

Stability and Clinical Efficacy of Moisturizing Cosmetic Formulations Containing Vitamins C and E

Estabilidade e Eficácia Clínica de Formulações Cosméticas Hidratantes Contendo Vitaminas C e E

**Raphael Dário Capitani, Daiane Garcia Mercurio, Flávio Bueno de Camargo Junior
& Patrícia M. B. G. Maia Campos**

Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – USP
Av do Café, S/N, Zip Code: 14040-903, Ribeirão Preto - São Paulo, Brasil
Email: pmcampos@usp.br

Abstract

The addition of different active substances in cosmetics, e.g. vitamins and their derivatives, has been quite frequent. In this way, it is fundamental to evaluate the stability and efficacy of cosmetic formulations containing these ingredients. The objective of this work was to evaluate the physical stability and the clinical efficacy of moisturizing cosmetic formulations based on panthenol, and containing ascorbyl tetraisopalmitate and α -tocopherol acetate. Formulations were developed with panthenol (FA), panthenol and ascorbyl tetraisopalmitate and α -tocopherol acetate (FBC). The latter was submitted to rheological behavior analysis and all were characterized as stable. Next, they were subjectively and objectively analyzed for clinical efficacy in 25 volunteers. Sensory evaluation and biophysical and skin imaging techniques were used to measure stratum corneum water content, transepidermal water loss (TEWL), and skin microrelief. These were carried out before application of the formulations and then after 3 hours. The formulations studied showed acceptable stability according to the physical aspects under consideration. In the clinical efficacy studies, both formulations significantly improved skin hydration and reduced TEWL. There was also improvement in skin microrelief but these results were not statistically significant. FBC received higher scores than FA in the sensory analysis as there was a significant improvement in the skin's smoothness, besides being preferred in purchase intent.

Keywords: Cosmetics, panthenol, vitamin C and E derivatives, clinical efficacy, sensory analysis.

Resumo

A adição de diferentes substâncias activas em produtos cosméticos, por exemplo, vitaminas e seus derivados, tem sido bastante frequente. Desta forma, é fundamental avaliar a estabilidade e eficácia de formulações cosméticas que contêm estes ingredientes. O objectivo deste trabalho foi o de avaliar a estabilidade física e a eficácia clínica da hidratação formulações cosméticas com base em pantenol, e contendo tetraisopalmitato de ascorbilo e α -tocoferol. Por isso, as formulações foram desenvolvidas com pantenol (FA), pantenol e tetraisopalmitato de ascorbilo e α -tocoferol (FBC), que foi submetido à análise do comportamento reológico, caracterizando-as como estável. Em seguida, foram subjectivamente e objectivamente analisados quanto à eficácia clínica em 25 voluntários por avaliação sensorial e técnicas de bioengenharia cutânea, em termos de teor de água do estrato córneo, a perda de água transepidermica (TEWL) e microrrelevo da pele, antes e depois de 3 horas de aplicação. As formulações estudadas apresentaram estabilidade aceitável de acordo com os aspectos físicos considerados. Nos estudos de eficácia clínica, ambas as formulações melhoraram significativamente a hidratação da pele e reduziram a TEWL, e também demonstraram uma melhoria no microrrelevo da pele, mas estes resultados não foram estatisticamente significativos. FBC recebeu notas superiores FA por análise sensorial, com melhoria significativa da suavidade da pele, além de ser preferido em intenção de compra.

Palavras-chave: Cosméticos, pantenol, vitamina C e derivados E, eficácia clínica, análise sensorial

Introduction

Moisturizers are among the most important classes of cosmetics and body care products since they are widely used not only for their preventive action (xeroderma, prevention and delaying of premature ageing), but also for their usefulness in helping with dermatological therapies in a wide variety of skin disorders ⁽¹⁾.

The addition of different active substances in cosmetic formulations (e.g. vitamins and their derivatives) has been quite frequent. Vitamin E, for example, has humectant properties besides being a potent neutralizer of free radicals ⁽²⁾. Along with vitamin E, panthenol and vitamin C have high moisturizing power. These actives and other plant extracts with antioxidant and protective properties have been widely used by the cosmetic industry ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾.

There is a large combination of ingredients used in cosmetic formulations with various functions. Therefore, it is essential to consider, during the R&D phase of a product, the product's stability once developed, its sensory characteristics, and its efficacy in the actual conditions of use.

In terms of stability evaluation, physical stability is defined as the cosmetics' ability to maintain their physical characteristics such as color, odor, consistency, uniformity and rheological behavior after production ⁽⁶⁾⁽⁷⁾. It allows for the detection of possible instabilities affecting the formulation during the storage period; thus, contributing to the estimation of the expiry date ⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

The sensory analysis is important as consumer acceptance can significantly influence product choice since product quality is directly related to the way it is physiologically perceived, and the sense of well-being produced during and after its application ⁽¹¹⁾. However, considering that sensory evaluation is subjective, an objective efficacy evaluation of a formulation in real conditions of use is essential i.e. on human skin by non-invasive techniques. This is in addition to the clinical observations. According to the work being performed using these techniques, the greater the number of parameters involved, the more conclusive the results since they complement each other ⁽⁵⁾.

Thus, the objective of this work was to evaluate the physical stability and the clinical efficacy of moisturizing cosmetic formulations, based on panthenol, and containing ascorbyl tetraisopalmitate and α -tocopherol acetate.

Introdução

Os hidratantes estão entre as mais importantes classes de produtos cosméticos e de higiene corporal, uma vez que são amplamente utilizados, não só pela a sua acção de prevenção (xeroderma, prevenção e retardamento do envelhecimento prematuro), mas também pela sua utilidade em complementar com terapias dermatológicas, numa grande variedade de desordens da pele ⁽¹⁾.

A adição de diferentes substâncias activas em formulações cosméticas (por exemplo, vitaminas e seus derivados) têm sido bastante frequente. A vitamina E, por exemplo, para além de ser um potente neutralizador de radicais livres, tem também propriedades humectantes ⁽²⁾. Além da vitamina E, o pantenol e a vitamina C têm alto poder hidratante. Estes princípios activos e outros extractos de plantas com propriedades antioxidantes e protectoras têm sido amplamente utilizados na indústria de cosméticos ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾.

Considerando a combinação dos ingredientes utilizados em formulações cosméticas e respectivas funções, durante estudos de I & D de produtos, é essencial considerar, entre outros fatores, a estabilidade do produto, e uma vez desenvolvidos, as suas características sensoriais e a eficácia em condições reais de utilização.

Em termos de avaliação de estabilidade, estabilidade física é definida como a capacidade dos cosméticos "para manter as suas características físicas, tais como a cor, odor, consistência, uniformidade e comportamento reológico após a produção ⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Permite a detecção de possíveis instabilidades que afectam a formulação durante o período de armazenagem, e assim, contribuir para a estimativa do prazo de validade ⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

A análise sensorial é importante, pois a aceitação do consumidor pode influenciar significativamente a escolha do produto uma vez que a qualidade do produto está diretamente relacionada com a sua percepção fisiológica, e a sensação de bem-estar produzida durante e depois da aplicação ⁽¹¹⁾. No entanto, considerando que a avaliação sensorial é subjectiva, juntamente com as observações clínicas, uma avaliação da eficácia de uma formulação deve ter como objectivo ser testada em condições de utilização reais, isto é, na pele humana por técnicas não invasivas. De acordo com o trabalho a ser realizado utilizando estas técnicas, quanto maior o número de parâmetros envolvidos, mais conclusivos serão os resultados, uma vez que estes se complementam ⁽⁵⁾.

Assim, o objectivo do presente trabalho foi o de avaliar a estabilidade física e a eficácia clínica da hidratação de formulações cosméticas, com base em pantenol, e contendo ascorbil tetraisopalmitato e α -tocoferol.

Material and Methods

Formulations studied

The gel-cream, a low oil emulsion stabilized by a hydrophilic polymer, containing 1.0% of panthenol (FA) was prepared using an acrylate polymer with active carboxyl groups propylene glycol, polyglyceryl-10 myristate, triethylhexanoin, diphenyl dimethicone, glycerin, methyl dibromo glutaronitrile and phenoxyethanol and a solution of sodium hydroxide for neutralization up to pH 5.5 - 6.0, plus distilled and deionized water. This formulation was supplemented with 2.0 % of α -tocopherol acetate (FB), 1.0% of ascorbyl tetraisopalmitate (FC) or both (FBC).

Preliminary Stability Tests

The formulations FA, FB, FC and FBC were subjected to preliminary stability tests by centrifugation, pH determination, and visual evaluation of the organoleptic characteristics for 28 days. The formulations were kept at room temperature and subjected to heat stress at 45°C, in thermostated greenhouses with controlled humidity and photoperiod, model 111FC (Electrolab). The readings were performed at 7, 14, and 28 day intervals.

Physical Stability Analysis to Determine the Rheological Behavior

For the physical stability study, the formulations FA and FBC were kept at room temperature, and subjected to heat stress at 37°C and 45°C in thermostated greenhouses with controlled humidity and photoperiod over a period of 21 days. Next, 0.5 grams of the formulations were collected at 7 intervals in 7 days, over a period of 21 days and they were subjected to the rheological behavior determination in a Brookfield Cone and Plate DV-III digital rheometer, using CP 52 spindle, via rheograms interpretations, and flow index⁽¹⁰⁾.

Clinical Study

After approval from the Institutional Ethics Commission (CEP/FCFRP protocol n° 143/2008), a total of 25 healthy female subjects were selected after informed written consent. Previously defined selection criteria included age, 20–59 (31.52 ± 10.9) years old and skin types, II to IV according to the Fitzpatrick scale. The study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and respective amendments. Volunteers had to fulfill the following non-inclusion criteria - pregnancy or

Materiais e Métodos

Formulações estudadas

O gel-creme, uma emulsão com reduzido conteúdo em óleo, estabilizada por um polímero hidrofílico, contendo 1,0% de pantenol (FA), foi preparado usando um polímero de acrilato com grupos carboxilo propilenoglicol activo, poligliceril-10, miristato de triethylhexanoin, dimeticona difenilo, glicerina, glutaronitrile metildibromo e fenoxietanol e uma solução de hidróxido de sódio para neutralização até pH 5,5-6,0, mais água destilada e desionizada. Esta formulação foi suplementada com 2,0% de α -tocoferol (FB), 1,0% de ascorbil tetraisopalmitato (FC) ou ambos (FBC).

Testes preliminares de estabilidade

As formulações, FA, FB, FC e FBC foram submetidas a testes de estabilidade preliminar por meio de centrifugação, a determinação do pH, e a avaliação visual das características organolépticas, durante 28 dias. As formulações foram mantidas à temperatura ambiente, e submetidas a stress térmico a 45 °C, regulados por termóstato em estufas com controle de fotoperíodo e da humidade modelo 111FC (Electrolab). As leituras foram realizadas aos 7, 14, e 28 dias.

Análise de estabilidade física para determinar o comportamento reológico

Para o estudo de estabilidade física, as formulações FA e FBC foram mantidas à temperatura ambiente, e submetidas a stress térmico entre 37 °C e 45 °C regulados por termóstato em estufas com humidade fotoperíodo controlados, durante 21 dias. Em seguida, 0,5 gramas das formulações foram colectadas em intervalos de 7 em 7 dias, durante 21 dias, e foram sujeitos a determinação do comportamento reológico no aparelho Cone Brookfield DV-III reómetro de placa digital, utilizando o eixo CP 52, obtendo-se assim os respectivos reogramas e índice de fluxo⁽¹⁰⁾.

Estudo Clínico

Após a aprovação pela Comissão de Ética Institucional (CEP / FCFRP protocolo n° 143/2008), um total de 25 mulheres saudáveis com idades entre os 20-59 (média 31,52 + 10,9) anos de idade, foram selecionados seguindo critérios de inclusão previamente definidos, pertencentes aos fototipos II a IV (Fitzpatrick), após consentimento informado. O estudo foi conduzido de acordo com os princípios enunciados na Declaração de Helsinquia e respectivas emendas. Os voluntários tinham de cumprir os seguintes critérios de não-

lactation, history of previous adverse reactions to cosmetics, use of drugs likely to produce abnormal cutaneous response, localized or generalized dermatological diseases, and excess hair in areas under study.

Twenty minutes after acclimation in a controlled temperature (21–22 °C) with relative humidity (45–55%), objective measurements using non-invasive techniques were performed before application and then 3 hours after the formulations FA and FBC had been applied on the volunteers' face. 50µl of the formulations were applied in an area of 25cm² in the malar region, randomly, on the left and right side of the face of the volunteers.

Sensory Evaluation

Following application of the formulations, volunteers received a sensory evaluation quiz to be scored according to the following quality parameters: immediate sensation to touch, feel of the skin after 5 minutes, spreadability, smoothness, skin firmness, and purchase intent. The score was graded as: 1 – Bad; 2 – Regular; 3 – Good; 4 – Very good; for all the parameters above⁽¹²⁾.

Efficacy Evaluation using biophysical and skin imaging techniques

The volunteers' skin was initially characterized with the use of two pieces of equipment - the *Sebumeter SM 810*, which measures the skin's lipid casual content (µg /cm²) using the photometric method; and the *PH 900 Skin pH meter* which directly measures the skin's pH, both from Courage Khazaka, Electronic GmbH, Germany. For the clinical efficacy analysis, before application and 3 hours after the formulations were applied, measurements were taken for the water content of the stratum corneum. This was done using a *Corneometer® CM 825* (Courage Khazaka, Electronic GmbH, Germany), which is based on capacitance measurement of a dielectric medium and is expressed in arbitrary units (UA's). The transepidermal water loss (TEWL) measurement was carried out with a *Tewameter® TM 210* (Courage Khazaka, Electronic GmbH, Germany), which measures the percentage relative humidity at the skin surface. It uses a sensing electrode encased in a chimney, based on the principles described by Adolf Fick 1885. The values are registered in g/m².h. The skin microrelief was determined using a *Visioscan® VC 98* (Courage Khazaka, Electronic GmbH, Germany), which qualitatively and quantitatively evaluates the skin's characteristics such as wrinkle depth (Rt), using optical profilometry with a UVA-light video camera. The measurements of the stratum corneum water content

inclusão - gravidez ou lactação, história de anteriores reações adversas aos cosméticos, uso de medicamentos susceptíveis de produzir resposta cutânea anormal, localizada ou generalizada doenças dermatológicas, e excesso de pêlos nas áreas sob estudo.

Vinte minutos depois da aclimação a temperatura (21-22 °C) e humidade relativa (45-55%) controladas, foram realizadas medições objetivas, usando técnicas não invasivas antes e após 3 horas de uma única aplicação das formulações FA e FBC no rosto dos voluntários. Foram aplicados 50 µl das formulações na região malar (área de 25 cm²), aleatoriamente no lado esquerdo e direito da face dos voluntários.

Avaliação sensorial

Após a aplicação das formulações, os voluntários receberam um questionário de avaliação sensorial para ser pontuados de acordo com os seguintes parâmetros de qualidade: sensação imediata de toque, sensação na pele após 5 minutos, espalhabilidade, suavidade, firmeza da pele, e intenção de compra. A pontuação foi classificada como: 1 - Mau, 2 - Regular; 3 - Bom, 4 - Muito bom, para todos os parâmetros acima⁽¹²⁾.

Avaliação da eficácia utilizando técnicas biofísicas e de imagem da pele

Para a análise de eficácia clínica, antes e depois de 3 horas após a aplicação das formulações, a pele dos voluntários foi caracterizada com a utilização de dois equipamentos - o *Sebumeter SM 810*, que mede o teor de lípidos da pele (µg / cm²) utilizando o método fotométrico, e o *PH900 potenciómetro* que mede directamente o pH da pele, da Courage Khazaka, Electronic GmbH, Alemanha.. As medições para o conteúdo de água do estrato córneo, foram realizadas usando *Corneometer CM® 825* (Courage Khazaka, Electronic GmbH, Alemanha), que se baseia na medição de capacitância de um meio dieléctrico, expresso em unidades arbitrárias (UA). A perda de água transepidermica medição (TEWL) foi calculada através do *Tewameter® TM 210* (Coragem Khazaka, Electronic GmbH, Alemanha), que mede a percentagem relativa de humidade na superfície da pele, utilizando um eléctrodo sensor encerrado numa câmara aberta, com base nos princípios descritos por Adolf Fick em 1885, sendo os valores registados em g / m². h. O microrrelevo da pele foi determinado utilizando o *Visioscan® VC 98* (Coragem Khazaka, Electronic GmbH, Alemanha), um sistema de perfilometria óptica com câmara de vídeo e luz UVA, que avalia qualitativa e quantitativamente características topográficas da pele, como a profundidade das rugas (Rt). As medições do teor de

were taken below the eyes, the transepidermal water loss in the region adjacent to the nose and the skin microrelief in the lateral region of the face. The experimental data from the formulations' effects on human skin after application were analyzed using the Friedman nonparametric for normal distribution and the Friedman parametric analysis of variance test for the sensory evaluation. Further analysis was carried out using the Tukey test. The above tests were performed using statistical software (GMC, Brazil), developed by Maia Campos (2002). Differences were accepted as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Preliminary Stability Tests

All formulations were subjected to centrifugation, 24 hours after preparation, and none presented phase separation.

Following the centrifugation test, formulations were subjected to room temperature and to heat stress at 45°C for 28 days. Samples were collected at 7, 14 and 28 days intervals, and solubilized at 10% with distilled water for the pH measurements. All formulations were relatively stable as there were no significant changes in pH which was maintained at between 5.42 and 5.65, an ideal range for the formulations.

During the 28-day period both the formulations which were maintained at room temperature and at 45°C, were visually examined and showed adequate stability for all parameters - odor, color, phase separation, and homogeneity.

Physical Stability Analysis to Determine the Rheological Behavior

The rheological behavior was determined by analyzing the rheograms (Figures 1, 2 and 3), and the flow index (Figure 4).

The rheograms analysis (Figures 1, 2 and 3) shows that FA and FBC formulations exhibited low rheogram variations when submitted to room temperature and to heat stress at 37°C, and 45°C over 21 days, suggesting good physical stability.

Regarding the flow index analysis (Figure 4), all formulations presented values below 1.0. Therefore, they have proven to have pseudoplastic characteristics, which is of real interest for the cosmetic formulations.

Thus, with the combined analysis of all rheological parameters, it can be concluded that the FA and FBC formulations showed physical stability⁽¹³⁾ and therefore, were selected for the clinical studies.

água do estrato córneo foram efectuadas na região periocular, a perda de água transepidermica, na região adjacente ao nariz e, o microrrelevo na região lateral da face. Os dados dos efeitos das formulações na pele humana após a aplicação, foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Friedman, para avaliação da normalidade da amostra e a análise de variância para a avaliação sensorial, seguida pelo teste suplementar de Tukey. Os testes acima foram realizados utilizando o software estatístico (GMC, Brasil), desenvolvido por Maia Campos (2002). As diferenças foram aceites como estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Testes preliminares de estabilidade

Todas as formulações foram submetidas a centrifugação, 24 horas após a preparação, e nenhuma apresentou separação de fases.

Após o teste de centrifugação, as formulações foram submetidas à temperatura ambiente e ao stress térmico a 45 ° C durante 28 dias. As amostras foram recolhidas com 7, 14 e 28 dias de intervalo, e solubilizadas (10%) em água destilada, para as medições de pH. Todas as formulações foram relativamente estáveis, uma vez que não houve alterações significativas no pH, que era mantido entre 5,42 e 5,65, uma gama ideal para as formulações.

Durante o período de 28 dias, ambas as formulações, mantidas à temperatura ambiente e a 45 ° C, foram examinados visualmente mostrando uma estabilidade adequada para todos os parâmetros - odor, cor, separação de fases, e a homogeneidade.

Análise de estabilidade física para determinar o comportamento reológico

O comportamento reológico foi determinado através da análise dos reogramas (Figuras 1, 2 e 3), e do índice de escoamento (Figura 4).

A análise dos reogramas (Figuras 1, 2 e 3) mostra que as formulações FA e FBC exibiram reogramas com ligeiras variações quando submetido à temperatura ambiente e ao stress térmico a 37 ° C e a 45 ° C, nos 21 dias, sugerindo que boa estabilidade física. No que diz respeito à análise do índice de escoamento (Figura 4), todas as formulações apresentaram valores abaixo de 1,0. A existência de características pseudoplásticas foi assim, demonstrada, o que é de grande interesse para as formulações cosméticas. A análise combinada de todos os parâmetros reológicos, permite concluir que as formulações FA e FBC mostraram estabilidade física (13) sendo, portanto, as seleccionadas para estudo clínico.

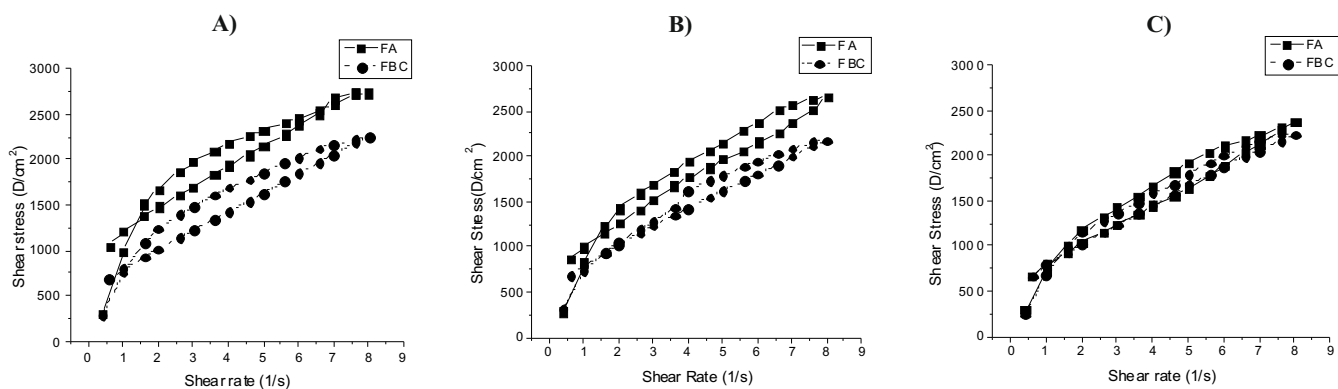


Figure 1 - Rheograms of formulations FA and FBC, when stored at room temperature, for 0, 7, and 21 days (A, B and C, respectively).

Figura 1- Reogramas das formulações FA e FBC, quando armazenados à temperatura ambiente, durante 0, 7, e 21 dias (A, B e C, respectivamente).

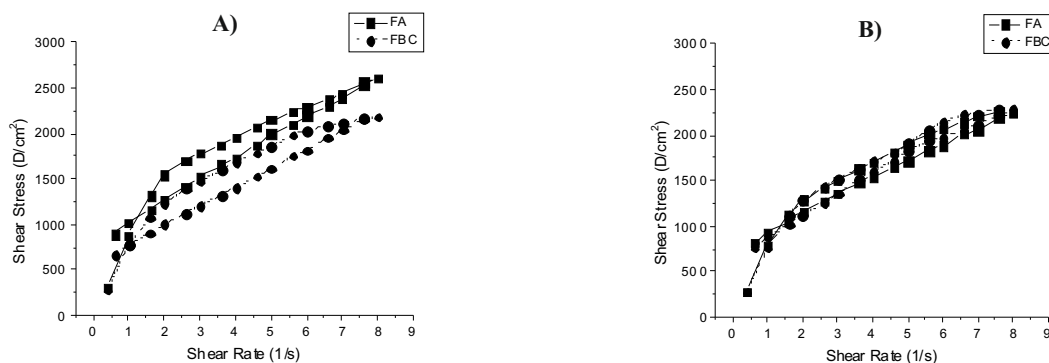


Figure 2 - Rheograms of formulations FA and FBC, when stored at 37°C temperature, for 0, 7, and 21 days (A and B, respectively).

Figura 2 - Reogramas das formulações FA e FBC, quando armazenado a 37 ° C de temperatura, durante 0, 7, e 21 dias (A e B, Respectivamente).

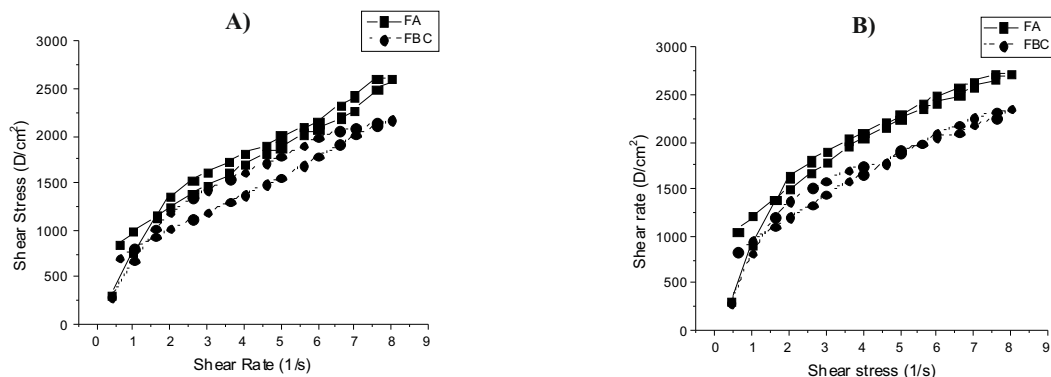


Figure 3 - Rheograms of formulations FA and FBC, when stored at 45°C temperature, for 0, 7, and 21 days (A and B, respectively).

Figura 3 - Reogramas das formulações FA e FBC, quando armazenado a 45 ° C de temperatura, durante 0, 7, e 21 dias (A e B, Respectivamente).

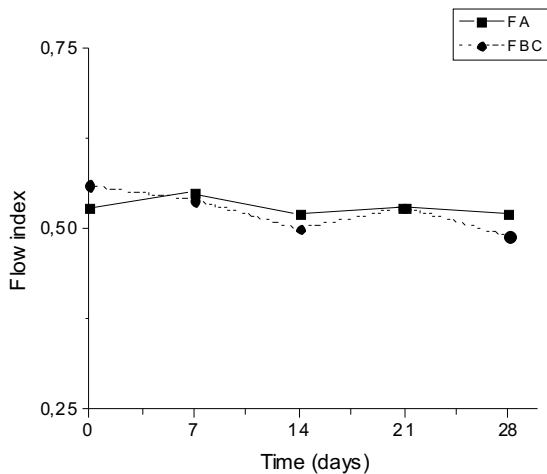


Figure 4 - Flow index values of the FA and FBC formulations in the initial time, and after 7, 14, 21, and 28 days of room temperature storage.

Figura 4 - Valores de índice de fluxo das formulações FA e FBC no tempo inicial, e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Sensory Evaluation

The FBC formulation obtained the highest rank in the sensory analysis compared to the FA formulation. However, only "smoothness" was statistically significant, with a 5% significance level for the one-tailed test (Figure 5). Moreover, the FBC formulation demonstrated 20% higher preferability regarding the purchase intent, compared to the FA formulation, as shown in Figure 6.

Avaliação sensorial

A formulação FBC obteve a classificação mais alta na análise sensorial em relação à formulação FA. Contudo, apenas o item "suavidade" foi estatisticamente significativo, com um nível de significância de 5% para o teste uni-cauda (Figura 5). Além disso, a formulação FBC demonstrou uma preferência em relação à intenção de compra superior a 20%, quando comparado com a formulação FA, como se verifica na Figura 6.

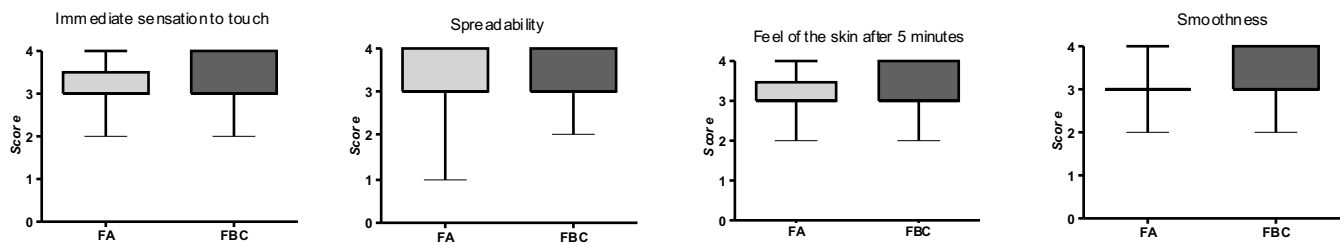


Figure 5 - Sensory evaluation of the FA and FBC formulations.

Figura 5 - Avaliação sensorial da FA e formulações FBC.

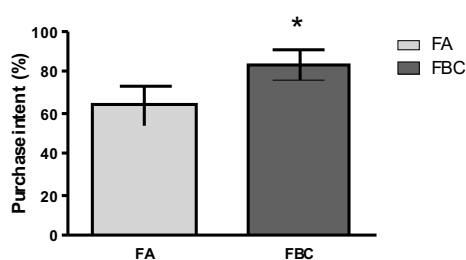


Figure 6 - Purchase intent for the FA and FBC formulations. * significantly different from formulation FA ($p < 0.05$).

Figura 6 - Intenção de compra para a FA e formulações FBC. * Significativamente diferente da formulação FA ($p < 0,05$).

Efficacy Evaluation using biophysical and skin imaging techniques

During the first stage of the study, volunteers were characterized by a *Sebumeter SM 810*. The normal skin casual sebum for the population under study have shown an average of 58.21 ± 19.79 ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$). The huge variation in this data results from inter-individual differences. Therefore, when considering the values individually, four volunteers had values well above the average, and one was well below. However, when considering the parameters analyzed afterwards, there were not many differences, thus, suggesting an individual skin characteristic, without compromising the hydrolipidic balance⁽¹⁴⁾.

Conversely, the average skin pH of the volunteers was equal to 5.03 ± 0.60 , which is within the normal pH range (between acidic and neutral), with a small variation range, thus reaffirming that the population under study has normal skin type.

The stratum corneum water content results (Figure 7A) demonstrated a significant increase after 3 hours of application of both formulations, when compared to the baseline. However, when comparing the formulations FA and FBC after 3 hours of application, there were no statistically significant differences. This suggests that the formulation containing vitamins does not necessarily increase the stratum corneum aqueous content, which may be caused by the use of panthenol⁽¹⁵⁾. However, when we analyze the TEWL (Figure 7B), a decreasing trend was observed after 3 hours of application of both formulations which suggests that they have a positive effect on skin barrier function. However these differences were not statistically significant.

Avaliação da Eficácia usando técnicas de imagem biofísicas e da pele

Durante a primeira fase do estudo, os voluntários foram caracterizados por um *Sebumeter SM 810*. O sebo casual normal para a população em estudo apresentou uma média de $58,21 \pm 19,79$ (mg / cm^2). A grande variação registrada é um resultado das diferenças inter-individuais. Considerando os valores individualmente, encontramos quatro voluntários com valores bem acima da média, e um abaixo da média. No entanto, tendo em consideração os restantes parâmetros analisados, não encontramos muitas diferenças, sugerindo uma característica da pele individual, sem comprometer o equilíbrio hidrolipídico⁽¹⁴⁾.

Por seu lado, o pH da pele média dos voluntários foi igual a $5,03 \pm 0,60$, a qual está dentro do intervalo de pH normal (entre ácido e neutro), com um pequeno intervalo de variação, o que confirma que a população em estudo tem um tipo de pele normal.

Os resultados do conteúdo de água do estrato córneo (Figura 7A), demonstraram um aumento significativo após 3 horas de aplicação de ambas as formulações, quando comparados com os valores basais. No entanto, ao fim de 3 horas, não encontramos a mesma situação comparando FA e FBC, uma vez que aqui não encontramos diferenças estatisticamente significativas. Isto sugere que a formulação que contém vitaminas não aumenta necessariamente o conteúdo aquoso do stratum corneum, e que tal pode ser atribuído ao pantenol⁽¹⁵⁾. No entanto, quando se analisa a TEWL (Figura 7B), observamos uma tendência para a diminuição, ao fim das 3 horas após a aplicação de ambas as formulações, o que sugere um efeito positivo sobre a função de barreira para ambas as formulações. Contudo, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

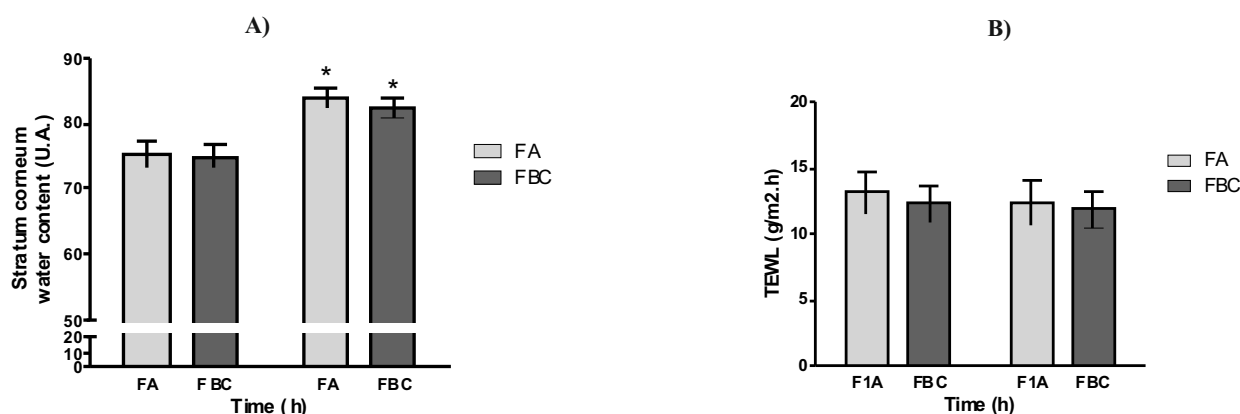
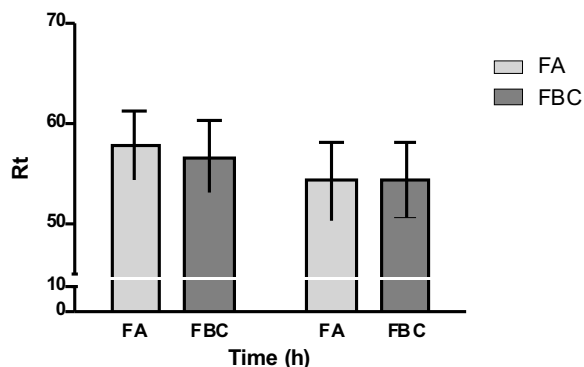


Figure 7 - (A) Stratum corneum aqueous content, and **(B)** transepidermal water loss (TEWL) from the volunteers' faces, 3 hours before and after applying the formulations. * significantly different from baseline values ($p < 0.05$).

Figura 7 - (A) teor aquoso do Stratum corneum, e **(B)** perda de água transepidérmica (TEWL) da face dos voluntários, 3 horas antes e após a aplicação das formulações. * Significativamente diferente dos valores basais ($p < 0,05$).

The "Rt" parameter (Figure 8), which indicates the skin's roughness, since it is related to wrinkle depth, was used to analyze the skin's microrelief. A decrease in the Rt values (although not significant) was observed 3 hours after both formulations were applied. This signals a slight reduction in wrinkle depth at the study's site, thus, suggesting an improvement in both the skin texture, and its smoothness.



Relativamente à análise do microrrelevo da pele, através do parâmetro "Rt" (Figura 8), um indicador da irregularidade da pele, uma vez que está relacionada com a profundidade de rugas, observou-se também uma tendência para a diminuição de Rt, embora não de forma significativa, 3 horas após a aplicação de ambas as formulações, sugerindo uma ligeira redução na profundidade das rugas no local do estudo, e portanto, uma melhoria da textura e da suavidade da pele.

Figure 8 - Rt values related to the wrinkles depth in a pre-determined region of the volunteers' face 3 hours before (left bars) and after (right bars) applying the formulations.

Figura 8 - valores de Rt relacionados com a profundidade de rugas de uma determinada região da face dos voluntários 3 horas antes (barras da esquerda) e depois (barras à direita) da aplicação das formulações.

Conclusions

Stability studies indicate that the formulations under observation have shown an acceptable level of stability according to the physical aspects considered which are very important in the development of topical formulations. The formulation containing panthenol, vitamin C and vitamin E derivatives was preferred in the sensory evaluation in terms of purchase intent and smoothness, and, in general, obtained higher scores related to the other sensory parameters compared to the formulation containing only panthenol.

In the clinical efficacy studies, both formulations significantly improved skin hydration and reduced transepidermal water loss by protecting the skin barrier function. In addition, they also demonstrated improvement in the skin microrelief, but these results were not statistically significant.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no financial or personal relationship that can be understood as representing a potential conflict of interest.

Conclusões

Os estudos de estabilidade mostraram que as formulações estudadas evidenciaram uma estabilidade aceitável de acordo com os aspectos físicos que são considerados cruciais para o desenvolvimento de formulações tópicas. A formulação contendo pantenol, vitamina C e derivados de vitamina E foi preferida na avaliação sensorial em termos de intenção de compra e suavidade, e, em geral, obteve avaliações mais elevadas para os outros parâmetros sensoriais, quando comparada com a formulação contendo apenas pantenol.

Nos estudos de eficácia clínica, ambas as formulações melhoraram significativamente a hidratação da pele e reduziram a perda de água transepidermica, protegendo a função de barreira da pele, evidenciando também uma melhoria do microrrelevo da pele, embora estes resultados não tenham sido estatisticamente significativos.

Conflito de Interesses

Os autores declaram a inexistência de qualquer tipo de relação financeira ou pessoal que possa representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- [1]. Rodrigues L, Pinto P, Silva N, Galego N, Quaresma P, Fitas M, Pereira LM. Caracterização da eficácia biológica de hidratantes por análise dinâmica do conteúdo hídrico epidérmico e profilometria de transmissão luminosa. *Cosm. Toil.* 1997; 9(2):44-9.
- [2]. Pugliese, PT. Antioxidantes, envelhecimento e a pele. *Rev Cosmiatr Med Est* 1998; 6(1):25-7.
- [3]. Idson, B. Vitamins and skin. *Cosm. Toil.* 1993; 108(2):79-94.
- [4]. Dal'Belo SE, Gaspar L R, Maia Campos P M B G. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Res. Technol.* 2006; v.12; 241-246.
- [5]. Maia Campos P M B G, Gonçalves G M S, Gaspar L R. In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy of topical formulations containing vitamin C and its derivatives studied by non-invasive methods. *Skin Res Technol.* 2008; v. 14; 376-380.
- [6]. Leonardi G R, Maia Campos P M B G. Estabilidade de Formulações Cosméticas. *Inter. J. Pharma. Compounding.* Editora Brasileira 2001; v.3, n.4, jul/ago; 154-156.
- [7]. Leonardi G R. *Cosmetologia Aplicada.* 1st ed. Medfama; 2004; 92-93.
- [8]. Martín A, Bustamante P, Chun A H C., A. H. C. Rheology. In: Martín A, Bustamante P, Chun A H C. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger. *Physical Pharmacy*; 1993, cap.17, p.453-473.
- [9]. Brummer R, Godersky S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. *Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp* 1999; 152:89-94.
- [10]. Gaspar L R, Maia Campos P M B G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *Inter. J. Pharma, Amsterdam* 2003; v.250, n.1; 35-44.
- [11]. Tachinardi F, Sá Dias T C, Picirili C A D, Gomes A L, Aruda R. Avaliação sensorial de produtos cosméticos em pele no. In: XVII COLAMIQ, Cusco 2005, in: Cusco CD-ROM.
- [12]. Anconi GL, Dal'Belo SE, Silva MM, Camargo FB Jr, Maia Campos PMBG. Evaluation of sensorial effects of gels containing L-Fucose and L-Rhamnose and its stability when associated or not with dimethylaminoethanol (DMAE), wheat protein or kinetic in liposomes. In: 1º SINPOSPq, Ribeirão Preto, 2004, in: Ribeirão Preto CD-ROM.
- [13]. Gianeti MD, Gaspar LR, Camargo FB Jr, Maia Campos PMBG. Benefits of combinations of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetic formulations. *Molecules.* 2012; v.17, n.2; 2219-30.
- [14]. Mercurio DG, Segura JH, Demets MBA ; Maia Campos PMBG. Clinical scoring and instrumental analysis to evaluate skin types. *Clinical and Experimental Dermatology* (in press).
- [15]. Camargo FB Jr, Gaspar LR, Maia Campos PMBG. Skin moisturizing effects of panthenol-based formulations. *J Cosmet Sci.* 2011; v. 62, n.4; 361-70.