,37,40,41).

As fibras e as células da derme encontram-se incorporadas numa matriz de macromoléculas denominada substância fundamental. Na derme é possível encontrar as partes mais interiores dos apêndices da epiderme como os folículos capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas. Encontram-se também terminações nervosas, recetores sensoriais e uma rede de vasos

sanguíneos, que nutrem as células avasculares da epiderme e regulam a temperatura corporal (20,21,23,33).

Os componentes celulares da derme incluem fibroblastos, dendrócitos e mastócitos. Os fibroblastos são as células principais da derme, estando presentes em abundância na derme papilar, mas em menor número na derme reticular. Estes são responsáveis pela síntese de colagénio, elastina, entre outras proteínas e da substância fundamental. Os mastócitos derivam da medula óssea e estão distribuídos à volta dos vasos sanguíneos e estruturas da derme papilar. Por fim, os dendrócitos representam uma população heterogénea de células dendríticas mesenquimais e podem atuar como fagócitos e células apresentadoras de antígenos (21,23,28,35).

4.4 Hipoderme

A hipoderme é a camada mais interior da pele, estando localizada sob a camada reticular da derme e acima do músculo subjacente. É composta por tecido conjuntivo laxo, tecido esse que normalmente se transforma em tecido adiposo subcutâneo, que vai formar uma camada que varia em espessura dependendo do sexo, localização no corpo e estado de nutrição. Na hipoderme encontram-se fibroblastos, células adiposas e macrófagos (20,21,27).

O tecido adiposo contribui para a manutenção da temperatura corporal, armazenamento de energia e tem capacidade amortecedora. Tem também função endócrina pois dá origem a hormonas como a leptina que regula o apetite e o equilíbrio energético (20,21,27,33).

4.5 Vascularização

A pele possui uma vasta rede de vasos sanguíneos e linfáticos, quer na derme quer na hipoderme. Existem dois plexos sanguíneos que nutrem a pele, o mais interno, que se encontra entre a hipoderme e a derme, próximo da junção dermal-hipodermal, e o superficial que se encontra entre as camadas papilar e reticular da derme. O plexo interno nutre os folículos capilares e as glândulas sudoríparas, bem como o plexo superior. O plexo superficial dá origem a alças capilares que nutrem a epiderme através mecanismos de difusão. Estas estruturas encontram-se representadas na figura 4.4 (20,21,28).

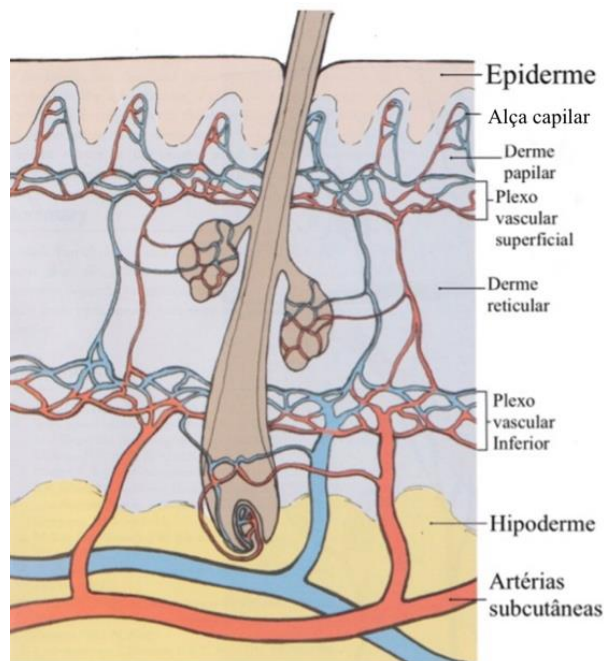


Figura 4.4 – Vascularização da derme e hipoderme. Adaptado de (28).

Os vasos sanguíneos da derme possuem diversos desvios entre os dois maiores plexos. Estes permitem manter uma temperatura constante no corpo pois regulam o fluxo sanguíneo nos capilares da camada papilar. Permitem também a difusão de plasma rico em nutrientes e células do sistema imunitário (20,26).

Os vasos linfáticos, com origem na derme papilar, são revestidos por células endoteliais e convergem para formar dois plexos situados próximo dos plexos sanguíneos. Os vasos linfáticos têm um papel importante na regulação da pressão do fluido intersticial, remoção do excesso de fluido extracelular e nas reações imunitárias (20,21).

4.6 Apêndices da pele

Os apêndices são estruturas epiteliais especializadas localizadas principalmente na derme e hipoderme, mas ligadas à epiderme. Estes incluem a unidade pilossebácea, unhas e as glândulas sudoríparas, que podem ser tanto apócrinas como écrinas (20,21).

A unidade pilossebácea, representada pela figura 4.5, inclui o cabelo, folículos capilares, glândula sebácea e o músculo eretor do pelo (músculo eretor pili). Este músculo contrai em resposta a estímulos do sistema nervoso simpático e esta contração leva à elevação da pele ou aos “arrepios” sendo este músculo também responsável por pressionar a glândula sebácea forçando-a a libertar o seu conteúdo (21,22,28,35).

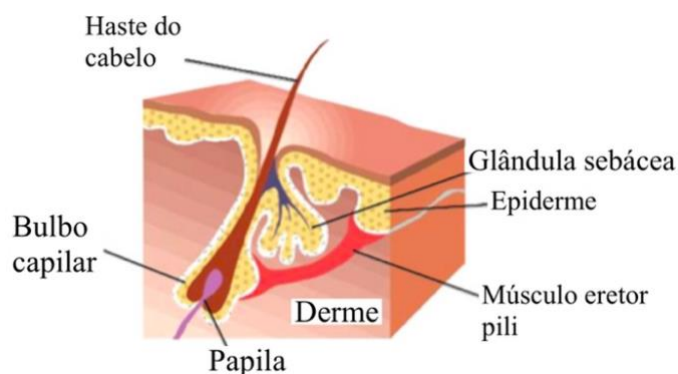


Figura 4.5 – Unidade pilosebácea. Adaptado de (21).

4.6.1 Folículos capilares

Os folículos capilares derivam da epiderme e invaginam profundamente na derme dando origem aos cabelos. Existem três tipos de cabelo humano. O cabelo *vellus* que é fino, curto e suave, e o mais presente em todo o nosso corpo; o cabelo terminal que é longo e grosso e presente no corpo cabeludo e nas sobrancelhas; e o cabelo lanugo, extremamente fino, encontrado na superfície do feto. A pele possui pelos no corpo todo exceto na palma das mãos e na planta dos pés (20,21,31,35).

O bulbo piloso contém a matriz de células que dão origem ao cabelo. Nesta matriz encontram-se também melanócitos que são responsáveis pelo fornecimento de melanina a estas células e, conseqüentemente, determinam a sua cor (20,21,26).

Idade, fatores genéticos, região corporal, gênero e hormonas sexuais determinam a cor, tamanho, comprimento, textura e distribuição do cabelo. O cabelo possui ciclos de crescimento descontínuos e tem 3 fases: fase de crescimento (anagénesse) que pode durar entre 2 e 7 anos, fase de regressão (catagénesse) que dura entre 2 a 3 semanas e fase de repouso (telogénese) que pode durar vários meses (20,21,31,35).

O cabelo tem a capacidade de nos proteger da radiação UV contribuindo para a prevenção de carcinomas (20).

4.6.2 Glândulas

A pele possui glândulas sudoríparas (écrinas e apócrinas), glândulas mamárias, que são glândulas sudoríparas especializadas, e glândulas sebáceas (20).

4.6.2.1 Glândulas sudoríparas

As glândulas sudoríparas écrinas estabelecem-se na derme mais profunda ou na junção dermal-hipodermal e os seus ductos comunicam com a superfície da pele. Têm forma tubular enrolada e encontram-se distribuídas por toda a superfície corporal, com exceção da zona vermelha dos lábios e da zona genital. São mais frequentes nas palmas das mãos, planta dos pés, axilas e testa, estando associadas ao controlo da temperatura corporal e sendo, por isso, componentes bastante importantes do sistema termorregulador (20,21,26,35).

As glândulas sudoríparas apócrinas libertam o seu conteúdo nos folículos capilares de onde originam. Têm igualmente forma tubular enrolada e desenvolvem-se a partir dos folículos capilares acima da abertura das glândulas sebáceas. Estão presentes nas axilas, monte de vénus, aréola do mamilo e região circum-anal (20,35).

4.6.2.2 Glândulas sebáceas

As glândulas sebáceas consistem numa camada de células basais, que proliferam e se diferenciam, dando origem a várias camadas de sebócitos carregados de lípidos. Com a maturação da célula, as gotas de gordura aumentam de tamanho e enchem o citoplasma dos sebócitos que acabam por perder o núcleo e os organelos celulares e por fim desintegram, dando origem ao sebo. O sebo é uma mistura complexa de lípidos tipo cera, composta por triglicéridos, esqualeno, ésteres de cera e colesterol (20,21).

As glândulas sebáceas derivam dos folículos capilares estando presente em maior quantidade na face, testa e couro cabeludo, estando ausentes na palma das mãos, planta dos pés e entre os dedos. Contrações das células mioepiteliais ajudam a impulsionar o sebo para os ductos secretores que libertam o seu conteúdo para os folículos capilares e em algumas áreas como os lábios, glande peniana, superfície mucosa do prepúcio, aréola do mamilo e pequenos lábios, abrem diretamente para a superfície da pele (20,21).

O sebo reveste a superfície corporal e capilar, funcionando como emoliente impedindo a secura cutânea. Apresenta fraca capacidade antibacteriana e antifúngica, mas protege o estrato córneo e o cabelo de danos ambientais. Ajuda também a manter a flexibilidade e textura da pele, aumentando a sua atividade após a puberdade, por influência hormonal (20,21,28,31).

4.6.3 Unhas

As unhas são estruturas completamente queratinizadas sobrepostas sobre a ponta dos dedos. Consistem em células compactas, translúcidas e a unidade da unha inclui a placa da unha (ou placa ungueal) e as suas estruturas de suporte: matriz da unha, leito da unha, dobra da unha, hiponíquio e istmo (31,35,42,43).

Estas estruturas têm diversas funções como proteção das falanges, aumento da destreza e da capacidade de agarrar pequenos objetos, contribuindo também para a percepção tátil, pois fornecem uma pressão contrária na ponta dos dedos. Devido à grande importância e relevância que a aparência das unhas representa na nossa sociedade, elas têm sido alvo de procedimentos estéticos (31,35,42,43).

4.7 Recetores sensoriais

A pele recebe uma enorme quantidade de estímulos por parte do ambiente como o toque, vibrações, pressão, calor, frio, dor e tem recetores apropriados para estes estímulos. Devido à sua presença o indivíduo tem capacidade de sentir dor, que funciona como mecanismo de proteção. Os referidos recetores podem ser encapsulados ou não encapsulados, estando localizados em vários níveis da pele e possuindo uma morfologia bastante variável (20,21,35).

Estes recetores podem ser divididos em 3 grupos de acordo com o tipo de resposta:

- Mecanorreceptores para as vibrações, pressão e toque;
- Termorreceptores para o calor e frio;
- Nociceptores para a dor (20).

Os recetores não encapsulados incluem os discos Merkel, terminações nervosas livres e terminações nervosas peritriciais (20,21).

Células de Merkel associadas a terminações nervosas periféricas dão origem aos discos de Merkel. Os discos de Merkel são mecanorreceptores intraepidermais, com alta sensibilidade ao toque ligeiro e apresentam um papel vital na percepção sensorial (20,28).

As terminações nervosas livres penetram desde a derme papilar às camadas inferiores da epiderme e instalam-se entre os queratinócitos. São sensíveis à dor, pressão ligeira, calor, frio, tato e comichão. Por fim, existem as terminações nervosas peritriciais, que se encontram

enroladas na base do folículo capilar e que, por isso, são facilmente estimuladas por qualquer movimento do cabelo (20,22).

Os recetores encapsulados incluem os corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Vater-Pacini, corpúsculos de Ruffini e corpúsculos de Krause (20,21).

Os corpúsculos de Meissner encontram-se presentes na derme papilar e funcionam como mecanorreceptores sensíveis ao toque, tendo a capacidade de detetar formas e texturas de objetos, representando metade dos recetores tácteis presentes nas mãos e nas pontas dos dedos. Os corpúsculos de Vater-Pacini encontram-se na junção dermal-hipodermal e funcionam como recetores da pressão e vibração, estando presentes em maior número na palma das mãos e planta dos pés. Os corpúsculos de Ruffini encontram-se localizados na camada reticular da derme e têm sensibilidade ao alongamento, sendo bastante comuns em particular na planta dos pés. Por fim, os corpúsculos de Krause situam-se nas membranas mucosas dos lábios e zona genital, sendo a sua função ainda desconhecida (20,21,28,44).

4.8 Funções da pele

A pele incorpora todos os maiores sistemas e mecanismos de suporte do corpo: vasos sanguíneos, nervos, músculo, imunocompetência, sensibilidade à radiação ultravioleta, funções endócrinas, entre outros. Estes sistemas e mecanismos, em conjunto, participam na homeostase da pele e dos seus apêndices (1,30,34).

4.8.1 Função de barreira e imunitária

A principal função da pele é manter um ambiente seguro que permita ao organismo proteger o DNA e reproduzi-lo, sendo esta função assegurada principalmente pela barreira formada pela epiderme, nomeadamente o estrato córneo. A pele é o primeiro contacto entre o ambiente externo e interno e atua como barreira para proteger o corpo e órgãos interiores. Esta barreira funciona bidireccionalmente como uma barreira física porque não só impede a perda de fluidos, eletrólitos e proteínas vitais para o nosso organismo como protege contra infeções, lesões, químicos tóxicos, poluição e radiação UV. O estrato córneo, responsável por abastecer a barreira da pele, é composto por células ricas em proteínas presentes numa matriz rica em lípido que mantêm a função da pele e previnem a perda de água transepidérmica. Outros componentes importantes desta barreira são queratohialina, filagrina, ceramidas, colesterol (20,21,30,45).

A pele possui também péptidos como defensinas, catelicidinas e lípidos sebosos como ácido láurico e ácido sapiénico que atuam prevenindo a invasão de microrganismos patogénicos e químicos tóxicos. Apesar da pele não possuir neutrófilos, estes, após exposição solar infiltram-se na pele, causando o fotoenvelhecimento e queimaduras solares (20,33,35).

A produção de suor também é importante pois ajuda a manter o manto ácido que regula o crescimento de organismos comensais da pele. O pH da pele deve encontrar-se entre 5.4 e 5.9 de modo a permitir a permanência destes organismos. A dermicidina é o exemplo de um composto que é secretado no suor humano e tem atividade microbiana contra um largo espetro de bactérias patogénicas. Os adipócitos têm demonstrado um papel importante na nossa imunidade pois aparentam ser uma fonte significativa de péptidos antimicrobianos (26,33–35).

A pele possui também a capacidade de se regenerar e reparar lesões, função altamente vital. A epiderme começa por selar a ferida enquanto que, na camada inferior, os fibroblastos da derme produzem uma nova matriz para restaurar a derme (20,31).

A barreira natural da pele tem também influência no sistema imunitário. As células apresentadoras de antigénio presentes na pele incluem os macrófagos, células B, células dendríticas e células Langerhans (as mais presentes na epiderme). Estas últimas atuam como células sentinela, inspecionando o ambiente e apresentando os antigénios às células T na epiderme de modo a iniciar uma resposta imunitária local. Quando necessário, estas células têm também a capacidade de migrar para os nódulos linfáticos de modo a iniciar resposta imunitária. Os macrófagos são outro tipo de célula apresentadora de antigénio presente na derme. Este tipo de célula tem a capacidade de detetar patógenos ou algum tipo de dano e iniciar a resposta imunitária adequada. Têm também um papel importante na homeostasia do organismo devido aos mecanismos anti-inflamatórios, contribuindo para a reparação de feridas e nervos após lesão. (26,31,33,35).

4.8.2 Termorregulação e homeostasia

O suor e sistema circulatório constituem o maior sistema de termorregulação do corpo (20).

O fluxo sanguíneo é um mecanismo eficaz para a transferência de calor do corpo para o meio ambiente: o aumento da temperatura corporal leva à vasodilatação, o que resulta numa perda de calor pelo corpo, enquanto uma diminuição da temperatura corporal leva à vasoconstrição, o que diminui a perda de calor pelo corpo. As glândulas sudoríparas produzem o suor a partir do plasma, que evapora na superfície corporal, diminuindo assim a sua temperatura (20,22,26,35).

Por fim, existe a hipoderme que tem como principal função ser um repositório de energia que responde à hipotermia, produzindo calor (33).

4.8.3 Função endócrina

Os queratinócitos são o local onde se dá o primeiro passo da via metabólica da produção de vitamina D. A pró-vitamina D3 é metabolizada em vitamina D3, catalisada pela radiação ultravioleta do tipo B (UVB). A vitamina D é um componente importante para um sistema imunitário e contribui também para a formação dos ossos tendo influência no metabolismo do cálcio (33,35,46).

4.8.4 Função de comunicação e aparência

A pele é também um componente muito importante na beleza exterior sendo por isso o alvo de vários procedimentos estéticos. Representa a aparência individual, influenciando os nossos relacionamentos, representando uma interface e meio de comunicação entre indivíduos e o mundo, permitindo expressar emoções. Através da mesma é possível aferir sobre a saúde do indivíduo, tendo influência tanto no aspecto físico como no psicológico, afetando o humor e autoestima (20,21,34,47).

5. Envelhecimento cutâneo: mecanismos e consequências

A pele incorpora todos os maiores sistemas de suporte do corpo e, apesar de existirem inúmeros mecanismos de defesa para proteger a pele de eventuais danos, a eficácia dos mesmos diminui com o tempo, o que resulta nas características clínicas associadas ao envelhecimento e ao desenvolvimento de diversos tipos de cancro da pele (25,48,49).

O envelhecimento é um processo contínuo, multifatorial e difícil de quantificar. Compreende uma série de alterações fisiológicas e estruturais complexas que ocorrem ao longo do tempo, e é um processo natural de eventos bioquímicos onde é possível observar a acumulação de danos que culminam em doença e, posteriormente, morte celular. A pele está sujeita a dois tipos de envelhecimento, o intrínseco ou cronológico, normalmente ditado por fatores genéticos, celulares e hormonais, e o extrínseco, causado por fatores ambientais, radiação UV, químicos, toxinas, poluição, trauma e hábitos tabágicos. Os danos causados pela radiação UV são predominantes e o principal fator de dano na pele, devido à sua grande influência é designado separadamente de fotoenvelhecimento (7,50–52).

Genericamente, as consequências do envelhecimento na pele e seus apêndices incluem rugas, manchas cutâneas, cabelo acinzentado e, para a maioria dos homens e algumas mulheres, o cabelo torna-se mais fino, podendo terminar em calvície. Estas alterações podem não resultar em perda de função, mas com o aumento da esperança média de vida, não são bem-vindas (1).

5.1 Envelhecimento intrínseco

O envelhecimento intrínseco é determinado cronologicamente e resulta de uma acumulação de danos celulares e alterações genéticas, metabólicas e hormonais. É mais subtil do que o extrínseco, pois a sua evolução é mais lenta e difere bastante nas diferentes partes do corpo, dependendo ainda da população e da etnia. É mais visível em pessoas com idade avançada e é caracterizado pelo aparecimento de manchas e perda de gordura subcutânea. É caracterizado por uma pele lisa, mais pálida, seca e menos elástica com mais rugas e linhas de expressão (1,49,53,54).

Este tipo de envelhecimento inclui mudanças na função celular, proteínas e fatores de crescimento. É controlado por um progressivo encurtamento de telómeros, fenómeno explicado mais adiante, sendo exacerbado pelo dano oxidativo aos telómeros e outros constituintes celulares. O stress oxidativo contribui para o envelhecimento intrínseco não só pelo aumento

de espécies reativas de oxigénio mas também pela redução da capacidade de regeneração celular (1,25,48,53).

Durante este tipo de envelhecimento observa-se uma redução do número de mastócitos e fibroblastos, bem como da produção de colagénio. É possível observar também o achatamento da junção dermal-epidermal e dos *rete ridges*. Esta perda dos *rete ridges* e a sua ligação com a derme papilar rica em capilares é a principal causa do achatamento da derme. Uma consequência deste fenómeno é a redução de suporte nutricional à epiderme avascular pela derme vascular. Os componentes da matriz extracelular (CME) como colagénio, elastina, glicosaminoglicanos, entre outros, encontram-se significativamente diminuídos (48,53–55).

5.2 Envelhecimento extrínseco

O envelhecimento extrínseco é associado ao estilo de vida e resulta da exposição a fatores exógenos e ambientais que promovem o envelhecimento. Os fatores extrínsecos têm um permanente impacto na fisiologia da pele e passam por diferentes tipos de radiação, espécies reativas de oxigénio, poluentes químicos, movimentos repetitivos de músculos e, de uma forma geral, o estilo de vida, stress e hábitos alimentares podem intensificar e acelerar sinais de envelhecimento (1,7,50,53).

As características deste tipo de envelhecimento passam por uma pele pouco elástica, mais espessa e áspera, com rugas mais pronunciadas e com alterações da pigmentação e descoloração (1,49).

A maior fonte de envelhecimento extrínseco é a exposição solar desprotegida, aparecendo os hábitos tabágicos em segundo lugar. As consequências da exposição solar são mais predominantes na face, pescoço e mãos e estima-se que acima de 80% do envelhecimento da pele facial se deve à exposição crónica à radiação UV. O fotoenvelhecimento é causado pela luz solar que consiste principalmente em radiação na gama do infravermelho (52-55%), visível (44%) e UV (3%). A radiação UV pode ser classificada em 3 tipos, A, B e C sendo que a pele não tem contacto com a última pois esta é completamente absorvida pela camada do ozono. Aproximadamente 95% da radiação UV que chega à pele é do tipo A, correspondendo os restantes 5% à radiação UV do tipo B (53,56–58).

A radiação UVA tem capacidade de penetrar camadas mais interiores da pele, penetrando a derme e até a hipoderme, danificando o tecido e aumentando o risco de cancro da pele, apesar de apresentar pouco potencial mutagénico. É responsável pelo aumento das espécies reativas

de oxigénio, tendo um papel predominante no fotoenvelhecimento pois existe em maior percentagem e pode irradiar tanto a derme como a epiderme. A radiação UVB apenas tem contacto com a epiderme, mas tem um alto potencial mutagénico, causando escaldões, bronzeamento. É a maior causa de alterações diretas ao DNA, podendo causar mutações e, consequentemente, iniciar carcinogénese. Esta radiação é também um potente indutor de stress tecidual, podendo induzir inflamação e imunossupressão. Enquanto a radiação UVB é absorvida pelos cromossomas, transformando-os, podendo dar origem a mutações e iniciar foto carcinogénese, a radiação UVA dá origem a espécies reativas de oxigénio que culminam em mutações pré-cancerígenas, danos ao DNA, proteínas, lípidos, redução dos níveis de antioxidantes na pele e inibição da resposta imunitária, impedido o reconhecimento de pequenas neoplasias (48,52,56,59).

Alguns sinais indicadores do fotoenvelhecimento incluem os mencionados anteriormente e adicionalmente um aumento da fragilidade, diminuição da capacidade de cicatrização, e elastose solar, que consiste numa acumulação anormal de fibras elásticas degradadas, entrelaçadas e desorganizadas. A magnitude destes danos é determinada pela quantidade cumulativa de exposição solar e, em casos mais avançados de fotoenvelhecimento, podem observar-se telangiectasias, que correspondem a pequenos vasos sanguíneos claramente visíveis sob a superfície cutânea (33,49,52,60),

As diferenças entre as demonstrações cutâneas de ambos tipo de envelhecimento estão representadas na figura 5.1.

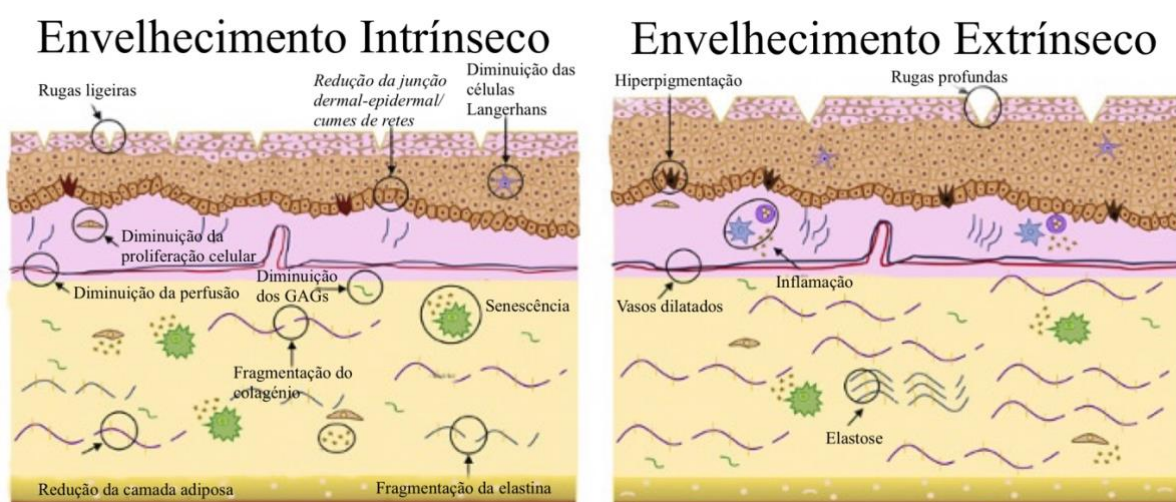


Figura 5.1 – Diferenças cutâneas entre o envelhecimento intrínseco e extrínseco. Adaptado de (54).

5.3 Mecanismos de envelhecimento

Apesar de existirem dois tipos de envelhecimento, e estes terem diferentes vias e mecanismos, o seu efeito é sinérgico e podem resultar em diferentes alterações funcionais e estruturais que afetam vários órgãos, além da pele (7,25,51).

Os mecanismos do envelhecimento cutâneo incluem a ação de espécies reativas de oxigénio e radicais livres, mutações no DNA, encurtamento de telómeros, reparação celular ineficaz, acumulação de agregados proteicos, senescência replicativa e alterações da função mitocondrial. Os mecanismos referidos serão explicados de seguida (1,48,52).

5.3.1 Aumento da produção das metaloproteinases da matriz

Com a exposição à radiação UV existe um aumento da expressão de metaloproteinases da matriz (MMP's), em particular as MMP-1, MMP-3, MMP-9 e MMP-12, que têm como alvo a elastina, fragmentando-a. O hábito de fumar aumenta também a expressão das MMP-1 e MMP-3, que aceleram a degradação dos colagénios tipo I e tipo III. Esta fragmentação leva à alteração do tecido conjuntivo da pele, o que resulta numa menor elasticidade. MMP's são proteinases com capacidade catalítica, ou seja, capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular, acelerando o envelhecimento cutâneo (34,52,61).

5.3.2 Diminuição da expressão do fator de crescimento tumoral

Tanto a radiação UVA como a UVB têm a capacidade de diminuir a expressão do fator de crescimento tumoral (TGF)- β . Esta diminuição resulta numa redução da síntese de colagénio tipo I, culminando em sinais de envelhecimento como rugas e flacidez (33,54).

5.3.3 Aumento de espécies reativas de oxigénio

Aproximadamente 50% dos danos causados pela radiação UV devem-se à sua capacidade de originar radicais livres (58).

Quando a pele é exposta a radiação UV direta ocorrem diversas reações químicas que dão origem a espécies reativas de oxigénio, as quais desencadeiam posteriormente diversos mecanismos que contribuem para o envelhecimento. O contacto com a radiação UV pode levar

à ativação de enzimas como a NADPH oxidase, o que pode induzir a formação do anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que é formado pela redução do oxigénio molecular, com eletrões fornecidos pela NADPH. Este anião pode posteriormente ser transformado em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a partir da superóxido dismutase (SOD). Apesar do (H_2O_2) não ter eletrões não emparelhados pode dar origem ao radical hidroxilo (OH^{\cdot}), composto altamente reativo, sendo que da sua ação irá resultar aumento destes ROS. Outros mecanismos incluem a indução de peroxidação de lípidos, que consiste na remoção de prótons e eletrões de moléculas lipídicas, originando radicais lipídicos, com capacidade de reagir com o oxigénio, que culminam na produção de novas moléculas (63–66).

As ROS induzem também diversas vias de expressão genética. Dois exemplos importantes para a pele são a via sinalizadora NF- κ B (fator nuclear kappa B) e a cascata MAPK (proteína cinase ativada mitoticamente). Estas vias levam à ativação do NF- κ B e da proteína AP-1 (proteína ativadora 1), respetivamente. A ativação da AP-1 resulta na estimulação das MMP's, que degradam o colagénio, resulta também na redução da transcrição do inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP's), que os inibem. Esta proteína tem também a capacidade de suprimir os recetores do TGF- β , que conseqüentemente bloqueiam a síntese de pro colagénio, reduzindo os seus níveis, tendo também a capacidade de ativar o NF- κ B que é o maior ativador da resposta inflamatória. Esta ativação da resposta inflamatória aumenta os níveis de fatores de necrose tumoral α (TNF- α), dá origem a citocinas e interleucinas que, por sua vez, estimulam a produção de ROS. Estes processos estão representados na figura 5.2 e culminam na destruição de componentes da matriz extracelular e por fim, em sinais de envelhecimento (63–65,67).

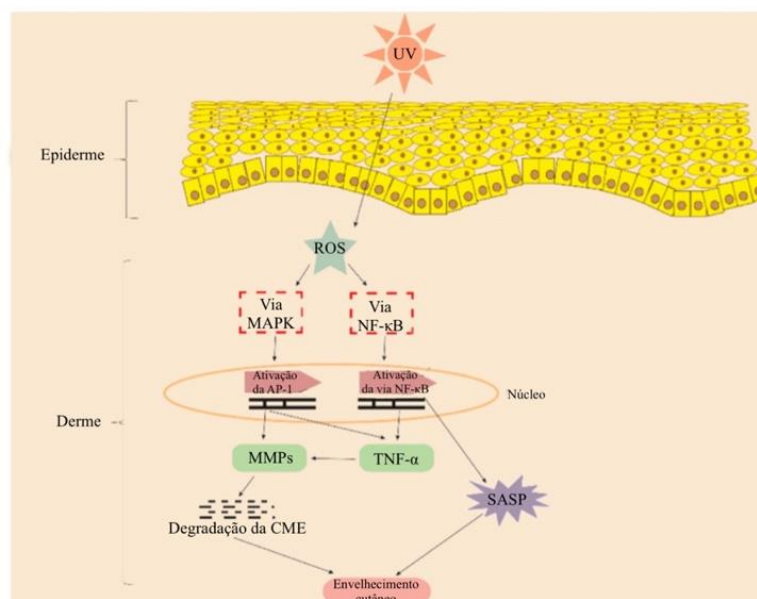


Figura 5.2 – Mecanismo de ação das espécies reativas de oxigénio. Adaptado de (59).

O excesso de produção de ROS induz stress oxidativo que pode ser causado tanto pelas reações químicas anteriormente explicadas, como por alterações na função mitocondrial e stress causado por diversos fatores ambientais. Este stress oxidativo caracteriza-se por uma desregulação na quantidade de radicais livres produzidos e a capacidade do organismo de os neutralizar. Isto gera diversas alterações em vários fenómenos biológicos como mutações e carcinogênese, podendo causar danos severos em estruturas celulares como membranas, lípidos, proteínas, organelos, RNA e DNA, e está envolvido no envelhecimento, na resposta inflamatória e na ativação da secreção de fenótipo secretor associado à senescência (SAPS). Todas estas mudanças e acumulação de danos podem levar a senescência replicativa (56–58,61, 62).

5.3.4 Senescência replicativa

A epiderme possui também a capacidade de se autorrenovar sendo esta capacidade necessária durante toda a vida do organismo. As células têm a capacidade de se dividir um restrito número de vezes, até chegarem a um limite onde ocorre uma completa exaustão da capacidade de regeneração da pele e, conseqüentemente, interrupção permanente da divisão celular, que dura até à morte da mesma. Este fenómeno é descrito como senescência replicativa sendo que a renovação celular diminui para metade entre a 3^a e a 7^a década da vida humana (1,7,56).

A senescência replicativa também pode ser desencadeada em resposta a danos ocorridos no DNA. Este fenómeno normalmente acontece devido a uma exposição extensa à radiação ou a substâncias químicas, podendo também ser causado devido a *stress* celular excessivo. Em ambos os casos se observam células morfológicamente anómalas, mas viáveis, funcionais e metabolicamente ativas, sem capacidade de divisão. Estas células senescentes secretam diversos fatores conhecidos como SASP que induzem senescência em células normais e têm expressões aumentadas de MMP's enquanto a expressão de TIMP's está diminuída (49,53,56,60).

Este SASP tem capacidade de causar enormes mudanças na função e estrutura do tecido, podendo levar a inflamação crónica. Por essa razão, substâncias que eliminem células senescentes (senolíticos) ou neutralizem células senescentes (senostáticos) representam uma boa estratégia no combate ao envelhecimento (61).

5.3.5 Alterações ao DNA Mitocondrial

O DNA mitocondrial está sujeito a danos regulares devido ao *stress* oxidativo e em particular, devido à deleção de uma porção específica de DNA, num processo chamado deleção comum. Esta deleção resulta numa maior acumulação de ROS, o que influencia negativamente a capacidade da célula de gerar energia, sendo 10 vezes mais comum em pele fotodanificada do que em pele não danificada. A extensão do dano do DNA mitocondrial na pele fotodanificada não se correlaciona com a idade cronológica, mas sim com a gravidade do foto dano e o número de deleções do DNA mitocondrial está correlacionado com a idade e envelhecimento (50,52,60,70).

Após o dano, não há como reparar a mitocôndria, pelo que a principal forma de atuação passa pela proteção e prevenção dos danos a esta estrutura, para o que o uso de protetores solares e antioxidantes é crucial (71).

5.3.6 Encurtamento de telómeros

Os telómeros protegem o DNA da degradação por nucleases e previnem conexões terminais entre cromossomas, mantendo a estabilidade da estrutura cromossômica. Em cada divisão celular, o telómero no fim do cromossoma vai perdendo pares de bases, chegando a um ponto onde começa a perder fragmentos importantes de DNA, alterando a função celular. Este encurtamento é um processo normal que ocorre durante a replicação do DNA devido ao problema de replicação e processamento final dos telómeros (7,56,60,72).

O encurtamento dos telómeros atua então, como um relógio mitótico para prevenir proliferação celular desregulada. Este encurtamento resulta também na ativação de proteínas de resposta a danos no DNA, como a p53, uma proteína supressora de tumor. Esta última pode induzir senescência proliferativa ou apoptose, dependendo do tipo célula (7,52,53,60).

5.3.7 Estilo de vida

Os hábitos tabágicos têm grande influência no envelhecimento. Os indivíduos fumadores têm uma aparência mais envelhecida quando comparados com não fumadores e existe uma associação entre o hábito de fumar e a formação de rugas. A nicotina estreita os vasos sanguíneos, o que culmina num menor aporte de nutrientes para a pele. Ocorre também a degradação de tecido elástico e aumento de telangiectasias (37,52,56).

O consumo de alimentos com um alto índice glicêmico leva à produção de produtos finais de glicação avançada que irão danificar o colágeno e o consumo de álcool pode desidratar a pele ao longo do tempo (34,57,71).

5.4 Fototipos de pele

A pigmentação da pele é um importante processo de defesa contra a luz UV. Existem dois tipos de pigmentos de melanina, feomelanina (amarelo avermelhado) e eumelanina (preto acastanhado), sendo este último responsável por proteger a pele dos danos cumulativos da exposição solar. Existem diversos fotótipos da pele, normalmente descritos usando a classificação de *Fitzpatrick*. Esta classificação tem uma escala de I a VI onde os fotótipos são distinguidos a partir do grau de eritema e de pigmentação adquirida após exposição solar. O fototipo I corresponde à pele que “queima sempre, nunca bronzeia” e o VI corresponde à pele que “bronzeia sempre, nunca queima” (1,30).

Quando se comparam os fotótipos é possível observar que as consequências do envelhecimento variam. Nos fotótipos I e II observa-se uma tendência para queratoses actínicas, manchas escamosas e ásperas, consequência da exposição solar, que podem evoluir para cânceros de pele, mas existe uma menor prevalência de rugas e despigmentação. Nos fotótipos III e IV existe uma maior prevalência de rugas profundas e lentigo (hiperpigmentação) (1,73).

5.5 Consequências do envelhecimento

5.5.1 Epiderme

Com o envelhecimento, a epiderme sofre várias alterações estruturais e funcionais. Verifica-se um aumento da secura da pele e esta torna-se mais suscetível a irritações; ocorre atrofia da epiderme devido à diminuição da renovação celular; menor resistência mecânica e menor capacidade de reparação do DNA e existe evidência de que ocorre alteração à permeabilidade de algumas substâncias químicas e aumento da perda de água transepidérmica. A função de barreira da pele encontra-se diminuída, tal como a produção de sebo e suor (7,24,33,51).

Existe também um achatamento da junção dermal-epidermal. Esta reduzida ligação entre a derme e a epiderme diminui não só a resistência da pele à tensão exercida externamente, como também diminui o aporte de oxigénio e nutrientes (1).

5.5.1.1 Queratinócitos e corneócitos

Os queratinócitos da camada basal da epiderme demonstram alguma variabilidade na forma e tamanho. Estes tornam-se mais curtos e achatados enquanto os corneócitos aumentam de tamanho devido à diminuição da renovação celular. O número de camadas do estrato córneo é significativamente maior numa pele mais envelhecida e é possível observar também um declínio na produção de células epiteliais, sendo esta produção responsável pela restauração da pele (1,25,33,51).

5.5.1.2 Melanócitos

O número de melanócitos funcionais diminui em até 20% por década, o que significa uma menor proteção contra os efeitos nocivos da radiação UV, por outro lado, existe um aumento do número de melanócitos numa pele danificada pela radiação solar. Estes encontram-se também distribuídos de forma desigual apresentado uma pele mais envelhecida, um aumento de lesões lentigo. Estas lesões exibem grandes alterações histológicas na camada basal da epiderme nomeadamente alongação dos *rete ridges* (1,51,54).

5.5.2 Derme

A derme consiste principalmente em colagénio e elastina, sendo o seu principal papel fornecer uma camada rígida e flexível que suporta a epiderme e liga a hipoderme (1).

O mecanismo de formação das rugas não é bem conhecido, mas acredita-se estar relacionado com uma atrofia generalizada da matriz extracelular acompanhada de uma diminuição dos fibroblastos e da capacidade de sintetização (1).

É possível observar também uma redução do volume de gordura subcutânea apesar da gordura corporal total aumentar até por volta dos 70 anos. Esta perda de gordura é mais visível na face, pés e mãos. Os nervos e recetores são pouco afetados pelo envelhecimento, mas alguns estudos indicam uma diminuição da perceção sensorial e aumento do limiar da dor (1).

5.5.2.1 Vasculatura da derme

O envelhecimento pode ser associado a uma diminuição da circulação, especialmente em áreas expostas ao sol. Esta redução da vascularidade é especialmente detetável na derme papilar superficial onde é possível observar perda das depressões causada pelos *retes ridges*. Os vasos sanguíneos são finos e dilatados, apresentados como telangiectasia. Uma redução da vascularidade resulta numa pele pálida, com reduzida capacidade de fazer troca de nutrientes e termorregulação alterada (1).

5.5.2.2 Constituintes da matriz extracelular

Com o aumento da idade os componentes constituintes de matriz extracelular diminuem (25,54).

Os glicosaminoglicanos (GAG's) como o ácido hialurónico são altamente hidrofílicos e ligam uma grande quantidade de água. Com o aumento da idade o número de GAG's aumenta, contudo, observa-se uma alteração da estrutura molecular água para a sua estrutura tetraédrica. Esta estrutura leva a uma menor hidratação e menor rigidez da pele, o que contribui para uma pele mais seca. Ocorre também uma diminuição da produção das três espécies lipídicas mais importantes: ceramidas, colesterol e ácidos gordos (7,25,53).

A alteração do colagénio é bastante importante no processo de envelhecimento. Os colagénios (nomeadamente o I, III e V) são os principais componentes extracelulares da derme e são a base estrutural de diversas redes de proteínas. Com o aumento da idade, estes feixes de colagénio aumentam de densidade, mas tornam-se mais fragmentados, desorganizados e menos solúveis. Ocorre também uma diminuição da produção do colagénio tipo I, o que vai resultar numa alteração da proporção entre colagénios. Existem também alterações nos níveis de colagénio tipo IV e VII, sendo o colagénio tipo IV um componente importante da junção dermal-epidermal, pois fornece estrutura para outras moléculas e tem um papel importante na estabilidade mecânica. Este conjunto de alterações reduz a integridade do tecido (1,7,25,33).

A elastina exhibe diversas alterações relacionadas com o envelhecimento. É possível observar uma localização anormal na camada superior da derme e a sua degradação. O aumento da anormalidade da elastina leva a uma diminuição da resiliência e elasticidade da pele e o tempo de recuperação à pressão mecânica aumentado. A elastose solar é uma das características mais marcantes, histologicamente, de uma pele danificada pelo sol (7,33,48).

5.5.2.3 Fibroblastos

A função e arquitetura da derme depende de várias células, principalmente dos fibroblastos da derme. O número de fibroblastos diminui com idade, consequência da redução da sua atividade proliferativa. Por outro lado, fibroblastos “adultos” da derme normalmente são células quiescentes e o seu envelhecimento tem também influência na produção de citocinas e hormonas (7,25,54,56).

5.5.3 Apêndices da pele

A redução das glândulas sudoríparas e dos compostos por si libertados, consequência do envelhecimento, tem impacto na termorregulação de todo o corpo. O odor corporal irá diminuir e a pele torna-se mais seca e menos hidratada devido a alterações nas glândulas sebáceas (1,49,54,56).

O crescimento das unhas aumenta até aos 25 anos, depois disso o ritmo de crescimento tem tendência a diminuir. Em relação aos folículos capilares, os pelos púbicos, do peito e das axilas diminuem a densidade com a idade. A alopecia afeta 50% dos homens até aos 50 anos e 50% das mulheres até aos 60 (1).

5.5.4 Função imunitária

Com o aumento da idade, o sistema imunitário sofre diversas alterações, tornando-o mais suscetível a infeções e doenças autoimunes (25,49).

A densidade de células de Langerhans na pele diminui, mesmo nas áreas protegidas pelo sol e estas tornam-se menos sensíveis a antígenos específicos. Componentes celulares como macrófagos e mastócitos, encontram-se reduzidos, sendo estes importantes para a resposta inflamatória das células. Ocorre também um aumento do pH do estrato córneo, o que vai alterar a homeostasia da permeabilidade da barreira, a integridade do estrato córneo e a sua coesão. Todas estas alterações resultam numa redução da intensidade a reações de hipersensibilidade e aumento da suscetibilidade à fotocarcinogénese e infeções crónicas da pele (1,25,51,54).

5.5.5 Regeneração e reparação de lesões

A regeneração cutânea e reparação de lesões é menos eficaz em indivíduos com idade avançada. Devido à diminuição e achatamento da junção dermal-epidermal e à diminuição de componentes celulares e de componentes constituintes da matriz extracelular observam-se alterações na integridade da pele e aumento da sua suscetibilidade a lesões. Estas lesões irão ter uma regeneração celular mais lenta, pois a epitelização está diminuída devido à menor capacidade de proliferação dos queratinócitos (25,51).

6. Prevenção e Combate ao envelhecimento

Recentemente tem-se observado um aumento do interesse dos consumidores em ter uma pele com aparência saudável. Este fator, associado ao aumento da esperança média de vida, levou a um maior interesse do público em geral pelo cuidado cutâneo. Medidas interventivas no envelhecimento intrínseco são difíceis, mas a prevenção e combate de alterações causadas pelo envelhecimento extrínseco são alvo de grande investigação (1,8,9,55).

6.1 Prevenção

Hábitos de prevenção de envelhecimento devem ser adotados antes dos 30 anos de idade, dependendo do risco de formação de rugas e outros sinais de envelhecimento do indivíduo (71).

Medidas educativas devem ser igualmente implementadas, pois o cumprimento é um grande problema quando se trata de tratamentos cutâneos. A rotina diária é essencial e deve ser executada de modo a fortalecer e promover a elasticidade e regeneração da pele, prevenindo a formação de rugas e degradação de colagénio e elastina. Esta rotina deve incluir no mínimo o uso diário de protetor solar, retinoides tópicos aplicados à noite e antioxidantes (34,71).

6.1.1 Medidas Preventivas

A luz solar, principalmente radiação UV, é responsável pela maior parte dos sinais de envelhecimento cutâneo, pelo que devem ser adotadas medidas preventivas. Estas medidas incluem o uso de roupa protetora, chapéu e óculos de sol. A exposição solar deve ser limitada, permanecendo à sombra principalmente nas horas de maior calor, sendo o uso de protetor solar igualmente essencial (57,64,73,76).

6.1.2 Estilo de vida

O estilo de vida também tem grande influência na pele. Uma dieta equilibrada, rica em vitaminas e nutrientes ajuda a prevenir certos danos que levam a um envelhecimento precoce. Estes compostos muitas vezes possuem propriedades antioxidantes que neutralizam o dano causado por radicais livres (57,66).

A redução do consumo de alimentos com alto índice glicémico e de ingestão de álcool, bem como o aumento do consumo de frutos secos são mudanças benéficas, sendo a última medida capaz de diminuir os processos inflamatórios, dada a capacidade de diminuir moléculas inflamatórias, bem como espécies reativas de oxigénio (34,57).

A cessação de hábitos tabágicos é também uma grande ajuda tendo em conta os efeitos nocivos que a nicotina tem na pele. Dormir bem e as horas necessárias é também essencial pois ajuda a vitalizar o corpo e atribui uma aparência mais jovem. O exercício físico melhora a circulação e a função mitocondrial (57,74–76).

6.2 Combate ao envelhecimento

O objetivo principal dos componentes utilizados antienvhecimento é proteger e rejuvenescer células importantes para o envelhecimento, como os queratinócitos e os fibroblastos. Existem diversos compostos com esta capacidade, a maior parte deles com propriedades antioxidantes, sendo alguns exemplos vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos (56,59,71,77).

6.2.1 Vitaminas e antioxidantes

Vitaminas são um grupo de compostos com diversas estruturas químicas, essenciais para o normal funcionamento do organismo humano, tendo muitas delas capacidade antioxidante. Um antioxidante é qualquer molécula capaz de bloquear radicais livres e/ou espécies reativas de oxigénio, impedindo-os de roubar eletrões a outros átomos, podendo ser tanto moléculas endógenas como exógenas. Têm diversos modos de atuação que incluem a captação de radicais livres, diminuição da ativação de proteínas cinase mitogénicas e supressão de fatores inflamatórios sendo, deste modo, essenciais no combate e prevenção do envelhecimento, atenuando os danos causados pelos radicais livres e ajudando a manter uma pele saudável (63,66,71,78,79).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou químicos, podendo os últimos ser divididos em solúveis em água e solúveis em óleo. Exemplos de alguns solúveis em água incluem a vitamina C (L-ácido ascórbico), EpiGaloCatequina-3-O-Galato (EGCG) e vitamina B3 (niacinamida), enquanto os solúveis em óleo incluem vitamina A (retinol), vitamina E (α -tocoferol) e

coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀). Alguns exemplos de antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase e a catalase (34,58,66,80).

A vitamina C é dos antioxidantes mais abundantes na pele e requer um ambiente ácido para ser melhor absorvida. Não só é um potente antioxidante e fotoprotetor como tem propriedades anti-inflamatórias devido à sua capacidade de desativar o NF-κB, de inibir a expressão de TIMP's e de estimular a produção de colagénio nos fibroblastos. Tem também a capacidade de reduzir a produção de melanina, sendo um bom candidato no tratamento da hiperpigmentação (74,80–82).

A vitamina E está presente em 8 isoformas, sendo a α-tocoferol a mais ativa. Tem capacidade de neutralizar o efeito dos radicais livres, diminuir a ativação NF-κB, aumentar a síntese de colagénio e diminuir a sua degradação. Tem também a capacidade de reduzir a hiperpigmentação causada pela radiação UV, tendo capacidades fotoprotetoras. As vitaminas E e C são muitas vezes usadas em conjunto devido à sua conhecida sinergia (81–84).

A vitamina A (retinol) e os seus derivados (retinoides) são compostos importantes numa rotina de pele saudável. Estas moléculas apresentam três ações principais: aumentam a espessura da pele por estimulação da proliferação de novas células, nomeadamente os queratinócitos; aumentam a vascularização da pele e a produção de componentes da matriz extracelular através da ativação dos fibroblastos. Têm também a capacidade de regular a função das glândulas sebáceas, limitando a produção de sebo, tendo também influência na distribuição de melanina na pele. Este tipo de moléculas leva a alguma sensibilidade cutânea, devendo ser usada com precaução (73,79,86,87).

A niacinamida, amida da vitamina B3, é outro elemento bastante importante na rotina de uma pele saudável. Previne a perda de colagénio na derme, tem propriedades anti-inflamatórias e reduz a pigmentação cutânea devido à sua capacidade de suprimir a transferência de melanossomas. Tem a capacidade de regular a produção de sebo e reter hidratação, tendo grande influência na reparação e síntese de moléculas de DNA, fornecendo às células a energia que as enzimas reparadoras necessitam. Aumenta a produção intracelular de lípidos, o que consequentemente reduz a perda de água transepidermica e amplifica a função de barreira do estrato córneo (71,73,88,89).

O selénio é um mineral importante na função corporal e cutânea sendo necessário para o funcionamento de diversas enzimas com capacidade antioxidante, controlando o potencial redutor nas células. Tem propriedades anti-inflamatórias e capacidade de reverter os danos

causados pela radiação UV, protegendo o DNA contra danos regulando a sua síntese e transcrição (78,79,83).

6.2.2 Polifenóis

Os polifenóis são compostos orgânicos que estão divididos em cinco grupos principais de acordo com a sua estrutura química: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e diferuloilmetano, sendo os flavonoides os mais investigados. As suas propriedades antioxidantes resultam da capacidade de captar e eliminar espécies reativas de oxigênio, aumentar a expressão de enzimas antioxidantes como a SOD e da capacidade de potenciar o efeito de outros antioxidantes. Devido à sua estrutura, estes compostos têm capacidade de absorver radiação ultravioleta evitando a sua penetração na pele, conferindo algum fator de proteção solar, sendo capazes de inibir a melanogênese (32,68,77,89).

Os flavonoides possuem, para além das propriedades já descritas, a capacidade de perturbar a ativação do NF- κ B, tendo propriedades anti-inflamatórias. Outro composto de interesse é o EGCG, presente no chá verde, planta rica em polifenóis. Este composto tem, para além das propriedades já descritas, a capacidade de induzir certas interleucinas de modo a aumentar a produção de enzimas que reparam os danos ao DNA. Causados pela radiação UV. É também capaz de diminuir o eritema causado pela exposição solar e diminuir a formação de escaldões (61,77,79,90).

6.2.3 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos presentes em diversas plantas. Estes compostos têm a capacidade de estimular a produção de colagénio e elastina, inibir a atividade das MMP's, tendo propriedades anti-inflamatórias e de proteção UV, o que lhes confere uma ação protetora e de antienvhecimento. Demonstraram ter capacidade de melhorar a elasticidade, hidratação e textura da pele e reduzir a perda de água transepidérmica. Ajudam também a estabilizar outros antioxidantes, potenciando o seu efeito. Alguns exemplos são os β -carotenos e o licopeno (68,79).

6.2.4 Agentes hidratantes e agentes reparadores de barreira

Existem diversos agentes hidratantes como agentes oclusivos, humectantes e emolientes, ou uma mistura dos três, que têm capacidade de suavizar a pele, aumentar a sua hidratação e melhorar a sua aparência (34,88,90).

Agentes oclusivos têm capacidade de nutrir a barreira física da epiderme, formando uma camada que previne a perda de água transepidérmica. Esta diminuição de perda de água pela epiderme deve-se ao facto de agente oclusivo aumentar o conteúdo lipídico da pele. Alguns exemplos incluem o óleo de jojoba, cera de abelha e óleo de coco, sendo que os dois últimos atuam também como emolientes. Emolientes são substâncias com capacidade de penetrar camadas inferiores da pele, preenchendo os espaços entre os corneócitos, tornando a pele mais suave e flexível, ajudando a reduzir a aparência áspera e escamosa. Alguns exemplos incluem manteiga de cacau e manteiga de karité. Os humectantes atuam atraindo a água tanto da derme como da atmosfera para o estrato córneo. São exemplos destas substâncias o ácido hialurónico, glicerina e ureia, entre outros (34,88,90).

Agentes reparadores de barreira são ingredientes importantes para o fortalecimento da barreira cutânea. Alguns exemplos incluem ómega 3 e 6, colesterol e ceramidas, tendo as últimas a capacidade de penetrar o estrato córneo, sendo posteriormente sintetizadas, processadas e, conseqüentemente, excretadas para o estrato córneo. A barreira lipídica presente na pele ajuda não só a manter as células juntas, mas também a manter a aparência saudável e hidratada, mantendo as moléculas de água e fatores de hidratação “presos” no estrato córneo, garantindo a sua firmeza (34,45,88,91).

6.2.5 α - e β -hidroxiácidos

Hidroxiácidos são esfoliantes tópicos com capacidade de aumentar a renovação celular descartando as peles mortas, aumentando a capacidade da pele de reter hidratação. Têm por isso a capacidade de reverter alguns efeitos do envelhecimento como manchas, pele seca e rugas (34).

Estão divididos em α -hidroxiácidos e β -hidroxiácidos. Os α -hidroxiácidos incluem os ácidos cítrico, glicólico e lático, enquanto os β -hidroxiácidos se referem a componentes como o ácido salicílico. Os α -hidroxiácidos são solúveis em água sendo melhores para pele seca e

envelhecida, por outro lado, os β -hidroxiácidos são solúveis em óleo, sendo mais adequados para o tratamento de pele oleosa e com acne. (34,71,90).

A tabela 6.1. reúne informação sobre todos os ativos utilizados atualmente na abordagem antienvelhecimento, bem como a sua função.

Tabela 6.1 – Ativos usados na abordagem antienvelhecimento e a sua função na pele. Adaptado de (5,68,79,88,90,92,93).

Composto	Mecanismo de Ação	Atuação na pele
Vitamina C	Capta radicais livres; reduz o dano oxidativo causado pela radiação UV	Antioxidante; fotoprotetor; promove a produção intra e extracelular de colagénio; estimula a síntese de GAGs e ceramidas
Vitamina E	Capta radicais livres; estabiliza as membranas celulares; reduz a ativação do NF- κ B	Antioxidantes; fotoprotetor; promove a produção de elastina, colagénio e GAGs
Vitamina A e derivados	Capta radicais livres; redução da expressão de MMP-1	Antioxidante; fotoprotetor; estimula a síntese de proteínas e células epidermais; estimula síntese de colagénio e elastina; protege o colagénio de degradação
Niacinamida	Inibe o NF- κ B e a proteína AP-1; inibe a transferência de melanossomas	Fotoprotetor; anti-inflamatório; estimula a síntese de proteínas epidermais; diminui a perda de água transepidérmica
Selénio	Auxilia enzimas responsáveis por minimizar dano causado por radicais livres	Antioxidante; protege o DNA, promovendo a sua a síntese e reparação
Polifenóis	Captam radicais livres; suprimem citoquinas pro-inflamatórias;	Antioxidante; anti-inflamatório; reduzem o eritema causado pela radiação UV

Composto		Mecanismo de Ação	Atuação na pele
Carotenoides		Captam radicais livres; diminuem a atividade da MMP-1/3/9/10;	Antioxidante; anti-inflamatório; protegem os CME de degradação
Agentes hidratantes	Oclusivos	Contribuem para a formação de uma barreira impermeável	Suavizam a pele; diminuem a perda de água transepidérmica
	Humectantes	Captam água da atmosfera e camadas inferiores da pele	Hidratam a pele
	Emolientes	Penetram camadas inferiores do estrato córneo, preenchendo os espaços entre os corneócitos	Reduzem a aparência escamosa da pele
Agentes reparadores de barreira		Penetram camadas inferiores do estrato córneo, preenchendo os espaços entre os corneócitos	Reforçam a barreira cutânea; reduzem a aparência escamosa da pele
Hidroxiácidos	α	Queratolíticos solúveis em água	Aumentam a renovação celular; aumentam a produção de colagénio
	β	Queratolíticos solúveis em óleo	

6.3 Pele como via de administração

A camada mais externa da pele tem elevada capacidade protetora, impossibilitando a absorção e penetração de diversos compostos para camadas inferiores da pele. Para se observar um efeito, o composto administrado deve ter não só a capacidade de atravessar a barreira cutânea, como também a capacidade de chegar lá em quantidade suficiente para surtir efeito, o que nem sempre acontece, dificultando a ação antienvhecimento. Devido a esta dificuldade de penetração na pele estão a ser investigados e projetados novos sistemas de administração cutânea com capacidade de chegar às camadas mais interiores da pele, de forma a que possa observar-se um resultado efetivo (15,96–99).

7. Novas Tecnologias

Sistemas de veiculação de substâncias ativas são tecnologias utilizadas de modo a transportar um ativo ao seu alvo de forma controlada. Tendo em conta que a pele atua como barreira a moléculas exógenas, estes sistemas são usados pois possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade da pele aos ativos, sendo de elevada importância devido à preocupação em manter o componente ativo nas camadas superficiais da pele e evitar a sua absorção sistémica, quando se trata da abordagem antienvhecimento. É importante mencionar que muitos dos compostos ativos utilizados no combate ao envelhecimento são bastante sensíveis à luz, oxigénio, temperatura, sendo facilmente degradados, algo que também é melhorado com o uso destes sistemas de transporte (96,99,100).

Transportadores baseados em nanopartículas são de particular interesse no transporte de ativos para a pele. Devido à boa compatibilidade com a pele, sistemas baseados em lípidos demonstram ser mais favoráveis para a libertação destes ativos na pele. Alguns destes transportadores baseados em lípidos são mais versáteis e apresentam como vantagem uma menor toxicidade intrínseca devido à sua semelhança aos lípidos fisiológicos. Apresentam também como vantagem a capacidade de aumentar a solubilidade de compostos ativos pouco solúveis ou até mesmo insolúveis em água (97,98,101).

7.1 Nanotecnologias

Nanotecnologia é a ciência que estuda nanoestruturas, que são qualquer material menor que 1000 nanómetros, que apresenta propriedades óticas, cinéticas e elétricas únicas. Vários sistemas de veiculação de compostos ativos ou de outras moléculas de interesse têm aplicação na área cosmética, podendo dividir-se em nanopartículas à base de lípidos, nanopartículas à base de polímeros, nanocristais e outros nanossistemas adicionais, representados na figura 7.1. As principais vantagens destes sistemas são a capacidade aumentar a estabilidade de diversos ativos nas formulações, aumentar a permeabilidade e eficácia de alguns compostos ativos, permitir uma libertação de composto ativo no local de ação de forma controlada e tornar os produtos esteticamente mais agradáveis. Algumas das desvantagens que podem ser apontadas a estas tecnologias são a reduzida estabilidade a longo prazo exibida em alguns casos, pouca capacidade de associação de moléculas e ainda a necessidade de utilizar uma grande quantidade de surfactante na produção de alguns sistemas, o que pode ser irritante para a pele (102–105).

Os sistemas nanotecnológicos demonstraram ser ferramentas eficazes para ultrapassar a barreira cutânea sem alterar a sua integridade. As próximas secções detalham cada um dos tipos de sistema de veiculação de maior relevo na área da cosmética (13,98,103).

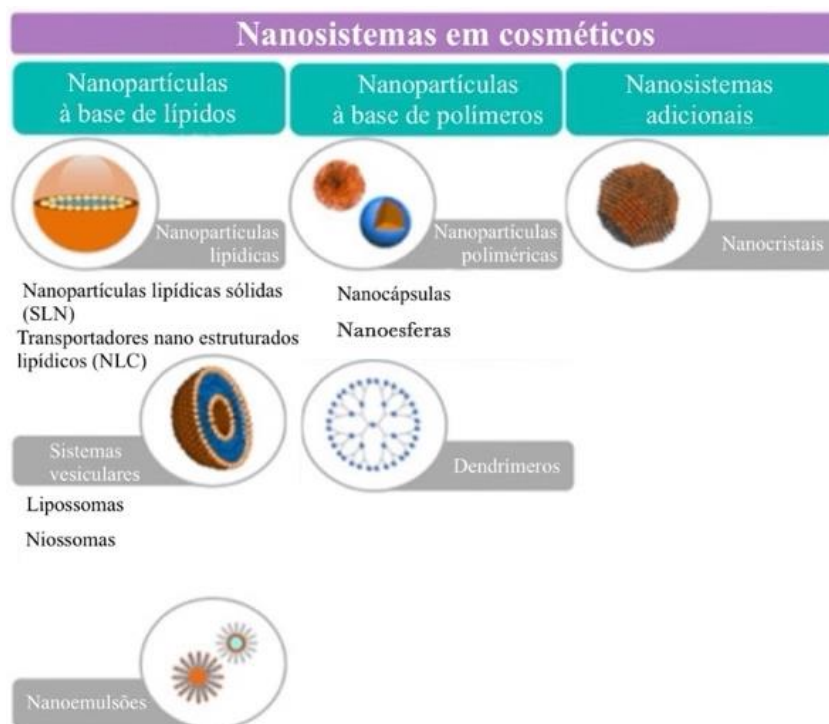


Figura 7.1 – Classificação das diferentes nanotecnologias descritas para aplicação na área cosmética. Adaptado de (15).

7.1.1 Nanoemulsões

Nanoemulsões são sistemas heterogêneos de dois líquidos imiscíveis, estabilizados por surfactantes, que consistem numa fina dispersão de composto ativo em nano gotas, representadas na figura 7.2. São termodinamicamente e cineticamente estáveis, de tamanho uniforme muito reduzido (gotículas entre 5 e 200 nm). Podem ser classificadas, de acordo com os componentes, em 3 categorias: água em óleo (A/O) onde a fase aquosa está dispersa numa fase oleosa contínua; óleo em água (O/A) onde a fase oleosa está dispersa numa fase aquosa contínua e bi-contínua ou múltipla onde micro domínios de fase aquosas e oleosas estão inter dispersas no sistema. Podem ainda ser classificadas de acordo com a carga superficial das gotículas nano em neutras, aniónicas e catiónicas (97,106–109).

As nanoemulsões têm diversas vantagens: elevada capacidade de permeabilização, elevado poder hidratante, elevada estabilidade, rápida absorção e boa capacidade de transportar moléculas de elevado tamanho molecular, voláteis e irritantes. Apresentam também uma boa

interação com as células cutâneas, pois conseguem alterar de forma reversível o arranjo celular do estrato córneo devido ao seu reduzido tamanho e grande área superficial. Estas características tornam as nanoemulsões bons candidatos para sistemas de veiculação cutânea, apesar de terem uma estabilidade de armazenamento relativamente reduzida (9,98,103,106,108).

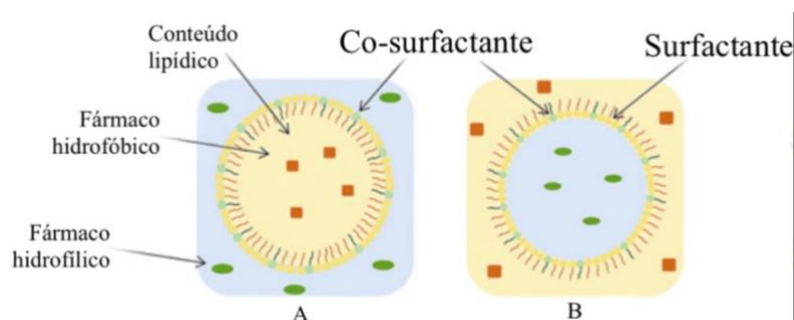


Figura 7.2 – Representação das nanoemulsões. A) Óleo em água. B) Água em óleo. Adaptado de (106).

Existem várias descrições na literatura do uso de nanoemulsões em ativos como vitamina E, flavonoides e polifenóis como o resveratrol que, no geral, apresentam todas as mesmas vantagens, uma toxicidade reduzida, uma maior estabilidade e maior penetração e retenção cutânea. Sharma *et al.* demonstraram que o resveratrol, quando incorporado em nanoemulsões ou nanoemulsões em gel, apresentava uma maior deposição na pele quando comparado com géis convencionais. A nanoemulsão em gel não só apresentou uma maior deposição como esta foi mais profunda na pele (103,104,110,111).

Um estudo de El-Leithy *et al.* demonstrou um aumento da permeabilidade de CoQ₁₀ na pele de ratos quando este composto é aplicado na forma de gel à base de nanoemulsão sendo que esta alteração contribuiu para um aumento na eficácia deste composto no combate às rugas (112).

O estudo focou-se no desenvolvimento de uma nanoemulsão capaz de transportar CoQ₁₀, bem como aumentar a sua solubilidade, permeabilidade cutânea e, conseqüentemente, potenciar o efeito antienvhecimento. A formulação foi preparada dissolvendo CoQ₁₀ numa mistura de óleos, surfactantes e co-surfactantes por ultrasonicação até obtenção de um líquido transparente. No total foram preparadas 18 formulações que foram posteriormente otimizadas, tendo-se selecionado as F2, F8 e F14 para prosseguir os estudos, por apresentarem maior estabilidade e concentração de CoQ₁₀ adequada. A sua caracterização está presente na tabela 7.1 (112).

Tabela 7.1 – Caracterização das nanoemulsões selecionadas. Adaptado de (112).

Caracterização	F2	F8	F14
pH	7.06 ± 0.051	7.16 ± 0.045	7.15 ± 0.180
Viscosidade	199.05 ± 0.35	236.75 ± 18.87	8035.5 ± 375.47
Tamanho de partícula (nm)	11.76 ± 1.1	11.17 ± 0.95	11.73 ± 1.17
Índice de polidispersidade	0.228	0.278	0.262
Potencial zeta (mV)	-14.7 ± 1.23	-17.2 ± 1.70	-11.3 ± 0.99
Conteúdo de ativo	101.58 ± 0.142	102.85 ± 0.500	101.08 ± 0.800

O estudo *ex vivo* foi realizado em ratos através do método difusão de Franz. Foi comparada a permeação de nanoemulsão de CoQ₁₀ com o controlo, que corresponde a uma suspensão de CoQ₁₀ 1% w/v em lauril sulfato de sódio. Os resultados obtidos estão representados na figura 7.3. As três formulações apresentaram um efeito significativo na quantidade de CoQ₁₀ que atravessou a pele dos ratos. A eficácia de absorção de CoQ₁₀ através das nanoemulsões pode ser explicada pelo facto de o composto estar dissolvido no conteúdo lipídico da nanoemulsão, podendo penetrar o estrato córneo diretamente, o que aumenta a permeabilidade destes compostos ativos. O conteúdo aquoso presente na formulação ajuda também a hidratar o estrato córneo da pele, potenciando a libertação destes compostos (112).

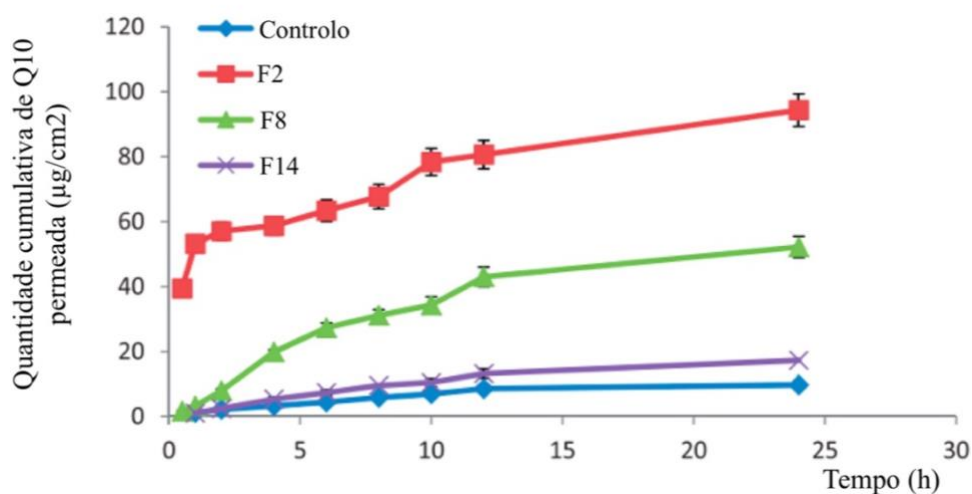


Figura 7.3 – Estudos de permeabilidade *ex vivo* de nanoemulsões CoQ₁₀ em comparação com o controlo. Adaptado de (112).

Após 24 h, a eficácia da nanoemulsão na penetração nas diversas camadas da pele foi avaliada pela determinação da quantidade de CoQ₁₀ retida na pele do rato (figura 7.4). Isto permitiu observar que as nanoemulsões permitiram uma alta retenção dos compostos ativos na pele, em comparação com o controlo, encontrando-se em maior quantidade na F2. Estes resultados demonstram a eficácia das nanoemulsões no transporte de CoQ₁₀ (112).

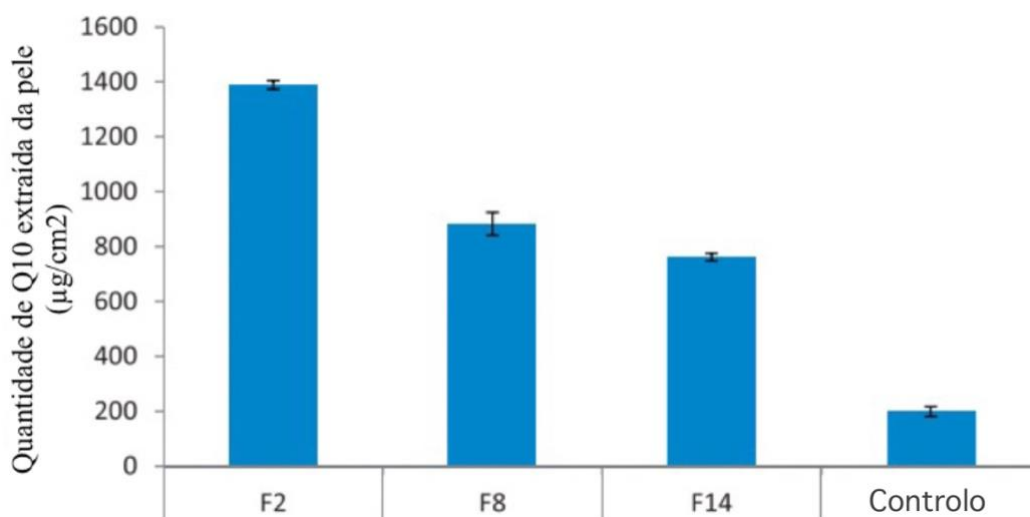


Figura 7.4 – Quantidade de CoQ₁₀ extraída da pele dos ratos no fim dos estudos de permeabilidade *ex vivo*, em comparação com o controlo. Adaptado de (112).

7.1.2 Nanopartículas à base de lípidos

Nanopartículas à base de lípidos geralmente são compostas por fosfolípidos, colesterol, ácidos gordos e triglicéridos e podem ser classificadas em dois grupos principais: nanopartículas lipídicas e sistemas vesiculares, sendo o mais importante neste último grupo, os lipossomas. A principal vantagem destas nanopartículas de base lipídica inclui a sua semelhança com os lípidos da epiderme, o que facilita a penetração cutânea (97,98).

7.1.2.1 Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas possuem tamanho entre 150-300 nm e podem ser divididas entre nanopartículas lipídicas sólidas e transportadores nanos estruturados lipídicos. Este grupo pode ser adicionado a formulações cosméticas existentes devido à sua estabilidade física, compatibilidade com outros compostos e efeitos secundários reduzidos. Apresentam a capacidade de contribuir para a hidratação da pele, melhorar a penetração dos compostos e

proteger os mesmos da degradação, prolongando a sua atividade e, conseqüentemente, aumentando a eficácia do tratamento. Em comparação com lipossomas, apresentam uma maior capacidade de armazenamento (97,98,102,104).

7.1.2.1.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

As nanopartículas lipídicas sólidas foram desenvolvidas de modo a combinar as vantagens de partículas sólidas, emulsões e lipossomas, estando representadas na figura 7.5. São produzidas alterando o lípido líquido, a parte oleosa da emulsão, por um lípido sólido à temperatura ambiente. Estes lípidos geralmente consistem em ácidos gordos, ceras, glicéridos e triglicéridos. Devido às semelhanças entre as SLN e os lípidos da pele, estes são apropriados para aplicação tópica (96–98,102,105).

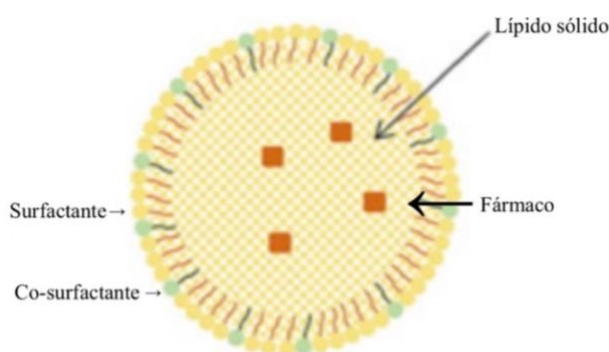


Figura 7.5 – Representação de nanopartículas lipídicas sólidas. Adaptado de (106).

Este tipo de estruturas apresenta diversas vantagens como a capacidade de interagir com os lípidos do estrato córneo, o que contribui para o aumento da permeabilidade dos componentes lipídicos; o seu efeito oclusivo, devido à capacidade de formar uma espécie de “filme” à superfície da pele o que diminui a perda de água transepidermica, hidratando a pele; e a sua capacidade de controlar a libertação e o transporte de compostos ativos. Estas partículas apresentam como principal desvantagem a capacidade diminuída de transporte de ativo devido à sua tendência em formar cristais (98,101,105,106).

As SLN mostraram-se capazes de aumentar a estabilidade dos compostos protegendo-os da degradação química e oxidação. Estudos na literatura que demonstram que as SLN são boas transportadoras para o resveratrol, um polifenol. Este componente existe em duas isoformas, *cis* e *trans*, sendo a última mais biologicamente ativa. A rápida isomerização e auto-oxidação do resveratrol torna-o um composto bastante instável e quando é encapsulado nas SLN observa-se um aumento na estabilidade e libertação do mesmo devido à proteção à fotodegradação conferida por este sistema de veiculação (104,105,113).

Sabe-se que existe uma enorme dificuldade na liberação de antioxidantes na pele, o que se deve não só à dificuldade em transportar o composto ativo para as camadas inferiores da pele, mas também à fácil oxidação de compostos ativos utilizados no combate ao envelhecimento. Existem diversas descrições na literatura da utilidade desta tecnologia em compostos como a vitamina A e derivados, vitamina E e CoQ₁₀. A incorporação destes compostos ativos nas SLN dão origem a cosméticos mais esteticamente agradáveis, pois, sendo hidrofóbicos, há dificuldade em incorporá-los. A estabilidade destes compostos é de bastante relevância sendo que o retinol, composto muito suscetível a degradação pela radiação UV demonstra ter maior estabilidade e uma liberação mais controlada na pele quando incorporado em SLN (105,106,114,115).

Tendo em conta as propriedades das SLN e as vantagens que advêm da sua incorporação em formulações cosméticas, Soldati *et al.* desenvolveram SLN com o objetivo de incorporar resveratrol e avaliar a sua penetração cutânea, ritmo de liberação bem como ação antioxidante. As SLN foram preparadas através da técnica de homogeneização de alto cisalhamento a partir de manteiga de semente natural de *Theobroma grandiflorum* e Pluronic® F-127. As SLN apresentaram um diâmetro médio de 195.30 ± 12.19 nm, PdI de 0.16 ± 0.09 , potencial zeta de -19.54 ± 1.89 mV e uma EE de 74.12 ± 2.17 % (116).

Foi realizado um estudo *in vitro* em células abdominais humanas através do método difusão de Franz, por um período de 24h de modo a avaliar a liberação de resveratrol. Para isso foi utilizada uma solução de resveratrol em etanol como controlo. A partir dos resultados presentes na figura 7.6 é possível observar que ocorreu uma liberação quase completa do resveratrol em solução nas primeiras horas, enquanto o resveratrol incorporado em SLN apresentou uma liberação mais controlada (116). É importante referir que ambos os perfis de liberação conferem vantagens, sendo importante adequar à formulação pretendida.

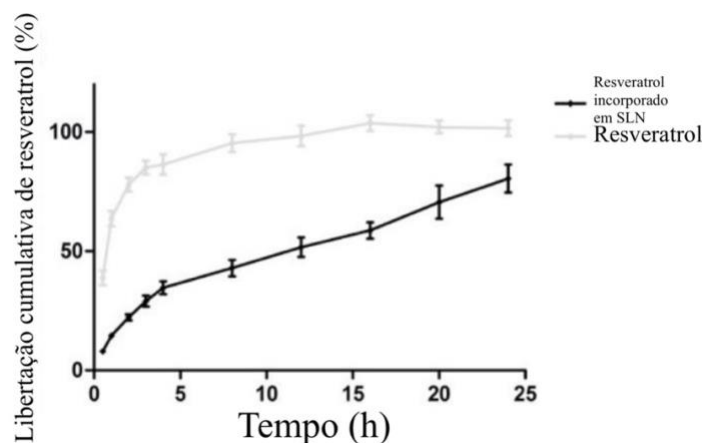


Figura 7.6 – Perfil de liberação *in vitro* de resveratrol em solução de etanol e resveratrol em SLN. Adaptado de (116).

Posteriormente foi avaliada a quantidade cumulativa de resveratrol presente na pele. Neste caso, foi possível observar que as SLN permitiram uma acumulação de resveratrol significativamente superior nas diferentes camadas da pele, sendo quase o dobro quando comparado com a solução de resveratrol (Figura 7.7). Estes resultados permitem-nos concluir que as SLN permitiram não só uma libertação controlada do composto ativo bem como uma maior retenção do mesmo na pele (116).

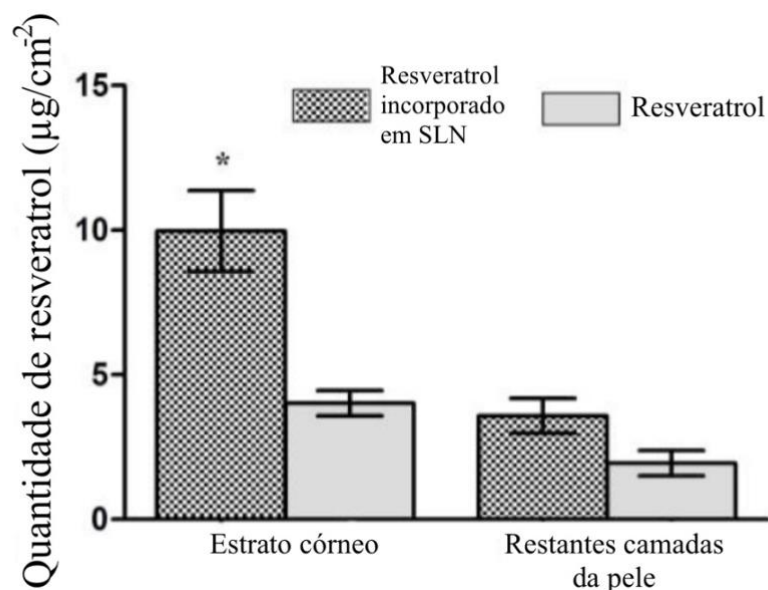


Figura 7.7 – Absorção cutânea de resveratrol após 12 h de estudo de permeação. * $p < 0.05$. Adaptado de (116).

Em outro estudo realizado, Argimón *et al.* desenvolveram um estudo com o objetivo de formular uma preparação de vitamina A para transporte cutâneo. Foram desenvolvidas SLN através da técnica de homogeneização de alta pressão a partir de surfactantes e Gelurice 44/14[®]. As SLN apresentaram tamanho médio de 40 nm, PDI de 0.459 ± 0.042 , potencial zeta de -17.7 ± 1.9 mV e uma EE de $90.7 \pm 1.4\%$ (117).

A estabilidade da vitamina A foi avaliada por um período de 10 dias. Para isso foram preparadas duas formulações, SLN com vitamina A e uma suspensão de vitamina A em tampão fosfato e lauril sulfato de sódio (controlo). A sua estabilidade foi avaliada um, três, cinco, sete e dez dias após preparação, estando os resultados presentes na figura 7.8. Foi possível observar que na suspensão de vitamina A, existiu uma perda significativa de composto ativo nos primeiros 3 dias, em comparação com as SLN. Também foi possível observar que as SLN conferiram proteção do composto ativo durante um maior período, o que sugere que o uso de SLN tem capacidade de retardar a degradação da vitamina (117).

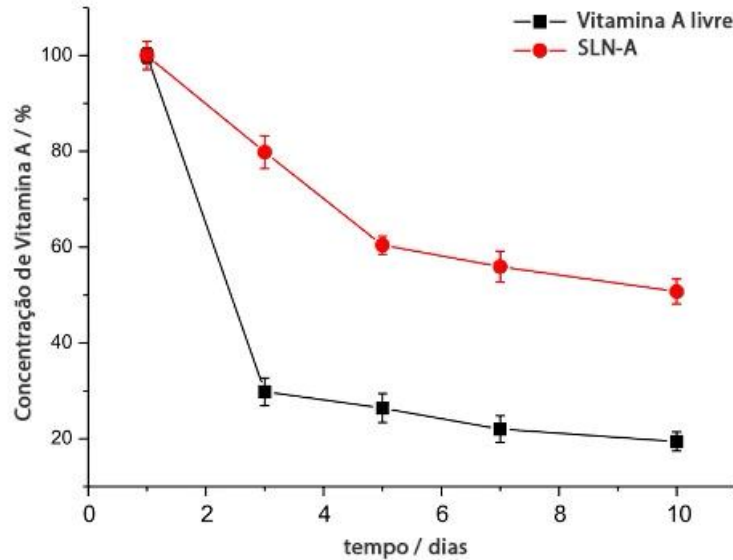


Figura 7.8 – Teste de estabilidade de vitamina A a 25° e pH 6.4. Adaptado de (117).

7.1.2.1.2 Transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC)

Os NLC são produzidos utilizando uma mistura de lípidos tanto na forma sólida como na forma líquida, estando a sua estrutura representada na figura 7.9. Devido à sua estrutura espacial, são mais estáveis que as SLN e apresentam uma maior capacidade de encapsulação, sendo assim melhores transportadores. Possuem um menor conteúdo em água, comparando com as SLN, tendo também a capacidade de proteger os ativos da degradação. Diferem das SLN pois o seu conteúdo lipídico líquido aumenta a solubilização de alguns componentes, o que contribui para uma maior deposição na pele (13,96,98,105,106).

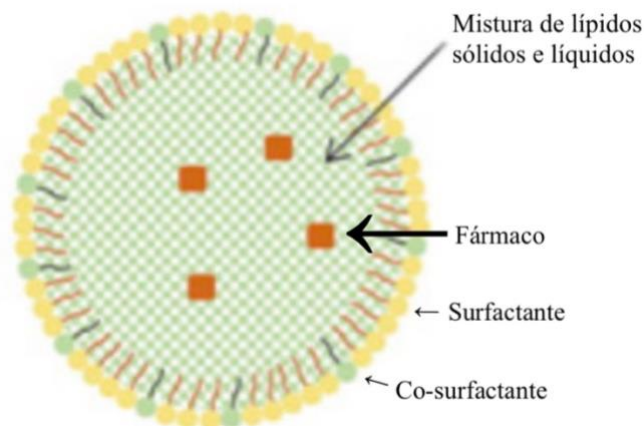


Figura 7.9 – Representação de transportadores lipídicos nanoestruturados. Adaptado de (106).

Os NLC apresentam também a capacidade de formar um filme lipídico na pele, o que promove a hidratação da pele, sendo então utilizados em diversas formulações antienvhecimento e de proteção solar devido às suas propriedades (105–107,119).

Devido ao seu núcleo lipofílico, os ativos são mais facilmente retidos. Estudos de diversos autores demonstraram um aumento da estabilidade de diversos compostos ativos utilizados no combate ao envelhecimento quando associados a esta nanotecnologia. Estes compostos ativos incluem CoQ₁₀, o retinol, vitamina E, ECGC entre outros (106,114,115,119,120).

Abla *et al.* desenvolveram um estudo onde prepararam NLCs e nanoemulsões com o objetivo de aumentar a estabilidade da vitamina E bem como resolver problemas associados à sua aplicação cutânea como a irritação na pele. Os NLC e as nanoemulsões foram preparadas através da técnica de homogeneização a partir de surfactantes tendo no caso dos NLC sido usado tripalmitina como lípido sólido e ácido oleico como lípido líquido. A caracterização de ambas formulações está presente na tabela 7.2 (121).

Tabela 7.2 – Caracterização das nanoemulsões e NLC de vitamina E. Adaptado de (121).

Formulações	Nanoemulsões	Transportadores lipídicos nanoestruturados
Tamanho de partícula (nm)	586.5 ± 209.6	67.0 ± 1.2
Índice de polidispersidade	0.7 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Potencial zeta (mV)	-10.0 ± 0.6	-32.0 ± 1.2
pH	6.5 ± 0.1	6.5 ± 0.0

Foi realizado um teste de estabilidade a ambas as formulações, para isso foram tiradas fotos às formulações após preparação e após 3 semanas. Na figura 7.10 é possível observar que, quando se trata da nanoemulsão, existe precipitação da vitamina E (121).



Figura 7.10 – Estabilidade física das formulações de vitamina E. Imagem da esquerda: Preparações preparadas recentemente NLC (1) e NE (2). Imagem da direita: Formulações após 3 semanas NLC (1) e NE (2). Adaptado de (121).

O estudo de permeação cutânea foi realizado em membranas de diálise, estando os resultados representados na figura 7.11. Foi possível observar que existiu uma libertação controlada de vitamina E no período de 24h. Nas primeiras duas horas verificou-se a libertação de 30% da vitamina E, significativamente maior à quantidade libertada na nanoemulsão que correspondeu apenas a 4% no mesmo período. No final das 24 horas a libertação de vitamina E em ambas formulações era semelhante, continuando a haver um valor superior no NLC. Os NLC permitiram então uma rápida, mas controlada libertação do composto ativo (121).

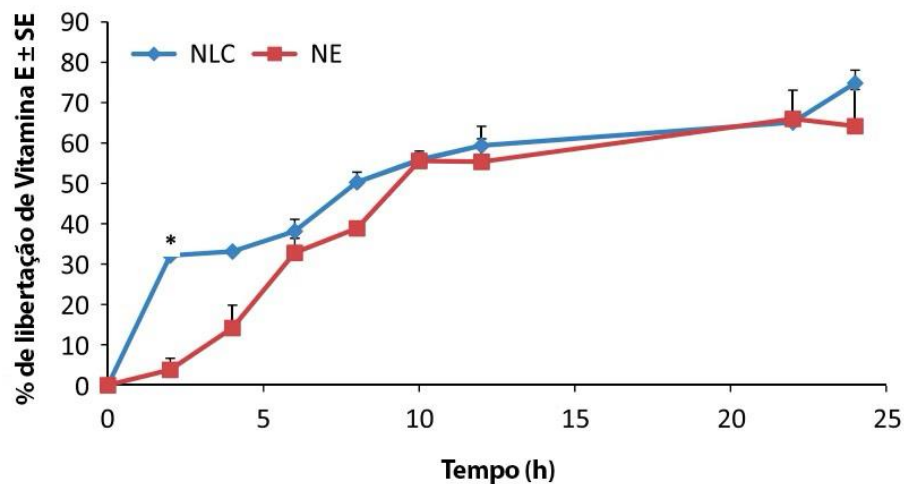


Figura 7.11 – Percentagem de vitamina E libertada através dos nanotransportadores utilizando uma membrana de diálise. Adaptado de (121).

Foi realizado um estudo de permeação *in vitro* através do método difusão vertical de Franz, em células humanas. A pele possui vitamina E endógena, tendo este fator sendo considerado e corrigidos no estudo. Na avaliação destes parâmetros os resultados foram também comparados com a vitamina E livre, utilizada como controlo, bem como a vitamina E em óleo mineral (figura 7.12). Foi possível observar que existe uma quantidade significativamente maior de vitamina E na epiderme quando este está incorporado em NLC, em comparação com as restantes formulações (121).

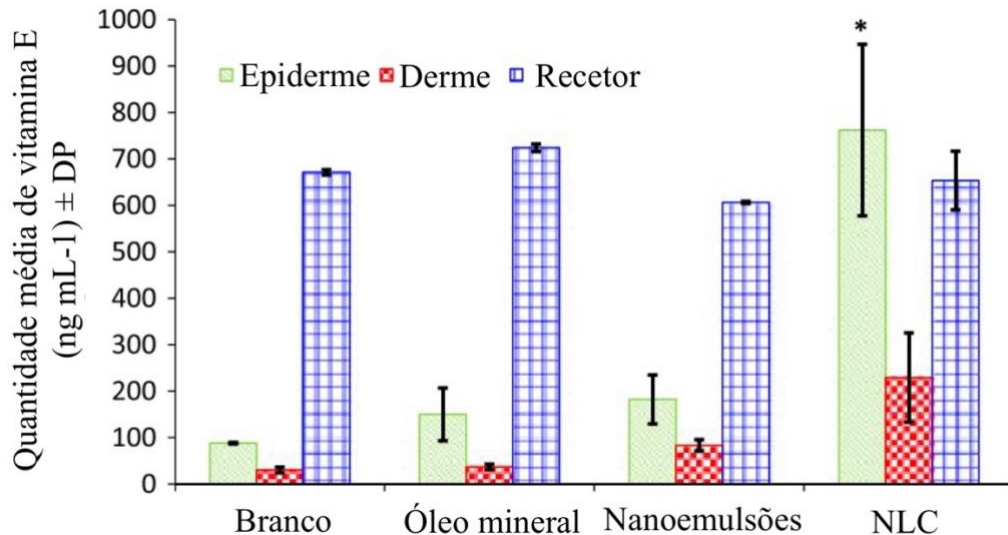


Figura 7.12 – Quantidade média de vitamina E (ng mL⁻¹) na epiderme e derme humana e no recetor. $p < 0.05$ Adaptado de (121).

Posteriormente foi também estudada a degradação UV do composto, sendo novamente os NLC e as nanoemulsões comparadas à vitamina E livre bem como à vitamina E em óleo mineral. Pelos dados apresentados na figura 7.13 foi possível observar que tanto os NLC como as nanoemulsões apresentaram capacidade de proteger o composto ativo da degradação em comparação com o mesmo na sua forma livre ou em óleo mineral (121).

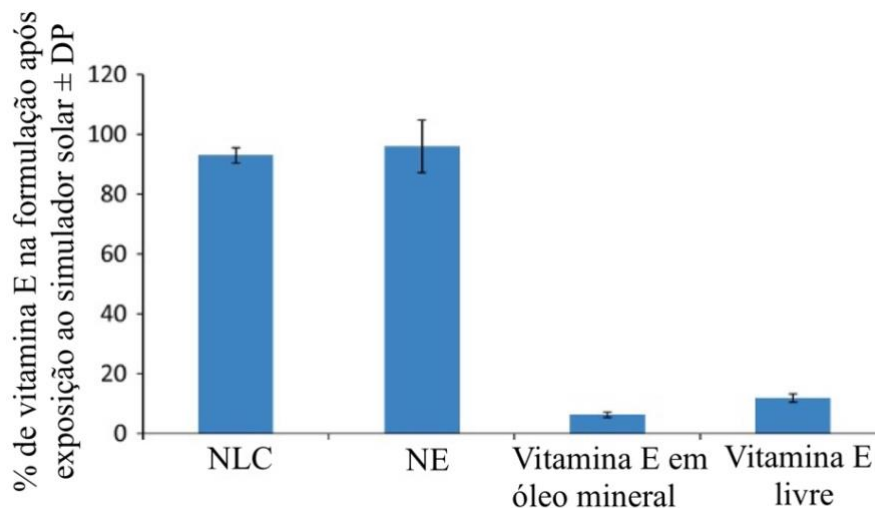


Figura 7.13 – Percentagem de vitamina E na formulação após exposição ao simulador solar. Adaptado de (121).

Com este estudo foi possível observar as diversas vantagens do uso dos NLC. A incorporação do composto ativo no mesmo permitiu uma libertação controlada do composto, uma maior concentração de composto na epiderme bem como uma elevada proteção do composto ativo, apresentado melhor estabilidade física (121).

7.1.2.2 Sistemas vesiculares

Os sistemas vesiculares constituem um grupo de transportadores feitos à base de moléculas anfipáticas. Normalmente são compostos por moléculas biocompatíveis, como fosfolípidos, colesterol e uma fase aquosa. São estruturas organizadas capazes de incorporar tanto compostos lipídicos como hidrofílicos, protegendo-os, e de controlar a sua libertação nas diferentes camadas da pele (105,107).

7.1.2.2.1 Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas com pelo menos uma bicamada lipídica, representada na figura 7.14. Podem ser divididas em vesículas pequenas unilamelares (SUV) que possuem entre 10-100 nm; vesículas grandes unilamelares (LUV) que possuem entre 100-3000 nm; vesículas multilamelares (MLV) onde existe mais de uma bicamada, entre outros. São compostas por fosfolípidos que possuem cabeças hidrofílicas e caudas lipofílicas. Isto confere ao lipossoma ambas as propriedades permitindo encapsular uma grande variedade de ingredientes tendo a sua eficácia sido demonstrada em diversos compostos ativos para aplicações transdérmicas. Devido à sua semelhança com os lípidos cutâneos têm como vantagem serem biocompatíveis, biodegradáveis sendo de fácil preparação e pouco tóxicos. Têm como desvantagem a baixa solubilidade e baixa estabilidade química devido à oxidação e hidrólise de lípidos (96-98,101-104,107).

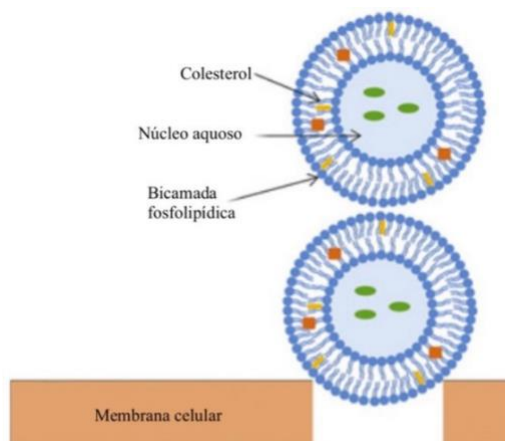


Figura 7.14 – Representação de lipossomas. Adaptado de (106).

Alguns autores sugerem que os lipossomas aumentam a penetração de compostos ativos pela sua capacidade de fundir com os lípidos do estrato córneo. Usar estas vesículas como método de transporte transdérmico pode melhorar o ritmo de penetração e superar a barreira cutânea (8,13,97,102).

Este sistema de veiculação pode ser utilizado para encapsular vitaminas como vitamina C, vitamina E, retinol, resveratrol, CoQ₁₀ e carotenoides. Está descrito na literatura que o uso de lipossomas proporciona um aumento da solubilidade, estabilidade e propriedades antioxidantes destes compostos, tendo também a capacidade de melhorar a penetração dos mesmos (99,100,105,107). Gokce *et al.* concluíram que o efeito da CoQ₁₀ é aumentado quando estas são transportados em lipossomas, e um estudo de Lee *et al.*, reportou uma melhoria significativa na penetração tópica desta mesma molécula quando transportada num lipossoma, em comparação com uma suspensão (114,122).

Bi *et al.* realizaram um estudo onde utilizaram lipossomas para transportar a vitamina D₃ e melhorar a sua estabilidade bem como o seu efeito. Estudos recentes demonstram que a vitamina D₃, uma vitamina lipossolúvel, possui capacidade de reparar o dano ao DNA através de diversos métodos (aumento da expressão da proteína p53; redução da produção de ROS induzida pela radiação UV, entre outros). A reduzida solubilidade da vitamina D₃ impede a sua distribuição uniforme na pele, podendo isto ser resolvido pela sua incorporação nos lipossomas (123).

Neste estudo foram otimizadas formulações lipossomais de vitamina D₃ de modo a melhorar a capacidade de encapsulação e de modo a melhorar a absorção transdermal e estabilidade da vitamina D₃. O tamanho de partícula e eficácia de encapsulação foram utilizadas como critério para avaliar o método sob o qual os lipossomas iriam ser produzidos, método de hidratação de filme lipídico ou pelo método de injeção de etanol. Os lipossomas foram preparados pelo método de injeção de etanol pois foi o que apresentou menor tamanho de partícula, menor PDI bem como uma maior eficácia de encapsulamento (92.5 nm ± 1.8; 0.085; 80.3 ± 0.4% respetivamente). Os lipossomas foram preparados por este método sendo compostos por colesterol e fosfatidilcolina de ovo, o seu tamanho médio foi 99.7 nm, e o seu potencial zeta foi -19.1 mV (123).

A estabilidade dos lipossomas foi avaliada em diferentes condições de temperatura (tabela 7.3) e exposição solar (tabela 7.4). Quando se compara a estabilidade da vitamina D₃ incorporada em lipossoma com o controlo, uma solução de vitamina D₃ num solvente de água/etanol, foi possível observar que a solução sofreu maior degradação. (123).

Tabela 7.3 – Estabilidade de lipossomas de vitamina D₃ em diferentes momentos e condições de temperatura. Adaptado de (123).

4°C	Solução de vitamina D ₃	Lipossomas de vitamina D ₃		
	Dia	Concentração (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Eficácia de Encapsulamento %
1	98.74 ± 1.69	96.56 ± 2.35	87.24 ± 1.07	107.7/0.11
3	93.56 ± 1.19	96.37 ± 1.03	87.11 ± 1.40	115.4/0.18
5	87.34 ± 1.01	95.74 ± 0.63	86.88 ± 1.65	126.2/0.15
7	82.11 ± 1.09	95.15 ± 1.75	86.58 ± 1.39	133.0/0.25
9	78.40 ± 1.66	94.89 ± 1.75	86.41 ± 1.37	150.9/0.33
25°C	Solução de vitamina D ₃	Lipossomas de vitamina D ₃		
	Dia	Concentração (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Eficácia de Encapsulamento %
1	97.27 ± 1.61	95.24 ± 0.34	86.69 ± 1.58	109.6/0.15
3	92.08 ± 2.29	95.13 ± 1.74	86.58 ± 0.72	104.7/0.17
5	85.46 ± 1.98	94.88 ± 0.61	85.17 ± 0.40	113.6/0.17
7	78.31 ± 2.53	94.60 ± 0.86	85.24 ± 1.33	120.9/0.21
9	73.36 ± 1.31	93.98 ± 1.45	85.09 ± 0.32	135.9/0.25
40°C	Solução de vitamina D ₃	Lipossomas de vitamina D ₃		
	Dia	Concentração (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Eficácia de Encapsulamento %
1	82.40 ± 2.72	91.93 ± 0.56	82.16 ± 0.97	111.2/0.17
3	73.44 ± 2.47	91.09 ± 0.59	81.98 ± 1.98	125.1/0.15
5	66.97 ± 1.48	90.81 ± 0.79	81.22 ± 2.65	115.7/0.19
7	59.38 ± 0.75	90.38 ± 1.73	80.74 ± 2.39	127.3/0.24
9	51.17 ± 0.61	89.57 ± 0.39	79.39 ± 0.55	129.8/0.39

Os resultados demonstram a degradação da vitamina D₃ nas diferentes temperaturas. Quando se observou a estabilidade da solução a 40° C é possível concluir que o conteúdo de vitamina D₃ reduz de forma drástica em apenas 9 dias. Quando se analisou a estabilidade da

vitamina D₃ incorporada em lipossomas observou-se que esta sofreu pouca alteração a 4 e 25 °C, apresentando uma diminuição na eficácia de encapsulamento a 40°C. Foi possível observar que o tamanho de partícula e PDI dos lipossomas têm tendência a aumentar durante o armazenamento (123).

Tabela 7.4 – Estabilidade dos Lipossomas de vitamina D₃ a 25 e 4500 Lx de luz. Adaptado de (123).

Dia	Solução de vitamina D ₃	Lipossomas de vitamina D ₃		
	Concentração (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Eficácia de Encapsulamento %	Tamanho (nm)/Índice de polidispersidade
1	91.35 ± 0.50	96.97 ± 1.05	86.43 ± 2.76	103.1/0.17
3	83.34 ± 1.21	95.73 ± 0.19	86.09 ± 0.46	108.6/0.19
5	72.90 ± 1.02	95.21 ± 1.78	85.33 ± 1.39	132.6/0.16
7	63.11 ± 2.56	95.38 ± 0.89	85.47 ± 0.26	130.9/0.23
9	50.48 ± 2.15	93.58 ± 2.52	83.69 ± 0.62	137.3/0.27

Em relação à estabilidade à luz foi possível observar também resultados promissores na vitamina D₃ incorporada em lipossoma. Não foi observada uma diminuição significativa na EE após irradiação durante 9 dias, porém observou-se uma diminuição ligeira da concentração de vitamina D₃ nos lipossomas em comparação com a diminuição pronunciada da mesma, na solução (123).

A penetração cumulativa bem como a retenção de composto na pele também foram avaliadas (tabela 7.5). O estudo foi realizado *ex vivo* em ratos através do método difusão de Franz. Os resultados demonstram que a penetração cumulativa da solução de vitamina D₃ foi bastante superior em comparação com a vitamina incorporada no lipossoma. No entanto, a retenção da vitamina na pele foi superior quando esta se apresentava incorporada no lipossoma (123).

Tabela 7.5 – Penetração cumulativa média e retenção de vitamina D₃ na pele. Adaptado de (123).

Tempo (h)	Penetração média cumulativa		Teste	Retenção média na pele	
	Solução de vitamina D ₃ (µg/cm ²)	Lipossomas de vitamina D ₃ (µg/cm ²)		Solução de vitamina D ₃ (µg/cm ²)	Lipossomas de vitamina D ₃ (µg/cm ²)
0.5	2.97	1.14	1	112.97	184.87
1	26.92	4.13	2	116.92	178.29
2	61.56	8.55	3	111.56	183.22
4	80.29	15.48	-	-	-

Os resultados deste estudo indicam que os lipossomas aumentam a retenção do composto na pele, possivelmente devido ao seu tamanho. Este aumento de retenção na pele pode melhorar o seu efeito no combate ao envelhecimento (123).

7.1.2.2 Niossomas

Niossomas são vesículas compostas por surfactantes não-iônicos e anfipáticos e colesterol, representadas na figura 7.15. Possuem um núcleo aquoso com a capacidade de incorporar compostos lipofílicos, hidrofílicos e anfipáticos, tendo estrutura semelhante aos lipossomas, mas maior resistência a oxidação, maior estabilidade e liberação mais controlada sendo também classificados em SUV, LUV e MLV. São usados na indústria cosmética para encapsular diversos compostos ativos, tendo a capacidade de modificar a estrutura do estrato córneo aumentando a sua permeabilidade e eficácia da liberação de substância de aplicação tópica (99,107,124,125).

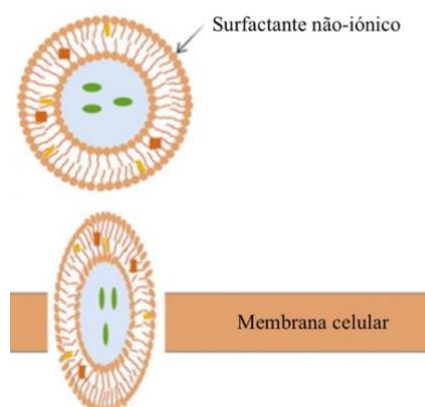


Figura 7.15 – Representação de um niossoma. Adaptado de (106).

Os niossomas apresentam a capacidade de melhorar a penetração e permeabilidade de antioxidantes como a vitamina E. Diversos estudos demonstraram a sua eficácia em compostos como vitamina C, β -caroteno e revelaram também aumentar a estabilidade, solubilidade e penetração cutânea do resveratrol (99,100,107,119,126).

Li *et al.* desenvolveram um estudo com o objetivo de otimizar uma formulação de EGCG incorporada em niossoma de modo a ultrapassar a barreira cutânea e promover uma ação antioxidante. Estes niossomas foram preparados a partir de surfactantes, colesterol e fosfato de dihexadecil através do método de hidratação de filme lipídico sendo otimizadas estatisticamente. Na otimização dos niossomas estudou-se quais os fatores teriam maior influência sob a EE, sendo o objetivo obter o maior valor de EE, tendo se chegado à conclusão de que os mais relevantes incluíam a quantidade de EGCG e a razão entre a quantidade de surfactante e a quantidade de colesterol. Os niossomas apresentaram tamanho médio de 235.4 ± 15.64 nm, PDI de 0.267 ± 0.053 , potencial zeta de -45.2 ± 0.03 mV e uma EE de $53.05 \pm 4.46\%$ (127).

O estudo foi realizado *ex vivo* com o uso de células humanas através do método difusão de Franz. Para os estudos foi utilizada como controlo uma solução de EGCG. Os resultados foram avaliados nas primeiras 12h e nas 24h finais. Na figura 7.16 estão presentes os resultados onde é possível observar que nas primeiras duas horas existiu uma libertação imediata do EGCG presente na solução, em comparação com os niossomas onde apenas aproximadamente 35% de EGCG tinha sido libertada nas primeiras 3 horas. Foi possível também observar uma libertação mais controlada deste composto quando incorporado (127).

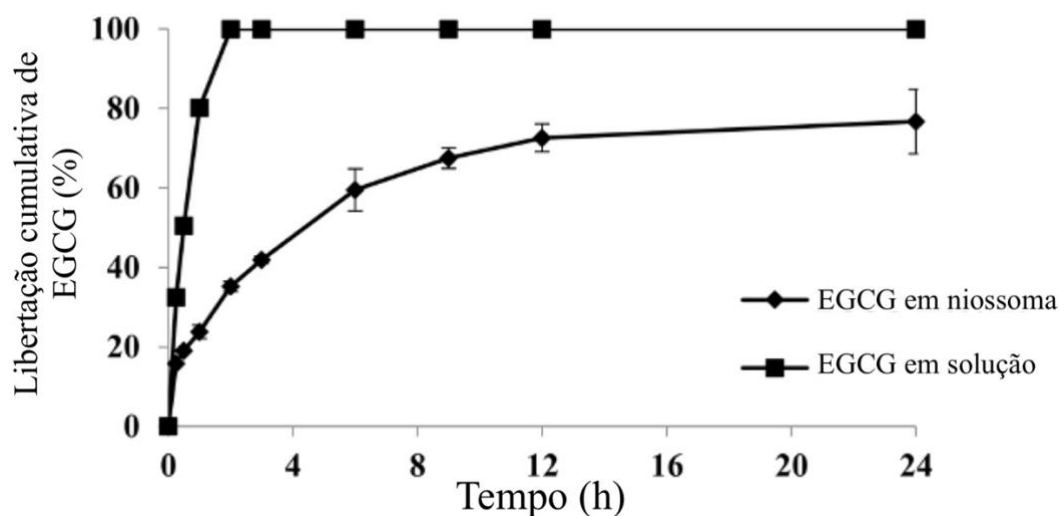


Figura 7.16 – Libertação *in vitro* de composto ativo incorporado em niossoma e em solução. Adaptado de (127).

Na figura 7.17 é possível observar a quantidade de EGCG depositada na pele a partir das diferentes formulações nas 12h e 24h. Os níveis de deposição de EGCG foi significativamente maior quando incorporada em niossomas, quando comparado com a solução, apresentado quase o dobro do composto ativo na pele (127).

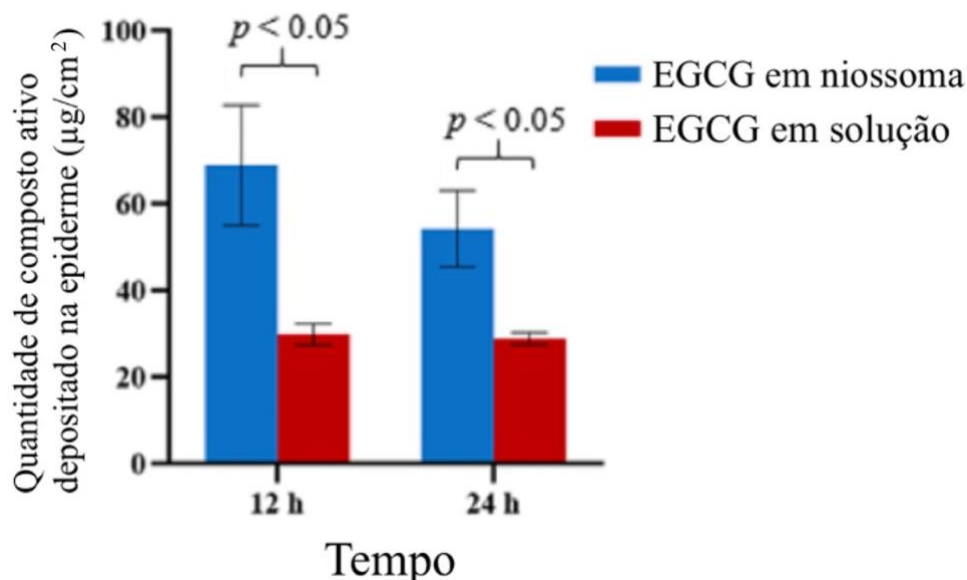


Figura 7.17 – Quantidade de composto ativo depositado na pele a partir dos composto incorporado em niossomas e da solução Adaptado de (127).

Com este estudo foi possível observar que o niossoma demonstrou vantagens para a administração cutânea, sendo possível concluir que esta nanotecnologia permitiu penetrar a barreira cutânea e melhorar a deposição de composto ativo nas diferentes camadas da pele (127).

7.1.3 Nanopartículas à base de polímeros

As nanopartículas à base de polímeros podem corresponder a nanocápsulas ou nanoesféras, ou ainda a dendrímeros, o que dependerá das técnicas de preparação e dos polímeros utilizados de base.

7.1.3.1 Nanoesféras e nanocápsulas

As nanoesféras são sistemas matriciais poliméricos formados por uma matriz contínua de polímero onde se dispersa o composto ativo. Já as nanocápsulas correspondem a nanopartículas do tipo reservatório e são aquelas em que será colocado o foco na descrição que se segue, por

serem aquelas com mais aplicações descritas no âmbito da abordagem antienvhecimento (128,129).

As nanocápsulas, representadas na figura 7.18, têm menos de 100 nm e são constituídas por um núcleo de afinidade lipofílica rodeado por uma membrana polimérica. Apresentam a capacidade de incorporar compostos ativos lipofílicos, boa biodisponibilidade, libertação de dos mesmos e aumento do seu transporte para o local de ação (107,129).

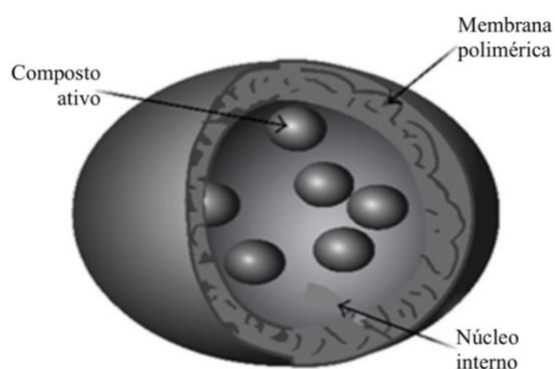


Figura 7.18 – Representação de uma nanocápsula. Adaptada de (119).

Xia *et al.* desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a ação do ácido α -lipóico, um antioxidante, incorporado em nanocápsulas lipídicas, no transporte cutâneo. Este ácido apresenta uma baixa biodisponibilidade bem como baixa estabilidade, daí o interesse da sua incorporação. As nanocápsulas foram preparadas através do método de homogeneização de alta pressão a quente a partir de surfactantes (como a fosfatidilcolina de soja), triglicéridos e água desionizada. As nanocápsulas apresentaram tamanho médio de 148.54 ± 2.31 nm, PdI menor que 0.15, potencial zeta de -50 mV e uma EE de $95.23 \pm 0.45\%$ (130).

A estabilidade da formulação foi avaliada a 4°C e 25°C por um período de 4 semanas, tendo sido comparada com o controlo que consistiu numa solução de etanol de ácido α -lipóico. Através dos resultados presentes na figura 7.19 (a) é possível observar que o PdI da formulação se manteve estável, sendo possível notar um ligeiro aumento no tamanho de partícula, a 25°C . Já na figura 7.19 (b) é possível observar que tanto sob luz solar, como no escuro, a formulação de ácido α -lipóico apresentou valores mais elevados de composto ativo, o que este apresenta capacidade de proteção bem como uma diminuição no ritmo de degradação (130).

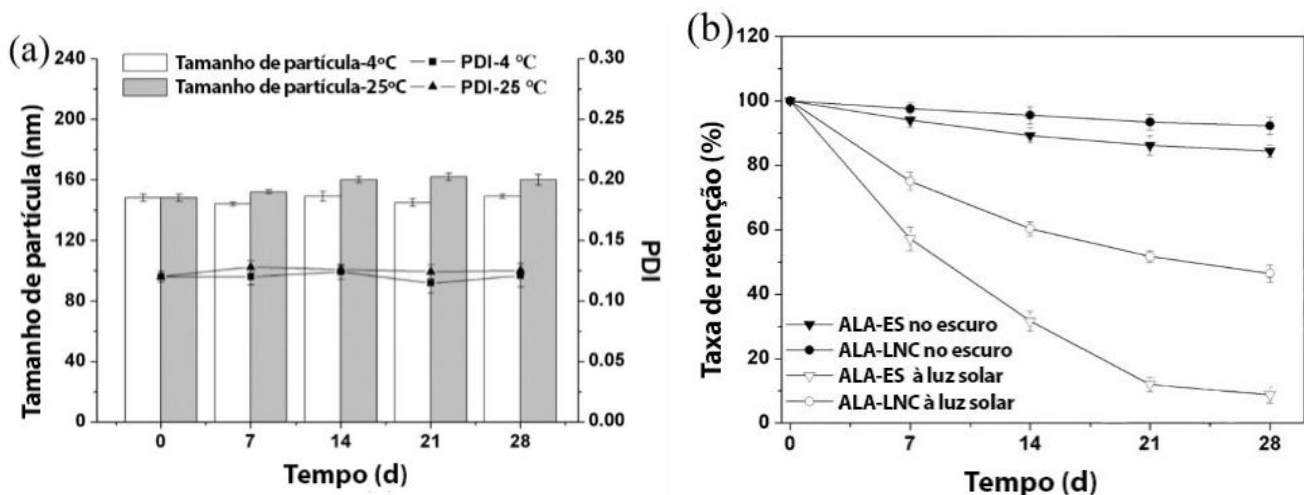


Figura 7.19 – (a) Tamanho de partícula por um período de 28 dias a 4°C e 25°C. (b) Concentração de composto ativo por um período de 28 dias, à luz solar e no escuro. Adaptado de (130).

A libertação *in vitro* do ácido α -lipóico associado a nanocápsula foi avaliado a partir da técnica da diálise¹. A partir dos resultados obtidos, presentes na figura 7.20, é possível observar que a libertação de ácido α -lipóico é mais rápida quando este está na forma de solução de etanol, em comparação com a nanocápsula, que apresenta uma libertação mais controlada do composto ativo (130).

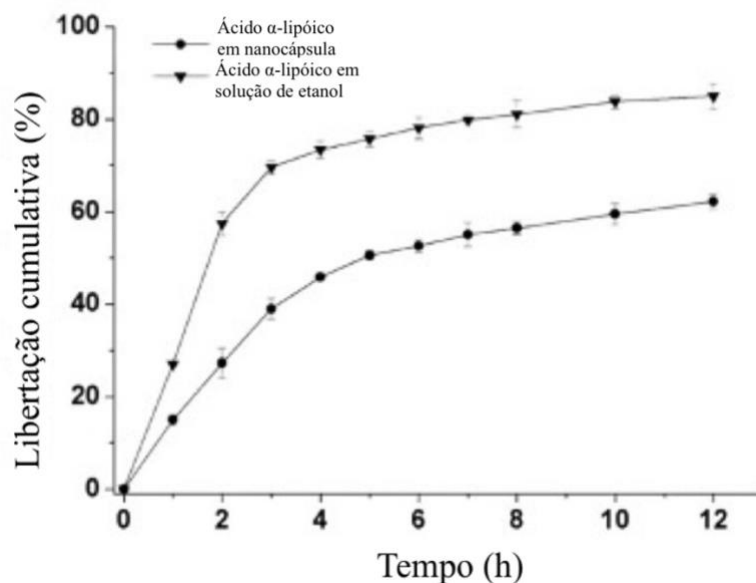


Figura 7.20 – Libertação cumulativa de ácido α -lipóico. Adaptado de (130).

¹ Nesta técnica, a solução que queremos avaliar é colocada num saco de diálise que posteriormente é imerso em uma solução. É avaliada a quantidade de composto ativo que consegue atravessar esta membrana, chegando à solução (156).

O estudo da concentração de composto ativo na pele através do método de difusão de Franz em células de orelha de suíno permite-nos aferir que existe uma maior concentração de composto ativo na pele quando este está incorporado em nanocápsula (figura 7.21). Os resultados obtidos pelo composto em solução de etanol indicam que uma elevada quantidade atravessou a pele, sendo que isto pode ser justificado pela ação promotora de absorção que o etanol tem. Os resultados deste estudo indicam que a utilização de nanocápsulas pode ser vantajosa no transporte cutâneo de compostos ativos (130).

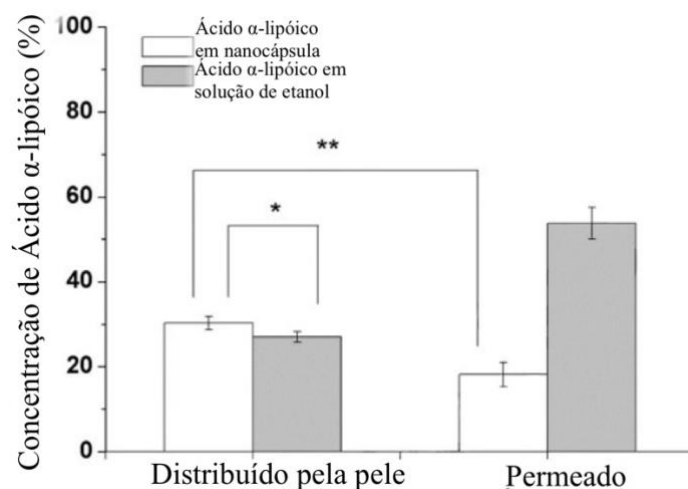


Figura 7.21 – Concentração de ácido α-lipóico distribuído pela pele e permeado. Adaptado de (130).

Outro estudo, realizado por Teixeira *et al.* mostrou vantagens na encapsulação de palmitato de retinol. O estudo foi realizado com o objetivo de propor nanocápsulas como transportadores de retinol, sendo para isto as mesmas preparadas por um método de nanoprecipitação modificado, com membrana polimérica à base de ácido polilático (PLA) e o núcleo a associar o palmitato de retinol. As nanocápsulas apresentaram, em média, um potencial zeta e diâmetro de $-14,9 \pm 5.0$ mV e 215 nm (PdI = 0.1), respetivamente. A penetração das nanocápsulas foi avaliada em pele abdominal humana e foi possível observar a sua permeação (figura 7.22). Após 24 horas foi possível observar que o palmitato de retinol estava presente não só no estrato córneo, estando presente em maior nas camadas mais interiores da epiderme e na derme. Os retinoides apresentam uma baixa permeação na pele, sendo as nanocápsulas vantajosas (131).

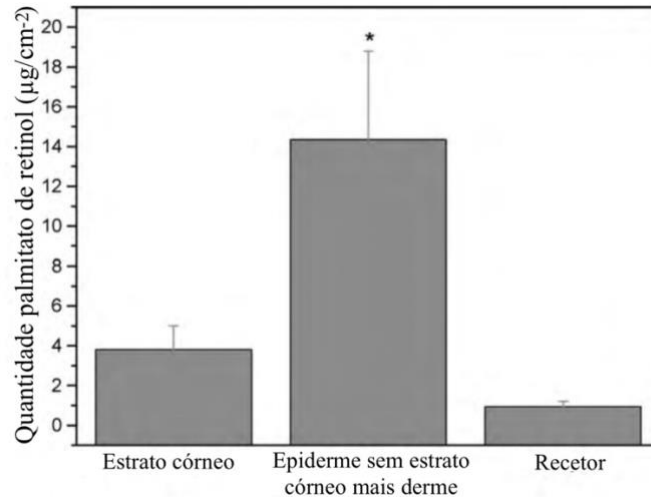


Figura 7.22 – Distribuição do palmitato de retinol nas diferentes camadas da pele após 24 horas de incubação. * $p < 0.05$ em relação ao estrato córneo e recetor. Adaptado de (131).

Apesar dos resultados apresentados, não foi encontrada mais literatura sobre a utilização de nanocápsulas na abordagem antienvhecimento.

7.1.3.2 Dendrímeros

Dendrímeros são complexos simétricos, compactos e homogêneos, compostos por uma série de ramos poliméricos bem definidos, como representado na figura 7.23, tendo o seu núcleo interior entre 1 e 10 nm. Estes complexos podem ter diversos sítios de ligação e, por isso, podem ser bastante eficazes em aumentar a solubilidade de químicos, podendo incorporar tanto componentes hidrofílicos como lipofílicos. Possuem também a vantagem de ter uma elevada capacidade de armazenamento e libertação controlada das moléculas incorporadas (9,96,102,107).

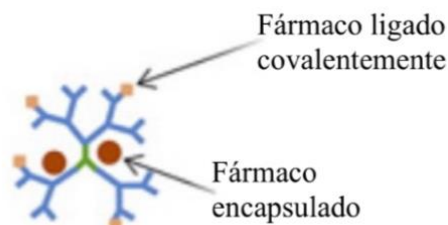


Figura 7.23 – Representação de um dendrímero. Adaptado de (106).

Estudos demonstraram que a incorporação de EGCG em dendrímeros peptídicos aumentou significativamente o seu transporte. Shetty *et. al* desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a habilidade de dendrímeros peptídicos aumentarem o transporte de antioxidantes. Para isso foram formulados complexos de dendrímeros peptídicos com o composto ativo através de métodos descritos em trabalhos anteriores (132,133).

O estudo *ex vivo* foi realizado em ratos por um período de 12 h e comparou a quantidade cumulativa de EGCG permeada (Figura 7.24). Quando comparada a permeação do EGCG isolado, que foi usado como controlo, com o EGCG incorporado no dendrímero, é possível observar que esta é maior quando o EGCG está incorporado no dendrímero. A quantidade cumulativa de EGCG no EGCG incorporado no dendrímero foi igualmente comparada nas células tratadas apenas com o dendrímero peptídico, bem como nas células tratadas com a aplicação simultânea de EGCG e dendrímero peptídico, sendo o EGCG incorporado no dendrímero o que continua a apresentar melhores resultados (133).

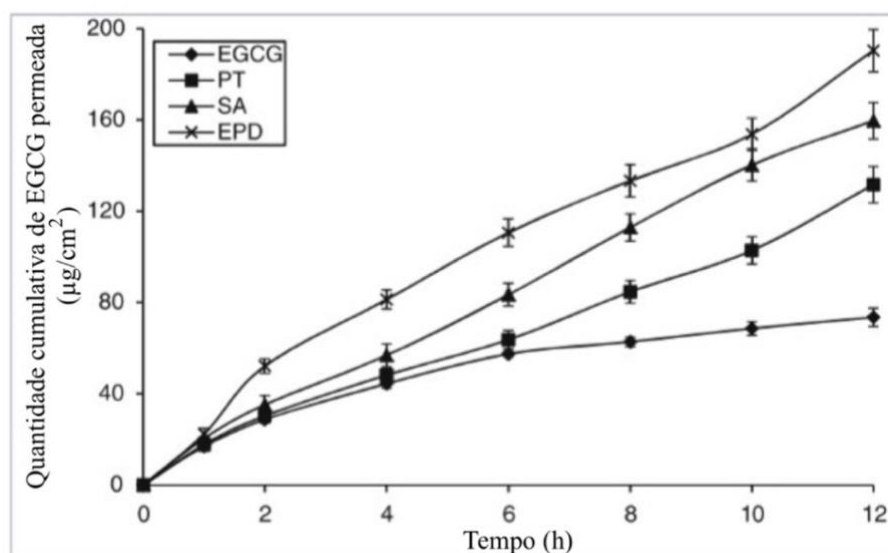


Figura 7.24 – Perfis de permeabilidade de EGCG *ex vivo*. Adaptado de (133).

Legenda: EGCG corresponde ao EGCG isolado; PT corresponde a pré-tratamento com dendrímero peptídico; SA corresponde a aplicação simultânea de EGCG e dendrímero peptídico; EPD corresponde ao complexo dendrímero peptídico-EGCG.

O complexo dendrímero peptídico-EGCG demonstrou resultar em níveis mais altos de retenção do composto ativo na pele em $212,18 \pm 8,68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ quando comparada com a difusão passiva para cada composto ativo aplicado isoladamente, demonstrado pelos resultados presentes na tabela 7.6 (133).

Tabela 7.6 – Deposição cutânea de EGCG em diferentes veículos. Adaptado de (133).

Modo de aplicação	EGCG ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Difusão passiva do EGCG isolado	98.83 ± 3.88
Pré-tratamento com um dendrímero peptídico	$160.79 \pm 5.10^*$
Aplicação simultânea de EGCG e dendrímero peptídico	$177.77 \pm 6.04^*$
Complexo dendrímero peptídico-EGCG	$212.18 \pm 8.68^*$

* $p < 0.05$

EGCG - EpiGaloCatecina-3-O-Galato

Estes resultados demonstram a eficácia dos dendrímeros no transporte de antioxidantes (133).

Um estudo de Pentek *et al.* também demonstrou vantagens dos dendrímeros. No estudo foram preparados e otimizados dendrímeros de resveratrol de modo a resolver o problema de estabilidade deste antioxidante. Resultados do estudo demonstraram que este sistema aumentou a permeação cutânea de resveratrol (78.06% em comparação com 37.33% do resveratrol isolado) apresentando maior estabilidade (134).

7.1.4 Nanocristais

Nanocristais são nanopartículas com propriedades cristalinas que consistem em 100% de composto ativo, de tamanho entre os 200 e 500 nm. É possível observar uma dispersão de compostos ativos nanocristais num líquido, que origina as nanosuspensões ou sistemas coloidais. Para estabilizar estas suspensões são adicionados estabilizadores surfactantes ou poliméricos, sendo necessário apenas uma pequena quantidade, sendo por isso seguros para aplicação tópica. Nanosuspensões tem como vantagem a sua elevada potência de encapsulação de compostos, baixos efeitos adversos pelos excipientes, e baixo custo, quando comparado com outras tecnologias. Devido à sua elevada razão entre área superficial e volume, estas partículas têm capacidade de aumentar o coeficiente de solubilidade e da taxa de dissolução de partículas, o que permite que os compostos nesta estrutura tenham uma maior atividade (13,89,96,102,107).

Produtos à base de nanocristais mostraram ter uma penetração cutânea aumentada. Estas partículas foram desenvolvidas para aumentar a estabilidade, penetração, eficácia e tolerância,

e tornar o produto esteticamente mais agradável. Devido à sua capacidade de aumentar o coeficiente de solubilidade observa-se um aumento do gradiente de concentração e da biodisponibilidade, o que resulta num maior potencial de penetração passiva após aplicação tópica (13).

Os nanocristais são usados em diversos produtos cosméticos, incluindo os produtos antienvhecimento. Foi demonstrado que nanocristais de tretinoína são capazes de aumentar o tempo de retenção do composto nas camadas mais inferiores na pele e são mais estáveis à radiação UV. Também são usados para aumentar a biodisponibilidade dos flavonoides (13,89).

Lai *et al.* desenvolveram um estudo com o objetivo de aumentar a fotoestabilidade de tretinoína através do uso de nanosuspensões de nanocristais. Foram preparadas nanoemulsões por sonicação e nanosuspensões pelo método de precipitação, estando as suas composições presentes na tabela 7.7 (135).

Tabela 7.7 – Composição da amostra. Adaptado de (135).

Composição (% w/w)	Nanoemulsão	Nanosuspensão
Tretinoína	0.035	0.035
Miristato de isopropilo	10.00	-
Glicerol	2.26	-
Lecitina de soja	1.20	0.0035
Água	86.50	99.9

Estas formulações foram posteriormente avaliadas quanto à sua fotodegradação utilizando pele de suíno. Na figura 7.25 é possível observar que as nanosuspensões foram capazes de melhorar significativamente a fotoestabilidade da tretinoína quando comparadas com a nanoemulsão e solução de metanol, utilizadas como controlo. Isto pode ser explicado, pois, quando se tratam de soluções as partículas estão mais dispersas no solvente e, conseqüentemente, mais expostas à radiação UV por diversos ângulos, quando em nanosuspensão, apenas a parte exterior da molécula pode ser irradiada e, conseqüentemente, degradada (135).

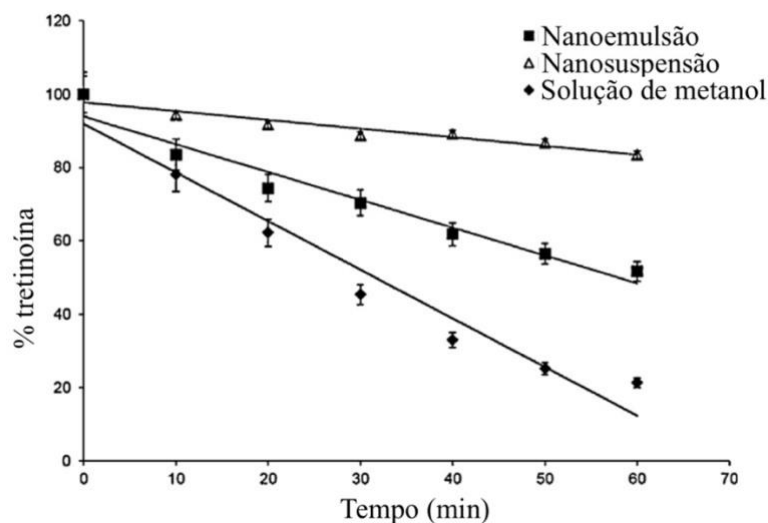


Figura 7.25 – Fotodegradação da tretinoína na solução de metanol, nanoemulsão e nanosuspensão uma hora após radiação UV ($\lambda=366\text{nm}$). Adaptado de (135).

Na figura 7.26 observa-se que a nanoemulsão proporciona uma maior acumulação de tretinoína na pele e transporte transdermal. Quanto à nanosuspensão, verificou-se que existe uma maior acumulação de tretinoína na pele bem como uma reduzida permeação dos componentes até à circulação sistémica (que é possível aferir devido à baixa quantidade permeada, ou seja, baixa quantidade no recetor fluido), sendo isto vantajoso. Quando se usa esta formulação observa-se uma maior deposição de componente ativo no estrato córneo, enquanto que na nanoemulsão este se acumula nas diferentes camadas, demonstrando a capacidade das nanosuspensões de reter o composto ativo minimizando a sua incorporação transdermal, responsável por efeitos adversos indesejáveis (135).

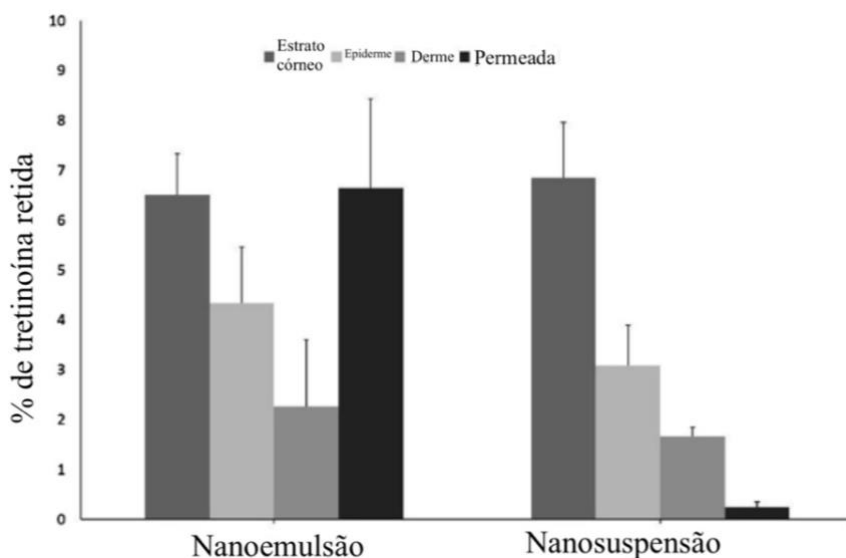


Figura 7.26 – Quantidade cumulativa de tretinoína retida e permeada nas diferentes camadas da pele do suíno após 8 horas de tratamento oclusivo com as formulações. Adaptado de (135).

Estes estudos demonstram a eficácia dos nanocristais no transporte de ativos na pele bem como na proteção de componentes ativo à degradação (135).

7.2 Tecnologias físicas

Sabe-se que a permeabilidade de diversas substâncias é aumentada 10 a 100 vezes quando o estrato córneo é removido. Este facto deu origem às tecnologias físicas pois estas podem ser utilizadas para aumentar a penetração cutânea, ultrapassando essa barreira. Algumas destas tecnologias incluem microagulhas, sonoforése, iontoforése, eletroporação, entre outros, sendo que grande maioria requer o uso de equipamentos que são utilizados para romper a barreira cutânea facilitando o transporte de substâncias (105,106,136,137).

Estes métodos físicos são muitas vezes utilizados em combinação com as nanotecnologias devido ao sinergismo que existe entre eles. É também muito comum ver-se a associação de microagulhas com outras tecnologias como a sonoforése e a iontoforése. O objetivo é que a microagulha coloque o composto no local específico e o segundo método atue aumentando a sua libertação e distribuição (106,111,128).

7.2.1 Iontoforése

A iontoforése é um processo não invasivo onde existe o transporte de moléculas iónicas ou hidrofílicas de tamanho inferior a 13 kDa. Este processo recorre ao uso de eletricidade onde existe uma aplicação externa de uma micro corrente de baixa voltagem, normalmente 10 V ou menos, com o objetivo de aumentar o transporte de compostos ativos através da pele. A iontoforése permite um rápido efeito terapêutico e uma libertação controlada de composto ativo na pele sem causar grandes efeitos na mesma (14,16,17,138).

Existem diversas descrições na literatura que demonstram a eficácia da iontoforése. Em 2012, Xu *et. al* avaliaram o transporte de vitamina C associada a promotores de absorção químicos, através de iontoforese. Os resultados obtidos após 14 dias de estudo demonstram que o lado tratado com iontoforese apresentou uma melhoria significativa aparência de rugas, suavidade da pele e das manchas. Em 2022, Yan *et. al* compararam novamente a ação da vitamina C isolada com a vitamina C aplicada via iontoforese em lados diferentes da face. Neste estudo não foram utilizados os promotores de absorção e foram reportadas melhorias na elasticidade e hidratação da pele, bem como na aparência dos poros (139).

Monteiro e Silva *et al.* estudaram a ação antioxidante do ácido gálico bem como a sua retenção na pele. A sua capacidade antioxidante foi avaliada através do método de trolox sendo os estudos realizados em pele de orelha suína. O estudo decorreu por um período de 6 horas e 20 minutos sendo que no grupo controlo a aplicação de gel decorreu de forma passiva, por simples espalhamento, e no grupo de estudo ocorreu a aplicação do gel com recurso à iontoforése catiónica de forma contínua (140).

Os resultados presentes na figura 7.27 demonstram que 6 h depois da aplicação do gel contendo ácido gálico, 0,21% aplicado de forma passiva e 0,61% aplicado através da iontoforése, apresentavam-se retidos na pele, sendo possível observar que o uso da iontoforése aumentou significativamente a retenção deste composto (140).

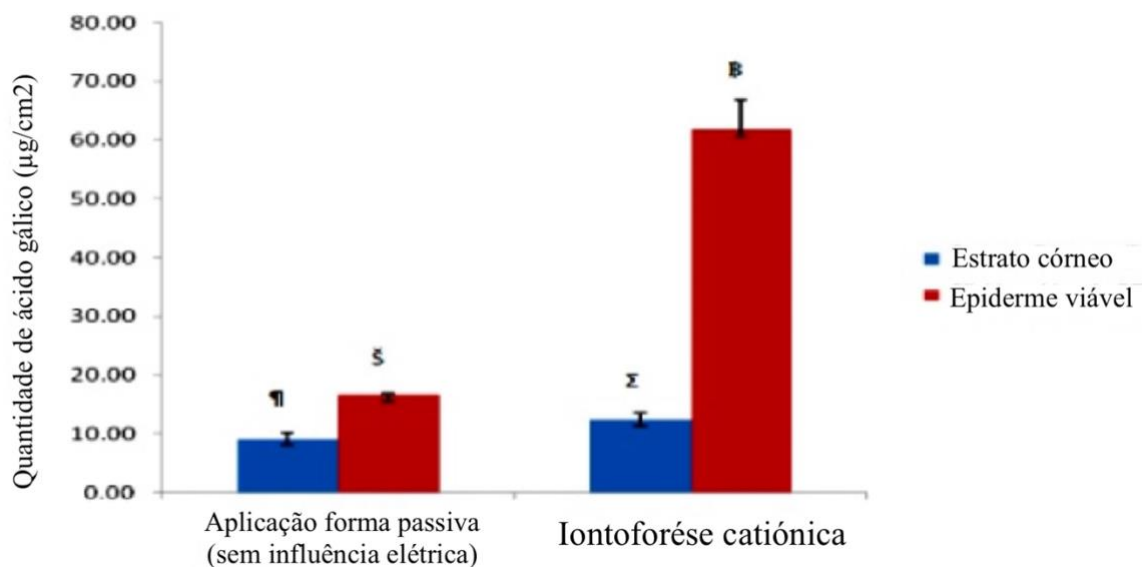


Figura 7.27 – Retenção de ácido gálico nas diferentes camadas da pele após 6 horas de permeabilidade. Diferentes símbolos representam valores médios estatisticamente significativos ($p < 0.05$). Adaptado de (140).

Com os resultados presentes na figura 7.28 é possível observar também que o efeito da iontoforése foi observado tanto 20 min após aplicação desta tecnologia bem como 6 h após aplicação desta tecnologia, isto indica que apenas 20 minutos permitiram obter um efeito desejável (140).

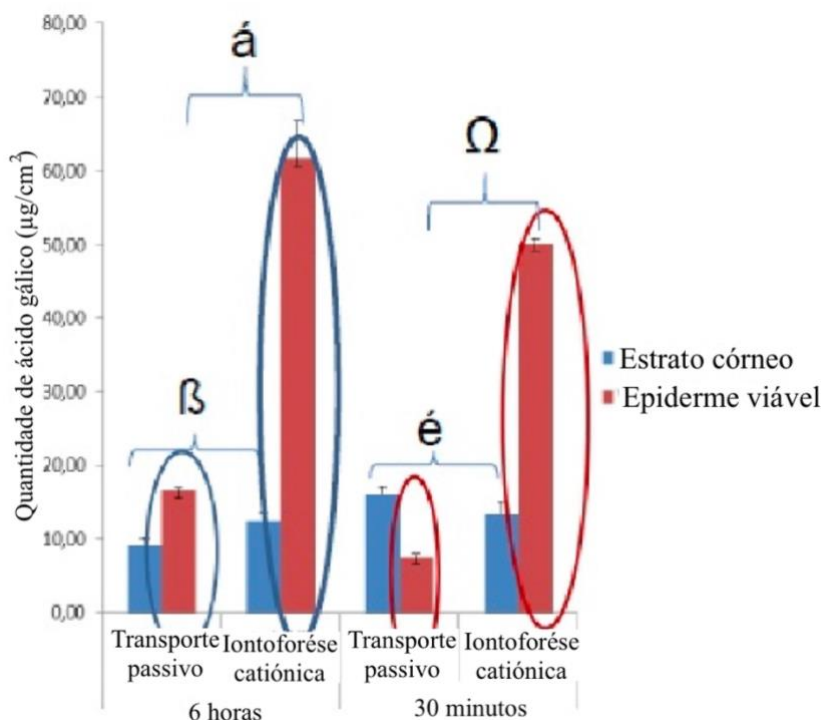


Figura 7.28 – Melhoria na retenção de ácido gálico na epiderme viável. Diferentes símbolos representam valores médios estatisticamente significativos ($p < 0.05$). Adaptado de (140).

Estes resultados indicam-nos que o uso de iontoforése é vantajoso, podendo contribuir para uma maior permeabilidade dos compostos ativos bem como uma maior retenção do mesmo na pele (140).

7.2.2 Eletroporação

A eletroporação é um método que recorre ao uso de eletricidade para aceder a camadas inferiores da pele, aumentando reversivelmente a permeabilidade das células. Ao contrário da iontoforése, a eletroporação recorre ao uso de eletricidade de voltagem superior (100 V). Outras diferenças incluem o facto de que na eletroporação existe a possibilidade de criar vias aquosas durante o processo, enquanto na iontoforése o processo é feito com vias já existentes, sendo por este motivo, a eletroporação mais utilizada para macromoléculas bioativas. O uso de pulsos elétricos permite também o uso do método de eletroporação irreversível onde se observa dano às membranas celulares sem causados dano aos CME, vasos sanguíneos e outras estruturas (14,97,141–143).

Um estudo de Zasada *et al.* demonstrou que a vitamina C é eficaz quando aplicada por este método, tendo sido reportado um aumento da firmeza e elasticidade da pele, bem como melhorias na hidratação (142). A utilização deste tipo de métodos não está necessariamente

relacionada com administração de compostos ativos sobre a pele. Li *et al.* realizaram um estudo em ratos onde demonstraram diversas vantagens na abordagem do antienvhecimento, quando apenas é aplicada a eletroporação parcialmente irreversível. Os ratos foram anestesiados e foi utilizada a seguinte configuração no trabalho experimental: 200 pulsos, duração de 70 μ s, frequência 3 Hz e foram aplicadas voltagem de 500, 250 e 125V tendo os seus resultados sido comparados com o grupo controlo, que não recebeu qualquer estimulação elétrica (144).

Neste estudo foi possível observar que a eletroporação aumentou a proliferação dos queratinócitos. Isto pôde ser confirmado através de resultados do marcador de proliferação Ki-67, dados presentes na figura 7.29. Este marcador regula a proliferação e diferenciação dos queratinócitos, estando aumentado nos grupos tratados com eletroporação. Quando se comparou a espessura da pele um dia após o início do estudo experimental, no grupo de controlo e no grupo da eletroporação, este último apresentou um aumento significativo da mesma, estando os resultados presentes na figura 7.30. Após 8 semanas tanto o grupo de controlo como o grupo da eletroporação apresentavam espessuras semelhantes (144).

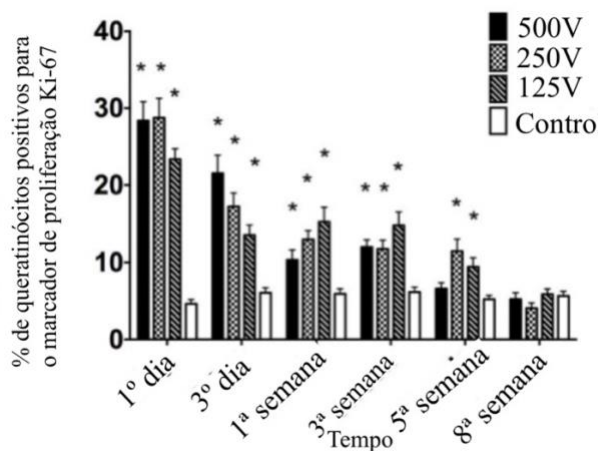


Figura 7.29 – Impacto da eletroporação nos níveis de expressão de Ki-67 nos queratinócitos da epiderme. ($p < 0.05$). Adaptado de (144).

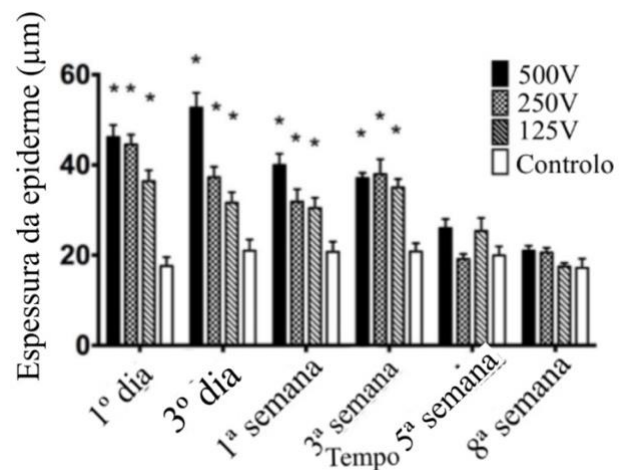


Figura 7.30 – Espessura da epiderme (μ m). Adaptado de (144).

Quanto aos níveis de colagénio na pele foi possível observar que tanto no grupo tratado com 500 V como no grupo tratado com 250 V, existiu um aumento deste constituinte cutâneo em comparação com o grupo de controlo três dias depois, resultado que se manteve uma semana depois (figura 7.31). No grupo tratado com 500V e 125V observou-se este aumento 3 semanas após o tratamento elétrico sendo que no grupo tratado com 250V este aumento continuou presente até 5 semanas após a administração do pulso elétrico. Após 8 semanas tanto

o grupo de controlo como o grupo da eletroporação apresentavam níveis de colagénio em patamares semelhantes ao início do estudo. Foi possível observar também um aumento da densidade das fibras tanto no grupo tratado com 500V como o grupo tratado com 250V, este aumento de densidade foi visível 3 dias após a administração tendo chegado a um máximo 3 semanas depois, como demonstrado pela figura 7.32. Após 8 semanas a diferença de densidade das fibras não era significativamente relevante (144).

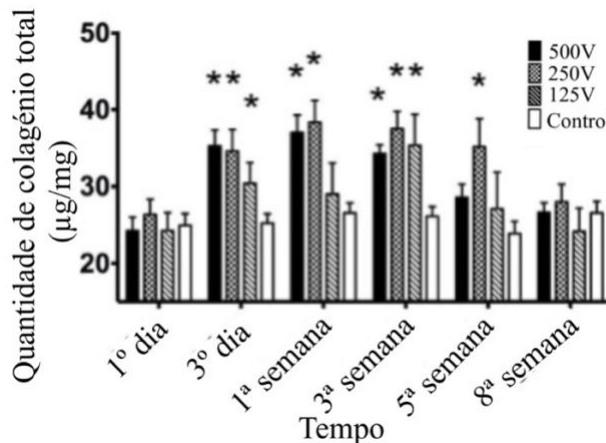


Figura 7.31 – Impacto da eletroporação na quantidade de colagénio. Adaptado de (144).

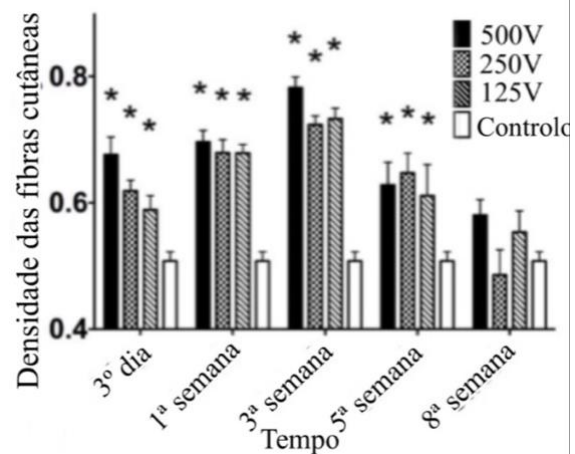


Figura 7.32 – Impacto da eletroporação na densidade das fibras cutâneas. Adaptado de (144).

Foi observado um aumento do colagénio e densidade das fibras, um aumento da proliferação de queratinócitos e um aumento da síntese de componentes da matriz extracelular, o que contribui para uma aparência mais jovem da pele (144).

7.2.3 Sonoforése

A sonoforése recorre ao uso de ultrassons para aumentar o transporte de componentes pela pele. O seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas acredita-se que esteja relacionado com a bicamada sonófora. Esta consiste na deformação intracelular temporária causada pela energia dada às células com este processo, o que resulta num aumento da permeabilidade da membrana. Pode ser classificada de acordo com a frequência usada: baixa frequência, entre 20 a 100 kHz, sendo esta a mais eficaz, frequência intermédia, entre os 100 e os 700 kHz e alta frequência, entre os 0,7 a 16 MHz (8,16,97,141,145).

Algumas vantagens do uso destes métodos incluem o aumento da penetração cutânea de ativos bem como uma libertação mais prolongada. O calor gerado por estes ultrassons melhora

também o fluxo sanguíneo e a regeneração das células (146). Um estudo de Chen *et al.* demonstrou que o uso de vitamina C via sonoforése após um tratamento de laser ajudou a tratar e prevenir hiperpigmentação pós-inflamatória, um efeito adverso bastante comum após este tipo de tratamentos (16). Jung *et al.* demonstraram que a combinação de calor e ultrassom levou a uma melhoria na absorção cutânea de vitamina C (147).

Outro estudo realizado por Zasada *et al.* comparou a eficácia de duas dosagens de retinol quando combinados com sonoforése. As dosagens foram de 0.3% e 0.5% em sérum, tendo sido a primeira aplicada no lado esquerdo e a segunda no lado direito, seguida da sonoforése. Estes tratamentos foram realizados semanalmente, durante 7 semanas, tendo estes parâmetros avaliados através do Sistema Adaptador Multi Probe (MPA) (146).

O tratamento combinado de retinol e sonoforése levou a uma redução significativa da produção de sebo, hiperpigmentação e eritema na pele, tendo o nível de hidratação na pele aumentado após as 7 semanas de tratamento, estando estes resultados presentes na tabela 7.8. A elasticidade da pele também se demonstrou aumentada após 7 semanas de tratamento quando aplicada sob este método como é possível aferir pelos resultados presentes na tabela 7.9. Em ambos os casos não se notaram diferenças significativas entre ambos os lados da face (146).

Tabela 7.8 – Comparação de parâmetros selecionados medido através do MPA. N=16. Adaptado de (146).

Parâmetros	Antes dos tratamentos N=16	Após 7 tratamentos N=16	Significância estatística
Maçã do rosto esquerda			
Hidratação	56.7 ± 17.2 55.0 (41.4-69.2)	65.5 ± 19.2 65.0 (47.1-79.2)	P<0.0001
Nível de sebo	56.0 ± 33.4 48.2 (30.7-88.0)	61.2 ± 30.1 56.5 (34.7-93.2)	P<0.0001
Hiperpigmentação	117.7 ± 28.1 115.5 (95.5-141.5)	111.2 ± 19.5 111.5 (96.2-124.5)	P=0.003
Eritema	309.9 ± 87.0 297.0 (245.0-357.0)	280.0 ± 72.1 270.0 (219.0-339.5)	P<0.0001
Parâmetros	Antes dos tratamentos N=16	Após 7 tratamentos N=16	Significância estatística

Testa esquerda			
Hidratação	53.0 ± 15.4 55.6 (39.2-67.4)	63.4 ± 14.7 64.1 (50.5-76.1)	P=0.021
Nível de sebo	69.5 ± 36.2 57.5 (39.6-99.2)	59.3 ± 28.0 57.5 (38.2-83.7)	P<0.0001
Hiperpigmentação	116.6 ± 32.5 120.0 (92.2-145.5)	105.2 ± 27.9 110.0 (86.7-120.0)	P<0.0001
Eritema	284.4 ± 68.2 268.5 (241.7-325.0)	277.5 ± 64.5 261.0 (232.5-313.7)	P<0.0001
Maça do rosto direita			
Hidratação	49.0 ± 15.7 45.7 (38.3-60.3)	53.4 ± 16.1 51.6 (41.5-67.0)	P<0.0001
Nível de sebo	66.3 ± 38.2 51.5 (43.0-91.2)	62.9 ± 30.9 52.5 (44.2-83.5)	P<0.0001
Hiperpigmentação	113.7 ± 37.4 108.0 (96.5-132.5)	103.4 ± 34.5 102.5 (72.7-115.2)	P<0.0001
Eritema	286.1 ± 85.9 275.0 (247.0-305.7)	267.6 ± 76.0 251.5 (220.5-297.5)	P<0.0001
Testa direita			
Hidratação	54.8 ± 14.8 57.6 (38.8-66.7)	70.5 ± 13.4 70.4 (60.7-78.8)	P=0.049
Nível de sebo	98.2 ± 34.8 107.5 (86.0-121.2)	90.0 ± 30.9 94.0 (75.5-115.5)	P<0.0001
Hiperpigmentação	126.0 ± 24.8 128.5 (107.5-133.7)	117.9 ± 23.2 116.5 (103.2-128.7)	P<0.0001
Eritema	284.2 ± 62.7 291.5 (239.7-340.0)	274.9 ± 55.8 276.5 (244.7-302.7)	P<0.0001

Tabela 7.9 – Avaliação da elasticidade da pele 7 semanas após o tratamento através do Cutometer®. Adaptado de (146).

Parâmetros	Antes dos tratamentos	Após 7 tratamentos	Significância estatística
Testa direita			
R2	0.546 ± 0.185	0.581 ± 0.168	Não foi estatisticamente significativo (p= 0.174)
R8	0.062 ± 0.037	0.052 ± 0.030	P=0.007
Testa esquerda			
R2	0.575 ± 0.171	0.602 ± 0.165	P=0.002
R8	0.074 ± 0.044	0.072 ± 0.045	P=0.006

R2 descreve a elasticidade da pele sendo um valor próximo de 100 o desejável, o R8 indica a habilidade da pele de voltar ao seu estado original sendo o valor próximo de 0 o mais desejável.

Concluiu-se que a associação da sonoforése aos retinoides aumenta a elasticidade e hidratação da pele, tornando-se esta mais suave, levando a uma redução da hiperpigmentação e da aparência das rugas. Foi possível observar efeitos adversos ligeiros ao início do tratamento e principalmente com a dosagem maior, sendo aconselhado o uso da menor dosagem, pois esta é igualmente eficaz (146).

7.2.4 Microagulhas

As microagulhas são microestruturas compostas por agulhas normalmente unidas a uma base, de tamanho 25 a 2000 µm. Possuem a capacidade de romper a camada mais externa da pele, atravessando-a diretamente, o que aumenta a permeabilidade da pele e permite o transporte e acumulação de diversos compostos na epiderme e na derme. Devido ao seu reduzido tamanho, fazem-no de forma indolor, pouco invasiva, o que permite evitar o contacto com nervos e capilares da derme, tornando-as um método bastante vantajoso (128,136,137,148).

Existem diversos tipos de microagulhas, sólidas, dissolvidas, formadoras de hidrogel, ocas, revestidas, as quais estão representadas na figura 7.33, sendo a maior parte capaz de depositar os compostos diretamente na pele nas profundidades desejadas (97,141,148,149).

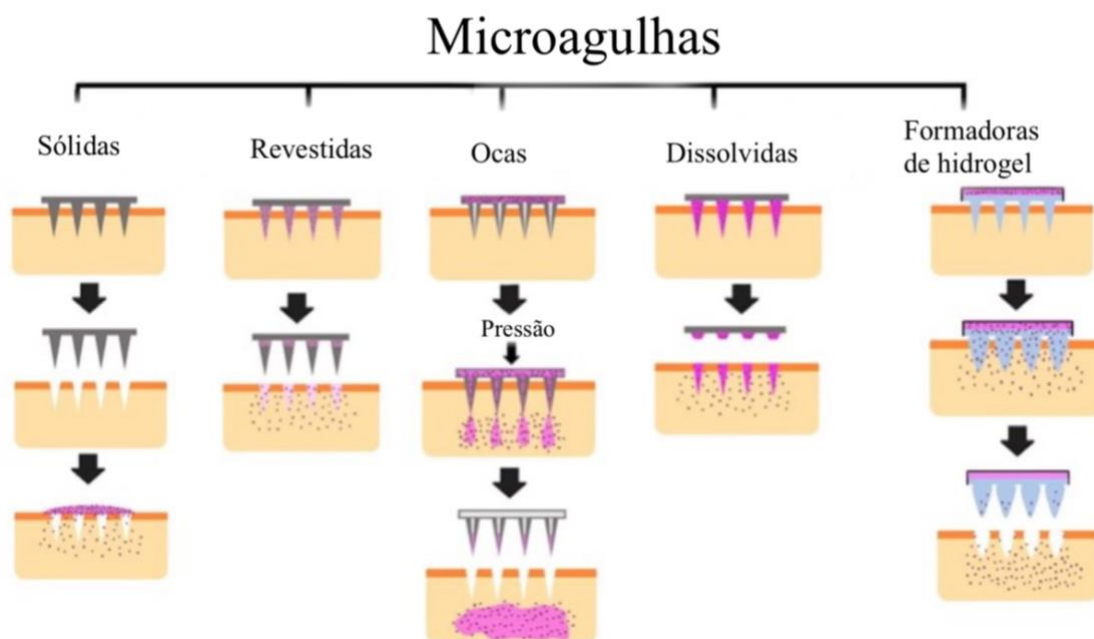


Figura 7.33 – Representação das diferentes microagulhas. Adaptada de (149).

Estas microagulhas são usadas para administração de diversos componentes como retinol e os seus derivados, vitamina C, entre outros (148).

Um estudo de Kim *et al.* estudou a eficácia de microagulhas dissolvidas incorporadas com um derivado do retinol e vitamina C no combate às rugas à volta dos olhos. Este estudo demonstrou que este método foi eficaz, tendo melhorado a aparência das rugas de forma segura. Isto corrobora os resultados de outro estudo realizado por Zasada *et al.* que demonstrou também que a vitamina C, quando aplicada em microagulhas, melhora a aparência da pele e a sua elasticidade, reduzindo os sinais de envelhecimento (142,150).

Outro estudo realizado por Lee *et al.* reportou microagulhas dissolvidas de vitamina C, tendo-se estudado o seu efeito no combate às rugas. O estudo foi realizado em 23 participantes que apresentavam rugas na zona dos olhos. Ambos os grupos receberam as microagulhas com vitamina C (amostra A) e sem vitamina C (amostra B e controlo) tendo o grupo I colocado a amostra A no lado esquerdo da face e a amostra B no lado esquerdo, sendo isto invertido no grupo II. Durante um período de 12 semanas foi avaliado a pontuação global de dano solar (GPS) bem como o efeito antirrugas. Durante as 3 primeiras semanas, cada participante aplicou

ambas microagulhas no antebraço durante a cada dois dias sendo estes retirados após 24 horas e a pele avaliada de modo a avaliar a irritação (151).

O GPS apresentou-se diminuído nos lados em que estava presente a microagulha com vitamina C, sendo o mesmo não observado no lado controlo, estando estes resultados presentes na figura 7.34. Um reduzido valor de GPS remete para uma menor probabilidade ruga, confirmando assim a ação antirugas destes emplastos. Através de um visiómetro foi realizada uma análise à pele onde se obteve os valores de R1 a R5, estes parâmetros avaliam a suavidade da pele sendo que um valor mais elevado de R remete para uma pele mais áspera. Na figura 7.35 estão presentes os resultados deste estudo onde se pôde observar que quando tratado com emplastos de microagulha com vitamina C, os valores de R1, R2 e R3 encontram-se significativamente diminuídos, o que indica uma pele com melhor aparência (151).

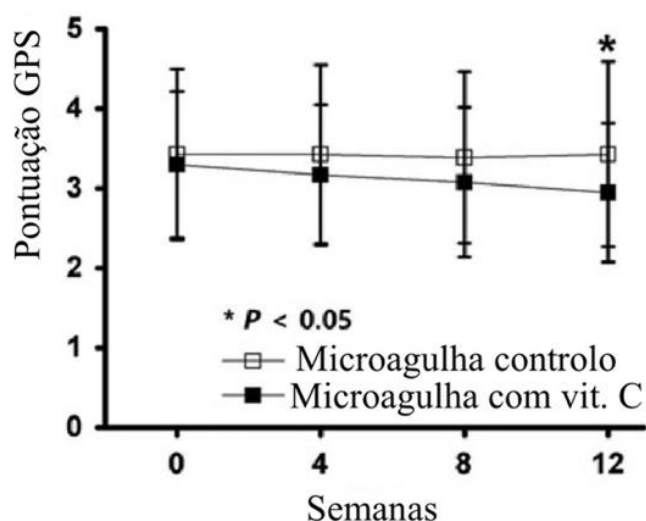


Figura 7.34 – Pontuação de GPS no grupo com microagulhas com ácido ascórbico e no grupo controlo. Adaptado de (151).

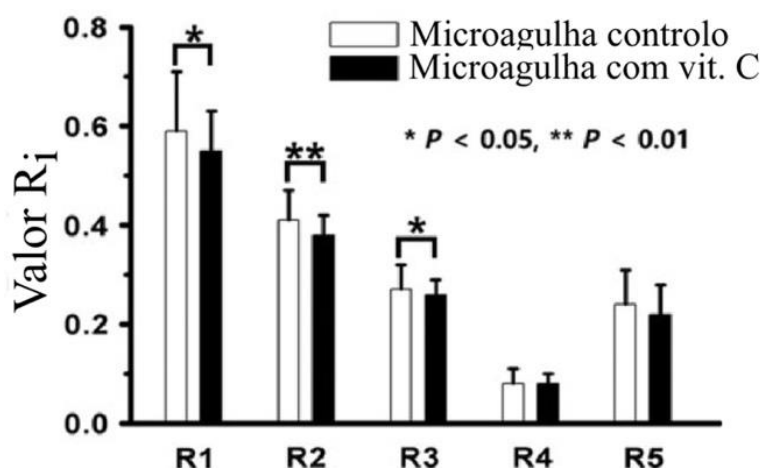


Figura 7.35 – Resultado da análise cutânea através do visiómetro. Adaptado de (151).

Concluiu-se que o sistema é eficaz e seguro no seu combate, já que se realizaram também ensaios de irritação e sensibilidade cutânea que demonstraram que o sistema não induziu nenhuma irritação ou sensibilidade cutânea (151).

As microagulhas não são utilizadas apenas para libertar os componentes ativos nas camadas mais inferiores da pele. Quando se aplicam instrumentos com microagulhas na pele, criam-se lesões que irão iniciar a cascata química pós-inflamatória, que dá origem a um processo de renovação cutânea. Estudos indicam que, ao utilizar estes instrumentos, ocorre a estimulação da síntese de ácido hialurónico e o aumento da produção de colagénio e elastina na pele bem como sua reconfiguração, o que melhora a aparência de cicatrizes e rugas (142,148,152–155).

El-Domyati *et al.* realizaram um estudo para investigar este efeito das microagulhas na produção de colagénio. Para isso foi utilizado um *dermaroller* com microagulhas de 1 mm tendo este sido distribuído pelas diversas áreas da face de forma uniforme com pressão mínima. Esta ação foi realizada durante 3 meses tendo os participantes sido sujeitos a 6 sessões com duas semanas de intervalo. Foram aconselhados a usar o antibiótico tópico ácido fusídico nas 24 horas após a sessão para prevenir uma infeção e evitar a exposição solar através do uso de protetor solar de com fator de proteção 30 ou superior (154).

Os resultados estão representados na tabela 7.10. Foi possível observar um aumento na espessura da epiderme que se manteve 3 meses após iniciar o tratamento. Os valores de elastina apresentaram-se diminuídos após os 3 meses de tratamento podendo isto ser explicado pela restauração parcial das mesmas, por outro lado, ocorre um aumento da tropoelastina, precursor das fibras elásticas. Estes resultados, apesar de não serem significativos ao fim do primeiro mês de tratamento, apresentam diferenças significativas ao fim de 3 meses. Ocorreu simultaneamente um aumento da síntese de colagénio bem como um aumento na quantidade dos colagénios I, II e VII e apesar de não serem estatisticamente significativos ao fim do primeiro mês de tratamento foi possível observar diferenças relevantes após os 3 meses. Estes resultados podem indicar que é necessário algum tempo para vermos os resultados (154).

Tabela 7.10 – Análise quantitativa da espessura da epiderme e proteínas da matriz extracelulares antes e depois do tratamento com a microagulha. Adaptado de (154).

n=10	Média ± DP			Valor <i>p</i>		
	Patamar inicial	Após um mês de tratamento (após duas sessões)	3 meses após tratamento (após 6 sessões)	Patamar inicial vs 1 mês de tratamento	1 mês de tratamento vs 3 meses após o início do tratamento	Patamar inicial vs 3 meses após o início do tratamento
Espessura da epiderme (µm)	58 ± 4.1	63 ± 3.8	72.9 ± 5.4	0.03*	0.01*	0.007*
% Elastina total	56.9 ± 5.3	55.2 ± 4.1	48.1 ± 4.9	0.511	0.03*	0.02*
% Tropoelastina	15.1 ± 4.2	16.6 ± 3.3	21.9 ± 2.9	0.478	0.03*	0.02*
% Colagénio recém sintetizado	14.1 ± 4.9	16.9 ± 4.2	21.8 ± 3.8	0.165	0.02*	0.01*
% Colagénio I	58.1 ± 5.1	61.2 ± 4.9	69.9 ± 5.4	0.369	0.02*	0.01*
% Colagénio III	55.6 ± 4.7	58.5 ± 5.6	67.8 ± 6.1	0.462	0.02*	0.01*
% Colagénio VII	13.5 ± 2.7	14.6 ± 2.1	19.1 ± 1.9	0.261	0.02*	0.02*

Foi possível observar que as microagulhas conferem algumas vantagens. O aumento da produção dos colagénios tipo I, III e VII, alterações na estrutura da elastina e aumento da espessura da derme papilar foram observadas ao logo dos 3 meses e apesar de serem necessárias várias sessões para manter o estado cutâneo, este processo é eficaz no combate ao envelhecimento, reduzindo significativamente a aparência de rugas e aumentando a elasticidade cutânea (154).

G. Ablon realizou outro estudo, desta vez com um instrumento de microagulha automatizado, onde foi novamente possível visualizar uma melhoria nos sinais de envelhecimento, nomeadamente as rugas, textura e flacidez da pele (155).

8. Conclusão

A pele é um órgão complexo, com diversas estruturas e mecanismos de proteção. Existem diversas funções que são asseguradas por este órgão, que é o primeiro contacto com o ambiente externo e atua impedindo não só a perda de componentes vitais ao organismo, como também protege o mesmo de agressores externos. A pele sofre diversas modificações estruturais ao longo do tempo que contribuem para alterações importantes e necessárias à sobrevivência humana, mas devido à sua grande importância estética, torna-se importante o combate bem como o retardamento dessas mesmas alterações. A elevada capacidade protetora da pele torna-a uma barreira difícil de ultrapassar, o que limita não só o tratamento de diversas patologias, como também na abordagem antienvhecimento. Esta dificuldade de penetração leva à constante necessidade de projetar novos métodos e tecnologias para assegurar uma melhor absorção cutânea de compostos ativos.

Ao longo da dissertação foram exploradas diferentes abordagens, desde o uso de nanotecnologias como as nanopartículas lipídicas sólidas, os transportadores lipídicos nanoestruturados, lipossomas, niossomas, nanocápsulas, dendrímeros, nanocristais e nanoemulsões, até ao uso de tecnologias físicas como a iontoforése, microagulhas, sonoforése e eletroporação.

Todos os estudos analisados e citados mostraram resultados promissores e demonstraram que é possível melhorar a penetração cutânea de compostos ativos. As nanotecnologias mais prevalentes e vantajosas na abordagem do antienvhecimento foram as SLN e as NLC. Devido ao seu caráter lipofílico, são transportadores que dão origem a produtos bastante compatíveis com a pele, protegendo os compostos ativos da degradação, permitindo uma libertação controlada desses produtos na pele. O facto de que a maior parte dos compostos ativos usados no combate ao envelhecimento serem lipofílicos leva também a que estas sejam as mais utilizadas. Os lipossomas e as nanoemulsões são também bastante utilizadas pelo seu caráter lipofílico, apesar de que, em comparação com as descritas previamente, apresentam menor capacidade de proteção de componentes. As nanocápsulas, dendrímeros e nanocristal são também nanotecnologias bastante vantajosas na abordagem antienvhecimento, apesar de apresentarem uma menor descrição de eficácia na literatura. É importante referir que a nanotecnologia a utilizar depende do propósito da formulação, tendo umas tecnologias mais vantagens que outras, devendo a sua escolha ser adaptada à formulação.

As tecnologias associadas ao combate do envelhecimento estão em constante evolução, e apesar de demonstrarem um grande potencial, mais estudos são necessários. Estudos comparando diferentes nanotecnologias podem não só proporcionar resultados mais esclarecedores como também benéficos para o desenvolvimento e aperfeiçoamento destas tecnologias.

Tecnologias físicas são também bastante úteis pois permitem alterar reversivelmente a permeabilidade das células aumentando a penetração dos compostos. Estas podem ser utilizadas de forma isolada, devido à sua capacidade de estimular a produção de diversos constituintes celulares, o que contribui para uma melhoria na pele, ou em conjunto, devido ao sinergismo entre elas. No entanto, mais estudos a comparar as tecnologias físicas entre si são necessários.

Com o decorrer dos anos, tem-se observado um maior interesse pelo cuidado da pele e uma maior exigência por parte dos consumidores. E, apesar dos resultados que existem de momento serem promissores, a barreira cutânea será sempre um obstáculo a contornar no que diz respeito ao transporte de compostos ativos no combate ao envelhecimento, de modo que são necessários mais estudos para obter formulações mais estáveis e esteticamente apelativas.

9. Bibliografia

1. Tobin DJ. Introduction to skin aging. *J Tissue Viability*. 2017;26:37–46.
2. Gu Y, Han J, Jiang C, Zhang Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Res Rev*. 2020;59:101036.
3. Lichterfeld-Kottner A, El Genedy M, Lahmann N, Blume-Peytavi U, Büscher A, Kottner J. Maintaining skin integrity in the aged: A systematic review. *Int J Nurs Stud*. 2020;103:103509.
4. Timsit J, Paul M, Shields RK, Echols R, Baba T, Yamano Y, et al. The Facial Aging Process From the “Inside Out” Arthur. *Aesthetic Surg J*. 2022;1–16.
5. Zouboulis CC, Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Elewa R, Makrantonaki E. Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment. *Clin Dermatol*. 2019;37(4):365–72.
6. Suozzi K, Turban J, Girardi M. Cutaneous photoprotection: A review of the current status and evolving strategies. *Yale J Biol Med*. 2020;93(1):55–67.
7. Strnadova K, Sandera V, Dvorankova B, Kodet O, Duskova M, Smetana K, et al. Skin aging: the dermal perspective. *Clin Dermatol*. 2019;37(4):326–35.
8. Kim B, Cho H-E, Moon SH, Ahn H-J, Bae S, Cho H-D, et al. Transdermal delivery systems in cosmetics. *Biomed Dermatology*. 2020;4(1):1–12.
9. Ahmad U, Ahmad Z, Khan AA, Akhtar J, Singh SP, Ahmad FJ. Strategies in Development and Delivery of Nanotechnology Based Cosmetic Products. *Drug Res (Stuttg)*. 2018;68(10):545–52.
10. Ahmed Saeed AL-Japairai K, Mahmood S, Hamed Almurisi S, Reddy Venugopal J, Rebhi Hilles A, Azmana M, et al. Current trends in polymer microneedle for transdermal drug delivery. *Int J Pharm*. 2020;587:119673.
11. McCrudden MTC, Mcalister E, Courtenay AJ, González-Vázquez P, Raj Singh TR, Donnelly RF. Microneedle applications in improving skin appearance. *Exp Dermatol*. 2015;24:561–6.
12. Sabbagh F, Kim BS. Recent advances in polymeric transdermal drug delivery systems. *J Control Release*. 2022;341:132–46.
13. Patel V, Sharma OP, Mehta T. Nanocrystal: a novel approach to overcome skin barriers for improved topical drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(4):351–68.
14. Hu X, He H. A review of cosmetic skin delivery. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(7):2020–30.
15. Santos AC, Morais F, Simões A, Pereira I, Sequeira JAD, Pereira-Silva M, et al. Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019;16(4):313–30.
16. Yamada M, Prow TW. Physical drug delivery enhancement for aged skin, UV damaged skin and skin cancer: Translation and commercialization. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;153:2–17.
17. Bakshi P, Vora D, Hemmady K, Banga AK. Iontophoretic skin delivery systems: Success and failures. *Int J Pharm*. 2020;586:119584.
18. Zorec B, Zupančič Š, Kristl J, Pavšelj N. Combinations of nanovesicles and physical methods for enhanced transdermal delivery of a model hydrophilic drug. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;127:387–97.
19. Münch S, Wohlrab J, Neubert RHH. Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;119:235–42.
20. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial

- skin. *Clin Dermatol.* 2014;32:3–13.
21. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(2):229–34.
 22. Yousef H, Sharma S. Anatomy, skin (integument), epidermis [Internet]. StatPearls. 2017 [cited 2022 Nov 9]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/322063118_Anatomy_Skin_Integument_Epidermis
 23. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat.* 2019;234(4):438–55.
 24. Ita K. Anatomy of the human skin. In: *Transdermal Drug Delivery.* Elsevier Inc.; 2020. p. 9–18.
 25. Bonifant H, Holloway S. A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. *Br J Community Nurs.* 2019;24:S28–33.
 26. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1):1–14.
 27. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):92–8.
 28. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017;25(3):283–9.
 29. Zhang X, Yin M, Zhang LJ. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells.* 2019;8(8):1–14.
 30. Serre C, Busuttill V, Botto JM. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. *Int J Cosmet Sci.* 2018;40(4):328–47.
 31. Qadri B. Skin. In: *The Human Body.* Elsevier Inc.; 2019. p. 65–85.
 32. D'Angelo Costa GM, Maia Campos PMBG. Efficacy of topical antioxidants in the skin hyperpigmentation control: A clinical study by reflectance confocal microscopy. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(2):538–45.
 33. Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology.* 2020;160(2):116–25.
 34. Ahmed IA, Mikail MA, Zamakshshari N, Abdullah ASH. Natural anti-aging skincare: role and potential. *Biogerontology.* 2020;21:293–310.
 35. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Med (United Kingdom).* 2021;49(6):337–42.
 36. Hirao T. Structure and Function of Skin From a Cosmetic Aspect. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications.* Elsevier Inc.; 2017. 673–683 p.
 37. Theocharidis G, Connelly JT. Minor collagens of the skin with not so minor functions. *J Anat.* 2019;235(2):418–29.
 38. Roig-Rosello E, Rousselle P. The human epidermal basement membrane: A shaped and cell instructive platform that aging slowly alters. *Biomolecules.* 2020;10(12):1–32.
 39. Hirobe T, Enami H, Nakayama A. The human melanocyte and melanoblast populations per unit area of epidermis in the rete ridge are greater than in the inter-rete ridge. *Int J Cosmet Sci.* 2021;43(2):211–7.
 40. Verdier-Sévrain S, Bonté F. Skin hydration: A review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol.* 2007;6(2):75–82.
 41. How KN, Yap WH, Lim CLH, Goh BH, Lai ZW. Hyaluronic Acid-Mediated Drug Delivery System Targeting for Inflammatory Skin Diseases: A Mini Review. *Front Pharmacol.* 2020;11:1–8.
 42. Baswan S, Kasting GB, Li SK, Wickett R, Adams B, Eurich S, et al. Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and

- diseases. *Mycoses*. 2017;60(5):284–95.
43. Brahs A, Rao Bolla S. Histology, Nail [Internet]. StatPearls. 2021 [cited 2022 Nov 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539733/>
 44. Gartner L. Textbook of histology. Fourth edi. Academic Medicine. Elsevier Inc.; 2017.
 45. Meckfessel MH, Brandt S. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(1):177–84.
 46. He hailun, Li A, Li S, Tang J, Li L, Xiong L. Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). *Biomed Pharmacother*. 2021;134.
 47. Amaral I, Barbosa D, Izolani A, Izolani Neto O. Revisão do uso de fatores de crescimentos e suas evidências clínicas em procedimentos estéticos antienvhecimento. *Brazilian J Surg Clin Res*. 2020;31(2):96–105.
 48. Schumacher B, Krieg TM. The Aging Skin: From Basic Mechanisms to Clinical Applications. *J Invest Dermatol*. 2021;141(4):949–50.
 49. Nikolakis G, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Experimental models of human skin aging. Second Edi. *Conn’s Handbook of Models for Human Aging*. Elsevier Inc.; 2018. 763–767 p.
 50. Flood KS, Houston NA, Savage KT, Kimball AB. Genetic basis for skin youthfulness. *Clin Dermatol*. 2019;37(4):312–9.
 51. Choi EH. Aging of the skin barrier. *Clin Dermatol*. 2019;37(4):336–45.
 52. Chang ALS. Expanding Our Understanding of Human Skin Aging. *J Invest Dermatol*. 2016;136(5):897–9.
 53. Franco AC, Aveleira C, Cavadas C. Skin senescence: mechanisms and impact on whole-body aging. *Trends Mol Med*. 2021;1–13.
 54. Wilkinson HN, Hardman MJ. A role for estrogen in skin ageing and dermal biomechanics. *Mech Ageing Dev*. 2021;197:111513.
 55. Rete ridge flattening [Internet]. [cited 2022 Nov 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/1369126>
 56. Gu Y, Han J, Jiang C, Zhang Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Res Rev*. 2020;59:101036.
 57. Malik A, Hoening LJ. Can aging be slowed down? *Clin Dermatol*. 2019;37(4):306–11.
 58. McDaniel D, Farris P, Valacchi G. Atmospheric skin aging—Contributors and inhibitors. *J Cosmet Dermatol*. 2018;17(2):124–37.
 59. Wang Y, Wang L, Wen X, Hao D, Zhang N, He G, et al. NF- κ B signaling in skin aging. *Mech Ageing Dev*. 2019;184.
 60. Low E, Alimohammadiha G, Smith LA, Costello LF, Przyborski SA, von Zglinicki T, et al. How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing? *Ageing Res Rev*. 2021;71:101456.
 61. Domaszewska-Szostek A, Puzianowska-Kuźnicka M, Kuryłowicz A. Flavonoids in skin senescence prevention and treatment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):1–18.
 62. Resende DISP, Ferreira M, Magalhães C, Sousa Lobo JM, Sousa E, Almeida IF. Trends in the use of marine ingredients in anti-aging cosmetics. *Algal Res*. 2021;55:1–11.
 63. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757–72.
 64. de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Adv Exp Med Biol*. 2017;996:15–23.
 65. Liu T, Li N, Yan Y qi, Liu Y, Xiong K, Liu Y, et al. Recent advances in the anti-aging effects of phytoestrogens on collagen, water content, and oxidative stress. *Phyther Res*.

- 2020;34(3):435–47.
66. Lephart ED. Skin aging and oxidative stress: Equol’s anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res Rev.* 2016;31:36–54.
 67. Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2019;132:73–82.
 68. Michalak M. Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):8–12.
 69. Babbush KM, Babbush RA, Khachemoune A. Treatment of melasma: a review of less commonly used antioxidants. *Int J Dermatol.* 2021;60(2):166–73.
 70. Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, et al. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;340:209–344.
 71. Baumann L. How to Use Oral and Topical Cosmeceuticals to Prevent and Treat Skin Aging. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2018;26(4):407–13.
 72. Solway J, McBride M, Haq F, Abdul W, Miller R. Diet and Dermatology: The Role of a Whole-food, Plant- based Diet in Preventing and Reversing Skin Aging—A Review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2020;13(5):38–43.
 73. Eisen DB, Asgari MM, Bennett DD, Connolly SM, Dellavalle RP, Freeman EE, et al. Guidelines of care for the management of actinic keratosis: Executive summary. *J Am Acad Dermatol.* 2021;85(4):945–55.
 74. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM. The roles of vitamin C in skin health. *Nutrients.* 2017;9(8).
 75. Distefano G, Goodpaster BH. Effects of exercise and aging on skeletal muscle. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3).
 76. Hood DA, Memme JM, Oliveira AN, Triolo M. Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. *Annu Rev Physiol.* 2019;81:19–41.
 77. de Lima Cherubim DJ, Buzanello Martins CV, Oliveira Fariña L, da Silva de Lucca RA. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(1):33–7.
 78. Burke KE. Mechanisms of aging and development—A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants. *Mech Ageing Dev.* 2018;172:123–30.
 79. Michalak M, Pierzak M, Kręćisz B, Suliga E. Bioactive compounds for skin health: A review. *Nutrients.* 2021;13(1):1–31.
 80. Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, Saito N, Ohsawa H, Kurita K, et al. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.
 81. Gref R, Deloménie C, Maksimenko A, Gouadon E, Percoco G, Lati E, et al. Vitamin C–squalene bioconjugate promotes epidermal thickening and collagen production in human skin. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–12.
 82. Rattanawiwatpong P, Wanitphakdeedecha R, Bumrungpert A, Maiprasert M. Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(3):671–6.
 83. Burke KE. Protection From Environmental Skin Damage With Topical Antioxidants. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(1):36–8.
 84. Lintner K, Gerstein F, Solish N. A serum containing vitamins C & E and a matrix-repair tripeptide reduces facial signs of aging as evidenced by Primos® analysis and frequently repeated auto-perception. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(12):3262–9.
 85. Shao Y, He T, Fisher GJ, Voorhees JJ, Quan T. Molecular basis of retinol anti-ageing

- properties in naturally aged human skin in vivo. *Int J Cosmet Sci.* 2017;39(1):56–65.
86. Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fangueiro JF, et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *Int J Pharm.* 2014;473(1–2):591–8.
 87. Lee YI, Kim S, Kim J, Kim J, Chung KB, Lee JH. Randomized controlled study for the anti-aging effect of human adipocyte-derived mesenchymal stem cell media combined with niacinamide after laser therapy. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(6):1774–81.
 88. Chandan N, Rajkumar JR, Shi VY, Lio PA. A new era of moisturizers. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(8):2425–30.
 89. Gujar K, Wairkar S. Nanocrystal technology for improving therapeutic efficacy of flavonoids. *Phytomedicine.* 2020;71:153240.
 90. Draelos ZD. The science behind skin care: Moisturizers. *J Cosmet Dermatol.* 2018;17(2):138–44.
 91. Huth S, Schmitt L, Marquardt Y, Heise R, Lüscher B, Amann PM, et al. Effects of a ceramide-containing water-in-oil ointment on skin barrier function and allergen penetration in an IL-31 treated 3D model of the disrupted skin barrier. *Exp Dermatol.* 2018;27(9):1009–14.
 92. Souyoul SA, Saussy KP, Lupo MP. Nutraceuticals: A Review. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2018;8(1):5–16.
 93. Bains P, Kaur M, Kaur J, Sharma S. Nicotinamide: Mechanism of action and indications in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2018;84(2):234–7.
 94. Lohani A, Verma A. Vesicles: Potential nano carriers for the delivery of skin cosmetics. *J Cosmet Laser Ther.* 2017;19(8):485–93.
 95. Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020;17(2):145–55.
 96. Costa R, Santos L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technol.* 2017;322:402–16.
 97. Chen Y, Feng X, Meng S. Site-specific drug delivery in the skin for the localized treatment of skin diseases. *Expert Opin Drug Deliv.* 2019;16(8):847–67.
 98. Khezri K, Saeedi M, Maleki Dizaj S. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:1499–505.
 99. Kouassi MC, Grisel M, Gore E. Multifunctional active ingredient-based delivery systems for skincare formulations: A review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2022;217:112676.
 100. Van Tran V, Moon JY, Lee YC. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *J Control Release.* 2019;300:114–40.
 101. Akhtar N, Khan RA. Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions'. *Prog Lipid Res.* 2016;64:192–230.
 102. Cheng YC, Li TS, Su HL, Lee PC, Wang HMD. Transdermal delivery systems of natural products applied to skin therapy and care. *Molecules.* 2020;25(21):1–21.
 103. Mota AH, Rijo P, Molpeceres J, Reis CP. Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *Int J Pharm.* 2017;532(2):710–28.
 104. Szulc-Musioł B, Sarecka-Hujar B. The use of micro- and nanocarriers for resveratrol delivery into and across the skin in different skin diseases—a literature review. *Pharmaceutics.* 2021;13(4).
 105. Jain S, Patel N, Shah MK, Khatri P, Vora N. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles

- and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. *J Pharm Sci.* 2017;106(2):423–45.
106. Roberts MS, Mohammed Y, Pastore MN, Namjoshi S, Yousef S, Alinaghi A, et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *J Control Release.* 2017;247:86–105.
 107. Santos AC, Rodrigues D, Sequeira JAD, Pereira I, Simões A, Costa D, et al. Nanotechnological breakthroughs in the development of topical phytocompounds-based formulations. *Int J Pharm.* 2019;572:118787.
 108. Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J Control Release.* 2018;270:203–25.
 109. Zhu J, Tang X, Jia Y, Ho CT, Huang Q. Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery – A review. *Int J Pharm.* 2020;578:119127.
 110. Nastiti CMRR, Ponto T, Mohammed Y, Roberts MS, Benson HAE. Novel nanocarriers for targeted topical skin delivery of the antioxidant resveratrol. *Pharmaceutics.* 2020;12(2).
 111. Harun MS, Wong TW, Fong CW. Advancing skin delivery of α -tocopherol and γ -tocotrienol for dermatitis treatment via nanotechnology and microwave technology. *Int J Pharm.* 2021;593:120099.
 112. El-Leithy ES, Makky AM, Khatib AM, Hussein DG. Optimization of nutraceutical coenzyme Q10 nanoemulsion with improved skin permeability and anti-wrinkle efficiency. *Drug Dev Ind Pharm.* 2018;44(2):316–28.
 113. Rocha V, Marques C, Figueiredo JL, Gaio AR, Costa PC, Sousa Lobo JM, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of resveratrol-loaded nanoparticles: Focus on the challenges of in vitro methodologies. *Food Chem Toxicol.* 2017;103:214–22.
 114. Pukale SS, Sahel DK, Mittal A, Chitkara D. Coenzyme Q10 loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles in gel for the treatment of psoriasis like skin condition. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2022;76:103672.
 115. Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Xu H, Yang X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm.* 2007;328(2):191–5.
 116. Soldati PP, Polonini HC, Paes CQ, Restrepob JAS, Creczynski-Pasa TB, Chaves MGAM, et al. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. *IFAC-PapersOnLine.* 2018;51(27):16–21.
 117. Argimón M, Romero M, Miranda P, Mombrú ÁW, Miraballes I, Zimet P, et al. Development and characterization of Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical application. *J Braz Chem Soc.* 2017;28(7):1177–84.
 118. Eiras F, Amaral MH, Silva R, Martins E, Lobo JMS, Silva AC. Characterization and biocompatibility evaluation of cutaneous formulations containing lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2017;519(1–2):373–80.
 119. Vinardell MP, Mitjans M. Nanocarriers for delivery of antioxidants on the skin. *Cosmetics.* 2015;2(4):342–54.
 120. Chen J, Wei N, Lopez-Garcia M, Ambrose D, Lee J, Annelin C, et al. Development and evaluation of resveratrol, Vitamin E, and epigallocatechin gallate loaded lipid nanoparticles for skin care applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;117:286–91.
 121. Abila MJ, Banga AK. Formulation of tocopherol nanocarriers and in vitro delivery into human skin. *Int J Cosmet Sci.* 2014;36(3):239–46.
 122. Lee WC, Tsai TH. Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q10 for in vivo topical application. *Int J Pharm.* 2010;395(1–2):78–83.
 123. Bi Y, Xia H, Li L, Lee RJ, Xie J, Liu Z, et al. Liposomal vitamin D3 as an anti-aging

- agent for the skin. *Pharmaceutics*. 2019;11(7).
124. Chaikul P, Khat-udomkiri N, Iangthanarat K, Manosroi J, Manosroi A. Characteristics and in vitro anti-skin aging activity of gallic acid loaded in cationic CTAB niosome. *Eur J Pharm Sci*. 2019;131:39–49.
 125. Chen S, Hanning S, Falconer J, Locke M, Wen J. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;144:18–39.
 126. Pando D, Caddeo C, Manconi M, Fadda AM, Pazos C. Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(8):1158–67.
 127. Li D, Martini N, Wu Z, Chen S, Falconer JR, Locke M, et al. Niosomal Nanocarriers for Enhanced Dermal Delivery of Epigallocatechin Gallate for Protection against Oxidative Stress of the Skin. *Pharmaceutics*. 2022;14(4).
 128. Dragicevic N, Maibach H. Combined use of nanocarriers and physical methods for percutaneous penetration enhancement. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;127:58–84.
 129. Ramanunni AK, Wadhwa S, Gulati M, Singh SK, Kapoor B, Dureja H, et al. Nanocarriers for treatment of dermatological diseases: Principle, perspective and practices. *Eur J Pharmacol*. 2021;890:173691.
 130. Xia N, Liu T, Wang Q, Xia Q, Bian X. In vitro evaluation of α -lipoic acid-loaded lipid nanocapsules for topical delivery. *J Microencapsul*. 2017;34(6):571–81.
 131. Teixeira Z, Zanchetta B, Melo BAG, Oliveira LL, Santana MHA, Paredes-Gamero EJ, et al. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;81(1):374–80.
 132. Mutalik S, Nayak UY, Kalra R, Kumar A, Kulkarni R V., Parekh HS. Sonophoresis-mediated permeation and retention of peptide dendrimers across human epidermis. *Ski Res Technol*. 2012;18(1):101–7.
 133. Shetty PK, Manikkath J, Tupally K, Kokil G, Hegde AR, Raut SY, et al. Skin Delivery of EGCG and Silibinin: Potential of Peptide Dendrimers for Enhanced Skin Permeation and Deposition. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(6):2346–57.
 134. Pentek T, Newenhouse E, O'Brien B, Singh Chauhan A. Development of a Topical Resveratrol Formulation for Commercial Applications Using Dendrimer Nanotechnology. *Molecules*. 2017;22(1).
 135. Lai F, Pireddu R, Corrias F, Fadda AM, Valenti D, Pini E, et al. Nanosuspension improves tretinoin photostability and delivery to the skin. *Int J Pharm*. 2013;458(1):104–9.
 136. Queiroz MLB, Shanmugam S, Santos LNS, Campos C de A, Santos AM, Batista MS, et al. Microneedles as an alternative technology for transdermal drug delivery systems: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2020;30(6):433–52.
 137. Waghule T, Singhvi G, Dubey SK, Pandey MM, Gupta G, Singh M, et al. Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1249–58.
 138. Yan C, Ng JNC, Wanitphakdeedecha R. Efficacy of handheld iontophoresis device in enhancing transdermal vitamin C delivery: A split-face clinical trial. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(2):698–706.
 139. Liatsopoulou A, Varvaresou A, Mellou F, Protopapa E. Iontophoresis in dermal delivery: A review of applications in dermato-cosmetic and aesthetic sciences. *Int J Cosmet Sci*. 2023;45:117–32.
 140. Monteiro e Silva SA, Souza JG de, Melo PS, Moreno IAM, Alencar SM, Lopez RFV, et al. Target action of antioxidants using iontophoresis. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(2):664–76.

141. Vogt A, Wischke C, Neffe AT, Ma N, Alexiev U, Lendlein A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? *J Control Release*. 2016;242:3–15.
142. Zasada M, Markiewicz A, Drożdż Z, Mosińska P, Erkiert-Polguj A, Budzisz E. Preliminary randomized controlled trial of antiaging effects of l-ascorbic acid applied in combination with no-needle and microneedle mesotherapy. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18(3):843–9.
143. Golberg A, Villiger M, Khan S, Quinn KP, Lo WCY, Bouma BE, et al. Preventing Scars after Injury with Partial Irreversible Electroporation. *Physiol Behav*. 2017;176(1):139–48.
144. Li X, Saeidi N, Villiger M, Albadawi H, Jones JD, Quinn KP, et al. Rejuvenation of aged rat skin with pulsed electric fields. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(12):2309–18.
145. Krasovitski B, Frenkel V, Shoham S, Kimmel E. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3258–63.
146. Zasada M, Drożdż Z, Erkiert-Polguj A, Budzisz E. A blinded study assessment of the efficacy of an original formula with retinol in combination with sonophoresis. *Dermatol Ther*. 2020;33(1).
147. Jung EC, Zhu H, Zou Y, Elmahdy A, Cao Y, Hui X, et al. Effect of ultrasound and heat on percutaneous absorption of l-ascorbic acid: human in vitro studies on Franz cell and Petri dish systems. *Int J Cosmet Sci*. 2016;38(6):646–50.
148. Jin X, Zhang X, Li Y, Xu M, Yao Y, Wu Z, et al. Long-acting microneedle patch loaded with adipose collagen fragment for preventing the skin photoaging in mice. *Biomater Adv*. 2022;135.
149. Microneedles. In: *Transdermal Drug Delivery*. Elsevier Inc.; 2020. p. 143–81.
150. Hong JY, Ko EJ, Choi SY, Li K, Kim AR, Park JO, et al. Efficacy and safety of a novel, soluble microneedle patch for the improvement of facial wrinkle. *J Cosmet Dermatol*. 2018;17(2):235–41.
151. Lee C, Yang H, Kim S, Kim M, Kang H, Kim N, et al. Evaluation of the anti-wrinkle effect of an ascorbic acid-loaded dissolving microneedle patch via a double-blind, placebo-controlled clinical study. *Int J Cosmet Sci*. 2016;38(4):375–81.
152. Alessa D, Bloom JD. Microneedling Options for Skin Rejuvenation, Including Non-temperature-controlled Fractional Microneedle Radiofrequency Treatments. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2020;28(1):1–7.
153. Devgan L, Singh P, Durairaj K. Minimally Invasive Facial Cosmetic Procedures. *Otolaryngol Clin North Am*. 2019;52(3):443–59.
154. El-Domyati M, Barakat M, Awad S, Medhat W, El-Fakahany H, Farag H. Multiple microneedling sessions for minimally invasive facial rejuvenation: An objective assessment. *Int J Dermatol*. 2015;54(12):1361–9.
155. Ablon G. Safety and effectiveness of an automated microneedling device in improving the signs of aging skin. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018;11(8):29–34.
156. Yu M, Yuan W, Li D, Schwendeman A, Schwendeman SP. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. *J Control Release*. 2019;315:23–30.