

MARIA DEL CARMEN VELAZQUEZ PEREDA

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO EXTRAÍDO DOS
GRÃOS VERDES DE *Coffea arabica* L. E DOS
FITOESTERÓIS DE *Brassica campestris* L. NA MELHORA
DA CELULITE E DA GORDURA LOCALIZADA”**

CAMPINAS

Unicamp

2009

MARIA DEL CARMEN VELAZQUEZ PEREDA

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO EXTRAÍDO DOS
GRÃOS VERDES DE *Coffea arabica* L. E DOS
FITOESTERÓIS DE *Brassica campestris* L NA MELHORA
DA CELULITE E DA GORDURA LOCALIZADA”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS

Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

P413a Pereda, Maria Del Carmen Velazquez
Avaliação dos efeitos do óleo extraído dos grãos verdes de *Coffea arabica* L.e dos fitoesteróis de *Brassica campestris* L.na melhora da celulite e da gordura localizada / Maria Del Carmen Velazquez Pereda. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Mary Luci de Souza Queiroz
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Celulite. 2. Pele. 3. Lipodistrofia. 4. Tecido adiposo.
5. Adipócitos. 6. *Coffea arabica*. 7. Fitosteróis. 8. Lipólise.
I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Study of the effects obtained with the oil extracted from the green seeds of *Coffea arabica* L. and phytoosterols of *Brassica campestris* L. in the cellulite improvement

Keywords:

- Cellulite
- Skin
- Lipodistrophy
- Adipose tissue
- Adipocyte
- *Coffea arabica*
- Phytosterols
- Lipolysis

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Mary Luci de Souza Queiroz

Prof^º. Dr^º. Luiz Claudio Di Stasi

Prof^º. Dr^º. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Machado De Moraes

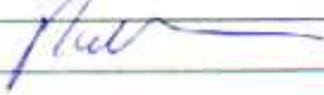
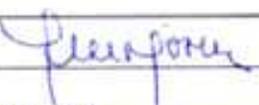
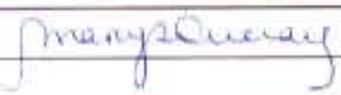
Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Santana

Data da defesa: 25-06-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Maria Del Carmen Velazquez Pereda

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Luiz Claudio Di Stasi	
Professor (a) Doutor (a) Paulo Eduardo Martins Ribolla	
Professor (a) Doutor (a) Aparecida Machado De Moraes	
Professor (a) Doutor (a) Maria Helena Santana	
Professor (a) Doutor (a) Mary Luci De Souza Queiroz	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/06/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus filhos
Danilo e Maya,
minhas maiores criações e amores.*

*Ao meu Amigo,
companheiro e Marido
Robinson.*

*Aos meus Pais,
por terem me ensinado a
ser persistente.*

AGRADECIMENTOS

Ao querido Dr. Pianowski, amigo, mestre e ser profissional admirado que sem saber, fez isso tudo possível por me indicar a Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, a qual soube, melhor do que qualquer um, com seus lindos olhos externos e internos prever o quanto seria empolgante e satisfatório este nosso trabalho juntas.

Ao querido amigo Gustavo Dieamant, a quem agradeço de forma mais veemente por ter sido fundamental nesta realização e sem o qual isto não haveria sido possível.

À querida Samara Eberlin por ter estado ao meu lado o tempo todo, explicando e participando de tudo.

À querida Cecília Nogueira por todos os trabalhos que fizemos juntas, muitas teses, certamente, que se transformaram em patentes e produtos para o mercado.

Ao Prof. Dr. Daniel Barrera por desenvolver parte dos componentes que fizeram parte deste estudo.

À Dra Carla Rosana e Idalina Santos da Evic Brasil, as quais foram responsáveis pelos belíssimos estudos clínicos realizados.

À EVIC Brasil, pelo apoio na condução dos testes clínicos.

À Chemyunion Química, empresa que tem a ciência e a pesquisa de alto nível, como suas principais metas.

Aos amigos do laboratório de CFU, em especial aqueles que tornaram os dias de convívio mais agradáveis.

À Sueli Cristina de Oliveira e Raphael Marcos Pereira, exemplos de luta, esforço e recompensa.

À equipe de Pesquisa e Desenvolvimento da Chemyunion Química, com toda admiração e orgulho que tenho por eles.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, possibilitaram a perfeita realização deste trabalho.

“A força
não provém da capacidade física e sim
de uma vontade indomável”

(Mahatma Ghandi)

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

Clinicamente, a celulite é definida como uma alteração na topografia da pele que ocorre principalmente em mulheres, na região pélvica, abdômen e membros inferiores, caracterizando-se pelo aspecto de “casca de laranja”. Etiologicamente, celulite é definida como uma desordem metabólica localizada do tecido subcutâneo que provoca uma alteração na forma corporal, onde muitas estruturas são alteradas na derme, na micro circulação e, também, no tecido adiposo. Este fenômeno, por sua vez, está associado com modificações morfológicas, histoquímicas e bioquímicas na pele e resultam nas alterações que levam ao desconforto estético e à aparência clínica da celulite. Partes destas alterações decorrem do acúmulo de lipídeos no interior de adipócitos, células chave no equilíbrio lipólise-lipogênese, o qual é visto hoje como uma unidade glandular funcional capaz de promover uma relação direta com o sistema nervoso central. Pesquisas atuais indicam que a busca por substâncias capazes de promover a homeostase dermo-hipodérmica através de uma ação lipolítica direta, aliada ao estímulo da produção de fatores de crescimento, especialmente TGF- β e GM-CSF, bem como de proteínas da matriz extracelular, como colágeno, elastina e GAGs, além de substâncias reguladoras do metabolismo adipocitário. Tendo em vista a complexidade clínica e estética da celulite, bem como as alterações bioquímicas dérmicas e hipodérmicas, buscamos neste trabalho avaliar os efeitos da associação entre o extrato oleoso dos grãos verdes de café (*Coffea arabica* L.) (OC) e os fitoesteróis de canola (*Brassica campestris* L.) (F), cuja combinação resulta no produto Slimbuster[®] L (SBL). Para isto, avaliamos neste estudo os efeitos *in vitro* (fibroblastos e adipócitos humanos), ex-vivo (fragmentos de pele humana) e clínicos (voluntários humanos) de SBL, OC e/ou F, utilizando metodologias e modelos experimentais que possibilitassem a visão global do processo celulítico. Os resultados demonstram que SBL foi capaz de estimular significativamente a lipólise, a síntese de leptina em cultura de adipócitos humanos, a produção de GM-CSF, TGF- β , colágeno, elastina e GAGs em cultura de fibroblastos humanos, a contração de fibroblastos em gel de colágeno, bem como promover a melhora das características histológicas gerais da pele (ex-vivo). As frações isoladas (OC e F) também demonstraram efeitos

importantes e distintos, sendo estes mais pronunciados para OC e potencializados quando ambos são associados (SBL). Os resultados clínicos demonstram que o produto Slimbuster® L foi bem apreciado pelas voluntárias quanto aos itens “facilidade de aplicação”, “pele mais lisa” e “pele mais macia”, “atenuação de celulite” e “redução de gordura”, especialmente após 60 dias de utilização de uma loção corporal contendo 3,0% (p/p) do produto. Os resultados das medidas instrumentais obtidos demonstram que o produto foi capaz de reduzir significativamente as medidas na região da coxa (superior, mediana e inferior), sendo esta diminuição centimétrica observada em aproximadamente 30% do painel em D30 e em 50% do painel em D60. As demais áreas avaliadas - abdome, pernas e quadris - não apresentaram significância estatística, porém devem ser levadas em consideração, pois apresentaram forte tendência após 60 dias de aplicação da loção corporal, indicando uma possível melhora significativa com o uso prolongado. A análise adipométrica das voluntárias demonstrou também forte tendência de redução da taxa de gordura localizada nas regiões do abdome, supra-ílica, supra-espinal e coxa proximal. A espessura da hipoderme através da ultrassonografia (ecografia) possibilitou observar uma redução superior a 2% nas regiões da coxa e abdome em aproximadamente 70% do painel em todos os tempos experimentais avaliados (D30 e D60). De acordo com todos os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o produto Slimbuster® L pode ser considerada uma ferramenta segura e eficaz na prevenção e tratamento tópico da gordura localizada e celulite.

Cellulite is an alteration of the topography of the skin that occurs mainly in women on the pelvic region, lower limbs and abdomen. It is characterized by a padded or 'orange peel' appearance. In accordance with its etiology, cellulite is defined as a metabolic disorder of the subcutaneous tissue that provokes an alteration in the physical form, where many structures are altered in the dermis, in the microcirculation and within the adipocytes. This phenomenon is associated to morphological, histochemical and biochemical modifications in the skin, culminating in the alterations that lead to the aesthetic discomfort and to the clinical appearance of the cellulitis. These alterations are consequence, in parts, from the lipid accumulation into the adipocytes, crucial cells in the lipolysis-lipogenesis balance, and it is considered as a glandular functional unit able to promote a fine-tune interaction with the central nervous system. Recent studies indicate the search for active substances with the ability to promote the dermo-hypodermic homeostasis through lipolytic action, allied to the stimulus of the production of growth factors, mainly TGF- β and GM-CSF, proteins of extracellular matrix, such as collagen, elastin and glycosaminoglycans, as well as substances able to regulate the adipocyte metabolism. According to the clinical and aesthetic complexity of the cellulitis, as well as the biochemical alterations in the dermis and hypodermis, in this work we evaluate the effects of green coffee seed oil (*Coffea arabica* L.) and canola phytoesters (*Brassica campestris* L.) (F), whose association is the product Slimbuster L (SBL). In this way, we evaluate in this study the effects of these compounds through in vitro, ex-vivo and clinical assessment, using methodologies and experimental models that show the global vision of the process of cellulites. The results demonstrate that SBL was able to stimulate significantly the lipolysis, the synthesis of leptin in human adipocyte cell culture, the production of GM-CSF, TGF- β , collagen, elastin and GAGs in human fibroblast cell culture, the contraction of fibroblasts in collagen gel matrix, as well as promoting the improvement of skin general histologic aspect. The separated fractions (OC and F) also demonstrated important and different effects, being this more pronounced for OC and when both (OC e F) are associated (SBL). The clinical results demonstrate that Slimbuster L was well

appreciated by the volunteers for the items “facility of application”, “more smooth skin” and “shear it more me“ reduction of cellulite” and “reduction of fat accumulation”, specially after 60 days use of a body lotion containing 3.0% (w/w) of SBL. The results of the instrumental assessment obtained demonstrate that SBL was able to reduce significantly the measures in the region of the thigh (superior, medium and inferior), being this centrimetric reduction observed in approximately 30% of the panel at D30 and in 50% of the panel at D60. The other evaluated areas - abdome, legs and hips - did not present statistical significance, however they must be taken into account since they presented strong tendency after 60 days of application of the body lotion, indicating a possible improvement with the time of use. The adipometric analysis of the volunteers demonstrated a strong tendency of accumulated fat reduction in the areas of abdomen, supra-iliac, supra-spinal and proximal thigh. The thickness of hypodermis measured by ultrasonography (ecography) showed a reduction superior to 2% in the areas of the thigh and abdomen in approximately 70% of the panel in the all experimental evaluated times (D30 and D60). In according to the results presented in this work, we can conclude that the product Slimbuster L can be considered a safe and efficient tool in the prevention and topical treatment of the located fat and cellulite.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Fatores protéicos e não-protéicos produzidos e secretados pelo tecido adiposo branco.....	58
Tabela 2 Composição percentual média de fitoesteróis nos óleos vegetais.....	70
Tabela 3 Descrição qualitativa e quantitativa da formulação utilizada nos estudos de eficácia clínica.....	93
Tabela 4 Condições experimentais e modo de aplicação dos produtos no estudo de eficácia subjetiva.....	94

	Pág.
Figura 1 Diagrama esquemático da pele demonstrando 5 zonas distintas.....	49
Figura 2 Hidrólise de triglicerídeos (TAG) pela ação da enzima lípase: liberação de ácidos graxos livres e glicerol.....	53
Figura 3 Prováveis mecanismos intracelulares de regulação dos processos de lipólise e lipogênese.....	55
Figura 4 Interação entre adipócitos brancos uniloculares e tecido conectivo (fibras).....	56
Figura 5 Diferentes graus da celulite: Grau II (i), Grau III (ii) e Grau IV (iii) em repouso (a) e após contração do glúteo (b).....	64
Figura 6 Estrutura dos diterpenos de <i>C. arábica</i>	68
Figura 7 Estrutura dos principais fitoesteróis encontrados em plantas.....	71
Figura 8 Efeitos do Slimbuster [®] L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos.....	105
Figura 9 Efeitos do Slimbuster [®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a liberação de ácidos graxos livres (NEFA) em cultura de adipócitos humanos....	107

Figura 10	Efeitos do Slimbuster [®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de leptina em cultura de adipócitos humanos.....	109
Figura 11	Efeitos do Slimbuster [®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de TGF- β em cultura de fibroblastos humanos.....	111
Figura 12	Efeitos do Slimbuster [®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de GM-CSF em cultura de fibroblastos humanos.....	113
Figura 13	Efeitos do Slimbuster [®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de colágeno em cultura de fibroblastos humanos.....	115
Figura 14	Efeitos do Slimbuster [®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos.....	117
Figura 15	Efeitos do Slimbuster [®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de GAGs em cultura de fibroblastos humanos.....	119
Figura 16	Resultados da Avaliação Qualitativa do Conteúdo Intracelular de Lipídeos (Controle).....	121
Figura 17	Resultados da Avaliação Qualitativa do Conteúdo Intracelular de Lipídeos (Slimbuster [®] L).....	121
Figuras 18 e 19	Resultados da Avaliação Histológica (Controle).....	122

Figuras 20 e 21	Resultados da Avaliação Histológica (Slimbuster® L).....	123
Figura 22	Resultados da Avaliação da Contração do Gel de Colágeno (Controle Negativo).....	124
Figura 23	Resultados da Avaliação da Contração do Gel de Colágeno (Controle Positivo).....	125
Figura 24	Resultados da Avaliação da Contração do Gel de Colágeno (Slimbuster® L).....	125
Figura 25	Apreciabilidade cosmética após 30 dias de aplicação de uma formulação de loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster® L.....	126
Figura 26	Apreciabilidade cosmética após 60 dias de aplicação de uma formulação de loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster® L.....	127
Figura 27	Redução centimétrica estimada média (cm) na região do estômago das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	129
Figura 28	Redução centimétrica estimada média (cm) na região do quadril inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	130

Figura 29	Redução centimétrica estimada média (cm) na região coxa superior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	132
Figura 30	Redução centimétrica estimada média (cm) na região coxa mediana das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	134
Figura 31	Redução centimétrica estimada média (cm) na região coxa inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	136
Figura 32	Redução centimétrica estimada média (cm) na região da perna superior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	138
Figura 33	Redução centimétrica estimada média (cm) na região da perna inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	140
Figura 34	Redução média estimada da espessura da hipoderme (cm) na região do braço das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	142

Figura 35	Redução média estimada da espessura da hipoderme (cm) na região do abdome das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	143
Figura 36	Redução média estimada da espessura da hipoderme (cm) na região da coxa das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	145
Figura 37	Avaliação do peso médio (Kg) das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	146
Figura 38	Redução adipométrica média na região do abdome das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	148
Figura 39	Redução adipométrica média na região supra-ílica das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	149
Figura 40	Redução adipométrica média na região supra-espinal das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	151
Figura 41	Redução adipométrica média na região da perna inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.....	153

	Pág.
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	43
1.1- Etiopatogenia e histopatologia.....	46
1.2- Integridade da pele e envolvimento da unidade matricial.....	50
1.3- O tecido adiposo como órgão endócrino e centro regulador do metabolismo.....	52
1.4- Critérios de avaliação e classificação da celulite.....	62
1.5- Evolução do mercado e relevância da utilização de produtos dermocosméticos na prática dermatológica atual.....	66
1.6- Slimbuster® L.....	67
1.6.1- Óleo de café verde.....	67
1.6.2- Fitoesteróis de canola.....	69
2- OBJETIVOS.....	73
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3.1- Amostras-teste.....	79

3.1.1- Óleo de café verde.....	79
3.1.2- Fitoesteróis de canola.....	79
3.1.3- Slimbuster® L.....	79
3.2- Estudos <i>in vitro</i>.....	80
3.2.1- Linhagem de adipócitos humanos.....	80
3.2.2- Linhagem de fibroblastos humanos.....	81
3.2.3- Protocolo de incubação das culturas celulares com as amostras avaliadas.....	82
3.2.4- Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular.....	83
3.2.5- Quantificação de citocinas TGF- β e GM-CSF.....	83
3.2.6- Mensuração da produção dos componentes da matriz extracelular.....	84
3.2.6.1- Colágeno.....	84
3.2.6.2- Elastina.....	85
3.2.6.3- Glicosaminoglicanas.....	85
3.2.7- Quantificação de leptina.....	86
3.2.8- Quantificação de ácidos graxos livres (NEFA).....	86
3.2.9- Coloração dos Triglicerídeos Intracelulares com corante vermelho lipídeo- específico.....	87

3.2.10- Avaliação da capacidade contrátil em gel de colágeno.....	87
3.3- Análise estatística.....	88
3.4- Avaliação histológica.....	88
3.4.1- Coleta do material e preparo das amostras para tratamento com as amostras-teste.....	89
3.4.2- Protocolo de incubação dos fragmentos de pele com as amostras a serem avaliadas.....	89
3.4.3- Realização dos cortes histológicos.....	90
3.5- Estudos clínicos.....	90
3.5.1- Avaliação da eficácia.....	90
3.5.1.1- Eficácia subjetiva e objetiva.....	90
3.5.1.1.1- Objetivo do estudo.....	90
3.5.1.1.2- Relevância do estudo e aspectos éticos.....	91
3.5.1.1.3- Princípio metodológico.....	92
3.5.1.1.4- Tipo de estudo.....	92
3.5.1.1.5- Formulação e aplicação do produto.....	93
3.5.1.1.6- Voluntários.....	94
3.5.1.1.7- Benefícios do estudo.....	97

3.5.1.1.8- Exigências requeridas pelo estudo.....	97
3.5.1.1.9- Controle de observação e modalidades de protocolo.....	98
3.5.1.2- Apreciabilidade cosmética e eficácia subjetiva.....	99
3.5.1.3- Eficácia instrumental.....	100
3.5.1.3.1- Avaliação da espessura da hipoderme.....	100
3.5.1.3.2- Medidas centimétricas e peso corporal.....	100
3.5.1.3.3- Avaliação da gordura corporal.....	102
3.5.2- Análise estatística.....	102
4- RESULTADOS.....	103
4.1- <i>In vitro</i>.....	105
4.1.1- Avaliação do potencial citotóxico do Slimbuster® L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F).....	105
4.1.2- Avaliação do efeito lipolítico do Slimbuster® L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F)....	106
4.1.3- Avaliação dos efeitos do Slimbuster® L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de leptina.....	108

4.1.4- Avaliação dos efeitos do Slimbuster® L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de fatores de crescimento.....	110
4.1.4.1- TGF-β.....	111
4.1.4.2- GM-CSF.....	113
4.1.5- Avaliação dos efeitos do Slimbuster® L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de proteínas da matriz extracelular (MEC).....	114
4.1.5.1- Colágeno.....	115
4.1.5.2- Elastina.....	117
4.1.5.3- Glicosaminoglicanas.....	119
4.2- Avaliação qualitativa do conteúdo intracelular de lipídeos (AdipoRed™ Reagent).....	120
4.2.1- Efeitos do Slimbuster® L (SBL) em adipócitos humanos corados com corante lipofílico específico.....	120
4.3- Avaliação histológica.....	122
4.3.1- Efeitos do Slimbuster® L (SBL) em adipócitos humanos corados com corante lipofílico específico.....	122
4.4- Resultados da avaliação da contração em gel de colágeno...	124
4.4.1- Efeitos do Slimbuster® L (SBL) em cultura de fibroblastos humanos em gel de colágeno.....	124

4.5- Eficácia clínica.....	126
4.5.1- Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma loção cremosa corporal contendo 3% de Slimbuster® L.....	126
4.5.1.1- Após 30 dias.....	126
4.5.1.2- Após 60 dias.....	127
4.5.2- Avaliação instrumental (objetiva) dos efeitos de uma loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster® L através dos seguintes parâmetros: redução da gordura corporal, redução das medidas centimétricas e redução da espessura da hipoderme.....	128
4.5.2.1- Medidas antropométricas.....	128
4.5.2.2- Espessura da hipoderme.....	142
4.5.2.3- Peso das voluntárias.....	146
4.5.2.4- Adipometria.....	148
5- DISCUSSÃO.....	155
6- CONCLUSÃO.....	171
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	175
8- ANEXOS.....	185



1- INTRODUÇÃO

Em uma primeira descrição médica científica para o termo celulite, Alquier e Paviot (1920) descreveram como sendo um processo celular não-inflamatório distrófico do tecido mesenquimal causado por uma desordem do metabolismo da água, o qual produzia uma saturação dos tecidos adjacentes pelos líquidos intersticiais. Esta distrofia foi vista como sendo uma reação local a um estímulo traumático, tóxico, infeccioso ou glandular (Rossi e Vergnanini, 2000).

O termo celulite teve sua origem na França, onde encontra-se descrito na literatura médica há mais de 150 anos (Scherwitz e Braun-Falco, 1978), apresentando diversas sinonímias de relevância clínica (Lotti et al., 1990; Rossi e Vergnanini, 2000), as quais surgiram na tentativa de adequar a nomenclatura às alterações histomorfológicas encontradas nesta disfunção. Dentre elas, destacam-se lipodistrofia (Rona et al., 2006; Terranova et al., 2006; Lucassen et al., 1997), paniculopatia edemato-fibroesclerótica (Terranova et al., 2006), hidrolipodistrofia (Gonçalves et al., 2005; Medeiros, 2004; Francischelli et al., 1999a; Francischelli et al., 1999b), adiposidade edematosa (Draeos, 2005; Lotti et al., 1990), paniculose (Segers et al., 1984), lipoesclerose (Terranova, 2006) e fibroedema gelóide (Milani et al., 2006). Em partes, estas denominações diferem em relação a sua patogenicidade e aspectos morfológicos, porém devido à pluralidade de nomenclaturas, acredita-se que este seja o motivo de diversos autores preferirem o termo celulite ou lipodistrofia ginóide (GLD).

Apesar do forte impacto que apresenta tanto na área médica quanto na mídia, devido à ausência de morbidade e mortalidade a ela relacionadas, a celulite não pode ser verdadeiramente considerada uma condição patológica (Lotti et al., 1990; Avram, 2004). Desta forma, a celulite permanece, ainda, como uma desordem estética que acomete um grande número de indivíduos.

Considerado um problema cosmeticamente inaceitável que a maioria das mulheres apresenta em alguma etapa da vida, a celulite é descrita por Goldman (2002) como um estado fisiológico normal na mulher pós-adolescente que apresenta um maior acúmulo de gordura como preparação para uma futura gravidez ou lactação (Goldman, 2002; Rawlings, 2006). Segundo Avram (2004),

entre 85% e 98% das mulheres apresentam, após a puberdade, algum grau de celulite, incidindo em todas as raças, porém em maior número em mulheres caucasianas (Nürnberg e Müller, 1978; Draelos, 2001; Avram, 2004).

Clinicamente definida como uma alteração na topografia da pele que ocorre principalmente em mulheres, na região pélvica, abdômen e membros inferiores, caracterizando-se pelo aspecto de “casca de laranja”, a celulite foi considerada durante anos, como uma alteração estética da superfície cutânea (Binazzi e Grilli-Cicioloni, 1977; Binazzi, 1983; Curri, 1991; Ciporkin, 1992; Rossi e Vergnanini, 2000).

1.1- Etiopatogenia e histopatologia

Etiologicamente, celulite é definida como uma desordem metabólica localizada do tecido subcutâneo que provoca uma alteração na forma corporal, sendo muitas vezes confundida com obesidade. No entanto, na obesidade, histologicamente, somente hipertrofia adipocitária e hiperplasia são observadas, enquanto que na celulite, muitas estruturas são alteradas na derme, na microcirculação e, também, no tecido adiposo. Este fenômeno, por sua vez, está associado com modificações morfológicas, histoquímicas e bioquímicas relacionadas à pele (Binazzi e Papini, 1983; Chimenti et al., 1983; Perin et al., 2000; Pierard et al., 2000), e resultam nas alterações que levam ao desconforto estético e à aparência clínica da celulite.

A lipodistrofia do tecido adiposo, representada por aproximadamente 25% do peso corpóreo das mulheres e caracterizada visualmente por seu aspecto de “pele acolchoada”, acomete a superfície da pele em decorrência do aumento excessivo do volume dos adipócitos organizados em lóbulos no tecido conectivo. Em parte, este fenômeno está associado com uma insuficiência do tônus venoso e com um aumento da permeabilidade capilar, ambos contribuindo para o aumento da infiltração e acúmulo de água na pele (Franchi et al., 2003).

A parte mais externa do tecido adiposo, denominada tecido adiposo areolar, é organizada em septos interlobulares de tecido conjuntivo (Rawlings, 2006; Alchorne, 2000; Segers et al., 1984; Corlett, 1989 e Nürnberger e Muller, 1978). Estes septos fibrosos apresentam projeções perpendiculares nas mulheres e oblíquas nos homens, o que também determinaria ou diferenciaria o aparecimento da celulite entre os sexos (Terranova et al., 2006; Rao et al., 2005; Querleux et al., 2002; Guirro e Guirro, 2002; Piérard et al., 2000; Francischelli et al., 1999a, Rosenbaum et al., 1998; Draelos e Marenus, 1997; Lucassen et al., 1997 e Nürnberger e Müller, 1978).

Naturalmente, a celulite pode acometer quaisquer áreas do corpo que apresentam tecido subcutâneo, porém certas regiões são mais susceptíveis, como, por exemplo, coxas e nádegas, podendo também ser encontrada nas mamas, abdômen inferior e úmeros, coincidentemente áreas de maior incidência de tecido panículo adiposo nas mulheres. Entretanto, a celulite pode ser encontrada em qualquer região do corpo onde há um excesso de tecido adiposo depositado, não sendo a obesidade um pré-requisito para seu surgimento (Querleux et al., 2002).

Alguns autores consideram o desenvolvimento ou agravamento da celulite como dependentes de um fator hormonal, uma vez que é praticamente inexistente de forma natural em homens e desenvolve-se apenas após o início da puberdade em mulheres. Em homens, quando aparece, a celulite está ligada a patologias relacionadas à deficiência de andrógenos, como síndrome de Klinefelter, hipogonadismo, estados pós-castrativos e em alguns pacientes em terapia estrogênica para câncer prostático (Querleux et al., 2002).

Segundo Terranova *et al.* (2006), existem três grandes teorias atualmente sendo exploradas que explicam sua etiopatogenia (Terranova et al., 2006).

Na primeira teoria, a celulite é caracterizada por um edema no tecido conjuntivo, causado principalmente pelo acúmulo de proteoglicanas no meio extracelular, que levam consigo grande quantidade de água (Wanitphakdeedecha

e Manuskiatti, 2006; Avram, 2005; Guirro e Guirro, 2002; Piérard et al., 2000; Francischielli et al., 1999^a; Rosenbaum et al., 1998; Draelos e Marenus, 1997; Sánchez et al., 1994; Lotti et al., 1990). Estes autores atribuem a causa a um aumento na hidrofília do tecido, provocando um edema crônico que resulta em fibrose localizada.

Outros autores explicam a celulite como conseqüência de uma alteração microcirculatória, com compressão do sistema venoso linfático (Distante et al., 2006; Rao et al., 2005; Sadick e Mulholland, 2004; Francischielli et al., 1999^a; Lotti et al., 1990). Smith (1995) e Rossi (1996) relatam que o fluxo sangüíneo nas regiões afetadas pela celulite é 35% menor, quando comparadas às regiões não comprometidas (Smith, 1995; Rossi, 1996). Segundo Binazzi e Cicilioni (1977) e Terranova et al. (2006), esta alteração circulatória está relacionada à adiposidade, e durante o estágio inicial da celulite é possível verificar histologicamente adipócitos com formas e tamanhos diferentes, além de edema e dilatação linfática (Binazzi e Cicilioni, 1977; Terranova et al., 2006). Além disso, a celulite pode estar associada à insuficiência venosa crônica, uma vez que ambas as condições partilham sinais e sintomas comuns, incluindo a presença de teleangiectasias e micro-hemorragias, sintomas parestéticos - como intensidade, repuxamento nos membros inferiores e dor à apalpação-, e diminuição da temperatura da superfície da pele na região afetada (Binazzi e Grilli-Cicioloni, 1977 e Rossi e Vergnanini, 2000). Muitos estudos de fluximetria utilizando o ultrassom Laser Doppler têm demonstrado uma redução de aproximadamente 35% no fluxo sangüíneo nas regiões acometidas pela celulite (Smith, 1995).

A última teoria é baseada no posicionamento perpendicular dos septos interlobulares do tecido subcutâneo feminino (Smalls et al., 2006; Terranova et al., 2006; Quatresooz et al., 2006; Piérard et al., 2000; Rao et al., 2005; Querleux et al., 2002; Guirro e Guirro, 2002; Piérard et al., 2000; Francischielli et al., 1999^a; Rosenbaum et al., 1998; Draelos e Marenus, 1997; Lucansen et al., 1997; Nürnberger e Müller, 1978).

A figura 1, elaborada por Mirrashed et al. (2004), demonstra esquematicamente um diagrama da estrutura da pele com 5 zonas distintas e possibilita a compreensão da invasão do tecido subcutâneo sobre a derme adjacente.

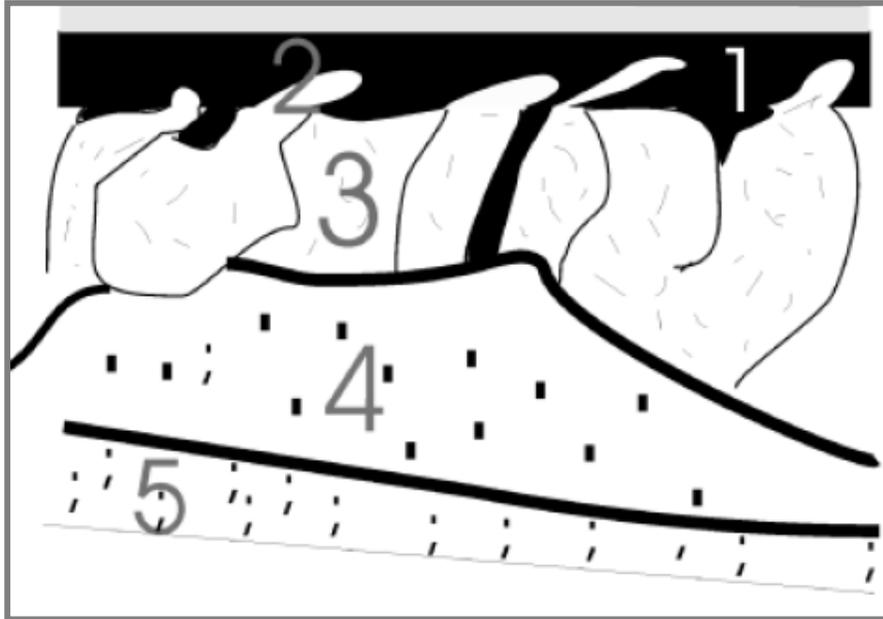


Figura 1- Diagrama esquemático da pele demonstrando 5 zonas distintas: a camada cinza superficial é denominada epiderme; zona 1: derme; zona 2: extrusão da hipoderme na derme; zonas 2 a 5: alta, média e baixa parte da hipoderme (Mirrashed et al., 2004).

Fink et al. (2006), defendem a hipótese de que a celulite é decorrente da deformação do tecido adiposo, porém associada à perda da integridade do colágeno da região afetada (Fink et al., 2006). Existem ainda alguns autores que associam a celulite à inflamação, com a presença de células que sugeririam um processo crônico no local afetado (Avram, 2005; Draelos e Marenus, 1997).

Mirrashed et al. (2004) e Querleux et al. (2002), afirmaram a diferença de posicionamento de septos fibrosos entre mulheres e homens por meio de exames de ressonância magnética. Além disso, observaram que os lóbulos de

gordura nas mulheres são maiores, o que pode também favorecer o aparecimento da desordem (Mirrashed et al., 2004; Querleux et al., 2002).

Devido a essa organização dos lóbulos de gordura nas mulheres, o aumento do volume do tecido adiposo leva-o ao envaginamento na derme, que, somado à falta de distensibilidade dos septos, favorece o aparecimento da pele acolchoada, característica da celulite (Avram, 2005; Rao et al., 2005; Medeiros, 2004; Guirro e Guirro, 2002; Piérard et al., 2000; Francischelli et al., 1999a, Rosenbaum et al., 1998; Draelos e Marenus, 1997; Rossi, 1996).

Outro aspecto importante no quadro da celulite diz respeito às alterações dérmicas observadas no local afetado. Querleux (2004), observou em seu estudo feito por meio de ressonância magnética que há invaginações do tecido adiposo na derme, mostrando grande heterogenicidade em sua direção (Querleux, 2004). Estes parâmetros explicam o comprometimento de fibras de colágeno e elastina na derme inferior, favorecendo o desenvolvimento de marcas cicatriciais (estrias) na região, bem como uma excessiva flacidez localizada.

1.2- Integridade da pele e envolvimento da unidade matricial

Segundo Holbrook (1983), pele é definida como um conjunto de tecidos, com organização estratificada, que reveste o corpo e apresenta componentes estruturais e metabólicos que trabalham em sintonia com o meio ambiente para manter a saúde do ser que envolve (Holbrook, 1983). Representando 10 a 12% do peso corpóreo, caracteriza-se como o maior órgão do corpo humano, com uma área de aproximadamente $1,5\text{m}^2$ e espessura média de 3mm (Breathnach, 1974).

Anatomicamente, a pele serve como uma barreira que separa o meio externo da homeostase interna. Apresenta-se como um complexo órgão com múltiplos tipos de células e estruturas, dividindo-se em três camadas distintas: derme, epiderme e hipoderme ou tecido subcutâneo. A primeira camada é formada por epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado. A derme,

também chamada tecido conjuntivo da pele, por sua vez, é composta principalmente de colágeno e elastina. Fibras colagênicas representam 70-80% do peso seco da pele e conferem à derme sua integridade estrutural e mecânica. Apesar de presente em menor proporção, a elastina desempenha a importante propriedade elástica da pele, representando 2-4% da matriz extracelular (MEC) (Tzaphlidou, 2004). É nesta camada que estão os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Sousa e Vargas, 2004; Guirro e Guirro, 2002; Alchorne, 2000). A derme sobrepõe a hipoderme, a camada mais profunda da pele, formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes (Peyrefitte et al., 1998).

A denominada unidade matricial-intersticial é formada por células-especialmente fibroblastos, os quais são responsáveis pela síntese de macromoléculas da matriz celular, a qual engloba tecido fibroso (fibras colagênicas, elásticas e reticulares), proteoglicanas, glicoproteínas e ácido hialurônico. Enquanto o tecido fibroso é responsável por resistência e suporte, as demais proteínas são responsáveis pela difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios para o sistema circulatório através dos tecidos intersticiais. As glicosaminoglicanas têm propriedades hidrofílicas e ajudam a manter a pressão osmótica intersticial, enquanto que as proteoglicanas desempenham um papel na produção de colágeno por fibroblastos, bem como na sua distribuição tridimensional (Ruggeri e Benazzo, 1984; Sainio et al., 2000). Ambos auxiliam no aumento da quantidade de colágeno e na reconstrução da matriz extracelular (Bartold e Wiebkin, 1981; Tzaphlidou, 2004). Estudos de microscopia eletrônica das proteoglicanas, realizados em amostras de pele de indivíduos com celulite, demonstraram precipitação de material granular com alta densidade de elétrons nas paredes dos capilares dérmicos e adjacentes fibras de colágeno e elastina na derme, o que resulta no edema de glicosaminoglicanas e pode levar às alterações nas fibras com conseqüente esclerose (Lotti et al., 1990; Rossi e Vergnanini, 2000).

Todos estes eventos relacionam-se diretamente à proliferação e a atividade de fibroblastos, a qual é controlada por nucleotídeos cíclicos, e sua atividade hormonal é afetada por receptores que ativam ou inibem a enzima adenilato-ciclase, responsável pela produção de AMP-cíclico local. Muitos fatores podem modificar esta matriz, dentre elas: variações topográficas, idade, estrógenos, gravidez, hipertireoidismo, diabetes, corticosteróides e radicais livres. Alterações em fibroblastos, provocadas, por exemplo, por ação estrogênica, causam acúmulo de glicosaminoglicanas não-funcionais na derme e no tecido conectivo perivascular, promovendo a hiperpolimerização destas proteínas e aumento de sua hidrofiliçidade. Isto causa retenção de água (edema) e um aumento na viscosidade do líquido intersticial, o que gera trocas celulares e, conseqüentemente, compressão dos vasos, provocando hipóxia tecidual (Ciporkin et al., 1992). A hipóxia formada no local é responsável pela formação de colágeno afuncional e conseqüente alteração na sua função fisiológica normal e no seu próprio mecanismo de *feedback* (Mirrashed, 2004).

1.3- O tecido adiposo como órgão endócrino e centro regulador do metabolismo

De composição hidrolipídica, a hipoderme é representada em aproximadamente 85% por componentes graxos (98% triglicerídeos, 2% de colesterol e poucos ácidos graxos livres) e 15% por constituintes hidrófilos (especialmente água, sendo que aproximadamente 60% encontra-se no meio extracelular) (Kersten et al., 2001).

Dependendo da região e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme apresenta uma espessura variável de tecido adiposo que, ao se desenvolver, formará o panículo adiposo, proporcionando proteção contra o frio e choques mecânicos (Rossi et al., 1993).

Para garantir a sobrevivência de todas as espécies, mesmo em condições de escassez de nutrientes no meio ambiente, os mamíferos são capazes de estocar o excesso de calorias consumidas e não requisitadas para suprir suas necessidades metabólicas imediatas, como lipídios (triacilgliceróis) e carboidratos. Os lipídeos, por serem hidrofóbicos, podem ser armazenados em grandes quantidades, dispensando a participação da água como solvente, e contêm, por unidade de massa, mais do que o dobro de energia armazenada que os outros dois componentes, fornecendo mais energia metabólica quando oxidados (Fonseca-Alaniz et al., 2006).

O balanço energético é determinado diretamente pelo equilíbrio entre o acúmulo e a quebra da gordura armazenada, originando um processo denominado lipogênese-lipólise (Stich e Berlan, 2004).

No processo de lipólise os triglicerídeos (TAG), forma de energia armazenada no interior dos adipócitos, são hidrolisados em três moléculas de ácidos graxos livres (NEFA) e uma molécula de glicerol (Yvan-Charvet et al., 2007), conforme demonstrado na figura 2.

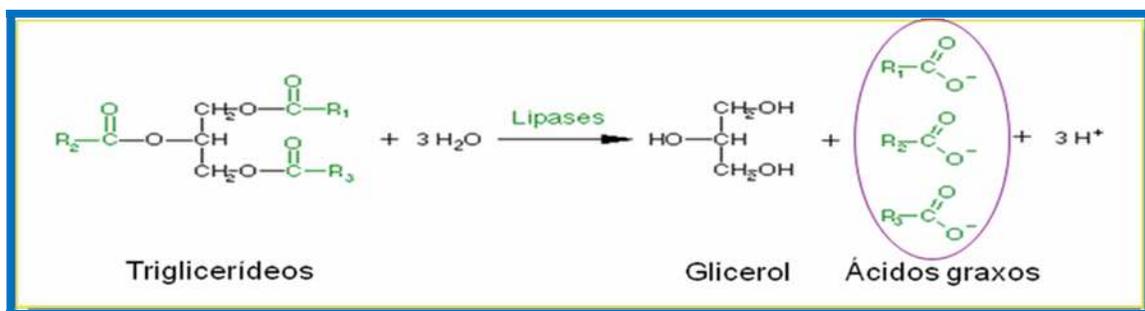


Figura 2- Hidrólise de triglicerídeos (TAG) pela ação da enzima lípase: liberação de ácidos graxos livres e glicerol.

Os adipócitos são as únicas células especializadas e perfeitamente adaptadas para armazenar lipídeos sem que isso comprometa a sua integridade funcional. Para isto, possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar ácidos graxos (processo denominado de lipogênese) e estocar TAG em períodos de oferta abundante de energia, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico (lipólise) (Lay e Dugail, 2009).

A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (Ahima e Flier, 2000).

O sistema nervoso autônomo tem controle direto sobre o tecido adiposo através de seus componentes simpático e parassimpático. A inervação simpática relaciona-se principalmente com as ações catabólicas, tais como a lipólise mediada pelos receptores β -adrenérgicos e dependente da atividade da enzima lipase hormônio-sensível (LHS). Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático está envolvido na execução de efeitos anabólicos sobre os depósitos adiposos, como a captação de glicose e de ácidos graxos estimulada pela insulina (Pénicaud et al., 2000) (figura 3).

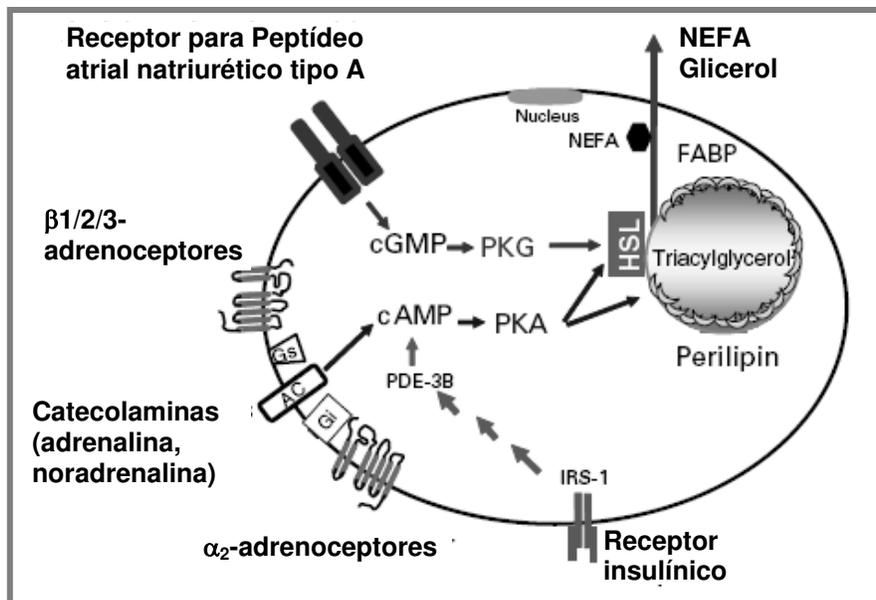


Figura 3- Prováveis mecanismos intracelulares de regulação dos processos de lipólise e lipogênese.

Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). O adipócito branco maduro armazena os TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de citosol para a periferia da célula. É interessante ressaltar que, durante seu desenvolvimento, a célula jovem contém múltiplas gotículas de lipídios, que coalescem para formar uma inclusão lipídica unitária com o amadurecimento celular. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que hemáceas, fibroblastos e células do sistema imune, e podem alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de TAG acumulada. A proporção de lipídios no TAB pode ocupar até 85% da massa total do tecido, sendo o restante da massa representado por água e proteínas (Pondi et al, 2001). O TAM é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Os depósitos de TAM estão praticamente ausentes em humanos adultos,

mas são encontrados em fetos e recém-nascidos. O adipócito marrom pode atingir 60µm de diâmetro, sendo, geralmente, muito menor que o adipócito branco, que tem um tamanho médio de 90-100µm. É uma célula caracterizada pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma relativamente abundante e núcleo esférico e ligeiramente excêntrico. Apresenta um grande número de mitocôndrias que, por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor (Cannon e Nedergaard, 2004).

Além dos adipócitos, o TAB é formado por uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (Ahima e Flier, 2000) (figura 4).

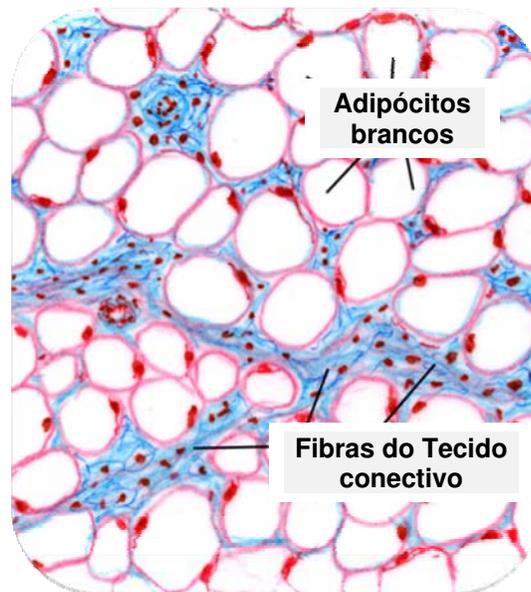


Figura 4- Interação entre adipócitos brancos uniloculares e tecido conjuntivo (fibras).

Embora a sua participação na termogênese seja desprezível, a capacidade funcional do TAB é bem mais ampla e abrangente. Possui distribuição generalizada pelo organismo, envolvendo, ou mesmo se infiltrando, por quase toda a região subcutânea, por órgãos e vísceras ocas da cavidade abdominal ou do mediastino e por diversos grupamentos musculares para os quais oferece proteção mecânica, amenizando o impacto de choques e permitindo um adequado deslizamento de feixes musculares, uns sobre os outros, sem comprometer a sua integridade funcional. Por ser um excelente isolante térmico e pela distribuição mais abrangente, incluindo derme e tecido subcutâneo, tem papel importante na preservação da temperatura corporal. Pela sua capacidade de armazenar energia (cerca de 200.000 a 300.000Kcal em adultos não-obesos) e de fornecê-la quando necessário, assume o status de mais importante sistema tamponante para o balanço energético (Fonseca-Alaniz et al., 2006; Fonseca-Alaniz et al., 2007).

Nos últimos 15 anos, com a descoberta da sua capacidade de secretar hormônios, grande importância foi atribuída ao seu papel endócrino. Estes hormônios, denominados de adipocinas, revolucionaram os conceitos sobre a sua função biológica, consolidando a idéia de ser não apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas um órgão dinâmico e central da regulação metabólica (Bartness e Bamshad, 1998; Trayhurn, 2007).

Dada a diversidade estrutural das adipocinas e a variedade de funções já identificadas, pode-se dizer que elas compreendem desde proteínas relacionadas ao sistema imune-fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6)-, a fatores de crescimento-fator transformador de crescimento- β (TGF- β) e fator estimulador de colônias para granulócitos e macrófagos (GM-CSF)- e proteínas da via alternativa de complemento (adipsina). Há, ainda, adipocinas envolvidas na regulação da pressão (angiotensinogênio), da coagulação sangüínea (inibidor do ativador de plasminogênio 1, PAI-1), da homeostase glicêmica (adiponectina, resistina, visfatina, leptina) e da angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular-VEGF) (7), além de várias outras (Fruhbeck et al., 2001) (tabela 1).

Tabela 1- Fatores protéicos e não-protéicos produzidos e secretados pelo tecido adiposo branco. (adaptada de Fruhbeck et al., 2001).

Substância	Principais Efeitos Biológicos
Leptina	Sinaliza o SNC sobre os estoques corporais de energia, estimula lipólise e oxidação lipídica
Adiponectina	Aumenta a sensibilidade à insulina, é antiinflamatório e atenua a progressão da aterosclerose
Resistina	Aumenta a resistência à insulina
TNF- α	Lipolítico aumenta o consumo energético e reduz a sensibilidade à insulina
Interleucina-6	Pró-inflamatório, lipolítico, reduz a sensibilidade à insulina
Adipsina	Ativa a via alternativa de complemento
ASP	Estimula a síntese de triacilgliceróis no TAB
Angiotensinogênio	Precursor da angiotensina II, envolvido na regulação da pressão arterial
PAI-1	Inibe a ativação do plasminogênio, bloqueando a fibrinólise
Fator tecidual	Iniciador da cascata de coagulação
VEGF	Estimula a proliferação vascular (angiogênese) no TA
Visfatina	Insulinomimético produzido predominantemente pela gordura Visceral
Monobutirina*	Vasodilatador e indutor de neoformação vascular
TGF- β	Regula uma série de processos no TAB, entre os quais proliferação de pré-adipócitos, diferenciação, desenvolvimento e apoptose de adipócitos. Bloqueia a diferenciação de adipócitos.
IGF-1	Estimula proliferação e diferenciação de adipócitos
HGF	Estimula diferenciação e desenvolvimento de adipócitos
MIF	Imunorregulador com atuação parácrina no TAB
LLP [†]	Enzima estimuladora da hidrólise de TAG de lipoproteínas (quilomícrons e VLDL)
CETP [†]	Transfere ésteres de colesterol entre lipoproteínas
Apo-E [†]	Componente protéico das lipoproteínas, especialmente das VLDL
Prostaglandinas*	Reguladores de diversos processos celulares, atuam na inflamação, coagulação sanguínea, ovulação e secreção ácida gástrica

Estrógenos*	Produzido pela ação da aromatase, sendo a principal fonte estrogênica em homens e em mulheres após a menopausa
Glicocorticóides*	Gerado pela ação da 11-hidroxiesteróide desidrogenase, tipo II, que transforma cortisona em cortisol no TAB
Apelina	Ações biológicas ainda não muito claras, relacionadas ao controle dos estoques energéticos corporais

ASP: proteína estimulante de acilação; CETP: proteína de transferência de ésteres de colesterol; HGF: fator de crescimento de hepatócito; IGF1: fator de crescimento insulina-símile-1; LLP: lipase lipoprotéica; MIF: fator de inibição de migração de macrófagos; PAI-1: inibidor de ativação do plasminogênio-1; SNC: sistema nervoso central; TAB: tecido adiposo branco; TAG: triacilgliceróis; TGF- β : fator transformador de crescimento- β ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa.

*Substâncias não-protéicas; †Proteínas sem ação hormonal.

A leptina (LEP), a de maior destaque dentre as adipocinas, foi identificada em 1994 como um produto do gene *ob* descrito em camundongos. Uma cepa de camundongos obesos (*ob/ob*) apresentava um defeito genético que resultava em não-produção dessa proteína⁸. Esse animal apresentava, entre outros sinais e sintomas, comportamento e fisiologia de animais em constante jejum, com níveis elevados de corticosterona, incapacidade de se manter aquecido, déficit de crescimento, acentuado hipogonadismo e apetite exacerbado, gerando obesidade, resistência à insulina e diabetes melito (Zhang et al., 1994; Fonseca-Alaniz et al., 2007).

Vários tecidos, além do adiposo, expressam LEP, como placenta, adeno-hipófise, mucosa do fundo gástrico, musculatura esquelética e epitélio mamário, embora, em termos globais, a maior ou menor produção esteja diretamente relacionada à massa de TA, pois os seus níveis circulantes estão mais diretamente relacionados à quantidade de seu RNAm neste tecido (Zhang et al., 1994). Outros fatores metabólicos e endócrinos contribuem para regular a sua transcrição: a insulina apresenta relação diretamente proporcional com os níveis de LEP (Frübeck, 2006).

Glicocorticóides, estrógenos, citocinas inflamatórias e quadros de infecção aguda aumentam, ao passo que baixas temperaturas, estimulação adrenérgica, hormônio de crescimento (GH), hormônios tireoidianos, andrógenos, melatonina e fumo parecem diminuir seus níveis. Exibe oscilação circadiana dos seus níveis, pois há aumento das concentrações plasmáticas à noite (Fonseca-Alaniz et al., 2007).

A LEP tem importante papel na regulação do balanço energético, apresentando duas ações: **1)** em uma população de neurônios parvo-celulares do núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico, estimula a expressão de neuropeptídeos, que induzem inibição da ingestão alimentar (pró-ópio-melanocortina [POMC] e transcrito relacionado à cocaína e anfetamina [CART]) e aumento do gasto energético total, neste caso envolvendo uma população de neurônios similares do núcleo paraventricular (PV) que promovem aumento do tônus simpático; e **2)** em outra população de neurônios do ARC, inibe a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo *agouti* (AgRP), envolvidos no aumento da ingestão alimentar e na redução do gasto energético (Schwartz et al., 2000).

Além desta importante função lipostática (mensurador de depósitos lipídicos do organismo), a LEP modula a reprodução, a angiogênese, a resposta imune, o controle da pressão sanguínea, a osteogênese e a maturação do eixo reprodutivo. Deficiência ou insensibilidade a LEP estão associadas a hipogonadismo hipotalâmico tanto em humanos como em roedores. Mutações do gene da LEP comprometem seriamente os ciclos menstruais na mulher. Se, por um lado, a LEP é essencial na puberdade e no ciclo reprodutivo, por outro não parece atuar na gestação e na lactação (Frübeck, 2006; Farooqi e O'Rahilly, 2009).

No sistema imune, a LEP aumenta a produção de citocinas, a adesão e a fagócitos e em macrófagos, além de estimular a proliferação das células T, levando ao aumento da competência imunológica (Farooqi e O'Rahilly, 2009).

O efeito angiogênico consiste na formação de capilares *in vitro* em cultura de células endoteliais, prolongando e aumentando a proliferação dessas células.

A LEP promove uma resposta pressora atribuída à ativação do simpático central e uma resposta depressora atribuída à síntese local de NO, indicando que atua de forma dual, produzindo simultaneamente uma ação pressora neurogênica e uma depressora humoral (Farooqi e O'Rahilly, 2009). Em relação ao metabolismo lipídico, a LEP ativa a adenilciclase, aumenta a oxidação lipídica no músculo esquelético e reduz a síntese de TAG no fígado (Schwartz et al., 2000).

Outra adipocina importante na regulação de uma série de processos no TAB é o TGF- β . Dentre as atividades de TGF- β como adipocina destacam-se a regulação da proliferação de pré-adipócitos e a diferenciação, desenvolvimento e apoptose de adipócitos. Por este motivo, mecanismos que estimulem a produção ou a atividade de TGF- β e seu receptor em adipócitos tem sido foco de importantes pesquisas na área médica endocrinológica e dermatológica (Brenmoehl et al., 2009).

Além do papel regulador do TGF- β sobre o TAB, fortes evidências sugerem seu envolvimento na modulação bioquímica das reações cutâneas relacionadas aos processos regenerativos e cicatriciais. Parte destes efeitos deve-se, diretamente, à capacidade de TGF- β de estimular a síntese de fibras dérmicas, especialmente colágeno e elastina, além de induzir a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, os quais possuem forte capacidade contrátil, acelerando o processo de regeneração tecidual (Brenmoehl et al., 2009; Chu et al., 2008; Zao et al., 2008). Levando em consideração às alterações que ocorrem na derme nos locais acometidos pelo acúmulo de lipídeos (gordura localizada) comuns na celulite, compostos que possuam a capacidade de estimular direta ou indiretamente a síntese de fatores de crescimento, incluindo além de TGF- β , GM-CSF e EGF (fator de crescimento epidérmico),

podem ser importantes ferramentas na melhora dos aspectos clínicos e estéticos relacionados à celulite.

1.4- Critérios de classificação e avaliação da celulite

De acordo com as alterações histopatológicas, a evolução da celulite pode ser dividida em quatro fases distintas (Rona et al., 2006; Guirro e Guirro, 2002; Curri, 1993; Terranova et al., 2006; Curri e Ryan, 1989; Distante et al., 2006; Lucassen et al., 1997; Curri, 1991; Rossi, 1996).

São elas:

- **Primeira Fase:** conhecida como congestiva simples, é caracterizada por transtornos circulatórios. Ocorre hipertrofia das células adiposas por acúmulo de líquido que inunda o tecido e, a persistência desse quadro implica em compressão dos vasos mais importantes, com conseqüente dilatação das paredes venosas e aumento de sua permeabilidade, que resulta em escape de líquido seroso para o tecido conjuntivo. É criado, então, um círculo vicioso onde o aumento de líquido leva ao aumento da pressão, da congestão e dos fenômenos de bloqueio;
- **Segunda Fase:** floculação e precipitação da substância fundamental. O líquido lançado no tecido conjuntivo contendo todos os resíduos das diferentes células das regiões adjacentes, não sendo utilizado, desempenha o papel de corpo estranho, provocando reações químicas na tentativa de defesa contra estes elementos. Ocorre o espessamento dos septos interlobulares, proliferação de fibras colagênicas não-funcionais, ficando o tecido com aspecto mais espesso e consistência gelatinosa, agravando continuamente o quadro;
- **Terceira Fase:** Fibrose. O aumento da densidade do tecido conjuntivo acarreta em danos às fibras teciduais, dando origem ao tecido fibroso, de malhas cerradas e densas que envolvem e comprimem vasos e nervos;

- **Quarta fase:** barreira de estanque. Há o espessamento do tecido conjuntivo interadipocitário, o tecido fibroso torna-se constantemente mais cerrado e endurecido até tornar-se esclerosado, isto é, muito rígido e firme, aprisionando em malhas os nutrientes, resíduos, lipídeos e água. Com este quadro, há uma irritação constante das terminações nervosas no local, resultando em dores à apalpação ou mesmo sem motivo aparente.

A pele tem seu aspecto alterado de acordo com a evolução das fases. Partindo desta observação macroscópica e do grau de comprometimento microscópico citado acima, a classificação se dá em quatro níveis, denominados graus da celulite (Rona et al., 2006; Rao et al., 2005; Medeiros, 2004; Curri, 1991; Guirro e Guirro, 2002; Rossi, 1996; Paschoal, 2000; Hexsel e Mazzuco, 2000; Rossi e Vergnanini, 2000).

São eles:

- **Grau I:** assintomático ou latente. Sem alterações clínicas, somente histopatológicas;
- **Grau II:** alterações somente visíveis à apalpação ou contração muscular. Apresenta comprometimento circulatório, diminuição de temperatura e elasticidade da pele;
- **Grau III:** visível mesmo sem a compressão dos tecidos, sujeitas a ficarem mais aparentes com a compressão dos mesmos. Aspecto macroscópico de casca de laranja, observado com inspeção simples. Presença de nódulos à apalpação. Pode haver alteração de sensibilidade;
- **Grau IV:** comprometimento pode ser observado quando o indivíduo estiver em qualquer posição. Há nódulos maiores e dolorosos, aderidos aos planos profundos. Pele com aspecto “acolchoado”, enrugada e flácida. Há fibrose como fator predominante, há sensibilidade aumentada à dor, podendo apresentar comprometimento nervoso.

A figura 5 (ia e ib, iia e iib e iiia e iiib) ilustra os diferentes quadros de celulite, conforme graus classificatórios expostos acima.

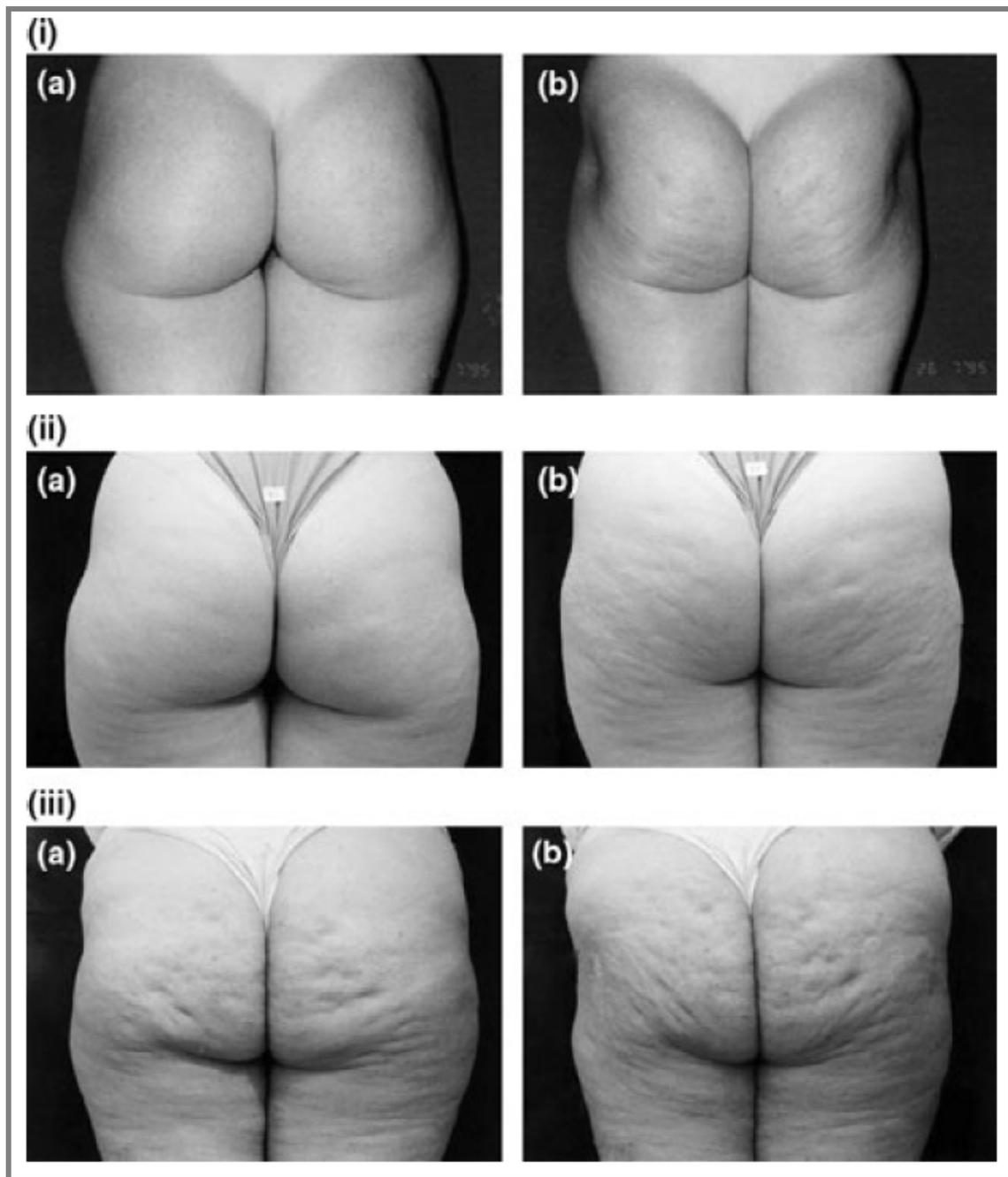


Figura 5- Diferentes graus da celulite: Grau II (i), Grau III (ii) e Grau IV (iii) em repouso (a) e após contração do glúteo (b). (Adaptado de Rossi e Vergnanini, 2000).

Para avaliar a celulite clinicamente, alguns exames podem ser realizados para estabelecer o grau de comprometimento da região afetada. Dentre eles destacam-se a termografia, a ultrassonografia, a ressonância magnética, o laser doppler, a biópsia, a xerografia, a bioimpedância, plicometria e a fotografia (Rossi e Vergmanini, 2000; Rawlings, 2006). Considerados exames rotineiros, de baixo custo e de alta relevância clínica, a bioimpedância e a plicometria são os mais utilizados na prática clínica atual (Rawlings et al., 2006).

A bioimpedância é um método que fornece dados sobre a relação gordura/massa magra do organismo por meio da aplicação de uma corrente elétrica. Não há, no entanto, relação direta deste exame com a presença ou não de celulite, mas é utilizado como parâmetro comparativo por muitos autores (Rao et al., 2005; Medeiros, 2004; Francischelli et al., 1999; Lukaski, 1986). A plicometria, por sua vez, é uma técnica que utiliza um instrumento capaz de medir a espessura do tecido cutâneo por meio de dobras cutâneas e com isso calcular a porcentagem de gordura corporal (Rona et al., 2006), podendo ser utilizado com a mesma finalidade da bioimpedância.

Outra técnica utilizada com certa freqüência, especialmente para comparação de resultados de tratamentos é a fotografia, porém a documentação fotográfica adequada da arquitetura e tonicidade da pele é relativamente difícil, uma vez que sofre diversas interferências metodológicas (Gherardini et al., 1997; Wanitphakdeedecha e Manuskiatti, 2006).

Cientificamente, apesar da sua alta incidência e do grande número de produtos cosméticos destinados ao seu tratamento, poucas investigações diretamente relacionadas à celulite têm sido evidenciadas. Esta escassez, consideravelmente, implica na dificuldade atual de tratar ou melhorar esteticamente esta desordem cutânea.

1.5- Evolução do mercado e relevância da utilização de produtos dermocosméticos na prática dermatológica atual

A busca por substâncias que possam exaltar a beleza ou reverter pequenas imperfeições genéticas ou adquiridas através de mecanismos que favoreçam a homeostasia da pele, é ferramenta constante de pesquisa e desenvolvimento na área cosmética e dermatológica. O crescimento da indústria, aliado ao dramático avanço científico na área química cosmética, tem aumentado consideravelmente a relação entre dermatologistas e produtos cosméticos ou cosmecêuticos. De acordo com Briney (2005), mais de US\$ 230 bilhões são gastos anualmente, em todo o mundo, apenas em produtos dermocosméticos direcionados aos cuidados com a aparência corporal, incluindo hidratantes, anti-celulíticos e modeladores de silhueta (Briney, 2005).

A dermatologia, como ciência, tem evoluído com menos ênfase na área clínica patológica, apresentando um considerável crescimento na área estética e cirúrgica (Millikan, 2001). Isto se deve principalmente à evolução na pesquisa básica e clínica de grandes empresas da área cosmética, impulsionada em parte pelos centros de pesquisa farmacológicos situados nos grandes centros. De acordo com dados dos últimos Congressos Mundiais de Dermatologia, aliados ao crescimento das sociedades de dermatologia estética na maioria das regiões do mundo, dermatologistas buscam compostos mais seguros, com funções mais abrangentes, bem-estabelecidas e que possam trazer benefícios adicionais ao paciente (Draelos, 2001). Segundo o FDA (Food and Drug Administration, USA), a prescrição dermatológica atual baseia-se na associação de compostos naturais normalmente prescritos e bem aceitos na área farmacêutica, especialmente aqueles com alta compatibilidade biológica e aqueles considerados naturais (Lupo e Cole, 2007).

Diante destas circunstâncias, novos compostos que possuam atividades antioxidantes, imunomoduladoras, reguladoras da homeostase cutânea, bem como aquelas que possam modular a atividade do complexo sistema endocrinológico da pele, protetoras e possivelmente estimuladoras do

metabolismo celular saudável podem contribuir para atenuar as manifestações estéticas decorrentes do processo celulítico.

Neste sentido, avaliamos neste trabalho os efeitos da aplicação da associação de um extrato oleoso vegetal com rica composição graxa, em associação com fitoesteróis vegetais, essenciais antioxidantes e coadjuvantes na regulação da homeostase celular e na ação de compostos sobre a membrana celular ou intracelularmente.

1.6- Slimbuster® L

Slimbuster® L, objeto principal deste estudo, é um extrato concentrado e modificado de materiais insaponificáveis e PUFAs (ácidos graxos poliinsaturados) de óleo de café verde e fitoesteróis vegetais esterificados de *Brassica Campestris* (canola).

1.6.1- Óleo de Café Verde (*Coffea arabica* L.)

Desde a introdução do café na Europa no século XVII, tem sido constante o interesse sobre seus possíveis efeitos positivos e negativos sobre a saúde humana (Gross et al., 1996).

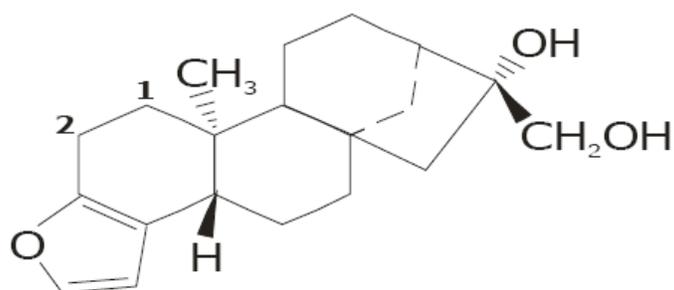
Grande parte dos estudos relacionados às propriedades farmacológicas do café atribui seus efeitos à cafeína, constituinte da fração polar de seus grãos e considerado seu principal ativo (Wheatley, 2005; Namba e Matsuse, 2002; Gross et al., 1996). As principais ações descritas para a cafeína são a sua forte capacidade estimulatória sobre o sistema nervoso central e sua ação diurética (Wheatley, 2005; Namba e Matsuse, 2002).

Além disso, ensaios biológicos realizados com outras porções da fração aquosa dos extratos de café têm sugerido seus efeitos antioxidantes, através de sua capacidade protetora à ação de radicais livres (Andersen et al., 2006).

As sementes de *C. arabica* apresentam diversos metabólitos secundários bioativos, incluindo derivados do ácido cafeico, em especial o ácido clorogênico, ácidos graxos poliinsaturados - palmítico, esteárico, oléico, linoléico e araquidônico -, α -, β - e γ -tocoferóis e diterpenos, todos conhecidos como fortes antioxidantes (Namba and Matsuse, 2002).

Nos últimos vinte anos, as atenções do meio científico têm se voltado para os efeitos biológicos dos principais diterpenos presentes nas sementes de café - cafestol e kahweol (Di Simplicio et al., 1989; Mensink et al., 1995; Miller et al., 1993; Miller et al., 1991; Weusten-Van der Woun et al., 1994). Estes componentes, que se diferenciam apenas os quais parecem ser específicos do café, são encontrados em ambas as variedades - *C. arabica* e *C. robusta* (Lercker et al., 1995)-, predominantemente cafestol, e compreendem aproximadamente 10 a 15% da fração lipídica das sementes) (Ratnayake et al., 1993; Nikolova-Damyanova et al., 1998; Kim et al., 2004).

De maneira genérica, os diterpenos são compostos contendo aproximadamente 20 átomos de carbonos formados por 4 unidades isoprenos (figura 6).



Cafestol, Mw = 314,4
Kahweol, $\Delta^{1,2}$

Figura 6- Estrutura dos diterpenos de *C. arabica*.

De acordo com Nikolova-Damyanova et al. (1998), estes compostos diterpênicos causam, em geral, estimulação da enzima adenilato ciclase, responsável pela conversão de ATP em AMPc (Nikolova-Damyanova et al., 1998). Este é o sinal intraadipocitário para que o mecanismo de lipólise aconteça. Além disso, tem sido demonstrado importante efeito antiinflamatório, devido à inibição de ciclooxygenase-2, bem como antitumoral, para ambos cafestol e kahweol (Cavin et al., 1998; Kim et al., 2004).

Além destes dois diterpenos, a fração lipídica de *C. arabica* é ampla, caracterizando-se também pela forte presença de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Análises por CLAE/HPLC ou CG do extrato oleoso das sementes verdes de *C. arábica* L., realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram a presença de ácido palmítico (C16:0) 33,00%, ácido esteárico (C18:0) 9,10%, ácido oléico (C18:1) 9,00%, ácido linoléico (C18:2) 42,90%, ácido linolénico (C18:3) 1,20%, ácido araquidônico (C20:0) 3,90% e ácido behênico (C22:0) 1,00% (Pereda et al., 2009). Os PUFAs, em geral, reduzem a lipogênese por diminuição da sua expressão gênica no fígado, incluindo a da síntese de ácidos graxos (Jump et al., 1994). Além disso, possuem comprovada ação antiinflamatória, cardioprotetora, anti-hipercolesterolemia, antitumoral, antiaterogênicas e antitrombóticas (Steinberg, D, and Witztum, 1990; Illingworth et al., 1984; Leat, A. & Weber, P.C, 1988; Mersmann, 2002).

1.6.2- Fitoesteróis de Canola (*Brassica campestris*)

Fitoesteróis são compostos com núcleo esteroidal encontrados em plantas, especialmente em nozes, sementes oleaginosas e cereais - p. ex., canola, soja e café -, formando uma grande família de compostos (Jekel et al., 1998). Enquanto as células animais possuem colesterol como único esterol, as plantas apresentam uma complexa mistura de esteróis (Mora et al., 1999).

Os alcoóis esteroidais possuem um grupo hidroxila no carbono 3 (C₃) e uma cadeia alifática de 8 a 10 átomos de carbono no C₁₇ do esqueleto esteroidal. Quatro classes principais de alcoóis esteroidais têm sido descritas:

4-desmetilesteróis (também chamado esteróis), 4-monometilesteróis, 4,4'-dimetilesteróis (também chamados álcoois triterpênicos) e dióis triterpênicos. Geralmente, a distribuição dos esteróis é particular para cada espécie vegetal e não sofre alterações significativas pela seleção ou hibridização das plantas (Vlahakis e Hazbroek, 2000). A maioria destes compostos apresenta um grupo alquila (metil ou etil) em uma cadeia externa ao núcleo esteróico e/ou insaturações no núcleo esteróico. Nos óleos, são mais comumente encontrados na forma de ésteres de ácidos graxos, tornando-se solúveis em óleo (Kamm et al., 2001a).

Os 4-desmetilesteróis ocorrem em óleos e gorduras e são comumente chamados “esteróis” ou, no caso de óleos vegetais, de “fitosteróis”. Em óleos vegetais os fitoesteróis estão presentes em níveis que variam de 40 a 15.000mg/Kg (Kamm et al., 2001b). A tabela 2 permite comparar as porcentagens de fitoesteróis encontrados em outros óleos vegetais.

Tabela 2- Composição percentual média de fitoesteróis nos óleos vegetais.

Óleo Vegetal	% média de fitoesteróis totais
Óleo de palmiste	0,08
Óleo de palma	0,04
Óleo de oliva	0,11
Óleo de amendoim	0,24
Óleo de canola	0,62
Óleo de algodão	0,43
Óleo de milho	0,85
Óleo de Soja	0,34
Óleo de Girassol	0,35
Óleo de Linhaça	0,43

Os fitoesteróis mais comumente encontrados são o β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, e compreendem aproximadamente 80% do total de fitoesteróis contidos na maioria dos óleos vegetais (Jekel et al., 1998). A figura 7 demonstra as estruturas químicas dos principais fitoesteróis encontrados em plantas.

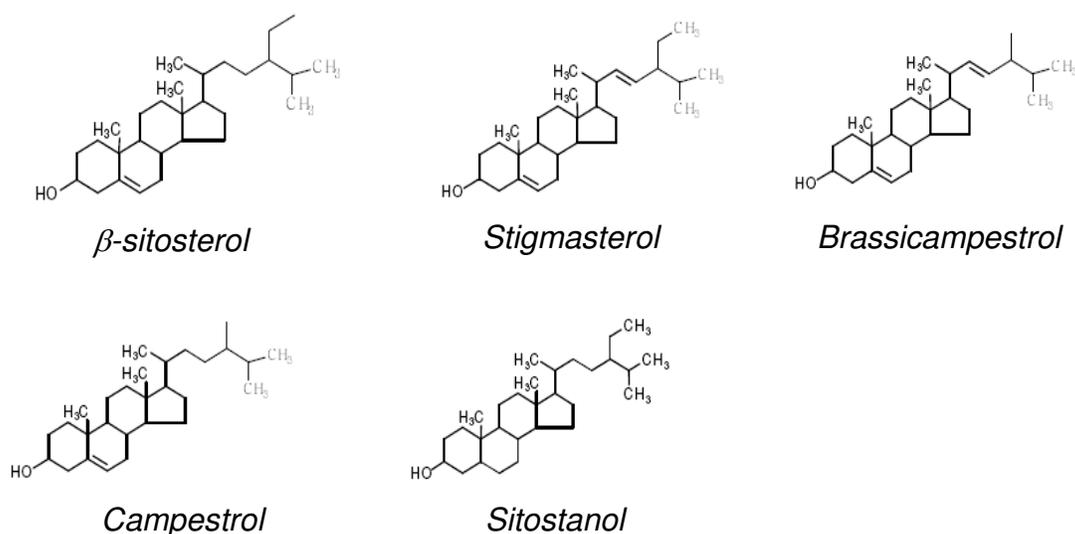


Figura 7- Estrutura dos principais fitoesteróis encontrados em plantas.

Estes compostos apresentam estrutura análoga ao colesterol, mas diferem no tamanho da cadeia devido à presença de um grupo etil na posição C₂₄. O estigmasterol possui ainda uma dupla ligação no C₂₂. Muitos estudos apontam os esteróis como grupamentos essencialmente localizados na membrana plasmática de animais e plantas (Yeagle, 1985; Hartmann and Benveniste, 1987).

Nas células animais o colesterol está envolvido na organização e permeabilidade da membrana e pode modelar muitas das atividades de proteínas membranais (Yeagle, 1985; Mora et al., 1999; Yasukazu e Etsuo, 2003). Assim como o colesterol, os fitoesteróis são hábeis em modificar as propriedades

estruturais e funcionais da dupla camada fosfolipídica das membranas celulares (Demel e De Kruffyff, 1976; Bloch, 1983; Rujanavech et al., 1986; Korstanje et al., 1990; Mora, 1999). Esta capacidade dos fitoesteróis favorece a ação de compostos no interior das células, bem como facilitam o transporte de moléculas intracelularmente (Kuhry et al., 1983; Mora et al., 1999).

Outros indícios dos efeitos biológicos dos fitoesteróis estão relacionados à sua capacidade antioxidante, especialmente no combate à oxidação de lipídeos naturalmente presentes nas membranas celulares, em decorrência do processo de lipoperoxidação lipídica (Yasukazu e Etsuo, 2003).



2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como principais objetivos:

Avaliar a eficácia do Slimbuster® L (SBL) e de seus principais componentes, *Coffea arabica* L. (óleo de café verde) (OC) e fitoesteróis de *Brassica campestris* L. (F), na melhora da celulite e da gordura localizada (Lipodistrofia Ginóide), através da modulação de mecanismos bioquímicos e endocrinológicos cutâneos utilizando metodologia *in vitro* e clínica.

Com o intuito de alcançar este objetivo, o trabalho foi dividido em 2 etapas:

▪ **Estudos *in vitro*:**

• **Em fibroblastos humanos - avaliar os efeitos do SBL, OC e F sobre:**

- A produção de TGF-beta e GM-CSF, fatores fundamentais envolvidos na proliferação celular e regeneração tecidual;
- A síntese de matriz extracelular viável, quantificando a expressão de colágeno total, elastina e glicosaminoglicanos.

• **Em fibroblastos humanos - avaliar a atividade de SBL sobre:**

- A contração de fibroblastos cultivados em gel de colágeno, observando a alteração de morfologia das células e possível transformação em miofibroblastos;

• **Em adipócitos Humanos Maduro - avaliar os efeitos do SBL, OC e F sobre:**

- A produção do hormônio leptina, o qual está diretamente relacionado a lipogênese e a lipólise, fatores extremamente importantes a serem modulados no processo da melhora da celulite e da gordura localizada;

- A lipólise direta utilizando a técnica de quantificação de ácidos graxos livres (NEFA).
- **Em adipócitos Humanos Maduros corados com AdipoRed[®] Reagent - avaliar os efeitos de SBL de:**
 - A quantidade de lipídeos intracelulares, demonstrando qualitativamente o efeito lipolítico do produto.
- **Em fragmentos de pele humana (ex-vivo) obtidas de cirurgia plástica eletiva - avaliar a capacidade de SBL em:**
 - Melhorar as condições gerais da pele.
- **Estudos Clínicos:** Avaliar em voluntários humanos com quadro clínico de celulite e gordura localiza, a eficácia da aplicação de uma loção hidratante contendo 3% p/p do produto teste, de forma a e qualificar os seguintes parâmetros:
 - **Medidas antropométricas** realizadas com auxílio de cinta métrica padronizada;
 - **Avaliação do índice de massa corpórea (IMC)** através da técnica do adipômetro;
 - **Avaliação da espessura da hipoderme** através da técnica de ultrassonografia por ecografia (Tovo, 1994);
 - **Avaliação da variação do peso das voluntárias do estudo.**



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Amostras-teste

3.1.1- Óleo de café verde

O Óleo de Café Verde (OC), de nome comercial MELSCREEN COFFEE EL DEO foi fornecido pela Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brasil). A análise quantitativa da composição química do OC foi realizada de acordo com metodologias apropriadas desenvolvidas e validadas pela empresa. A análise da composição graxa do OC realizada por cromatografia gasosa (CG) demonstra o seguinte perfil: ácido palmítico (C16:0)= 25,0-40,0, ácido esteárico (C18:0)= 7,0-15,0%, ácido oléico (C18:1)= 8,0-15,0%, ácido linoléico (C18:2)= 35,0-48,0%; ácido linolênico (C18:3)= 0,1-3,0%, ácido araquídico (C20:0)= 2,0-5,0%. O conteúdo de palmitato de cafestol é determinado por CLAE/HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e encontra-se na faixa de concentração que varia de 10,0 a 20,0%. O laudo de análise que contempla também as demais análises físico-químicas e microbiológicas especificadas para o produto encontra-se anexo (anexo 1).

3.1.2- Fitoesteróis de canola

O produto Fitoesteróis de Canola (F) consistem de ésteres de esteróis vegetais com ácidos graxos de canola e foi fornecido pela ADM Nutrition (Archer Daniels Midland Company). Comercialmente, recebe o nome de CardioAid™ -S.

3.1.3- Slimbuster® L

O Slimbuster® L (SBL) consiste da associação entre OC e F, na proporção aproximada de 2:1. A sua fabricação é de responsabilidade da Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brasil), estando registrado no INPI

(Instituto Nacional de Propriedade Intelectual) sob o número de patente PI 020060095443, de 29/06/2006. A análise quantitativa da composição química do SBL foi determinada de acordo com as metodologias elaboradas e validadas pela empresa. A composição graxa do SBL realizada por cromatografia gasosa (CG) demonstra o seguinte perfil: ácido palmítico (C16:0)= 25,0-40,0, ácido esteárico (C18:0)= 7,0-15,0%, ácido oléico (C18:1)= 8,0-15,0%, ácido linoléico (C18:2)= 35,0-48,0%. O conteúdo de palmitato de cafestol é determinado por CLAE/HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e encontra-se na faixa de concentração que varia de 6,0 a 12,0%. Para o produto SBL, devido a associação, especifica-se o conteúdo de fitoesteróis (fitoesteróis totais) determinado por CG, o qual obedece a faixa de concentração que varia de 12,0 a 21,0%. O laudo de análise que contempla também as demais análises físico-químicas e microbiológicas especificadas para o produto encontra-se anexo (anexo 3).

3.2- Estudos *in vitro*

3.2.1- Linhagem de adipócitos humanos

Pré-adipócitos humanos criopreservados de origem subcutânea (Poietics™, PT-5020) foram adquiridos da Cambrex/Lonza Biosciences (Walkersville-MD). Os pré-adipócitos foram cultivados em garrafas de 25cm² (Corning Inc, New York, NY) em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂, com meio de cultura específico, contendo 500 mL de meio de crescimento de pré-adipócitos (PBM - Preadipocyte Basal Medium, PT-8200) suplementado com 50mL de soro fetal bovino (FBS - Fetal bovine Serum, PT-9000C), 5mL de L-glutamina (L-glutamine, PT9001C) e 5mL de uma associação de antibióticos contendo penicilina e estreptomicina (Penicillin-Streptomycin, PT-9002C).

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e ao atingiram aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen, Cat. 25200-072), neutralizadas com o próprio

meio de cultura, centrifugadas 220g por 10 minutos e semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de 1×10^5 células/poço.

O processo de diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos foi iniciado 24 horas após a semeadura das células nas placas através da substituição do meio de crescimento pelo meio de diferenciação de pré-adipócitos, constituído por 500 mL do meio de crescimento de pré-adipócitos (descrito acima), 2mL de insulina recombinante (h-Insulin, PT-9003C), 0,2mL de dexametasona (Dexamethasone, PT-9004C), 0,4mL de indometacina (PT-9005C) e 0,2mL de isobutilmetilxantina (IBMX - 3-Isobutyl-1-methylxanthine, PT-9006C). As células foram mantidas com este meio de cultura por aproximadamente 10-15 dias, até a completa diferenciação em adipócitos, para posterior incubação com as amostras a serem avaliadas.

3.2.2- Linhagem de fibroblastos humanos

Fibroblastos (FB) dérmicos humanos criopreservados (Clonetics™ NHDF-Normal Human Dermal Fibroblasts, CC-2511) na densidade de aproximadamente 1×10^6 células/ampola foram adquiridos da Cambrex/Lonza (Walkersville, MD). Os FB foram adicionados na densidade de 87.500 células em garrafas de 25cm² (Corning Inc, New York, NY), cultivados e expandidos até pelo menos a quinta passagem, em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂, utilizando meio de cultura específico, contendo 500mL de meio de cultura basal para fibroblastos (FBM - Fibroblast Basal Medium, CC-3131, Cambrex/Lonza) suplementado com 10mL de SBF (Fetal Bovine Serum, CC-4101J), 0,5mL de uma associação de antibióticos contendo gentamicina e anfotericina-B (GA-1000- Gentamicin Sulfate/Amphotericin-B, CC-4081J), 0,5mL de insulina bovina (Insulin Bovine, CC-4021J) e 0,5mL de fator de crescimento de fibroblastos humanos (rhFGF-B - r-Human Fibroblast Growth Factor-B, CC 4065-J).

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e ao atingiram aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen, Cat. 25200-072), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas (220 x g) por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de 1×10^5 células/poço para posterior irradiação e incubação as amostras a serem avaliadas.

3.2.3- Protocolo de incubação das culturas celulares com as amostras avaliadas

SBL, OC e F foram dissolvidos em meio de cultura específico para cada linhagem de célula ensaiada e então aplicados nas concentrações de 50,0, 25,0, 12,5, 6,25 e 3,12 mg/mL, com auxílio de uma dose não cototóxica de Tween 20 (polissorbato 20). A seleção destas doses foi baseada em ensaios prévios de viabilidade/citotoxicidade celular através do método MTT.

Os adipócitos foram incubados com SBL, OC e F após sua completa diferenciação e o sobrenadante da cultura foi coletado após 2, 8 e 24 horas para a quantificação de ácidos graxos livres (AGL) e após 48 horas para quantificação de leptina. Após a retirada do sobrenadante, as culturas receberam AdipoRed[®] Assay Reagent (PT-7009, Cambrex/Lonza Walkersville, MD) para coloração dos triglicerídeos intracelulares.

A cultura de fibroblastos, após 48 horas de semeadura nas placas de 24 poços foram incubados com as diferentes concentrações das amostras. O sobrenadante foi coletado após 48 horas de incubação para mensuração dos níveis de colágeno, elastina, glicosaminoglicanas, TGF- β e GM-CSF.

Os fibroblastos também foram cultivados em gel de colágeno (3D Collagen Cell Culture System, Chemicon International, USA) na concentração de 1×10^6 cel/mL para avaliação da capacidade contrátil após tratamento com SBL.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.2.4- Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular

A viabilidade celular foi determinada por um método colorimétrico que utiliza o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) (VISTICA et al., 1991; MOSMANN, 1983). Esse ensaio é baseado na conversão do brometo de tetrazolium amarelo (MTT) para formazan azul pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis. Fibroblastos humanos foram semeados na densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, DM). SBL, OC e F foram dissolvidos em meio de cultura específico e adicionados à placa de 96 poços em uma diluição seriada na faixa de 100,0 a 0,195 mg/mL. A cultura foi incubada por um período de 48 horas. O MTT foi então adicionado na cultura na concentração de 5mg/mL (30 μ L/poço) e incubado por mais 4 horas. O conteúdo do poço foi removido e 100 μ l de etanol foi adicionado com o propósito de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância (A) de cada poço foi determinada a 570 nm em um leitor de Elisa (LGC Biotecnologia, Brasil). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem e calculada conforme a equação:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{absorbância da amostra incubada com as amostras}}{\text{absorbância do controle}} \times 100$$

3.2.5- Quantificação de citocinas TGF- β e GM-CSF

TGF- β e GM-CSF foram quantificadas utilizando kits de ensaios imunoenzimáticos (ELISA sanduíche) disponíveis comercialmente (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN). 100 μ L do anticorpo monoclonal anti-citocina de captura foi adicionado na placa de 96 poços, que foi incubada por 12 horas a temperatura ambiente (TA). Após este período os poços foram lavados com uma

solução de tampão de lavagem (PBS/Tween) e incubados com uma solução de bloqueio (300 μ L), contendo PBS e albumina sérica bovina (BSA) durante 1 hora (TA). As amostras (sobrenadantes provenientes da cultura de adipócitos e fibroblastos) e os padrões (citocinas recombinantes) foram adicionados e a placa foi incubada por 2 horas (TA). O anticorpo monoclonal de detecção anti-citocina foi então preparado e incubado por mais 2 horas (TA). Adicionou-se uma solução de estreptavidina-peroxidase e incubou-se por 1 hora (TA). Finalmente, a solução de substrato (H_2O_2 e TMB - tetrametilbenzidina) foi adicionada à placa e uma coloração azul se desenvolveu dentro de um período de 20 minutos. A reação de coloração foi interrompida adicionando-se H_2SO_4 2N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas (Microplate Reader, LCG Biotecnologia, São Paulo, Brasil) a 450nm. Os níveis de citocinas foram expressos em pg/mL, calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes.

3.2.6- Mensuração da produção dos componentes da matriz extracelular

Colágeno e elastina e GAG foram quantificados no sobrenadante da cultura de fibroblastos.

3.2.6.1- Colágeno

O colágeno total solúvel (tipo I e IV) foi mensurado utilizando Sircol Kit (Bicolor, Belfast, Irland). Em tubos plásticos próprios para microcentrífuga, 1mL do corante Sircol (vermelho sirius em ácido pícrico) foi adicionado em 100 μ L da amostra teste e agitado durante 30 minutos em TA. O complexo colágeno-corante formado foi precipitado por centrifugação (10.000 x g) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão re-suspendido em 1mL de reagente álcali (NaOH 0.5M). Alíquotas de 200 μ L foram transferidas para uma placa de 96 poços e as absorbâncias determinadas em 540nm. A concentração de colágeno foi

realizada com base na curva de calibração utilizando colágeno padrão fornecido pelo fabricante do kit.

3.2.6.2- Elastina

Os níveis de elastina foram determinados segundo o protocolo descrito no kit de detecção Fastin (Biocolor, Belfast, Irland). O conteúdo de elastina das amostras foi precipitado em tubos de microcentrífuga após a adição de 1mL de reagente de precipitação (ácido tricloroacético e arginina) e incubação a 0°C por 24 horas. Após a centrifugação dos tubos (10.000 x g) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão de elastina re-suspendido em 1mL de TPPS (5,10,15,20-tetrafenil-21,23-porfina sulfonato) e 200 µL de sulfato de amônio saturado 90% para a formação do complexo elastina-corante. Após 60 minutos de agitação, os tubos foram novamente centrifugados (10.000 x g) por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o complexo re-suspendido em 1mL do reagente de dissociação (HCl guanidina e 1-propanol) que permitiu a formação do complexo colorido, cuja absorbância foi medida em 513nm. A concentração de colágeno foi realizada com base na curva de calibração utilizando colágeno padrão fornecido pelo fabricante do kit.

3.2.6.3- GAGs

GAG sulfatada foi mensurada pela reação de coloração Blyscan (Biocolor, Belfast, N. Ireland). 1mL do corante azul 1,9-dimetilmetileno foi adicionado às amostras e homogeneizados por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos, formando um complexo insolúvel com a GAG sulfatada. O sobrenadante foi removido e o complexo GAG-corante foi recuperado com o reagente de dissociação (sal caotrópico em 1-propanol) e a absorbância foi mensurada a 656nm. Os níveis de GAG foram calculados a partir da curva padrão.

3.2.7- Quantificação de leptina

A leptina foi quantificada em sobrenadante de cultura de adipócitos humanos utilizando kit de ensaio imunoenzimáticos (ELISA sanduíche) disponíveis comercialmente (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN). 100µL do anticorpo de captura monoclonal anti-leptin foram adicionados à placa de 96 poços (Nunc) para incubação prévia por 12 horas em temperatura ambiente (TA). Após este período os poços foram lavados com uma solução de tampão de lavagem (PBS/Tween) e incubados com uma solução de bloqueio (300µL), contendo PBS e albumina sérica bovina (BSA) durante 1 hora em TA. Os sobrenadantes provenientes da cultura de adipócitos e o padrão recombinante (leptina recombinante) foi adicionado e a placa foi incubada por 2 horas em TA. O anticorpo monoclonal de detecção apropriado para leptina foi então preparado e incubado por mais 2 horas em TA. Adicionou-se uma solução de estreptavidina-peroxidase e incubou-se por 1 hora em TA. Finalmente, a solução de substrato (H_2O_2 e TMB - tetrametilbenzidina) foi adicionada à placa e uma coloração azul se desenvolveu dentro de um período de 20 minutos. A reação de coloração foi interrompida adicionando-se H_2SO_4 2N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450nm. Os níveis de leptina foram expressos em pg/mL, calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes.

3.2.8- Quantificação de ácidos graxos livres (AGL)

A quantificação de AGL foi feita através de um método enzimático colorimétrico NEFA C (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA) no sobrenadante da cultura de adipócitos. Esse método consiste na acilação da coenzima A (CoA) por ácidos graxos na presença de acil-CoA sintetase. A acil-CoA formada é então oxidada pela ação da acil-CoA oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, o qual na presença de peroxidase permite a condensação oxidativa de 3-metil-N-etil-(β -hidroxietil)-anilina com 4-aminoantipirina.

A densidade óptica da coloração púrpura formada por esta reação é então lida a 550nm. 50µL das amostras e das soluções do padrão foram colocadas em tubos de ensaio com 1mL do reagente de coloração A (acil-CoA sintetase, 4-aminoantipirina) e deixadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Em seguida, 2mL do reagente de coloração B (acil-CoA oxidase, peroxidase e 3-metil-N-etil-(β-hidroxietil)-anilina) foi adicionado aos frascos e incubados por mais 10 minutos no banho-maria. Removeram-se os tubos para a temperatura ambiente e a absorbância das amostras foi mensurada. A concentração de AGL nas amostras foi calculada com base na curva padrão.

3.2.9- Coloração dos Triglicerídeos Intracelulares com corante vermelho lipídeo- específico

A coloração dos lipídeos intracelulares (triglicerídeos) foi feita através da adição de um reagente colorimétrico específico para lipídeos, denominado AdipoRed™.

Assay Reagent (PT-7009, Lonza Walkersville, Inc., USA) diretamente sobre a cultura de adipócitos. Esse método consiste na simples interação entre um corante altamente lipofílico e permeável à membrana celular, o que resulta na coloração das gotículas de lipídeos acumuladas no meio intracelular. Após a impregnação das culturas celulares com o AdipoRed™, as imagens foram obtidas através de uma câmera digital de 3.2 megapixels acoplada ao microscópio binocular invertido.

3.2.10- Avaliação da Capacidade Contrátil em Gel de Colágeno

Esta técnica consiste em cultivar fibroblastos humanos em uma matriz colagênica em três dimensões, para a qual utilizou-se um kit comercial apropriado (3D Collagen Cell Culture System, ECM697, Chemicon International, USA).

Após tripsinização dos fibroblastos mantidos em cultura celular (item 3.2.2), uma suspensão de células foi preparada na concentração de 2×10^6 cel/mL e adicionada a uma solução de gel aquecida à temperatura suficiente para evitar a formação imediata do gel (aproximadamente 40°C). A mistura foi então homogeneizada e adicionada a uma placa de cultura de 6 well (Nunc, Roskilde, DM) e imediatamente transferida para uma incubadora úmida (5%CO₂, 37°C) por 60 minutos, para iniciar a polimerização do colágeno. Após este período, as placas receberam 2,5% de Slimbuster® L e 10ng/mL de TGF-β recombinante (Human TGF-β recombinant, R&D). Após 24 horas de contato, as células foram avaliadas utilizando microscopia de contraste de fase para avaliação qualitativa da contração de fibroblastos ou transformação em miofibroblastos.

3.3- Análise estatística

Um método paramétrico de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para a realização da análise estatística seguido do teste Tukey de comparação múltipla. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram menor que 0,05.

3.4- Avaliação histológica

Este estudo foi realizado de acordo com a Legislação Brasileira, baseada na “Resolução Normativa 196/96, CNS/MS”, mediante consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), protocolado sob o número 582/2006 (CAAE: 0460.0.146.000-06). Para estes experimentos, utilizou-se fragmentos de pele obtidos de blefaroplastias realizadas no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

3.4.1- Coleta do material e Preparo das amostras para tratamento com os produtos-testes

Os fragmentos de pele utilizados neste estudo foram provenientes de blefaroplastias eletivas de pacientes sadios submetidos à cirurgia oftalmo-plástica no Centro Cirúrgico Ambulatorial do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os pacientes foram abordados no pré-operatório sobre a possibilidade de doarem a pele para este estudo. Toda a explicação necessária constante deste trabalho foi informada aos pacientes que consentiram e assinaram o Termo de Consentimento. Após a realização do procedimento cirúrgico pelo corpo clínico da oftalmo-plástica, os fragmentos de pálpebras foram acondicionados em frascos plásticos contendo soro fisiológico 0,9%, podendo ficar armazenados até 18 horas antes da manipulação. As amostras biológicas foram removidas da solução salina, mergulhadas em etanol 70% durante 15 segundos e lavadas 2 vezes em nova solução de salina. Os fragmentos foram transferidos para uma placa de petri contendo meio de cultura RPMI suplementado com SBF (Fetal Bovine Serum, CC-4101J), associação de antibióticos contendo gentamicina e anfotericina-B (GA-1000 - Gentamicin Sulfate/Amphotericin-B, CC-4081J), insulina bovina (Insulin Bovine, CC-4021J) e de fator de crescimento (rhFGF-B - r-Human Fibroblast Growth Factor-B, CC 4065-J), por um período máximo de 24 horas, até o tratamento com as amostras a serem testadas.

3.4.2- Protocolo de incubação dos fragmentos de pele com as amostras a serem avaliadas

O SBL (25mg/mL) foi dissolvido em meio de cultura e aplicado sobre o fragmento de pele de forma homogênea sobre toda a superfície. As amostras foram mantidas em contato com o fragmento por um período 48 horas em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂, para posterior realização dos cortes histológicos.

3.4.3- Realização dos cortes histológicos

As amostras de pele foram fixadas em formol tamponado a 10%. Após seu período de fixação, o material foi incluído em blocos de parafina, e realizados cortes seriados com cerca de 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro. Os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H/E). Os parâmetros visuais qualitativos avaliados foram a espessura da epiderme, o número de queratinócitos viáveis (camada basal, camada granulosa e camada espinhosa) e condição de barreira pela integridade física do estrato córneo.

3.5- Estudos clínicos

Os estudos clínicos apresentados neste trabalho foram realizados em parceria com o Instituto de Bioengenharia da Pele Evic Brasil, empresa integrada ao Grupo Evic International, que atende todos os aspectos legais e éticos necessários para a avaliação de segurança e eficácia de produtos cosméticos e dermatológicos.

3.5.1- Avaliação da eficácia

3.5.1.1- Eficácia subjetiva e objetiva (medidas instrumentais)

3.5.1.1.1- Objetivo do estudo

O estudo objetivou avaliar sensorialmente de forma subjetiva o efeito como coadjuvante na melhora da celulite de uma formulação cosmética contendo a 3,0% (p/p) de SLIMBUSTER® L em comparação com a formulação placebo em condições normais de uso, durante 60 dias. Cosmética.

A redução de medidas foi verificada através de:

- (a) medidas antropométricas (centimétricas);
- (b) medidas da espessura da hipoderme através de ultrassonografia);
- (c) da temperatura cutânea;
- (d) da gordura corporal e
- (e) do peso corporal no início do estudo (D1/T0), após 30 dias (D30) e 60 dias (D60) de uso.

As qualidades cosméticas foram avaliadas, após 30 dias e no final do estudo, usando-se um questionário dirigido respondido pelos voluntários.

3.5.1.1.2- Relevância do estudo e aspectos éticos

Este estudo foi realizado de acordo com a Legislação Brasileira, baseada na “Resolução Normativa 196/96, CNS/MS”, tendo o consentimento e aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital Leonor Mendes de Barros (São Paulo-SP).

O estudo objetivou um melhor conhecimento da apreciabilidade dos produtos testados e os riscos previsíveis incorridos pelas voluntárias que fizeram parte do estudo. Houve uma conveniência entre o objetivo do estudo e os possíveis riscos relacionados às modalidades planejadas no protocolo. Devido às exigências metodológicas, todas as voluntárias não foram incluídas no mesmo dia. Assim, no caso de uma reatividade significativa não-esperada em um ou várias das voluntárias incluídas inicialmente, o teste poderia ser interrompido para o restante do painel.

Os riscos previstos para este tipo de estudo eram a possível manifestação de uma alergia a um determinado produto cosmético ou o possível aparecimento de uma irritação no local de aplicação, na forma de vermelhidão da pele, prurido, aquecimento, formigamento, repuxamento, queimação, bolha,

crosta, ressecamento ou alteração da cor da pele. Se isto ocorresse, a aplicação do produto seria suspensa, sendo colocada ao voluntário toda a assistência que se fizesse necessária.

Todos os voluntários iniciaram o teste após devidamente informados e esclarecidos quanto à participação nesta pesquisa e forneceram seu consentimento informado, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A pesquisa manteve o anonimato do voluntário, e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer momento. Todos foram esclarecidos dos possíveis riscos mais freqüentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa/alérgica ou a não melhoria das condições propostas no início do estudo.

3.5.1.1.3- Princípio metodológico

As condições experimentais adotadas, tais como área experimental, quantidade do produto aplicada, freqüência e duração das aplicações reproduziram as condições normais de uso como indicado e o teste realizado em uma “pequena escala” refletiu a aplicação feita por futuros consumidores. A observância das condições experimentais pelas voluntárias que participaram do estudo deu-se através da avaliação por meio de um questionário ao final do estudo e por um controle de consumo do produto. A opinião das voluntárias foi levada em consideração, uma vez que ela reflete as opiniões de consumidores em potencial.

3.5.1.1.4- Tipo de estudo

O estudo realizado foi monocêntrico e aberto. O controle foi intraindividual, levando em consideração o grupo placebo. O estudo foi realizado de acordo com o procedimento operacional da EVIC Brasil, estabelecido para realização do projeto de teste em humanos.

3.5.1.1.5- Formulações e aplicação dos produtos

A formulação do produto placebo e do produto contendo ativo, encontram-se quantitativamente descritos, conforme tabela 3.

Tabela 3- Descrição qualitativa e quantitativa da formulação utilizada nos estudos de eficácia clínica.

COMPONENTES (nome comercial e descrição química)	PRODUTO COM ATIVO (Lote CSE001A05)
Montanov L (C14-22 Alcohol and C12-20 Alkylglucoside)	3,0
Lactato de miristila	6,0
SLIMBUSTER® L	3,0
Uniqulan NA ₂ S (EDTA dissódico)	0,1
Suspender	0,5
Chemynol	0,5
Sepigel 501	1,0
Água deionizada	q.s.p. 100,0%

As formulações foram preparadas no Laboratório de Assistência Técnica da Chemyunion Química Ltda e fornecidas, com os respectivos números de lote, antes do estudo juntamente com a fórmula quantitativa, o termo de responsabilidade técnico sobre a conformidade do produto, dados de segurança e modo de uso.

As condições experimentais de uso dos produtos teste foram:

Tabela 4- Condições experimentais e modo de aplicação dos produtos no estudo de eficácia subjetiva

Zona de aplicação do produto	Modo de aplicação	Aplicação residencial (frequência/duração)
Aplicação no abdômen, nas nádegas e nas coxas.	Aplicar uma pequena quantidade do produto e espalhar sobre a pele até a absorção.	Duas vezes ao dia, manhã e noite, por 60 dias.

OBS: Foi fornecido um produto placebo para que fosse aplicado em todas as áreas do corpo em que não se utilizou o produto teste. Todas as condições experimentais de aplicação no Instituto em domicílio, definidas no protocolo, foram respeitadas.

3.5.1.1.6- Voluntários

Número

O número de voluntárias cujos dados foram extrapolados no final do estudo é 20. Vinte e nove voluntários foram incluídos no estudo, sendo que:

- Dez voluntários (DILC S - V02, JOSI P - V03, VANJ C - V04, AILD F - V06, ADRI M - V10, JOEL T - V12, CRIS S - V13, ROBE P - V15, ALES S - V16 e PRIS F - V27) desistiram do estudo por motivos pessoais, não relacionados ao protocolo;
- Um voluntário (ANAM A - V17) não compareceu na última visita para a medida da hipoderme por motivos pessoais, não relacionados ao estudo;
- Um voluntário (FERN C - V14) foi excluído do estudo pelo investigador devido às sensações de desconforto.

As medidas antropométricas, de gordura corporal e a temperatura cutânea foram realizadas em 18 voluntários.

As medidas da espessura da hipoderme por ultrassonografia foram realizadas em 17 voluntários.

Critérios específicos de inclusão

Os critérios específicos de inclusão, definidos no protocolo, foram:

- idade: de 20 a 40 anos;
- sexo: feminina;
- fototipo: de I a IV;
- usuários ocasionais ou regulares de produtos para celulite;
- presença moderada de celulite nas nádegas e coxas.

As informações tipológicas dos voluntários encontram-se em anexo.

Critérios específicos de não-inclusão

Os critérios específicos de não-inclusão, definidos no protocolo, são os seguintes:

- marcas cutâneas na área experimental que possam interferir nas avaliações das reações cutâneas (problemas de pigmentação, cicatrizes, pilosidade superdesenvolvida, efélides e nevus em grande quantidade, queimadura solar, etc);

- alergia ou reatividade a categoria de produtos testada;
- anorexia;
- tratamento hormonal não balanceado;
- previsão de alteração dos métodos contraceptivos orais durante o período do estudo;
- tratamento com produtos anti-celulite ou redutores de gorduras 3 meses antes de início do estudo;
- tratamento anti-celulite como: drenagem linfática, mesoterapia, acupuntura, massoterapia, sauna, etc.;
- obesidade;
- dieta de emagrecimento;
- menopausa;
- hiperuricemia;
- dismenorréia;
- hipercolesteromia;
- hiperglicemia;
- insuficiência circulatória;
- tratamento por um produto hidratante na zona experimental 2 semanas antes do início do estudo;
- alergia a látex;
- mulheres em período de gestação ou amamentando.

Todos os voluntários corresponderam aos critérios específicos de não-inclusão.

3.5.1.1.7- Benefícios do estudo

Esse estudo visou atender uma regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Com esse estudo, o voluntário pode ter tido uma melhora no aspecto geral do corpo com uso do produto em estudo.

3.5.1.1.8- Exigências requeridas pelo estudo

As exigências impostas aos voluntários são as seguintes:

- não aplicação de produtos anti-celulite ou redutores de gordura localizada diferentes dos testados durante o período do estudo;
- não exposição solar intensa (natural ou câmaras de bronzamento) durante o período do estudo;
- não alteração dos hábitos de higiene;
- não realização de tratamentos anti-celulite (mesoterapia, acupuntura, hidroterapia, drenagem linfática, massoterapia, sauna,...) durante período do estudo;
- não utilizar medicamentos como tranqüilizantes, antidepressivos, diuréticos, laxantes ou psicotrópicos;
- não realizar esfoliação na área experimental;
- não alterar os hábitos de consumo de café, álcool e tabaco;

- não alterar a dieta;
- não alterar os modos de vestimenta;
- não utilizar moderadores de apetite ou anoréticos (fibras);
- não realizar dieta emagrecedora;
- não alterar os hábitos de atividades físicas;
- não alterar o método contraceptivo oral durante o período do estudo;
- comparecimento no Instituto nos mesmos horários em todas as visitas;
- comunicar qualquer desvio ao Investigador.

3.5.1.1.9- Controle de observação das modalidades do protocolo

Os voluntários foram questionados no final do estudo sobre o modo como utilizaram o produto teste. Avaliou-se a importância de possíveis desvios em comparação com as condições experimentais requeridas no início do estudo. Verificou-se também o cumprimento das restrições do estudo pelos voluntários. O resumo das respostas obtidas está apresentado no anexo.

Todos os desvios em relação ao protocolo foram analisados, bem como seus efeitos sobre a validade dos resultados.

Um controle de consumo do produto foi realizado e o consumo individual e médio do painel foram calculados no final do estudo. As amostras dadas aos voluntários foram pesadas antes de sua abertura no início do estudo e após a última aplicação. O consumo médio do produto foi comparado ao consumo teórico definido pelo Investigador no início do estudo e estimado por volta 4,0 por aplicação para cada um dos produtos aplicados. Os desvios individuais do

consumo por aplicação em relação ao consumo teórico foram analisados. Os resultados da pesagem das amostras e dos consumos individuais estão apresentados no anexo C.

O consumo médio do painel foi de 4,56 gramas por aplicação. Apesar do consumo médio do painel ter sido maior que o estimado, este fato não impacta nos resultados finais do estudo.

3.5.1.2- Apreciabilidade cosmética e eficácia subjetiva

Os voluntários responderam um questionário no final do estudo sobre itens correspondentes às qualidades cosméticas e eficácia do produto, de acordo com a categoria e público-alvo do produto.

As respostas individuais são agrupadas por itens e, para cada item, os resultados são expressos em porcentagem de voluntários “satisfeitos”.

Os itens avaliados foram:

Qualidades cosméticas:

- Fácil aplicação;
- Textura agradável;
- Fragrância agradável;
- Rápida penetração.

Eficácia:

- Pele mais lisa;
- Atenuação da celulite;
- Redução de gordura;

- Pele mais hidratada;
- Pele mais macia.

Preferência:

- Intenção de compra;
- Preferência do produto teste;
- Preferência do produto usual.

3.5.1.3- Eficácia Instrumental

3.5.1.3.1- Avaliação da espessura da hipoderme

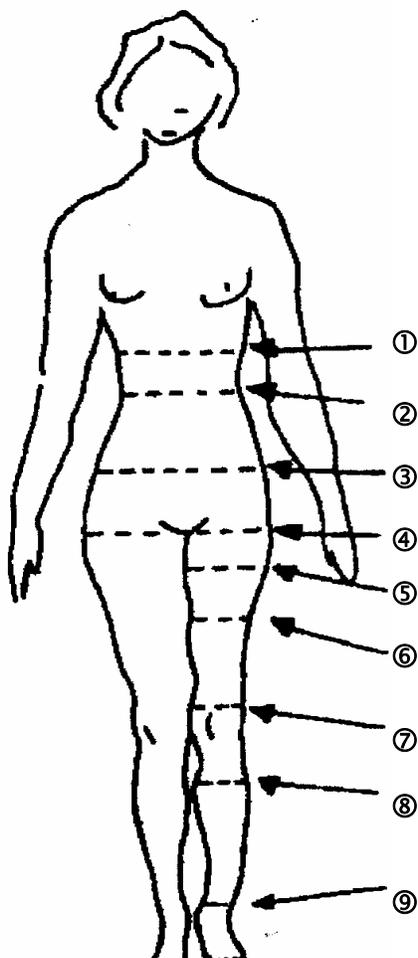
A espessura da hipoderme foi avaliada através de ultrassonografia no primeiro dia (D1), após 30 dias (D30) e após 60 dias (D60) por médico radiologista.

3.5.1.3.2- Medidas centimétricas e peso corporal

Essa avaliação permite verificar se os voluntários têm variação significativa no peso durante o estudo. O controle será feito por medidas centimétricas e pela pesagem dos voluntários.

Medidas centimétricas

Nos tempos experimentais (D1, D30 e D60) as medidas são feitas por 2 diferentes avaliadores, utilizando equipamento adequado (fita métrica) e nas seguintes regiões esquematizadas abaixo:



As áreas medidas são as seguintes:

- ① estômago;
- ② cintura;
- ③ quadris (parte superior);
- ④ quadris (parte inferior);

- ⑤ coxa (parte superior);
- ⑥ coxa (parte mediana);
- ⑦ coxa (parte inferior);
- ⑧ perna (parte superior);
- ⑨ perna (parte inferior).

Peso Corporal

A cada tempo experimental, os voluntários foram pesados sob as mesmas condições experimentais. Qualquer flutuação no peso menor que 2% do peso inicial foi considerada como não-significativa e como flutuações fisiológicas aceitáveis.

3.5.1.3.3- Avaliação da gordura corporal

A medida da gordura corporal foi realizada por um educador físico com adipômetro.

3.5.2- Análise estatística

Para os estudos de eficácia clínica subjetiva e instrumental, a análise foi feita através de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972) em que efeito de tratamento e tempo foram avaliados. Para se levar em conta a medida repetida, empregou-se o método GEE (Generalized Estimating Equations, Liang e Zeger, 1986). A distribuição postulada para as respostas foi a Binomial; as observações foram feitas em categorias. Estimam-se as proporções de respostas em cada categoria, por tratamento e tempo. Os cálculos foram feitos com o sistema SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC), sob sistema operacional Linux (Mandriva).



4- RESULTADOS

4.1- Resultados *in vitro*

4.1.1- Avaliação do potencial citotóxico do Slimbuster[®] L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F)

A possível ação citotóxica de SBL, OC e F foi avaliada utilizando o método de MTT em cultura de fibroblastos humanos incubados com diferentes concentrações dos compostos, obedecendo uma faixa de 100 a 0,195mg/mL.

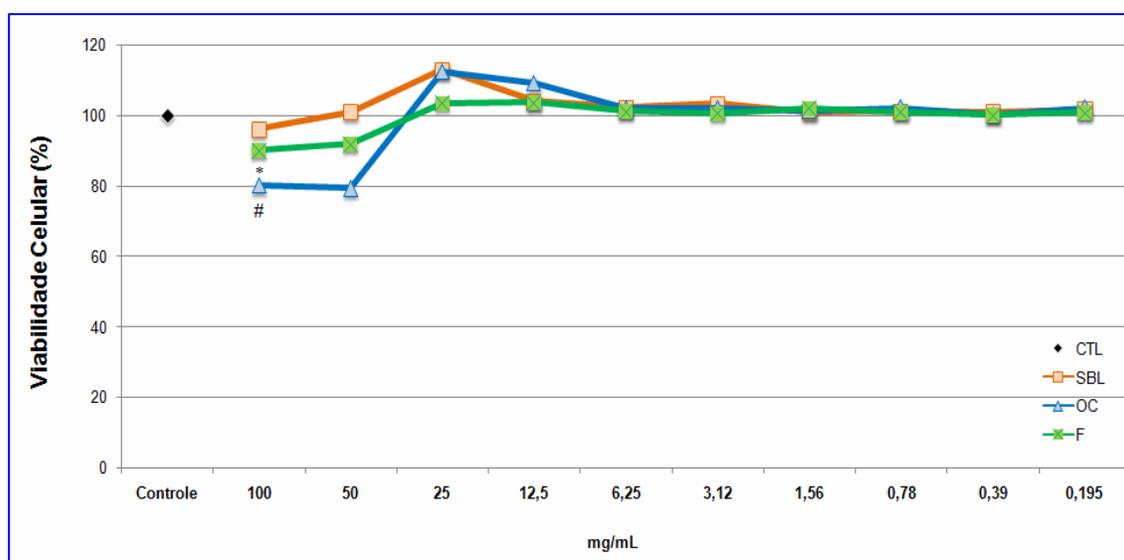


Figura 8- Efeitos do Slimbuster[®] L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos. Fibroblastos humanos foram incubados com os compostos em diferentes concentrações (100-0,195mg/mL) durante 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtidos de 3 experimentos independentes.

Conforme podemos observar na figura 8, SBL, OC e F apresentaram, mesmo nas maiores doses avaliadas, ausência de potencial citotóxico, mantendo a viabilidade celular em níveis ótimos (superior a 80,0%) respectivamente, alcançando níveis ótimos de viabilidade celular a partir da dose de 5mg/mL. As duas maiores concentrações de OC avaliadas neste estudo (100,0 e 50,0mg/mL) reduziram a população celular em aproximadamente 20,0%, o que apesar de estatisticamente significativo em relação ao controle, não são considerados efeitos citotóxicos. O mesmo aconteceu para F, o qual apresentou uma redução de aproximadamente 10,0% na viabilidade das células. SBL, por sua vez, mesmo nas maiores concentrações avaliadas manteve a população celular próxima dos 100,0% de viabilidade.

4.1.2- Avaliação do efeito lipolítico do Slimbuster[®] L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F)

O possível efeito lipolítico dos compostos foi avaliado através da mensuração da liberação de ácidos graxos livres (NEFA, Non-Esterified free Fatty Acids) em cultura de adipócitos humanos.

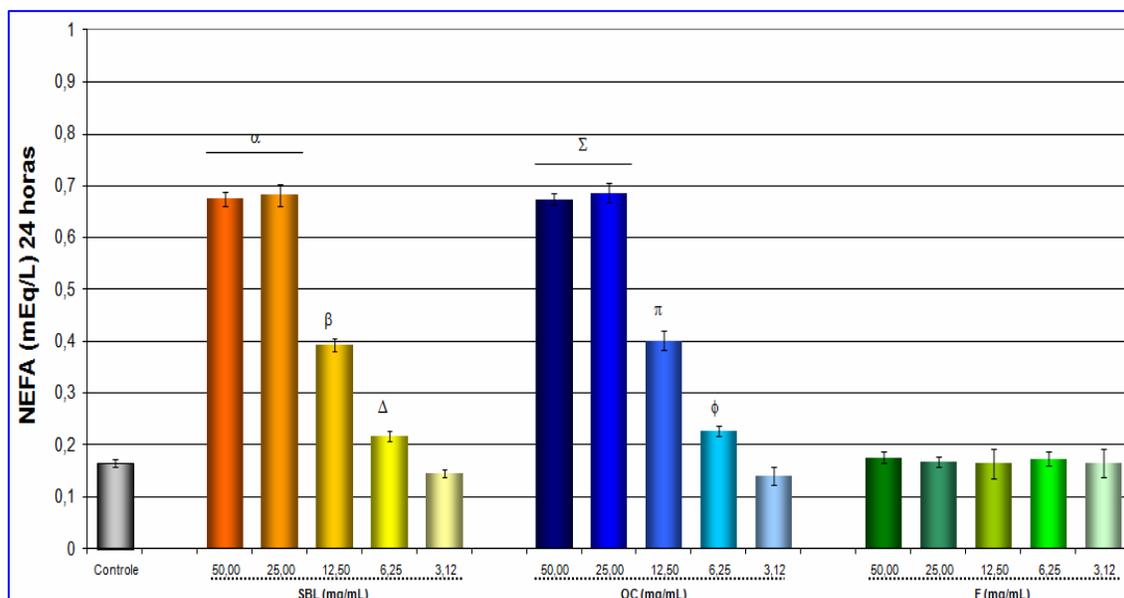


Figura 9- Efeitos do *Slimbuster*[®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a liberação de ácidos graxos livres (NEFA) em cultura de adipócitos humanos. Adipócitos humanos foram incubados com SBL, OC ou F em condição basal e a concentração de NEFA liberados foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 24 horas de incubação com os produtos. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). Para SBL: $\alpha P < 0,001$, em relação ao controle, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL; $\beta P < 0,001$, em relação ao controle, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL; $\Delta P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 3,12mg/mL; Para OC: $\Sigma P < 0,001$, em relação ao controle, 12,5, 6,25, 3,12mg/mL; $\pi P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 6,25 e 3,12mg/mL. $\phi P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5, 3,12mg/mL (ANOVA, Tukey).

Conforme podemos observar na figura 9, SBL e OC apresentaram efeitos significativos sobre a liberação de NEFA, enquanto que F manteve os mesmos níveis que o controle. SBL e OC apresentaram perfis lipolíticos muito parecidos, sendo que 50,0 e 25mg/mL, em ambos os casos não significativas entre si, aumentaram em aproximadamente 4,1 vezes os níveis de NEFA em relação ao controle não-tratado. SBL e OC também apresentaram ausência de significância quando comparamos as doses de 12,5 e 6,25mg/mL de ambos, uma vez que induziram uma liberação de NEFA aproximadamente 2,4 e 1,4 vezes maiores, respectivamente, em relação ao grupo que não recebeu tratamento (controle). Em ambos os casos, a concentração de 3,12mg/mL não induziu aumento da taxa de lipólise, mantendo os níveis de NEFA similares aqueles obtidos para o controle.

4.1.3- Avaliação dos efeitos do Slimbuster[®] L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de leptina

O possível efeito dos compostos sobre a indução da produção de leptina foi avaliado através da sua quantificação em sobrenadante das culturas de adipócitos humanos.

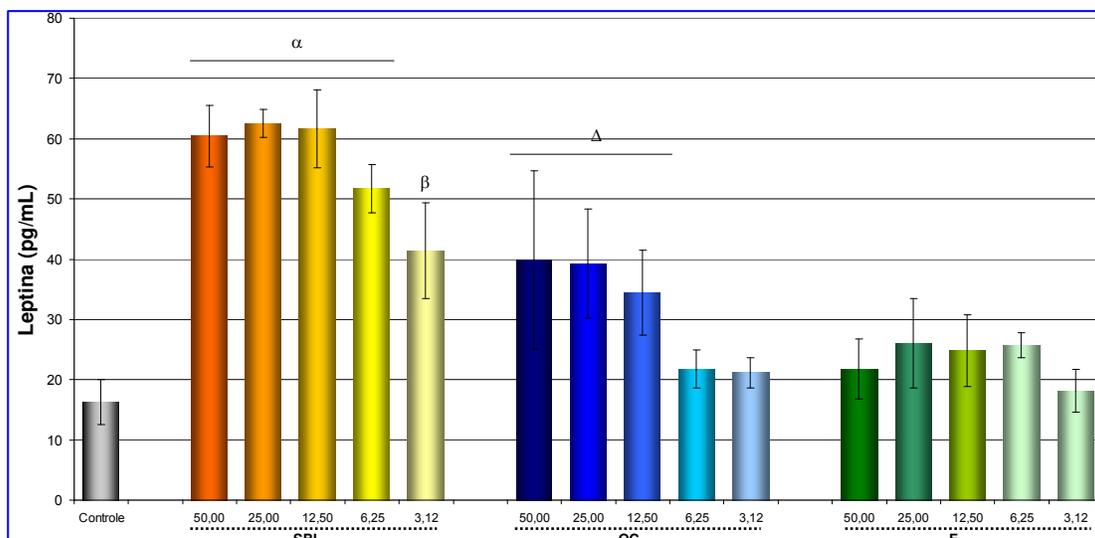


Figura 10- Efeitos do *Slimbuster*[®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de leptina em cultura de adipócitos humanos. Adipócitos humanos foram incubados com SBL, OC ou F em condição basal e a leptina liberada foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação com os produtos. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). Para SBL: $^{\alpha}P < 0,001$, em relação ao controle e 3,12mg/mL. $^{\beta}P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL; Para OC: $^{\Delta}P < 0,01$, em relação ao controle (ANOVA, Tukey).

De acordo com aos resultados apresentados na figura 10, SBL e OC aumentaram a produção de leptina em cultura de adipócitos, quando comparados ao grupo controle não-tratado. As concentrações de SBL situadas na faixa que varia de 50,0 a 6,25mg/mL, não significativas entre si, induziram um aumento médio de aproximadamente 3,5 vezes em relação ao controle. A concentração de 3,12mg/mL também aumentou significativamente os níveis do hormônio leptina, sendo este aumento aproximadamente 2,5 vezes superior ao controle. O OC, por sua vez, demonstrou efeito importante, porém menos expressivo que o SBL,

sendo que 50,0, 25,0 e 12,5mg/mL, concentrações não significativas entre si, induziram uma síntese de leptina 2,2 vezes superior àquela obtida para o grupo controle. Os grupos que receberam as diferentes concentrações de F avaliadas neste estudo, não apresentaram aumento nos níveis de leptina no sobrenadante da cultura celular.

4.1.4- Avaliação dos efeitos do Slimbuster[®] L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de fatores de crescimento

Para avaliar os possíveis efeitos destes compostos sobre a indução da produção de fatores de crescimento, avaliamos neste estudo a produção de TGF- β e GM-CSF em cultura de fibroblastos humanos.

4.1.4.1- TGF- β

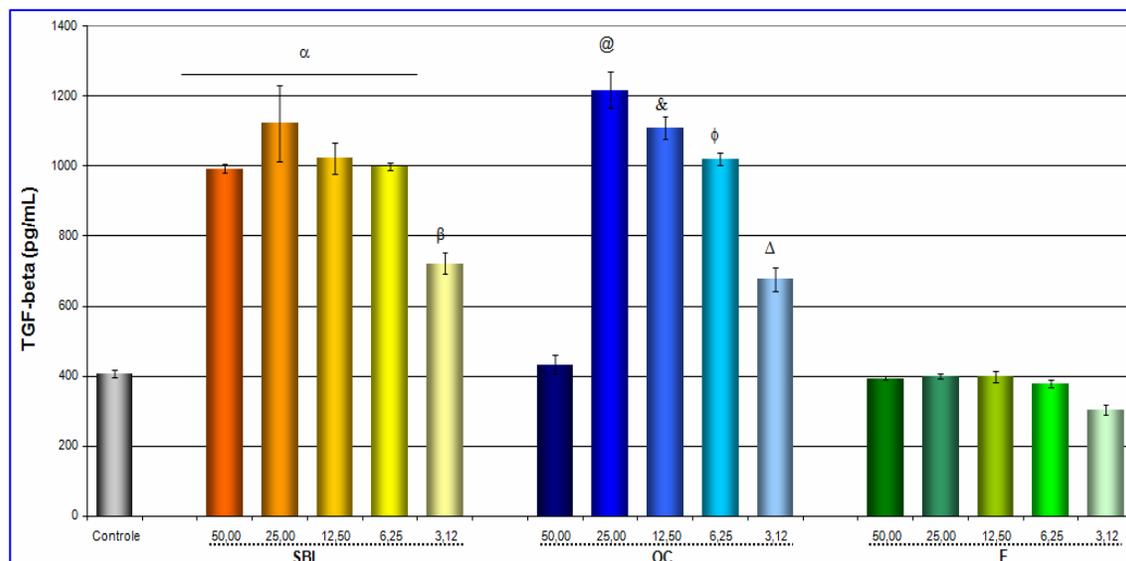


Figura 11- Efeitos do *Slimbuster*[®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de TGF- β em cultura de fibroblastos humanos. Fibroblastos humanos foram incubados com SBL, OC ou F em condição basal e a concentração de TGF- β foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação com os produtos. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). *Para SBL:* $^{\alpha}P < 0,001$, em relação ao controle e 3,12mg/mL; $^{\beta}P < 0,05$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL; *Para OC:* $^{\textcircled{a}}P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL; $^{\&}P < 0,01$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 6,25 e 3,12mg/mL; $^{\phi}P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 3,12mg/mL; $^{\Delta}P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL (ANOVA, Tukey).

Conforme podemos observar na figura 11, SBL induziu um aumento expressivo na produção de TGF- β por fibroblastos humanos, sendo que as concentrações de 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL, não significativas entre si, induziram um aumento de aproximadamente 10,0 vezes nos níveis deste parâmetro. No entanto, a concentração de 3,12mg/mL, também significativa em relação ao controle, induziu um aumento de apenas 1,8 vezes. De maneira diferente, o OC também aumentou consideravelmente a produção de TGF- β , porém de forma concentração-dependente, sendo que 25,0, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL aumentaram em, respectivamente, 3,0, 2,7, 2,5 e 1,7 vezes os níveis deste fator de crescimento em relação ao controle. A concentração de 50,0mg/mL de OC, curiosamente, não apresentou efeito sobre a produção de TGF- β . Os resultados obtidos para F demonstram, também, ausência de efeitos significativos sobre a produção de TGF- β , em todas as concentrações avaliadas neste estudo.

4.1.4.2- GM-CSF

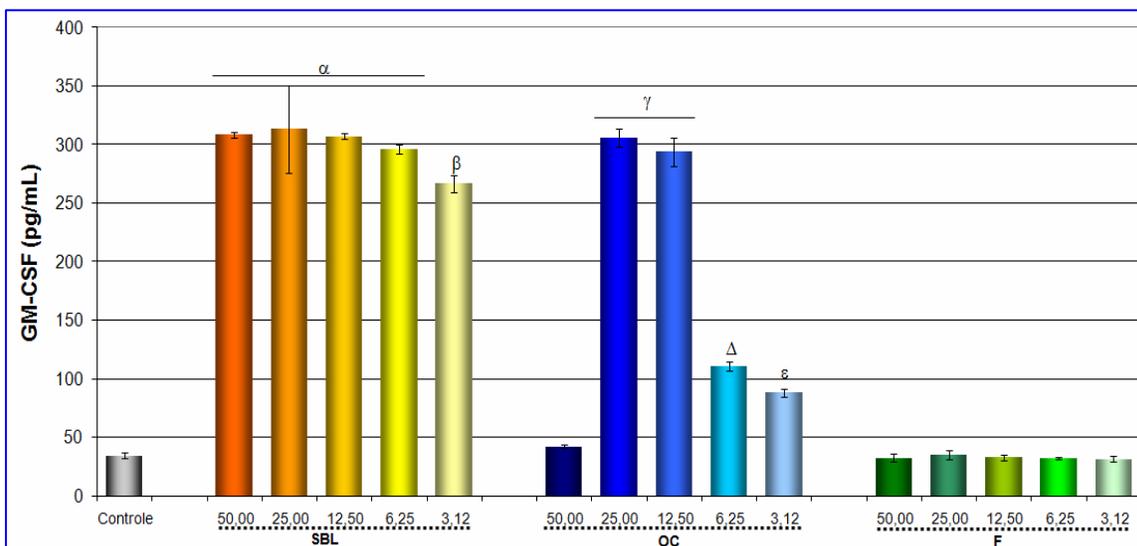


Figura 12- Efeitos do *Slimbuster*[®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de GM-CSF em cultura de fibroblastos humanos. Fibroblastos humanos foram incubados com SBL, OC ou F em condição basal e a concentração de GM-CSF foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação com os produtos. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). Para SBL: $\alpha P < 0,001$, em relação ao controle; $\alpha P < 0,05$, em relação a 3,12mg/mL; $\beta P < 0,05$, em relação ao controle; Para OC: $\gamma P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 6,25mg/mL e 3,12mg/mL; $\Delta P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 3,12mg/mL; $\epsilon P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL (ANOVA, Tukey).

Conforme podemos observar na figura 13, SBL induziu um aumento expressivo na produção de GM-CSF por fibroblastos humanos, sendo que as concentrações de 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL, não significativas entre si,

induziram um aumento de aproximadamente 8,9 vezes nos níveis deste parâmetro. No entanto, a concentração de 3,12mg/mL, também significativa em relação ao controle, induziu um aumento de apenas 7,7 vezes. O OC, por sua vez, apresentou efeitos similares aos do SBL para as concentrações de 25,0 e 12,5mg/mL, as quais induziram um aumento na produção de GM-CSF de aproximadamente 8,72 vezes em relação ao grupo não-tratado (controle). As concentrações de 6,25 e 3,12mg/mL de OC também demonstraram efeito estimulatório sobre a produção de GM-CSF, uma vez que induziram um aumento de aproximadamente 3,22 e 2,5 vezes, respectivamente. A concentração de 50,0mg/mL de OC, assim como ocorreu para o parâmetro TGF- β , não apresentou efeito sobre a produção de GM-CSF. Os resultados obtidos para F demonstram, também, total ausência de efeitos sobre a produção de GM-CSF em todas as concentrações avaliadas neste estudo.

4.1.5- Avaliação dos efeitos do Slimbuster[®] L (SBL), do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de proteínas da matriz extracelular (MEC)

Os efeitos de SBL, OC e F sobre a síntese dos componentes da MEC foi avaliada através da mensuração da produção de colágeno, elastina e glicosaminoglicanas (GAGs) em cultura de fibroblastos humanos tratadas com estes compostos.

4.1.5.1- Colágeno

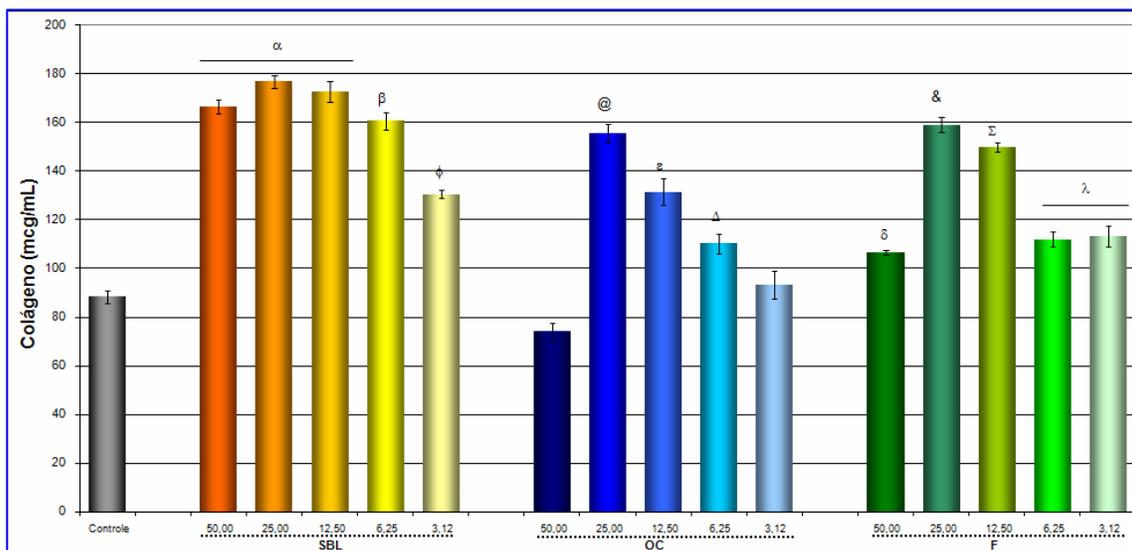


Figura 13- Efeitos do *Slimbuster*[®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de colágeno em cultura de fibroblastos humanos. Fibroblastos humanos foram incubados com SBL, OC ou F em condição basal e a produção de colágeno foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). *Para SBL:* $\alpha P < 0,001$, em relação ao controle, 6,25 e 3,12mg/mL; $\beta P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 3,12mg/mL; $\phi P < 0,001$, em relação ao controle e 50,0, 25,0 12,5 e 6,25mg/mL; *Para OC:* $@ P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL; $\epsilon P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 6,25 e 3,12mg/mL; $\Delta P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 3,12mg/mL; $\epsilon P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL; *Para F:* $\delta P < 0,001$, em relação ao controle, 25,0 e 12,5mg/mL; $\delta P < 0,005$, em relação a 6,25 e 3,12mg/mL; $\& P < 0,001$, em relação ao controle, 50,0, 12,50, 6,25, 3,12mg/mL; $\lambda P < 0,001$, em relação ao controle, 25,0 e 12,5mg/mL (ANOVA, Tukey).

De acordo com os resultados apresentados na figura 13, diferentemente do ocorrido para os demais parâmetros apresentados até o momento, tanto SBL e OC, quanto F apresentaram efeitos expressivos sobre a estimulação da síntese de colágeno em cultura de fibroblastos humanos. Os resultados mais evidentes alcançados com F foram aqueles obtidos com as concentrações de 25,0 e 12,5mg/mL, as quais induziram uma síntese 1,8 e 1,7 vez superior ao controle. 50,0, 6,25 e 3,12mg/mL de F demonstraram efeitos mais discretos, porém consideravelmente relevantes, uma vez que induziram um aumento de aproximadamente 1,3 vezes na síntese de colágeno. OC, por sua vez, também demonstrou um efeito na estimulação da síntese colagênica, pois induziu um aumento de aproximadamente 1,8, 1,5 e 1,3 vezes, respectivamente para as concentrações de 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL. 50,0 e 3,12mg/mL de OC não apresentaram efeitos significativos em relação ao controle. A associação entre F e OC, representada por SBL, demonstrou uma potencialização do uso combinado, uma vez que todas as concentrações avaliadas neste estudo induziram um importante aumento na síntese desta proteína da MEC. As concentrações de 50,0, 25,0 e 12,5mg/mL, não significativas entre si, foram capazes de aumentar em aproximadamente 2,0 vezes a síntese de colágeno quando comparadas ao grupo controle. Já 6,25 e 3,12mg/mL de SBL promoveram um aumento aproximado de 1,82 e 1,47 vezes, respectivamente.

4.1.5.2- Elastina

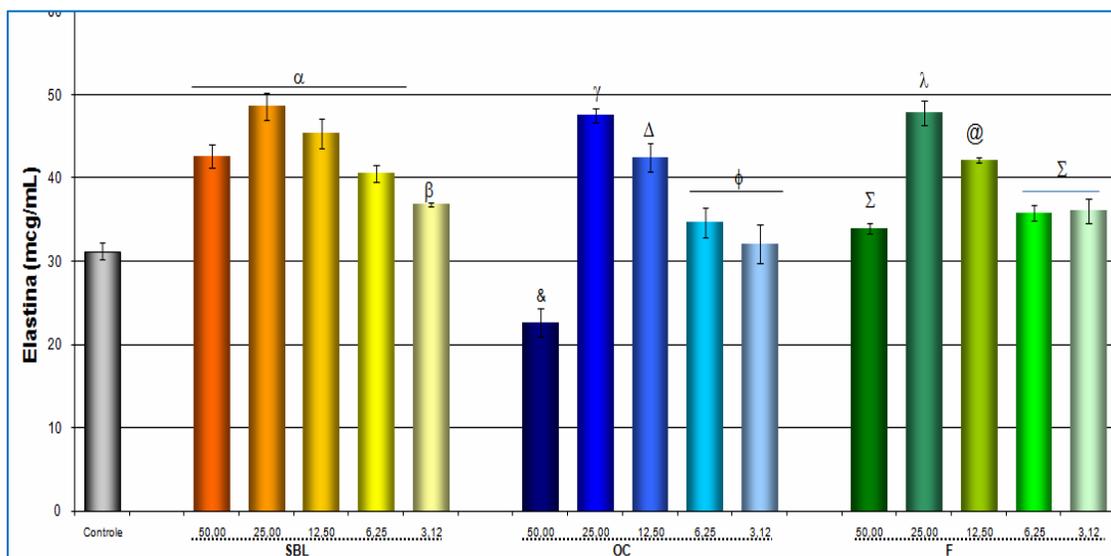


Figura 14- Efeitos do *Slimbuster*[®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos. Fibroblastos humanos foram incubados com SBL, OC ou F em condição basal e a produção de elastina foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). Para SBL: α P<0,001, em relação ao controle e 3,12mg/mL; β P<0,01, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,50 e 6,25mg/mL; Para OC: $\&$ P<0,001, em relação ao controle, 25 e 12,5mg/mL; $\&$ P<0,01, em relação a 6,25 e 3,12mg/mL; γ P<0,001, em relação ao controle e 50mg/mL, γ P<0,05, em relação a 12,50mg/mL e γ P<0,01, em relação a 6,25 e 3,12 mg/mL; Δ P<0,001, em relação ao controle e 50mg/mL, Δ P<0,01 em relação 6,25 e 3,12mg/mL, ϕ P<0,01, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5mg/mL; Para F: Σ P<0,05, em relação ao controle, Σ P<0,001, em relação a 25,0 e 12,5mg/mL; λ P<0,001, em relação ao controle, 50,0, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL; δ P<0,001, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 6,25 e 3,12mg/mL; π P<0,01, em relação ao controle, 25,0, 12,5mg/mL (ANOVA, Tukey).

De acordo com os resultados apresentados figura 14, similarmente ao ocorrido para colágeno, tanto SBL e OC, quanto F apresentaram efeitos expressivos sobre a estimulação da síntese de elastina em cultura de fibroblastos humanos. Os resultados mais evidentes alcançados com F foram aqueles obtidos com as concentrações de 25,0 e 12,5mg/mL, as quais induziram uma síntese 1,55 e 1,45 vez superior ao controle. 50,0, 6,25 e 3,12mg/mL de F demonstraram efeitos mais discretos, porém consideravelmente relevantes, uma vez que induziram um aumento de aproximadamente 1,3 vezes na síntese de elastina. O OC também demonstrou um efeito significativo na estimulação da síntese colagênica, pois induziu um aumento de aproximadamente 1,5, 1,35, 1,2 e 1,1 vezes, respectivamente para as concentrações de 25,0, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL. De forma curiosa, a concentração de 50,0mg/mL reduziu a síntese de elastina quando avaliamos os valores obtidos para o grupo controle. SBL, representado pela associação OC e F, demonstrou uma potencialização do uso combinado, uma vez que todas as concentrações avaliadas neste estudo induziram um importante aumento na síntese desta proteína da MEC. As concentrações de 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL, não significativas entre si, foram capazes de aumentar em aproximadamente 1,4 vezes a síntese de elastina quando comparadas ao grupo controle. 3,12mg/mL de SBL, no entanto, promoveram um aumento aproximado de 1,17 vez, respectivamente.

4.1.5.3- Glicosaminoglicanas (GAGs)

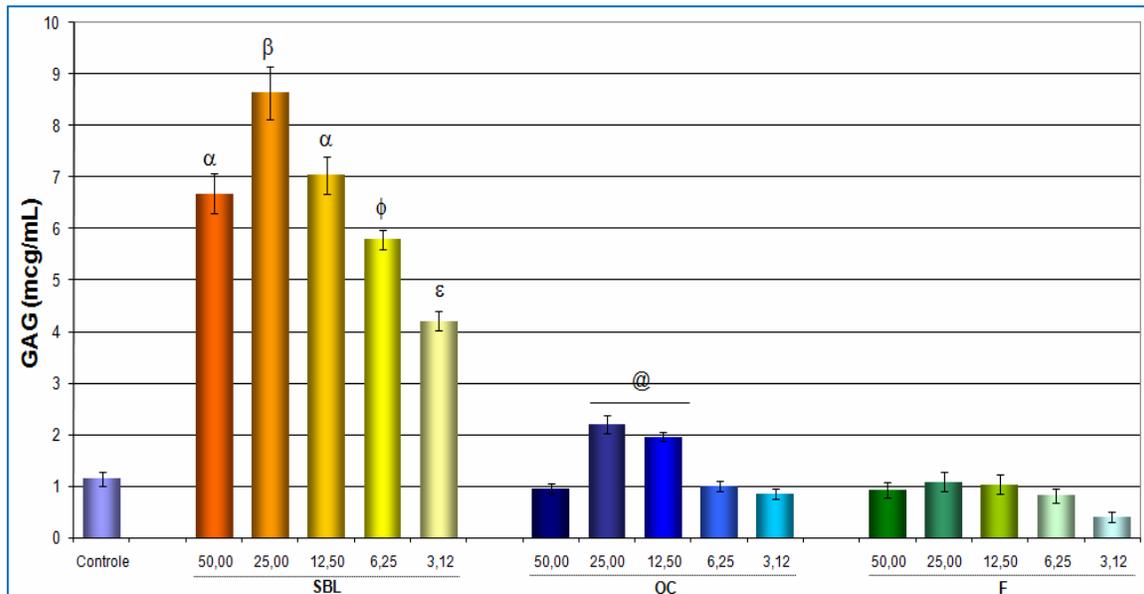


Figura 15- Efeitos do *Slimbuster*[®] L, do óleo de café verde (OC) e dos fitoesteróis de canola (F) sobre a produção de GAGs em cultura de fibroblastos humanos. Fibroblastos humanos foram incubados com SBL, OC ou F em condição basal e a produção de GAGs foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). Para SBL: α P<0,01, em relação ao controle, 25,0, 6,25 e 3,12mg/mL. β P<0,001, em relação ao controle e 50,0, 12,5, 6,25, 3,12mg/mL. ϕ P<0,001, em relação ao controle, 25,0, 12,5 e 3,12mg/mL. ϕ P<0,05 em relação a 50,0mg/mL. ϵ P<0,001, em relação ao controle, 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25mg/mL; Para OC: $@$ P<0,001, em relação ao controle, 50,0, 6,25 e 3,12mg/mL (ANOVA, Tukey)..

De acordo com os resultados apresentados figura 15, de forma diferente daquelas obtidas para as demais proteínas da MEC, as frações de SBL não demonstram potente atividade estimuladora da síntese de GAGs. F não apresentou nenhum efeito estimulatório, enquanto que OC, apenas para as concentrações de 25,0 e 12,5mg/mL demonstraram discreto efeito. SBL, no entanto, representado pela associação de OC e F, apresentou excelentes resultados, em todas as concentrações testadas. 50,0 e 12,5mg/mL de SBL estimularam em aproximadamente 6 vezes. A concentração de 25,0mg/mL foi a mais expressiva, gerando um estímulo aproximado de até 7,6 vezes sobre a síntese de elastina. 6,25 e 3,12mg/mL de SBL aumentaram os níveis de elastina em aproximadamente 5,0 e 3,7 vezes, respectivamente.

4.2- Resultados da Avaliação Qualitativa do Conteúdo Intracelular de Lipídeos (AdipoRed™ Reagent)

4.2.1- Efeitos do Slimbuster® L (SBL) em adipócitos humanos corados com corante lipofílico específico

Neste experimento, avaliamos os efeitos de SBL (25mg/mL) aplicados sobre a cultura de adipócitos humanos de pele em condição basal em comparação com o respectivo controle (não-tratado).

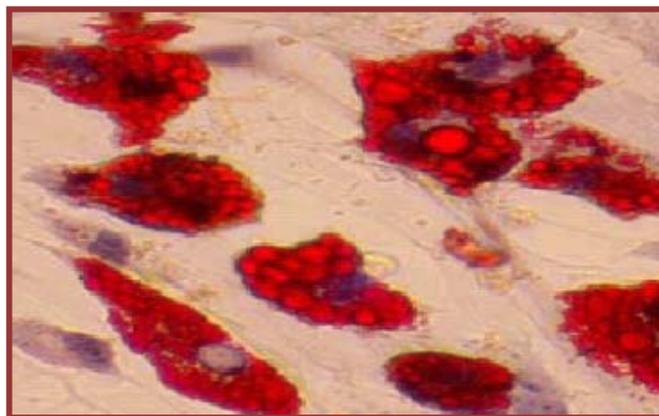


Figura 16- Controle

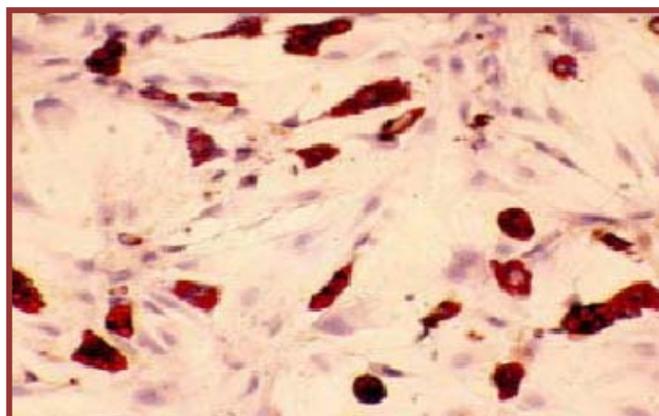


Figura 17- Slimbuster[®] L 25mg/mL

Ao avaliarmos as imagens (figuras 16 e 17) das culturas de adipócitos humanos coradas com AdipoRed[™] Reagent, é possível notar que houve uma redução bastante significativa na quantidade de lipídeos no interior das células. Além disso, aparentemente, percebe-se uma alteração morfológica dos adipócitos após tratamento com Slimbuster L, o que pode ser um indicativo de retorno destas células à forma de pré-adipócitos, células incapazes de armazenar gordura.

4.3- Resultados da avaliação histológica

4.3.1- Efeitos do Slimbuster® L (SBL) em fragmentos de pele humana corados com Hematoxilina-Eosina (HE)

A coloração dos fragmentos de pele humana com HE (hematoxilina-eosina) consiste em uma técnica amplamente utilizada em histologia e dermato-patologia, pois permite a visualização das principais estruturas celulares, possibilitando a análise morfológica visual qualitativa. Neste experimento, avaliamos os efeitos de SBL (25mg/mL) aplicados sobre os fragmentos de pele em condição basal em comparação com o respectivo controle (não-tratado).

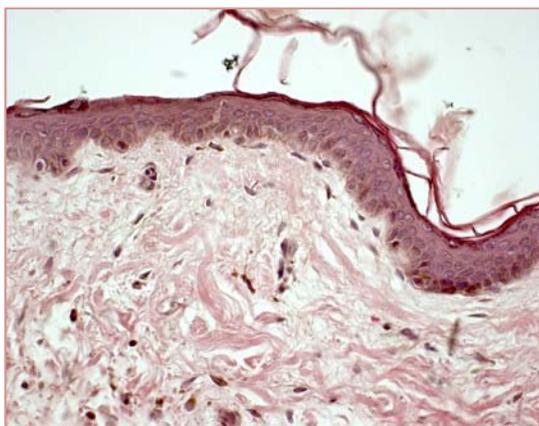


Figura 18- Controle

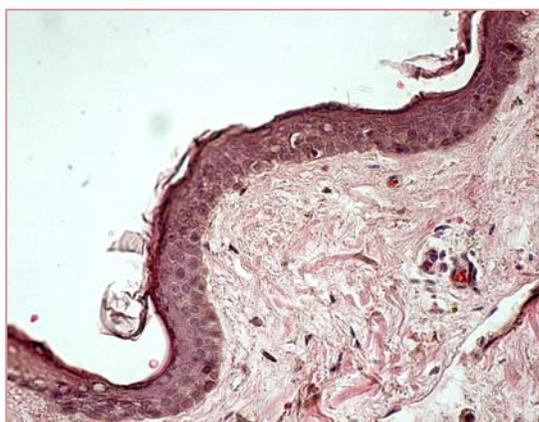


Figura 19- Controle

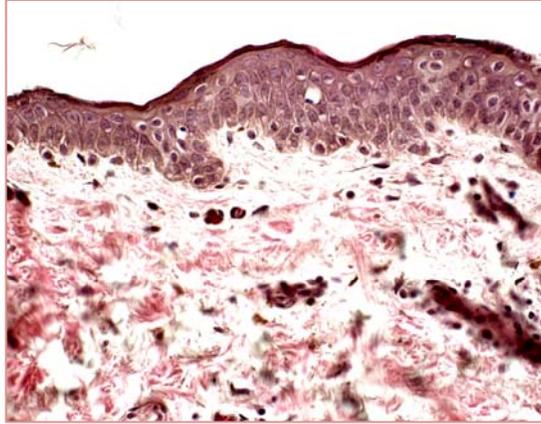


Figura 20- Slimbuster® L (25mg/mL)

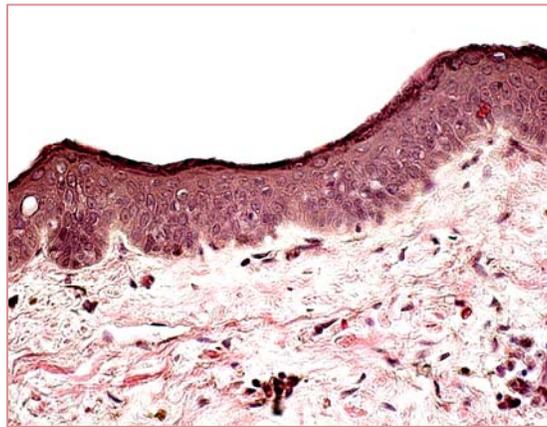


Figura 21- Slimbuster® L (25mg/mL)

Ao avaliarmos a resposta da pele após aplicação de Slimbuster® L em condição basal, é possível notar que houve uma melhora visualmente significativa no aspecto geral da pele, caracterizado principalmente pelo aumento da espessura da epiderme, pelo aumento do número de queratinócitos nucleados na camada basal, bem como pela compactação da camada córnea, aparentemente descompactada nas ilustrações que representam a ausência de tratamento no grupo controle.

4.4- Resultados da avaliação da contração do gel de colágeno

4.4.1- Efeitos do Slimbuster® L (SBL) em cultura de fibroblastos humanos em gel de colágeno

A cultura de fibroblastos em gel de colágeno consiste em uma técnica bastante aceita para a avaliação da habilidade contrátil de miofibroblastos, normalmente relacionados ao processo de cicatrização e regeneração de tecidos lesionados. Neste experimento, avaliamos os efeitos de SBL (25mg/mL) aplicados sobre fibroblastos em gel colagênico em condição basal, em comparação com os respectivos controles. Foram considerados como controles, um grupo sem tratamento (controle negativo) e o outro tratado com 2,5ng/mL de TGF- β (controle positivo), fator de crescimento padrão para este tipo de estudo.

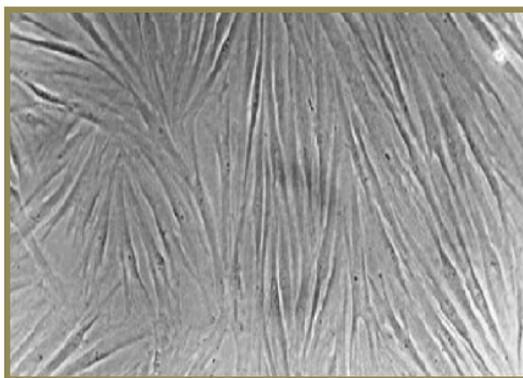


Figura 22- Controle negativo (sem tratamento)

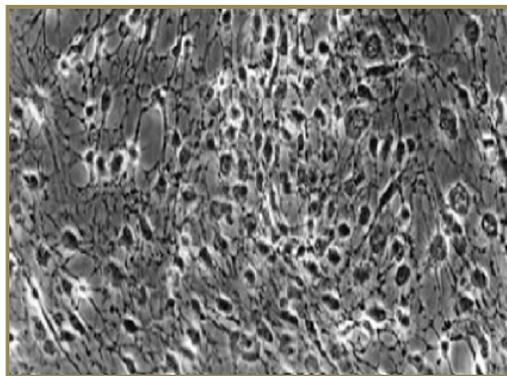


Figura 23- Controle positivo (TGF- β 2,5ng/mL)

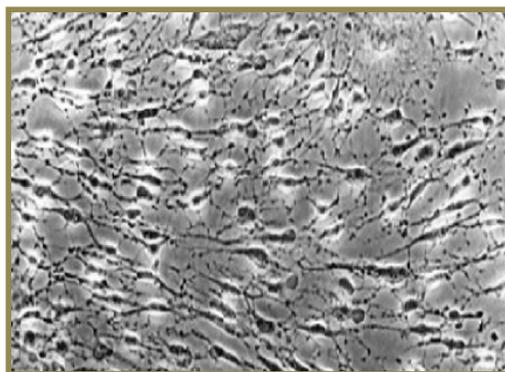


Figura 24- Slimbuster[®] L (25mg/mL)

Ao avaliarmos a resposta dos fibroblastos cultivados em gel colagênico, podemos concluir que há uma evidência da transformação morfológica das células em miofibroblastos, os quais possuem conhecida habilidade contrátil, desempenhando um papel importante na regeneração e reorganização tecidual.

4.5- Resultados clínicos

Os voluntários após serem avaliados quanto à hipoderme, medidas antropométricas, medidas com adipômetro, temperatura corpórea e elasticidade e firmeza cutânea antes do início dos estudos, foram orientados a utilizar uma loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster® L por 60 dias, sendo que as medidas foram novamente avaliadas após 30 e 60 dias do início do tratamento e também responderam um questionário sobre a apreciação do produto-teste.

4.5.1- Avaliação Sensorial da Apreciabilidade Dermocosmética de uma loção cremosa corporal contendo 3% de Slimbuster L

4.5.1.1- Após 30 dias (D30)

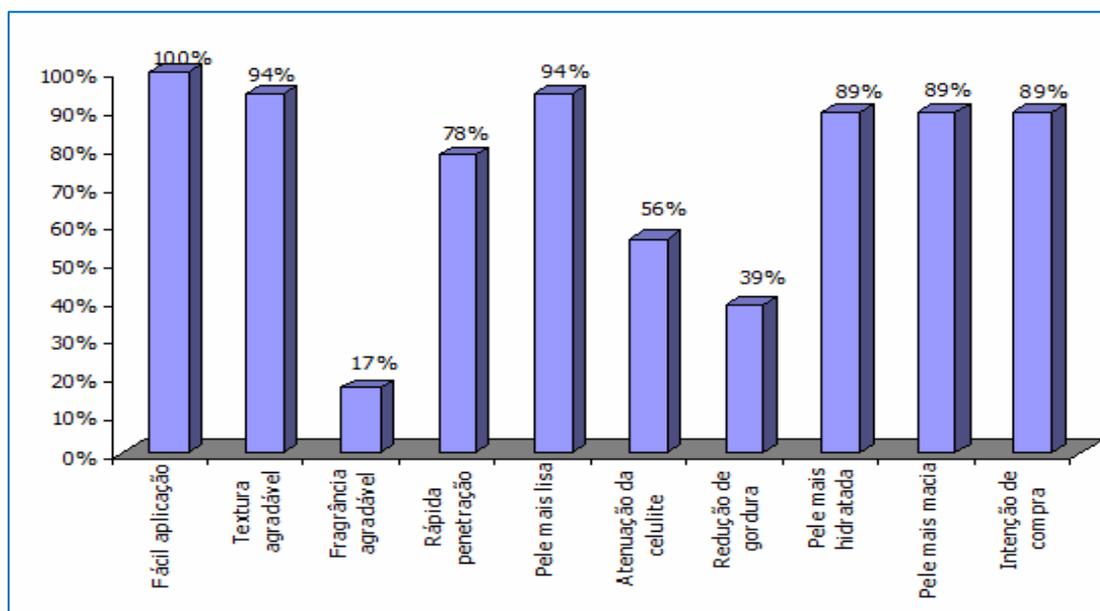


Figura 25- Apreciabilidade cosmética após 30 dias de aplicação de uma formulação de loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster® L.

4.5.1.2- Após 60 dias (D60)

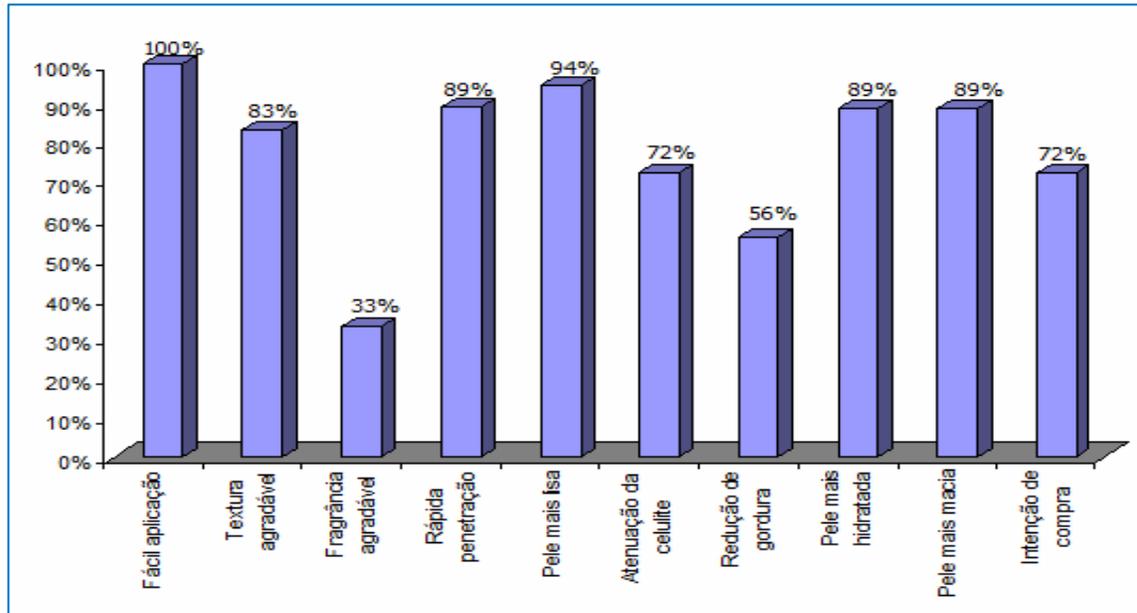


Figura 26- Apreciabilidade cosmética após 60 dias de aplicação de uma formulação de loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster® L.

De acordo com os resultados apresentados acima, o produto *Slimbuster® L* foi bem apreciado pelas voluntárias quanto aos itens “*facilidade de aplicação*”, “*pele mais lisa*” e “*pele mais macia*” em ambos tempos experimentais (D30, após 30 dias de uso e D60, após 60 dias de uso do produto).

Os itens relacionados à “*atenuação de celulite*” e “*redução de gordura*” foram melhor apreciados após 60 dias de uso em comparação com a opinião das voluntárias após 30 dias.

A maioria das voluntárias não apreciou a fragrância do produto, entretanto 72% das voluntárias relataram intenção de compra do produto do estudo.

De acordo com a apreciação do pesquisador, o produto promoveu leve melhora no aspecto da celulite.

4.5.2- Avaliação Instrumental (objetiva) dos efeitos de uma loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster® L através dos seguintes parâmetros: redução da gordura corporal, redução das medidas centimétricas e redução da espessura da hipoderme

Este estudo teve como objetivo demonstrar o efeito na redução de medidas durante 60 dias em condições normais de uso do produto.

As medidas instrumentais foram tomadas nas seguintes regiões:

- Medidas antropométricas (centimétricas): cintura, coxa, estômago e quadril;
- Adipômetria: abdome, supra-ilíaca, supra-espinal e coxa;
- Espessura da Hipoderme (ecografia): abdome, coxa.

Além disso, como parte do protocolo de estudo, as voluntárias foram pesadas em D1 e D60, como critério de inclusão nas análises estatísticas. Foram permitidas variações de até $\pm 2\%$ no peso inicial, a fim de evitarmos resultados falso-positivos em decorrência de perda considerável de peso.

4.5.2.1- Medidas Antropométricas (centimetria)

Estômago

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	0.39	0.6827

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.68$).

- Médias de mínimos quadrados para estômago, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	78.41	76.14	80.68
D30	78.17	75.88	80.47
D60	78.20	75.90	80.49

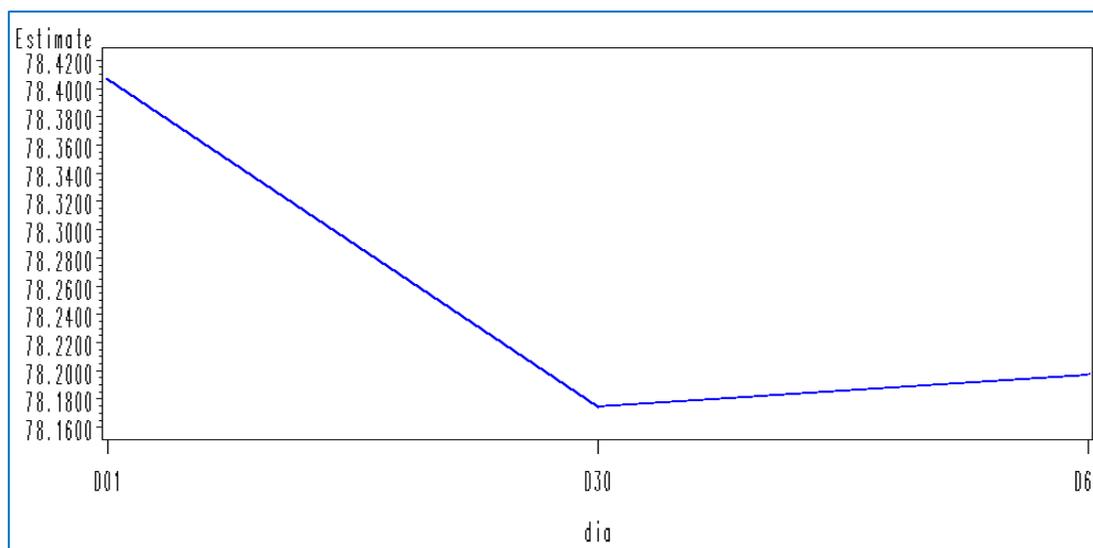


Figura 27- Redução centimétrica estimada média (cm) na região do estômago das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas ao longo do tempo. $P > 0,05$, em relação à D1 (SAS PROC MIXED).

Quadril inferior

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	3.07	0.0589

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.06$).

- Médias de mínimos quadrados para coxa proximal, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	98.48	95.64	101.33
D30	98.02	95.17	100.88
D60	97.81	94.95	100.68

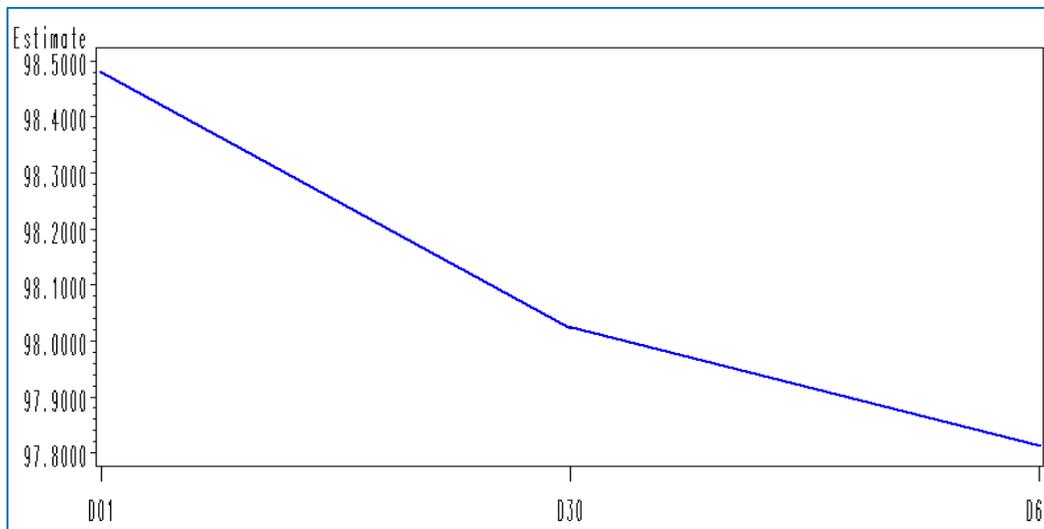


Figura 28- Redução centimétrica estimada média (cm) na região do quadril inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas ao longo do tempo. $P > 0,05$, em relação à D1 (SAS PROC MIXED).

Coxa superior

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	8.68	0.0008

Foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.0008$).

A comparação entre dois tempos quaisquer e o respectivo nível de significância corrigido para comparações múltiplas está apresentado na tabela a seguir.

- Comparações múltiplas:

Tempo	Tempo	Nível de significância corrigido
D1	D30	0.0491
D1	D60	0.0006
D30	D60	0.1922

- Médias de mínimos quadrados para coxa superior, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	58.33	55.39	61.27
D30	57.71	54.76	60.66
D60	57.25	54.30	60.20

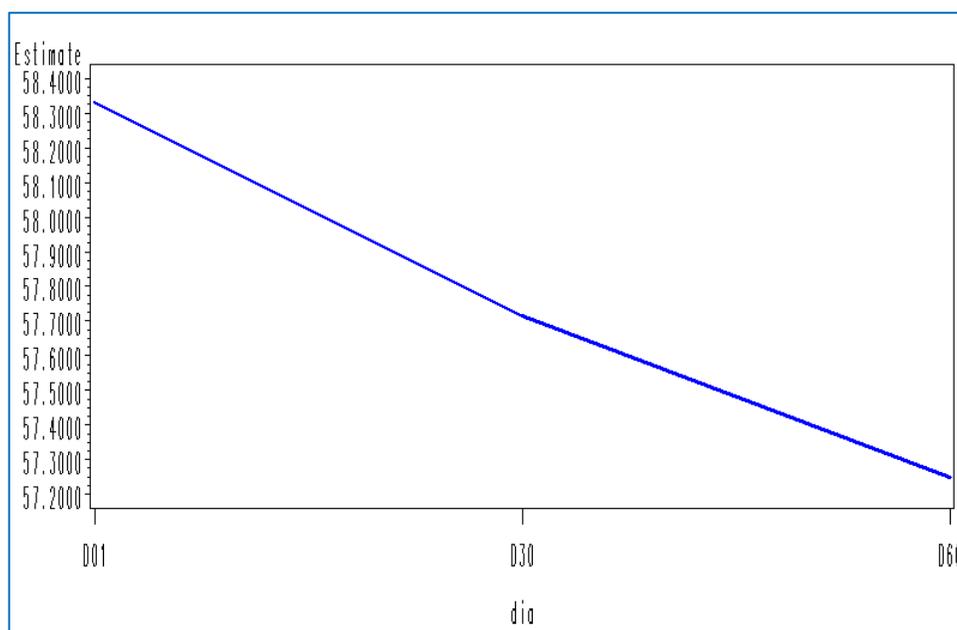


Figura 29- Redução centimétrica estimada média (cm) na região coxa superior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L. D30: $P < 0,05$, em relação a D1; D60: $P < 0,05$, em relação a D1. Não foram encontradas diferenças significativas entre D30 e D60 (SAS PROC MIXED).

Coxa mediana

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 – Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	11.40	0.0001

Foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.0001$).

A comparação entre dois tempos quaisquer e o respectivo nível de significância corrigido para comparações múltiplas está apresentado na tabela a seguir.

- Comparações múltiplas:

Tempo	Tempo	Nível de significância corrigido
D1	D30	0.0160
D1	D60	0.0001
D30	D60	0.1530

- Médias de mínimos quadrados para coxa mediana, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	50.05	48.36	51.73
D30	49.22	47.51	50.93
D60	48.65	46.93	50.37

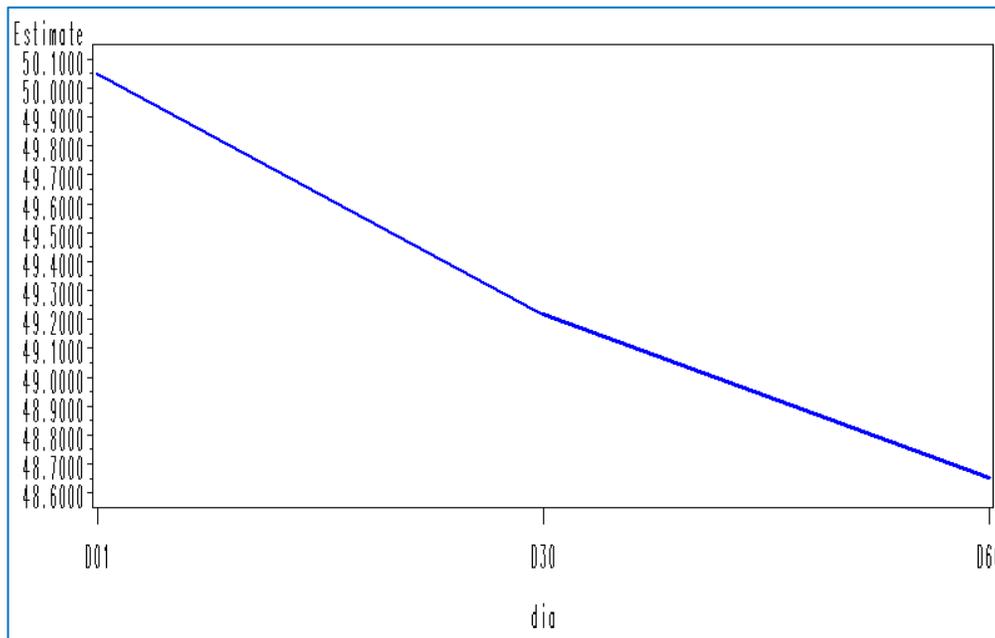


Figura 30- Redução centimétrica estimada média (cm) na região coxa mediana das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L. D30: $P < 0,05$, em relação a D1; D60: $P < 0,05$, em relação a D1.

Não foram encontradas diferenças significativas entre D30 e D60 (SAS PROC MIXED).

Coxa inferior

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	7.35	0.0021

Foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.002$).

A comparação entre dois tempos quaisquer e o respectivo nível de significância corrigido para comparações múltiplas está apresentado na tabela a seguir.

- Comparações múltiplas:

Tempo	Tempo	Nível de significância corrigido
D1	D30	0.0763
D1	D60	0.0015
D30	D60	0.2443

- Médias de mínimos quadrados para coxa inferior, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	39.84	38.43	41.24
D30	39.27	37.84	40.71
D60	38.85	37.41	40.29

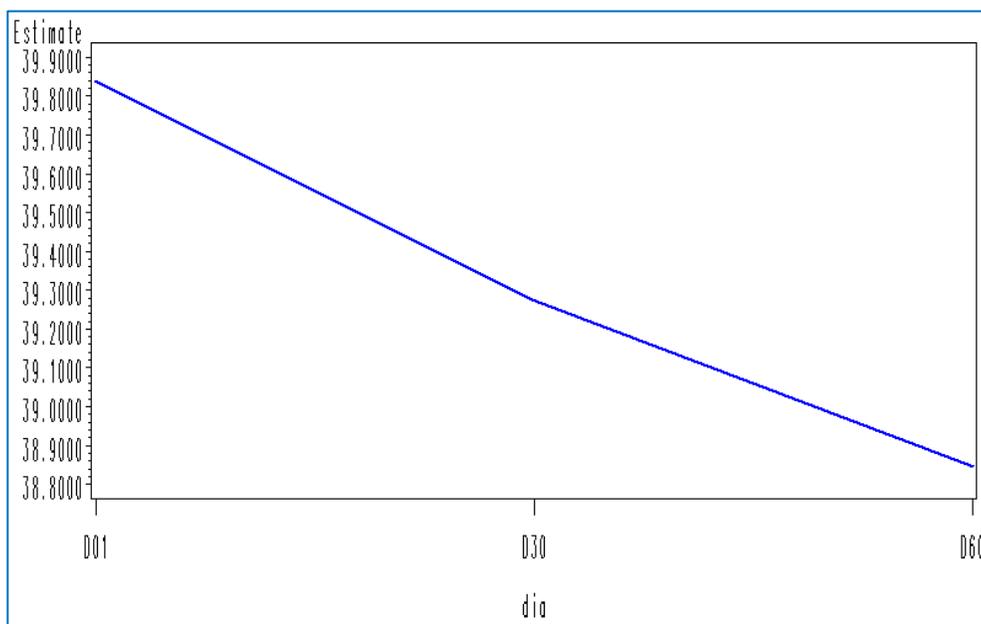


Figura 31- Redução centimétrica estimada média (cm) na região coxa inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L. D60: $P < 0,05$, em relação a D1.

Não foram encontradas diferenças significativas entre D1 e D30, e entre D30 e D60 (SAS PROC MIXED).

Perna superior

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	4.82	0.0139

Foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.01$).

A comparação entre dois tempos quaisquer e o respectivo nível de significância corrigido para comparações múltiplas está apresentado na tabela a seguir.

- Comparações múltiplas:

Tempo	Tempo	Nível de significância corrigido
D1	D30	0.0810
D1	D60	0.0143
D30	D60	0.6855

- Médias de mínimos quadrados para perna superior, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	33.91	32.79	35.03
D30	33.56	32.42	34.69
D60	33.42	32.28	34.55

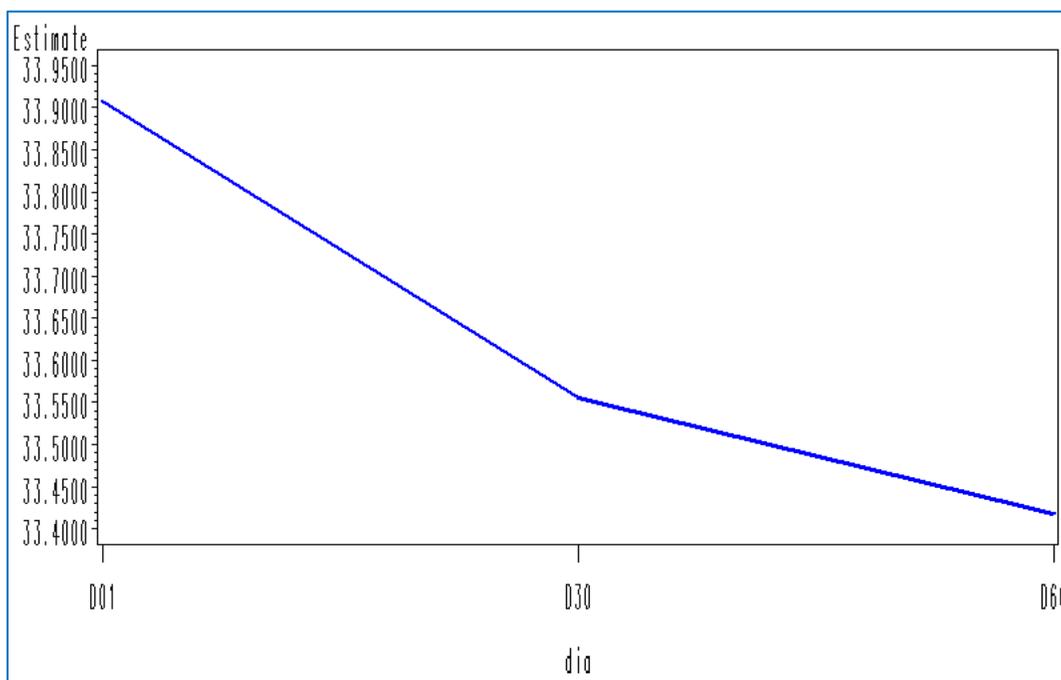


Figura 32- Redução centimétrica estimada média (cm) na região da perna superior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster[®] L. D60: $P < 0,05$, em relação a D1.

Não foram encontradas diferenças significativas entre D1 e D30, e entre D30 e D60 (SAS PROC MIXED).

Perna inferior

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	4.69	0.0155

Foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.02$).

A comparação entre dois tempos quaisquer e o respectivo nível de significância corrigido para comparações múltiplas está apresentado na tabela a seguir.

- Comparações múltiplas:

Tempo	Tempo	Nível de significância corrigido
D1	D30	0.3323
D1	D60	0.0112
D30	D60	0.2281

- Médias de mínimos quadrados para perna inferior, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	21.00	20.43	21.57
D30	20.86	20.28	21.44
D60	20.69	20.11	21.27

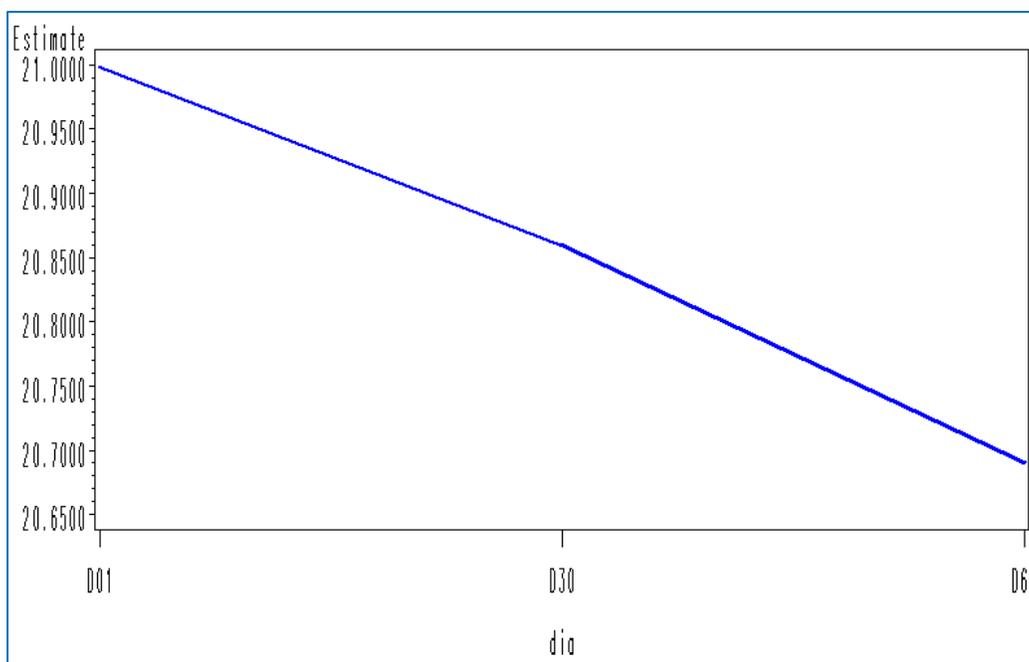


Figura 33- Redução centimétrica estimada média (cm) na região da perna inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster[®] L. D60: $P < 0,05$, em relação a D1.

Não foram encontradas diferenças significativas entre D1 e D30, e entre D30 e D60 (SAS PROC MIXED).

4.5.2.2- Espessura da Hipoderme (ecografia)

Braço

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	33	0.04	0.9576

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.96$).

- Médias de mínimos quadrados para braço, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	0.63	0.53	0.73
D30	0.62	0.50	0.74
D60	0.64	0.51	0.77

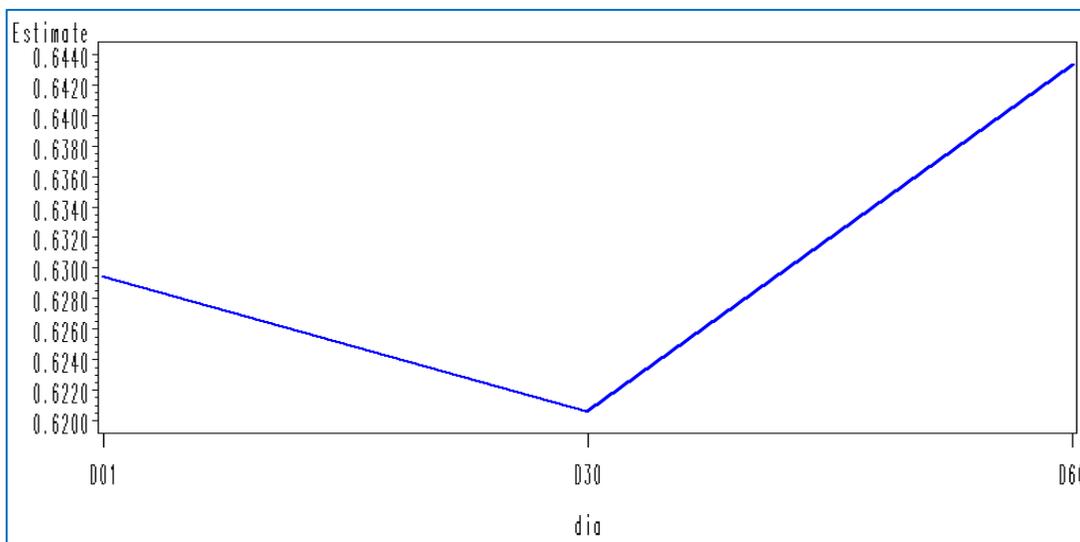


Figura 34- Redução média estimada da espessura da hipoderme (cm) na região do braço das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos (SAS PROC MIXED).

Abdomen

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	33	0.21	0.8135

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.81$).

- Médias de mínimos quadrados para abdômen, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	3.14	2.74	3.53
D30	3.03	2.59	3.47
D60	3.06	2.60	3.52

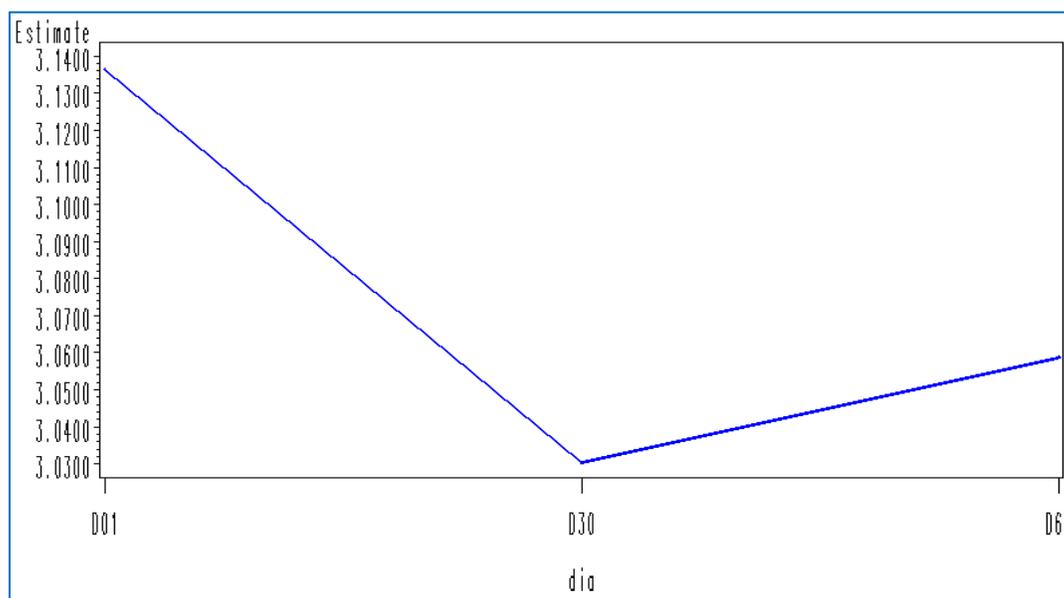


Figura 35- Redução média estimada da espessura da hipoderme (cm) na região do abdôme das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos (SAS PROC MIXED).

Coxa

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	33	0.01	0.9864

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.99$).

- Médias de mínimos quadrados para coxa, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	3.18	2.91	3.44
D30	3.15	2.83	3.47
D60	3.16	2.82	3.50

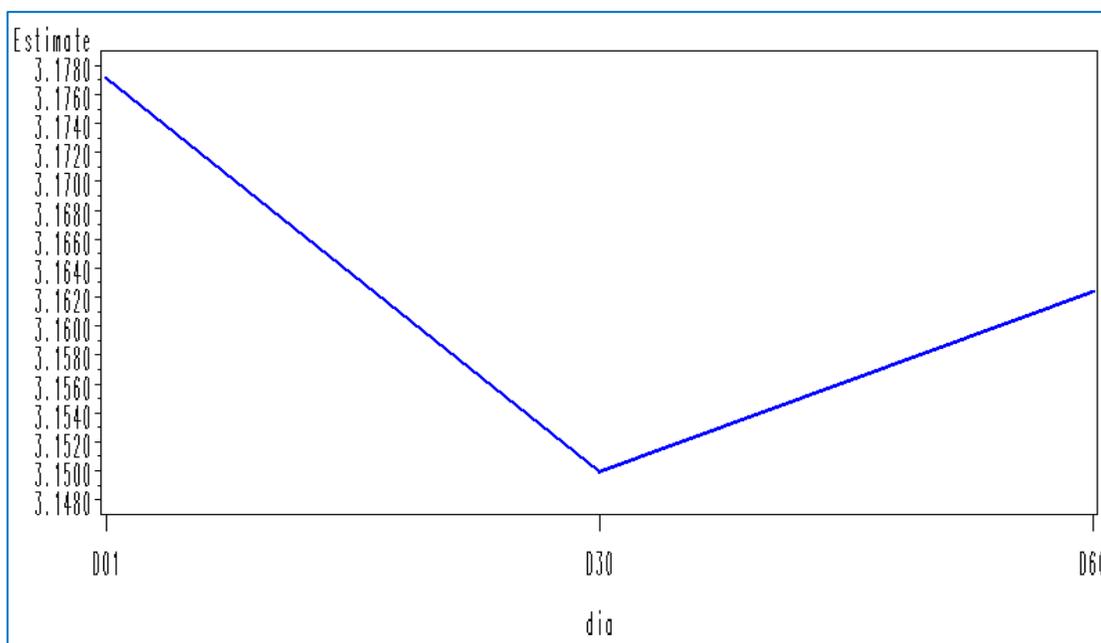


Figura 36- Redução média estimada da espessura da hipoderme (cm) na região do coxa das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos (SAS PROC MIXED).

4.5.2.3- Peso das voluntárias

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	36	0.01	0.9894

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.99$).

- Médias de mínimos quadrados para peso, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	61.83	58.00	65.65
D30	61.86	58.03	65.70
D60	61.85	58.01	65.68

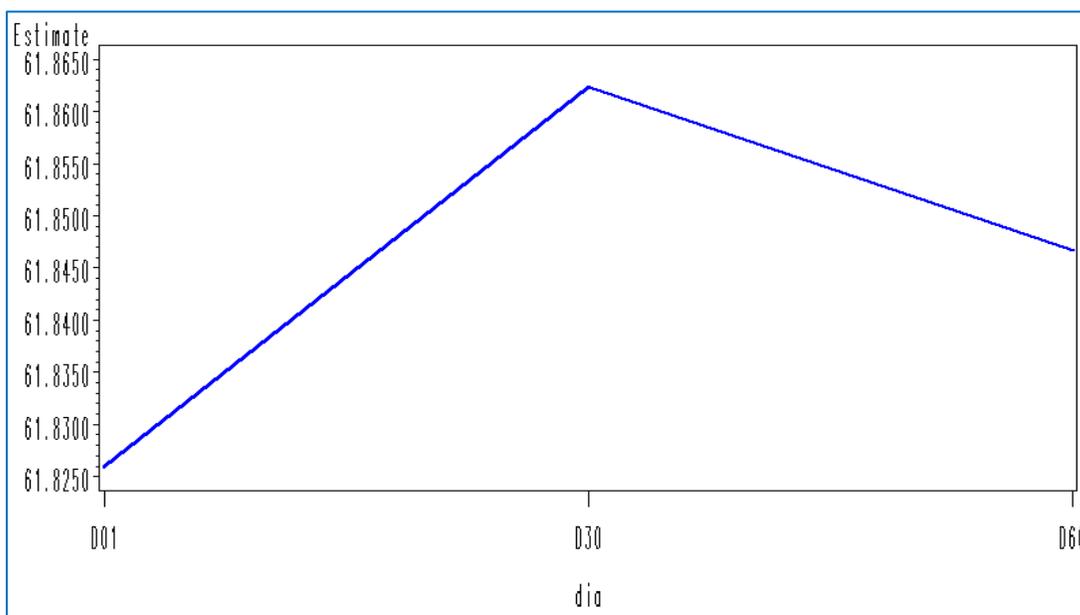


Figura 37- Avaliação do peso médio (Kg) das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos (SAS PROC MIXED).

4.5.2.4- Adipometria (determinação da taxa de gordura corporal)

Abdomen

- Testes para efeitos do modelo:

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	35	0.67	0.5179

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.52$).

- Médias de mínimos quadrados para abdomen, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	22.51	20.39	24.63
D30	21.63	19.29	23.97
D60	21.49	19.11	23.86

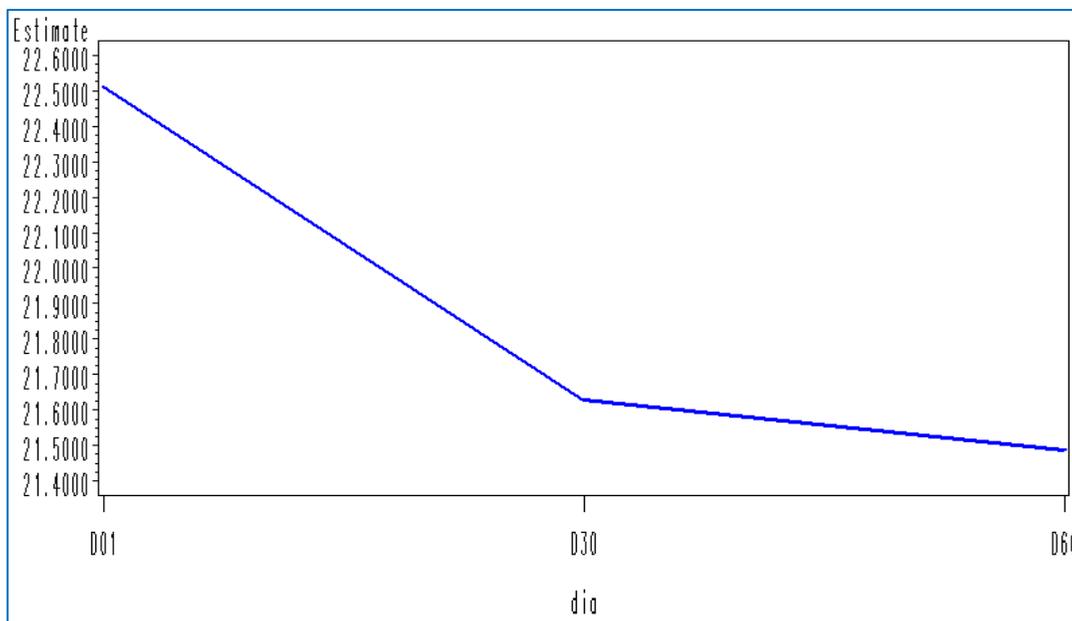


Figura 38- Redução adipométrica média na região do abdome das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos (SAS PROC MIXED).

Supra-iliaca

- Testes para efeitos do modelo

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	35	2.20	0.1263

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.13$).

- Médias de mínimos quadrados para supra-ilíaca, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	21.88	19.65	24.12
D30	20.82	18.49	23.15
D60	20.73	18.38	23.07

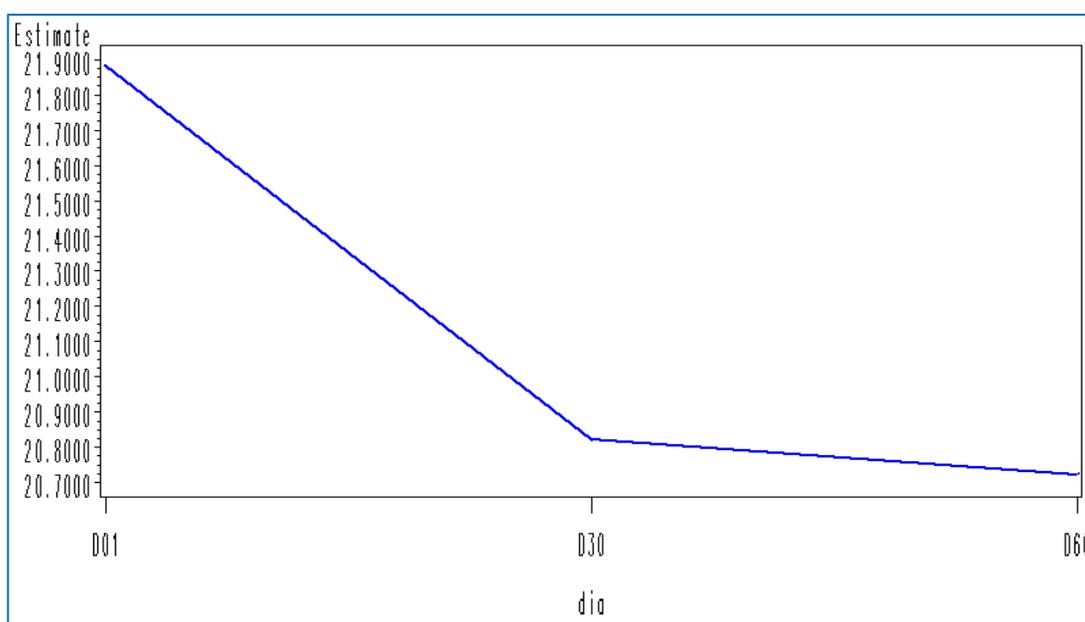


Figura 39- Redução adipométrica média na região supra-ilíaca das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos (SAS PROC MIXED).

Supra-espinal

- Testes para efeitos do modelo

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	35	1.03	0.3672

Não foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.37$).

- Médias de mínimos quadrados para supra-espinal, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	14.19	12.13	16.26
D30	13.56	11.42	15.70
D60	13.56	11.41	15.70

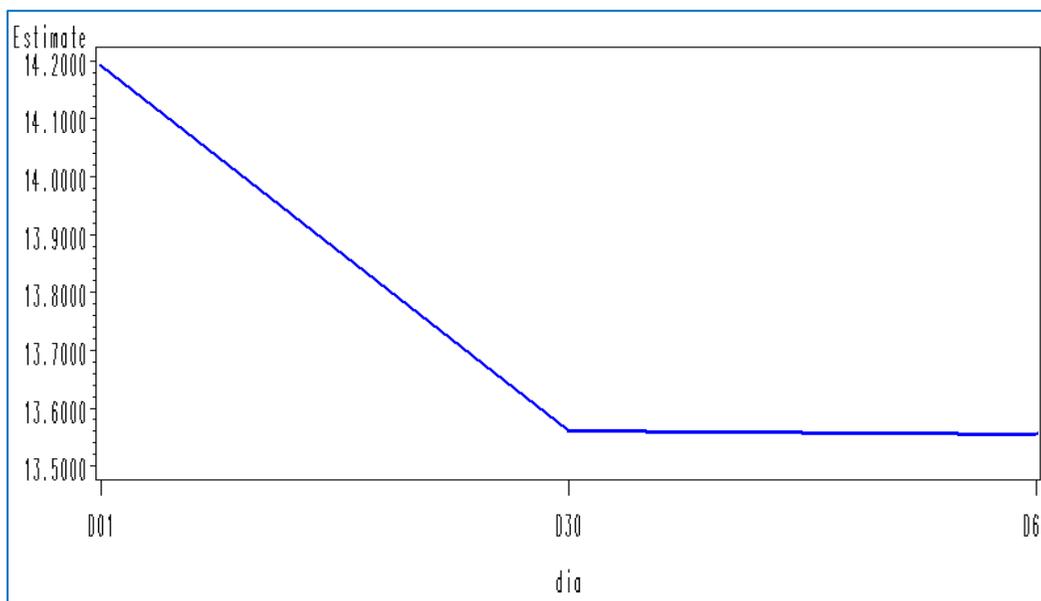


Figura 40- Redução adipométrica média na região supra-espinal das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster[®] L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos (SAS PROC MIXED).

Coxa proximal

- Testes para efeitos do modelo

Teste tipo 3 - Efeitos Fixos				
Efeito	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tempo	2	35	5.22	0.0104

Foi encontrada evidência de efeito de tempo ($p=0.01$).

A comparação entre dois tempos quaisquer e o respectivo nível de significância corrigido para comparações múltiplas está apresentado na tabela a seguir.

- Comparações múltiplas:

Tempo	Tempo	Nível de significância corrigido
D1	D30	0.4314
D1	D60	0.1288
D30	D60	0.0078

- Médias de mínimos quadrados para coxa proximal, limite inferior e superior (95%) por tempo:

Tempo	Estimativa	LI	LS
D1	25.07	22.35	27.80
D30	25.69	22.91	28.47
D60	24.07	21.28	26.85

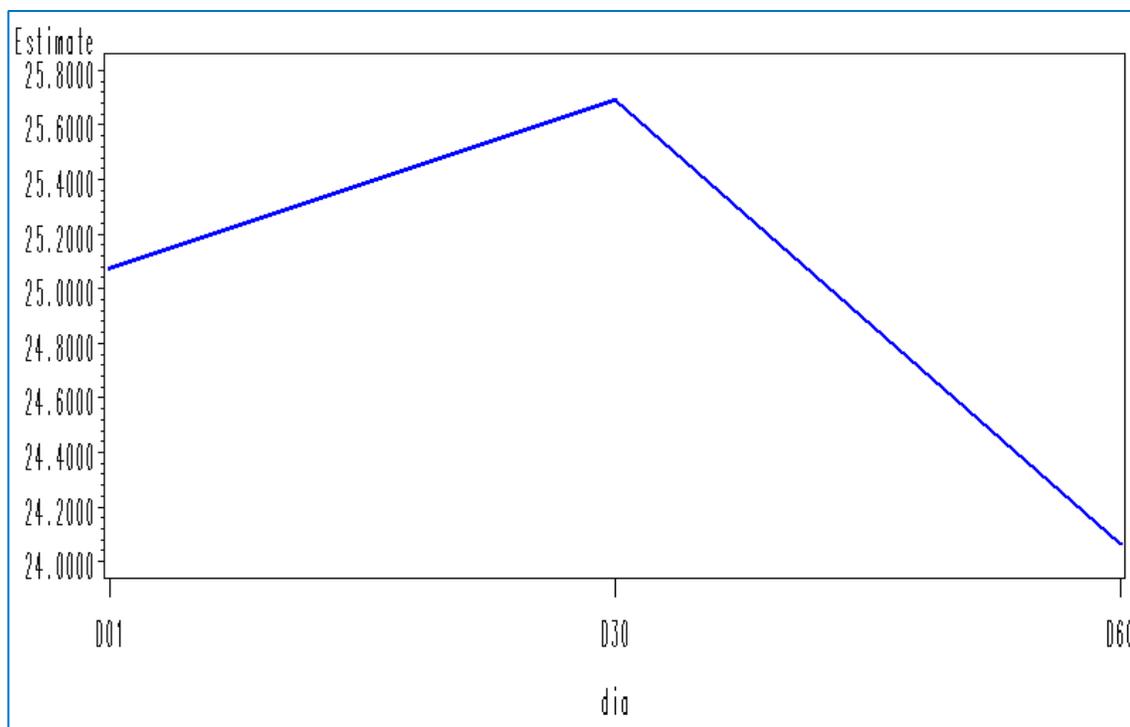


Figura 41- Redução adipométrica média na região da perna inferior das voluntárias após 30 (D30) e 60 (D60) dias de uso de uma loção corporal contendo 3,0% de Slimbuster® L. D60: $P < 0,05$, em relação a D30.

Não foram encontradas diferenças significativas entre D1 e D30, e entre D1 e D60 (SAS PROC MIXED).



5- DISCUSSÃO

A beleza tem sido exaltada e cultuada durante séculos em todas as culturas e civilizações, independente da região geográfica, etnia, raça e religião. Historicamente, a busca pela manutenção da aparência jovem e saudável é desde a antiguidade uma das maiores preocupações da humanidade (Rocquet e Bonté, 2002).

A influência e o poder da beleza nas relações humanas têm sido evidenciados desde o advento da escrita, onde influentes personalidades da época mencionaram a sua importância. Para Platão (século V a. C), beleza era uma das maiores preocupações da humanidade, seguida de boa saúde e riqueza. Aristóteles (século IV a. C), por sua vez, afirmava que “a beleza é para o homem tão importante quanto algumas letras de seu nome”.

Na cultura globalizada atual, o bem-estar físico, incluindo os cuidados com a aparência, também vem sendo altamente valorizado. Por este motivo, estudos relacionados à avaliação do impacto de certas desordens estéticas na qualidade de vida do indivíduo, tais como rugas, envelhecimento e celulite, têm sido bastante evidenciados (Sarwer et al., 2003). Este fato pode ser comprovado dado o crescente interesse na investigação e tratamento destes problemas, os quais até recentemente eram considerados de menor significância (Hexsel e Hexsel, 2003).

Considerada a alteração topográfica cutânea mais comum, a celulite é definida como sendo um fenômeno degenerativo não-inflamatório, que provoca alterações na hipoderme (Ronald e Di Salvo, 1995), com conseqüentes ondulações irregulares na pele das regiões acometidas. Caracteriza-se pelo aspecto de “casca de laranja” que a pele adquire em decorrência de alterações no tecido adiposo e na microcirculação local, resultante de distúrbios sanguíneos e linfáticos, causando fibroesclerose do tecido conectivo (Draelos, 1997; Lucassen e Van-Der-Sluis et al., 1997; Segers et al., 1984).

Nos últimos anos, companhias cosméticas têm disponibilizado um arsenal de produtos indicados para a redução das características estéticas da celulite, contendo principalmente ingredientes ativos que estimulem a

microcirculação sanguínea e promovam a drenagem linfática no local. No entanto, tem-se postulado que uma formulação efetiva para reduzir os sinais clínicos da celulite deva conter ativos que não somente estimulem o fluxo sanguíneo, mas também que atuem como lipolíticos diretos, que reduzam medidas antropométricas e a espessura da hipoderme, que sejam indutores da síntese de proteínas da matriz extra-celular, que estimulem a produção de fatores de crescimento tecidual e dos reguladores da sinalização hormonal adipocitária (Avram, 2004), dentre outros mecanismos, a fim de se obter a melhor resposta clínica para a aparência estética desfavorável. Assim, estudos vêm sendo conduzidos para avaliar a eficácia destes produtos.

A mensuração da melhora do quadro da celulite, tanto no parâmetro qualidades cosméticas do produto, quanto na eficácia subjetiva, como pele mais lisa, atenuação da celulite e redução da gordura, tem sido feita através da avaliação visual conduzida por especialistas na área, como dermatologistas ou outro profissional treinado (Draelos, 2001).

Neste trabalho, avaliamos a apreciabilidade cosmética de uma loção corporal contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster[®] L, antes (D1), após 30 (D30) e após 60 dias (D60) de uso produto. Nossos resultados demonstram que o produto Slimbuster[®] L foi bem apreciado pelas voluntárias quanto aos itens “*facilidade de aplicação*”, “pele mais lisa” e “pele mais macia” em ambos os tempos experimentais. Os itens relacionados à “atenuação de celulite” e “redução de gordura” foram melhor apreciados apenas após 60 dias.

Cabe ressaltar que estes resultados, os quais traduzem a opinião das voluntárias, são de extrema importância e muito bem aceitos no meio científico e mercadológico, uma vez que refletem as opiniões de consumidores em potencial.

Conforme mencionado anteriormente, além da opinião das voluntárias, levamos em consideração neste estudo a apreciação/opinião do pesquisador treinado, o qual relatou uma leve melhora do quadro geral da celulite após 60 dias de uso do produto, corroborando com a opinião das voluntárias.

A mensuração instrumental da eficácia de ativos ou produtos direcionados para o tratamento cosmético da celulite também tem sido evidenciada utilizando-se de ferramentas que permitam estabelecer o grau de comprometimento da região afetada através da quantificação de parâmetros comumente afetados pela desordem, como por exemplo, alterações dos níveis de gordura local e da espessura da hipoderme, bem como das medidas antropométricas (Rossi e Vergmanini, 2000; Rawlings, 2006).

Considerados exames rotineiros, de baixo custo e de alta relevância clínica, a plicometria e a tomada de medidas centimétricas (antropometria) são os mais utilizados na prática clínica atual (Rawlings et al., 2006) e, por este motivo, foram incluídos no nosso protocolo de estudo.

Assim sendo, após 30 (D30) e 60 (D60) dias de aplicação da loção corporal contendo Slimbuster[®] L, as voluntárias foram avaliadas objetivamente através da utilização de um adipômetro - para medir a espessura do tecido cutâneo e a porcentagem de gordura corporal -, bem como através do uso de fita métrica para tomada das medidas antropométricas.

Os resultados obtidos demonstram que o produto foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey) as medidas na região da coxa (superior, mediana e inferior) após 30 e 60 dias de utilização do produto. Cabe ressaltar ainda, que considerando apenas reduções de medidas superiores a 2%, observou-se diminuição centimétrica da coxa em aproximadamente 30% do painel em D30 e em 50% do painel em D60. As demais áreas avaliadas - abdome, pernas e quadris - não apresentaram significância estatística, porém devem ser levadas em consideração, pois apresentaram forte tendência após 60 dias de aplicação da loção corporal, indicando uma possível melhora significativa com o uso prolongado.

A análise adipométrica das voluntárias demonstrou também forte tendência de redução da taxa de gordura localizada após 60 dias de aplicação do produto contendo 3,0% (p/p) de Slimbuster[®] L, especialmente nas regiões do abdome, supra-ílica, supra-espinal e coxa proximal.

Além da avaliação instrumental da eficácia de Slimbuster® L através da utilização das técnicas acima descritas, realizamos neste trabalho o estudo da espessura da hipoderme através da ultra-sonografia (ecografia), o que nos permitiu verificar a capacidade do produto em diminuir a quantidade de tecido adiposo. De acordo com os resultados obtidos para as medidas da espessura da hipoderme, pode-se observar melhora, ou seja, redução superior a 2%, nas regiões da coxa e abdome em aproximadamente 70% do painel em todos os tempos experimentais avaliados (D30 e D60).

Um aspecto altamente relevante que gostaríamos de ressaltar é que um dos parâmetros de controle para a não-inclusão dos resultados instrumentais obtidos nas análises estatísticas ao final dos estudos de eficácia clínica, foi o controle de peso das voluntárias, o qual não poderia sofrer uma variação superior a 2,0%, para mais ou para menos. Esta ferramenta de controle possibilita a obtenção de resultados mais confiáveis e fidedignos, uma vez que a redução do peso das voluntárias pode favorecer resultados falso-positivos, especialmente no que diz respeito às medidas antropométricas.

Parte dos positivos resultados clínicos obtidos com Slimbuster® L pode ser explicada pelo seu mecanismo de ação, elucidado neste trabalho pelos ensaios *in vitro*.

Neste sentido, avaliamos neste trabalho os efeitos do extrato oleoso dos grãos verdes de café (OC), dos fitoesteróis de canola (F), bem como da associação de ambos (Slimbuster® L) sobre a resposta bioquímica e endocrinológica da pele. Para tanto, utilizamos culturas saudáveis de células da pele humana, especificamente fibroblastos e adipócitos, a fim de avaliar parâmetros biológicos relacionados diretamente à melhora dos aspectos estéticos da celulite, caracterizado em partes, pelas alterações no tecido conectivo e pelo acúmulo de gordura localizada.

Celularmente, o acúmulo de gordura é caracterizado pelo aumento da adipogênese (hiperplasia) e do aumento do volume do adipócito branco (hipertrofia) na camada subcutânea (WABITSCH et al., 1995). A hipertrofia

adipocitária consiste em um acúmulo anormal de triacilglicerol (TAG) no citosol do adipócito, através de um processo exacerbado de esterificação de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol (STICH e BERLAN, 2004).

Os adipócitos possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar TAG em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico (Fonseca-Alaniz et al., 2006).

As principais ações metabólicas do tecido adiposo podem ser divididas em atividades lipogênicas e atividades lipolíticas. Entende-se sobre atividade lipogênica todos os processos metabólicos que resultam em biossíntese, incorporação e armazenamento de TAG na gotícula de gordura intracitoplasmática, ao passo que atividade lipolítica se refere às ações que resultam na hidrólise do TAG armazenado e na liberação de AGL e glicerol (STICH e BERLAN, 2004). O adequado controle dos processos de esterificação e hidrólise do TAG são importantes para a manutenção da homeostase energética assim como para a prevenção de desordens metabólicas sistêmicas e localizadas, como por exemplo, a celulite.

Tomando como aspecto crucial para o desenvolvimento da celulite, bem como a complexidade da resposta gerada pelo acúmulo intracelular de lipídeos no interior dos adipócitos, experimentos foram conduzidos objetivando investigar a possível aplicação de Slimbuster® L como um dermocosmético lipolítico direto. Assim, avaliamos seus possíveis efeitos no metabolismo adipocitário, através da quantificação dos subprodutos da quebra dos triglicerídeos intracelulares, representados pelo aumento de ácidos graxos livres no meio extracelular. Após avaliação do possível potencial citotóxico dos produtos-teste, as culturas foram incubadas com as concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL de Slimbuster® L, bem como de suas frações em separado - OC e F, nas mesmas concentrações -, a fim de avaliarmos o possível efeito que justificasse a associação.

Slimbuster[®] L e OC apresentaram um perfil muito similar no que diz respeito ao aumento da concentração de AGL no sobrenadante das culturas, uma vez que ambos induziram uma lipólise aproximadamente 4 vezes maior que aquela obtida para as células que não receberam tratamento (grupo controle). F, por sua vez, não promoveu lipólise direta, mantendo o mesmo padrão de resposta obtida para o grupo controle.

A atividade lipolítica gerada por estes compostos pode ser explicada, em partes, pela suas capacidades de promover o aumento do metabolismo celular adipocitário e consequente estimulação da sua atividade glandular (FRUHBECK et al., 2001).

O tecido adiposo, como é sabido, produz uma variedade de substância, dentre elas hormônios, citocinas e biopeptídeos, que atuam como sinais reguladores que controlam seu próprio metabolismo (FRUHBECK et al., 2001). O balanço entre os processos de lipólise e lipogênese é mediado por modulações na sinalização celular e pela responsividade do adipócito à ação destes diversos mediadores.

A leptina, o mediador de maior destaque entre todas as adipocinas, e considerada crucial no controle dos fenômenos lipogênicos e lipolíticos (Frübeck, 2006), é um hormônio peptídico produzido principalmente pelos adipócitos e liberado na corrente sanguínea, onde circula até o cérebro e liga-se a receptores específicos presentes em vários locais do hipotálamo, fornecendo informação sobre o *status* energético do corpo para o centro regulador do cérebro (Spiegel et al., 2004; Schwartz et al, 1999). Ela é produzida pelo tecido adiposo proporcionalmente ao volume dos adipócitos, portanto, na medida em que ocorre um acúmulo excessivo de gordura, a produção e concentração de leptina aumenta na circulação. A leptina tem efeitos em vários tecidos e órgãos. Nos músculos, por exemplo, aumenta a oxidação de ácidos graxos e diminui a esterificação de TAG. Em concentrações elevadas, o efeito da leptina, como consequência de sua ação no hipotálamo, é a diminuição do apetite e aumento da taxa de metabolismo,

enquanto em baixas concentrações provoca o aumento do apetite e diminuição da taxa metabólica (Jérquier e Tappy, 1999).

Além de sua ação lipostática, controlando os depósitos de gordura no organismo, a leptina possui uma ação lipolítica direta, uma vez que provoca significativamente a aceleração do metabolismo celular para que o excesso de lipídeos acumulado no interior das células possa ser rapidamente eliminado (Spiegel et al., 2004). Sendo assim, o aumento de leptina produzida no tecido adiposo, faz dela uma adipocina de ação autócrina, agindo diretamente sobre a célula que a produziu para prover o mecanismo de auto-controle (Ottosson et al., 2000).

Com o intuito de desvendar os mecanismos pelo qual Slimbuster[®] L e OC acentuaram a taxa de lipólise, conforme demonstrado anteriormente, avaliamos neste trabalho a capacidade de ambos, bem como de F, de estimular as culturas de adipócitos humanos a produzir ou liberar uma maior quantidade de leptina. Os resultados obtidos demonstram que ambos, Slimbuster[®] L e OC, induziram a síntese de leptina por adipócitos, justificando parte do potente efeito lipolítico por eles apresentado. Os níveis de leptina liberados nos sobrenadantes das culturas celulares tratadas com OC, para as maiores concentrações avaliadas (50, 25 e 12,5mg/mL) foram aproximadamente 2,2 vezes superiores aqueles obtidos para o controle não-tratado. Slimbuster[®] L, no entanto, apresentou resultados mais expressivos, uma vez que os níveis desta adipocina foram, em média, 3,5 vezes superiores aqueles obtidos na ausência do tratamento. Interessantemente, F não promoveu aumento da produção de leptina, mas de certa forma potencializou os efeitos de Slimbuster[®] L, já que este apresentou diferença significativa em relação ao OC ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey). Este evento pode justificar, em parte, a importância da associação.

O estímulo lipolítico gerado por Slimbuster[®] L foi ainda confirmado qualitativamente através da coloração específica dos triacilgliceróis intracelulares com corante vermelho lipofílico (Oil Red, AdipoRed[™] Reagent) (Greenspan et al., 1985). As imagens digitais obtidas diretamente das culturas celulares

demonstraram expressiva redução da quantidade de lipídeos no interior das células, o que corrobora com os altos níveis de ácidos graxos livres quantificados colorimetricamente.

A rápida sinalização da presença de uma agressão tecidual, e o imediato reparo dessa lesão têm sido apontados como passos cruciais na batalha contra o processo de formação ou evolução da celulite, uma vez que a morte celular e as reações inflamatórias subseqüentes são os principais fatores do processo cumulativo de dano tecidual, podendo provocar um colapso funcional do órgão alterando as características morfológicas e biofísicas da pele (Giacomoni e Rein, 2001; Giacomoni, 1992). O processo de reparo tecidual é um processo altamente ordenado que envolve a proliferação e migração celular, a síntese e deposição de componentes da matriz extracelular (MEC) e a remodelação tecidual (Martin, 1997).

Do ponto de vista molecular as manifestações clínicas da celulite estão associadas com modificações na MEC, a qual desempenha um papel fundamental na manutenção das propriedades físicas do tecido conectivo, assim como, no controle da interação entre as células dérmicas e os componentes da MEC (Robert e Labat-Robert, 2000). Os componentes da MEC implicam no tônus e hidratação da pele, gerados especialmente por componentes fibrilares, como colágeno e elastina, e por componentes não fibrilares, como as GAGs.

O colágeno e a elastina formam uma rede tri-dimensional que constitui a arquitetura base da derme, na qual estão dispersas outras substâncias e diversos tipos celulares, incluindo adipócitos. O colágeno é a macromolécula mais abundante do tecido conectivo e suas principais funções é garantir a propriedade mecânica e a integridade estrutural dos tecidos (Frei et al., 1998). A elastina é caracterizada por conferir resistência física à pele e sua estrutura está especialmente envolvida na flexibilidade e plasticidade (Uitto, 1986). A estrutura polianiónica da GAG confere um poder de retenção da hidratação e também é responsável por interações entre a MEC e as células da derme, influenciando nos processos de sinalização, diferenciação e proliferação celular (Gallagher, 1989).

As moléculas de GAG circundam o colágeno, a elastina e as células da derme e da hipoderme, especialmente fibroblastos e adipócitos, se ligando a moléculas de água, o que confere hidratação às proteínas da pele (Rene, 2006). Alguns estudos apontam a perda de função ou função anormal das GAGs como a principal causa de retenção de água no tecido conectivo, o que resulta, pelo menos parcialmente, no edema característico da celulite (Ciporkin et al., 1992; Mirrashed, 2004).

Recentemente, uma variedade de citocinas e fatores de crescimento têm mostrado desempenhar papéis fundamentais na manutenção das propriedades físicas do tecido conectivo, entre eles, regulação da proliferação, diferenciação e migração celular, síntese dos componentes da MEC, síntese de proteases e inibidores das proteases (Werner e Grose, 2003). O TGF- β (fator de crescimento tecidual beta) e o GM-CSF (fator estimulador de granulócitos e macrófagos) são fatores envolvidos em diversos aspectos do reparo do tecido conectivo, exercendo um papel importante na regulação do crescimento e diferenciação celular e estimulando a biosíntese e deposição de componentes da MEC pelos fibroblastos (Werner e Grose, 2003; Bauer et al., 2002; Mann et al, 1991; Piek et al, 1999; Kawada et al, 1997; O'kane e Ferguson, 1997; Feder e Laskin, 1994), os quais apresentam-se deteriorados nos locais acometidos pela celulite.

A superfamília de do TGF- β abrange uma faixa diversa de proteínas muitas das quais desempenham papéis importantes durante a embriogênese, respostas inflamatórias e imunológicas, homeostasia e reparo tecidual. No processo de cicatrização, os efeitos do TGF- β nos diversos tipos celulares, incluindo queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, estão integrados numa seqüência temporal de eventos dentro de uma arquitetura tecidual bem definida (Faler et al, 2006; Flanders et al, 2003). *In vitro*, têm ação mitogênica para fibroblastos e são potentes estimuladores da expressão de proteínas da MEC e de integrinas (Son et al., 2005; Werner e Grose, 2003; Bauer et al., 2002; Piek et al., 1999; O'kane e Ferguson, 1997). Adicionalmente o TGF- β 1 diminui a expressão de enzimas proteolíticas, como a collagenase e estromelisina, as quais degradam

as proteínas da MEC (Faler et al., 2006; Eickelberg et al., 1999). Essas atividades são sustentadas por uma série de estudos em vários modelos experimentais que demonstraram os efeitos benéficos do TGF- β . Brown e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes de TGF- β 1, submetidos a uma lesão tecidual, exibem uma redução da espessura da derme, com a presença marcante de infiltrado inflamatório em consequência da diminuição da re-epitelialização e da deposição de colágeno (BROWN et al., 1995). Um outro estudo revelou que animais tratados com anti-TGF- β 1 apresentam um severo enfraquecimento da capacidade regenerativa, especialmente nos estágios tardios do reparo tecidual (Shah et al., 1999).

O GM-CSF é uma glicoproteína inicialmente caracterizada por sua habilidade de estimular a proliferação e diferenciação dos progenitores hematopoéticos em macrófagos e neutrófilos maduros (Metcalf, 1986; Burgess e Metcalf, 1980). Entretanto, sabe-se da importância desta citocina na organização estrutural e metabolismo do tecido conectivo (Plenz et al., 2003; Werner e Grose, 2003). De fato, alguns experimentos e estudos clínicos têm demonstrado que, quando aplicado localmente no tratamento de feridas e úlceras crônicas, o GM-CSF desempenha um papel na melhora destas lesões (Almeida et al., 2005; Santos et al., 2004; Jaschke et al., 1995). É interessante mencionar que os níveis de TGF- β 1 nestas mesmas lesões estavam significativamente elevados, indicando que o GM-CSF estimula o reparo tecidual direta e indiretamente, via indução de citocinas secundárias (Werner e Grose, 2003; Mann et al., 2001).

Os níveis e a responsividade dos componentes da MEC e dos fatores de crescimento aos estímulos gerados pela agressão tecidual e consequente processo de regeneração, estão reduzidos no processo celulítico e exacerbados pelos fatores intrínsecos inerentes ao indivíduo.

De fato, os danos gerados à arquitetura dérmica, em decorrência da cascata iniciada pela estase e acúmulo de gordura na região hipoderme que resultam em invasões na derme, estão diretamente relacionados aos eventos estéticos da lipodistrofia ginóide (Mirrashed, 2004).

Desta forma, baseados no forte envolvimento e comprometimento dos componentes dérmicos no processo de formação e agravamento da celulite, avaliamos neste trabalho os possíveis efeitos de Slimbuster® L e de suas frações em separado (OC e F) sobre a resposta de fibroblastos humanos. Para tanto, os fatores de crescimento TGF- β e GM-CSF, bem como os componentes da MEC (colágeno, elastina e GAGs), foram quantificados no sobrenadante das culturas celulares.

Slimbuster® L e OC apresentaram importantes efeitos estimulatórios sobre produção dos fatores de crescimento GM-CSF e TGF- β . De forma interessante, a maior concentração de OC avaliada neste estudo (50mg/mL) promoveu efeito algum, enquanto que 25, 12, 6,25 e 3,12mg/mL aumentaram em, respectivamente, 3,0, 2,7, 2,5 e 1,7 vezes os níveis deste fator de crescimento em relação ao controle não-tratado. Estes resultados foram reproduzíveis para o produto Slimbuster® L, o qual é composto de OC em associação com F, na proporção 2:1, uma vez que a resposta foi muito similar, porém com efeitos significativos para a concentração de 50mg/mL. Slimbuster® L promoveu um aumento de aproximadamente 2,5 vezes nos níveis de TGF- β na faixa de concentração entre 6,25 e 50mg/mL. F, por sua vez, não apresentou efeitos significativos para este parâmetro.

Quando levamos em consideração os resultados destes compostos no que diz respeito à estimulação da produção de GM-CSF, podemos observar uma resposta muito similar àquela obtida para TGF- β . Portanto, ambos Slimbuster® L e OC, apresentaram resultados bastante expressivos com o mesmo perfil de resposta.

Com o intuito de observar os efeitos deste aumento nos níveis destes fatores de crescimento induzidos pelo Slimbuster® L, complementamos este estudo avaliando a estimulação do produto sobre a habilidade contrátil de fibroblastos humanos cultivados em gel de colágeno. Confirmando os resultados relacionados ao aumento de TGF- β , foi possível observar um efeito bastante

pronunciado do composto Slimbuster® L na promoção da contração de fibroblastos e possível transformação em miofibroblastos contráteis, os quais possuem forte capacidade contrátil, acelerando o processo de regeneração tecidual (Brenmoehl et al., 2009; Chu et al., 2008; Zao et al., 2008).

Conforme mencionado anteriormente, fatores de crescimento são importantes sinalizadores da indução da produção de proteínas da MEC por fibroblastos dérmicos. Assim sendo, ao avaliarmos o perfil de resposta de Slimbuster® L, OC e F sobre a estimulação da síntese de colágeno, elastina e GAGs funcionais em cultura de fibroblastos humanos, os resultados são corroborativos. Neste caso, especificamente, os fitoesteróis (F), os quais até o momento haviam apresentado ausência de efeito ou efeito muito discreto, apresentaram efeito bastante expressivo sobre a estimulação da síntese das proteínas da MEC colágeno e elastina. Para colágeno e elastina o estímulo gerado por F foi de aproximadamente 2 vezes, enquanto que para GAGs houve ausência de efeitos. OC apresentou resultados, muito similares, inclusive apresentando ausência de significância ($P > 0,05$, Anova, Tukey) quando comparamos as resposta obtidas com as mesmas concentrações de F. De maneira interessante, os resultados obtidos com Slimbuster® L para estes parâmetros apresentou efeito consideravelmente superior aqueles obtidos para as frações isoladas (OC e F), gerando um aumento médio de aproximadamente 2 vezes para colágeno, 1,5 vez para elastina e 7 vezes para GAGs. Cabe ressaltar que para GAGs, os resultados obtidos com Slimbuster® L foram consideravelmente distintos daqueles encontrados para OC e F.

Parte dos efeitos e mecanismos apresentados por Slimbuster® L pode ser explicada pela sua rica composição. Slimbuster® L, conforme mencionado anteriormente, é composto basicamente pela associação entre o extrato oleoso dos grãos verdes de café (*Coffea arabica* L.) e os fitoesteróis de canola (*Brassica campestris* L.), na proporção 2:1. Caracteriza-se quimicamente como um extrato concentrado e modificado de materiais insaponificáveis e PUFA's (ácidos graxos poliinsaturados) de óleo de café verde e fitoesteróis vegetais

esterificados de *Brassica Campestris* (canola). A composição graxa do SBL realizada por cromatografia gasosa (CG) demonstra o seguinte perfil: ácido palmítico (C16:0)= 25,0-40,0, ácido esteárico (C18:0)= 7,0-15,0%, ácido oléico (C18:1)= 8,0-15,0%, ácido linoléico (C18:2)= 35,0-48,0%. O conteúdo de palmitato de cafestol, determinado por CLAE/HPLC encontra-se na faixa de concentração que varia de 6,0 a 12,0%. Para o produto Slimbuster[®] L, devido a associação, especifica-se o conteúdo de fitoesteróis (fitoesteróis totais) determinado por CG, o qual obedece a faixa de concentração que varia de 12,0 a 21,0%.

As sementes de *C. arabica* apresentam diversos metabólitos secundários bioativos, incluindo derivados do ácido cafeico, em especial o ácido clorogênico, ácidos graxos poliinsaturados - palmítico, esteárico, oléico, linoléico e araquidônico -, α -, β - e γ -tocoferóis e diterpenos (cafestol e Kahweol) todos conhecidos como fortes antioxidantes (Namba and Matsuse, 2002). Além destes dois diterpenos, a fração lipídica de *C. arabica* é ampla, caracterizando-se também pela forte presença de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Os PUFAs, em geral, reduzem a lipogênese por diminuição da sua expressão gênica no fígado, incluindo a da síntese de ácidos graxos (Jump et al., 1994). Os diterpenos, por sua vez, causam estimulação da enzima adenilato ciclase, responsável pela conversão de ATP em AMPc (Nikolova-Damyanova et al., 1998). Este é o sinal intraadipocitário para que o mecanismo de lipólise aconteça.

Além dos efeitos que são atribuídos ao OC, os fitoesteróis (F) presentes no Slimbuster[®] L, são importantes no conjunto de resultados obtidos para o composto.

Os fitoesteróis presentes na canola apresentam estrutura análoga ao colesterol, estando essencialmente localizados na membrana plasmática de animais e plantas (Yeagle, 1985; Hartmann and Benveniste, 1987). Assim como o colesterol, os fitoesteróis são hábeis em modificar as propriedades estruturais e funcionais da dupla camada fosfolipídica das membranas celulares (Demel e De Kruffy, 1976; Bloch, 1983; Rujanavech et al., 1986; Korstanje et al., 1990;

Mora, 1999). Esta capacidade dos fitoesteróis favorece a ação de compostos no interior das células, bem como facilitam o transporte de moléculas intracelularmente (Kuhry et al., 1983; Mora et al., 1999). Este pode ser o principal mecanismo pelo qual o Slimbuster® L tenha apresentado excelente perfil de resposta clínica, uma vez que a presença dos fitoesteróis pode favorecer a premeação cutânea e a atividade intracelular do OC.

Outros indícios dos efeitos biológicos dos fitoesteróis estão relacionados à sua capacidade antioxidante, especialmente no combate à oxidação de lipídeos naturalmente presentes nas membranas celulares, em decorrência do processo de lipoperoxidação lipídica (Yasukazu e Etsuo, 2003), favorecendo assim a preservação das fibras dérmicas, consideravelmente aumentadas após o tratamento das culturas celulares com cada um dos compostos.

Apesar do grande número de parâmetros avaliados neste trabalho, o completo mecanismo pelo qual Slimbuster® L exerce seus efeitos biológicos ainda não está totalmente elucidado. Todavia, embora complexos mecanismos não avaliados estejam envolvidos na fisiopatologia da celulite, a melhora clínica obtida com Slimbuster® L apresentadas neste trabalho, associada aos resultados obtidos nos estudos histológicos e *in vitro*, nos encorajam a afirmar que este composto pode ser utilizado como uma alternativa eficaz em produtos para os cuidados do corpo em geral, particularmente aqueles destinados ao controle e tratamento da celulite, situação na qual a pele apresenta-se esteticamente e metabolicamente perturbada.

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram o depósito de patente de aplicação para o produto Slimbuster® L, solicitada ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), sob o número PI 0602452-1.



6- CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Slimbuster L pode ser considerada uma ferramenta segura e eficaz na prevenção e tratamento tópico da gordura localizada e celulite;
- Slimbuster L, de acordo com os resultados *in vitro*, constitui uma associação racional e eficaz de ingredientes, os quais isoladamente atuam, na maioria das vezes, por mecanismos diferentes e ou complementares, o que esclarece o objetivo de terem sido associados;
- A combinação de compostos com ações distintas, porém não-antagônicas, agrega mecanismos complementares e essenciais, que podem atuar clinicamente, de forma sinérgica, no combate da lipodistrofia ginóide (celulite);
- Slimbuster L possibilitou a elaboração de uma patente de aplicação para a associação avaliada ("Uso do óleo de café (*coffea arabica*) em associação com fitoesteróis de canola (*Brassica campestris* L.) na melhora de alterações cutaneas específicas"; Inventores: Maria Del Carmen Velazquez Pereda, Márcio Antonio Polezel, Cecilia Nogueira, Gustavo de Campos Dieamant, Samara Eberlin, Marcos Roberto Rossan; Propriedade Intelectual de Chemyunion Química Ltda; PI 0602452-1);
- Slimbuster L é um produto originado desta pesquisa e que encontra-se atualmente sendo comercializado e presente em alguns produtos finais de mercado, isoladamente ou em associação com outros ativos.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:327-32.

Andersen LF, Jacobs-Jr DR, Carlsen MH, Blomhoff R. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutrition* 2006; 83(5): 1039-46.

Avram MM. Cellulite: a review of its physiology and treatment. *J Cosmet Laser Ther* 2004; 6: 181-185.

Bartness TJ, Bamshad M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol* 1998; 44: 1399-1411.

Bartold PM, Wiebkin OW. Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect Tiss Res* 1981; 9(2): 99-106.

Binazzi M, Grilli-Cicioloni E. - A proposito della cosiddetta cellulite e della dermatopanniculopatia edemato fibrosclerotica. *Ann It Derm Clin Sper* 1977; 31: 121-125.

Binazzi M, Papini M. Aspetti clinico histomorfologici. In: Ribuffo A, Bartoletti CA, editors. *La cellulite Salus*, Rome, 1983: 7-15.

Binazzi M. - Cellulite. aspects cliniques et morpho-histologiques. *J Med Esth Et Chir Derm* 1983; 10(40): 229-233.

Bloch KE. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* 1983; 14: 47-92.

Brenmoehl J, Miller SN, Hofmann C, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Rogler G. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol* 2009; 15(12): 1431-42.

Cambar J, Dabis G, Gendre PH, Saurel J. La vrai problème de ce qu'on appelle improprement la cellulite: etude clinique, enquete endocrinométabolique, microscopie optique et électronique. *Gaz Méd Fr* 1976; 25(83): 2339-2348.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359.

Chimenti S, Pranteda G, Cantaresi F, Clerico R, Bianchi L. Aspetti istochimici. In: Ribuffo A, Bartoletti CA, editors. *La cellulite Salus*, Rome, 1983: 17-12.

Chu Y, Guo F, Li Y, Li X, Zhou T, Guo Y. A novel truncated TGF-beta receptor II downregulates collagen synthesis and TGF-beta I secretion of keloid fibroblasts. *Connect Tissue Res* 2008; 49(2): 92-8.

Ciporkin H, Paschoal LH. Atualização terapêutica e fisiopatogênica da Lipodistrofia Ginóide (LDG) 'celulite'. Livraria Editora Santos, São Paulo, 1992. *Rev Med* 1980; 21: 1457.

Curri SB. Aspects morpho-histochimiques et biochimiques du tissu adipeux dans la dermo hypodermose cellulitique. *J Med Esth* 1976; 5: 183.

Curri SB. Aspetti biochimici. In: Ribuffo A, Bartoletti CA, editors. *La cellulite*. Salus, Rome, 1983: 29-36.

Curri SB. Las paniculopatías de estasis venosa: diagnostico clínico e instrumental. Hausmann, Barcelona, 1991.

Demel RA, De Kruyff B. The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1976; 457: 109-32.

Di Simplicio P, Jensson H, Mannervik B. Effects of inducers of drug metabolism on basic hepatic forms of mouse glutathione transferase. *Biochem J* 1989; 263: 679-85.

Draelos ZD. In search of answers regarding cellulite. *Cosmet Dermatol* 2001; 14: 55-8.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(3): 980S-84S.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(2).

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. *J Pediatr* 2007; 83(5): S192-203.

Franchi J, Pellicier F, André P, Schnebert S. L'adipocyte dans une histoire d'amincissant Adipocyte and the story of slimming products. *Pathologie Biologie* 2003; 51: 244-47.

Frübeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 2006; 393: 7-20.

Fruhbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzabal J, Burrel MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2001; 280: 827-47.

Goldman MP. Cellulite: a review of current treatments. *Cosmet Dermatol* 2002; 15: 17-20.

Gross G, Jaccaud E, Huggett AC. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in Coffee Brews. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 547-54.

Jekel AA, Vaessen HAMG, Schotthorst RC. Capillary gas-chromatographic method for determining non-derivatized sterols - some results for duplicate 24h diet samples collected in 1994. *Fresenius J Anal Chem* 1998; 360: 595-600.

Kamm W, Dionisi F, Hischenhuber C, Engel KH. Authenticity of fats and oils. *Food Rev Int* 2001b; 17: 249-90.

Kersten et al. Mechanisms of Nutritional and Hormonal Regulation of Lipogenesis. *EMBO Reports* 2001; 2: 282-86.

Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS letters* 2004; 569: 321-26.

Korstanje LJ, van Ginkel G, Levine YK. Effects of steroid molecules on the dynamical structure of dioleoyl phosphatidyl choline and digalactosyl diacylglycerol bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1022: 155-62.

Kuhry JG, Fonteneau P, Duportail G, Maechling C, Laustriat G. TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys* 1983; 5: 129-40.

Lay SL, Dugail I. Connecting lipid droplet biology and the metabolic syndrome. *Prog Lipid Res* 2009 [Epub ahead of print].

Leat A, Weber PC. Cardiovascular Effects of Omega-3 Fatty Acids. *N Engl J Med* 1988; 318: 549.

Lotti T, Ghersetich I, Grappone C, Dini G. Proteoglycans in so-called cellulite. *Br J Dermatol* 1990; 29: 272-274.

Mensink RP, Lebbink WJ, Lobbezoo IE, Weusten-Van der Wouw MPME, Zock PL, Katan MB. Diterpene composition of oils from Arabica and Robusta coffee beans and their effects on serum lipids in man. *J Internal Med* 1995; 237: 543-50.

Merlen JF, Curri SB. Raisons anatomo-pathologiques de La cellulite. *J Mal Vasc* 1984; 9: 53-54.

Merlen JF, Curri SB. Rapporti vasculo-tessutali. In: Ribuffo A, Bartoletti CA, editors. *La cellulite Salus*, Rome, 1983: 37-46.

Mersmann HJ. Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition. *J Anim Sci* 2002; 80(2): 126-E134.

Miller EG, Gonzales-Sanders AP, Couvillon AM, Binnie WH, Sunahara GI, Bertholet R. Inhibition of oral carcinogenesis by roasted beans and roasted coffee bean fractions. In: 15th International Scientific Colloquium on Coffee 1993 pp. 420-25. Association Scientifique International du Café, Paris.

Miller EG, McWhorter K, Rivera-Hidalgo F, Wright JM, Hirsbrunner P, Sunahara GI. Kahweol and cafestol: inhibitors of hamster buccal pouch carcinogenesis. *Nutrition Cancer* 1991; 15: 41-6.

Mirrashed F, Sharp JC, Krause V, Morgan J, Tomanek B. Pilot study of dermal and subcutaneous fat structures by MRI in individuals who differ in gender, BMI, and cellulite grading. *Skin Research and Technology* 2004; 10: 161-168.

Mora MP, Tourne-Peteilh C, Charveron M, Fabre B, Milon A, Muller I. Optimisation of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity. *Chemistry and Physics of Lipids* 1999; 101: 255-65.

Namba T, Matsuse T. A historical study of coffee in Japanese and Asian countries: focusing the medicinal uses in Asian traditional medicines. *Yakushigaku Zasshi* 2002; 37(1): 65-75.

Negrel R. Paracrine autocrine signals and adipogenesis. *Progress in Obesity Research* 1999;8(chap 7:55-61.

Nikolova-Damyanova B, Velikova R, Jham GN. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. *Food Res Int* 1998; 31(6): 479-86.

Nürnberg F, Müller G. So-called cellulite: an invented disease. *J Dermatol Surg Oncol* 1978; 4: 221-9.

Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition* 2000; 16: 903-8.

Pereda MCV, Dieamant GC, Eberlin S, Nogueira C, Colombi D, Di Stasi LC, Queiroz MLS. Effect of green *Coffea Arabica* L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in in vitro and ex vivo human skin models. *J Cosm Dermatol* 2009; 8: 56-62.

Perin F, Perrier C, Pittet JC, Beau P, Schnebert S, Perrier P. Assessment of skin improvement treatment efficacy using the photograding of mechanically-accentuated macrorelief of thigh skin. *Int J Cosmet Sci* 2000; 22: 147-56.

Pierard GE, Nizet JL, Pierard-Franchimont C. Cellulite: from standing fat herniation to hypodermal stretch marks. *Am J Dermatopathol* 2000; 22: 34-7.

Pond C. Ecology of storage and allocation of resources: animals. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001; 1-5.

Querleux B, Cornillon C, Jolivet O, Bittoun J. Anatomy and physiology of subcutaneous adipose tissue by in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy: Relationships with sex and presence of cellulite. *Skin Res Technol* 2002; 8: 118-124.

Rawlings AV. Cellulite and its treatment. *Int J Cosm Sci* 2006; 28: 175-90.

Ribuffo A. Cellulite: aspects histochimiques. *J Med Esth Et Chir Derm X* 1983; 40: 223-227.

Rossi ABR, Vergnanini AL. Cellulite: a review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000; 14: 251-62.

Ruggeri A, Benazzo F. Collagen–proteoglycan interaction: ultrastructure of the connective tissue matrix. *Martins Nijaolf, Boston, 1984.*

Rujanavech C, Henderson PA, Silbert DF. Influence of sterol structure on phospholipid phase behavior as detected by parinaric acid fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* 1986; 261: 7204-14.

Sainio EL, Rantanen T, Kanerva L. Ingredients and safety of cellulite creams. *Eur J Dermatol* 2000; 10: 596-603.

Scherwitz C, Braun-Falco O. So-called cellulite. *J Dermatol Surg Oncol* 1978; 4: 230-4.

Schwartz MW, Woods SC, Porter D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-71.

Segers AM, Abulafia J, Kriner J, Cortondo O. 'Celulitis': estudo histopatológico e histoquímico de 100 casos. *Med Cut ILA* 1984; 12: 167-172.

Smas C, Sul HS. Control of adipocyte differentiation. *Biochem J* 1995; 309: 697-710.

Smith WP. Cellulite treatments: snake oils or skin science. *Cosm Toil* 1995; 1(10): 61-70.

Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. *JAMA* 1990; 264: 3047-52.

Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obesity Reviews* 2007; 8: 41-4.

Tzaphlidou, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. *Micron* 2004; 35: 173-77.

Vlahakis C, Haezbroek J. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting locations, and temperature. *J Am Oil Chem Soc* 2000; 77: 49-53.

Weusten-Van der Woun MPME, Katan MB, Viani R, Huggett AC, Liardon R, Lund-Larsen PG et al. Identity of cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effect on liver function enzymes. *J Lip Res* 1994; 35: 721-33.

Wheatley D. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *J Psychopharmacol* 2005; 19(4): 414-21.

Willingworth DR, Harris WS, Connor WE. Inhibition of low-density lipoprotein synthesis by dietary Omega-3 fatty acids in humans. *Atherosclerosis* 1984; 4: 270-5.

Yasukazu Y; Etsuo N. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nut Sci Vitaminol* 2003; 49(4): 277-80.

Yvan-Charvet L, Bobard A, Bossard P, Massiéra F, Rousset X, Ailhaud G, Teboul M, Ferré P, Dagher G, Quignard-Boulangé A. In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(6): 1340-5.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.

Zhao DZ, Shi WY, Zhang PG, Zhang CL. [Effects of Shibao Powder on promoting the expression of b-FGF and TGF-beta 1, in the repair of soft tissue injuries]. *Zhongguo Gu Shang*. 2008 Sep;21(9):667-8.

Greenspan P, Mayer EP and Fowler SD. Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 1985; 100: 965-73.



8- ANEXOS

Laudo de Análise (certificado de análise) do Óleo de Café Verde.



Certificado de Análise CHEMYUNION

Produto	MELSCREEN-COFFEE-EL-000		Fabricação	01/09/2008
Lote	CAG07-0008		Validade	01/09/2009
País Origem	BR			
Desc. Comercial	Óleo de café verde (Coffee extract)			

Parâmetro	Unidades	Método	Especificação	Resultado
Aspecto (170)		Visual	LC, livremente solúvel, p/ água quente	De acordo
Cor		Visual	Marrom homogêneo e límpido	De acordo
Odor		Organoléptico	Característico	De acordo
Índice de acidez	mg de KOH / g de amo.	9940201	Max. 10,00	3,17
Índice de saponificação	mg de KOH / g de amo.	9940201	140,00 - 180,00	159,09
Índice de sódio	g de Na / 100g de amo.	9940204	500,00 - 1100,00	100,29
Densidade (20 °C)	g/cm ³	9947004	0,870 - 0,960	0,897
Índice de peróxido	mEq / Kg de amostra	9942101	Max. 10,00	0,21
Ácido caprílico (C8:0)	%	9944801	Max. 0,1	0,0
Ácido caprílico (C10:0)	%	9944801	Max. 0,1	0,0
Ácido laúrico (C12:0)	%	9944801	Max. 0,1	0,0
Ácido mirístico (C14:0)	%	9944801	Max. 0,3	0,0
Ácido palmítico (C16:0)	%	9944801	25,0 - 40,0	34,7
Ácido heptadecanoico (C17:0)	%	9944801	Max. 0,3	0,0
Ácido esteárico (C18:0)	%	9944801	7,0 - 15,0	7,8
Ácido oleico (C18:1)	%	9944801	0,0 - 15,0	0,0
Ácido linoléico (C18:2)	%	9944801	30,0 - 40,0	41,8

OBSERVAÇÕES

Responsável IQ - ISABEL BARROE	CRG - 04003164V (Região)	APROVADO
Analisado em - 12/11/2008	Aprovado 	Aprovado Eletronicamente
Supervisor IQ - ANA PAULA M. V. LAF	CRG - 00211103 - IV (Região)	300000000000000011271
Gerente de Qualidade	Aprovado 	12/11/2008

Rua Presidente Dutra, 100 - Vila Militar - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 22250-000 - Brasil - Tel: (21) 2100-0000 Fax: (21) 2100-0000 e-mail: atendimento@chemyunion.com.br
 0001 - Unidade | Imprensa



Certificado de Análise

CHEMYUNION

Produto:	SELECIONE O PRODUTO	Fabricação:	01.00.2008
Lote:	00001-0000	Validade:	01.00.2008
País Origin:	BR		
Desc. Química:	Cloro de cálcio anidro (Cloruro anidro)		

Ácido acético (C2H3O2)	%	99,9999	0,1 - 1,0	0,1
Ácido acético (C2H3O2)	%	99,9999	1,1 - 10	1,1
Ácido fórmico (C2H2O2)	%	99,9999	Máx. 1,0	0,1
Ácido láctico (C3H5O2)	%	99,9999	Máx. 1,0	0,1
Teor. de cálcio	% pp	99,9999	Máx. 1,00	0,20
Conteúdo de palmitato de cálcio	% pp	99,9999	10,0 - 20,0	10,1
Formoldeído	% pp	99,9999	0,0000 - 0,0000	0,0000
Formoldeído	mg/100g	99,9999	10,00 - 20,00	20,00
Formoldeído	mg/100g	99,9999	55,00 - 65,00	60,00
Formoldeído	mg/100g	99,9999	Máx. 10,00	1,00
Formoldeído	mg/100g	99,9999	1,00 - 0,00	0,00
Formoldeído	UFC / ml de amostra	99,9999	Ausente	De acordo
Formoldeído	UFC / ml de amostra	99,9999	Ausente	De acordo
Formoldeído	UFC / ml de amostra	99,9999	Ausente	De acordo
Formoldeído	UFC / ml de amostra	99,9999	Ausente	De acordo
Formoldeído	UFC / ml de amostra	99,9999	Ausente	De acordo
Formoldeído	UFC / ml de amostra	99,9999	Máx. 100	De acordo
Formoldeído	UFC / ml de amostra	99,9999	0,0000	De acordo

OBSERVAÇÕES

Responsável IQ: DRAUZ BARROS	CRC: 038031611 Região	APROVADO
Analisado em: 12.11.2008	Aprovado:	
Responsável IQ: AYA PALLA REVELAN	CRC: 04281830 - 1ª Região	000000000000011271
Garante de Qualidade:	Aprovado:	

Informações gerais: Rua José de Sousa Costa, 441 - Edif. - Top. - Itaipava - Curitiba - PR Brasil. Tel: (41) 3102-0000 Fax: (41) 3102-0000 e-mail: atendimento@chemyunion.com.br

Laudo de Análise (certificado de análise) do Slimbuster® L.



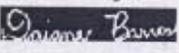
Certificado de Análise

CHEMYUNION

Produto	SLIMBUSTER L		
Lote	CN018-1208	Fabricação	05.12.2008
País Origem	BR	Validade	05.12.2009
Desc Química	Extrato concentrado e modificado de materiais insaponificáveis e PUFAS de óleo de café verde (<i>Coffea arabica</i>) e fitosteróis vegetais esterificados de <i>Brassica campestris</i>		

Análises	Unidades	Métodos	Especificações	Resultado
Aparência (25°C)		Visual	Liq. viscoso, levemente turvo à turvo	De acordo
Cor		Visual	Amarelo esverdeado a âmbar	De acordo
Odor		Organoléptico	Característico	De acordo
Índice de peróxido	m Eq / Kg de amostra	MA021CH	Max. 10,00	4,28
Ácido-palmitico (C16:0)	%	MA146CH	27,00 - 50,00	30,92
Ácido esteárico (C18:0)	%	MA146CH	3,00 - 8,00	7,34
Ácido oléico (C18:1)	%	MA146CH	8,00 - 20,00	14,28
Ácido linoléico (C18:2)	%	MA146CH	30,00 - 50,00	41,41
Palmitato de Cafestol	% p/p	MA158CH	6,00 - 12,00	7,82
Fitosteróis Totais	% p/p	MA250CH	12,00 - 21,00	16,48

OBSERVAÇÕES

Responsável CQ DAIANE BARROS	CRQ 04406318-IV Região	APROVADO
Analisado em 11.12.2008	Aprovado 	
Supervisora GQ ANA PAULA M.VILAR	CRQ 04251830 - IV Região	000000000000000017698
Garantia de Qualidade	Aprovado 	11.12.2008

Atendimento ao Cliente: Rua José de Oliveira Cassó, 447 Eden - Cep: 18103-065 - Sorocaba - SP Brasil Tel (55) 15 2102-2002 Fax (55) 15 2102-2001 e-mail: vendas@chemyunion.com.br

100% reciclado / recycled

Características tipológicas das voluntárias, dados brutos e demais dados referentes aos estudos de eficácia clínica.

CARACTERÍSTICAS TIPOLOGICAS DOS VOLUNTÁRIOS					
Voluntários		Idade (anos)	Sexo F=feminino M=masculino	Fototipo*	Pele saudável na área experimental
Ref.	Nome / Sobrenome				
1	SAND B	38	F	IV	X
2	DILC S	33	F	III	X
3	JOSI P	32	F	III	X
4	VANJ C	36	F	III	X
5	LUZI L	39	F	II	X
6	AILD F	37	F	II	X
7	ANAL O	33	F	III	X
8	ELIA S	34	F	III	X
9	ANAM B	26	F	III	X
10	ADRI M	32	F	IV	X
11	ANAC P	25	F	III	X
12	JOEL T	24	F	IV	X
13	CRIS S	22	F	IV	X
14	FERN C	22	F	II	X
15	ROBE P	27	F	III	X
16	ALES S	29	F	III	X
17	ANAM A	37	F	II	X
18	MARC K	34	F	II	X
19	ALES G	33	F	III	X
20	PRIS Q	23	F	III	X
21	LILI A	25	F	III	X
22	ROSE C	38	F	III	X
23	ROSE O	38	F	III	X
24	SILV F	28	F	IV	X
25	DANI M	29	F	III	X
26	ELIS O	34	F	IV	X
27	PRIS F	20	F	III	X
28	IVON B	27	F	III	X
29	DURV S	38	F	III	X

Legenda: / = não; x = sim

Desistência

Exclusão

***FOTOTIPO DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE FITZPATRICK⁽²⁾**

Tipo	Cabelo	Pele	Sardas	Queimaduras Solares
I	vermelho	clara	+++	queima-se sempre; nunca bronzeia
II	claro	clara	++	queima-se sempre; bronzeado mínimo
III	castanho	clara	+	queima-se moderadamente; bronzeado progressivo
IV	castanho escuro / preto	morena	0	queima-se eventualmente; bronzeia-se sempre
V	preto	negra	0	nunca se queima; fortemente pigmentada

CONTROLE DE OBSERVAÇÃO
Verificação da Obediência às Restrições

Verificação da obediência às restrições (18 resultados extrapolados)	Número de voluntários que respeitaram as restrições	Porcentagem de voluntários que respeitaram as restrições
Aplicação de produtos similares na região experimental Desvios: Nenhum	18	100%
Exposição intensiva ao sol UVA na região experimental Desvios: Nenhum	18	100%
Tomar medicamentos interditados * Desvios: Nenhum	18	100%
Tratamento Tópico com Vitamina A Ácida ou Derivados Desvios: Nenhum	18	100%

Legenda:

*(antialérgicos/ anti-inflamatórios/ substâncias à base de vitamina A ácida ou seus derivados/ tratamento anti-acne local ou sistêmica/ tratamento anti-seborréia).

CONTROLE DE OBSERVAÇÃO
Consumo em gramas do Produto em D60

Voluntários		Amostra	Amostra	Consumo P1	Número de	Consumo por
Ref.	Nome/Sobren	Peso em D0 P1 em (g)	Peso em D60 P2 em (g)	P2 = C em (g)	aplicações N	aplicação C/N em (g)
1	SAND B	665,30	135,02	530,28	113,0	4,69
2	DILC S	803,10				
3	JOSI P					
4	VANDI C	268,00				
5	LUZI L	534,34	138,53	395,81	109,0	3,63
6	ATIL D F	133,58				
7	ANAL O	670,42	265,23	405,19	81,0	5,00
8	ELIA S	669,48	169,33	500,15	112,0	4,47
9	ANAM B	669,56	92,92	576,64	100,0	5,77
10	ADRI M	267,80				
11	ANAC P	804,46	204,56	599,90	109,0	5,50
12	JOEL T	267,35				
13	CRIS S					
14	FERN C					
15	ROBE P					
16	ALES S					
17	ANAM A	530,89	374,97	155,92	120	1,30
18	MARC K	670,33	158,92	511,41	102	5,01
19	ALES G	538,38	107,85	430,53	99	4,35
20	PRIS Q	669,27	288,91	380,36	107	3,55
21	LILI A	669,00	104,43	564,57	110	5,13
22	ROSE C	536,29	236,45	299,84	114	2,63
23	ROSE O	804,37	168,84	635,53	120	5,30
24	SILV F	1069,43	227,63	841,80	118	7,13
25	DANI M	939,21	196,87	742,34	120	6,19
26	ELIS O	937,88	149,39	788,49	112	7,04
27	PRIS F	401,43				
28	IVON B	401,25	120,11	281,14	108	2,60
29	DURV S	400,24	92,89	307,35	108	2,85
Consumo Médio do Painel ± Desvio			4,56	±	1,57	

Legenda:

Desistência

Exclusão

QUALIDADES COSMÉTICAS - Opinião dos Voluntários D30

Itens de avaliação (18 resultados extrapolados)	Número de respostas	Porcentagem de voluntários satisfeitos
Fácil aplicação	18	100%
Textura agradável	17	94%
Fragrância agradável	3	17%
Rápida penetração	14	78%
Pele mais lisa	17	94%
Atenuação da celulite	10	56%
Redução de gordura	7	39%
Pele mais hidratada	16	89%
Pele mais macia	16	89%
Intenção de compra	16	89%

PREFERÊNCIA E INTENÇÃO DE COMPRA – D30

Itens de avaliação	Número de respostas	Porcentagem de voluntários satisfeitos
Preferência pelo produto testado comparado ao produto usual (18 voluntários considerados para este item)	2	12%
Preferência pelo produto usual comparado ao produto testado (18 voluntários considerados para este item)	4	22%
Não sabem optar pela preferência (18 voluntários considerados para este item)	12	67%

QUALIDADES COSMÉTICAS - Opinião dos Voluntários D60

Itens de avaliação (18 resultados extrapolados)	Número de respostas	Porcentagem de voluntários satisfeitos
Fácil aplicação	18	100%
Textura agradável	15	83%
Fragrância agradável	5	33%
Rápida penetração	16	89%
Pele mais lisa	17	94%
Atenuação da celulite	13	72%
Redução de gordura	10	56%
Pele mais hidratada	16	89%
Pele mais macia	16	89%
Intenção de compra	13	72%

PREFERÊNCIA E INTENÇÃO DE COMPRA – D60

Itens de avaliação	Número de respostas	Porcentagem de voluntários satisfeitos
Preferência pelo produto testado comparado ao produto usual (18 voluntários considerados para este item)	1	6%
Preferência pelo produto usual comparado ao produto testado (18 voluntários considerados para este item)	5	28%
Não sabem optar pela preferência (18 voluntários considerados para este item)	12	67%

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Média entre os leitores												
Ref.	Estômago			Cintura			Quadril (superior)			Quadril (inferior)		
Vol.	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60
1	74,4	74,2	74,2	73,7	74,3	74,3	89,8	89,3	89,0	96,2	96,2	95,7
2	74,6	73,7	0,0	62,7	62,4	0,0	71,7	72,7	0,0	91,2	91,9	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	85,6	0,0	0,0	83,7	0,0	0,0	97,6	0,0	0,0	106,9	0,0	0,0
5	87,7	89,0	88,1	90,2	89,7	88,8	95,0	95,9	94,0	99,5	99,4	97,4
6	78,5	0,0	0,0	77,4	0,0	0,0	82,0	0,0	0,0	90,1	0,0	0,0
7	72,7	72,0	72,1	69,4	69,8	69,3	77,7	79,8	79,8	93,2	94,4	94,2
8	93,2	89,9	92,8	91,8	91,4	90,8	97,3	95,9	96,0	116,4	114,3	113,8
9	67,2	67,7	67,4	62,6	62,5	62,9	73,8	73,5	74,0	87,6	87,8	87,5
10	74,3	0,0	0,0	64,1	0,0	0,0	77,5	0,0	0,0	88,4	0,0	0,0
11	70,5	69,8	70,4	69,8	67,7	69,5	83,8	81,7	82,1	97,4	95,7	95,4
12	78,9	0,0	0,0	77,0	0,0	0,0	93,9	0,0	0,0	100,4	0,0	0,0
13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14	78,4	0,0	0,0	72,5	0,0	0,0	85,9	0,0	0,0	91,7	0,0	0,0
15	81,8	82,0	0,0	73,3	73,5	0,0	82,2	82,4	0,0	102,0	101,2	0,0
16	77,7	0,0	0,0	72,8	0,0	0,0	81,8	0,0	0,0	96,3	0,0	0,0
17	71,4	71,0	70,2	69,1	68,2	68,6	77,3	78,5	78,2	89,5	88,1	88,6
18	71,3	71,9	71,3	67,2	66,3	69,4	77,2	75,2	76,2	88,3	88,8	90,2
19	81,3	81,1	81,7	76,4	74,0	76,5	86,8	87,1	87,1	99,1	98,2	100,1

Ref.	Média entre os leitores											
	Estômago			Cintura			Quadril (superior)			Quadril (inferior)		
	Vol.	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30
20	85,3	82,3	83,1	81,0	80,5	80,8	92,5	93,1	96,5	111,0	109,4	110,2
21	74,8	74,7	74,7	70,5	69,2	69,7	81,3	80,2	80,3	91,4	90,8	90,6
22	85,2	83,4	85,5	77,3	77,5	80,2	95,8	95,1	94,8	106,8	106,3	106,7
23	81,3	84,2	82,0	79,8	79,8	80,0	97,3	96,3	95,6	106,7	107,2	105,3
24	82,8	82,4	82,6	76,7	75,8	76,8	87,9	87,5	87,4	96,7	96,5	96,2
25	76,1	76,0	75,5	70,4	69,8	69,2	85,9	83,9	83,6	101,4	99,8	98,8
26	80,9	79,8	80,8	81,2	80,3	82,0	91,4	91,7	92,2	100,1	98,9	100,9
27	78,2	0,0	0,0	70,5	0,0	0,0	87,2	0,0	0,0	103,2	0,0	0,0
28	77,0	75,9	75,6	79,9	79,7	79,9	83,8	87,9	89,7	102,0	101,2	101,1
29	76,1	79,9	77,5	72,8	76,5	72,8	91,8	95,7	92,3	105,7	106,8	103,6

Legenda:

Desistência

Exclusão

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Ref.	Média entre os leitores														
	Coxa (superior)			Coxa (mediana)			Coxa (inferior)			Perna (superior)			Perna (inferior)		
	Vol.	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30
1	56,1	56,2	55,3	45,1	45,1	43,0	36,8	36,5	35,5	31,8	31,5	31,3	19,8	19,9	19,7
2	49,6	50,1	0,0	46,8	45,5	0,0	37,8	35,6	0,0	32,8	31,6	0,0	22,4	22,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	63,3	0,0	0,0	55,8	0,0	0,0	47,0	0,0	0,0	38,5	0,0	0,0	22,6	0,0	0,0
5	56,8	55,9	54,5	53,2	52,1	51,2	43,6	44,3	40,2	36,6	34,9	34,2	20,5	20,3	19,9
6	51,6	0,0	0,0	45,4	0,0	0,0	35,8	0,0	0,0	33,9	0,0	0,0	20,0	0,0	0,0
7	52,5	53,1	52,6	48,9	48,6	48,7	39,8	38,3	38,0	33,0	33,2	32,6	20,9	19,4	19,3
8	69,9	67,9	67,5	61,4	58,9	59,6	48,5	46,9	48,1	42,4	40,8	41,2	24,4	24,1	23,9
9	49,4	49,1	48,0	44,4	44,5	42,7	33,3	34,1	32,3	29,8	29,5	28,8	18,4	18,7	18,3
10	87,7	0,0	0,0	44,7	0,0	0,0	38,0	0,0	0,0	30,9	0,0	0,0	19,9	0,0	0,0
11	56,0	53,5	54,2	53,8	52,5	51,6	40,1	38,9	38,6	36,4	35,4	35,7	21,1	20,9	20,6
12	58,3	0,0	0,0	51,3	0,0	0,0	42,1	0,0	0,0	32,5	0,0	0,0	20,9	0,0	0,0
13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14	56,3	0,0	0,0	48,3	0,0	0,0	38,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,0	21,7	0,0	0,0
15	57,7	57,9	0,0	49,4	48,8	0,0	37,2	36,9	0,0	32,5	32,5	0,0	21,0	21,1	0,0
16	55,3	0,0	0,0	50,6	0,0	0,0	40,3	0,0	0,0	32,3	0,0	0,0	21,0	0,0	0,0
17	52,8	51,4	50,7	46,0	44,7	45,7	37,1	35,6	35,1	31,7	30,7	31,3	19,2	19,2	19,2
18	50,1	50,6	52,0	44,1	44,2	43,8	37,7	36,3	38,9	30,4	30,1	30,9	20,4	20,2	21,3
19	57,3	56,3	56,2	45,8	45,0	44,4	36,5	36,3	36,0	33,4	33,3	34,1	20,8	20,6	20,8

Ref.	Média entre os leitores														
	Coxa (superior)			Coxa (mediana)			Coxa (inferior)			Perna (superior)			Perna (inferior)		
	Vol.	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30
20	65,2	64,4	64,9	56,5	57,3	56,7	44,8	44,4	43,4	38,4	37,9	37,8	22,4	22,4	22,1
21	52,1	50,5	50,3	45,6	43,9	43,4	34,5	34,1	33,6	30,3	30,2	29,7	19,1	19,0	18,9
22	60,9	60,6	60,6	51,8	51,0	49,1	39,3	38,8	38,1	34,1	33,3	33,7	19,4	19,4	19,7
23	60,4	60,5	59,3	52,0	51,4	51,8	42,6	43,2	42,6	37,2	37,2	35,8	21,8	21,8	21,2
24	57,0	56,8	56,7	49,9	50,5	50,6	41,2	41,5	41,9	34,5	34,3	33,5	21,1	20,9	20,5
25	58,1	56,5	55,7	49,1	48,9	48,6	39,2	39,1	39,0	31,4	31,4	31,0	19,0	19,0	18,9
26	56,4	56,8	57,9	49,5	49,7	50,0	40,1	39,8	40,2	33,2	33,1	32,7	21,1	21,0	20,9
27	61,1	0,0	0,0	54,3	0,0	0,0	43,7	0,0	0,0	37,8	0,0	0,0	24,6	0,0	0,0
28	60,2	58,3	56,8	52,9	47,9	47,5	38,9	38,8	38,4	32,8	34,0	33,9	21,7	22,0	21,6
29	63,0	63,0	60,4	54,8	53,8	51,2	41,1	40,1	38,7	32,7	33,3	32,9	21,8	21,7	20,9

Legenda:

Desistência

Exclusão

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Porcentagem de Variação de Medidas

Ref. Vol.	Estômago		Cintura		Quadril (superior)		Quadril (inferior)	
	D30	D60	D30	D60	D30	D60	D30	D60
1	99,8%	99,8%	100,9%	100,8%	99,4%	99,1%	100,0%	99,5%
2								
3								
4								
5	101,5%	100,4%	99,5%	98,5%	100,9%	99,0%	99,9%	*97,9%
6								
7	99,1%	99,3%	100,5%	99,8%	102,7%	102,7%	101,3%	101,1%
8	*96,5%	99,6%	99,5%	98,9%	98,6%	98,7%	98,2%	*97,8%
9	100,8%	100,3%	99,8%	100,4%	99,5%	100,2%	100,3%	100,0%
10								
11	98,9%	99,8%	*97,0%	99,6%	*97,5%	*98,0%	98,3%	*98,0%
12								
13								
14								
15								
16								
17	99,5%	98,3%	98,7%	99,3%	101,5%	101,2%	98,4%	99,0%
18	100,8%	100,0%	98,7%	103,3%	*97,3%	98,7%	100,5%	102,2%
19	99,7%	100,6%	*96,8%	100,2%	100,3%	100,3%	99,1%	101,1%
20	*96,5%	*97,4%	99,4%	99,8%	100,7%	104,3%	98,6%	99,2%
21	99,9%	99,9%	98,2%	98,8%	98,7%	98,8%	99,3%	99,1%
22	*97,9%	100,4%	100,1%	103,7%	99,2%	99,0%	99,5%	99,8%
23	103,5%	100,8%	100,0%	100,3%	98,9%	98,2%	100,4%	98,7%
24	99,5%	99,8%	98,9%	100,1%	99,5%	99,4%	99,8%	99,5%
25	99,9%	99,2%	99,2%	98,3%	*97,6%	*97,3%	98,4%	*97,4%
26	98,7%	99,9%	98,9%	101,1%	100,4%	101,0%	98,8%	100,8%
27								
28	98,6%	98,2%	99,8%	100,1%	104,9%	107,1%	99,2%	99,1%
29	104,9%	101,8%	105,0%	100,0%	104,2%	100,5%	101,0%	*98,0%
Média	99,8%	99,7%	99,5%	100,2%	100,1%	100,2%	99,5%	99,3%
Desv. Pad.	0,021	0,010	0,017	0,014	0,021	0,024	0,010	0,013
% Vol. Reat.	17%	6%	11%	0%	17%	11%	0%	28%

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Porcentagem de Variação de Medidas										
Ref. Vol.	Coxa (superior)		Coxa (mediana)		Coxa (inferior)		Perna (superior)		Perna (inferior)	
	D30	D60	D30	D60	D30	D60	D30	D60	D30	D60
1	100,2%	98,6%	100,0%	*95,2%	99,2%	*96,3%	98,9%	98,3%	100,4%	99,4%
2										
3										
4										
5	98,5%	*96,1%	98,1%	*96,4%	101,6%	*92,2%	*95,2%	*93,5%	98,9%	*96,9%
6										
7	101,0%	100,2%	99,3%	99,7%	*96,2%	*95,3%	100,7%	99,0%	*92,6%	*92,0%
8	*97,1%	*96,6%	*96,0%	*97,1%	*96,7%	99,2%	*96,3%	*97,2%	98,8%	98,0%
9	99,3%	*97,3%	100,3%	*96,3%	102,3%	*96,8%	99,0%	*96,7%	101,4%	99,2%
10										
11	*95,6%	*96,9%	*97,7%	*96,0%	*97,0%	*96,2%	*97,2%	98,2%	99,1%	*97,8%
12										
13										
14										
15										
16										
17	*97,3%	*96,1%	*97,2%	99,3%	*95,9%	*94,7%	*96,9%	98,8%	100,1%	100,0%
18	100,9%	103,8%	100,1%	99,3%	*96,1%	103,1%	99,0%	101,8%	99,3%	104,4%
19	98,1%	*98,0%	98,2%	*96,9%	99,3%	98,5%	99,8%	102,2%	99,2%	99,9%
20	98,7%	99,5%	101,4%	100,4%	99,0%	*96,7%	98,6%	98,5%	100,0%	98,6%
21	*96,9%	*96,5%	*96,3%	*95,1%	98,9%	*97,5%	99,7%	98,1%	99,8%	99,0%
22	99,4%	99,4%	98,4%	*94,7%	98,7%	*96,9%	*97,6%	98,8%	99,7%	101,5%
23	100,3%	98,3%	98,9%	99,6%	101,4%	100,1%	100,1%	*96,3%	100,0%	*97,2%
24	99,8%	99,5%	101,2%	101,4%	100,7%	101,8%	99,3%	*97,2%	99,1%	*97,4%
25	*97,4%	*96,0%	99,5%	99,0%	99,8%	99,5%	100,3%	99,0%	99,7%	99,2%
26	100,8%	102,7%	100,3%	101,0%	99,5%	100,3%	99,9%	98,6%	99,6%	99,1%
27										
28	*96,9%	*94,4%	*90,7%	*89,9%	99,7%	98,7%	103,7%	103,3%	101,4%	99,4%
29	100,1%	*95,9%	98,2%	*93,5%	*97,4%	*94,0%	101,9%	100,6%	99,8%	96,2%
Média	98,8%	98,1%	98,4%	97,3%	98,9%	97,6%	99,1%	98,7%	99,4%	98,6%
Desv. Pad.	0,016	0,025	0,025	0,030	0,020	0,028	0,020	0,023	0,019	0,025
%Vol. Reativos*	33%	56%	28%	56%	33%	56%	28%	28%	6%	28%

MEDIDAS DA ESPESSURA DA HIPODERME

Ref.	Média dos valores								
	Braço			Abdômen			Coxa		
	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60
1	0,52	0,55	0,71	2,63	2,39	2,59	3,28	2,67	2,97
2	0,30	0,00	0,00	1,053333	0,00	0,00	1,926667	0,00	0,00
3	0,53	0,00	0,00	3,486667	0,00	0,00	2,456667	0,00	0,00
4	1,30	0,00	0,00	4,343333	0,00	0,00	4,176667	0,00	0,00
5	0,83	0,86	0,68	4,40	4,18	3,80	3,57	3,15	3,15
6	0,79	0,00	0,00	3,666667	0,00	0,00	2,43	0,00	0,00
7	0,61	0,34	0,35	2,31	2,18	2,38	2,96	2,77	2,71
8	0,73	1,14	1,06	5,33	4,94	4,19	3,34	4,80	4,48
9	0,48	0,50	0,51	2,90	2,82	2,76	2,79	2,28	2,61
10	0,35	0,00	0,00	1,77	0,00	0,00	1,95	0,00	0,00
11	1,08	0,92	2,07	3,13	2,69	3,12	4,13	3,49	3,78
12	0,48	0,00	0,00	4,08	0,00	0,00	4,88	0,00	0,00
13	0,27	0,00	0,00	1,08	0,00	0,00	2,96	0,00	0,00
14	0,36	0,00	0,00	3,36	0,00	0,00	3,28	0,00	0,00
15	0,39	0,45	0,00	3,82	3,97	0,00	2,96	2,98	0,00
16	0,57	0,00	0,00	3,27	0,00	0,00	3,58	0,00	0,00
17	0,68	0,85	0,00	2,88	2,82	0,00	3,35	3,25	0,00
18	0,31	0,55	0,37	1,38	1,49	1,43	3,04	3,27	2,90
19	0,30	0,37	0,64	2,12	2,38	2,04	2,92	3,12	2,92

Ref.	Média dos valores								
	Braço			Abdômen			Coxa		
	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60
20	1,28	0,87	1,11	4,74	4,18	4,98	4,10	3,85	3,95
21	0,67	0,47	0,78	2,71	2,63	2,59	2,39	2,26	2,55
22	0,45	0,66	0,66	2,23	2,25	2,10	2,71	3,48	3,23
23	0,63	1,05	0,65	5,15	4,91	4,75	4,56	4,60	4,28
24	0,66	0,42	0,44	3,19	3,02	2,98	2,98	2,75	2,92
25	0,59	0,31	0,30	2,49	2,29	2,26	3,52	2,93	2,77
26	1,21	0,60	0,76	3,06	3,24	3,12	2,13	2,06	2,95
27	0,80	0,00	0,00	3,13	0,00	0,00	3,27	0,00	0,00
28	0,40	0,59	0,47	3,87	3,83	3,93	2,88	2,64	2,80
29	0,70	0,44	0,66	3,38	2,94	3,16	3,61	3,85	3,36

Legenda:

Desistência

Exclusão

MEDIDAS DA ESPESSURA DA HIPODERME

Porcentagem de Variação de Medidas						
Ref. Vol.	Braço		Abdômen		Coxa	
	D30	D60	D30	D60	D30	D60
1	105,8%	136,8%	*90,6%	98,5%	*81,5%	*90,7%
2	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/	/	/
4	/	/	/	/	/	/
5	103,6%	*82,3%	*95,1%	*86,3%	*88,1%	*88,2%
6	/	/	/	/	/	/
7	*56,0%	*57,1%	*94,2%	103,2%	*93,6%	*91,4%
8	157,3%	145,4%	*92,6%	*78,5%	143,8%	134,1%
9	104,9%	107,7%	*97,1%	*95,2%	*81,6%	*93,7%
10	/	/	/	/	/	/
11	*84,9%	190,8%	*85,9%	99,8%	*84,5%	*91,4%
12	/	/	/	/	/	/
13	/	/	/	/	/	/
14	/	/	/	/	/	/
15	/	/	/	/	/	/
16	/	/	/	/	/	/
17	/	/	/	/	/	/
18	178,5%	120,4%	108,2%	103,4%	107,6%	*95,5%
19	120,9%	209,9%	112,3%	*96,4%	107,0%	100,0%
20	*67,5%	*86,2%	*88,3%	105,2%	*93,9%	*96,5%
21	*71,0%	116,5%	*96,8%	*95,3%	*94,4%	106,4%
22	147,0%	147,0%	100,9%	*94,3%	128,5%	119,2%
23	166,1%	103,2%	*95,4%	*92,3%	100,9%	*93,8%
24	*63,5%	*67,5%	*94,6%	*93,4%	*92,1%	*97,9%
25	*52,3%	*51,1%	*91,7%	*90,6%	*83,2%	*78,6%
26	*50,0%	*63,3%	105,7%	101,7%	*96,9%	138,9%
27	/	/	/	/	/	/
28	147,5%	117,5%	99,0%	101,6%	*91,6%	*97,2%
29	*62,7%	*94,7%	*87,0%	*93,5%	106,6%	*93,0%
Média	102,3%	111,6%	96,2%	95,8%	98,6%	100,4%
Desv. Pad.	0,435	0,446	0,073	0,068	0,167	0,160
%Vol. Reativos*	47%	41%	71%	59%	65%	71%

Legenda:

 Desistência

 Exclusão

* Vol. Reativos são aqueles onde foi observada redução superior a 2%

MEDIDAS DA GORDURA CORPORAL

Ref.	Média dos valores											
	Triceps			Abdominal			Supra ilíaca			Supra espinal		
	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60
1	28,5	26,0	25,5	20,1	16,9	17,0	25,7	19,9	22,0	13,9	13,5	11,5
2	15,5	15,5	0,0	9,0	9,0	0,0	12,0	11,1	0,0	4,0	4,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	28,0	0,0	0,0	28,0	0,0	0,0	24,9	0,0	0,0	20,8	0,0	0,0
5	26,1	24,9	27,6	26,1	27,2	25,1	29,9	28,0	27,4	25,8	23,2	28,1
6	19,1	0,0	0,0	29,0	0,0	0,0	24,9	0,0	0,0	13,9	0,0	0,0
7	24,0	23,1	24,9	16,0	15,9	15,4	16,5	16,6	14,4	6,9	7,5	7,0
8	31,9	31,0	29,0	25,2	24,4	25,0	25,4	26,3	28,1	22,2	20,1	24,7
9	21,9	19,5	19,4	18,8	18,5	18,6	18,0	16,8	17,4	13,0	13,9	11,5
10	12,4	0,0	0,0	12,6	0,0	0,0	10,6	0,0	0,0	6,5	0,0	0,0
11	31,8	29,5	29,0	22,4	20,4	20,5	26,0	18,5	20,5	17,8	18,4	15,5
12	25,5	0,0	0,0	39,0	0,0	0,0	30,0	0,0	0,0	20,9	0,0	0,0
13	20,8	0,0	0,0	25,9	0,0	0,0	22,2	0,0	0,0	14,4	0,0	0,0
14	21,5	0,0	0,0	25,2	0,0	0,0	26,3	0,0	0,0	12,1	0,0	0,0
15	20,4	0,0	0,0	24,5	0,0	0,0	17,5	0,0	0,0	9,9	0,0	0,0
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17	24,9	24,8	23,5	16,0	15,1	14,9	16,2	16,0	14,1	13,0	11,8	12,1
18	16,2	16,4	18,1	11,7	12,5	12,5	11,5	10,6	11,8	6,9	6,9	6,5
19	16,0	14,9	14,4	21,6	21,8	22,5	16,0	14,7	15,3	9,5	9,1	9,5

Ref.	Média dos valores											
	Triceps			Abdominal			Supra ilíaca			Supra espinal		
	Vol.	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30
20	26,1	26,1	24,0	27,4	27,1	26,0	25,4	25,0	23,5	18,2	19,5	16,4
21	20,0	17,9	18,0	22,1	21,9	24,0	24,0	21,8	23,0	13,0	11,4	11,8
22	18,5	19,0	19,1	17,8	19,5	20,0	20,9	20,3	23,3	15,9	18,0	19,3
23	33,0	31,0	27,5	24,0	24,0	23,8	29,0	31,1	28,7	16,4	16,5	13,2
24	18,3	18,0	18,6	28,1	28,1	27,0	31,0	29,9	28,2	12,9	13,0	12,0
25	20,9	19,7	18,5	25,1	20,1	20,4	20,5	20,5	18,2	12,5	9,1	12,0
26	29,0	30,0	30,3	24,9	26,1	25,5	25,3	24,9	24,6	19,0	18,2	16,8
27	30,2	0,0	0,0	27,1	0,0	0,0	25,5	0,0	0,0	15,1	0,0	0,0
28	22,4	23,3	20,4	20,0	18,9	18,4	17,2	21,1	18,7	10,5	10,0	10,4
29	20,4	19,0	19,2	20,1	22,0	19,3	18,2	16,4	17,0	18,1	13,4	15,0

Legenda:

 Desistência	 Exclusão
---	--

MEDIDAS DA GORDURA CORPORAL

Ref.	Média dos valores								
	Coxa lateral			Coxa medial			Coxa proximal		
	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60
1	28,4	25,6	26,2	24,5	26,1	26,1	25,0	25,7	26,4
2	22,0	29,0	0,0	22,4	23,6	0,0	22,0	21,8	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	38,0	0,0	0,0	40,5	0,0	0,0	37,8	0,0	0,0
5	33,2	40,0	40,7	28,3	30,9	29,3	24,1	27,9	21,7
6	32,0	0,0	0,0	12,1	0,0	0,0	16,1	0,0	0,0
7	27,2	33,5	31,4	26,8	29,1	31,9	21,1	22,0	22,9
8	53,7	48,9	49,2	37,9	39,4	38,6	37,0	36,1	40,1
9	26,5	24,9	29,0	20,9	21,9	19,4	18,0	17,5	15,0
10	17,2	0,0	0,0	16,1	0,0	0,0	15,7	0,0	0,0
11	38,2	42,0	38,4	40,1	39,5	35,9	32,3	37,0	32,0
12	41,9	0,0	0,0	27,9	0,0	0,0	28,8	0,0	0,0
13	35,6	0,0	0,0	25,1	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0
14	33,3	0,0	0,0	24,5	0,0	0,0	26,4	0,0	0,0
15	24,5	0,0	0,0	22,2	0,0	0,0	21,7	0,0	0,0
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17	34,0	32,1	39,1	27,8	30,2	29,9	28,9	27,6	24,9
18	30,4	31,8	38,2	26,9	24,6	25,9	23,6	26,9	25,1
19	32,5	32,0	38,0	20,3	21,9	20,9	16,1	17,1	17,2

Ref.	Média dos valores								
	Coxa lateral			Coxa medial			Coxa proximal		
	D1	D30	D60	D1	D30	D60	D1	D30	D60
20	42,5	41,0	42,8	35,4	34,8	33,5	31,1	30,9	27,5
21	23,9	26,5	32,2	16,1	17,9	16,2	11,3	11,9	10,2
22	31,9	32,1	34,9	24,0	26,3	26,1	23,4	22,0	20,5
23	42,2	38,3	40,1	36,0	41,4	38,5	24,9	24,2	25,2
24	31,0	30,3	29,0	18,3	18,7	19,1	18,5	18,5	16,2
25	39,6	37,9	36,5	22,3	17,7	17,5	26,3	23,9	24,5
26	40,0	42,4	41,7	32,8	34,0	32,7	36,4	37,9	35,2
27	41,0	0,0	0,0	32,9	0,0	0,0	32,5	0,0	0,0
28	38,5	32,2	30,8	23,4	24,9	22,2	24,6	23,2	22,6
29	36,5	31,1	28,3	30,1	31,4	28,1	28,2	32,5	26,0

Legenda:

Desistência

Exclusão

MEDIDAS DA GORDURA CORPORAL

Porcentagem de Variação de Medidas								
Ref. Vol.	Triceps		Abdominal		Supra-iliaca		Supra-espinal	
	D30	D60	D30	D60	D30	D60	D30	D60
1	*91,3%	*89,5%	*83,8%	*84,4%	*77,3%	*85,5%	*96,9%	*82,5%
2	/	/	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/	/	/	/	/
4	/	/	/	/	/	/	/	/
5	*95,4%	105,7%	104,2%	*96,2%	*93,8%	*91,6%	*90,0%	109,2%
6	/	/	/	/	/	/	/	/
7	*96,3%	103,7%	99,6%	*96,7%	101,0%	*87,7%	107,7%	101,0%
8	*97,1%	*90,7%	*97,0%	99,2%	103,5%	110,4%	*90,6%	111,1%
9	*89,0%	*88,7%	98,4%	98,9%	*93,5%	*96,5%	107,5%	*88,9%
10	/	/	/	/	/	/	/	/
11	*93,0%	*91,3%	*90,9%	*91,2%	*71,0%	*78,7%	103,8%	*87,2%
12	/	/	/	/	/	/	/	/
13	/	/	/	/	/	/	/	/
14	/	/	/	/	/	/	/	/
15	/	/	/	/	/	/	/	/
16	/	/	/	/	/	/	/	/
17	99,6%	*94,1%	*94,4%	*93,1%	98,4%	*86,9%	*90,8%	*92,8%
18	101,2%	111,9%	106,8%	106,8%	*92,2%	102,9%	99,5%	*93,8%
19	*92,9%	*90,2%	100,8%	104,0%	*91,9%	*96,0%	*96,1%	100,0%
20	99,9%	*92,1%	98,8%	*94,9%	98,4%	*92,7%	106,8%	*89,9%
21	*89,5%	*89,8%	99,2%	108,6%	*90,7%	*95,8%	*87,7%	*90,3%
22	102,7%	103,4%	109,6%	112,4%	*97,0%	111,1%	113,2%	121,4%
23	*93,8%	*83,4%	99,9%	99,0%	107,0%	98,9%	100,2%	*80,5%
24	*98,5%	101,8%	100,0%	*96,2%	*96,3%	*90,9%	101,3%	*93,5%
25	*94,3%	*88,6%	*80,1%	*81,4%	99,8%	*88,6%	*72,7%	*96,3%
26	103,3%	104,4%	104,7%	102,1%	98,6%	*97,4%	*96,0%	*88,2%
27	/	/	/	/	/	/	/	/
28	104,0%	*91,1%	*94,5%	*92,2%	122,5%	108,5%	*95,2%	99,4%
29	*93,0%	*94,0%	109,3%	*95,7%	*90,3%	*93,2%	*74,2%	*83,0%
Média	96,4%	95,3%	98,4%	97,4%	95,7%	95,2%	96,1%	94,9%
Desv. Pad.	0,047	0,078	0,078	0,078	0,109	0,088	0,108	0,107
%Vol. Reativos*	67%	67%	33%	56%	56%	72%	56%	67%

MEDIDAS DA GORDURA CORPORAL

Porcentagem de Variação de Medidas								
Ref. Vol.	Supra-espinal		Coxa lateral		Coxa medial		Coxa proximal	
	D30	D60	D30	D60	D30	D60	D30	D60
1	*96,9%	*82,5%	*90,2%	*92,3%	106,4%	106,3%	102,8%	105,5%
2								
3								
4								
5	*90,0%	109,2%	120,6%	122,8%	109,1%	103,5%	115,7%	*89,9%
6								
7	107,7%	101,0%	123,2%	115,6%	108,6%	119,2%	104,3%	108,5%
8	*90,6%	111,1%	*91,2%	*91,6%	103,8%	101,7%	*97,5%	108,2%
9	107,5%	*88,9%	*94,0%	109,4%	104,9%	*92,7%	*97,2%	*83,2%
10								
11	103,8%	*87,2%	110,0%	100,5%	98,6%	*89,6%	114,7%	99,2%
12								
13								
14								
15								
16								
17	*90,8%	*92,8%	*94,4%	115,1%	108,6%	107,8%	*95,7%	*86,4%
18	99,5%	*93,8%	104,5%	125,5%	*91,6%	*96,3%	114,0%	106,2%
19	*96,1%	100,0%	98,6%	117,0%	108,2%	103,1%	106,0%	106,0%
20	106,8%	*89,9%	*96,5%	100,9%	98,4%	*94,6%	99,5%	*88,5%
21	*87,7%	*90,3%	110,7%	134,4%	110,7%	100,6%	105,3%	*90,6%
22	113,2%	121,4%	100,6%	109,5%	109,4%	108,9%	*94,3%	*87,7%
23	100,2%	*80,5%	*90,9%	*95,0%	115,0%	107,0%	*97,1%	101,1%
24	101,3%	*93,5%	*97,8%	*93,7%	102,2%	104,6%	99,6%	*87,4%
25	*72,7%	*96,3%	*95,5%	*92,1%	*79,4%	*78,2%	*90,9%	*93,0%
26	*96,0%	*88,2%	106,0%	104,3%	103,7%	99,7%	104,3%	*96,9%
27								
28	*95,2%	99,4%	*83,6%	*80,0%	106,4%	*94,9%	*94,4%	*91,9%
29	*74,2%	*83,0%	*85,3%	*77,6%	104,3%	*93,1%	115,4%	*92,4%
Média	96,1%	94,9%	99,7%	104,3%	103,9%	100,1%	102,7%	95,7%
Desv. Pad.	0,1078794	0,1069478	0,1105534	0,1561022	0,0811066	0,0905225	0,0789625	0,0842839
Vol. Reativos*	56%	67%	56%	39%	11%	39%	39%	61%

PESO DOS VOLUNTÁRIOS**Pesagem e IMC – D1**

Ref. Vol.	Peso	Altura	IMC
1	58,7	1,60	22,93
2	51,2	1,63	19,27
3			
4	75,7	1,63	28,49
5	70,1	1,55	29,18
6	58,2	1,54	24,54
7	53,4	1,56	21,94
8	87,0	1,72	29,41
9	44,8	1,50	19,91
10	50,0	1,60	19,53
11	59,0	1,58	23,63
12	71,5	1,75	23,35
13	/	/	/
14	60,4	1,61	23,30
15	61,0	1,61	23,53
16	60,0	1,61	23,15
17	49,5	1,49	22,30
18	50,0	1,59	19,78
19	58,8	1,62	22,41
20	78,7	1,64	29,26
21	52,0	1,57	21,10
22	67,8	1,60	26,48
23	67,4	1,53	28,79
24	66,5	1,60	25,98
25	58,3	1,60	22,77
26	60,8	1,50	27,02

Pesagem e IMC – D1			
Ref. Vol.	Peso	Altura	IMC
27	68,0	1,70	23,53
28	65,3	1,63	24,58
29	62,2	1,56	25,56

Legenda:

 Desistência

 Exclusão

PESO DOS VOLUNTÁRIOS**Pesagem e IMC – D30**

Ref. Vol.	Peso	Altura	IMC
1	58,2	1,60	22,73
2	52,3	1,63	19,68
3	/	/	/
4	/	/	/
5	69,9	1,55	20,09
6	/	/	/
7	54,4	1,56	22,35
8	87,5	1,72	29,58
9	45,3	1,50	20,13
10	/	/	/
11	56,3	1,58	22,55
12	/	/	/
13	/	/	/
14	/	/	/
15	62,6	1,61	24,15
16	/	/	/
17	49,1	1,49	22,12
18	51,1	1,59	20,21
19	58,9	1,62	22,44
20	77,3	1,64	28,74
21	52,3	1,57	21,22
22	67,9	1,60	26,52
23	68,4	1,53	29,22
24	65,7	1,60	25,66
25	57,1	1,60	22,30
26	61,0	1,50	27,11

Pesagem e IMC – D30			
Ref. Vol.	Peso	Altura	IMC
27	/	/	/
28	65,8	1,63	24,76
29	65,2	1,56	26,79

Legenda:

 Desistência

 Exclusão

PESO DOS VOLUNTÁRIOS

Pesagem e IMC – D60

Ref. Vol.	Peso	Altura	IMC
1	58,6	1,60	22,89
2	/	1,63	/
3	/	/	/
4	/	/	/
5	69,9	1,55	29,09
6	/	/	/
7	54,3	1,56	22,31
8	88,3	1,72	29,85
9	45,0	1,50	20,00
10	/	/	/
11	57,6	1,58	23,07
12	/	/	/
13	/	/	/
14	/	/	/
15	/	1,61	/
16	/	/	/
17	48,4	1,49	21,80
18	50,2	1,59	19,86
19	60,0	1,62	22,86
20	78,3	1,64	29,11
21	51,9	1,57	21,06
22	68,4	1,60	26,72
23	67,6	1,53	28,88
24	67,3	1,60	26,29
25	56,2	1,60	21,95
26	61,8	1,50	27,47

PESO DOS VOLUNTÁRIOS

Pesagem e IMC – D60

Ref. Vol.	Peso	Altura	IMC
27	/	/	/
28	66,5	1,63	25,03
29	62,1	1,56	25,52

Legenda:

 Desistência

 Exclusão