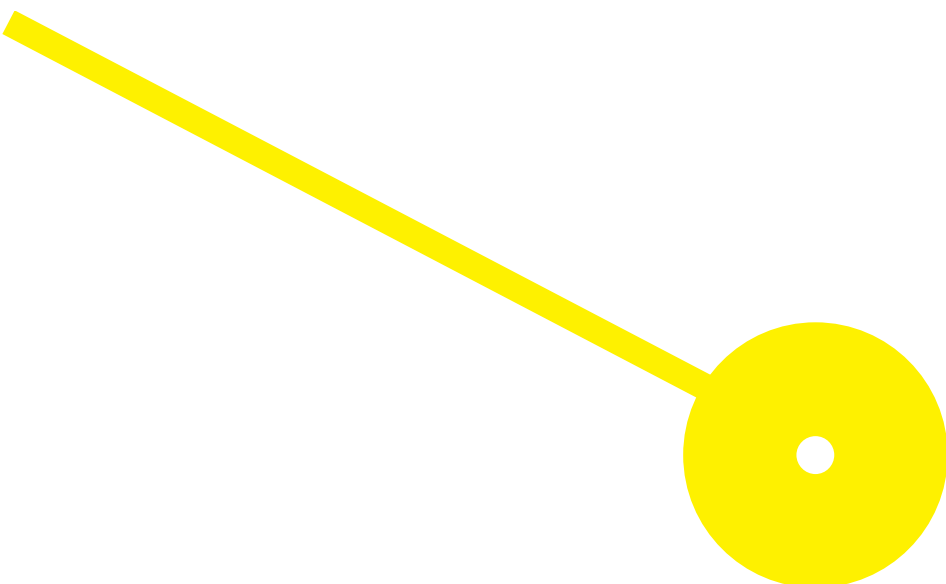




Avaliação de um ingrediente cosmético na proteção química da pele contra poluição

Cândida Cristine Kringel

09/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Avaliação de um ingrediente cosmético na proteção química da pele contra poluição

Autor

Cândida Cristine Kringel

Orientador(es)

Mestre/Marta Monteiro/ Diretora de Estudos - Inovapotek

Professora Coordenadora/Mónica Almeida Vieira/ESS-IPP

Relatório de Estágio apresentada(o) para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo/Área de Especialização em Bioquímica Clínica e Metabólica pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a empresa inovapotek, por aceitar meu estágio de conclusão de mestrado e a toda equipa pelo acolhimento, responsabilidades, auxílio nos ensaios clínicos, incentivo e aprendizado. Em especial a elas que estiveram mais envolvidas no âmbito do meu estágio, minha Orientadora Marta Monteiro por todo apoio, incentivo, paciência e dedicação comigo, e também a Investigadora Juliana Moura Marinho pela confiança na execução de um estudo clínico sob sua orientação, pela sua dedicação e ensinamentos. Ao fim do meu estágio sinto que estou melhor preparada para o mercado de trabalho, com muito conhecimento e crescimento pessoal.

A seguir, agradeço ao meu esposo que sempre esteve do meu lado, a me incentivar e apoiar a concluir esse objetivo.

Também quero agradecer aos meus professores, orientadores da Escola Superior de Saúde, em especial ao profº Ricardo Ferraz e a profº Mónica Vieira pelo apoio, incentivo durante o mestrado e aos meus colegas pelo acolhimento.

Resumo

Para garantir a segurança do consumidor, está em vigor na Europa o Regulamento que estabelece as especificações concretas que os produtos cosméticos devem cumprir (Regulamento (CE) nº 1223/2009) e as suas alegações devem ser objetivas e claras (Regulamento (UE) nº 655/2013).

Os produtos cosméticos estão cada vez mais presentes no nosso dia a dia e a indústria cosmética vem crescendo cada vez mais, seja em quantidade de produtos disponíveis no mercado, seja em inovação no seu desenvolvimento.

Este relatório descreve, o estágio realizado na inovapotek Pharmaceutical Research & Development para conclusão do meu mestrado na Escola Superior de Saúde (ESS), onde detalho o desenvolvimento de um estudo clínico que tem como objetivo avaliar a eficácia de um ingrediente cosmético na proteção química da pele contra a poluição no Departamento de Ensaio de Eficácia e Segurança e também sugestões de melhoria ao equipamento utilizado para o estudo.

Palavras-chave: Produtos cosméticos; equipamento; ensaios; alegações; segurança

Abstract

To ensure consumer safety, a Regulation that establishes the concrete specifications that cosmetic products must comply with (Regulation (EC) No. 1223/2009) is in force in Europe and their claims must be objective and clear (Regulation (EU) No. 655/2013).

Cosmetic products are increasingly present in our daily lives and the cosmetic industry is growing more and more, whether in the number of products available on the market or in the innovation on their development.

This report describes the internship carried out at inovapotek Pharmaceutical Research & Development to complete my master's degree at Higher School of Health (ESS), where I detail the development of a clinical study that aims to evaluate the effectiveness of a cosmetic ingredient in the chemical protection of skin against pollution in the Efficacy and Safety Testing Department and also suggestions for improving the equipment used for the study.

Keywords: Cosmetic products; equipment; testing; allegations; safety

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Princípios de um estudo clínico.....	3
1.2.	Partes envolvidas em um estudo clínico.....	3
1.2.1.	Promotor	4
1.2.2.	Investigador	4
1.2.3.	Conselho de Revisão Institucional/Comité de Ética Independente (IRB/IEC)	5
1.2.4.	Monitor	5
1.2.5.	Participante.....	6
1.2.6.	Documentação.....	6
1.3.	A empresa inovapotek.....	7
1.4.	Avaliação de um ingrediente cosmético na proteção química da pele contra a poluição..	10
2.	Métodos.....	11
2.1.	Aplicação dos produtos.....	12
2.2.	Exposição ao fumo do tabaco.....	13
2.3.	Recolha do material biológico.....	15
3.	Resultados.....	15
3.1.	Quantificação da enzima	16
4.	Discussão.....	18
5.	Conclusão.....	18
	Referências Bibliográficas.....	19
	Anexos.....	21

Abreviaturas

BPC	Boas Práticas Clínicas
CEIC	Comissão Nacional de Ética para Investigação Clínica
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
ICH	Conselho Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos dos Medicamentos para Uso Humano
CRO	Organização de Pesquisa Contratada
SOPs	Procedimentos Operacionais Padrão
PIF	Ficheiro de Informações do Produto
ICF	Formulário de Consentimento Informado
IRB/IEC	Conselho de Revisão Institucional/Comité de Ética Independente
TMF	<i>Trial Master File</i>
SP	Plano de Estudo
CIP	Plano de Investigação Clínica
TRR	Ficheiro de Registro de Recrutamento Telefónico
CRF	Ficha de Relatório de Caso
CIR	Ministério Francês de Ensino Superior de Pesquisa
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
SGQ/SI	Sistema de Gestão da Qualidade e Segurança da Informação
BDM	Desenvolvimento de Negócios e Marketing
DAF	Departamento Administrativo e Financeiro
EES	Estudos de Eficácia e Segurança
FCQ/AR	Departamento de Formulação, Controlo de Qualidade e Assuntos Regulamentares
MDA	Malondialdeído
GC-MS	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa
SIFIDE	Sistema de Incentivos Fiscais à I&D Empresarial

1. Introdução

De acordo com o Regulamento da Comissão Europeia n.º 655/2013, todas as alegações presentes num produto cosmético devem ser úteis, compreensíveis e fiáveis para os consumidores, uma vez que as alegações certificam de que o produto é adequado às suas necessidades ou expectativas ^[1]. Essas alegações devem estar em conformidade com o Regulamento que estabelece seis critérios comuns para justificação das alegações relativas a produtos cosméticos: conformidade legal, veracidade, suporte probatório, honestidade, justiça e consentimento informado ^[1,2].

As alegações dos produtos cosméticos são normalmente informações diretas, principalmente para fins de marketing, sobre o conteúdo, o efeito, a eficácia, as propriedades ou o tipo de produto. Estas alegações podem ser de diferentes tipos, tais como ^[3]:

a) Alegações de desempenho

No qual a natureza do ensaio deve ser especificamente incluída na fundamentação da alegação; Por exemplo: estudo de eficácia, ensaio com consumidores, ensaio *in vitro/ex vivo*.

b) Alegações relativas aos ingredientes

Portanto, se um produto alegar que existe um ingrediente específico, este deve estar numa concentração superior a 0,001%.

Se uma alegação extrapolar as propriedades de um ingrediente para o produto acabado, deve ser baseada por provas satisfatórias e comprováveis, assim como a garantia do mesmo numa concentração efetiva.

c) Alegações sensoriais

As avaliações do nível relativo de um atributo sensorial numa escala relevante por um painel de peritos formados, deve ser efetuada sem qualquer juízo de valor sobre a atração desse atributo.

d) Alegações relativas à percepção do consumidor

Baseia-se na percepção pessoal dos consumidores de uma característica sensorial ou de desempenho e pode incluir a avaliação da atratividade do produto.

e) Alegações comparativas

Podem ser entre dois produtos, antes e depois da aplicação do produto, através de representações visuais que mostram o desempenho do produto ^[4].

f) Alegações ambientais

Estão relacionadas com o impacto do produto cosmético no meio ambiente.

g) Alegações relacionadas com escolhas de estilo de vida, valores pessoais e crença.

Servem apenas para ajudar o consumidor a fazer uma escolha informada e não implicar qualquer outro benefício para além dos factuais.

h) Afirmações hiperbólicas/exageradas

Este tipo de alegações não deve ser tomadas à letra por nenhum consumidor e não necessitam de qualquer fundamentação.

As alegações devem ser apoiadas por provas fiáveis, relevantes e sólidas, que podem ser baseadas em dados geralmente reconhecidos, em estudos experimentais internos ou externos (como estudos *in vivo*/*ex vivo*/*in vitro* ou avaliações sensoriais) e em avaliações efetuadas pelos consumidores ^[2,3]. Assim, um conjunto de provas pode consistir numa única categoria de provas ou numa combinação de provas de diversas categorias.

A metodologia utilizada deve estar de acordo com o estado atual da arte e deve ser escolhida para sustentar o objetivo do teste ^[2]. Para obter conclusões científicas e estatisticamente válidas, a condição e a análise do estudo clínico devem ter em conta o número de participantes, o número de amostras de teste, o número de medições, etc. A qualidade do estudo clínico é assegurada por um protocolo de estudo validado e por uma monitorização adequada. Quando se escolhe a equipa que irá executar o estudo é preciso garantir que as suas qualificações, experiência técnica e integridade ética sejam adequadas ^[2].

Os estudos experimentais devem basear-se em métodos fiáveis e reprodutíveis para que a metodologia selecionada seja adequada para fundamentar a alegação. Portanto, não existe uma lista de métodos já aprovados para a fundamentação das alegações, uma vez que os métodos estão em constante evolução e criação.

1.1. Princípios de um estudo clínico

Atualmente, em Portugal, todos os estudos clínicos têm de cumprir a Lei da Investigação Clínica n.º 21/2014^[5]. Para cumprir a legislação em vigor, todos os estudos clínicos devem garantir a dignidade humana do participante, onde o estudo é realizado de acordo com as Boas Práticas Clínicas (BPC) e a relação risco-benefício é favorável. Cabe à Comissão Nacional de Ética para a Investigação Clínica (CEIC) e à Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED) decidir se os benefícios superam os riscos e supervisionar a realização do estudo clínico.

Os estudos clínicos são um elemento fundamental da investigação clínica e a principal via para obter provas da segurança e da eficácia de qualquer produto antes da sua aprovação e disponibilização à população em geral^[6].

Todos os estudos clínicos devem se basear num protocolo, que é um documento que detalha os objetivos do estudo, os métodos propostos, a organização e as considerações éticas assegurando a proteção dos participantes e todas as situações possíveis que possam ocorrer durante o estudo^[7].

As BCP são definidas como um código de normas internacionais relativas à conceção, realização, desempenho, monitorização, auditoria, registo, análise e comunicação de estudos clínicos, assegurando simultaneamente os direitos, a integridade e a confidencialidade dos participantes^[8]. A diretriz ICH E6 (R2) de BCP do Conselho Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos dos Medicamentos para Uso Humano (ICH) visa facilitar a aceitação mútua dos dados clínicos pelas autoridades reguladoras nas jurisdições das regiões da ICH, fornecendo normas unificadas^[9].

Em um estudo clínico, se as BPC forem cumpridas, a investigação realizada pode ser classificada como fiável, aceitável e fundamentada, bem como em conformidade com a Declaração de Helsínquia^[7]. A garantia de que todas estas normas estão sendo cumpridas é uma responsabilidade partilhada por todas as partes envolvidas.

1.2. Partes envolvidas em um estudo clínico

Em um estudo clínico, as partes envolvidas, geralmente são o promotor, os investigadores, a organização de pesquisa contratada (CRO) e o comitê de ética.

1.2.1. Promotor

Essa função pode ser desempenhada por uma empresa, uma organização governamental, um investigador e/ou agências não governamentais. As principais responsabilidades de um promotor consistem em implementar um sistema que assegure a qualidade durante todo o estudo clínico, desde o protocolo até à recolha e gestão dos dados. Também é responsável por garantir que os procedimentos operacionais padrão (SOPs) e as BPC estão a ser implementados e que o estudo é realizado de acordo com a regulamentação aplicável^[9].

Deve dispor de um pessoal médico qualificado para prestar aconselhamento sobre o estudo clínico, assim como de uma equipa qualificada para realizar o estudo em todas as fases. Em caso de uma reação adversa, informar as autoridades reguladoras.

Portanto, um promotor é uma única pessoa ou empresa, instituto ou organismo responsável pela conceção, execução, gestão e/ou financiamento de um estudo clínico^[9,10]. Ele notifica as autoridades reguladoras, CEIC e INFARMED, para receber a sua autorização e poder iniciar o estudo, bem como a avaliação do risco-benefício ou quaisquer pedidos obrigatórios. Se as autoridades nacionais questionarem algum objetivo/protocolo do estudo clínico, é de sua total responsabilidade responder.

Garante que a descrição do produto experimental é adequada à fase de desenvolvimento do produto, que está em conformidade com as Boas Práticas de Fabrico (BPF), estando codificado e rotulado para continuar a ser um estudo cego, caso seja aplicável. Também se certifica que existam dados suficientes sobre a segurança do produto experimental para poder realizar o estudo e que estejam disponíveis para apoiar a duração do ensaio, a população do ensaio, a via de exposição e a dosagem. Sendo que esta informação deve ser atualizada na Brochura do Investigador.

Se um estudo for suspenso ou terminado prematuramente, o promotor deve informar todas as partes envolvidas e garantir que os relatórios do estudo clínico serão preparados e fornecidos às agências reguladoras, que devem estar em conformidade com a ICH Guideline for Structure and Content of Clinical Study Reports^[11].

1.2.2. Investigador

Para um estudo clínico ser executado é preciso que o(s) investigador(es) tenham qualificação adequada, em termos de formação académica, experiência e formação prática para assumir as

responsabilidades perante um ensaio em conformidade com as BCP, as obrigações regulamentares aplicáveis e as diretrizes da ICH.

É adicionalmente necessário que o(s) investigador(es) contenham também conhecimento sobre a utilização adequada do produto (que está descrita no protocolo), na brochura do investigador, no ficheiro de informações do produto (PIF) ou qualquer outra informação fornecida pelo promotor.

Tem ainda como dever recrutar o número adequado de participantes, de conduzir corretamente o estudo dentro do período estipulado, bem como assegurar a existência de pessoal qualificado e instalações adequadas para conduzir o estudo de forma correta e segura, assegurando que todos os envolvidos estão bem informados sobre o protocolo, produtos experimentais, assim como os seus deveres e funções.

O(s) investigador(es) têm também que se certificar que todos os participantes assinaram o formulário de consentimento informado (ICF), onde são informados dos seus direitos e deveres, da disponibilidade de assistência clínica (se for necessário) durante toda a duração do estudo clínico e da compensação pelas despesas incorridas durante o estudo. É também responsabilidade do investigador declarar qualquer reação adversa que possa ocorrer durante o estudo e notificá-la. E, se houver a necessidade de suspender o estudo prematuramente, o investigador pode e deve tomar essa decisão.

1.2.3. Conselho de Revisão Institucional/Comité de Ética Independente (IRB/IEC)

O principal dever do IRB/IEC é salvaguardar os direitos, a segurança, o bem-estar e integridade dos participantes de um estudo clínico. Analisar o protocolo clínico, o ICF e qualquer informação escrita fornecida aos participantes, a brochura do investigador, o guião de recrutamento dos participantes, a informação sobre a compensação pelas despesas incorridas fornecida aos participantes, o *curriculum vitae* do investigador e qualquer outro documento que considerem relevantes^[12].

1.2.4. Monitor

Monitoriza e assegura os direitos e o bem-estar dos participantes, verifica se o estudo foi realizado em conformidade com o protocolo, as diretrizes da ICH e a regulamentação exigida^[9]. O monitor é uma pessoa qualificada designada pelo promotor^[10].

1.2.5. Participante

Os participantes têm o direito de avaliar o risco/benefício de participar num estudo clínico, de ver assegurada a sua integridade moral, física e a sua privacidade, de cuidados médicos (se for necessário), bem como o direito de revogar o consentimento. Devem cumprir todos os requisitos de acordo com o estudo clínico a ser desenvolvido, e de acordo com as BPC ^[9].

1.2.6. Documentação

Existem duas categorias de documentos que constituem o *Trial Master File* (TMF): documentos essenciais e documentos de base.

Os documentos essenciais são todos os documentos que permitem avaliar a organização de um estudo clínico e a qualidade dos dados gerados ^[9]. Às autoridades nacionais são apresentados diversos documentos, para que o estudo clínico possa ser validado e para que se possa avaliar se os benefícios superam os riscos. Nesses documentos estão incluídos:

- Acordo de confidencialidade (entre o promotor e a CRO);
- *Curriculum vitae* dos investigadores;
- Plano de estudo (SP) ou o plano de investigação clínica (CIP) em que se descrevem o objetivo, a conceção, os métodos, a análise estatística, a codificação do produto, os critérios de inclusão/exclusão e a organização do estudo;
- Brochura do Investigador, é um documento que resume todas as informações clínicas e não clínicas relevantes sobre o produto a ser estudado;
- ICF, em que o participante confirma que participará voluntariamente no estudo e onde são fornecidas as diretrizes gerais que deve seguir durante o estudo;
- Certificado de seguro;
- Aprovação das autoridades nacionais;
- PIF;
- Codificação de produtos;
- Rotulagem do produto.

Os documentos de base são aqueles obtidos quando há realização do estudo clínico. Nesses documentos estão incluídos:

- Ficheiro de registo de recrutamento telefónico (TRR), onde inclui a lista de todos os participantes inscritos no estudo e a quem foram feitas tentativas de chamadas de triagem telefónica;
- Ficha de relatório de caso (CRF), onde inclui todos os dados recolhidos sobre um participante como: medicação concomitante, questionário geral de saúde, critérios de inclusão/exclusão, procedimentos que ocorreram durante as visitas, registo de deformação do produto e de reações adversas;
- Lista de identificação do participante, onde inclui o nome, data de nascimento, número de identificação de acordo com o ficheiro TRR e o grupo;
- Lista de inscrição do participante, onde inclui o número de identificação e o seu estado no estudo, se falhou a triagem no estudo, se terminou antecipadamente o estudo ou se concluiu o estudo;
- Registo de responsabilidade pelo produto, onde é registado o produto fornecido a cada participante no início do estudo e a sua devolução no final do estudo;
- Dados obtidos no estudo e sua análise.

1.3. A empresa inovapotek

A inovapotek Pharmaceutical Research & Development foi fundada em 2008 por dois pesquisadores do Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. A empresa é uma CRO que fornece Serviços de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), Testes de Eficácia e Consultoria para indústrias de Cuidados Pessoais, Farmacêutica, Dispositivos Médicos e Suplementos Alimentares.

Tem como objetivo ser a vanguarda da pesquisa científica nas áreas da tecnologia cosmética e farmacêutica, promovendo o desenvolvimento de produtos inovadores que atendam as exigências e necessidades dos consumidores. Mantendo os seus valores de ética, compromisso, excelência científica e inovação.

Também tem como dever ajudar as empresas de cosmética a desenvolver novos produtos, preservando a sua estabilidade, segurança, eficácia e conformidade regulamentar. Está presente em todas as etapas da introdução de um produto cosmético no mercado, que vai desde o desenvolvimento de um produto até aos estudos clínicos, que apoiam na sustentação das alegações do produto. Assim como o seu procedimento regulamentar para introduzir um produto novo no mercado. A figura 1 representa o fluxograma da inovapotek.

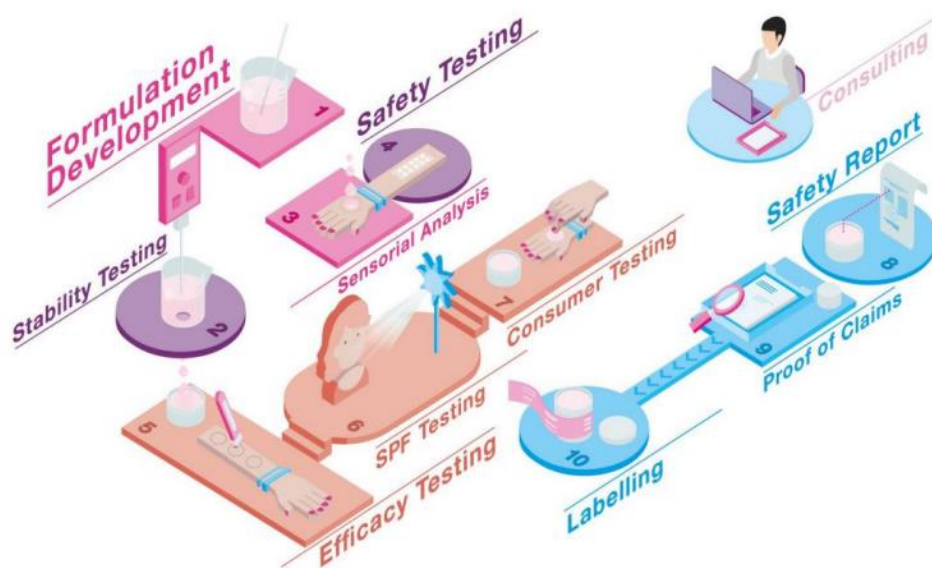


Figura 1: Fluxograma da inovapotek Pharmaceutical Research & Development

A inovapotek é uma spin-off da Universidade do Porto, certificada com as normas ISO 9001 e ISO 27001. Foi também reconhecida pelos Ministérios da Economia, Inovação e Desenvolvimento e da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SIFIDE), bem como pelo Ministério Francês de Ensino Superior e Pesquisa (CIR) como uma identidade adequada para a prestação de serviços de P&D [13].

A sede da inovapotek está localizada no Pólo de Ciência e Tecnologia da UPTEC – Porto, Portugal. Está dividida em dois espaços, um localizado no piso zero e o outro no piso -1. O espaço do piso zero abrange 5 salas onde podem ser realizados os estudos clínicos com os diferentes equipamentos, um open space, um laboratório com todo suporte necessário para desenvolvimento de produtos cosméticos pelo Departamento de Formulação, Controlo de Qualidade e Assuntos Regulamentares (FCQ/AR) e um armazém. A sala situada no piso -1 pode ser utilizada tanto para fins administrativos como para o desenvolvimento de estudos clínicos. A empresa encontra-se dividida nos seguintes departamentos: Departamento de Sistema da Gestão de Qualidade e Segurança da Informação (SGQ/SI), Departamento de Desenvolvimento de Negócios e Marketing (BDM), Departamento Administrativo e Financeiro (DAF) e Departamento Técnico que está dividido em Departamento de Estudos de Eficácia e Segurança (EES) e Departamento de Formulação, Controlo de Qualidade e Assuntos Regulamentares (FQC/AR). A equipa é constituída por 19 pessoas: uma CEO, uma responsável do Departamento da Qualidade, uma Diretora do Departamento BDM, uma Gestora de projetos do Departamento

BDM, uma responsável do Departamento DAF, e cada departamento técnico tem um Diretor de Estudo, investigadoras, bem como assistentes técnicos e assistentes de recrutamento.

A duração do meu estágio foi de 5 meses, onde fiz parte do Departamento de Estudos de Eficácia e Segurança (EES) e me permitiu aprofundar conhecimentos sobre a documentação necessária para realização de um estudo clínico, as diferentes técnicas possíveis, diversos equipamentos que podem ser usadas para um dado estudo e o gerenciamento dos dados obtidos.

Para fundamentar as alegações de um produto cosmético, são utilizados testes com base no tipo de alegação que o cliente fornece. Como já referido, estes testes podem ser *ex vivo* e/ou *in vivo*, aplicando diferentes técnicas e utilizando os equipamentos adequados.

Focando num estudo *in vivo*, depois de o promotor aprovar o respetivo protocolo, de forma a garantir que o mesmo está em conformidade com o que foi adjudicado na proposta do estudo, o próximo passo para o início do mesmo é angariar os participantes necessários. Para isso, os assistentes de recrutamento da inovapotek partilham o estudo com a base de dados de participantes inscritos através do site da inovapotek e do email de recrutamento. Após mostrarem o seu interesse em participar em um determinado estudo, passamos à fase de recrutamento telefónico, chamada triagem. Esta fase é importante para excluir as pessoas que possam ter alguma condição que não seja compatível com o objetivo do estudo ou ainda que possa interferir com os resultados, como uma condição de pele, uma doença ou uma medicação que possa interferir com o objetivo do estudo.

Se o participante preencher todos os requisitos básicos para inclusão no estudo, pode então ser agendada a visita de recrutamento presencial, onde o investigador que está a realizar o estudo, ou alguém designado por este, verifica se o participante cumpre de facto todos os critérios de inclusão e exclusão. Durante a visita de recrutamento, o investigador, ou alguém designado por este, explica todo o procedimento do estudo, como os objetivos, as medições a efetuar, o número de visitas, o que fazer se ocorrer alguma reação adversa, bem como os direitos e deveres do participante. Toda esta informação está descrita no ICF, que é assinado pelo participante caso este aceite e compreenda tudo o que lhe foi explicado. Após o ICF ser assinado pelo participante, é realizado então o preenchimento do CRF, onde são feitas questões gerais de saúde, bem como um levantamento de medicação concomitante e verificação dos critérios de inclusão e exclusão do estudo. Caso o participante cumpra todos os requisitos, pode ser incluído no estudo.

1.4. Avaliação de um ingrediente cosmético na proteção química da pele contra a poluição

O objetivo deste estudo clínico controlado, randomizado e duplamente cego é então avaliar a eficácia de um ingrediente ativo cosmético, incorporado numa concentração de 0,20%(p/p) numa emulsão cosmética na proteção química da pele contra a poluição, onde neste caso será utilizado o fumo do tabaco como representante da poluição. Para a realização deste estudo, foi incluído um grupo de 33 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos e sem alterações cutâneas na região de teste (costas). Foram efetuadas cinco aplicações do produto experimental na respetiva área de teste, seguida da exposição de dois locais da pele (pele tratada com o produto experimental e pele não tratada) ao fumo do tabaco. De forma a avaliar o efeito provocado pelo fumo do tabaco, foram recolhidas amostras da superfície da pele onde foi quantificado um marcador de oxidação lipídica – Malondialdeído (MDA). A hipótese formulada é que o produto experimental apresentaria maior eficácia na proteção da pele contra a poluição quando comparado com a área exposta não tratada. Ou seja, seria expectável que ocorresse um aumento da concentração de MDA nos locais expostos ao fumo do tabaco, mas um aumento menor no local da pele tratada com a emulsão cosmética.

A conceção e a fundamentação desta investigação clínica se baseiam na revisão bibliográfica sobre os ingredientes ativos do produto experimental, informações fornecidas pelo promotor e metodologias semelhantes realizada anteriormente. O promotor declarou que o produto experimental está em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 relativo aos produtos cosméticos e do ponto de vista toxicológico, tem uma boa tolerância, não existindo qualquer indicação de que possa causar algum acontecimento adverso nas condições do estudo. O sistema antioxidante da pele consiste em uma rede de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entre os antioxidantes enzimáticos está a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e o superóxido dismutase (SOD) que desempenham um papel fundamental. Os antioxidantes não enzimáticos presentes nas células são α -tocoferol, ubiquinona, β -caroteno, ascorbato e glutathione. Entre os antioxidantes endógenos estão o α -tocoferol e o β -caroteno que se concentram nas membranas celulares e funcionam *in vivo* como protetores contra a peroxidação lipídica, interagindo preferencialmente com radicais livres^[18].

A indústria cosmética tem vindo a apostar no desenvolvimento de produtos com propriedades antipoluição. Esses produtos têm diversas estratégias de proteção: podem evitar ou proteger a pele dos danos dos poluentes; podem criar uma barreira que previne a passagem dos poluentes

ou possuir agentes antioxidantes que protegem a pele dos danos oxidativos ⁽¹⁹⁾. Os diferentes poluentes podem afetar a nossa pele de diversas formas, eles podem induzir efeitos oxidativos, partículas podem depositar-se na superfície da pele, e/ou elementos tóxicos podem penetrar na pele ⁽²¹⁾. O fumo do tabaco é um poluente que induz oxidação lipídica, a qual desencadeia vários efeitos, como um aumento de MDA.

O MDA é um composto orgânico com a fórmula $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ produzido naturalmente, sendo um marcador para o stress oxidativo e um indicador da peroxidação lipídica ^(20,22,23). A principal produção endógena de MDA surge da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas ligações duplas interrompidas por metileno ^(26,27). Tem sido amplamente utilizado em pesquisas clínicas e estudos epidemiológicos ambientais, especialmente na avaliação do estresse oxidativo como resposta à exposição à poluição atmosférica ^(24,25).

Em relação ao princípio ativo do produto experimental, foi averiguado que o mesmo possui um antioxidante enzimático que pode ser utilizado na prevenção/minimização do stress oxidativo mitocondrial relacionado com doenças e útil para atenuar os efeitos de distúrbios mitocondriais e metabólicos.

Neste estudo, o fumo do tabaco é um favorável representante da poluição, pois ele contém as principais classes de poluentes a que estamos expostos diariamente, incluindo os metais pesados. Considerando os principais constituintes do fumo do tabaco, se espera que este induza a oxidação lipídica, levando a um aumento da concentração de enzima, sendo o MDA, o marcador utilizado neste estudo ^[16]. Portanto, o esperado deste ingrediente ativo, incorporado numa emulsão cosmética, é que leve a um menor aumento da concentração de MDA induzido pela exposição ao fumo do tabaco.

No desenvolvimento do estudo, tanto os participantes como os investigadores envolvidos nas avaliações de eficácia são cegos, portanto não sabem qual o local da pele que corresponde ao produto experimental e qual o local da pele que não é tratado, evitando assim erros sistemáticos. Além disso, é utilizada uma aleatorização e uma randomização para cada local da pele, garantindo assim que os resultados obtidos são cientificamente válidos e sólidos.

2. Métodos

O produto experimental é uma emulsão numa concentração de 0,20% (p/p), que foi aplicada 5 vezes nas costas durante o estudo, correspondendo a 3 dias consecutivos, onde o participante

ficará deitado de costas para cima e serão definidas 3 zonas circulares da pele com um diâmetro de cerca de 3,7 cm, utilizando um molde e um marcador, como mostra na Figura 2.

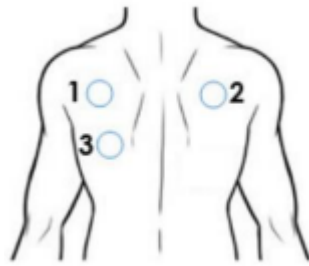


Figura 2: Esquema dos locais da pele para a exposição ao fumo e recolha do material biológico.

O produto será aplicado 5 vezes no respetivo local da pele, e dois locais da pele não serão tratados, um correspondendo à *baseline* – local da pele não tratado e sem exposição ao fumo do tabaco – e outro correspondendo ao controlo – local de pele não tratado e exposta ao fumo do tabaco. Os locais da pele serão aleatorizados, de acordo com uma tabela, criada no Microsoft Office Excel. A existência de um controlo neste estudo é necessária para eliminar e isolar variáveis, permitindo assim ver a concentração máxima da enzima alcançada após a exposição ao fumo do tabaco, validando assim a metodologia.

O fumo do tabaco será utilizado como produto não experimental, pois contém as principais classes de poluentes que estamos expostos diariamente, como os metais pesados.

Todos os procedimentos do estudo são realizados nas mesmas condições, com a temperatura ambiente a $22,5 \pm 15^{\circ}\text{C}$ e a humidade relativa a $50 \pm 10\%$. O participante tem um período de aclimatização de 20 minutos da área exposta antes das avaliações.

2.1. Aplicação dos produtos

A aplicação dos produtos é realizada nas instalações da inovapotek, seguida da exposição ao fumo, por um investigador/assistente técnico, não envolvido nas avaliações de eficácia.

A ordem de aplicação dos produtos é do local 1 para o local 3 (Figura 2), mesmo que dois locais da pele não sejam tratados.

Será aplicado 2 mg/cm^2 do produto no respetivo local da pele e o mesmo é espalhado homogeneamente com uma ligeira pressão, utilizando a ponta do dedo indicador e cerca de 40 movimentos circulares na área de teste.

A aplicação dos produtos é repetida de manhã e à noite, com um intervalo mínimo de 6 horas entre as aplicações, até completar 5 aplicações. Após a última aplicação, deve-se aguardar 5 minutos e depois expor os locais da pele ao fumo do tabaco. O produto deve ser conservado num local fresco e ao abrigo da luz.

2.2. Exposição ao fumo do tabaco

Para realização desta parte do estudo é necessário a montagem do sistema de exposição ao fumo do tabaco. O método aplicado é integrado pela ligação dos 5 cigarros, do frasco de kitasato, da caixa acrílica, da câmara, das torneiras e da bomba de vácuo, conforme mostram as figuras 3 e 4.

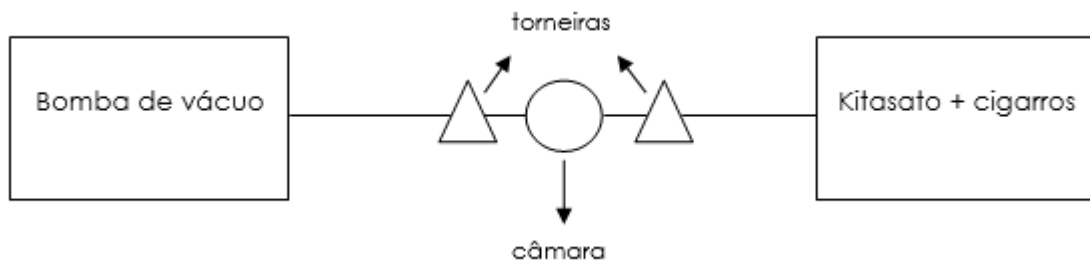


Figura 3: Sistema com bomba de vácuo para exposição ao fumo do tabaco.

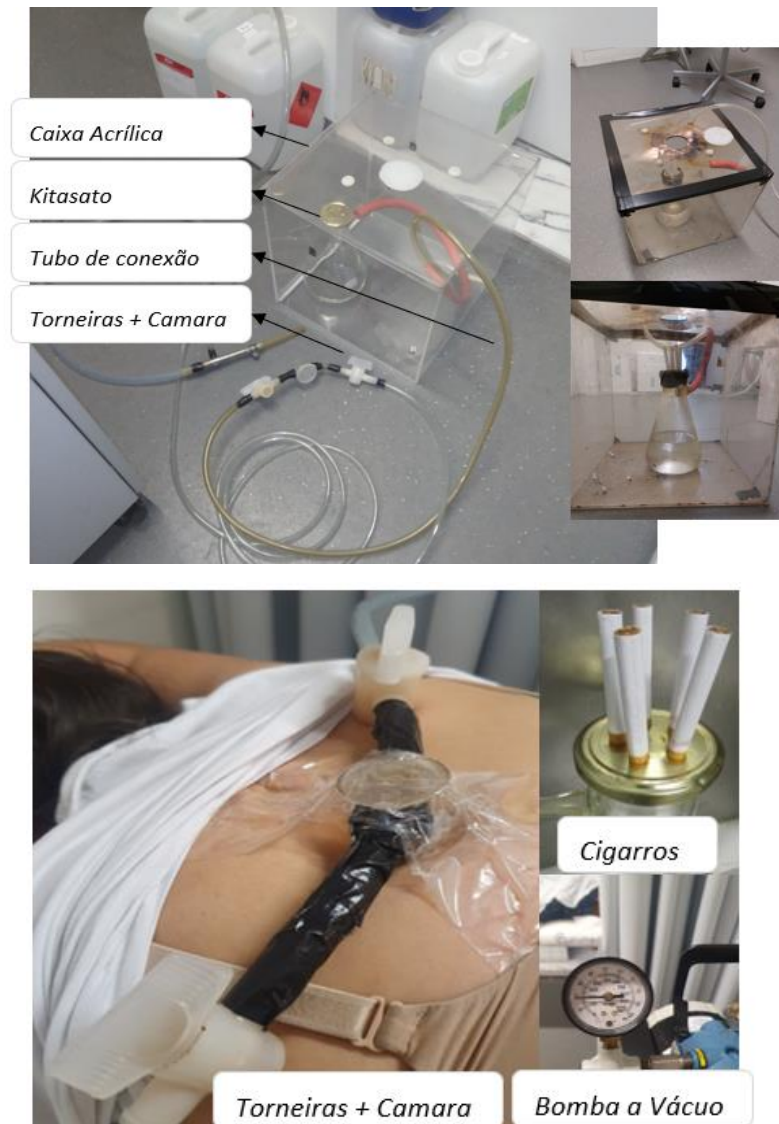


Figura 4: Método aplicado para exposição ao fumo do tabaco.

O primeiro passo é verificar a funcionalidade do sistema e a ordem de exposição ao fumo, que é do local 1 ao local 3, sendo que um local da pele é coletado primeiro, a amostra de *baseline*, que não será exposta.

De seguida, deve colocar-se a câmara no primeiro local da pele garantindo o seu isolamento e o seu posicionamento, ligar a bomba de vácuo, acender os cinco cigarros, com um intervalo de 2 segundos entre cada um e fechar a caixa. Aguardar 5 minutos, até a queima completa dos cigarros, fechar ambas as torneiras que estão ligadas aos tubos da câmara e desligar a bomba de vácuo. Aguardar 15 minutos, garantindo o isolamento e posicionamento da câmara. Depois retirar a câmara do local da pele e coletar a amostra biológica para quantificação de MDA. Repetir novamente, os passos anteriores, para o outro local da pele a ser exposto. No final da exposição,

a pele do participante deve ser limpa com algodão humedecido em água, e em seguida retirar as marcas com álcool (70%).

2.3. Recolha do material biológico

Para quantificação, são recolhidas amostras das camadas exteriores do estrato córneo no dorso dos participantes, em 2 momentos, em três locais da pele: num local da pele que corresponde à *baseline*, num local da pele após exposição ao fumo do tabaco (local da pele não tratado) e num local da pele após 5 aplicações consecutivas do produto e exposição ao fumo do tabaco.

A coleta das amostras é feita através de uma zaragatoa, primeiramente humedecida com uma solução fornecida pelo laboratório externo que irá efetuar a preparação e quantificação das mesmas. De seguida, a amostra é recolhida, realizando movimentos circulares em toda área de teste e aplicando uma leve pressão por 45 segundos (utilizou-se um molde para evitar a coleta da amostra além dos limites da área de teste). De seguida, a zaragatoa é cortada e armazenada no eppendorf, e uma nova recolha é realizada no mesmo local com uma segunda zaragatoa.

O eppendorf é então armazenado, devidamente identificado com o ID do participante e o número do local da pele, a -20° C imediatamente após a recolha da amostra. No final do estudo, as amostras são enviadas ao laboratório externo, em gelo seco, para análise de quantificação da concentração de MDA por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).

3. Resultados

Um grupo de 33 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos e com idade superior a 18 anos foram incluídos na investigação clínica, efetuaram todas as medições e finalizaram o estudo.

A quantidade média da emulsão cosmética contendo o ingrediente ativo aplicada durante o estudo foi de $107,38 \text{ g/cm}^2 \pm 0,34 \text{ g/cm}^2$ e a quantidade média aplicada por área de pele em cada aplicação única foi de $2,00 \text{ g/cm}^2 \pm 0,01 \text{ mg/cm}^2$.

O produto codificado com concentração de $0,20\%$ (p/p), foi denominado produto A e o local da pele que não foi tratado foi denominado produto B, para que as avaliações fossem efetuadas de forma duplamente cega.

3.1. Quantificação da enzima

Neste estudo clínico, foram recolhidas amostras das camadas exteriores do estrato córneo nas costas dos participantes em três locais da pele: um local da pele que corresponde à *baseline* (antes da exposição ao tabaco) e dois outros locais da pele (após a exposição ao tabaco) – um local da pele não tratado e um local da pele após 5 aplicações consecutivas do produto investigacional com um ingrediente ativo cosmético.

Para determinar a eficácia do ingrediente ativo cosmético incorporado a uma concentração de 0,20%(p/p) numa emulsão cosmética na proteção química da pele contra a poluição, as amostras recolhidas foram submetidas à quantificação de MDA por GC-MS.

Os resultados obtidos para a quantificação da concentração de MDA no local da pele que corresponde à *baseline*, no local da pele onde foi aplicada a formulação com um ingrediente ativo cosmético e no local da pele não tratada são apresentados na Tabela 1 e na Figura 5. As diferenças médias foram determinadas subtraindo os resultados obtidos no local da pele que corresponde à *baseline* aos resultados obtidos nos outros dois locais da pele.

Tabela 1: Resultados da concentração de um ingrediente ativo obtidos no local da pele que corresponde à *baseline* e nos outros dois locais da pele – local da pele não tratada (código do produto: B) e local da pele tratado com um ingrediente ativo cosmético incorporado a uma concentração de 0,20%(p/p) numa emulsão cosmética (código do produto: A).

	Baseline n=33	Pele tratada com ingrediente ativo (Código do produto: A) n=33	Pele não tratada (Código do produto: B) n=33
MDA valores médios (ng/mg)	106.48	43.97	70.51
±SD (ng/mg)	26.75	17.33	21.64
MDA diferenças médias (ng/mg)	-	-62.51	-35.97
±SD (ng/mg)	-	31.84	25.90
MDA diferenças médias (%)	-	-53.91%	-29.88%
±SD (%)	-	33.41%	29.98%
Nº indivíduos com diminuição da concentração de MDA	-	31	30
Nº indivíduos com diminuição da concentração de MDA (%)	-	93.94%	90.91%
Diminuição máxima (%)	-	-79.36%	-54.05%
Diminuição media entre indivíduos com efeitos positivos (%)	-	-61.84%	-37.95%
p valor (antes vs depois)	-	<0.001*	<0.001*
p valor (A vs B)	-	<0.001*	<0.001*

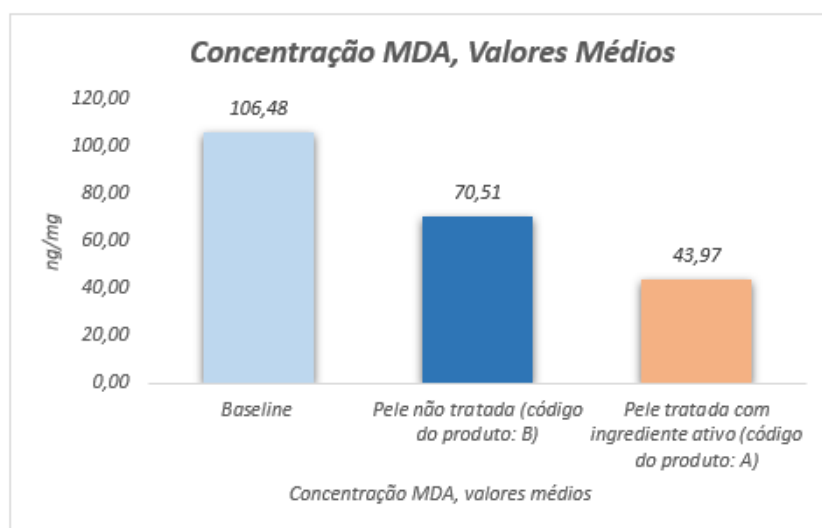


Figura 5: Resultados da concentração de enzima obtidos no local da pele que corresponde à *baseline* e nos outros dois locais da pele – local da pele não tratada (código do produto: B) e local da pele tratada com um ingrediente ativo cosmético incorporado a uma concentração de 0,20% (*p/p*) numa emulsão cosmética (código do produto: A).

Após a exposição ao fumo do tabaco, foi observado uma diminuição média estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) da concentração de MDA de 53,91% e 29,88% para o local da pele tratada com um ingrediente ativo de 0,20% (*p/p*) em uma emulsão cosmética e para o local da pele não tratada, respetivamente, em comparação com o local da pele que corresponde à *baseline*. Conforme referido anteriormente, levando em consideração os principais constituintes do fumo do tabaco, é de se esperar que este induza a oxidação lipídica, o que leva a um aumento da concentração de MDA. Neste estudo, foi possível observar uma diminuição da concentração após a exposição ao fumo do tabaco, que pode ser explicado pelo facto de a área de teste estar exposta a um elevado número de radicais livres e, por esta razão, pode ser desenvolvida uma resposta antioxidante endógena imediatamente após a exposição para equilibrar o stress oxidativo induzido pela exposição ao fumo do tabaco.

Ao fazer a comparação dos resultados obtidos para o local da pele tratada com a formulação contendo um ingrediente ativo cosmético e os resultados obtidos para o local da pele não tratada, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$), levando a formulação com o ingrediente ativo cosmético a uma maior diminuição da concentração.

4. Discussão

Para este estudo, o equipamento utilizado para exposição ao fumo do tabaco foi melhorado e testado novamente. Durante o desenvolvimento do estudo, funcionou muito bem, isolando a saída do fumo. No entanto, este era pouco prático pois toda vez que se trocava o local para exposição também tinha que acender outra remessa de cigarros, e isolar-se novamente a caixa, o que tornava a metodologia trabalhosa.

Por isso, e como sugestão de melhoria na metodologia aplicada, faria algumas alterações na caixa, tais como: em vez de abrir toda a tampa da caixa, sempre que for preciso para repor o tabaco e perder tempo isolando novamente, trocaria essa tampa por outra com uma entrada maior em cima, que daria para repor o tabaco por cima sem mexer no seu isolamento e ao acender fecharia com outra tampa do tamanho da circunferência dela. Ficaria mais prático e com menos desperdício de tempo e material. Também seria ideal, um ambiente com melhor exaustão para circulação de ar.

Realizar mais testes com intervalos maiores de tempo entre a exposição ao fumo e a recolha da amostra, como por exemplo 30 minutos, 1 hora ou 2 horas após a exposição ao fumo do tabaco. Assim, haveria mais tempo para o desenvolvimento de uma resposta endógena ao poluente e poderia haver uma detecção maior na concentração de MDA.

5. Conclusão

Este estudo clínico controlado, aleatorizado e duplamente cego, teve como objetivo avaliar a eficácia de um ingrediente ativo cosmético incorporado a uma concentração de 0.20% (p/p) numa emulsão cosmética na proteção química da pele contra a poluição, onde neste caso foi utilizado o fumo do tabaco para representante da poluição. Foram efetuadas cinco aplicações do produto experimental na respetiva área de teste, seguida da exposição de dois locais da pele (pele tratada com o produto experimental e pele não tratada) ao fumo do tabaco. De forma a avaliar o efeito provocado pelo fumo do tabaco, foram recolhidas amostras da superfície da pele onde foi quantificado um marcador de oxidação lipídica - MDA.

Após a exposição ao fumo do tabaco, pode ser observado uma diminuição média estatisticamente significativa da concentração de MDA de 53,91% e 29,88% para o local da pele tratado com um ingrediente ativo cosmético incorporado a uma concentração de 0,20% (p/p) em

uma emulsão cosmética e para o local da pele não tratado, respetivamente, em comparação com o local da pele que corresponde à *baseline*. Esta diminuição, pode ser explicada pelo facto de a área de teste estar exposta a um elevado número de radicais livres e, por esta razão, pode ser desenvolvida uma resposta antioxidante endógena imediatamente após a exposição para equilibrar o stress oxidativo induzido pela exposição ao fumo do cigarro.

Também foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação dos resultados obtidos para o local da pele tratada com a formulação contendo um ingrediente ativo cosmético incorporado a uma concentração de 0,20%(p/p) numa emulsão cosmética com os resultados obtidos para a zona da pele não tratada, levando a formulação com o ingrediente cosmético a uma maior diminuição da concentração.

A alegação fornecida inicialmente e a principal hipótese desse estudo clínico é que o produto experimental seria mais eficaz na proteção da pele contra a poluição, em comparação com a área exposta não tratada e, portanto, essa alegação não pode ser validada pois o objetivo não foi alcançado com este estudo clínico, levando a exposição ao fumo de tabaco a uma diminuição do MDA e não ao seu aumento, como esperado.

Os benefícios da investigação sobrepuseram-se aos riscos, uma vez que foram obtidas conclusões acerca do produto e não foram observados quaisquer eventos adversos.

Em conclusão, não é possível aferir-se que o ingrediente ativo cosmético incorporado numa concentração de 0,20%(p/p) numa emulsão cosmética é eficaz na proteção química da pele contra a poluição em comparação com uma área não tratada após cinco aplicações consecutivas.

Referências Bibliográficas

1. Commission E. Regulation no. 655/2013 of 10 July 2013. 2013
2. Commission E. Technical Document on Cosmetic Claims. 2017.
3. GUIDELINES FOR COSMETIC PRODUCT CLAIM SUBSTANTIATION. Cosmetics Europe. 2019; (pag.1–23).
4. Commission E. Directive 2006/144 of 12 December 2006; (pag. 21–7).
5. Assembleia da República. Lei da Investigação Clínica nº21/2014. 2014.
6. An MW, Duong Q, Le-Rademacher J, Mandrekar SJ. Principles of Good Clinical Trial Design. *Journal of Thoracic Oncology*. 2020 Aug 1;15(8):1277–80.

7. World Medical Association. Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 1964
8. Good clinical practice | European Medicines Agency. Accessed on 24th July 2022.
9. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guideline for good clinical practice E6(R2). 2002; (pag. 1–68).
10. COMMISSION DIRECTIVE 2005/28/EC of 8 April 2005 laying down principles and detailed guidelines for good clinical practice as regards investigational medicinal products for human use, as well as the requirements for authorisation of the manufacturing or importation of such products.
11. ICH Topic E3 Structure and Content of Clinical Study Reports Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON STRUCTURE AND CONTENT OF CLINICAL STUDY REPORTS. 1996.
12. Institutional Review Board/Independent Ethics Committee (IRB/IEC): ICH E6 (R2) Good clinical practice. European Medicines Agency, 2018;
13. inovapotek. Accessed on 2th of May 2023 from: <https://inovapotek.com/>
14. Clinical investigation of medical devices for human subjects – Good clinical practice. International Standard ISO 14155. 3rd edition. 29/07/2020.
15. Guideline for Good Clinical Practice – ICH harmonised tripartite guideline E6 (R2). International Conference on Harmonization (ICH). 9 November 2016.
16. CIGARETTES MANUFACTUREES: Pourcentage d'additifsetaux de nicotine, goudrons, monoxyde de carbone (CO). 2016. Retrieved March 17, 2017.
17. Clinical study for the evaluation of the efficacy of cosmetic ingredients on the chemical protection of skin from pollution; Clinical investigation plan n.P305C17 (v01); inovapotek; 05/2018
18. Blackwell Publishing Ltd. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. S Briganti, M Picardo. JEADV (2003)
19. Cosmetics Bangkok. Shielding against the impact of pollution, stress and UV, November 2014.
20. Nielsen, F., Mikkelsen, B. B., Nielsen, J. B., Andersen, H. R., & Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. Clinical Chemistry, 1997.
21. Egawa, M., Kohno, Y., & Kumano, Y. Oxidative effects of cigarette smoke on the human skin. International Journal of Cosmetic Science, 1999.

22. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990.
23. Hageman JJ, Bast A, Vermeulen NP. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects. *Chem Biol Interact* 1992.
24. Ho E, Karimi Galoungahi K, Liu CC, et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology* 2013.
25. Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Nunez C, et al. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008.
26. Draper HH, McGirr LG, Hadley M. The metabolism of malondialdehyde. *Lipids* 1986.
27. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005.

Anexos

Durante meu período de estágio, além de estar envolvida neste estudo clínico, também desfrutei a oportunidade de participar em outros estudos clínicos, tais como:

- Teste de consumidor para avaliação da aceitabilidade e eficácia de um produto cosmético (produto para frieiras).
- Estudo clínico cego controlado para avaliação do impacto de dois suplementos alimentares na vida do participante.
- Estudo clínico duplo cego controlado por placebo para avaliação da eficácia de um ingrediente cosmético na celulite.
- Estudo clínico cego para avaliação dos efeitos antirrugas, reafirmante e uniformidade do tom de pele de um produto cosmético.
- Estudo clínico duplo cego randomizado por placebo para avaliação do efeito de um ingrediente cosmético na acne, redução de poros e homogeneidade de cor de pele.