

Characterization of the efficacy of a moisturizer that restores the cutaneous barrier*

*Caracterização da eficácia de um creme hidratante restabelecedor da barreira cutânea**

Catarina Rosado, Luis Monteiro Rodrigues

Universidade Lusófona (CBIOS- Experimental Dermatology Unit), Campo Grande 376,
1749-024 Lisboa – Portugal
E-mail: catarina.rosado@ulusofona.pt

Abstrac

The high incidence of xerosis amongst the population is a factor that contributes to the high usage of moisturizers. Additionally, different types of cosmetic products include this claim in the labelling.

Numerous strategies have been developed to assess the efficacy of moisturizers, however most of these methodologies are based in methods that can be influenced by the water that exists in the formulation and only provide instantaneous data. The aim of this study was to characterize the effect of a moisturizer on stratum corneum hydration and skin barrier function by two approaches that challenge the barrier: the assessment of the permeation of a vasodilating molecule and the assessment of the protection against irritation by sodium lauryl sulphate (SLS). The results obtained by these methodologies were then compared with those obtained with more conventional approaches.

15 healthy volunteers applied a formulation for two weeks, twice daily, on a marked site on the lower leg. Different measurements were then conducted in all volunteers. In the methodology that assesses changes in the permeation, ethyl nicotinate application was followed by measurements with laser Doppler flowmetry (LDF). The more conventional approaches were measurements of transepidermal water loss (TEWL) and skin hydration. Finally, to assess the protective properties, a 2.5% SLS solution was applied for 24h to a treated and untreated site, followed by measurements of TEWL and erythema.

Results indicate that the formulation was able to cause positive changes to the barrier and skin hydration. The study was also able to demonstrate the advantages of using methodologies that challenge the skin, over the more conventional approaches.

Keywords: Xerosis; Hydration; Cutaneous barrier; Moisturizer.

Resumo

A elevada prevalência da xerose na população faz dos cremes hidratantes um dos tipos de cosméticos mais consumidos, sendo também a reivindicação de promotor da hidratação cutânea atribuída frequentemente a outras classes de produtos. Existem já diversas estratégias para avaliar a eficácia de produtos hidratantes, no entanto invariavelmente são utilizadas metodologias que recorrem a métodos que podem ser influenciados pela água contida nas formulações e que apenas produzem dados instantâneos. O objectivo deste estudo foi caracterizar a acção produzida por um creme hidratante na função de barreira cutânea e na hidratação do estrato córneo através de duas abordagens que testam a barreira cutânea: a avaliação da rapidez de permeação de uma molécula vasodilatadora e a avaliação da protecção conferida contra a agressão com laurilsulfato de sódio (LSS). Estas metodologias foram depois comparadas com os resultados obtidos através das técnicas convencionais.

15 voluntárias saudáveis aplicaram uma formulação durante 15 dias, duas vezes por dia, num sitio randomizado da perna. Foram depois seguidos diferentes procedimentos em todas as voluntárias. A metodologia de avaliação de alterações na permeação consistiu na aplicação de nicotinato de etilo seguida de medição através de fluxometria de laser Doppler (FLD). As estratégias convencionais consistiram na medição da perda transepidermica de água (PTEA) e da hidratação cutânea. Finalmente, para avaliação da capacidade protectora, aplicou-se sob oclusão, LSS a 2,5% durante 24h no site tratado e noutro não tratado. Comparou-se a PTEA e o eritema nestes sites e num site que proporciona as variáveis basais.

Os resultados obtidos indicam que a aplicação da formulação provocou alterações positivas na barreira e hidratação cutânea. O estudo confirmou a vantagem da aplicação de uma metodologia que desafia a resposta cutânea.

Palavras-chave: Xerose; Hidratação; Barreira Cutânea; Creme hidratante

*Prize Vasenol (Unilever) 2011
*Prémio Vasenol (Unilever) 2011

Recebido em 13/04/2011
Biomedical and Biopharmaceutical Research, 2011; (8) 1: 109-121
Versão electrónica: <http://revistas.ulusofona.pt/index.php/revistasuade>

Introduction

Dry skin, or xerosis, is one of the most common skin disorders. It is more severe in the Winter and Summer months, when humidity values are low and extreme temperatures are reached, and becomes more pronounced with ageing. The high prevalence of this disorder amongst the population explains the high usage of moisturizers. Additionally, different types of cosmetic products include this claim in the labelling, ranging from sunscreens to skin cleansers.

The stratum corneum (SC) constitutes the interface between the body and the environment and its main function is to keep out exogenous threats, as well as to prevent loss of endogenous material. Its unique impermeability properties are attributable to the characteristics of the corneocytes and to the lipids that are present in the intercellular spaces- ceramides^[1].

Numerous skin pathologies and household products can impair skin barrier function. The use of cosmetic products is a common approach to restore this property or to prevent its damage. One of the aims of the application of such products is to substitute some of the lost components of the SC, such as cholesterol, fatty acids and ceramides^[2]. The ingredients that are included in these formulations can be divided into two main groups^[3]: those that form a water impermeable film (such as mineral oil or petrolatum) and those that are hygroscopic molecules (such as glycerine, lactic acid, sodium PCA or urea). Urea, a substance that is naturally present in the SC, has both a hygroscopic and keratolytic capacity^[7].

Several strategies have been developed to assess the efficacy of moisturizers. Most of these methodologies are based in static approaches, that can be influenced by the water that exists in the formulation and only provide instantaneous data^[4].

The first aim of this study was to characterize the effect of a moisturizer that contains urea (Kératosane15[®]) in the cutaneous barrier function and in SC hydration. Apart from the conventional static methods, such as measurements of capacitance or of transepidermal water loss (TEWL), a dynamic approach was also employed, based on the assessment of the permeation of a vasodilating molecule (ethyl nicotinate) with laser Doppler flowmetry (LDF).

On the other hand, the development of in vivo models to study cutaneous lesion, in animal models^[5, 6] or humans^[7, 8], has been pivotal to the efficacy study of barrier creams. The induction of a controlled lesion with sodium lauryl sulphate (SLS), in concentrations ranging between 0.25 and 10%, is a widely used approach that has provided information on the dermatotoxicity of this molecule, as well as on the mechanisms that are involved in the changes in skin

Introdução

A pele seca, ou xerose, é uma das patologias cutâneas minor mais frequentes, aumentando de incidência nos meses de Inverno ou Verão, quando a humidade ambiental é baixa e as temperaturas extremas, e torna-se mais pronunciada com o envelhecimento. A elevada prevalência da xerose na população faz dos produtos hidratantes uma das classes de cosméticos mais usados. Para além dos cosméticos que têm apenas esta função, a reivindicação de promotor da hidratação cutânea faz parte da rotulagem de muitas outras classes de produtos- desde os protectores solares até aos cosméticos de limpeza.

O estrato córneo (SC) é a interface entre o corpo e o meio ambiente, sendo a sua função crucial constituir uma camada impermeável à entrada de ameaças exógenas e contra a perda de material endógeno. Para a manutenção desta impermeabilidade contribuem lípidos como as ceramidas e a constituição única das células que formam esta camada da epiderme – os corneócitos^[1].

São inúmeras as patologias cutâneas e os produtos de utilização doméstica que contribuem para a diminuição da eficácia da barreira cutânea. É corrente o recurso a produtos cosméticos para restabelecer esta capacidade ou prevenir a sua perda. Um dos objectivos destes produtos consiste na recuperação de alguns constituintes básicos do estrato córneo, como o colesterol, ácidos gordos e ceramidas^[2]. Os excipientes incluídos nestas formulações podem dividir-se em dois grandes grupos^[3]: os que formam um filme impermeável à passagem de água (como o óleo mineral ou a vaselina) e os que são higroscópicos (como a glicerina, o ácido láctico, o sódio pirrolidonacarboxilato e a ureia). A ureia, uma substância que faz parte da constituição normal do estrato córneo, além de higroscópica apresenta também acção queratolítica^[7].

Existem diversas metodologias para avaliar a eficácia de produtos hidratantes. A maioria das vezes são utilizadas abordagens que recorrem a métodos estáticos, mas estas estão condicionadas ao facto de não identificarem a origem da água detectada e apenas produzirem dados instantâneos^[4]. O primeiro objectivo deste estudo foi caracterizar a acção produzida por um creme hidratante contendo ureia (Kératosane15[®]) na função de barreira cutânea e na hidratação do estrato córneo. Foram utilizados não só os métodos estáticos convencionais, como a corneometria e a medição da perda transepidermica de água (PTEA), mas também um método dinâmico. Neste é avaliada a rapidez de permeação de uma molécula vasodilatadora (nicotinato de etilo) através de Fluxometria Laser Doppler (FLD).

Por outro lado, o desenvolvimento de modelos in vivo de estudo da lesão cutânea, em animais^[5, 6] ou humanos^[7, 8] tem sido de grande importância para a determinação da eficácia dos cremes barreira. Os modelos de lesão com Lauril Sulfato de Sódio (LSS), em concentrações entre 0,25-10%, têm sido amplamente utilizados, produzindo uma vasta informação sobre a dermatotoxicidade deste composto, bem como os mecanismos envolvidos nas

integrity^[9-13]. SLS is a well known anionic surfactant that is a common ingredient of both medicines and cosmetics^[14]. It is a penetration enhancer but causes skin irritation, oedema and changes in keratin^[15, 16]. Anionic surfactants are able to weaken the resistance of the SC through their impact in the keratin helices^[17] and by lipid removal^[18]. There are numerous references in the literature to the effects of the exposure to different concentrations of SLS, such as increase in TEWL and local blood flow, as well as erythema of variable intensity^[19]. The second aim of this investigation is to conduct a study on the protective capacity of a product to exposure to a model irritant (SLS), through the assessment of two different cutaneous variables: TEWL and erythema.

Materials

This study used a commercially available formulation, a moisturizer containing urea (Kératosane15^o, Uriage, France). Sodium lauryl sulphate (Texapon K12) was supplied by J. M. Vaz Pereira, Lda, Lisbon, Portugal. Ethyl nicotinate was supplied by Aldrich, Dorset, UK.

Methods

15 healthy female volunteers participated in the study, aged between 22 and 51 years (mean age 28.27±13.7 years), that were fully informed of the nature of the study and of all the procedures involved. The procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration^[20]. The work was entirely conducted in the lower leg of the volunteers, since it is one of the sites where xerosis is more prevalent. All measurements were conducted in a controlled environment of temperature (24.36 ± 1.34 °C) and relative humidity (51.74 ± 4.48%).

Protocol to assess protective efficacy

4 sites were randomly selected in the lower leg of each volunteer: 1) treated with cream and exposed to SLS; 2) untreated with cream and exposed to SLS; 3) untreated with either cream or SLS but occluded for 24h; 4) control. During the first two weeks of the protocol, in the protection stage, the volunteers were instructed to apply twice daily the moisturizer to site 1). This was followed by the provocation stage, where in the sites 1) and 2) a 2.5% SLS aqueous solution was applied for 24h using filter paper and Finn Chamber® patches (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland). During the same time, a blank patch was applied to site 3). After this period all the patches were removed and,

alterações de integridade da pele assim induzidas^[9-13]. O LSS é um tensoactivo aniónico muito conhecido que faz parte da composição de diversas formas farmacêuticas e cosméticas^[14]. Este influencia a permeação transcutânea, mas é irritante para a pele^[15, 16], causando edema e alterações na queratina. Os tensoactivos aniónicos reduzem particularmente a resistência da camada córnea por alteração das hélices da queratina^[17] e, adicionalmente, por removerem os lípidos que o constituem^[18]. Está descrito na literatura, que a exposição a diversas concentrações de LSS, normalmente aplicado sob oclusão, causa aumento da Perda Trans-Epidérmica de Água (PTEA), bem como do fluxo sanguíneo local, visível clinicamente pelo aparecimento de eritema, de intensidade variável^[19].

O segundo objectivo deste trabalho de investigação é executar um estudo sobre a eficácia apresentada pelo mesmo produto como protector através da aplicação de uma substância modelo irritante (o LSS) seguida da avaliação de 2 variáveis cutâneas diferentes: Perda Transepidérmica de Água (PTEA) e eritema.

Material

Neste trabalho experimental foi utilizada uma formulação comercialmente disponível, um creme hidratante contendo ureia (Kératosane15^o, Uriage, França). O agente provocador da função de barreira foi uma solução aquosa a 2,5% de Laurilsulfato de Sódio (LSS) (Texapon K12, J. M. Vaz Pereira, Lda, Lisboa, Portugal).

Métodos

O estudo realizou-se em 15 voluntários saudáveis do sexo feminino com idades compreendidas entre os 22 e os 51 anos (idade média de 28,27±13,7 anos), que foram informadas da natureza do estudo e dos procedimentos envolvidos. O trabalho foi desenvolvido em conformidade com a Declaração de Helsínquia e suas alterações posteriores^[20]. Por ser uma das zonas onde a xerose é mais evidente, o estudo foi inteiramente conduzido na perna das voluntárias. As medições decorreram em condições controladas de temperatura (24,36 ± 1,34 °C) e humidade relativa (51,74 ± 4,48%).

Protocolo de avaliação da eficácia como protector

Na perna de cada voluntária foram seleccionados 4 sites de forma randomizada: 1) site tratado com creme e exposto ao LSS; 2) site não tratado mas exposto ao tensoactivo; 3) site que apenas foi submetido à oclusão durante 24h; 4) site controlo. Numa primeira fase, fase de protecção, as voluntárias foram instruídas a aplicar o creme durante 15 dias, 2 vezes por dia, no site designado por 1). Na fase de provocação, aplicou-se durante 24h papel de filtro de 11mm de diâmetro saturado em solução aquosa a 2,5% de LSS utilizando os adesivos oclusivos

after a 15 minutes interval, measurements were conducted on all sites. Changes in skin colour were assessed with a Chromameter CR-300 (Minolta Camera Co, Ltd, Osaka, Japan) using the CIE Lab system. Since the parameter a^* provided by the device is indicative of the intensity of the red colour, it was used to quantify erythema. TEWL measurements were made with a Tewameter TM 300 (Courage and Khazaka, Koln, Germany), according to published guidelines [21].

Protocol to assess the impact in barrier function and SC hydration

2 sites were marked in the lower leg of each volunteer: 1) treated with cream; 2) untreated control. Once again, for the first two weeks of the protocol, the volunteers were instructed to apply twice daily the moisturizer to site 1). After this period, measurements of TEWL were conducted in both sites, as well as measurements of SC hydration with two different devices: Corneometer CM 825 (Courage and Khazaka, Koln, Germany) and MoistureMeter-SC (Delfin, Kuopio, Finland). Finally, squares of filter paper with 1 cm² soaked with a 0.2M aqueous solution of ethyl nicotinate were applied to both sites for 60 seconds. Immediately after removal of the filter paper, blood perfusion was monitored for 60 minutes using a laser Doppler flowmeter (PeriFlux System 5000, Perimed, Stockholm, Sweden) according to published guidelines [22]. Onset time (tonset) and time for maximum response (tmax) were the parameters that were considered relevant to the study.

Non parametric comparative analysis (Wilcoxon sign rank test) was used in this study. A 0.05 significance level was adopted.

Results

One of the greatest difficulties associated to in vivo studies is the high inter-individual variability in the irritation response by SLS. In order to by-pass this difficulty, data was analysed as a ratio of the results obtained in relation to control. Thus, results that are close to one indicate a low impact, whereas higher or lower values are suggestive of the opposite.

In the results obtained with the Chromameter there were no differences between the two sites that were exposed to SLS (treated and untreated with the moisturizer). Nevertheless, as can be seen in table 1 and figure 1, there were statistically significant differences between the latter and the site that was only submitted to occlusion.

Finn Chamber® (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finlândia) aos sites 1) e 2). No site 3) apenas foi aplicada a camara adesiva oclusiva. No fim deste período, foram retirados os adesivos e, após uma pausa de 15 minutos, mediram-se os parâmetros de avaliação do impacto na função de barreira nos sites 1) a 4). As alterações na coloração da pele foram avaliadas com um colorímetro tri-estimular Chromameter CR-300 (Minolta Camera Co, Ltd, Osaka, Japão). Todas as medições foram feitas utilizando o sistema CIE Lab. Uma vez que o parâmetro a^* reflecte a cromaticidade vermelha, este foi utilizado para quantificar o eritema. A perda transepidérmica de água (PTEA) foi medida com o evaporímetro Tewameter TM 300 (Courage and Khazaka, Colónia, Alemanha) de acordo com guidelines previamente publicadas [21].

Protocolo de avaliação do impacto na função de barreira cutânea e na hidratação do estrato córneo

Na perna de cada voluntária foram seleccionados 2 sites de forma randomizada: site tratado com creme e um site não tratado (controlo). As voluntárias foram instruídas para proceder à aplicação do creme (Kératosane15©, Uriage, França) durante 15 dias, 2 vezes por dia, numa área pré-delimitada e randomizada da perna em estudo. Foram efectuadas medições de perda transepidérmica de água com o evaporímetro (Tewameter TM 300, Courage and Khazaka, Colónia, Alemanha, em ambos os locais (tratado e controlo). Fez-se também uma comparação com dois aparelhos que avaliam a hidratação cutânea: o Corneometer CM 825 (Courage and Khazaka, Colónia, Alemanha) e o MoistureMeter-SC (Delfin, Kuopio, Finlândia). Por último, foram aplicados quadrados de papel de filtro com 1 cm² saturados numa solução aquosa de nicotinato de etilo 0,2M (Aldrich, Dorset, Reino Unido) durante 60 segundos no local tratado e no local controlo. Imediatamente após a remoção do papel de filtro procedeu-se à medição do fluxo sanguíneo através de fluxímetro de laser doppler (PeriFlux System 5000, Perimed, Estocolmo, Suécia) de acordo com guidelines previamente publicadas [22], durante um período de 60 minutos, colocando uma sonda em cada área em estudo. Os parâmetros considerados relevantes para este estudo foram o tempo de início de resposta (tonset) e o tempo de resposta máxima (tmax).

Para a análise dos resultados foi utilizada estatística não paramétrica (teste de Wilcoxon) e um nível de significância de 0,05.

Resultados

Uma das maiores dificuldades associada à realização de teste in vivo é a grande variabilidade inter-individual na resposta ao LSS. A estratégia adoptada para minimizar este obstáculo foi analisar os resultados como rácios do valor obtido sobre o valor do controlo. Assim, resultados perto da unidade indicam que não se observam diferenças, enquanto que valores mais elevados indicam alterações provocadas pela intervenção.

Os resultados relativos à coloração da pele não permitem observar diferenças entre os sites expostos ao LSS (site tratado com creme versus site não tratado). No entanto há diferenças estatisticamente significativas entre estes e o site sob oclusão, como se pode observar na tabela 1 e figura 1.

Table 1 – Colorimetry results
Tabela 1 – Resultados da colorimetria

| | a* (site 1/site 4) | a* (site 2/site 4) | a* (site 3/site 4) |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Mean / Média | 1,16 | 1,29 | 0,98 |
| Sd / DP | 0,23 | 0,25 | 0,19 |
| p | 0,109 | | |
| | | 0,003 | |
| | 0,008 | | |

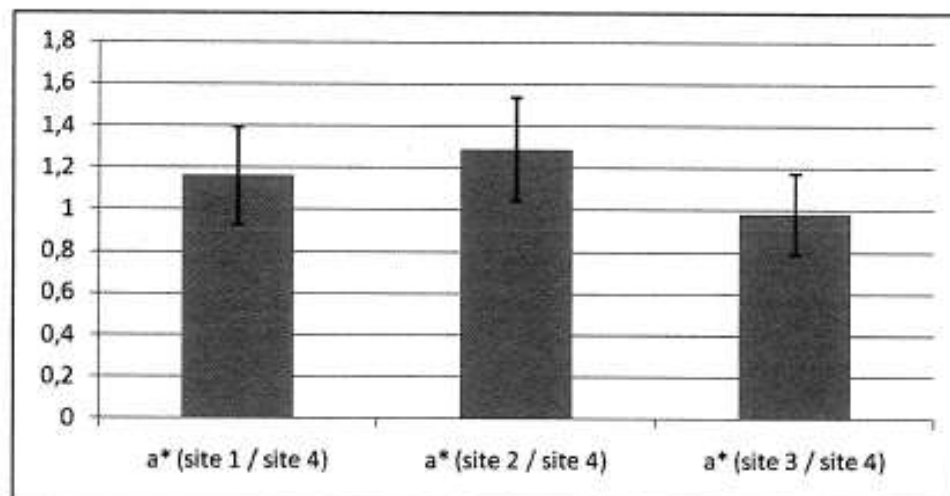


Figure 1 – a* ratios (n=14, mean ±SD)
Figural – Rácios de a* (n=14, média ± DP)

It can be observed in table 2 that statistically significant differences were observed in the TEWL after application of SLS. The more marked impact in TEWL values was found in the untreated site (figure 2).

Pode ver-se na tabela 2 que há diferenças estatisticamente significativas na PTEA medida após aplicação de LSS. É de salientar o maior impacto causado na PTEA da aplicação de LSS ao site não tratado com creme (figura 2).

Table 2 - TEWL results
Tabela 2 – Resultados da PTEA

| | site 1/site 4 | site 2/site 4 | site 3/site 4 |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|
| Mean / Média | 2,82 | 3,76 | 1,33 |
| SP / DP | 1,34 | 1,70 | 0,39 |
| p | 0,004 | | |
| | | 0,001 | |
| | 0,002 | | |

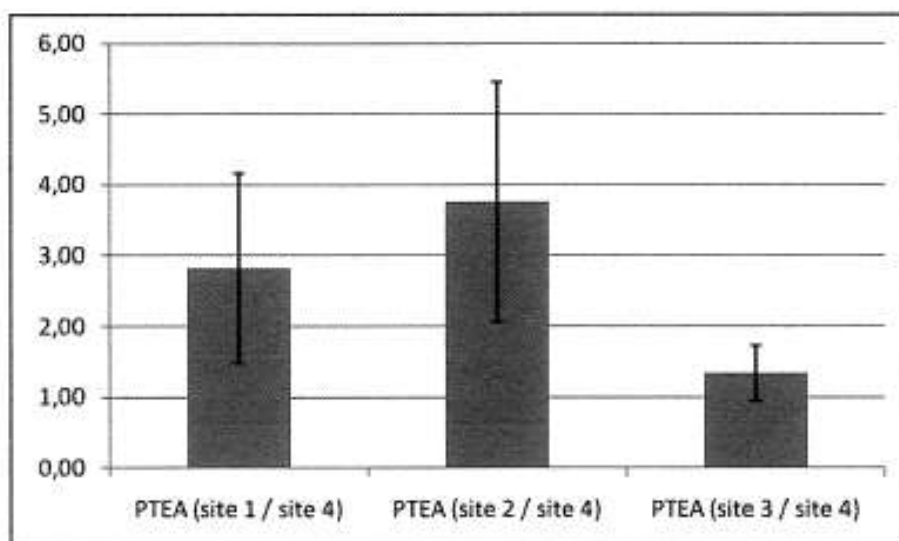


Figure 2 – TEWL ratios (n=14, mean ±SD)
Figura 2 – Rácios de PTEA (n=14, média ± DP)

Analysis of the data obtained from the protocol that aimed to assess the impact of product application on barrier function is unable to establish differences between the site that was treated with the moisturizer and the untreated control. In the laser Doppler flowmetry profiles obtained after application of ethyl nicotinate (fig.3) not only are the mean results very similar, but the standard deviation is also high. The onset time (tonset) was slightly lower in the treated site, but this difference does not have statistical significance ($p= 0,346$), as seen in figure 4. No differences in the time for maximum response (tmax)

A análise dos resultados que tinham como objectivo a avaliação do produto sobre a função de barreira não permitem observar diferença entre o local tratado com o creme hidratante e o controlo (não tratado). Nos resultados de FLD relativos à resposta ao nicotinato de etilo (fig. 3), a média dos perfis de resposta ao vasodilatador é muito idêntica e o desvio padrão é muito elevado. O tempo de início de resposta (tonset) é ligeiramente inferior na zona tratada face à zona controlo, mas esta diferença não é estatisticamente significativa ($p= 0,346$), como se pode ver na fig. 4. No tempo em que se atinge a resposta máxima (tmax) não há

were found between the two sites (fig.5). In figure 6 it can be seen that there are no statistically significant differences between the TEWL measured in the treated and control sites ($p=0,865$).

diferença entre os dois locais estudados ($p=0,802$), como é visível na fig. 5. Pode ver-se na fig. 6 que não há diferença estatisticamente significativa ($p=0,865$) entre a PTEA dos locais tratado e controlo.

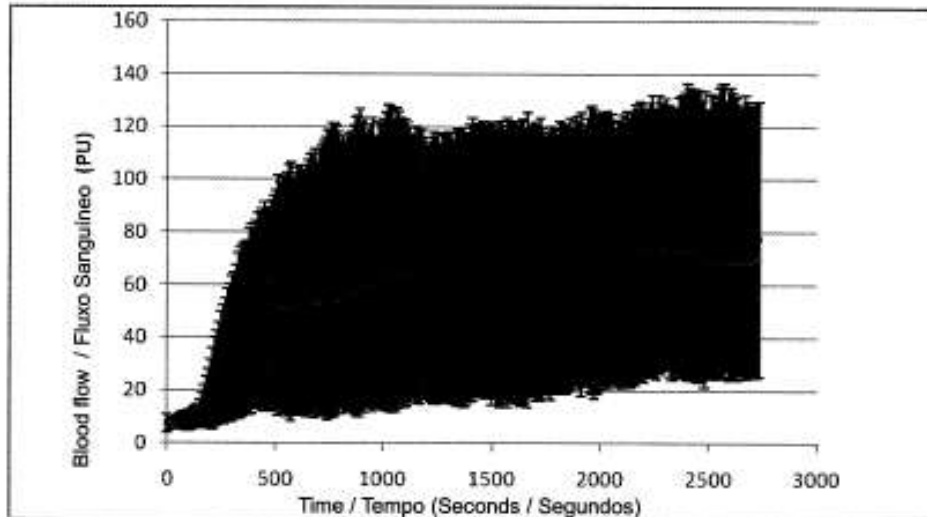


Figure 3- Blood flow values (\pm SD) obtained in the treated (red line) and control (blue line) sites after application of ethyl nicotinate.

Figura 3- Valores médios do fluxo sanguíneo com respectivos desvios padrão, da zona tratada (linha vermelha) e da zona controlo (linha azul) após a aplicação do nicotinato de etilo.

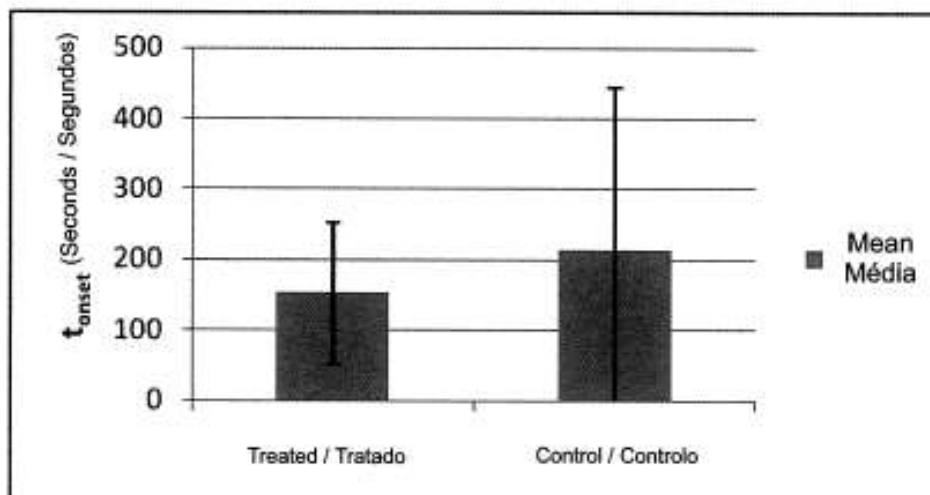


Figure 4- Mean values of onset time (tonset), obtained in the treated and control sites after application of ethyl nicotinate ($n=14\pm$ SD).

Figura 4- Valores médios do tempo de início de resposta (tonset), da zona tratada e da zona controlo após a aplicação do nicotinato de etilo ($n=14\pm$ DP).

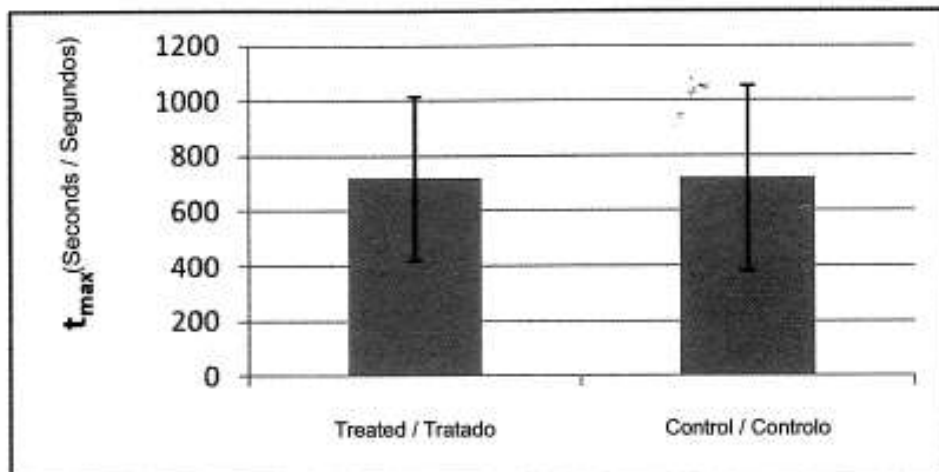


Figure 5- Mean values of the time for maximum response t_{max} , obtained in the treated and control sites after application of ethyl nicotinate ($n=14\pm SD$).
Figura 5- Valores médios do tempo de resposta máxima t_{max} , da zona tratada e da zona controlo após a aplicação do nicotinato de etilo ($n=14\pm DP$).

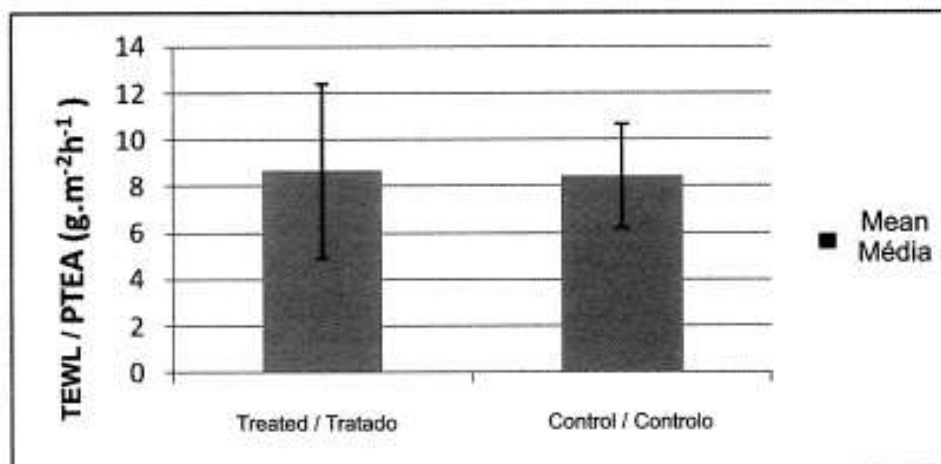


Figure 6- Mean values of TEWL in the treated and control sites ($n=15\pm SD$).
Figura 6- Valores médios de PTEA na região tratada e controlo ($n=15\pm DP$).

The application of the moisturizer caused differences in the parameters that reflect skin hydration. As can be seen in figures 7 and 8, the values of the treated site are higher than those of the control. A comparison of the

As variáveis que estão relacionadas com a hidratação mostram diferenças cutâneas após a aplicação do creme durante 15 dias. Como se pode ver nas figuras 7 e 8, o nível de hidratação do local tratado é superior ao

values provided by the two devices that measure SC hydration can be found in figure 9. There was a good correlation between the results provided by the MoistureMeter-SC and the Corneometer-CM 825 ($R^2=0,80$).

do controlo. Pretendeu-se efectuar uma comparação entre as respostas obtidas pelos dois equipamentos utilizados para avaliar a hidratação (fig. 9). Para tal, foi efectuada uma regressão linear que mostra a consistência dos dados obtidos pelo MoistureMeter-SC e o Corneometer-CM 825 ($R^2=0,80$).

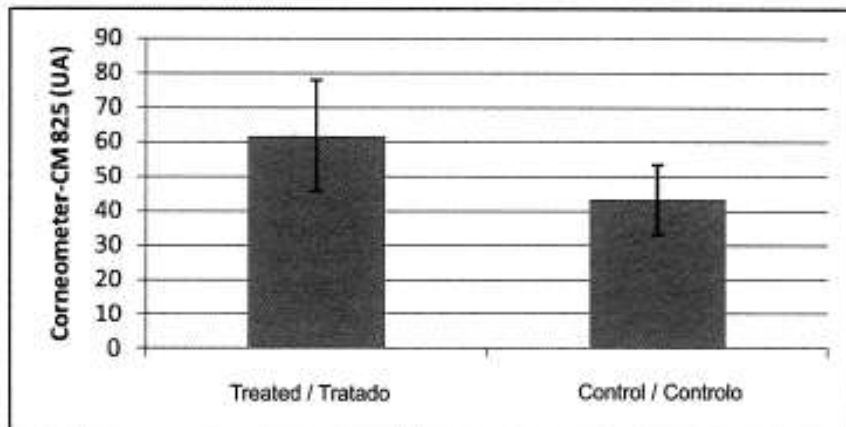


Figure 7- Mean values of capacitance in the treated and control sites ($n=14\pm SD$). * statistically significant difference $p=0.001$.

Figura 7- Valores médios de capacitância cutânea numa região tratada e controlo ($n=14\pm DP$). * denota diferença estatisticamente significativa, $p=0,001$.

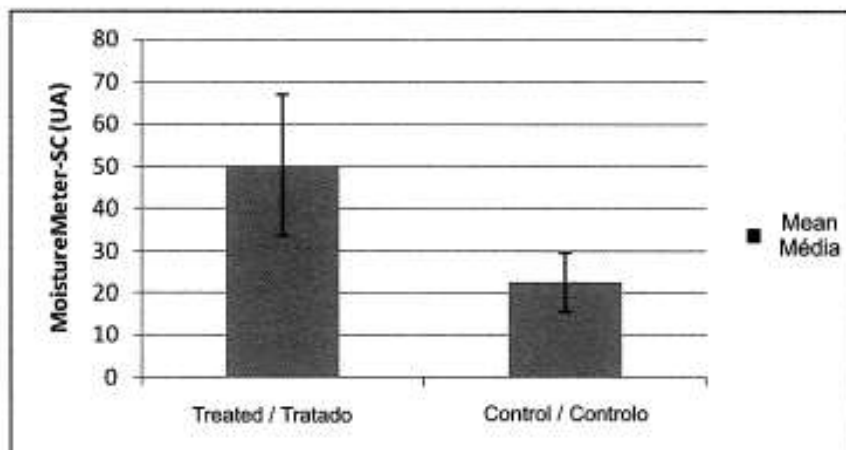


Figure 8- Mean values of stratum corneum hydration obtained with the MoistureMeter-SC in the treated and control sites ($n=15\pm SD$). * statistically significant difference, $p=0.001$.

Figura 8- Valores médios de hidratação do estado córneo obtidos com o MoistureMeter-SC, ($n=15\pm DP$). * denota diferença estatisticamente significativa, $p=0,001$.

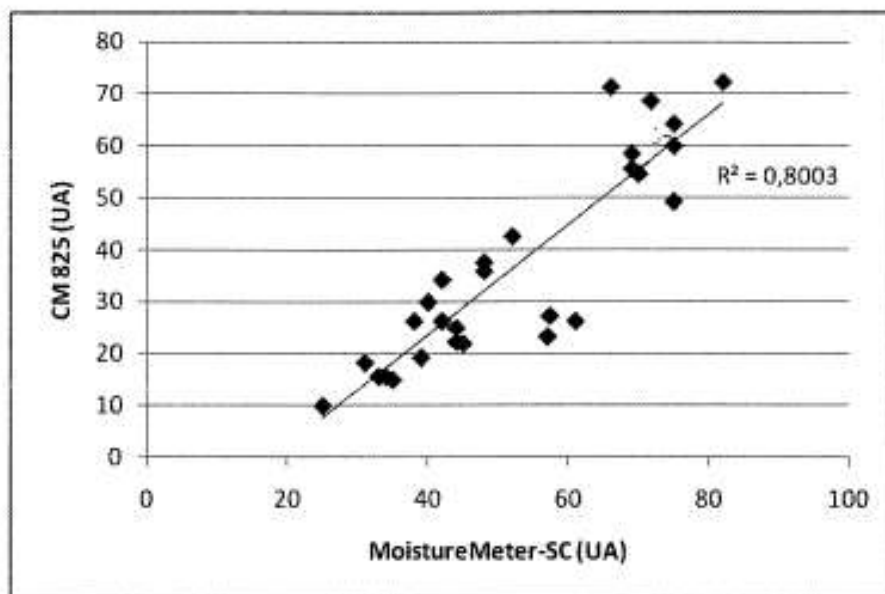


Figure 9- Relationship between the results obtained in the two devices under analysis (n=29)

Figura 9- Relação entre os resultados obtidos por ambos os aparelhos em análise (n=29).

Discussion

The stratum corneum is made up of several layers of adjacent cells, the corneocytes, immersed in a lipid matrix, and constitutes one of the most impermeable layers of the skin. The cutaneous barrier function is crucial to the survival under the hostile environmental conditions of the Earth⁽²³⁾. Dry skin is characterized by a group of changes that affect epidermal organization, impairing barrier function and lowering the hydration levels of the SC. The aim of this study was to assess the impact in xerotic skin of a moisturizer containing urea with an approach that combines not only direct methodologies, but also those that challenge the cutaneous response to aggressions and stimuli.

The first part of the study used a substance that is commonly employed to induce a controlled cutaneous lesion: SLS. This well known anionic surfactant is widely used in semi-solid formulations⁽¹⁴⁾. Its irritation potential results from the capacity to interact with the SC and cause adverse reactions⁽¹⁸⁾.

The protective efficacy of the cream against erythema after contact with SLS was assessed by colorimetry. A

Discussão

O estrato córneo é constituído por várias camadas de células justapostas, os corneócitos, imersos numa matriz lipídica, sendo um dos principais contributores para o estabelecimento de uma barreira impermeável e eficaz de protecção- a barreira cutânea. A função de barreira cutânea é fundamental para a sobrevivência sob as condições ambientais da Terra⁽²³⁾. A pele seca caracteriza-se por um conjunto de alterações que afectam a constituição da epiderme, causando diminuição da função de barreira cutânea e baixos níveis de hidratação do estrato córneo. O objectivo do estudo foi avaliar o impacto de um creme contendo ureia na pele com xerose de uma forma multifacetada, isto é, empregando metodologias directas de avaliação e métodos dinâmicos que desafiam a capacidade cutânea de resistir a agressões e estímulos.

Na primeira parte do estudo, foi aplicada uma substância vulgarmente utilizada como modelo da lesão cutânea: o LSS. É um tensoactivo aniónico muito conhecido, fazendo parte da constituição de inúmeras formulações⁽¹⁴⁾. Apresenta um potencial de

statistically significant difference was only found between the sites exposed and not exposed to the surfactant, even though the erythema was slightly less intense in the site that was treated with the moisturizer. The inexistence of measurable differences is probably linked to the high inter-individual variability in the erythematogenic response to SLS^[24].

TEWL is classically ascribed as indicative of skin barrier function^[25]. As expected, statistically significant differences were observed between the results obtained in all the sites. The protective effect of the moisturizer was evident, since the increase in TEWL was much higher in the untreated site than in the skin where the cream was applied for two weeks. Nevertheless, the formulation was not able to form a totally impermeable barrier, since these last results were higher than those of the control site, where only an occlusion was performed.

The protective capacity of different formulations containing ceramides was investigated with a similar approach by other authors. The study by di Nardo et al^[26] was conducted in the volar forearm of 14 volunteers, with concentrations of SLS ranging from 1 to 3%, applied under occlusion. Its results indicate that the application of ceramides decreases the susceptibility to SLS, since a decrease in TEWL and lower erythema intensity were observed in the treated sites. Another study^[27] assessed the influence of different creams and cream ingredients in barrier function, using the forearm and an application period of 7 weeks. Differences, positive but also negative, were observed in TEWL and SLS susceptibility, according to the formulation composition.

In the second part of the study, the assessment of the impact of repeated application of the moisturizer in hydration and barrier function employed static and dynamic approaches. TEWL measurements, as well as evaluation of the quickness and intensity of the vasodilating effect of ethyl nicotinate were employed. Both methodologies seem to indicate that cream application for 15 days has not improved the barrier significantly, since no significant differences were detected between treated and untreated sites in tonset, tr_{\max} and TEWL.

Both types of equipment employed in the assessment of hydration point toward positive results provided by the moisturizer and, as expected, significantly higher values were registered in the treated sites. The investigation also aimed to compare the performance of these devices. The MoistureMeter-SC has been introduced more recently to the market, however the good correlation between its data and those provided by the Corneometer CM 825 is indicative of its suitability. Additionally, more marked differences were observed when the first device was employed, which seems to be indicative of its higher sensitivity.

irritação da pele fruto da sua capacidade de alteração do estrato córneo, promovendo algumas reacções adversas^[18].

A eficácia protectora do creme contra o aparecimento de eritema após aplicação de LSS foi avaliada através de colorimetria. Os resultados indicam apenas diferença estatística entre os resultados do site não exposto ao tensoactivo e os sites expostos, embora o eritema fosse ligeiramente mais intenso no site onde não foi aplicado creme. Provavelmente, a inexistência de diferenças mensuráveis está também ligada à grande variabilidade interindividual associada à resposta eritematogénica ao LSS^[24].

A PTEA é um parâmetro classicamente associado ao estado da função da barreira cutânea^[25]. Tal como esperado, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os resultados de todos os sites. Assim, pode observar-se um efeito protector do creme, uma vez que no site exposto não tratado houve maior aumento de PTEA do que naquele onde foi feita a aplicação de creme durante 15 dias. Apesar disso, a capacidade de formar uma barreira totalmente impermeável é limitada, uma vez que não permitiu que estes últimos fossem idênticos ao do site controlo onde apenas foi aplicado o adesivo oclusivo.

A capacidade protectora de diferentes formulações contendo ceramidas foi estudada com uma abordagem semelhante por outros autores. O estudo de di Nardo et al^[26] foi feito no antebraço de 14 voluntários, aplicando-se concentrações de LSS a 1% e 3% sob oclusão. Os seus resultados indicaram um efeito positivo da aplicação de ceramidas na diminuição da susceptibilidade ao LSS, uma vez que, houve uma diminuição da PTEA e índices mais baixos de eritema nos sites tratados. Noutro estudo^[27] avaliaram-se diferentes cremes ou constituintes de cremes na função de barreira cutânea usando o antebraço como local anatómico de estudo e um período de aplicação de 7 semanas. Notaram diferenças, nalguns casos positivas e noutros negativas, na PTEA e na susceptibilidade ao LSS de acordo com a composição da formulação aplicada.

A primeira parte do estudo evidenciou a capacidade protectora do creme hidratante, limitando o contacto de uma substância irritante com a pele.

Para a avaliação do impacto da aplicação repetida do creme sobre a hidratação e a função de barreira cutânea, foram utilizadas abordagens estáticas e dinâmicas de demonstração da eficácia. A primeira recorreu à medição da PTEA, enquanto que a rapidez e a intensidade do efeito vasodilatador do nicotinato de etilo foram as variáveis dinâmicas estudadas. Os resultados obtidos por ambas as metodologias mostram que a aplicação do creme durante o período de 15 dias não provoca alterações positivas na barreira. Caso o produto apresentasse eficácia sobre esta

The superior performance probably results from a more uniform contact between its pressure controlled probe and the skin.

There are references in the literature to studies with similar objectives to this investigation. In a work with hexyl nicotinate^[29], higher values of tonset and tmax were registered after cutaneous application of a cream containing 5% urea. However, it should be noted that this study employed a molecule with a higher molecular weight and partition coefficient (the logP of hexyl nicotinate is 3.5, and only 1.3 for ethyl nicotinate (calculated from the software ACD/LogP, ACD/Labs, Toronto, Canada)). Additionally, these results do not allow any conclusions about the efficacy of the formulation, since the tonset and tmax of an untreated control were not determined. Comparisons were only established between the nicotinate permeation through skin treated with two different formulations (one containing urea and another that was rich in lipids).

A study conducted by Vuleta et al^[29] reports contradictory effects caused by formulations containing urea, depending on the type of product in which this molecule was integrated. In some formulations a decrease in TEWL and reactivity to SLS was noted, whereas in others the opposite occurred. Another work can be found in the literature describing decrease in TEWL after application for 20 days of three formulations containing urea in different compositions and concentrations^[30]. This study also investigated the formulation effect on epidermal capacitance, however, no differences in hydration were established between the control and treated sites. The results obtained in the second part of the current investigation enable to conclude that the repeated application of the tested formulation causes, primarily, a superficial action, revealed by an increase in the water content of the stratum corneum, that is certainly attributable to the action of the occlusive and hygroscopic ingredients. The fact that no differences were established through the methodologies that assess the competence of the barrier function is indicative of its incapacity to modify the various cellular epidermal processes that lead to xerosis, and that are much more difficult to correct.

In conclusion, this study exposes positive changes to the cutaneous barrier and hydration caused by the formulation, even though the deeper characteristics of xerosis were not dealt with. The work also confirmed the advantage of employing a methodology that challenges the cutaneous response in the efficacy study of a cosmetic product.

propriedade, o tonset e tmax seriam mais elevados e a PTEA mais baixa no local tratado. No entanto, não se observaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas.

Na avaliação da hidratação, ambos os aparelhos indicam que a utilização do creme teve resultados positivos. Tal como era esperado, obtiveram-se valores significativamente mais elevados no local tratado face ao controlo. Outro objectivo do trabalho foi comparar dois aparelhos de medição da hidratação. O aparelho MoistureMeter-SC é mais recente, no entanto a boa correlação obtida entre os resultados por este fornecidos e os do Corneometer CM 825 é reveladora da sua adequabilidade. Adicionalmente, nos dados proporcionados pelo primeiro aparelho, as diferenças entre local tratado e controlo são mais evidentes, o que é indicador da sua mais elevada sensibilidade. Esta está provavelmente associada à capacidade apresentada pela sonda do MoistureMeter-SC de, através de um indicador luminoso, assegurar um contacto mais uniforme entre a sonda e a pele.

Na literatura podem ser encontrados trabalhos com objectivos semelhantes aos deste estudo. Num estudo utilizando nicotinato de hexilo^[29], observam-se valores de tonset e tmax mais elevados após aplicação cutânea de um creme contendo 5% de ureia. Pode salientar-se logo à partida que este utilizou uma molécula de maior peso molecular e coeficiente de partilha octanol/água (logP=3,5 para o nicotinato de hexilo e logP=1,3 para o nicotinato de etilo (calculados a partir do software ACD/LogP, ACD/Labs, Toronto, Canadá)). No entanto, estes resultados não permitem concluir acerca da eficácia da formulação contendo ureia uma vez que não foram estudados os parâmetros tonset e tmax da pele não tratada. Apenas são feitas comparações entre a permeação do nicotinato de hexilo através da pele tratada com dois cremes diferentes (um contendo ureia e outro rico em lípidos).

Outro trabalho realizado por Vuleta et al^[29] refere acções contraditórias de formulações contendo ureia consoante a composição do produto em que esta se insere. Algumas formulações causaram diminuição da PTEA e menor reactividade ao laurilsulfato de sódio, enquanto que noutros se observou o oposto. Na literatura pode ainda encontrar-se um estudo que mostra diminuição da PTEA após aplicação durante 20 dias de três formulações contendo ureia em diferentes composições e percentagens^[30]. Nesse trabalho também foi estudada a acção sobre a capacitância epidérmica, observando-se que no final do período de aplicação não há diferença entre os valores do local tratado e controlo.

Os resultados obtidos pela segunda parte do presente estudo permitem concluir que a aplicação repetida do produto testado causa, sobretudo, uma acção superficial, que se manifesta no aumento dos níveis de

água do estrato córneo e que se deverá certamente aos diferentes componentes higroscópicos e oclusivos que o constituem. O facto de não se terem observado diferenças através das metodologias que avaliam a competência da função de barreira é indicador da sua incapacidade em modificar os desequilíbrios nos processos celulares da epiderme que levam ao aparecimento da pele seca, que são muito mais difíceis de corrigir.

Em suma, os resultados obtidos indicam que a aplicação da formulação provocou alterações positivas na barreira e hidratação cutânea, embora fosse incapaz de alterar as características mais profundas da xerose. O estudo confirmou a vantagem da aplicação de uma metodologia que desafia a resposta cutânea na caracterização da eficácia de um produto cosmético.

Acknowledgements

The authors would like to thank Saninter/SFD for providing the products tested in the study and the collaboration of Ana Lourenço.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Saninter/SFD a cedência das amostras utilizadas neste estudo e a colaboração de Ana Lourenço.

References / Referências

- [1]. Elias PM, Menon GK. Structural and biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. In: Elias PM, ed. *Advances in Lipid Research*. Vol. 24. Skin Lipids. New York: Academic Press, 1991: 1-26.
- [2]. Barton S. Formulation of Skin Moisturizers in Skin Moisturization Leyden J. J., Rawlings A. V.; Marcel Dekker, Nova York, 2002 p. 547-584.
- [3]. Marty JP NMF and cosmetology of cutaneous hydration *Ann Dermatol Venerol*. 2002 Jan;129(1 Pt 2):131-6.
- [4]. Criqui MH, Fronck A, Klauber MR, Barrett-Connor E, Gabriel S. The sensitivity and predictive value of traditional clinical evaluation peripheral arterial disease: results from non-invasive testing in a defined population. *Circulation* 1985; 71: 516-522.
- [5]. Yang L, Mao-Quiang M, Taljebani M, Elias PM, Feingold KR. Topical stratum corneum lipids accelerate Barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br J Dermatol*, 1995; 133,5:679-685.
- [6]. Man MQ, Feingold KR, Elias PM. Exogenous Lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch. Dermatol*, 1993; 129, 6: 728-738.
- [7]. Reed JT, Ghadially R, Elias PM. Skin type, but neither race nor gender, influence epidermal permeability barrier function. *Arch. Dermatol*, 1995; 131, 10: 1134-1138.
- [8]. Loden M, Barany E. Skin - identical lipids versus petrolatum in the treatment of tape - stripped and detergent-perturbed human skin. *Acta Dermatol. Venerol.*, 2000; 80, 6: 412-415.
- [9]. Zhai H, Maibach H. Micro Wound healing models. In: Rovee D, Maibach H, editors. *The epidermis in wound healing*. Boca Raton: CRC Press; 2004. pp 141-151.
- [10]. Jackwerth B, Krachter HV, Matthies W. Dermatological test methods for optimising mild tenside preparations. *Parfümerie und Kosmetik*. 1993; 74:134-141.
- [11]. Wilhelm KP, Freitag G, Wolf HH. Surfactant induced skin irritation and skin repair. Evaluation of the acute irritation model by non-invasive techniques. *J Am Acad Dermatol*. 1994; 30: 944.
- [12]. Lee, CH, Maibach H. Sodium Lauryl Sulfate in Dermatotoxicology. In: Zhai H, Maibach H, editors. *Dermatotoxicology*. Boca Raton: CRC Press; 2004. pp 479-506.
- [13]. Zhai H, Poblete, N., Maibach H. Sodium Lauryl Sulfate damaged skin in vivo in man: a water barrier repair model. *Skin Res Technol*, 1998; 4:24.
- [14]. Nikitatis JM, McEwen GN, Wenninger JA. *CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary*, 4th ed. Washington DC: The cosmetic, Toiletary and Fragrance Association Inc.; 1991.
- [15]. Santos, D, Bahia MFG. Promotores de penetração e absorção. *Cosmetics & Toiletries* (edição portuguesa), 1995, Vol 7, n. 5, p 42-51.
- [16]. Allen Jr., L. V., *The art, science and technology of pharmaceutical compounding*, 2^o ed, Washington: American pharmaceutical association, 2002.
- [17]. Effendy I, Maibach HI. Detergent and skin irritation. *Clinics and Dermatology*, 1996, Vol 14, pp 15-21.
- [18]. Maibach HI, Zhai H. Sodium Lauryl Sulfate in Dermatotoxicology. In Lee, CH, Maibach H I, editors. *Dermatotoxicology*, 6th ed, USA: CRC Press; 2004. pp 481-506.
- [19]. Agner T, Serup J. Sodium Lauryl Sulphate for irritant patch testing: a dose response study using bioengineering methods for determination of skin irritation. *J Invest Dermatology*, 1990, 95: 543-547.
- [20]. Goodyear MD, Krleza-Jeric K, Lemmens T. The Declaration of Helsinki. *BMJ* 2007; 335:624-625.
- [21]. Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement: A report from the standardization group of the European Society of contact Dermatitis. *Contact Derm.*, 1990, 22:164-172.
- [22]. Bircher AJ, de Boer EM, Agner T, Wålberg JE, Serum J. (1990) Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry: A report from the Standardization Group of the European Society of contact Dermatitis. *Contact Derm.*, 30:65-72.
- [23]. Menon GK, Norlén L. Stratum Corneum Ceramides and Their Role in Skin Barrier Function. In: *Skin Moisturization*, Leyden JJ, Rawlings AV, Nova York, Marcel Dekker, 2002, pp 31-47.
- [24]. Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI. Cutaneous sodium lauryl sulphate irritation potential: age and regional variability. *Br J Dermatol*. 1990; 123(5):607-13.
- [25]. Rosado C, Pinto P, Rodrigues LM. Comparative assessment of the performance of two generations of Tewameter(R): TM210 and TM300. *Int J Cosmet Sci*. 2005;27(4):237-41.
- [26]. di Nardo A, Sugino K, Wertz P, Ademola J, Maibach HI. Sodium lauryl sulfate (SLS) induced irritant contact dermatitis: a correlation study between ceramides and in vivo parameters of irritation. *Contact Dermatitis*: 1996; 35(2): 86-91.
- [27]. Buraczewska I, Berne B, Lindberg M, Törmä H, Loden M. Changes in skin barrier function following long-term treatment with moisturizers, a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2007;156(3):492-8.
- [28]. Duval C, Lindberg M, Boman A, Johnsson S, Edlund F, Loden M. Differences among moisturizers in affecting skin susceptibility to hexyl nicotinate, measured as time to increase skin blood flow. *Skin Res Technol*. 2003 Feb;9(1):59-63.
- [29]. Savica S, Tamburic S, Savic M, Cekic N, Milic J, Vuleta G. Vehicle-controlled effect of urea on normal and SLS-irritated skin. *Int J Pharm*. 2004 Mar 1;271(1-2):269-80.
- [30]. Loden M. Urea-containing moisturizers influence barrier properties of normal skin. *Arch Dermatol Res*. 1996 Feb;288(2):103-7.