

**INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

ANA LÚCIA KOFF MILAN

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA AVALIAÇÃO
DA HIDRATAÇÃO CUTÂNEA DE IDOSAS PELO
USO TÓPICO DE NICOTINAMIDA**

**Porto Alegre
2006**

ANA LÚCIA KOFF MILAN

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA AVALIAÇÃO
DA HIDRATAÇÃO CUTÂNEA DE IDOSAS PELO
USO TÓPICO DE NICOTINAMIDA**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. André Arigony Souto

Porto Alegre

2006

*“À minha família, em especial
minha mãe, por todo o seu esforço,
dedicação infinita e amor, que me
proporcionaram chegar até aqui”.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. André Arigony Souto, por todos os ensinamentos, pela confiança e pelo apoio dispensados durante todo este tempo.

À Prof^a Temis Corte, pela oportunidade, pela ajuda, pelo incentivo e também pela amizade a mim conferidas desde a graduação, e que se estenderam durante o Mestrado.

Ao Prof. Luiz Glock, pelo auxílio dispensado para a realização dos cálculos estatísticos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, pelos aprendizados construídos.

À equipe da secretaria do Instituto de Geriatria e Gerontologia, em especial à Sra. Lúcia, pelo apoio e compreensão no atendimento dado aos mestrandos.

À minha colega Simone Dal Bosco por todo o apoio, estímulo e ajuda na busca de voluntárias.

Às alunas Betania Fonseca, Cíntia Witt e Candida Deves, da Faculdade de Farmácia da PUCRS, pela ajuda dedicada na realização dos experimentos práticos.

Às casas geriátricas Lar dos Velhos Maurício Seligman, Clínica Vitális e ao grupo de senhoras da Igreja São Francisco, em especial à Dona Maria, cuja ajuda foi essencial para a realização deste trabalho.

À todas as voluntárias que participaram deste projeto com exemplares responsabilidade e dedicação.

"A velhice é, e deveria ser considerada por todos, um tempo maravilhoso da vida. É parecido com o clássico entardecer do dia, quando as pessoas mais sensíveis param e se permitem curtir o espetáculo do pôr-do-sol, percebendo, mesmo sem entender, que há algo muito maior e mais importante do que a busca frenética e mesquinha pelo dinheiro, pela fama e pelo poder, a qual está empenhado o mundo."

Chafic Jbeili

RESUMO

Introdução: o processo de envelhecimento da pele determina uma série de mudanças na capacidade e funcionabilidade do tecido, resultando em perda de células, fibras elásticas, lipídios e diminuição da capacidade proliferativa. Como consequência, o estrato córneo apresenta diminuição do conteúdo de lipídios (principalmente ceramidas), ocasionando o aparecimento de xerose senil (pele seca). Esta é uma das desordens dermatológicas mais comuns em idosos e sua incidência e gravidade aumentam com a idade. Ela caracteriza-se por prurido, rachaduras e fissuras com descamação, podendo levar ao desenvolvimento de transtornos dermatológicos mais graves. O conteúdo de água é um importante fator para a condição da pele, sendo que este se encontra em uma quantidade 25% menor na pele xerótica quando comparado com a pele normal. Desta forma, a pele do idoso necessita de atenção particular, e nesse sentido, produtos hidratantes específicos para a população em questão devem ser desenvolvidos. A Nicotinamida (vitamina B₃) é um indutor da síntese de lipídios do estrato córneo e possui comprovada ação no aumento da hidratação cutânea de jovens. Ela é um substrato para a formação de NAD e NADP nas células, os quais servem como co-fatores para diversas reações bioquímicas na pele. Portanto, ela apresenta grande potencial para ser um ativo importante na reestruturação da barreira lipídica e consequente aumento da hidratação da pele de idosos. **Objetivos:** caracterizar a pele de jovens e idosas quanto ao conteúdo de água e lipídios, antes do início do tratamento com Nicotinamida; avaliar a performance de hidratação e o aumento do conteúdo lipídico na pele envelhecida e na pele de jovens ocasionados pelo uso tópico de Nicotinamida através da Espectroscopia de Infravermelho. **Metodologia:** foi realizado estudo *in vivo*, com 55 mulheres saudáveis, sendo 29 pertencentes ao grupo jovem (18-25 anos) e 26 pertencentes ao grupo idoso (60-93 anos). As medidas de hidratação cutânea e do conteúdo lipídico foram realizadas por Espectroscopia de Infravermelho, um método biofísico, não-invasivo. Espectros da pele das voluntárias foram obtidos antes e depois do início do tratamento, o qual foi constituído por duas aplicações diárias de Solução de Nicotinamida 2% em um antebraço e de Solução Placebo no outro antebraço, por um período de 30 dias. A hidratação cutânea foi calculada pela razão entre as bandas de amida I e amida II. A

banda de amida I é sobreposta pela banda de água, portanto, quanto maior o aumento na absorção dessa banda, maior a hidratação cutânea. O conteúdo lipídico foi calculado através da razão entre as bandas de CH₂ assimétrico e CH₂ simétrico.

Resultados: Jovens e idosas apresentaram o mesmo conteúdo de água e de lipídios no estrato córneo, antes do início do tratamento. A Nicotinamida mostrou aumentar a hidratação cutânea, tanto no grupo jovem quanto no idoso. O aumento verificado no grupo jovem foi de 3,7%, enquanto que no grupo idoso foi de 1,8%. O conteúdo lipídico também aumentou após tratamento com Nicotinamida, em torno de 5,5%, em ambos grupos. Os dados foram avaliados através da análise da variância (ANOVA), e foram encontradas diferenças significativas entre início e o final do tratamento com Nicotinamida nos dois grupos, enquanto que no tratamento com solução placebo não foram encontradas diferenças significativas. **Discussão e**

Conclusão: A Espectroscopia de Infravermelho foi capaz de detectar o aumento de hidratação cutânea e do conteúdo de lipídios do estrato córneo pelo uso de Nicotinamida 2% em ambos os grupos. Além disso, o estudo revelou que há uma grande diferença no aumento da hidratação, após o tratamento com Nicotinamida, entre o grupo jovem e o grupo idoso: o aumento na hidratação cutânea do grupo jovem foi duas vezes maior do que no grupo idoso. Esta é a primeira vez que esse dado é apresentado.

Palavras-chave: Envelhecimento. Nicotinamida. ATR-FTIR. Hidratação cutânea

ABSTRACT

Introduction: the skin aging process determines a series of changes in the tissue's capacity and functionality, resulting in loss of cells, elastic fibers, lipids and reduction of proliferative capacity. As a consequence, the stratum corneum presents a reduction in lipid content (specially ceramides), provoking the appearance of senile xerosis (dry skin). This is one of the most common skin disorders in elderly people, and its incidence and severeness increase with age. It is characterized by pruritus, cracks and fissures with desquamation, and it can lead to the development of more serious skin disorders. The water content is an important factor for the skin condition, being 25% lower in the xerotic skin when compared to a normal skin. Thus, the elderly skin requires special attention and, to that end, hydrating products designed specifically for elderly people must be developed. Nicotinamide (vitamin B₃) is an inductor of synthesis of stratum corneum lipids, with proved effectiveness in increasing the skin hydration of young people. It is a substrate for the formation of NAD and NADP in cells, which work as cofactors for several biochemical reactions in the skin. Therefore, nicotinamide presents a high potential to be an important asset in the restructuring of the lipid barrier and consequent increase in the skin hydration of the elderly. **Objectives:** characterize the skin of young and elderly women regarding water and lipid content, before starting the treatment with Nicotinamide; evaluate the hydration performance and the increase in lipid content caused by the topical use of Nicotinamide in the skin of elderly and young women using Infrared Spectroscopy. **Methodology:** an *in vivo* study was carried out with 55 healthy women, divided into two groups: a younger group (aged 18-25 years) and an elder group (aged 60-93 years). Skin hydration and lipid content measurements were carried out through Infrared Spectroscopy, a biophysical non-invasive method. Specters of the volunteers' skin were obtained before and after the treatment, which lasted 30 days, in which the volunteers applied, twice a day, the Nicotinamide Solution 2% in one forearm and the Placebo Solution in the other one. Skin hydration was calculated by the rate between the amid I and amid II bands. Amid I band is superposed by the water band; therefore, the higher is the increase in this band's absorption, the higher is the skin hydration. Lipid content was calculated through the rate between asymmetrical and symmetrical CH₂ bands. **Results:** Younger and elder women

presented the same water and lipid content in the stratum corneum before starting the treatment. Nicotinamide proved to increase skin hydration both in the younger and in the elder group. The increase verified in the younger group was of 3,7%, whereas in the elder group it was of 1,8%. The lipid content also increased following treatment with Nicotinamide - around 5,5% - in both groups. Data treatment was carried out through analysis of variance (ANOVA). Significant differences were found throughout the treatment with Nicotinamide in both groups, whereas the treatment with the placebo solution did not show significant results. **Discussion and Conclusion:** Infrared Spectroscopy was able to detect an increase in skin hydration and in the lipid content of the stratum corneum by the use of Nicotinamide 2% in both groups. Besides, the study revealed that there is a great difference between the increase in the hydration level of the younger group and that of the elder group: the younger group doubled its degree of skin hydration, compared to the elder group. This is the first time this data is introduced.

Key-words: Aging. Nicotinamide. ATR-FTIR. Skin hydration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Aparência clínica de pele fotoenvelhecida em áreas da face expostas ao sol, revelando rugas profundas, amarelamento e elasticidade diminuída (adaptado de MA *et al.*, 2001)26**
- Figura 2 - Características histológicas da pele fotoenvelhecida. (a,b) A distribuição e abundância de elastina na pele exposta e na pele protegida do sol foram determinadas usando coloração por orceína. Na pele exposta ao sol, são observadas fibras elásticas fotodanificadas em abundância na derme e derme superior (a), enquanto que uma fina rede de fibras elásticas é aparente na derme superficial da pele protegida do sol (b). Escala bar $\frac{1}{4}$ 50 μ m. (c,d) Luz microscópica de haematoxilina, eosina e safranina- seções coradas mostram altos números de células infiltradas na pele exposta ao sol em comparação à pele protegida. Scale bars $\frac{1}{4}$ 20 μ m, 200 μ m (adaptado de BOSSET *et al.*, 2003)27**
- Figura 3 - Aparência ultraestrutural da pele do antebraço exposta ao sol. (a,b) fotografias mostram fibras de colágeno partidas. Em grande aumento (b), numerosos rompimentos nas fibras são aparentes, a presença de matriz rompida e numerosas quantidades de material amorfo também são visíveis. Células em contato com a mistura de fibras de colágeno intacto e fragmentado (c) e com material amorfo (d) são aparentes. Escala bars: (a) 1.33 mm; (b) 0.67 mm; (c) 3.57 mm; (d) 2.17 mm (adaptado de FLIGIEL *et al.*, 2003)28**
- Figura 4 - Estrutura química da molécula de Nicotinamida. Nicotinamida é um precursor para cofatores de energia (adaptado de GEHRING, 2004)35**
- Figura 5 - Espectro de Infravermelho da molécula de água. Observa-se bandas nas frequências de 3300 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} (banda de amida I), utilizadas para cálculo de hidratação cutânea38**
- Figura 6 - Espectros de Infravermelho da pele humana. Em destaque, as bandas de amida I e amida II, utilizadas para obtenção da medida de hidratação; (vermelho) espectro demonstrando maior conteúdo de água, devido à maior desproporção entre as bandas de amida; (azul) espectro demonstrando menor conteúdo de água38**
- Figura 7 - Espectros de Infravermelho da pele humana. Em destaque as bandas de 2920 cm^{-1} (estiramento CH_2 assimétrico) e 2850 cm^{-1} (estiramento CH_2 simétrico), utilizadas para calcular a quantidade de lipídios do estrato córneo; (vermelho) espectro demonstrando maior conteúdo lipídico, devido a uma maior relação entre as bandas indicadas; (azul) espectro demonstrando menor conteúdo de lipídios no estrato córneo39**

Figura 8 - Cristal de Selenito de Zinco, acessório do equipamento de ATR-FTIR, utilizado para leitura do estrato córneo das voluntárias	45
Figura 9 - Voluntária idosa com antebraço sobre o cristal do equipamento de ATR-FTIR durante obtenção de espectro do estrato córneo.....	45
Figura 10 - Frascos contendo as soluções de Nicotinamida 2% (à esquerda) e de Solução Placebo (à direita), utilizadas no experimento	46
Figura 11 - As médias das razões das bandas de amida I e amida II, antes e depois do tratamento com solução placebo e Nicotinamida no grupo jovem	51
Figura 12 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária jovem; (vermelho) espectro do antebraço esquerdo antes da intervenção; (preto) espectro do antebraço esquerdo após tratamento com Solução Placebo. Percebe-se que não existem diferenças na proporção entre as bandas de amida I e amida II, o que demonstra que não houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo	51
Figura 13 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária jovem; (azul) espectro do antebraço direito antes da intervenção; (preto) espectro do antebraço direito após tratamento com Solução Nicotinamida 2%. Percebe-se que existe aumento na desproporção entre as bandas de amida I e amida II após o tratamento, o que demonstra que houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo	52
Figura 14 - As médias das razões das bandas de amida I e amida II, antes e depois do tratamento com Solução Placebo e Nicotinamida no grupo idoso.....	53
Figura 15 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária idosa; (preto) espectro do antebraço esquerdo antes da intervenção; (vermelho) espectro do antebraço esquerdo após tratamento com Solução Placebo. Percebe-se que não existem diferenças na proporção entre as bandas de amida I e amida II, o que demonstra que não houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo	53
Figura 16 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária idosa; (azul) espectro do antebraço direito antes da intervenção; (vermelho) espectro do antebraço direito após tratamento com Solução Nicotinamida 2%. Percebe-se que existem diferenças na proporção entre as bandas de amida I e amida II, o que demonstra que houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo	54
Figura 17 - Gráfico demonstrando aumento no conteúdo de lipídios do estrato córneo de jovens e idosas após tratamento com Nicotinamida.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Freqüências de absorção de constituintes do estrato córneo	39
Tabela 2 - Médias das bandas de amida I/amida II, que demonstram a hidratação cutânea da pele de jovens e idosas antes do início do tratamento	49
Tabela 3 - Médias das bandas $2920\text{cm}^{-1}/2850\text{cm}^{-1}$, que demonstram a quantidade de lipídios do estrato córneo da pele de jovens e idosas antes do início do tratamento	50
Tabela 4 - Demonstração das médias das razões das bandas de amida I/amida II encontradas no grupo jovem	50
Tabela 5 - Demonstração das médias das razões das bandas de amida I/amida II encontradas para o grupo idoso	52
Tabela 6 - Médias das razões das bandas $2920\text{cm}^{-1}/2850\text{cm}^{-1}$ para os grupos jovem e idoso após o uso de Nicotinamida	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	- TRANSCRIPTION FACTOR (FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR)
ATR-FTIR	- ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE FOURIER TRANSFORM INFRARED SEPECTROSCOPY (ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM ATENUAÇÃO DE REFLETÂNCIA)
DNA	- DEOXYRIBONUDEIC ACID (ÁCIDO DESOXIRIBONUCLÉICO)
G1	- FASE DE CRESCIMENTO DO CICLO CELULAR
IBGE	- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA
H ₂ O ₂	- PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
MMP	- METALOPROTEINASES
MMP-1	- METALOPROTEINASE 1
MMP-2	- METALOPROTEINASE 2
MMP-3	- METALOPROTEINASE 3
MMP-9	- METALOPROTEINASE 9
NAD	- NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO
NADH	- FORMA REDUZIDA DE NAD
NADP	- NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO FOSFATO
NADPH	- FORMA REDUZIDA DE NADP
NIR	- NEAR INFRARED (ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO APROXIMADA)
NMF	- NATURAL MOISTURIZING FACTOR (FATOR NATURAL DE HIDRATAÇÃO DA PELE)
NMR	- NUCLEAR MAGNETIC RESSONANCE (RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA)
O ₂	- OXIGÊNIO SINGLETO
O ₂ ⁻	- ÂNION SUPERÓXIDO
OH	- RADICAL HIDROXILA
PCA-Na	- PYRROLIDINE CARBOXYLIC ACID (ÁCIDO PIRROLIDONICO-CARBOXÍLICO)
ROS	- REACTIVE OXIGEN SPECIES (ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO)
SPT	- SERINE PALMITOYL TRANSFERASE (ENZIMA SERINA PALMITIL TRANSFERASE)

- TEWL** - **TRANSEPIDERMAL WATER LOSS (PERDA DE ÁGUA TRANSEPIDERMAL)**
- TGF-beta** - **TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (FATOR DE CRESCIMENTO E TRANSFORMAÇÃO BETA)**
- TIMP** - **TISSUE INHIBITORS OF METALOPROTEINASES (INIBIDORES DE METALOPROTEINASES)**
- UV** - **RADIAÇÕES ULTRAVIOLETA**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL	17
2.2 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO	17
2.3 TEORIAS DO ENVELHECIMENTO	18
2.4 ENVELHECIMENTO DA PELE	21
2.4.1 Envelhecimento intrínseco	22
2.4.1.1 Senescência celular	23
2.4.1.2 Teorias relacionadas à senescência celular	24
2.4.1.3 Dano oxidativo	24
2.4.2 Fotoenvelhecimento	26
2.4.2.1 Mudanças no tecido conectivo	26
2.4.2.2 Metaloproteinases x fotoenvelhecimento	28
2.5 PELE	29
2.5.1 Composição da pele	29
2.5.2 Hidratação cutânea	30
2.5.3 Xerose Senil	32
2.5.4 Formas de hidratação cutânea	33
2.5.5 Metodologias de quantificação da hidratação cutânea	35
3 JUSTIFICATIVA	40
4 OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GERAL	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5 MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 DELINEAMENTO GERAL	42
5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	42
5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	42
5.4 RECOMENDAÇÕES GERAIS	43
5.5 ÉTICA	44
5.6 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES-TESTE	44
5.7 DESCRIÇÃO DO ENSAIO CLÍNICO	44
5.8 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRATAÇÃO CUTÂNEA E CONTEÚDO DE LIPÍDIOS	47
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48

6 RESULTADOS	
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁGUA E LIPÍDIOS DO ESTRATO CÓRNEO NO GRUPO JOVEM E IDOSO (ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO).....	49
6.2 HIDRATAÇÃO CUTÂNEA NO GRUPO JOVEM.....	50
6.3 HIDRATAÇÃO CUTÂNEA NO GRUPO IDOSO.....	52
6.4 CONTEÚDO DE LIPÍDIOS DO ESTRATO CÓRNEO NO GRUPO JOVEM E IDOSO APÓS TRATAMENTO COM NICOTINAMIDA.....	54
7 DISCUSSÃO	56
8 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	68
APÊNDICE A - Documento com recomendações gerais sobre o estudo <i>in vivo</i> entregue às voluntárias	69
APÊNDICE B - Ficha de Controle de Aplicação das Soluções	70
APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	71
APÊNDICE D - Resumo apresentado no 20º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, São Paulo/SP	73
APÊNDICE E - Resumo enviado para o WORLD CONGRESS OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES 2006 - 66th International Congress of FIP	75
ANEXOS	77
ANEXO A - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS ..	78
ANEXO B - Correspondência eletrônica com pesquisador Tanno	79

1 INTRODUÇÃO

O atual panorama de envelhecimento populacional, que vem se delineando desde o último século, tem levado cientistas de todo o mundo a voltarem sua atenção e seus esforços para entender melhor este fenômeno. Na busca por esclarecimentos sobre os processos de envelhecimento, e visando a cura de doenças a ele relacionadas, muitos estudos e descobertas estão sendo feitos.

O foco principal de todo o esforço despendido não é apenas aumentar os anos vividos pela população idosa, mas elevar a qualidade de vida desses anos, proporcionando um envelhecimento bem-sucedido.

Para isso, é essencial que se construa um conhecimento profundo sobre o envelhecimento humano. A descoberta das causas, das formas de prevenção e o surgimento de novas tecnologias e medicamentos para os males que atingem os idosos são fundamentais no atual contexto da população, que, nos próximos anos, terá um aumento exponencial do número de idosos.

Assim como doenças graves associadas ao envelhecimento, as quais acarretam na deteriorização e perda da função máxima de órgãos e tecidos, o envelhecimento cutâneo também tem sido foco de muito interesse e pesquisas. Uma das conseqüências deste processo que acomete grande parcela da população idosa é o ressecamento da pele. Tal condição não se caracteriza como doença, mas gera desconforto ao idoso, e pode levar ao desenvolvimento de outras desordens dermatológicas, tais como: eczemas, infecções secundárias por bactérias, prurido, dermatites, e outras, além de causar uma aparência antiestética.

A proposta desenvolvida no presente estudo visa contribuir para o entendimento acerca do assunto e na busca de novas alternativas para o tratamento do ressecamento cutâneo. Foi avaliada a capacidade de hidratação cutânea da Nicotinamida (vitamina B₃) em idosos, uma vez que se conhece, por estudos já publicados, tal capacidade em jovens. Por fim, se pretende avaliar, nesta pesquisa, uma nova alternativa para o tratamento do ressecamento de pele, especificamente dos idosos, tendo como intuito contribuir para a melhoria da condição da pele desta população.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL

O envelhecimento populacional ocorrido durante o século XX foi marcado pelo aumento do número de pessoas idosas em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Acredita-se que nos próximos anos esse crescimento ocorra de maneira exponencial (STUART, 2002).

Estima-se, atualmente, que a população idosa no Brasil (considera-se idoso quem tem mais de 60 anos) seja de 15 milhões de pessoas. As projeções demográficas indicam que no ano de 2025 o Brasil será a sexta maior população de idosos do mundo, com cerca de 32 milhões de pessoas incluídas nesta categoria, o que representará, então, 15% da população total do país. A expectativa de vida média da população brasileira aumentou em quase 25 anos nos últimos 50 anos (JECKEL NETO; CRUZ, 2000).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 1991 o estado do Rio Grande do Sul possuía 8,9% do total de sua população constituída por pessoas com mais de 60 anos. Em 2000, atingiu-se o percentual de 10,5%.

O fator que mais incidiu sobre as mudanças do perfil demográfico foi a implementação de políticas de saúde pública, tais como: diminuição da fecundidade, controle da mortalidade infantil, vacinação, planejamento e controle sanitário. Doenças que no início do século XX eram as maiores responsáveis pela mortalidade da população, tais como as infecciosas e parasitárias, foram cedendo espaço à doenças não-transmissíveis, como neoplasias e doenças cardiovasculares (JECKEL NETO; CRUZ, 2000).

2.2 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO

Dada a variedade de abordagens sobre os temas *envelhecimento* e *longevidade*, é de grande relevância estabelecermos conceitos básicos.

Até o momento não existe um conceito de envelhecimento que seja consensual, ainda que tenham havido muitos avanços no estudo desse processo. A pesquisa biogerontológica segue enfrentando dificuldades em estabelecer convenções para a terminologia empregada por diversos autores (JECKEL NETO; CRUZ, 2000).

Apesar da grande limitação em se estabelecer uma base conceitual para o envelhecimento, o que se observa é que, do ponto de vista biológico, trata-se de um processo normal, não patológico, multifatorial, irreversível, que envolve mudanças que ocorrem gradualmente em função do tempo e em todos os níveis organizacionais (da molécula aos sistemas e ao organismo como um todo), levando a uma perda de aptidões e funções que resulta no fim da vida (morte) (WHIKENS, 1998).

Para Hayflick (1997), o envelhecimento é a perda das funções normais, que começa a acontecer após a maturação sexual e continua até a longevidade máxima dos membros de uma espécie; é a manifestação dos efeitos biológicos que ocorrem ao longo do tempo. Conforme Jeckel e Cunha (2002), essa perda inclui as mudanças morfofuncionais que sofremos ao longo da vida, as quais começam a ocorrer após a maturação sexual e, progressivamente, comprometem a capacidade dos indivíduos de responder ao estresse ambiental da homeostasia.

Apesar dos rápidos avanços tecnológicos, o caminho para vencer o nosso próprio envelhecimento ainda não foi encontrado (TAKAHASHI *et al.*, 2000).

2.3 TEORIAS DO ENVELHECIMENTO

Há um grande número de teorias que procuram definir o fenômeno do envelhecimento. Até o presente momento, no entanto, não foi criada uma teoria única que sintetize todas as etapas deste processo que leva à morte (HAYFLICK, 1997). Existe, assim, a necessidade da criação de um sistema teórico geral, que permita aos cientistas lidar com uma quantidade vasta de diversas observações relacionadas ao processo de envelhecimento, pois, para transformar essas observações em um corpo de conhecimento compreensível, uma teoria geral do

envelhecimento e longevidade das espécies torna-se indispensável (GAVRILOV; GAVRILOVA, 2002).

Algumas das teorias existentes analisam os fatores intrínsecos (componente genômico e processos genéticos) e extrínsecos (ambientais, externos ao organismo) responsáveis pelo envelhecimento, outras tentam explicar a evolução do fenômeno de envelhecimento (MERKER *et al.*, 2001).

Uma das primeiras teorias relativas ao processo, articulada em 1882 pelo biólogo August Weismann, é denominada Teoria do Desgaste. Segundo ela, “a morte ocorre porque um tecido desgastado não pode se renovar eternamente”. Com essa idéia, Weismann sugere a “morte programada”, que seria determinada geneticamente por características de adaptação (*apud* GOLDSMITH, 2003). Para Jeckel e Cunha (2002), é em função do acúmulo de agressões ambientais sofridas no dia-a-dia que ocorre o decréscimo gradual da eficiência do organismo que, por fim, leva à morte.

Medawar, por seu turno, propõe que o envelhecimento seria causado por mutações aleatórias, o que ocasionaria características de envelhecimento adversas. Ou seja, ele seria causado por doenças genéticas diversas, e cada uma teria seus próprios sintomas manifestados apenas em idade avançada (*apud* GOLDSMITH, 2003).

Para Williams, o envelhecimento seria causado por uma combinação de efeitos de vários genes pleiotrópicos que teriam efeitos benéficos em animais jovens e efeitos adversos em animais idosos (Teoria Antagonista Pleiotrópica) (*apud* GOLDSMITH, 2003).

Em 1997, Thomas Kirkwood publica sua teoria, na qual propõe que os organismos teriam uma quantidade limitada de energia, que seria dividida entre atividades reprodutivas e a manutenção dos aspectos não-reprodutivos do organismo (*apud* GOLDSMITH, 2003).

Em 1983, Hart e Turturro sugerem a adoção de uma escala crescente, que abarcasse as diferentes teorias: teorias de base celular, teorias baseadas em órgãos e sistemas, teorias populacionais e teorias integrativas. Em 1990, Finch classifica as teorias de envelhecimento em *evolutivas* e *não evolutivas*. As evolutivas seriam as que partem do princípio de que o papel do envelhecimento e da longevidade é adaptativo, portanto, sujeito à seleção, ainda que o organismo sofra uma pressão menor na fase final do processo em relação às fases iniciais. As não evolutivas

seriam aquelas que postulam que o envelhecimento e a longevidade decorrem do desgaste acumulado em fases anteriores ao envelhecimento ou devido à ocorrência de eventos estocásticos (ao acaso) sobre o corpo, os quais se concentrariam nos mecanismos celulares, fisiológicos e ambientais que atuam sobre o processo.

Em 1997, Hayflick opta por uma classificação baseada nos eventos que geram as mudanças associadas ao envelhecimento, as quais se caracterizam por eventos propositais e eventos aleatórios.

Strehler (1982) assevera que para uma teoria do envelhecimento ser aceita, ela precisa necessariamente contemplar as seguintes características em relação ao fenômeno:

- a) ser deletéria, ou seja, crer que o evento casual deve reduzir a funcionalidade corporal ao longo do tempo;
- b) ser progressiva, ou seja, considerar que as modificações e a redução da funcionalidade corporal devem ser graduais;
- c) ser intrínseca, ou seja, considerar que as modificações e a redução da funcionalidade não devem ser resultado direto de um componente ambiental;
- d) ser universal, ou seja, postular que as modificações e a redução da funcionabilidade devem ocorrer similarmente, conforme avance a idade, mesmo que precoce ou tardiamente, em todos os indivíduos de uma mesma espécie.

Arking (1998) agrupa em duas grandes categorias as teorias do envelhecimento que contemplam as referidas características, considerando eventos intra e intercelulares:

- a) teorias de base sistêmica ou genético evolutiva (intrínsecas), que postulam que os eventos associados ao envelhecimento são baseados numa agrupação genética espécie-específica determinada;
- b) as teorias de base estocástica (extrínsecas), que postulam ser o envelhecimento causado, principalmente, por eventos ao acaso, levando ao acúmulo de danos e, por conseqüência, a deterioração orgânica .

Harman, em 1956, tendo por base estudos de Gerschman, publicados dois anos antes, propõe uma das teorias estocásticas do envelhecimento mais relevantes, a teoria do dano oxidativo. Ele propõe que o estresse oxidativo desencadeado pelos radicais livres, também denominados de espécies reativas de

oxigênio (ROS), seria o principal fator responsável pelo envelhecimento. Essa teoria foi sustentada por evidências provenientes da descoberta de que estes elementos, além de atuarem na formação de pigmentos da pele, conforme avance a idade, também produzem ligações cruzadas em algumas moléculas e danos ao DNA das células (HARMAN, 1956; 1981; 1986).

Segundo Fossel (2002), que postula a existência de uma regulação genética no desencadeamento do envelhecimento, tal regulação seria influenciada por fatores genéticos (o que Arcking classifica como genes que acelerariam/desacelerariam o envelhecimento e genes que aumentariam/abreviariam a longevidade) e por fatores epigenéticos.

Os fatores epigenéticos amplamente associados ao processo de envelhecimento são: o mecanismo de reparo de DNA, o encurtamento telomérico, a metilação do DNA e o estresse oxidativo. No entanto, além desses fatores epigenéticos, a regulação do processo de envelhecimento parece estar intimamente associada à rotas bioenergéticas da célula, que estariam, por sua vez, associadas ao estresse oxidativo.

Em 1999, Masoro agrupa as teorias sobre o envelhecimento em quatro categorias:

- a) relógios de envelhecimento, adaptados evolutivamente a cada espécie ou grupo de espécies;
- b) uso e desgaste;
- c) genes e expressão gênica;
- d) regulação da função sistêmica.

O presente estudo, como já se mencionou, tem como foco principal o envelhecimento cutâneo. Dentre as teorias apresentadas, ele se encontra subsidiado tanto nas teorias estocásticas (dano oxidativo) quanto nas teorias sistêmicas (genéticas), conforme será verificado a seguir.

2.4 ENVELHECIMENTO DA PELE

O envelhecimento da pele ocorre pela ação de dois processos simultâneos. O primeiro processo é intrínseco (envelhecimento cronológico) e talvez seja similar

ao envelhecimento de outros tecidos (UITTO, 1986). Sua ação é determinada geneticamente, e clinicamente ele está associado à fragilidade, perda de elasticidade e transparência (GILCHREST, 1982). O segundo processo de envelhecimento ao qual a pele está exposta, que surge como resultado de repetidas exposições à luz solar, é o fotoenvelhecimento. Esse processo se caracteriza pelo remodelamento da derme, que sofre marcadas mudanças morfológicas, estruturais e bioquímicas (URSCHITZ, 2002; BOSSET, 2003). Clinicamente, a pele com danos causados pelo sol é caracterizada por rugas, pela perda de elasticidade e por pigmentação alterada (KLIGMAN, 1989; TAYLOR *et al.*, 1990).

O processo de envelhecimento intrínseco e o fotoenvelhecimento da pele compreendem uma série de mecanismos moleculares, tais como: senescência celular, danos oxidativos causados por radicais livres de oxigênio (ROS), alterações na matriz dermal, diminuição de fibroblastos, acúmulo de elastina, aumento de células inflamatórias, mudança na expressão de genes, entre outros, como será explicitado a seguir.

2.4.1 Envelhecimento intrínseco

O processo de envelhecimento intrínseco da pele é similar ao que ocorre na maioria dos órgãos internos, envolvendo vagarosa deterioração das funções do tecido (JECKINS, 2002). Primariamente ocorrem alterações funcionais que resultarão em uma total mudança morfológica na pele (YAAR; MARK, 2002). A pele cronologicamente envelhecida mostra-se seca e pálida, com finas rugas, apresentando determinada diminuição da elasticidade e uma variedade de neoplasmas benignos (YAAR *et al.*, 2002).

Histologicamente, a mudança mais evidente do envelhecimento intrínseco a pele é o achatamento da junção derme-epiderme, levando a uma diminuição da superfície de contato entre as duas camadas e, conseqüentemente, reduzindo as trocas metabólicas e a passagem de nutrientes (YAAR *et al.*, 2002). Outras características marcantes desse processo de envelhecimento são o aparecimento de atrofia na matriz extracelular, a redução do conteúdo de elastina, a desintegração

das fibras elásticas (YU; YANG, 1996), a elevação dos níveis de metaloproteinases (enzimas degradativas dos componentes elásticos da derme) (VARANI *et al.*, 2000) e a redução do número de fibroblastos e de sua capacidade biossintética (BOLOGNIA, 1993). Também há uma progressiva diminuição nos melanócitos e nas células de Langherans (YAAR *et al.*, 2002).

Os mecanismos moleculares relacionados ao envelhecimento intrínseco, que levam às modificações do tecido acima referidas, são a senescência celular e o dano oxidativo.

2.4.1.1 Senescência celular

As células epiteliais são células mitóticas, isto é, caracterizam-se por não se dividirem indefinidamente. O processo que limita o número de divisões celulares é chamado de senescência celular ou replicativa (CAMPISI, 1998). Portanto, em um dado momento de sua vida, a célula deixa de se dividir (para irreversivelmente na fase G1 do ciclo celular, não entrando mais na fase S); nesse momento, ela entra em senescência. Estas células senescentes apresentam mudanças seletivas, específicas em suas funções, pois possuem metabolismo e fenótipo alterados. Resistem à morte por apoptose por longos períodos de tempo (DIMRI, 1995) e expressam genes que tem longo alcance e efeitos pleiotrópicos: enzimas degradativas, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias (CAMPISI, 1998).

A pele humana envelhecida apresenta queratinócitos e fibroblastos senescentes em acúmulo (CAMPISI, 1998). Nos fibroblastos senescentes, há um aumento na expressão de metaloproteinases (MMP), ao passo que há redução na expressão de inibidores de metaloproteinases (TIMP) (WEST *et al.*, 1989; MILLIS *et al.*, 1992; WICK *et al.*, 1994). Conseqüentemente, ocorre diminuição da capacidade proliferativa das células derivadas da pele, diminuição da síntese de matriz na derme e aumento da expressão de enzimas que degradam a matriz colágena (JECKINS, 2002).

2.4.1.2 Teorias relacionadas à senescência celular

Existem duas teorias que tentam explicar os motivos pelos quais, em determinado momento, algumas células “recebem a informação” de que devem parar seu crescimento e entrar em senescência celular.

A primeira teoria postula que a redução no crescimento das células associada ao avanço da idade pode ser explicada por uma repressão seletiva de genes regulatórios de crescimento, cuja expressão é importante para a progressão do G1 e síntese do DNA (JECKINS, 2002).

A segunda teoria atribui a redução do crescimento celular ao encurtamento telomérico. Os telômeros são seqüências especializadas de DNA, localizadas no final dos cromossomos eucarióticos (AHMED; TOLLEFSBOL, 2001). Durante a mitose das células somáticas, a DNA polimerase não consegue replicar o final dos pares de bases de cada cromossomo, resultando em um progressivo encurtamento cromossômico a cada rodada de divisão celular (YAAR; MARK, 2002). Quando os telômeros começam a ficar “criticamente pequenos”, as células entram em senescência proliferativa. Então, os telômeros parecem servir como relógio biológico, informando às células que elas estão ficando velhas. Além disso, o comprimento dos telômeros pode influenciar na expressão de genes próximos a eles, sugerindo um mecanismo provavelmente relacionado a alguma mudança característica do envelhecimento (WRIGTH; SHAY, 1992; BAUR *et al.*, 2001; NING *et al.*, 2003). Portanto, o encurtamento do telômero em células somáticas normais tem sido um relógio molecular potente, que provoca a senescência celular (HARLEY *et al.*, 1990), a perda da capacidade proliferativa e patologias relacionadas ao envelhecimento (FOSSEL, 1998; CAMPISI, 1997).

2.4.1.3 Dano oxidativo

No processo de envelhecimento cutâneo estão envolvidas espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres (JAZWINSKI, 1996; KOWALD; KIRKWOOD, 1996).

Como já vimos, diversos modelos teóricos têm sido propostos, a fim de explicar o envelhecimento da pele. Nesse sentido, a teoria dos radicais livres (HARMAN, 1956; 1981; 1986) tem recebido atenção particular, pois a pele é exposta constantemente a espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes no ar, na radiação solar, no ozônio e em outros poluentes atmosféricos. Também no metabolismo normal ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio, quando a cadeia respiratória mitocondrial doa os elétrons em excesso a moléculas de oxigênio que geram ânions superóxidos. (RHIE *et al.*, 2001).

O acúmulo de ROS tem dado indícios de exercer uma importante função no envelhecimento intrínseco e no fotoenvelhecimento da pele (KAWAGUCHI *et al.*, 1996). Ele tem sido indicado como responsável por várias desordens inflamatórias cutâneas e cânceres de pele (CROSS *et al.*, 1987; RECORD *et al.*, 1991). Os Ânions superóxido (O_2^-), peróxido hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e oxigênio singlete (O_2) causam danos à maioria das macromoléculas celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA (HASE *et al.*, 2000), e suas formas oxidadas são uma das muitas contribuições ao envelhecimento (BECKAM; AMES, 1998; DE ZWART *et al.*, 1999), além de influenciar na incidência da senescência celular (JECKINS, 2002).

Para proteger as células contra esses pró-oxidantes, além dos antioxidantes de alto peso molecular como a enzima superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, existem também os antioxidantes de baixo peso molecular, que têm significância. Porém, o sistema antioxidativo não é perfeito: existem artigos científicos *in vitro* e *in vivo* que sugerem uma correlação entre o processo de envelhecimento e a formação de ROS em todos os órgãos (PODDA; GRUDMANN-KOLLMANN, 2001). Em adição, parece acontecer uma redução dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos durante o envelhecimento (BECKMAN; AMES, 1998).

A noção de que ROS estão envolvidas na incidência de senescência replicativa e nos processos de envelhecimento intrínseco e extrínseco tem origem em vários modelos, incluindo modelos de biologia celular, desordens genéticas com ocorrência natural e organismos transgênicos (PODDA; GRUDMANN-KOLLMANN, 2001).

ROS também tem uma função substancial no metabolismo do colágeno; elas não só destróem diretamente o colágeno intersticial, mas também inativam inibidores de metaloproteinases do tecido (TIMPs) e induzem a síntese e ativação de metaloproteinases degradadoras da matriz (MA *et al.*, 2001).

2.4.2 Fotoenvelhecimento

Segundo o que afirma Fisher *et al.* (2002), a radiação ultravioleta do sol causa danos à pele humana, provocando um envelhecimento precoce. Este processo de envelhecimento prematuro (fotoenvelhecimento) é cumulativo “à exposição solar” e afeta principalmente indivíduos com pele mais clara (FISHER *et al.*, 2002).

As manifestações clínicas do fotoenvelhecimento são rugas finas e grossas, coloração irregular e flacidez da pele (BOSSET, 2003). Maiores alterações que também são aparentes na derme incluem acúmulo massivo de fibras elásticas anormais, perda de colágeno e aumento de glicosaminoglicanos (LAVKER, 1979).

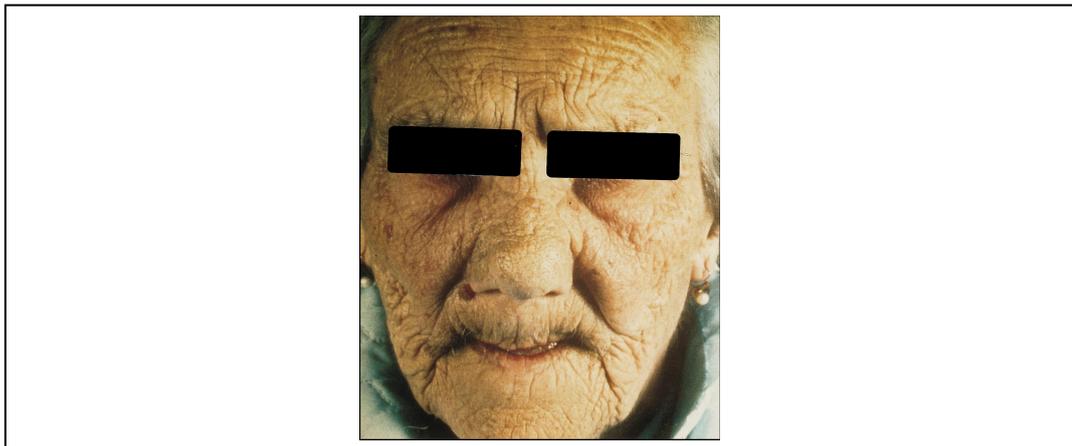


Figura 1 - Aparência clínica de pele fotoenvelhecida em áreas da face expostas ao sol, revelando rugas profundas, amarelamento e elasticidade diminuída (adaptado de MA *et al.*, 2001).

2.4.2.1 Mudanças no tecido conectivo

Os maiores danos causados à pele pela ação do fotoenvelhecimento são vistos no tecido conectivo da derme (MA *et al.*, 2001).

A aparência e histologia da pele são profundamente alteradas pela exposição crônica ao sol, que induz à atrofia epidermal, a um aumento no número de melanócitos, à grande deposição de fibras elásticas distróficas e diminuídas na

derme (elastose), à uma diminuição no número de fibras colágenas e à presença de infiltrado inflamatório na derme (SCHARFFETTER-KOCHANCK, 2000).

Tem sido postulado que o material elastótico acumulado na pele fotoenvelhecida resulta de danos diretamente mediados por radiação UV à fibras elásticas e fibroblastos (BERNSTEIN *et al.*, 1994). Degradação extensiva de fibras de colágeno (tipo I e III) é uma característica que se observa na pele gravemente fotoenvelhecida (SMITH *et al.*, 1962; LAVKER, 1979, 1995; WEST, 1994). A radiação UV prejudica a síntese de colágeno, primariamente em função da baixa regulação da expressão dos genes de procolágeno tipo I e III (FISCHER *et al.*, 2000). O mesmo sugere que a baixa regulação do receptor TGF-beta tipo II em adição à repressão transcricional mediada pelo AP-1, contribui para a redução da expressão gênica do pro-colágeno observada em pele humana, *in vivo*, através de radiação UV (FISHER *et al.*, 2002).

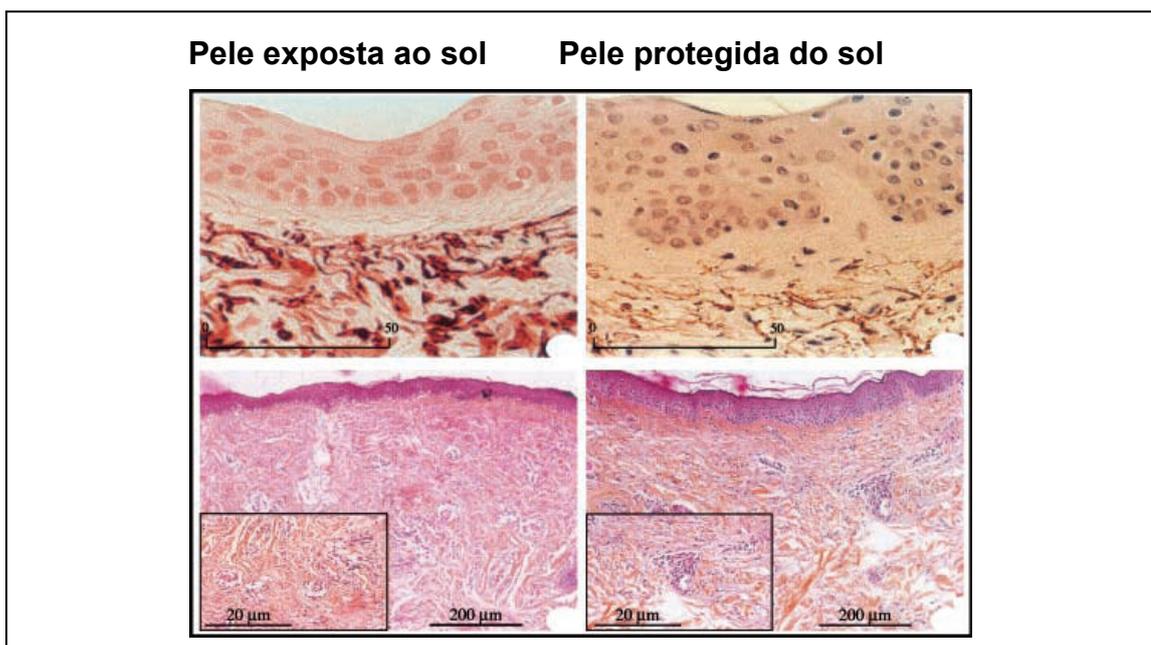


Figura 2 - Características histológicas da pele fotoenvelhecida. (a,b) A distribuição e abundância de elastina na pele exposta e na pele protegida do sol foram determinadas usando coloração por orceína. Na pele exposta ao sol, são observadas fibras elásticas fotodanificadas em abundância na derme e derme superior (a), enquanto que uma fina rede de fibras elásticas é aparente na derme superficial da pele protegida do sol (b). Escala bar $\frac{1}{4}$ 50 μm . (c,d) Luz microscópica de haematoxilina, eosina e safranina-seções coradas mostram altos números de células infiltradas na pele exposta ao sol em comparação à pele protegida. Scale bars $\frac{1}{4}$ 20 μm , 200 μm (adaptado de BOSSET *et al.*, 2003).

2.4.2.2 Metaloproteinases x fotoenvelhecimento

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de enzimas degradativas, que atuam nos componentes elásticos da derme. Atualmente, comportam 26 membros (STAMENKOVIC, 2000; STETLER-STEVENSON; YU, 2001). A MMP-1 (colagenase intersticial) cliva preferencialmente colágeno tipo 1, MMP-2 degrada elastina, assim como componentes da membrana basal, incluindo colágenos tipo IV e tipo VII. MMP-3 tem um substrato específico para proteínas como o colágeno tipo IV, proteoglicanos, fibronectina e laminina (MA *et al.*, 2001). Em adição, MMP-2 e MMP-9 têm potencial para degradar fibras elásticas (JECKINS, 2002).

Os níveis de metaloproteinases da pele aumentam em função da idade (VARIANI *et al.*, 2000). Além disso, estas mesmas enzimas degradativas são elevadas em resposta direta à radiação ultravioleta (FISHER *et al.*, 1996, 1997), que ativa a proteína quinase, a qual, quando ativada, regulará a ação e expressão funcional do fator de transcrição nuclear - AP-1, que estimula a transcrição dos genes de enzimas degradativas da matriz, como as metaloproteinases MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (FISHER *et al.*, 2002).

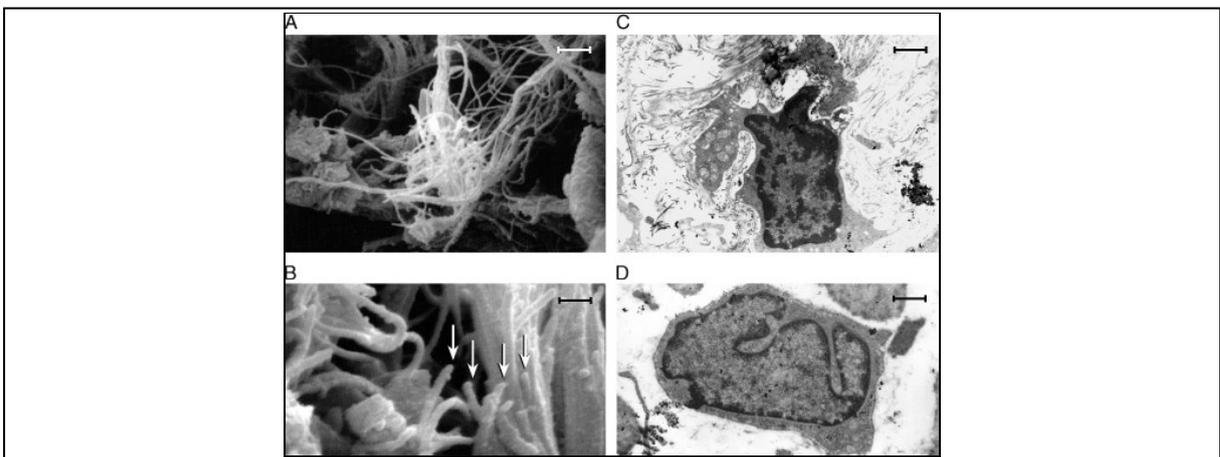


Figura 3 - Aparência ultraestrutural da pele do antebraço exposta ao sol. (a,b) fotografias mostram fibras de colágeno partidas. Em grande aumento (b), numerosos rompimentos nas fibras são aparentes, a presença de matriz rompida e numerosas quantidades de material amorfo também são visíveis. Células em contato com a mistura de fibras de colágeno intacto e fragmentado (c) e com material amorfo (d) são aparentes. Escala bars: (a) 1.33 mm; (b) 0.67 mm; (c) 3.57 mm; (d) 2.17 mm (adaptado de FLIGIEL *et al.*, 2003).

Nos últimos 40 anos, muitos progressos para o entendimento dos mecanismos que controlam o envelhecimento têm sido feitos. Senescência celular, danos oxidativos, aumento da expressão de MMP e radiação solar, são fatores que claramente exercem funções fundamentais no processo de envelhecimento cutâneo.

A perda de células e fibras e a diminuição da capacidade proliferativa, decorrentes desses processos, levam a uma mudança morfológica e a um declínio da capacidade de funcionamento do tecido, caracterizando o envelhecimento.

2.5 PELE

A pele é o manto que reveste o organismo, sendo indispensável à vida, pois isola os componentes orgânicos do meio exterior (SAMPAIO, 1998). É o maior órgão do corpo humano, por sua extensão e seu peso (CHARLET, 1996). Constitui-se em complexa estrutura de tecidos de naturezas diversas, dispostos e interrelacionados de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções (SAMPAIO, 1998).

2.5.1 Composição da pele

Conforme sua estrutura, a pele é dividida em três camadas: Epiderme (camada superior), Derme (camada intermediária) e Hipoderme (camada inferior).

Por definição, a epiderme é um epitélio de revestimento estratificado e pavimentoso. Os queratinócitos são as células que formam este epitélio, representando 80% do conjunto das células epidérmicas. Os queratinócitos se dividem em quatro camadas sobrepostas: Camada Germinativa ou Basal, Corpo Mucoso de Malpighi, Camada Granulosa e Camada Córnea (estrato córneo) - que é a camada mais superficial da epiderme. A Camada Córnea é formada por corneócitos - células muito planas, verdadeiras escamas microscópicas, anucleadas. Eles se organizam em diversos estratos, cujos números variam de acordo com a região do corpo que é observada (PEYREFITE *et al.*, 1998).

O estrato córneo não é uma camada estática, mas, sim, uma barreira dinâmica, a qual está constantemente sendo formada pela epiderme por diferenciação de queratinócitos em corneócitos, processo chamado de queratinização. Em média, uma camada de corneócitos da superfície mais externa da pele é perdida por dia (PRASCH *et al.*, 2000).

A queratinização da epiderme compreende dois fenômenos simultâneos: a migração vertical das células surgidas da divisão das células basais e a diferenciação destas células durante sua viagem ascensional para chegar à formação das células córneas (PEYREFITE *et al.*, 1998). Durante este processo, lipídios do EC, assim como NMFs, são sintetizados.

Entre as células do estrato córneo (corneócitos) estão presentes os lipídios intercelulares, que são constituídos principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, formando as estruturas lipídicas lamelares intercelulares (PRASCH *et al.*, 2000). Juntamente com os corneócitos, os lipídios intracelulares formam o cimento intercelular, o qual é responsável pela maior parte da função de barreira de permeabilidade e pela função de coesão intercelular da pele. Devido ao seu alto grau de compactação e pequeno espaço intercelular, o estrato córneo é seletivamente impermeável, tanto para os líquidos que entram como para os que saem do corpo.

Substâncias químicas que não a água, portanto, só conseguem permear a pele através de camadas lipídicas intercelulares - enquanto a água, ao passar pelos corneócitos, será retirada pelas fibras de queratina, altamente hidrofílicas (HARRIS, 2003). A combinação entre as células córneas e as camadas lipídicas lamelares previne a perda de água do corpo e o protege contra penetração de substâncias exógenas (PRASCH *et al.*, 2000).

Verifica-se, então, que o estrato córneo tem a importante função de barreira da pele, prevenindo a perda de água e, conseqüentemente, a desidratação cutânea.

2.5.2 Hidratação cutânea

O teor de água no estrato córneo está entre 10 e 20%. A retenção de água neste tecido é essencial para manter sua flexibilidade e prover a hidratação

necessária às enzimas envolvidas em vários aspectos de função e maturação do estrato córneo (HARDING *et al.*, 2000). Além disso, quando associada às moléculas solúveis do fator de hidratação natural - NMF e às proteínas da epiderme, a água tem função plastificante (BARATA, 1995). Esta ação plastificante, que é indispensável para manter em ordem as propriedades mecânicas do estrato córneo, só pode ocorrer com três condições simultâneas:

- a) a presença de NMF, capaz de reter a água no interior das células;
- b) a existência de membranas celulares e espaços intracelulares intactos, que mantenham os lipídeos de estrutura e evitem a saída dos constituintes do NMF;
- c) a presença de água em quantidade suficiente no interior do estrato córneo. O grau de hidratação do estrato córneo decorre do equilíbrio entre a água fornecida a ele pela derme e as perdas por evaporação na atmosfera (BARATA, 1995).

Os lipídios exercem importante função de barreira no estrato córneo, e sua integridade e grau de organização são fundamentais para prevenir a aumentada perda de água transdermal (TEWL) (MATOLSKY *et al.*, 1968). Em estudo realizado por Thune *et al.* (1998) foi demonstrado que altos valores de TEWL são freqüentemente relacionados a altos valores de pH, baixa hidratação do estrato córneo e reduzido conteúdo de lipídios na superfície da pele.

Na pele saudável, os corneócitos possuem altas concentrações (até 10% de seu peso seco) de fator natural de hidratação (NMF), o qual é composto por moléculas de baixo peso molecular, higroscópicas e que se ligam à água, prevenindo sua evaporação. Essas moléculas são principalmente aminoácidos, os ácidos pirrolidônico-carboxílico (PCA-Na), lactato de sódio, ácido lático e uréia (HARRIS, 2003).

A quantidade de água na pele não é distribuída uniformemente dentre as diversas camadas. A maior parte está fixada à derme pelos glicosaminoglicanos, em particular, pelo ácido hialurônico e pelo sulfato de condroitina, que são os maiores constituintes da derme fundamental. Derme e epiderme são formadas por aproximadamente 70% de água. O conteúdo de água do estrato córneo, por sua vez, segue um gradiente, diminuindo conforme se aproxima da superfície. Suas camadas profundas contêm aproximadamente 65% de água, enquanto as camadas mais externas contêm aproximadamente 10-15% (GIRARD *et al.*, 2000). A água do

estrato córneo localiza-se principalmente no interior dos corneócitos e em regiões intercelulares (BOMMANNAN *et al.*, 1990), e possui duas origens: exógena e endógena. A água de origem exógena é fornecida pelo contato com o meio ambiente, quando esse está saturado de umidade, ou por aplicação de preparações cosméticas (BARATA, 1995).

A pele se desidrata e perde sua elasticidade quando o estrato córneo elimina a água com mais rapidez do que a recebe, procedente das camadas mais internas da epiderme (WILKINSON; MOORE, 1990).

2.5.3 Xerose Senil

À pele seca dá-se o nome de Xerose (NORMAN, 2003). Sua incidência e gravidade aumentam com a idade (ENGELKE *et al.*, 1997; BERRY *et al.*, 1999). Segundo Norman (2003), a Xerose e o prurido são os problemas de pele mais freqüentes em pacientes de casas geriátricas. Um estudo feito na Austrália mostra que 29,5% dos pacientes de casas assistenciais apresentam Xerose Senil, enquanto outro estudo similar, realizado na Tailândia, aponta que esta desordem dermatológica acomete 38,9% dos pacientes (TAIPISUTTIKUL, 1998; SMITH *et al.*, 2002).

A Xerose Senil não se caracteriza como doença, mas provoca desconfortos para o idoso: além de seu aspecto antiestético, ela se relaciona às condições ambientais (piora nos meses de inverno), predispõe à coceira, rachaduras e fissuras na pele, escamações, inflamação, eczema, infecções secundárias por bactérias e ao aumento da incidência de dermatites de contato (ENGELKE *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 2000; PAEPE *et al.*, 2000; ROENIGK, 2000).

As rachaduras e fissuras se fazem presentes devido ao aumento da perda de água transepidermal. A coceira e o prurido levam a lesões secundárias, pois o ato de coçar produz escoriações que podem provocar respostas inflamatórias, formação de líquen simples crônico, manchas edematosas e infecções secundárias por bactérias (BERRY *et al.*, 1999; NORMAN, 2003).

Durante o envelhecimento, as mudanças em proteínas estruturais da pele, tais como colágeno, elastina e glicosaminoglicanos, e a diminuição dos lipídios do

estrato córneo são as responsáveis pelas alterações da morfologia e das propriedades mecânicas da pele, que se manifestam pela formação de rugas, perda de elasticidade e ressecamento cutâneo (GNIADOCKA *et al.*, 1998; TANNO *et al.*, 2000). Os lipídeos do estrato córneo, particularmente as ceramidas, diminuem com o envelhecimento. Isso deve-se, ao menos em parte, à redução, acarretada pela idade, da capacidade sintética de lipídios (GHADIALLY *et al.*, 1995; TANNO *et al.*, 2000). Uma quantidade adequada de lipídios é fundamental para reter a água livre e prover a hidratação necessária à pele.

Berry demonstra que o nível de hidratação da pele xerótica é 25% menor em relação ao nível de hidratação da pele normal (BERRY *et al.*, 1999). Déficits tanto na hidratação da pele quanto no conteúdo de lipídios do estrato córneo exercem uma função-chave no desenvolvimento da Xerose (HARDING *et al.*, 1996). Portanto, a incapacidade de reter o conteúdo de água necessário e fornecer o conteúdo adequado de lipídios leva a pele envelhecida ao desenvolvimento de Xerose (ENGELKE *et al.*, 1997; PAEPE *et al.*, 2000-b).

Esta diminuição de lipídios no estrato córneo se deve a limitações funcionais que ocorrem na pele, incluindo o *turn over* celular reduzido na epiderme, que resulta na deficiência de NAD e NADP nas células envelhecidas, e conseqüentemente na diminuição da síntese de lipídios (BOWSTRA *et al.*, 1998).

2.5.4 Formas de hidratação cutânea

Agentes oclusivos e umectantes têm sido amplamente utilizados em produtos “*skin care*”, a fim de tratar a pele seca. O efeito oclusivo se dá rapidamente e diminui após um pequeno espaço de tempo, assim que o óleo penetra nas camadas de lipídeo do estrato córneo e se mistura aos lipídeos da pele (PRASCH *et al.*, 2000). Os agentes umectantes, por sua vez, hidratam devido à grande aumento de hidroxilas nas moléculas dessas substâncias, às quais se ligam retendo moléculas de água. Nenhuma dessas formas de hidratação, porém, é elaborada com base em conhecimentos detalhados a respeito do problema (HARDING *et al.*, 2000).

Com os novos avanços no conhecimento sobre a biologia do estrato córneo e com a concretização da idéia de que um nível crítico de hidratação é requerido

para que ele possa fazer a manutenção de sua flexibilidade (BLANK, 1952), vem à tona as pesquisas sobre hidratação cutânea, nas quais os cientistas investigam substâncias que possam aumentar a habilidade do estrato córneo em reter água, a fim de criar novas metodologias que aprimorem o tratamento da pele seca (HARDING *et al.*, 2000).

O foco atual do desenvolvimento de novas tecnologias de hidratação cutânea visa a obtenção de uma melhor superfície de barreira ou a melhor hidratação da superfície cutânea das camadas externas do estrato córneo. Para isso, tem se tentado identificar agentes que penetrem especificamente na epiderme, os quais assistem no processo de diferenciação celular ou agem como precursores dos componentes vitais do estrato córneo (RAWLINGS, 2003). Neste contexto, está a *epidermoterapia* - que visa a aplicação de agentes que estimulariam a síntese de lipídios no estrato córneo (ELIAS, 1983).

A Nicotinamida tem sido descrita como estimulante da síntese de ceramidas *in vivo*, assim como de outros lipídios do estrato córneo, tais como colesterol e ácidos graxos livres (TANNO *et al.*, 2000). Ela também é conhecida como vitamina B₃, vitamina pp ou niacinamida. É necessária para a produção de Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e NAD fosfato, que agem como coenzimas em mais de 40 reações bioquímicas (TANNO *et al.*, 2000).

A Nicotinamida estimula a síntese de lipídios do estrato córneo, pois acelera o processo de diferenciação dos queratinócitos em função do aumento na razão de NAD e NADP intracelulares (GEHRING *et al.*, 2004). Acredita-se que o aumento da síntese de esfingolipídeos (ceramidas) ocorre também devido a uma elevação na atividade da enzima SPT (serina palmitil transferase) (TANNO *et al.*, 2000). Já o aumento na síntese de colesterol e ácidos graxos livres não pode ser explicado pela atividade elevada da enzima SPT; outros mecanismos que ainda não foram elucidados devem estar envolvidos (TANNO *et al.*, 2000).

Feldmann e Maibach (1970) aumentam as possibilidades de uso tópico de Nicotinamida ao provarem que essa apresenta uma boa razão de penetração cutânea na pele humana. Além de aumentar a síntese de lipídios no estrato córneo e, conseqüentemente, diminuir a perda de água transepidermal, aumentando a hidratação cutânea, outros efeitos benéficos para a pele têm sido atribuídos ao uso de Nicotinamida tópica, tais como: aumento na síntese de proteínas (ex: queratina), melhoramento da superfície da pele, diminuição de rugas superficiais, inibição de

fotocarcinogênese (GEHRING, 2004), redução da acne severa (SHALITA *et al.*, 1995; GRIFFITHS, 1995), prevenção de fotoimunossupressão (GENSLER, 1997) e prevenção da perda de colágeno dérmico que acompanha o fotoenvelhecimento (YU *et al.*, 2002).

Verifica-se, assim, que a Nicotinamida apresenta grande potencial para causar múltiplos efeitos na pele (BISSET *et al.*, 2004).

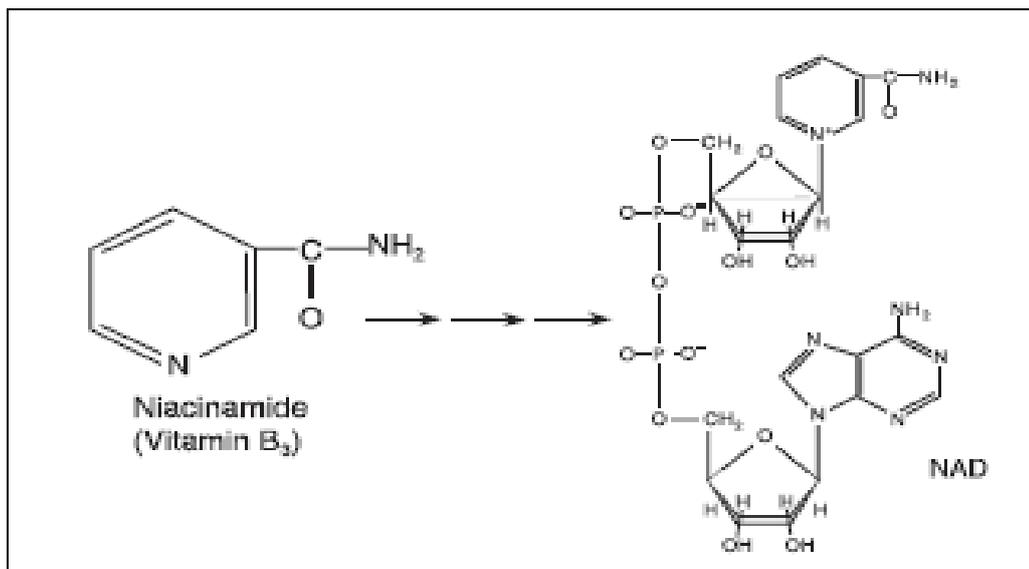


Figura 4 - Estrutura química da molécula de Nicotinamida. Nicotinamida é um precursor para cofatores de energia (adaptado de GEHRING, 2004).

2.5.5 Metodologias de quantificação da hidratação cutânea

Diversas técnicas foram desenvolvidas para mensurar o conteúdo de água da pele. Cada qual conta com sensibilidade, resolução e alcance particulares (POTTS, 1986; SERUP; JEMEC, 1995).

Os níveis de hidratação cutânea podem ser acessados diretamente pela mensuração da quantidade de água, que pode ser feita por espectroscopia de infravermelho com atenuação de refletância (ATR-FTIR), espectroscopia de infravermelho aproximada (NIR) e espectroscopia de ressonância nuclear magnética (NMR). Podem também ser acessados semi-diretamente, pela mensuração dos

efeitos de hidratação em propriedades físicas específicas da pele, por meio da medição de propriedades elétricas e/ou da condutância térmica da epiderme. Indiretamente, podem ser acessados pela mensuração dos efeitos de hidratação no aspecto e comportamento do estrato córneo ou da epiderme (medida de propriedades biomecânicas e contornos) (GIRARD *et al.*, 2000).

Das medições semi-diretas, a corneometria é amplamente utilizada. O Corneometer®¹ determina o nível de hidratação das camadas mais externas do estrato córneo. Ele mede a capacitância elétrica com um sensor do tipo condensador. A capacitância medida na investigação, variará em proporção ao conteúdo de hidratação da pele, numa escala de 7-10 (GIRARD *et al.*, 2000). Outra medida semi-direta também largamente utilizada é a medição da perda de água transepidérmica (TEWL). Ela é útil para acessar informações sobre a função de barreira da pele em diversos casos, tais como situações de danos à pele e processos de cicatrização. O Tewameter®² é utilizado para medidas do TEWL na superfície da pele. A base física dessa metodologia é a Lei de Difusão de Fick, que somente se aplica a uma zona homogênea difusa. O procedimento é o seguinte: um cilindro com aberturas superior e inferior é levemente pressionado sobre a pele. A água que evapora da superfície da pele é liberada diretamente no cilindro. O gradiente de densidade que é produzido é medido indiretamente por um par de sensores (temperatura e umidade relativa) localizados no cilindro, onde os dados são avaliados por um microprocessador e apresentados em $\text{g (m}^2\cdot\text{h)}^{-1}$ (PRASCH *et al.*, 2000).

A espectroscopia de NMR é um método utilizado para avaliar diretamente todo o conteúdo de hidratação da epiderme e da derme superficial, possuindo, portanto, alto alcance (GIRARD *et al.*, 2000).

A espectroscopia de Infravermelho com atenuação de refletância (ATR-FTIR) é uma técnica não-invasiva e adequada para determinar a hidratação cutânea *in vivo*. Não somente porque a água absorve fortemente no infravermelho, mas também porque o espectro de água e os constituintes da pele podem ser identificados pelo uso dessa técnica (LUCASSEN *et al.*, 1998). O espectro revela, pelas regiões de absorção, a composição química e pelas áreas dos picos, a

¹ Equipamento utilizado para medições de conteúdo de água do estrato córneo por corneometria (Courage-Khazaka®).

² Equipamento utilizado para medição da perda de água transepidérmica (Courage-Khazaka®).

concentração dos componentes (BRANCALEON *et al.*, 2001; CURDY *et al.*, 2001; STINCHCOMB *et al.*, 1999; PRETELLI; MILLE, 1988).

Utilizando-se a espectroscopia de infravermelho obtém-se, através da análise de refletância atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR), uma pequena penetração de radiação na pele, o que permite uma investigação seletiva do estado do estrato córneo *in vivo* (HARRIS, 2003). A profundidade da medida do ATR-FTIR é, tipicamente, poucos microns acima do comprimento de onda ($\nu=1/\lambda$) na frequência de 4000-650 cm^{-1} . Isso significa que o ATR-FTIR nos permite monitorar diretamente mudanças no conteúdo de água das camadas mais externas do estrato córneo. Ele também nos dá informações sobre a função de barreira da pele (LUCASSEN *et al.*, 1998).

Existem diferentes formas de se calcular a medida de hidratação do estrato córneo através do ATR-FTIR. Gloor (1980) obteve o conteúdo de água pela razão entre as bandas de amida I (1580-1720 cm^{-1}) e amida II (1475-1580 cm^{-1}). Quanto maior for essa razão, maior será a hidratação, pois a banda de amida I se sobrepõe à banda de água (PRASCH *et al.*, 2000).

Potts propõe um método focado na combinação da banda de 2100 cm^{-1} , no qual a área abaixo da curva e acima da linha que conecta a intensidade espectral em 1900 e 2300 cm^{-1} é considerada uma medida do conteúdo de água, enquanto a área abaixo da linha base é considerada uma medida de área de contato (POTTS *et al.*, 1985; LUCASSEN *et al.*, 1998). A razão entre essas duas áreas é chamada de razão de absorção de infravermelho. Da comparação das razões de absorção de infravermelho obtidos *in vivo* com aqueles mensurados *in vitro*, informações quantitativas de hidratação são obtidas. Porém, essa metodologia proposta por Potts apresenta um problema quando se lida com níveis de água mais baixos. Nesses casos, o tamanho da banda 2100 cm^{-1} é obscurecido em função da influência das altas intensidades da banda 1640 cm^{-1} e o amplo e elevado número de outras bandas, que afeta as análises (LUCASSEN *et al.*, 1998).

Além das técnicas descritas acima, a amplitude e a intensidade integrada da banda de estiramento de OH na região de 3300 cm^{-1} também tem sido utilizada para a medição de hidratação do estrato córneo.

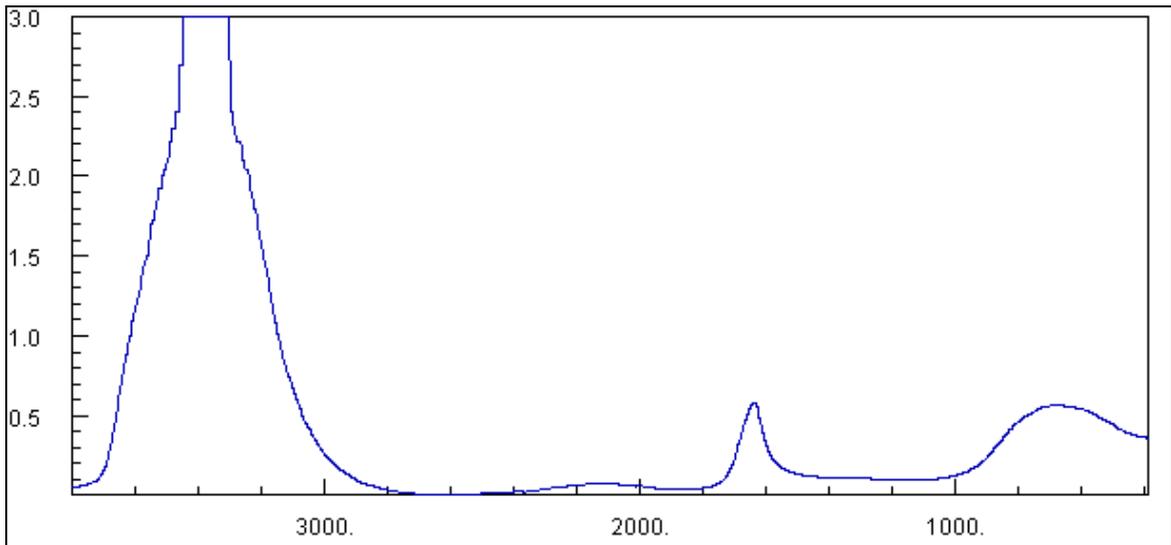


Figura 5 - Espectro de Infravermelho da molécula de água. Observa-se bandas nas frequências de 3300 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} (banda de amida I), utilizadas para cálculo de hidratação cutânea.

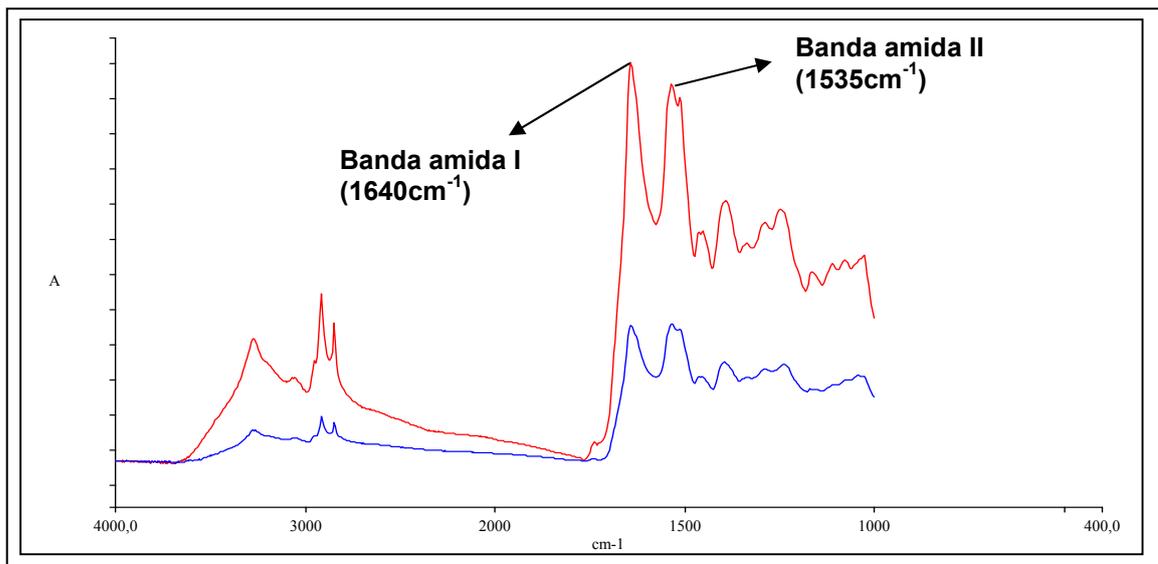


Figura 6 - Espectros de Infravermelho da pele humana. Em destaque, as bandas de amida I e amida II, utilizadas para obtenção da medida de hidratação; (vermelho) espectro demonstrando maior conteúdo de água, devido à maior desproporção entre as bandas de amida; (azul) espectro demonstrando menor conteúdo de água.

Como citado anteriormente, além de prover informações sobre o conteúdo de água no estrato córneo, o ATR-FTIR pode monitorar o conteúdo de lipídios e seu grau de ordenação (LUCASSEN *et al.*, 1998; BRANCALEON *et al.*, 2001), trazendo, assim, informações importantes sobre a função de barreira da pele.

Na tabela abaixo, são demonstrados os principais picos de absorção dos componentes da pele:

Tabela 1 - Frequências de absorção de constituintes do estrato córneo.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3300	Estiramento OH (água) e NH (LUCASSEN <i>et al.</i> , 1998)
2945-2875	Estiramento assimétrico CH ₂ (BOMMANNAN <i>et al.</i> , 1990)
2875- 2800	Estiramento simétrico CH ₂ (BOMMANNAN <i>et al.</i> , 1990)
1900-2300	Estiramento OH secundário (água) (LUCASSEN <i>et al.</i> , 1998)
1790-1720	Estiramento da carbonila de éster (HARRIS, 2003)
1790-1690	Estiramento da carbonila de ácidos graxos (HARRIS, 2003)
1720-1580	Banda Amida I (LUCASSEN <i>et al.</i> , 1998)
1580-1475	Banda Amida II (LUCASSEN <i>et al.</i> , 1998)

Tsai (2004) apresenta uma maneira rápida para quantificar conteúdo lipídico do estrato córneo: pela obtenção da razão entre as bandas de CH₂ assimétrico e CH₂ simétrico. Essa metodologia apresenta 10% de erro.

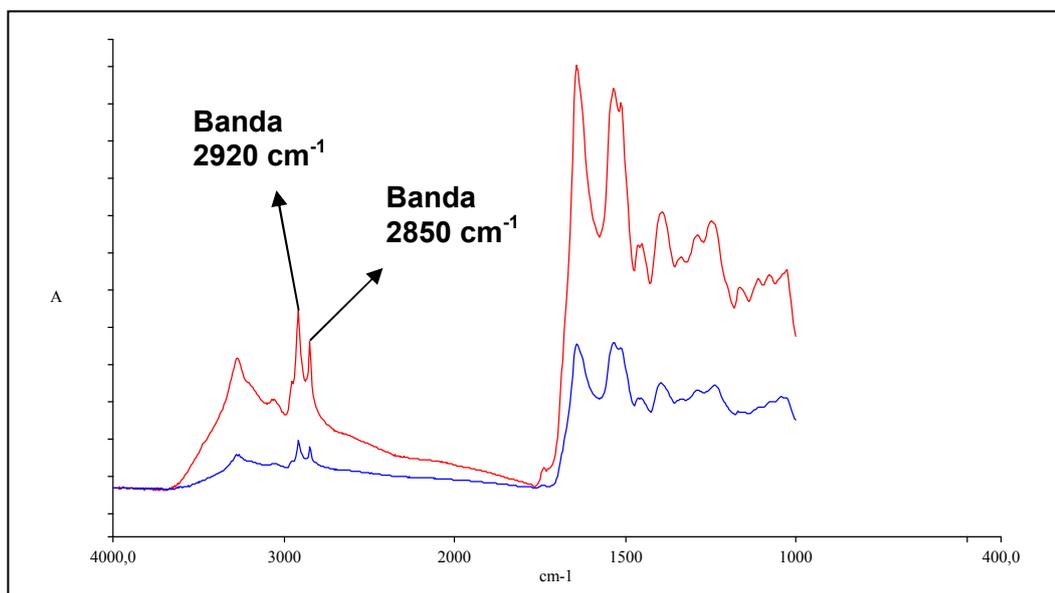


Figura 7 - Espectros de Infravermelho da pele humana. Em destaque as bandas de 2920 cm⁻¹ (estiramento CH₂ assimétrico) e 2850 cm⁻¹ (estiramento CH₂ simétrico), utilizadas para calcular a quantidade de lipídios do estrato córneo; (vermelho) espectro demonstrando maior conteúdo lipídico, devido a uma maior relação entre as bandas indicadas; (azul) espectro demonstrando menor conteúdo de lipídios no estrato córneo.

3 JUSTIFICATIVA

O atual paradigma de envelhecimento populacional mostra que está havendo um crescimento exponencial da população de idosos no mundo.

A biologia do idoso e a sua saúde se diferenciam das do adulto. Em função disso, um número crescente de pesquisas estão sendo realizadas, no intuito de compreender melhor estas diferenças, a fim de que o fenômeno do envelhecimento possa ser melhor entendido e tratado. Dentre tais diferenças, estão fisiologia da pele e seu estado.

Com a redução do conteúdo de lipídios do estrato córneo e a conseqüente diminuição da hidratação cutânea, a pele dos idosos tende a desenvolver Xerose Senil. Para prevenir o aparecimento desta condição e suas complicações, e para tratá-la quando já existente, um tratamento focado em sanar as causas do problema é fundamental. Portanto, a pele de idosos precisa ser tratada com agentes específicos, que tenham capacidade comprovada de reverter o referido quadro.

Devido a seus já comprovados benefícios, principalmente no que se refere ao estímulo da síntese de lipídios no estrato córneo, e conseqüente aumento da função de barreira da pele, a Nicotinamida possui grande potencial para ser um ativo eficaz no tratamento de uma das principais causas da pele seca em idosos.

Nesse contexto, o presente estudo tem como proposta avaliar a performance da Nicotinamida na hidratação da pele de idosos, como alternativa para o tratamento da Xerose Senil, visando assim, a promoção de melhorias nas condições da pele do idoso.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a performance da Nicotinamida tópica na hidratação cutânea de idosas, como tratamento para a Xerose Senil através de ATR-FTIR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São considerados como objetivos específicos:

- a) comparar, por meio de ATR-FTIR, o grau de hidratação cutânea e o conteúdo de lipídios do estrato córneo em voluntárias jovens e idosas, antes da intervenção por Nicotinamida tópica (caracterização das peles);
- b) verificar a capacidade de hidratação cutânea após uso de Nicotinamida tópica em voluntárias jovens, ATR-FTIR;
- c) comparar as performances da Nicotinamida tópica na hidratação cutânea das voluntárias jovens e idosas;
- d) verificar, por ATR-FTIR, mudanças no conteúdo de lipídios do estrato córneo de jovens e idosas, após utilização de Nicotinamida tópica;
- e) comparar as mudanças no conteúdo de lipídios do estrato córneo, em função da utilização de Nicotinamida tópica, do grupo jovem e do grupo idoso.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO GERAL

A presente pesquisa foi realizada através de um ensaio clínico cego, comparando áreas não tratadas, tratadas com ativo (Nicotinamida) e tratadas com placebo.

5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

O estudo foi feito no Laboratório de Espectroscopia da Faculdade de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

O projeto foi conduzido ao longo de quatro meses, nos quais voluntárias jovens e idosas estiveram participando. O grupo de voluntárias jovens foi formado por alunas de Graduação da Faculdade de Farmácia da PUCRS, as quais foram convidadas para participar do projeto. O grupo de voluntárias idosas foi formado por residentes das casas geriátricas *Lar dos Velhos Maurício Seligman*, *Clínica Vitalis* e pelas senhoras da Igreja São Francisco. As referidas casas geriátricas e igreja são situadas em Porto Alegre.

A amostra foi constituída por 55 participantes, sexo feminino, divididas em dois grupos:

- a) grupo jovem - 29 voluntárias com idades entre 18 e 25 anos;
- b) grupo idoso - 26 voluntárias com idades entre 60 e 93 anos.

5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios para exclusão de participantes da amostra foram: apresentar ou ter apresentado doenças de pele que pudessem interferir nos resultados do

experimento; ter sensibilidade conhecida à Nicotinamida; estar fazendo uso de medicação que interfira na fisiologia cutânea; estar grávida ou amamentando.

As voluntárias que não utilizaram adequadamente as soluções-teste durante o tratamento também foram excluídas da amostra.

5.4 RECOMENDAÇÕES GERAIS

As participantes da amostra foram instruídas a não fazer uso de quaisquer produtos cosméticos nas regiões-teste (antebraços direito e esquerdo) desde uma semana antes e durante todo o período do experimento.

Além de receberem informações verbais detalhadas sobre como proceder durante o estudo e sobre a forma correta de aplicação das soluções, elas receberam um documento no qual estão todas as explicações referentes ao estudo: freqüências de aplicação, recomendações gerais e telefones de contato, para o caso de haver qualquer dúvida (apêndice A).

Também foi entregue, para cada voluntária, uma ficha para controle de aplicação das soluções, na qual elas anotavam os dias e horários de cada aplicação. Preenchida, a ficha foi entregue à pesquisadora ao final do estudo (apêndice B).

5.5 ÉTICA

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (protocolo de aprovação nº373/05-CEP, em 05 de maio de 2005) com o título de "*Avaliação do aumento da síntese de lipídios do estrato córneo pelo uso de emulsões cosméticas contendo Nicotinamida para a xerose senil*" (anexo A). A pesquisa foi realizada segundo a Resolução 196/96, que regula a ética em pesquisa no país. Todos os participantes assinaram e receberam uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice C).

5.6 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES-TESTE

Para a realização do presente estudo, foram preparadas duas soluções-teste: Solução de Nicotinamida 2% e Solução Placebo. Essas soluções foram preparadas conforme postulados de Tanno (2000).

As matérias-primas foram pesadas em balança analítica, previamente calibrada. Para preparação da Solução Placebo foi utilizado 0,1% de polioxietileno monolaurato de sorbitano 20 (Tween 20[®] - Croda) em água destilada. Na Solução de Nicotinamida foi utilizado Nicotinamida 2% (Sigma) em Solução Placebo. O polioxietileno monolaurato de sorbitano 20, por ser um emulsificante, promove maior absorção da Nicotinamida pela pele; e por este motivo, foi adicionado as soluções em teste. As soluções não foram acrescidas de conservantes para que se evitassem interferências durante a leitura no Infravermelho e, por isso, foram renovadas e entregues a cada voluntária uma vez por semana.

A posologia de aplicação e a área tratada foram determinadas conforme o estudo realizado por Tanno (2000). Através de informe pessoal (anexo B), nos foram repassadas informações mais precisas sobre o seu experimento, como a área de aplicação que, em seu estudo, mediu 10cmx20cm, sendo similar à área do antebraço, utilizada em nosso estudo. A posologia utilizada no experimento de Tanno foi de 0,3ml de cada solução, duas vezes ao dia. Neste estudo mantivemos a mesma posologia, porém, preocupamo-nos com que essa quantidade fosse convertida em gotas, visando facilitar a aplicação das soluções pelas voluntárias. A conversão resultou na aplicação de sete gotas, duas vezes ao dia.

5.7 DESCRIÇÃO DO ENSAIO CLÍNICO

O experimento foi realizado em sala climatizada, com temperatura e umidade relativa do ar controladas (temperatura: $22,5 \pm 0,3^{\circ}$ C e umidade relativa do ar: $44,6 \pm 1\%$).

Para determinação do grau de hidratação da pele e do conteúdo de lipídios, foi utilizada Espectroscopia de Infravermelho com atenuação de refletância (ATR-

FTIR). Devido à facilidade de acesso, a uma maior praticidade técnica de posicionamento sobre o aparelho de Infravermelho e à ausência de pêlos na região, os antebraços esquerdo e direito foram escolhidos como área-teste. Durante a observação, as voluntárias encostavam o antebraço sobre o cristal do equipamento no qual foram obtidos os espectros de Infravermelho do estrato córneo.



Figura 8 - Cristal de Selenito de Zinco, acessório do equipamento de ATR-FTIR, utilizado para leitura do estrato córneo das voluntárias.

O estudo se constituiu de três etapas:

- a) etapa 1 - obteve-se a primeira leitura do estrato córneo das voluntárias antes do uso das soluções testes (leitura inicial). Para cada antebraço, foram obtidos 4 espectros de infravermelho.



Figura 9 - Voluntária idosa com antebraço sobre o cristal do equipamento de ATR-FTIR durante obtenção de espectro do estrato córneo.

b) Etapa 2 - após realização da leitura inicial do estrato córneo dos antebraços, cada voluntária recebeu dois frascos conta-gotas: um deles continha um rótulo na cor azul, com os seguintes dizeres: “antebraço direito - aplicar 7 gotas 2x ao dia”; o outro frasco continha um rótulo vermelho com os seguintes dizeres: “antebraço esquerdo - aplicar 7 gotas 2x ao dia”. Portanto, a partir da data da leitura inicial, as voluntárias passaram a aplicar as soluções recebidas em seus antebraços direito e esquerdo, conforme indicavam os rótulos. As aplicações foram feitas ao longo de 30 dias.

O frasco indicado para o antebraço direito continha a Solução de Nicotinamida 2%, enquanto o frasco destinado ao antebraço esquerdo continha a Solução Placebo. As voluntárias não foram informadas sobre o conteúdo de cada frasco.

Conforme descrito anteriormente, as voluntárias receberam recomendações orais e escritas orientando para a correta utilização das soluções, além de receberem a ficha para controle de aplicação e o termo de consentimento livre e esclarecido. Nas voluntárias idosas, residentes de casas geriátricas, as soluções foram aplicadas pela equipe de enfermagem das clínicas, visando assim, assegurar a utilização correta das soluções.



Figura 10 - Frascos contendo as soluções de Nicotinamida 2% (à esquerda) e de Solução Placebo (à direita), utilizadas no experimento.

c) Etapa 3 - decorridos os 30 dias de uso das soluções, as voluntárias retornaram ao laboratório, onde foram feitas novas leituras dos antebraços esquerdo e direito. Novamente, foram obtidos 4 espectros de infravermelho de cada antebraço.

5.8 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRATAÇÃO CUTÂNEA E DO CONTEÚDO DE LIPÍDIOS

Para determinação do grau de hidratação cutânea e do conteúdo de lipídios do estrato córneo foi utilizada, como já foi mencionado, a Espectroscopia de Infravermelho com atenuação de refletância (ATR-FTIR). Esse é um método biofísico, não-invasivo, não prejudicial e indolor.

A partir dos espectros de infravermelho obtidos dos antebraços das voluntárias antes do início e ao final do tratamento com ambas as soluções, foi calculado o grau de hidratação do estrato córneo. O cálculo foi feito da seguinte forma: os espectros foram inicialmente passados para a forma de absorbância; foram determinados, para cada espectro individualmente, os picos máximos de absorbância das bandas de amida I (1720-1580) e amida II (1475 - 1580). Em seguida, foi calculada a razão entre as absorbâncias máximas das bandas de amida I e amida II para cada espectro, conforme técnica descrita por Gloor (1980). Depois de determinadas estas razões, foram calculados, para cada espectro, a média e o desvio padrão das razões encontradas, para cada situação (inicial e final), em cada grupo de voluntárias (jovens e idosas):

- a) antebraço esquerdo inicial (sem intervenção);
- b) antebraço esquerdo final (após tratamento com Solução Placebo);
- c) antebraço direito inicial (sem intervenção);
- d) antebraço direito final (após tratamento com Nicotinamida 2%).

As médias encontradas em cada uma das situações descritas acima e em cada grupo de voluntárias foram comparadas entre si, a fim de verificar a alteração da hidratação cutânea provocada pelo tratamento e a diferença de hidratação entre os grupos.

O aumento da hidratação final, expresso em porcentagem, foi obtido por cálculo de regra de três simples. Utilizou-se a média da razão da banda de amida I/amidall no antebraço direito, comparando início e final do tratamento com Nicotinamida.

Para calcular o conteúdo de lipídios do estrato córneo, empregou-se metodologia apresentada por Tsai (2004). Foram utilizados os espectros iniciais e finais dos antebraços direitos dos dois grupos. Cada espectro foi passado à

absorbância e determinou-se os valores de absorção máxima nos picos de 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} . Em seguida, foi calculada a razão entre estas absorções máximas (banda 2920 cm^{-1} /banda 2850 cm^{-1}) para cada espectro. Após, foram determinadas as médias desta razão para os diferentes grupos:

- a) antebraço direito inicial grupo jovem (sem intervenção);
- b) antebraço direito final grupo jovem (após tratamento com Solução Nicotinamida 2%);
- c) antebraço direito inicial grupo idoso (sem intervenção);
- d) antebraço direito final grupo idoso (após tratamento com Solução Nicotinamida 2%).

Os valores encontrados para os diferentes grupos foram comparados no intuito de verificar diferenças existentes entre o conteúdo de lipídios das diferentes faixas etárias e após o tratamento com Nicotinamida.

O valor final encontrado para o conteúdo de lipídios, expresso em porcentagem, foi calculado por regra de três simples, utilizando-se os valores médios encontrados antes e depois da intervenção.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no presente estudo foram plotados em planilha Excel[®] versão 2000 e tratados através da análise da variância (ANOVA) pelo *software* SPSS versão 11.0.

Os valores encontrados para os grupos: jovens esquerdo inicial, jovens esquerdo final, jovens direito inicial, jovens direito final, idosas esquerdo inicial, idosas esquerdo final, idosas direito inicial e idosas direito final, foi analisado pelo teste citados acima, a fim de calcular as diferenças de hidratação cutânea. Para calcular as diferenças do conteúdo lipídico foi utilizado o mesmo teste, porém, apenas com os grupos do antebraço direito, inicial e final, para jovens e idosas. Foi utilizado o teste de Levene para o cálculo de homogeneidade de variância. O estudo estatístico foi realizado por meio da análise da variância, com comparações múltiplas pelo método de Bonferroni e de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

Das sessenta voluntárias que iniciaram o estudo, cinquenta e cinco utilizaram as soluções adequadamente, completando o tratamento. Das 5 voluntárias que descontinuaram o uso, uma pertencia ao grupo de idosas e se afastou por motivos de saúde; as quatro demais faziam parte do grupo de jovens e cessaram por motivos variados. Nenhuma voluntária apresentou sensibilidade ou qualquer efeito adverso durante o experimento.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁGUA E LIPÍDIOS DO ESTRATO CÓRNEO NO GRUPO JOVEM E IDOSO (ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO)

A pele de jovens e idosas foi caracterizada pela determinação do conteúdo de água (grau de hidratação) e lipídios do estrato córneo através do ATR-FTIR. Para esta caracterização, os parâmetros foram avaliados antes da intervenção com as soluções em teste.

O conteúdo de água encontrado foi o mesmo nos grupos jovem e idoso ($p > 0,05$), o que demonstrou que, inicialmente, ambos apresentavam o mesmo grau de hidratação cutânea. As médias das bandas de amida I e amida II encontradas, que representam o grau de hidratação cutânea, estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 2 - Médias das bandas de amida I/amida II, que demonstram a hidratação cutânea da pele de jovens e idosas antes do início do tratamento.

	Média amida I/amida II	Desvio padrão	<i>p</i>	Significância
Grupo Jovem	0,9841	0,273	0,298	> 0,05
Grupo Idoso	0,9768	0,027		

Análise da Variância (ANOVA)

Não foi encontrada diferença significativa quanto ao conteúdo de lipídios do estrato córneo nos grupos jovem e idoso ($p > 0,05$). Os valores das razões das

bandas $2920\text{cm}^{-1}/2850\text{cm}^{-1}$, que representam o conteúdo de lipídios, encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 3 - Médias das bandas $2920\text{cm}^{-1}/2850\text{cm}^{-1}$, que demonstram a quantidade de lipídios do estrato córneo da pele de jovens e idosas antes do início do tratamento.

	Média banda $2920/2850\text{cm}^{-1}$	Desvio padrão	<i>p</i>	Significância
Grupo Jovem	1,2214	0,0318	0,950	> 0,05
Grupo Idoso	1,2130	0,0527		

Análise da Variância (ANOVA)

De acordo com os dados demonstrados acima, verificamos que a hidratação cutânea e o conteúdo lipídico encontrados inicialmente foram os mesmos para os dois grupos.

6.2 HIDRATAÇÃO CUTÂNEA NO GRUPO JOVEM

As médias obtidas das razões das bandas de amida I/amidall, utilizadas para mensurar a hidratação cutânea encontradas no grupo jovem antes e depois tratamento com Solução Placebo e com Solução de Nicotinamida 2%, encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 4 - Demonstração das médias das razões das bandas de amida I/amidall encontradas no grupo jovem.

	Média bandas amidal/amidall	Desvio Padrão	<i>p</i>	Significância
<u>Placebo</u>				
Inicial	0,9906	0,025	0,298	> 0,05
Final	0,9716	0,137		
<u>Nicotinamida</u>				
Inicial	0,9841	0,273	0,0001	< 0,05
Final	1,0206	0,025		

Análise da Variância (ANOVA)

Foi observado um aumento significativo de 3,7% na hidratação cutânea do grupo jovem, comparando-se o antes e o depois do tratamento com Nicotinamida. No tratamento com solução placebo não houve diferenças significativas no nível de hidratação do estrato córneo.

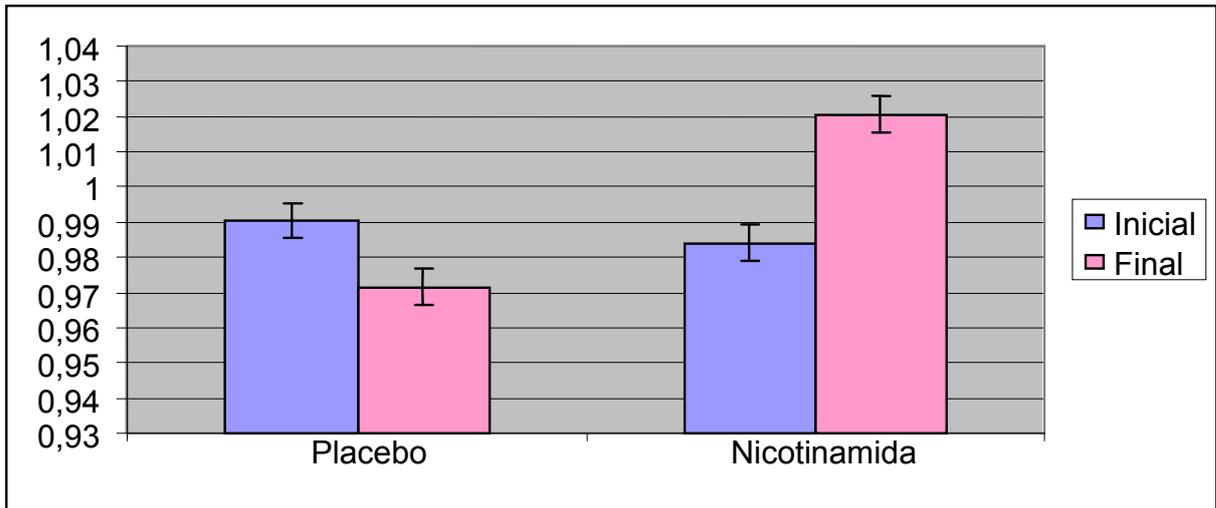


Figura 11 - As médias das razões das bandas de amida I e amida II, antes e depois do tratamento com solução placebo e Nicotinamida no grupo jovem.

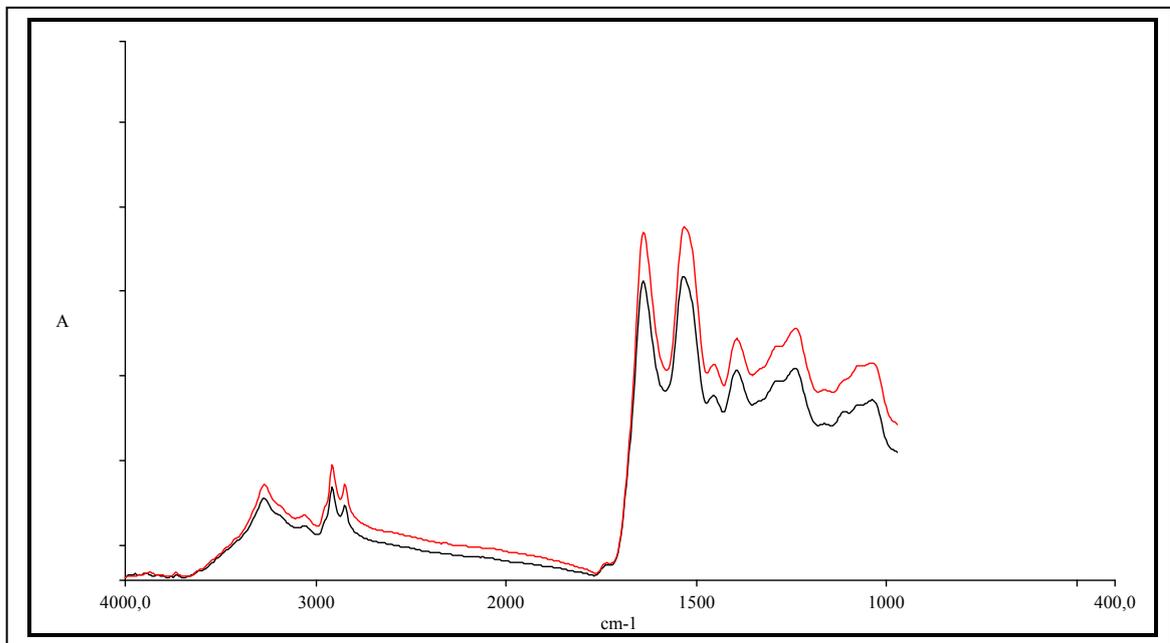


Figura 12 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária jovem; (vermelho) espectro do antebraço esquerdo antes da intervenção; (preto) espectro do antebraço esquerdo após tratamento com Solução Placebo. Percebe-se que não existem diferenças na proporção entre as bandas de amida I e amida II, o que demonstra que não houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo.

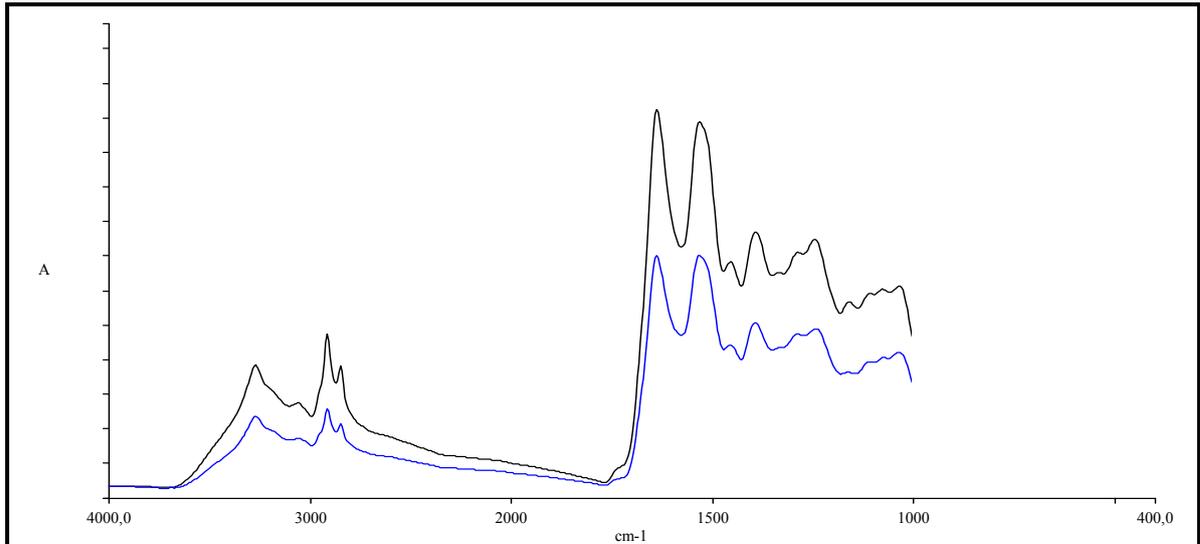


Figura 13 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária jovem; (azul) espectro do antebraço direito antes da intervenção; (preto) espectro do antebraço direito após tratamento com Solução Nicotinamida 2%. Percebe-se que existe aumento na desproporção entre as bandas de amida I e amida II após o tratamento, o que demonstra que houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo.

6.3 HIDRATAÇÃO CUTÂNEA NO GRUPO IDOSO

As médias obtidas das razões das bandas de amida I/amida II, utilizadas para mensurar a hidratação cutânea, encontradas no grupo idoso antes e depois tratamento com Solução Placebo e com Solução de Nicotinamida 2% encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 5 - Demonstração das médias das razões das bandas de amida I/amida II encontradas para o grupo idoso.

	Média bandas amida I/amida II	Desvio Padrão	p	Significância
<u>Placebo</u>				
Inicial	0,9845	0,028	0,354	> 0,05
Final	0,9863	0,027		
<u>Nicotinamida</u>				
Inicial	0,9768	0,027	0,032	< 0,05
Final	0,9946	0,028		

Análise da Variância (ANOVA)

Foi observado um aumento significativo de 1,8% na hidratação cutânea do grupo idoso, comparando-se o antes e o depois do tratamento com Nicotinamida. No tratamento com solução placebo não houve diferenças significativas no nível de hidratação do estrato córneo.

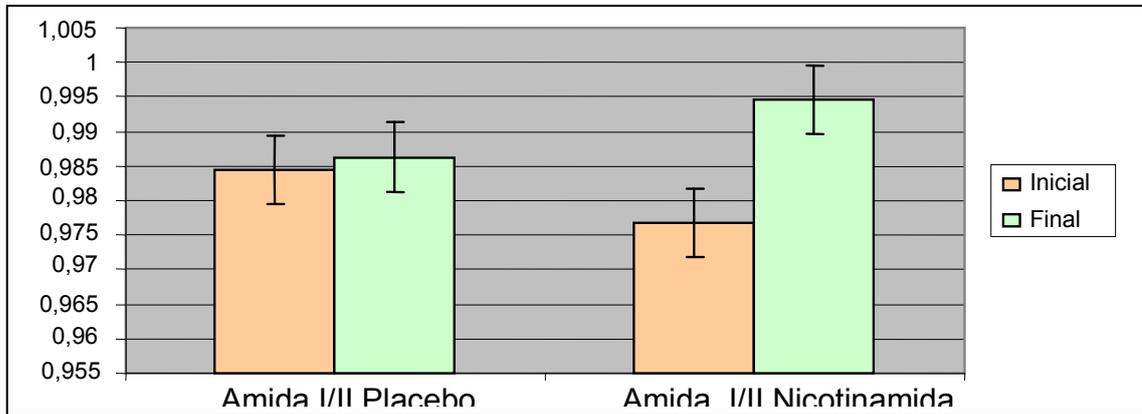


Figura 14 - As médias das razões das bandas de amida I e amida II, antes e depois do tratamento com Solução Placebo e Nicotinamida no grupo idoso.

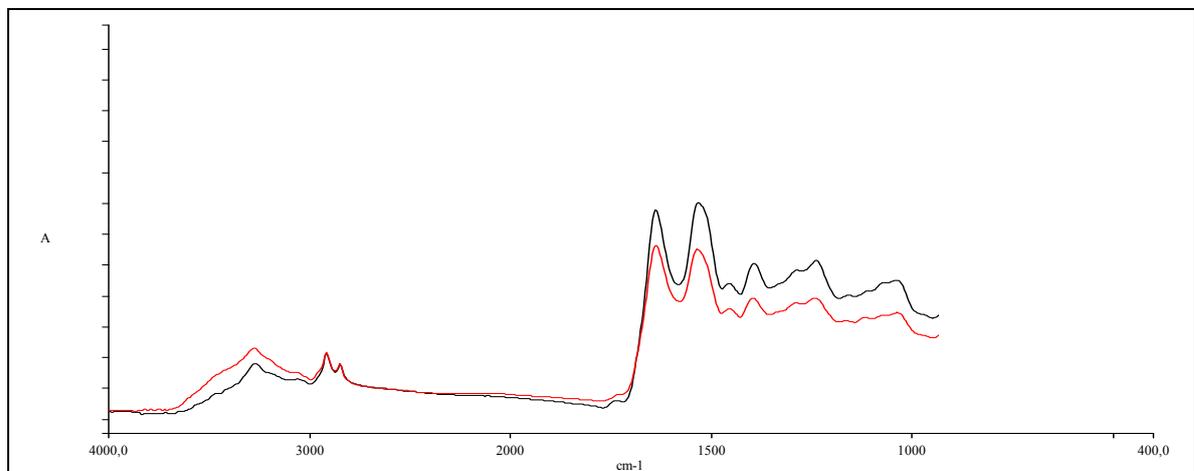


Figura 15 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária idosa; (preto) espectro do antebraço esquerdo antes da intervenção; (vermelho) espectro do antebraço esquerdo após tratamento com Solução Placebo. Percebe-se que não existem diferenças na proporção entre as bandas de amida I e amida II, o que demonstra que não houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo.

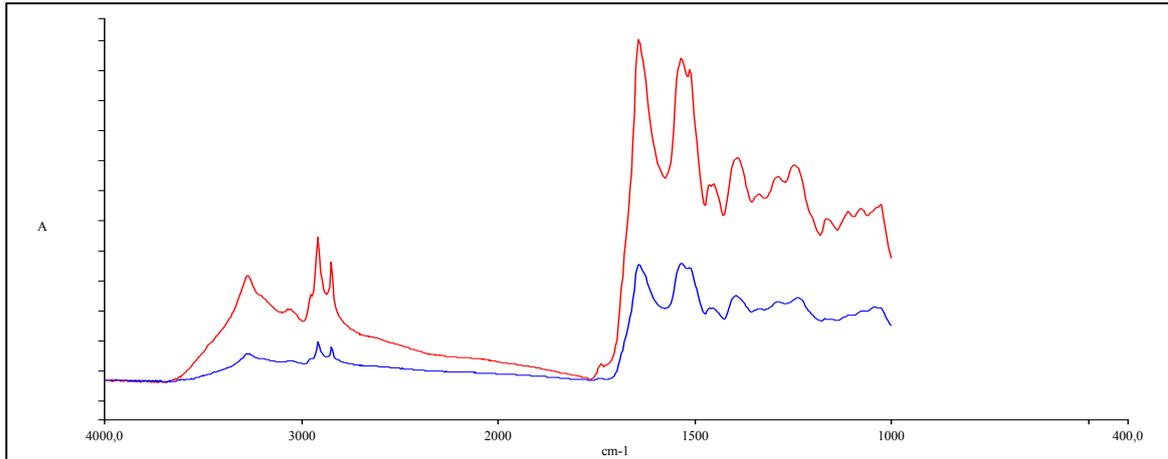


Figura 16 - Espectros de ATR-FTIR de voluntária idosa; (azul) espectro do antebraço direito antes da intervenção; (vermelho) espectro do antebraço direito após tratamento com Solução Nicotinamida 2%. Percebe-se que existem diferenças na proporção entre as bandas de amida I e amida II, o que demonstra que houve aumento no conteúdo de água do estrato córneo.

6.4 CONTEÚDO DE LIPÍDIOS DO ESTRATO CÓRNEO NO GRUPO JOVEM E IDOSO APÓS TRATAMENTO COM NICOTINAMIDA

As médias obtidas das razões das bandas de $2920\text{cm}^{-1}/2850\text{cm}^{-1}$, utilizadas para mensurar o conteúdo de lipídios do estrato córneo, encontradas no grupo jovem e idoso após tratamento com Solução de Nicotinamida 2%, encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 6 - Médias das razões das bandas $2920\text{cm}^{-1}/2850\text{cm}^{-1}$ para os grupos jovem e idoso após o uso de Nicotinamida.

	Grupo Jovem		<i>p</i>	Grupo Idoso		<i>p</i>
	Média $2920/2850\text{cm}^{-1}$	Desvio Padrão		Média $2920/2850\text{cm}^{-1}$	Desvio padrão	
Início	1,2214	0,3182	0,0001	1,2130	0,5271	0,0001
Final	1,2872	0,0761	<0,05	1,2821	0,5130	<0,05

Análise da Variância (ANOVA)

Foi observado um aumento significativo de 5,4% no conteúdo de lipídios no grupo jovem e de 5,6% no grupo idoso, comparando-se o antes e o depois do tratamento com Nicotinamida.

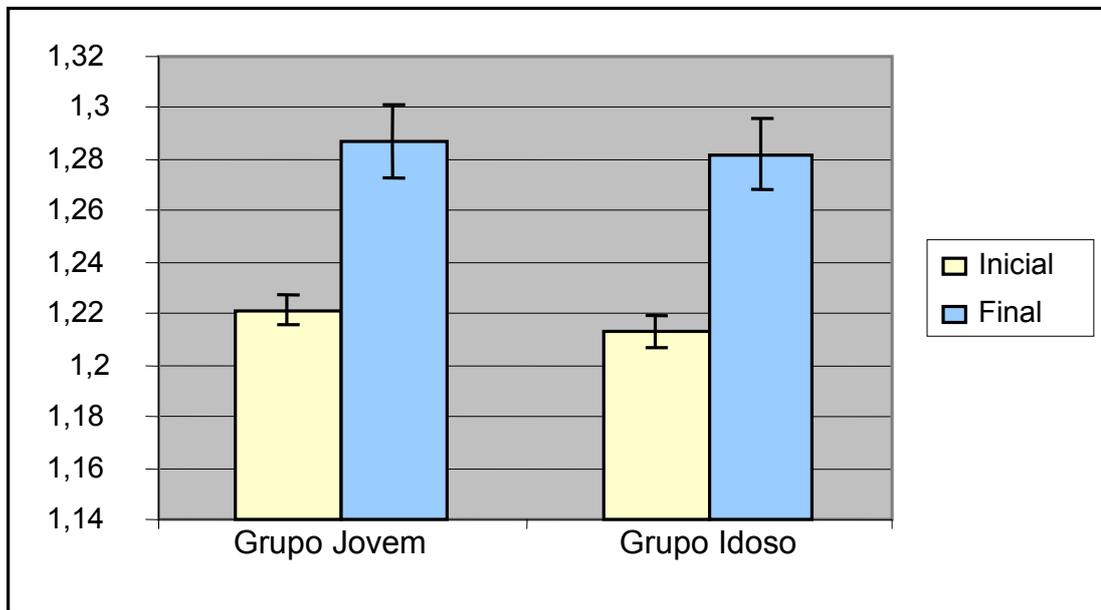


Figura 17 - Gráfico demonstrando aumento no conteúdo de lipídios do estrato córneo de jovens e idosos após tratamento com Nicotinamida

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como proposta caracterizar a pele de jovens e idosas quanto ao conteúdo de água e lipídios do estrato córneo, assim como avaliar o aumento da hidratação cutânea e do conteúdo de lipídios, através da Espectroscopia de Infravermelho com atenuação de refletância (ATR-FTIR), promovido pelo uso de Nicotinamida tópica.

A pele de jovens e idosas foi caracterizada pelo seu grau de hidratação e conteúdo de lipídios, antes do início do tratamento. Foi demonstrado que o conteúdo de água (hidratação cutânea) existente nos dois grupos era o mesmo, isto é, sua diferença não foi significativa ($p>0,05$).

Esta questão é frequentemente discutida em uma série de estudos, nos quais resultados conflitantes são demonstrados. Estudos de determinação da hidratação cutânea na pele seca e envelhecida, através da técnica de corneometria (Corneometer®) demonstraram reduzido conteúdo de água (HASHIMOTO-KUMASAKA *et al*, 1993). No entanto, através da determinação da perda de água transepidermal (Tewameter®), tanto níveis normais, como níveis diminuídos de TEWL foram reportados (WILHELM *et al*, 1991; GHADIALLY; BROWN, 1995). Assim, ainda não existe um consenso quanto ao conteúdo de água apresentado pela pele xerótica em comparação a pele normal.

O conteúdo lipídico também foi investigado para caracterização das peles nas diferentes faixas etárias, sendo que, também não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos estudados. O conteúdo e a distribuição de lipídios na pele seca e envelhecida foram investigados em diversos estudos, que demonstraram tanto conteúdos normais, como diminuídos de lipídios sebáceos, diminuição do conteúdo de ceramidas para lipídios da epiderme, ou distúrbios na composição das ceramidas na pele xerótica (NORDSTORM *et al*, 1988; JACOBSEN *et al*, 1990; AKINOMOTO *et al*, 1993; ROGERS *et al*, 1993). No presente estudo, a igualdade do conteúdo lipídico de jovens e idosas, pode ser atribuído a diversos fatores, tais como, a características da população e ao seu tamanho reduzido. Outro importante fator é o cálculo empregado para determinar o conteúdo de lipídios, que apresenta um erro de 10%. Além disso, a técnica utilizada (ATR-FTIR) possui pequena penetração no estrato córneo e, portanto, as diferenças lipídicas podem

estar em níveis mais profundos do estrato córneo.

Neste estudo, a pele de jovens e idosas mostrou igualdade no grau de hidratação e no conteúdo lipídico antes da intervenção por Nicotinamida. As causas do ressecamento cutâneo no envelhecimento, ainda não são perfeitamente entendidas, uma vez que, são demonstradas diferenças no conteúdo de água e lipídios empregando-se diferentes metodologias para determinação destes parâmetros.

O ATR-FTIR provou ser capaz de detectar variações no conteúdo de água e lipídios do estrato córneo promovidas pelo uso de Nicotinamida, conforme resultados apresentados anteriormente. Essa metodologia é amplamente utilizada para mensuração da hidratação cutânea depois do uso de diferentes emulsões cosméticas, porém, ela ainda não havia sido utilizada para avaliar a performance de hidratação da Nicotinamida. Da mesma forma, essa metodologia também costuma ser empregada para avaliação de parâmetros da função de barreira da pele, tais como grau de ordenação e conteúdo lipídico após aplicação de diversos cremes e ativos cosméticos, sendo esta a primeira vez que foi utilizada para mensurar o aumento no conteúdo de lipídios induzido pela Nicotinamida.

O estrato córneo mede entre 10 a 20 μm de espessura, variando conforme a região do corpo. Os feixes de infravermelho penetram em uma profundidade em torno de 1,5 μm , variando conforme o tipo de cristal e posicionamento (angulação) da área em teste. Portanto, o ATR-FTIR é um método de quantificação direto, que possui alcance às camadas mais superficiais do estrato córneo, conforme mencionado no referencial teórico. Desta forma, o aumento do grau de hidratação cutânea e do conteúdo lipídico mensurado, obtidos neste estudo, refere-se apenas às camadas mais externas do estrato córneo. Provavelmente, as camadas mais internas do estrato córneo e a derme superficial também tenham elevado seu conteúdo de água, porém, este dado não pôde ser obtido devido às limitações da técnica.

Os estudos até hoje publicados, que trabalharam com aplicação tópica de Nicotinamida *in vivo*, utilizaram metodologias semi-diretas (medida do TEWL, corneometria) para avaliar os efeitos de hidratação dessa vitamina. Em seu estudo, Tanno aplicou Nicotinamida tópica em voluntários jovens durante quatro semanas, encontrando diminuição dos valores de TEWL em 27% (TANNO *et al.*, 2000). No presente estudo, encontramos um aumento de 3,7% no conteúdo de água do estrato

córneo (hidratação cutânea) em voluntárias jovens e 1,8% em voluntárias idosas, ambos significativos. As diferenças encontradas nos valores obtidos pelo presente estudo e pelo estudo realizado por Tanno se devem a diferenças nas metodologias empregadas, pois o estudo de Tanno avalia a diminuição da perda de água transepidermal, enquanto este avalia o aumento do conteúdo de água no estrato córneo. Ambas metodologias possuem alcance superficial, isto é, atingem apenas as camadas mais externas do estrato córneo, conforme verificado anteriormente.

A utilização de Nicotinamida tópica, por 30 dias, demonstrou aumentar a hidratação cutânea significativamente tanto no grupo jovem quanto no grupo idoso. Este aumento no conteúdo de água do estrato córneo se deve, provavelmente, ao aumento na síntese de lipídios do estrato córneo, induzida pela Nicotinamida e, assim, formando uma barreira mais eficiente contra a perda de água transepidermal.

Porém, uma diferença grande no aumento de hidratação foi verificada entre os dois grupos. O grupo jovem obteve um aumento de 3,7% no conteúdo de água do estrato córneo, sendo praticamente o dobro do valor encontrado para o grupo idoso, que foi de 1,8%. Além disso, a análise estatística mostrou diferença altamente significativa ($p < 0,001$) para o grupo jovem tratado com Nicotinamida; e uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o grupo idoso. Essa diferença no aumento da hidratação cutânea reflete as mudanças ocorridas no tecido cutâneo com o envelhecimento.

Conforme discutido anteriormente, durante o processo de envelhecimento da pele, queratinócitos e fibroblastos entram em senescência celular, aparecendo em acúmulo na pele do idoso. Na epiderme, isto se reflete pelo processo de queratinização diminuído (ciclo celular lento), responsável, dentre outras atividades, pela diminuição da síntese de lipídios no estrato córneo. A intervenção realizada no tecido, pela aplicação de Nicotinamida, um indutor da síntese de lipídios do estrato córneo, foi capaz de aumentar a síntese desses lipídios em ambos grupos. O menor conteúdo de água apresentado pelo grupo idoso se deve, provavelmente, à diminuição da sua capacidade sintética de lipídios, devido à presença em acúmulo de queratinócitos senescentes na epiderme. Esta diferença de performance de hidratação da Nicotinamida em jovens e idosos é inédita e está sendo descrita pela primeira vez por este estudo.

O tratamento realizado com a Solução Placebo não demonstrou diferenças significativas no conteúdo de água do estrato córneo entre o início e final do

tratamento em nenhum dos grupos estudados.

O conteúdo de lipídios do estrato córneo demonstrou um aumento significativo após tratamento com Nicotinamida, nos grupos jovem e idoso. O grupo jovem apresentou um aumento de 5,4%, enquanto o grupo idoso apresentou um aumento de 5,6%, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). Diferentemente da hidratação cutânea, que apresentou um aumento duas vezes maior no grupo jovem, o conteúdo de lipídios aumentou igualmente em ambos os grupos estudados. Com isso, a Nicotinamida demonstrou ser um indutor da síntese de lipídios do estrato córneo em jovens e idosos.

Além do aumento mensurado no conteúdo de água e lipídios do estrato córneo, após a utilização de Nicotinamida tópica, mudanças macroscópicas na pele de idosas foram percebidas. De uma maneira geral, houve melhora na textura, aumento da maciez e diminuição de rugas superficiais e manchas na pele, na maioria dos casos.

8 CONCLUSÃO

O ATR-FTIR provou ser um método capaz de mensurar o aumento, induzido por Nicotinamida, do conteúdo de água superficial e de lipídios do estrato córneo. Com isso, esta técnica demonstra grande aplicabilidade para estudos de avaliação da hidratação cutânea e da função de barreira da pele *in vivo*.

A Nicotinamida aumentou significativamente o grau de hidratação cutânea nas camadas mais externas do estrato córneo em voluntárias jovens e idosas, após 30 dias de tratamento. O aumento da hidratação cutânea foi praticamente duas vezes maior para o grupo jovem, em relação ao grupo idoso. Foi constatado um aumento significativo do conteúdo de lipídios do estrato córneo em jovens e idosas, em torno de 5,5%, após tratamento com Nicotinamida.

A Nicotinamida é um ativo capaz de induzir aumento da hidratação cutânea e do conteúdo de lipídios do estrato córneo. Esta vitamina pode efetivamente ser utilizada para o tratamento do ressecamento da pele, podendo ser incorporada a emulsões cosméticas hidratantes.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M.P.H.; TRYGUE, D. O. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. **Geriatr Biosc**, 2001, n. 49, p. 1105-1109.
- AKIMOTO, K; YOSHIKAWA, N; HIGAKI, Y. Quantitative analysis of stratum corneum lipids in xerosis and asteatotic eczema. **J Dermatol**, 1993, n. 20, p. 1-6.
- ARKING, R. **Biology of Aging**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.
- BARATA, E. A. F. **A cosmetologia: princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress; 1995.
- BAUR, J. A.; ZOU, Y.; SHAY, J. W. *et al.* Telomere position effect in human cells. **Science**, 2001, n. 292, p. 2075-2077.
- BECKAM, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**, 1998, n. 78, p. 548-581.
- BERNESTEIN, E. F. ; CHEN, Y. Q. ; TAMAI, K. *et al.* Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1994, n. 103, p. 182-186.
- BERRY, N.; CHARMEIL, C; GOUJON, A. *et al.* A clinical, biometrological and structural study of xerotic skin. **International Journal of Cosmetic Science**, 1999, n. 21, p. 241-252.
- BISSET, D. L.; MIYAMOTO, K.; SUN, P.; *et al.* Topical niacinamide reduces yellowing, wrinkling, red blotchiness, and hyperpigmented spots in aging facial skin. **International Journal of Cosmetic Science**, 2004, n. 26, p. 231-238.
- BLANK, I. H. Factors which influence the water content of the stratum corneum. **J. Invest. Dermatol.**, 1952, n. 18, p. 433-440.
- BOLOGNIA, J. L. Dermatological and cosmetic concerns of the older woman. **Clin. Geriatr. Med.** 1993, n. 9, p. 209-229.
- BOMMANNAN, D.; POTTS, O.; GUY, R. H. Examination of Stratum Corneum Barrier Function in vivo by Infrared Spectroscopy. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1990, n. 95, p. 403-408.
- BOSSET, S. ; BONNET-DUQUENNOY, M. ; BARRE, P. *et al.* Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. **Brit. J. Dermatol.**, 2003, n. 149, p. 826-835.
- BOWSTRA, J. A.; GOORIS, G. S.; DUBBLEAAR, E. E. R. *et al.* ph, cholesterol sulphate and fatty acids affect stratum corneum lipid organization. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1998, n. 3, p. 69-74.

BRANCALEON, L.; BAMBERG, P. B.; SAKAMAKI, T. *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transformed Infrared Spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum in vivo. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2001; n. 16, p. 380-386.

CAMPISI, J. The biology of replicative senescence. **Eur. J. Cancer.**, 1997, n. 33, p. 703-709.

_____. The role of cellular senescence in skin ageing. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1998, n. 3, p. 1-5.

CHARLET, E. **Cosmética para farmacéuticos**. Zaragoza: Acribia, 1996.

CROSS, C. C.; HALLIWELL, B.; BORISH ET, *et al.* Davis conference: oxygen radicals and human disease. **Ann. Intern. Med.**, 1987, n. 107, p. 526±545.

CURDY, C.; KALIA, Y. N, GUY, R. H. Non-invasive assessment of the effects of iontophoresis on human skin in vivo. **J. Pharm. and Pharmacol.**, 2001, n. 53, p. 769-777.

DE ZWART, L. L.; MERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M. *et al.* Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans. **Free Rad. Biol. Med.**, 1999, n. 26, p. 202-226.

DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G. *et al.* A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and ageing skin in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, 1995, n. 92, p. 9363-9367.

ELIAS, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1983, n. 80, 44-49.

ENGELKE, M; M. JENSEN, J; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S; *et al.* Effects of xerosis and aging on epidermal proliferation and differentiation. **Br. J. Dermatol.**, 1997, n. 137, 219-225.

FELDMANN, R. J.; MAIBACH, H. I. Absorption of some organic compounds through the skin in man. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1970, n. 54, p. 399-404.

FINCH, C. E. **Longevity, senescence and the genome**. Chicago: Chicago University Press, 1990.

FISHER, G. J.; DATTA S. C.; TALWAR, H.S. *et al.* The molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, 1996, n. 379, p. 335-338.

_____; KANG, S.; VARANI, J. *et al.* Collagen Degradation in Aged/ Photodamaged Skin InVivo and After Exposure to Matrix Metalloproteinase-1 InVitro. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2003, n. 120, p. 842-848.

_____. Mechanisms of Photoageing and chronological Skin Ageing. **Arch Dermatol.**, 2002, n. 138, p. 1462-1470.

FISHER, G. J.; KANG, S.; VOORHEES. **J. J. Photoaging. Clin. Geriatr. Dermatol.**, 2000, n. 19, p. 413-423.

_____; WANG, Z. Q.; DATTA S. C. *et al.* C-jun-dependente inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2000, n. 106, p. 663-670.

_____. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **N. Engl. J. Med.**, 1997, n. 337, p. 1419-1428.

FOSSEL, M. Cell senescence in human aging and disease. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 2002, n. 959, p. 14-23.

_____. Telomerase and the ageing cell: implications for human health. **JAMA**, 1998, n. 279, p. 1732-1735.

GAVRILOV, L. A.; GAVRILOVA, N. S. Evolutionary theories of aging and Longevity. **The Scientific World Journal**, 2002, n. 2, p. 339-356.

GEHRINHG, W. Nicotinic acid/ niacinamide and the skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 2004, n. 3, p. 88-93.

GENSLER, H. L. Prevention of photoimmunesuppression and photocarcinogenesis by topical niacinamide. **Nutr. Cancer**, 1997, n. 29, p. 157-162.

GHADIALLY, R.; BROWN, B. E.; SEQUEIRA-MARTIN, S. M *et al.* The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1995, n. 95, p. 2281-2290.

GILCHEST, B. A. Age associated changes in the skin. **J. Am. Geriatr. Soc.**, 1982, n. 30, p. 139-142.

GIRARD, P.; BERAUD, A.; SIRVENT, A. Study of three complementary techniques for measuring cutaneous hydration in vivo in human subjects: NMR spectroscopy,

GLOOR, M.; WILDEBRANDT, U.; THOMER, G. *et al.* Water content of the horny layer and skin surface lipids. **Arch. Dermatol. Res.**, 1980, n. 268, p. 221-223.

GNIADACKA, M; NIELSEN, F.; WESSEL, S. *et al.* Water and Protein Structure in Photoaged Chronically Aged Skin. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1998, n. 111, p. 1129-1133.

GOLDSMITH, T. C. **The evolution of aging.** How Darwin's Dilemma is Affecting Your Chance for a Longer and Healthier Life.

GRIFFITHS, C. E. M. Nicotinamide 4% gel for the treatment of inflammatory acne vulgaris. **J. Dermatol. Treat.**, 1995, n. 6S, p. 8-10.

HARDING; WATKINSON; RAWLINGS *et al.* Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. **International Journal of Cosmetic Science**, 2000, n. 22, p. 1-21.

HARLEY, C.B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, 1990, n. 345, p. 458-460.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, 1956, n. 11, p. 298-300.

_____. Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease process. **Biology of Aging**, 1986, p. 3-50.

_____. The aging process. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 1981, n. 78, p. 7124-7128.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento.** São Paulo: Senac, 2003.

HART, R. W.; TURTURRO, A. Theories of ageing. *In*: ROTHSTEIN, M. **Review of biological Research in Aging.** New York: Alan R. Liss, 1983.

HASE, T.; SHINTA, K.; MURASE, T. *et al.* **Histological increase in inflammatory in sun-exposed skin of female subjects:** the possible involvement of matrix metalloproteinase-1 produced by inflammatory infiltrate on collagen degradation. 2000.

HASHIMOTO-KUMASAKA, K; TAKAHASHI, K; TAGAMI, H. Electrical measurement of the water content of the stratum corneum in vivo and in vitro under various conditions; comparison between skin surface hygrometer and corneometer in evaluation of the skin surface hydration state. **Acta Derm Venerol**, 1993, n. 73, p. 335-339.

HAYFLICK, L. **Como e porque envelhecimento.** New York: Campus, 1997.

_____. The limited in vitro lifetime of human diploid cells strains. **Exp. Cell Res.**, 1965, n. 37, p. 614-636.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dados populacionais.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 abr. 2006.

JACOBSEN, TM; YUSEL, K.U; GESSIN, J.C. Effects of aging and xerosis on the amino acid composition of human skin. **J Invest dermatol**, 1990, n. 95, p.296-300.

JAZWINSKI, S. M. Longevity, genes, and aging. **Science**, 1996, n. 273, p. 54-59.

JECKEL NETO, E. A.; CRUZ, I. B. M da. **Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000.

_____; CUNHA, G. L. da. Teorias Biológicas do Envelhecimento. *In*: FREITAS, E. V. de; PY, L.; NERI, A. L. *et al.* **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

JECKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **M. Age. Develop.**, 2002, n. 123, p. 801-810.

KAWAGUCHI, Y.; TANAKA, H.; OKADA, T. *et al.* The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. **Arch. Dermatol. Res.**, 1996, n. 288, p. 39±44.

KLIGMAN, L. H. Photoaging: manifestations, prevention, and treatment. **Clin. Geriatr. Med.**, 1989, n. 5, p. 235-251.

KOWALD, A.; KIRKWOOD, T. B. L. A network theory of aging: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the aging process. **Mutat Res.**, 1996, n. 316, p. 209-236.

LAVKER, R. M. Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. **Blackwell Science**, 1995, p. 123-135.

_____. Structural alterations in sun exposed and unexposed aged skin. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1979, n. 73, p. 59-66.

LUCASSEN, G. W.; VAN VEEN, G. N. A; JANSEN, J. A. Band analysis of hydrated human skin stratum corneum attenuated total reflectance fourier transform infrared spectra *in vivo*. **Journal of Biomedical Optics**, 1998, n. 3, p. 267-280.

MA, W.; WLASCHECK, M.; TANTCHEVA-POÓR, I. *et al.* Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. **Clin. Exp. Dermatol.**, 2001, n. 26, p. 592-599.

MASORO, E. J. **How ageing occurs: challenges of biological aging**. New York: Springer, 1999.

MATOLSKY, A. G.; DOWNES, A. M.; SWEENEY, T. M. Studies of epidermal water barrier: Part II - Investigations of the chemical nature of the water barrier. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1968, n. 50, p. 19-26.

MERKER, K.; STOLZING, A.; GRUNE, T. Proteolysis, caloric restriction and aging. **Mechanisms of aging and Development**, 2001, n. 122, p. 595-615.

MILLIS, A. J.; HOYLE, M.; McCUE, H. M. *et al.* Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, 1992, n. 201, p. 373-379.

NING, Y.; XU, J. F.; LI, Y.; CHAVEZ, L. *et al.* Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts. **Hum. Mol. Genet.**, 2003, n. 12, p. 1329-1336.

NORDSTROM, K.M.; MCGINLEY, J.; KLIGMAN, A.M. Sebaceous lipids in xerosis of the skin. **J Cutan Aging Cosmet Dermatol.**, 1988, n. 1, p.29-33.

NORMAN, R. A. Xerosis and pruritus in the elderly: recognition and management. **Dermat. Therapy**, 2003, n. 16, p. 254-259.

PAEPE, K.; DERDE, M. P.; ROSSEUW, *et al* Incorporation of ceramides 3B in dermatocosmetic emulsions effect on the transepidermal water loss of sodium lauryl sulphate-damage skin. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2000, n. 14.940, p. 272-279.

PAEPE, K.; DERDE, M. P.; ROSSEUW, *et al.* Claim substantiation and efficiency of hydrating body lotions and protective creams. **Contact Dermatitis**, 2000, n. 42, p. 227-234.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia Biologia Geral Biologia da Pele**. São Paulo: Organização Andrei, 1998.

PODDA, M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. **Clin. Dermatol.**, 2001, n. 26, p. 578-582.

POTTS, R. O.. Stratum corneum hydration: experimental techniques and interpretations of results. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, 1986, n. 37, p. 9-33.

_____ ; GUZEK, D. B.; HARRIS, R. R. *et al.* A non-invasive, in vivo technique to quantitatively measure water concentration of the stratum corneum using attenuated total-reflectance infrared spectroscopy. **Arch. Dermatol. Res.**, 1985, n. 277, p. 489-495.

PRASCH, T. H.; KNÜBEL, G., SCHIMIDT-FONK, K. *et al.* Infrared spectroscopy of the skin: influencing the stratum corneum with cosmetics products. **International Journal of Cosmetic Science**, 2000, n. 22, p. 371-383.

PRETELLI, E. D. ; MILLE, G. Analyses in vivo de la peau par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. **C. R. Acad. Sci.**, Paris: 1988, n. 307, série III, p. 623-626.

RAWLINGS, A. V. Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. **International Journal of Cosmetic Science**, 2003, n. 25, p. 63-95.

RECORD, I. R.; DREOSTI, I. E.; KONSTANTINOPOULOS, M.; BUCKLEY, R. A. The influence of topical and systemic vitamin E on ultraviolet light-induced skin damage in hairless mice. **Nutr. Cancer**, 1991, n. 16, p. 219±226.

RHIE, G.; SHIN, M. H.; SEO, J. Y. *et al.* Aging and photoaging dependent changes of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2001, n. 117, p. 1212-1217.

ROENIGK, H. H. Treatment of the skin face. **Dermatologic Therapy**, 2000, n. 13, p. 141-153.

ROGERS, J; MAYO, A; WATHINSON, A. Skin dryness – what is it? **J Invest Dermatol.**, 1993, n. 100, p. 510A.

SAMPAIO, S. A. S.; RIVITTI, E. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

SCHARFFETER-KOCHANEK, K. ; BRENNEISEN, P. ; WENK, J. *et al.* Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Exp. Gerontol.**, 2001, n. 35, p. 307-31.

SERUP, J.; JEMEC, G. B. E. **Handbook of non-invasive and the skin**. Boca Raton: CRC Press, 1995.

SHALITA, A. R.; SMITH, J. G.; PARISH, L. C. *et al.* Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. **International Journal of Cosmetic Science**, 1995, n. 34, p. 434-437.

SMITH, D. R.; SHEU, H. M.; HSIED, F. S. *et al.* Prevalence of skin disease among nursing home patients in southern Taiwan. **International Journal of Cosmetic Science**, 2002, n. 41, p. 754-759.

SMITH, J. G.; DAVIDSON, E. A.; CLARK, W. M. Alterations in human dermal connective tissue with age and chronic sun damage. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 1962, n. 39, p. 347-356.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. **Sem. Cancer Biol.** 2000, n. 10, p. 415-433.

STETLER-STEVENSON, W. G.; YU, A, E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **Sem. Cancer Biol.**, 2001, n. 11, p. 143-152.

STINCHCOMB, A. L; PIROT, F.; TOURAILLE, G. D. *et al.* Chemical uptake into human stratum corneum in vivo from volatile and non volatile solvents. **Pharm. Res**, 1999, n. 16, p. 1288-1293.

STREHLER, B. **Time, cells and aging**. New York: Academic Press, 1982.

STUART, I. H. **A psicologia do envelhecimento: uma introdução**. Porto Alegre: Artmed; 2002.

TAKAHASHI, Y.; KURO-O, M.; ISHIKAWA, F. Aging Mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2000, v. 27, n. 23, p. 12407-12408.

TANNO, O; OTA, Y; KITAMURA, N; *et al.* Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. **Br. J. Dermatol.**, 2001, n. 143, p. 524-531.

TAYLOR, C. R.; STERN, R. S.; LEYDEN, J. J. *et al.* Photoaging/photodamage and photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 1990, n. 22, p. 1-15.

THAIPISUTTIKUL, Y. Pruritic skin diseases in the elderly. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 1998, n. 25(3), p. 153-157.

THUNE, P.; NILSEN, T.; HANSTAD, K. *et al.* The water barrier function of the skin in relation to the water content of stratum corneum, pH and skin lipids. **Acta. Derm. Venereol.**, 1998, n. 68, p. 277-283.

TSAI, J. C.; LO, Y. L.; LIN, C. Y. *et al.* Feasibility of rapid quantitation of stratum corneum lipid content by Fourier transformed infrared spectroscopy. **I.O.S Press**, 2004, n. 18(3), p. 423-431.

UITTO, J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis: age-related alterations in collagen and elastin. **Dermatol. Clin.**, 1986, n. 4, p. 433-446.

URSCHITZ, J.; IOBST, S.; URBAN, Z. *et al.* A serial analysis of gene expression in sun-damaged human skin. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2002, n. 119, p. 3-13.

VARANI, J. ; WARNER, R. L. ; MEHRAZ, G. K. *et al.* Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2001, n. 114, p. 480-486.

WEST, M. D. The cellular and molecular biology of skin aging. **Arch. Dermatol.** 1994, n. 130, p. 87-92.

_____ ; PEREIRA-SMITH, J. R. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with loss of regulation and overexpression of collagenase activity. **Exp. Cell Res.**, 1989, n. 184, p. 138-147.

WICK, M.; BURGER, C.; BRUSSELBACH, S. *et al.* A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation and senescence. **J. Biol. Chem.**, 1994, n. 269, p. 18953-18960.

WICKENS, A. P. **The causes of aging.** Preston: Hardwood Academic Publishers, 1998.

WILHELM, K.P.; CUA, A.B.; MAIBACH, H.I.. Skin aging. **Arch Dermatol.**, 1991, n. 127, p. 1806-1809.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry.** Madri: Diaz de Santos, 1990.

WRIGHT, W. E.; Shay, J. W. Telomere positional effects and regulation of cellular senescence. **Trends Genet.**, 1992, n. 8, p. 193-197.

YAAR, M.; MARK, E. S. Mechanisms of aging. **Arch. Dermatol.**, 2002, n. 138, p. 1429-1432.

_____; GILCHREST, B. A. Fifty years of skin ageing. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, 2002, n. 7, p. 51-58.

YU, B. P.; YANG, R. Critical evaluation of the free radical theory of aging a proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1992, n. 786, p. 1-11.

YU, J. M.; LIU, Y.; XIE, N. *et al.* Effects of nicotinamide on levels of dermis hydroxyproline in photoaging skin. **Huanjing Yu Jiankang Zazhi**, 2002, n. 19, p. 102-104.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Documento com recomendações gerais sobre o estudo *in vivo* entregue às voluntárias

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

“ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA AVALIAÇÃO DA HIDRATAÇÃO CUTÂNEA DE IDOSAS PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE NICOTINAMIDA”

RECOMENDAÇÕES PARA AS VOLUNTÁRIAS PARTICIPANTES:

- Aplicar 7 gotas, 2 vezes ao dia das soluções recebidas, no antebraço esquerdo e direito (conforme indicação do rótulo) por 30 dias e anotar na ficha de aplicação;
- Ao final dos 30 dias será marcada nova data para reler os antebraços;
- Caso a data marcada ultrapasse 30 dias, continuar usando as gotas até o dia da releitura;
- No dia da releitura, por favor, devolver a ficha de aplicação;
- Não utilizar produtos cosméticos **no antebraço** durante o tratamento (cremes hidratantes, óleo de banho, protetores solares, autobronzeadores, perfumes, etc);
- Qualquer dúvida entrar em contato com Ana Lúcia pelos telefones: 32224461 ou 99168141.

MUITO OBRIGADA PELA SUA PARTICIPAÇÃO!!!!

APÊNDICE B

Ficha de Controle de Aplicação das Soluções

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**“AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA HIDRATAÇÃO DO ESTRATO CÓRNEO PELO
USO DE NICOTINAMIDA TÓPICA”**

FICHA DE CONTROLE DE APLICAÇÃO DAS SOLUÇÕES TESTES					
GRUPO: [] JOVEM [] IDOSO					
VOLUNTÁRIA: _____					
IDADE: _____ ANOS					
DIA	DIA/ MES	DIA SEMANA	HORÁRIOS APLICAÇÃO	ASSINATURA	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

APÊNDICE C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Avaliação da Eficácia da Nicotinamida como adjuvante no tratamento da Xerose Senil

Estamos realizando um estudo no Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS com o objetivo de adequar produtos hidratantes para pele de idosos. A pele seca é uma consequência natural do envelhecimento, mas predispõe a outras desordens dermatológicas. Para este estudo, vocês deverão aplicar soluções hidratantes nos antebraços, diariamente, por um período de 4 semanas. Após este período, deverão retornar ao laboratório, onde os antebraços serão colocados sobre um equipamento, durante 2 minutos, para verificar a hidratação cutânea. Este método empregado é totalmente não-invasivo, indolor e não prejudicial. Os resultados deste estudo poderão auxiliar na melhoria da pele seca e no desenvolvimento de produtos cosméticos para pele de idosos. Caso concorde em participar, solicitamos a assinatura deste termo.

Eu,....., fui informada dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Desta forma, assino este termo de concordância para o projeto acima citado, de livre e espontânea vontade. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão em participar do experimento, se assim o desejar. Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Os dados serão utilizados somente para objetivo de investigação, ficando assegurados seu sigilo e anonimato. Este documento foi elaborado em duas vias, sendo que uma via permanecerá com o pesquisador e a outra via com o voluntário participante do experimento.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

_____ Nome do Voluntário	_____ Assinatura	_____ Data
_____ Nome do Pesquisador	_____ Assinatura	_____ Data

Este formulário foi lido para.....
em.....(data) por Ana Lúcia Koff Milan enquanto eu estava presente.

_____ Nome da Testemunha	_____ Assinatura	_____ Data
-----------------------------	---------------------	---------------

Responsável pela investigação: Ana Lúcia Koff Milan

Endereço Residencial: Rua Dinarte Ribeiro, 77/201 - Moinhos de Vento -Porto Alegre-RS

Fone: (51) 3222-4461 - (51) 99168141

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS. FONE: (51) 3320 3345

APÊNDICE D
Resumo apresentado no
20º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, São Paulo/SP

EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE NICOTINAMIDA NA HIDRATAÇÃO
CUTÂNEA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Ana Lúcia Koff **Milan**¹, Msc. Temis W.F. **Corte**², Cíntia **Witt**³, Candida **Deves**⁴,
Betania **Marques**⁵, Dr. André Arigony **Souto**⁶.

1- Mestranda Gerontologia Biomédica; 2- Doutoranda Gerontologia Biomédica;
3,4,5- Acadêmicas Faculdade de Farmácia; 6- Prof. Orientador.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

INTRODUÇÃO: A pele é o maior tecido com a função de barreira do organismo, prevenindo este contra a dessecação. Para isto, a epiderme (camada mais externa da pele) passa por um processo de diferenciação terminal para produzir uma camada fina e inerte a retenção de água, o estrato córneo. Este é formado por células anucleadas (corneócitos) que estão embebidas em uma matriz lipídica, formando uma estrutura multilamelar, que serve como barreira de permeabilidade. Dentre os lipídeos destacam-se as ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. A pele seca pode ser resultado de disfunções no estrato córneo, que são determinadas por diversos fatores, tais como: idade avançada, níveis de hidratação anormais e pH. Esta tem como características a descamação de corneócitos, a diminuição do nível de hidratação e um aumento da perda de água transepidermal, além da perda de elasticidade e flexibilidade. Tradicionalmente, as emulsões cosméticas para tratamento da pele seca utilizam-se de agentes oclusivos e umectantes. Com os avanços no conhecimento da biologia do estrato córneo, novas metodologias para melhorar o tratamento da pele seca se fazem necessárias. Agentes hidratantes que suplementem a barreira lipídica, tanto pela sua aplicação direta, como pelo aumento intrínseco da lipogênese estão sendo avaliados.

OBJETIVO: este estudo tem como objetivo avaliar o aumento da hidratação cutânea pelo uso tópico de um indutor bioquímico da síntese de lipídeos do estrato córneo (Nicotinamida). **METODOLOGIA:** foi realizado estudo *in vivo*, onde foram avaliadas 30 voluntárias, saudáveis, com idade entre 18-27 anos. A medida da hidratação cutânea foi realizada através de um método biofísico, não-invasivo, denominado Espectroscopia de Infravermelho com Atenuação de Reflectância (FTIR). Espectros da pele das voluntárias foram realizados antes e após o tratamento. Este consistiu-se de duas aplicações diárias de Solução de Nicotinamida 2% em um antebraço, e aplicação de Solução Placebo no outro antebraço por 30 dias. A leitura da pele foi realizada em sala aclimatizada, com temperatura e umidade controladas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS e as voluntárias assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. **RESULTADOS:** obteve-se aumento significativo na hidratação cutânea dos antebraços tratados com Nicotinamida em comparação ao início do tratamento e em comparação ao placebo. **DISCUSSÃO e CONCLUSÃO:** Nicotinamida demonstrou ser um importante ativo para hidratação cutânea, uma vez que estimula bioquimicamente a síntese de lipídeos do estrato córneo, principalmente ceramidas. Com o aumento nos níveis destes lipídeos, há um aumento no seu grau de ordenação e redução da perda de água transepidermal, aumentando assim, a retenção de água no tecido.

APÊNDICE E

Resumo enviado para o WORLD CONGRESS OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES 2006 - 66th International Congress of FIP

Evaluation of the effect of nicotinamide on aged skin hydration by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR - FTIR)

Milan, Ana Lúcia Koff; **Corte**, Temis Weber Furlanetto; **Souto**, André Arigony.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

IGG - Instituto de Geriatria e Gerontologia

Porto Alegre - RS - Brazil

Correspondence: analuciakoff@gmail.com

Key-words - aged skin, hydration, nicotinamide, FTIR-ATR.

Dry skin is known as xerosis. The hydration level is 25% lower in xerotic skin than in normal skin, and the stratum corneum lipids, particularly ceramides are decreased. The functional limitations in ageing skin include reduced turnover of the epidermis (slower epidermal cell cycle), with results from a deficiency of NADP in ageing cells. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy is used to measure hydration of the stratum corneum. The physiologic role of nicotinamide is a precursor to important cofactors: NAD and NADP, that serve as redox coenzymes in many enzymatic reactions. Tanno et al, demonstrated that topical application of nicotinamide also increase the levels of ceramides, free fatty acids and cholesterol in the stratum corneum, and also decreases the TEWL in young adults. Objective: evaluate the performance of skin hydration of nicotinamide on aged skin, and to compare with the skin hydration performance in young skin by ATR-FTIR. Methodology: *in vivo* study, with 55 volunteers, female, that were divided in two groups: young (18-25) and aged (60-93). The skin hydration measurement was made by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. Skin spectra from volunteers had been made after and before the beginning of the study. This lasted 30 days, when they applied twice daily a nicotinamide solution 2% in a forearm, and a vehicle in the other forearm. The skin

moisture was calculated by the ratio between amide I and amide II band. Results: Nicotinamide showed to increase skin hydration in the young group (3,7%) and in the aged group (1,8%). The data were analyzed by Student test, and were found significantly differences between the beginning and end of treatment with nicotinamide. Conclusion: The ATR-FTIR was able to detect an increase in the skin moisture in the young and the aged skin treated with nicotinamide 2%. Furthermore, this study revealed that the young group showed a twice increase of hydration. It is the first time these data are published.

ANEXOS

ANEXO A**Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 373/05-CEP

Porto Alegre, 05 de maio de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Avaliação do aumento da síntese de lipídeos do estrato córneo pelo uso de emulsões cosméticas contendo nicotinamida para a xerose senil".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Ana Lucia Koff Milan
N/Universidade

ANEXO B**Correspondência eletrônica com pesquisador Tanno**

----- Original Message -----

From: TANNO osamu (丹野 修)
To: anakoff@terra.com.br
Sent: Friday, April 29, 2005 1:32 AM
Subject: Re: information about an article

Dear Miss Koff

Thank you for your e-mail to Mr. Inoue.

I'm a author of that paper.

In in vivo test, we applied 0.3ml of solution to the shin (10 cm x 20cm).

As vehicle, we used the solution which 0.1% polyoxyethylene (20) monoluarate sorbitan was contained in distillation water.

If you have more questions, don't hesitate to contact me.

Best regards

Osamu TANNO

Senior Research Scientist

Kanebo Cosmetics Inc.

Cosmetics Laboratory

3-28, Kotobuki-cho 5-chome,

Odawara-shi, Kanagawa-ken,

250-0002 JAPAN

facsimile; +81-465-34-1237

e-mail: otanno@kanebocos.co.jp

-----Original Message-----

From: Ana Lúcia Koff Milan [mailto:anakoff@terra.com.br]

Sent: Tuesday, April 26, 2005 9:52 AM

To: inoshin@kanebocos.co.jp

Subject: information about an article

Dear Mr. Inoue,

My name is Ana Lúcia Koff, and I'm master student in Brazil. I'm working with topical nicotinamide for older people. I read your article "Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier" Brit J dermatol, 2000. I'd like to know, in *the in vivo* test, how many (g or ml) solution did you apply on the volunteer's shin? And, I'd like to know what was the vehicle used in your article to produce the polyoxyethylene (20) monoluarate sorbitan (0,1%) solution? It was water?

Sincerely,

Ana Lúcia Koff