

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

RAISSA HARUMI GOLIN

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DE
SISTEMAS LÍQUIDO-CRISTALINOS CONTENDO ÁCIDO
KÓJICO**

Araraquara

2014

RAISSA HARUMI GOLIN

Desenvolvimento e caracterização térmica de sistemas líquido-cristalinos contendo ácido kójico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof^a Dr^a Adélia Emília de Almeida

Araraquara

2014

Dedico este trabalho aos meus pais João e Helena, que transformaram os meus sonhos em possibilidades.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adélia Emília Almeida pela colaboração, dedicação e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela oportunidade de iniciação científica.

Aos meus familiares por todo o amor e apoio antes e durante estes anos de graduação. Sem eles nada seria possível.

Aos meus amigos de turma, por ter tornado momentos difíceis em aprendizados e por multiplicar momentos de alegrias, fazendo com que estes anos fossem menos exaustivos.

Às minhas colegas de república por ter sido meu lar em Araraquara, presente em todos os momentos dessa jornada, me ensinaram a ver o mundo de outra forma.

Às minhas veteranas, minhas melhores amigas, que sempre tiveram e terão minha admiração e respeito, pela sabedoria, conselhos e amizade.

Ao Renato, meu namorado e melhor amigo, pela participação direta e indireta neste trabalho, me apoiando e me motivando em todos os momentos.

Aos docentes e estudantes da Universidade de Santiago de Compostela, pela experiência de intercâmbio e por todo aprendizado. Vivi momentos inesquecíveis.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por todo conhecimento e auxílios.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. MATERIAL.....	19
3.2 EQUIPAMENTOS	19
3.3. MÉTODOS	19
3.3.1. SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES	19
3.3.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES	20
3.3.3. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.....	21
3.3.4. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	22
3.3.5. TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	23
4.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	23
4.3. TERMOGRAVIMETRIA (TG)	28
5. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

RESUMO

O Ácido Kójico (AK) é uma substância produzida por cepas de *Aspergillus sp.* Foi isolado pela primeira vez em 1907, através do estudo feito a partir do crescimento desse fungo em arroz cozido a vapor. É usado na cosmetologia como antioxidante e despigmentante para uso tópico. Atua como um potente antioxidante quelando íons de ferro e os íons de cobre presentes no seu sítio ativo da tirosinase impedindo a formação de melanina. O isononanoato de cetosteárida, utilizado na formulação, tem ampla utilização em cosméticos como cremes protetores de epiderme, cremes de maquiagens, cremes de proteção solar, loções e desodorantes por ser emoliente, não possuir cheiro e toque seco. Os sistemas nanoestruturados, como por exemplo, os sistemas líquido-cristalinos aumentam a solubilidade dos princípios ativos incorporados ao sistema e aumentam a solubilidade dos princípios ativos incorporados ao sistema e aumentam a estabilidade e diminuem a toxicidade, pois agem como reservatórios e dependendo da interação fármaco-sistema, altera a biodisponibilidade. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema líquido cristalino constituído por água e isononanoato de cetosteárida (óleo), e estabilizado com o tensoativo álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo ácido kójico avaliando sua estabilidade através de estudos de termoanálises.

ABSTRACT

The Kojic Acid (AK) is a substance produced by strains of *Aspergillus sp* and it was first isolated in 1907. It is used in cosmetology as an antioxidant and skin lightener. It acts chelating copper ions present in the active site of tyrosinase, what prevents the formation of melanin. The nanostructured systems and liquid crystalline systems, when an active principle is incorporated, increase the solubility and stability of the drug, because they act as reservoirs, decreasing toxicity, and, depending on the drug-interaction system, alters the bioavailability. This study aims to develop and characterize a crystalline liquid system consisting of water and isononanoate cetoestearila (oil), and stabilized with surfactant cetyl alcohol ethoxylated and propoxylated containing kojic acid, evaluating its stability through thermal analysis studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido kójico. (USP, 2012).....	13
Figura 2. Sítio ativo da tirosinase. Fonte: DURAN et al (2002).	14
Figura 3. Síntese de feomelanina e eumelanina.	15
Figura 4. Curva DSC de Procetyl, Isoleron e ácido kójico	23
Figura 5. Curvas DSC: Cristais líquidos (A) e mistura física dos componentes (B)...	24
Figura 6. Curvas DSC: Cristais líquidos (C) e mistura física dos componentes (D)...	26
Figura 7. Curvas de TG, DTG e DTA	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações, em %, dos componentes das formulações.....	20
Tabela 2. Concentrações, em %, dos componentes das formulações.....	21
Tabela 3. Dados da curva de DSC.....	24
Tabela 4. Dados das curvas DSC dos cristais líquidos e das misturas físicas contendo ácido kójico	25
Tabela 5. Dados das curvas DSC dos cristais líquidos e das misturas físicas.....	26
Tabela 6. Valores de entalpia esperado e verificado das formulações	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AK – Ácido Kójico;

DOPA – 3,4-diidroxifenilalanina;

CLs – cristais líquidos;

CLT – Cristal líquido termotrópico;

CLL – Cristal líquido liotrópico;

ICTAC – Confederação Internacional de Análises Térmica e Calorimetria

DSC – Differential Scanning Calorimetry (calorimetria exploratória diferencial);

TG – Termogravimetria;

DTG – Derivative thermogravimetry (termogravimetria derivada);

DTA – Differential thermal analysis (análise térmica diferencial);

m – massa;

O – Fase oleosa (Isoleron[®]);

T – Tensoativo (Procetyl[®]);

A – Água purificada;

MLP – microscopia de luz polarizada;

T/O – tensoativo em óleo;

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, países do Terceiro Mundo, tal como Brasil, vem passando por um processo de envelhecimento populacional. Em meados dos anos 50 a expectativa de vida era em torno dos 33,7 anos e estima-se que, entre 2020 e 2025, deverá alcançar 77,8 anos. Esse aumento na expectativa de vida se deve às descobertas da medicina visando prevenção de doenças e promoção de hábitos saudáveis, tais como alimentação balanceada e qualidade de vida e à diminuição da taxa de natalidade (COSTA et al, 2012).

Com isso a população idosa tem se tornado um grande público alvo no mercado de beleza. Atrofia, enrugamento, ptose e lassidão estão entre os sinais mais aparentes da pele idosa. Esses processos são ocasionados tanto por fatores extrínsecos, tais como a exposição a raios ultravioletas e poluição, quanto por fatores intrínsecos, como alterações nas camadas internas da derme (ORÍÁ et al, 2003).

Estruturalmente a pele é dividida em duas camadas: epiderme (mais superficial) e derme. A derme está localizada abaixo da camada germinativa da epiderme, servindo como base desta. A derme é rica em fibras, vasos linfáticos e nervos. É separada em duas partes: camada papilar e reticular. A camada papilar é constituída de tecido conjuntivo frouxo. A camada reticular é responsável pela síntese de colágeno e elastina, já que esta camada é rica de fibroblastos. Tanto a camada papilar quanto a reticular mantêm a função de elasticidade da pele, pois são constituídas de fibras elásticas. A epiderme é ainda dividida em outras camadas: o estrato basal ou germinativo, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo. Através de uma intensa atividade mitótica, a camada basal garante a renovação contínua da epiderme. Estão presentes nessa camada os queratinócitos, melanócitos e células de Merkel. O estrato espinhoso

está acima da camada basal e suas células poliédricas estão unidas por desmossomos e interdigitações, contribuindo para a resistência da epiderme ao atrito. As células mais facilmente encontradas nessa camada são as células de Langerhans. No estrato granuloso, além de ocorrer a queratização, os queratinócitos sintetizam a acilglicosilceramida, que cimenta as células formando uma barreira impermeável a água, evitando a desidratação. A camada mais superficial é o estrato córneo, essa camada possui células sem núcleo, achatadas e mortas que protegem contra substâncias do meio externo e também da perda de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Assim como outros órgãos, a pele sofre envelhecimento por alterações celulares e moleculares, mas, por ser um órgão exposto às diversas agressões ambientais, acaba sofrendo um dano maior em relação aos demais órgãos. Fatores ambientais como a exposição ao sol e à poluição e o uso de cigarro são alguns dos principais danos extrínsecos.

O envelhecimento cutâneo é um processo natural e fisiológico, presente desde o nascimento. Hábitos pessoais e a genética influenciam na intensidade do envelhecimento, o qual torna-se mais evidente após os 30 anos de idade. (GUIRRO; GUIRRO, 2004).

Visualmente, o envelhecimento é caracterizado pelo aparecimento de linhas de expressões, sulcos, rugas, atrofia muscular, ressecamento, flacidez, espessura da cútis, hiper e hipopigmentação (FATTACIOLO, 2001).

O maior responsável pelas agressões na pele é a exposição à luz solar compreendida pelos raios UVA, UVB e UVC. Os altos índices de radiação solar aceleram o envelhecimento cutâneo, culminando no aparecimento de rugas, manchas e até câncer de pele (STEINER, 1995).

A formação de radicais livres é agravada após a exposição ao sol, que acelera ainda mais o envelhecimento. Os radicais livres são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo, implicando em instabilidade energética e cinética a qual gera uma cascata de reações, podendo ocasionar a morte celular. Agentes quelantes de íons metálicos, vitaminas e enzimas são proteções naturais do corpo contra essas espécies químicas, mas esse mecanismo vai se tornando menos eficiente com o envelhecimento do tecido. (HIRATA et al, 2004).

A formação de radicais livres, a exposição ao sol, a idade, a genética e distúrbios hormonais podem colaborar também para o desenvolvimento de manchas na pele. Estas manchas são conhecidas como discromias. As discromias são alterações patológicas da melanina na pele, podendo ser manchas claras (hipopigmentação) e escuras (hiperpigmentação). (TEIXEIRA et al, 2012).

Uma doença muito comum caracterizada pela produção irregular de melanina da pele é o melasma, que acomete até 75% das mulheres grávidas. Devido a alterações hormonais ocorridas durante a gestação e a exposição à luz solar, a pele se torna mais sensível e vulnerável ao aparecimento dessas manchas. Além da gestação, uso de anticoncepcionais orais, fatores genéticos e raciais, exposições solares podem ser também responsáveis pelo desenvolvimento da hiperpigmentação. Mulheres entre 20 e 50 anos e com pele mais pigmentadas são também afetadas por essa patologia. (ALVES et al, 2005; PURIM, AVELAR, 2012).

A melanina é um pigmento de origem orgânica que costuma estar no interior de grânulos. Sua coloração varia de amarelado até negro, não é solúvel em água ou em líquidos orgânicos, mas é solúvel em álcalis e soluções ácidas. (ROMAGUERA LLACH, 1947).

O Ácido Kójico

O ácido kójico (AK) é um composto amplamente utilizado na indústria de cosméticos a fim de diminuir manchas na pele. Foi isolado primeiramente pelo Dr. K.Saito a partir do fungo *Aspergillus oryzae* crescido em arroz cozido a vapor. O AK foi extraído através do pó fino formado pelo fungo, sendo primeiramente extraído com água quente e em seguida com éter e pelo processo de recristalização o AK foi obtido em formato de agulhas incolores. (SMITS; BARHAM, 1934).

Prosseguindo os estudos do Dr.K. Saito, T. Yabuta, através da preparação de vários derivados, conseguiu estabelecer a fórmula molecular da nova substância como $C_{12}H_{14}O_8$, e a nomeou de AK, devido à natureza ácida e ao nome do fungo *A. oryzae* ser conhecido como koji. (SMITS; BARHAM, 1934).

Yabuta constatou que mesmo a uma diluição de 1 : 200.000, o AK reagia com uma solução de cloreto férrico dando uma coloração cor de vinho tinto, sendo facilmente reconhecido. Observou também que o ácido era produzido por algumas espécies de *Aspergillus*. Com estudos químicos mais aprofundados alterou a fórmula molecular para $C_6H_6O_4$. (BIRKINSHAW et al,1931).

Em 1924, concluiu a fórmula estrutural do AK (Figura 1):

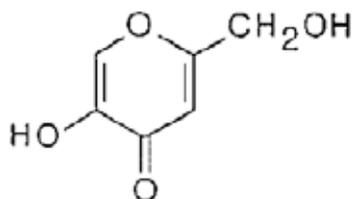


Figura 1. Fórmula estrutural do AK. (USP, 2012)

Seu nome químico é 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona; 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona ou 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirano. Possui massa molar de 142,11 g/mol e possui faixa de fusão entre 153 - 154°C. É muito solúvel em água, etanol e acetona; moderadamente solúvel em éter, acetato de etila, clorofórmio e piridina. (MERCK INDEX, 2006).

O AK, além da sua ação antimicrobiana, atua como quelante de íons cobre, inibindo a tirosinase no seu sítio ativo (figura 2), o que impede a formação de melanina. (DURAN et al, 2002).

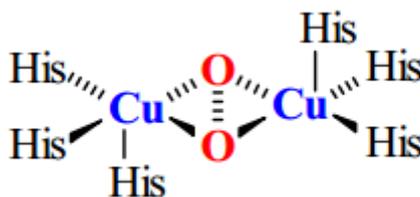


Figura 2. Sítio ativo da tirosinase. Fonte: DURAN et al (2002).

A síntese da melanina pelos melanócitos é regulada pela tirosinase que hidroxila a tirosina formando a 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) a qual é oxidada pela tirosina formando a DOPAquinona que por fim levará a formação dos pigmentos feo e eumalanina (Figura 3). Com a enzima tirosinase inibida, a cascata é impedida, não havendo a produção dos pigmentos da pele. (ROCHA; MOREIRA, 2007)

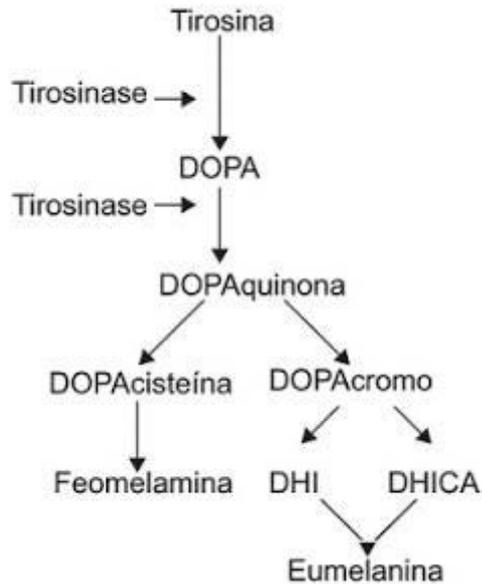


Figura 3. Síntese de feomelanina e eumelanina.

Cristal Líquido (CL)

O CL apresenta aderência à pele e, portanto, irá ter maior tempo de ação na pele, e, portanto o AK incorporado a esse sistema permanecerá um maior tempo em contato com a pele apresentando maior tempo de ação na pele, obtendo maior sucesso na despigmentação de manchas e também prevenindo o envelhecimento, já que o AK possui propriedades antioxidantes. (DUNFORD, 1987; PUPPO; HALLIWELL, 1988).

O CL é um fluido que possui anisotropia óptica elétrica e magnética semelhante ao sólido cristalino e propriedades mecânicas de um líquido isotrópico. O sólido cristalino possui suas moléculas organizadas espacialmente em posições bem definidas, chamadas de ordem posicional de longo alcance, enquanto o líquido isotrópico não possui essa característica, isto é, sua organização não depende de direção e sentido. (GRAY; WILSON, 1994 apud BECHTOLD, 2000). Essa característica intermediária de

sólido e líquido é também conhecido como mesofase (em grego *meso* significa intermediário).

Os CLs são classificados em dois grupos: termotrópicos e liotrópicos. Os cristais líquidos termotrópicos (CLT) têm seus parâmetros baseados principalmente na temperatura, e, com menor importância, na pressão. Os CLTs são muito utilizados na fabricação de dispositivos eletro-ópticos e sensores de temperatura e pressão. (BECHTOLD, 2005). Os cristais líquidos liotrópicos (CLL) são constituídos de pelo menos dois componentes: um orgânico, como um tensoativo, e um solvente, como a água. As moléculas orgânicas possuem um grupo hidrofílico (cabeça) e um grupo hidrofóbico (cauda). O solvente irá hidratar seletivamente a porção hidrofílica da molécula orgânica de modo que sua organização não fique com moléculas dispersas, descaracterizando o CLL (FORMARIZ et al, 2005). As principais fases observadas em CLL são lamelar, hexagonal e cúbica (IBRAHIM et al, 1993).

Ao incorporar o fármaco no CL, dependendo da sua solubilidade, poderá se situar na parte hidrofílica ou na lipofílica, ou em ambas, como também na bicamada do tensoativo da mesofase. (MULLER-GOYMANN; FRANK, 1986). A interação do fármaco com o sistema incorporado influencia no controle da liberação do fármaco em questão podendo ser usados como sistema de liberação controlada de fármacos. Além disso, auxiliam na absorção, solubilidade e controle da biodisponibilidade de fármacos. (FORMARIZ et al, 2005).

Formulações de CL necessitam de estabilidade em relação a diferentes temperaturas. Seus componentes devem ter boa compatibilidade, caso contrário à formulação perderia sua mesofase durante o período de estocagem levando à separação de fase. (Li ZHIBIN et al, 1998).

As análises térmicas

O termo *análises térmicas* foi originalmente proposta pela Confederação Internacional de Análises Térmicas e Calorimetria (ICTAC). (BROWN, 2001). Compreende um conjunto de técnicas que permitem avaliar as propriedades físicas de uma substância e/ou o produto da sua reação, enquanto é sujeito a um ambiente com temperatura controlada. Através das análises é possível avaliar a interação física e química do princípio ativo com o excipiente e a possível causa de interferência na estabilidade, biodisponibilidade, interferindo na eficácia e na segurança terapêutica. (MENDONÇA, 2014).

O uso de mais de uma técnica de análise térmica é aconselhável, a fim de assegurar os resultados, esclarecendo incertezas que a realização de apenas um teste poderia causar. Os métodos mais conhecidos de análises térmicas são Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC). (IONASHIRO, 2005).

Para análises de rotina, são comumente usadas as técnicas Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Análise Térmica Diferencial (DTA) por serem rápidos e necessitarem apenas de alguns miligramas de amostra. Em um único teste, várias informações quantitativas e qualitativas podem ser obtidas (GIRON; GOLDBRONN, 1997). A partir do resultado do TG, é possível determinar a Termogravimetria Derivada (DTG), que é a derivada primeira da variação da massa (m) em relação ao tempo (dm/dt) em função de tempo ou temperatura. Os picos representados nas curvas de DTG possuem área proporcional à variação de massa (MATOS et al, 2009). Segundo o ICTAC, a Análise Térmica Diferencial (DTA) é uma técnica na qual a diferença de temperatura entre a substância e o material de referência é medida em função da temperatura, enquanto são submetidos a

uma programação controlada de temperatura. É muito semelhante à análise de DSC e é usado para complementar o TG com as informações de transição vítrea.

O DSC possui duas zonas onde se posiciona um cadinho vazio e outro cadinho contendo a amostra, então é introduzido calor linearmente ou retirado e as duas zonas são monitoradas para se estudar a capacidade da amostra em absorver ou liberar calor.

O TG é principalmente aplicado em estudos de decomposição e combustão.

As técnicas de TG/DTG e DSC são utilizadas em estudos farmacêuticos para caracterização de matéria prima, pureza, compatibilidade com as formulações, identificação de polimorfismo, avaliação de estabilidade e decomposição térmica do fármaco e formulações farmacêutica. Através desse estudo é possível identificar fenômenos como transições vítreas, cristalização, fusão, decomposição térmica e até polimerização.

2. OBJETIVOS

Estudo do comportamento térmico de sistemas líquido-cristalinos contendo AK.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistemas líquido-cristalinos para incorporar AK;
- Analisar e caracterizar as formulações em microscopia de luz polarizada (MLP).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

- Ácido kójico (Chengdu Wonho);
- Iseleron® (Isonomanoato de cetoestearila) (MPR Indústria D);
- Procetyl® (Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP) AWS (Croda do Brasil);
- Água purificada (Milli-Q).

3.2 EQUIPAMENTOS

- Balança Analítica (SHIMADZU®);
- Microscópio de luz polarizada Jenamed 2 - Carl Zeiss Jena;
- DSC Mettler Toledo;
- SDT 2960 Simultaneous DTA-TGA.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As formulações contendo CL foram inicialmente selecionadas por Gonçalves (2012) a partir do diagrama de fases por ela desenvolvido. As formulações do diagrama continha diferentes porcentagens de Isoleron (O), Procetyl (T) e água, variando suas concentrações com as relações de T/O na faixa de 1:9 até 9:1 adicionando à mistura de T/O a água na proporção requerida. Os sistemas foram realizados por mistura direta dos

componentes aquecidos em banho termostático a 45° C com a utilização de bastão de vidro, para homogeneização. Depois de 24 horas, no mínimo, os sistemas formados foram analisados visualmente contra fundo escuro. Gonçalves selecionou as formulações mais indicadas para incorporação do ácido kójico, apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 1. Concentrações, em %, dos componentes das formulações

Amostras	Isoleron (%)	Procetyl (%)	Fase aquosa (%)
A	35	50	15
B	30	50	20
C	20	50	30

Fonte: GONÇALES, 2012, p. 39.

Com base nessas formulações, foram preparadas as amostras dessa pesquisa, conforme descritas a seguir.

3.3.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

As amostras foram preparadas em pequenos frascos de vidro transparente contendo tampa. Utilizando a balança semi-analítica foram pesadas diretamente no frasco quantidades adequadas de água purificada (A), Isoleron (O) e Procetyl (T) variando as proporções conforme a amostra a ser preparada e incorporando AK 2% a algumas e a outras não, de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Concentrações, em %, dos componentes das formulações

Grupos	Amostras	Fase oleosa (%)	Tensoativo (%)	Fase aquosa (%)	AK 2%
1	CL1	35	50	15	Não
	CL2	30	50	20	Não
	CL3	20	50	30	Não
2	CLAK1	35	50	15	Sim
	CLAK2	30	50	20	Sim
	CLAK3	20	50	30	Sim
3	MF1	35	50	15	Não
	MF2	30	50	20	Não
	MF3	20	50	30	Não
4	MFAK1	35	50	15	Sim
	MFAK2	30	50	20	Sim
	MFAK3	20	50	30	Sim

As amostras CL1, CL2, CL3 correspondem às mesmas de Gonzalez. As amostras CLAK1, CLAK2 e CLAK3 foram igualmente preparadas com banho termostático a 45°C, tendo sido incorporado o AK. As amostras MF1, MF2, MF3 e MFAK1, MFAK2, MFAK3 foram preparadas somente com as misturas físicas dos componentes, sendo que as amostras MFAK1, MFAK2 e MFAK3 tiveram também a incorporação de 2% AK à formulação.

3.3.3. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Uma pequena quantidade de cada formulação foi aplicada em uma lâmina de vidro coberta por uma lamínula e estudada em microscopia de luz polarizada (MLP). Foi avaliada a homogeneidade da dispersão e, com auxílio de polarização, observou-se ao microscópio a presença de áreas de anisotropia, indicativo da presença de cristal líquido. A análise foi feita em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.3.4. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas DSC foram obtidas utilizando o DSC Mettler Toledo com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50 \text{ ml}/\text{min}$ e massa da amostra de $3,0 \text{ mg}$. Utilizou a faixa de -80°C até 200°C .

Para a realização desse teste foram feitas análises das 12 amostras e também de todos os componentes individualmente.

Durante o experimento, a amostra pode sofrer mudanças físicas e químicas, tais como cristalização e fusão e reações de oxidação, caso a atmosfera não seja inerte, portanto o experimento foi realizado em atmosfera inerte.

3.3.5. TERMOGRAVIMETRIA (TG)

As curvas TG do AK foram registradas no aparelho TA Instruments SDT 2960 (simultaneous TG-DTA) com razão de aquecimento de $15^\circ\text{C}/\text{min}$, atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100 \text{ ml}/\text{min}$ e amostra contendo $5,0 \text{ mg}$.

O aparelho é composto de uma termobalança onde é colocada a amostra. Essa termobalança é uma associação de uma balança eletrônica precisa e um forno elétrico. Simultaneamente ao aquecimento, o aparelho mede a perda de massa da amostra. (ANVISA, 2010).

Na curva TG é possível verificar em qual temperatura se inicia e finaliza o processo de perda de massa, verificando a sua faixa de decomposição.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

As amostras foram analisadas após o período de 24 horas em MLP confirmando que as amostras são de mesofase hexagonal caracterizada pela presença de estrias.

4.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas DSC obtidas dos componentes estão apresentadas na figura 4.

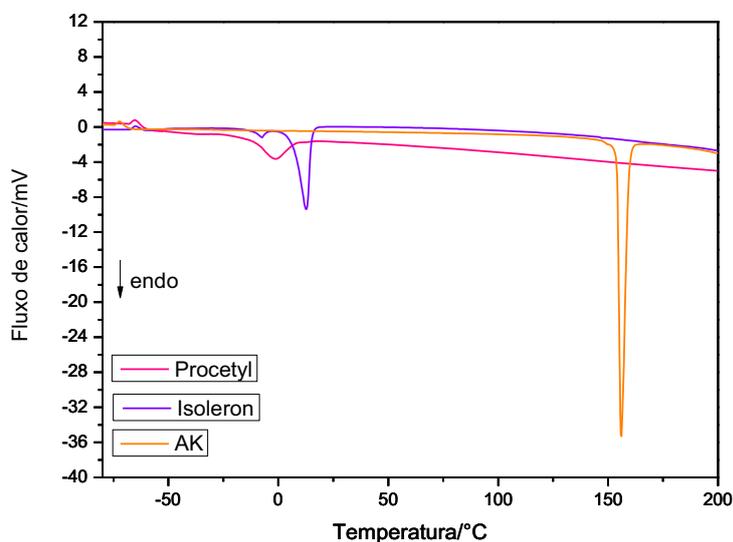


Figura 4. Curva DSC de Procetyl, Isoleron e AK, atmosfera de nitrogênio, 10°C/min, fluxo de gás de 50 mL/min, temperatura de -80° a 200°C.

Tabela 3. Dados da curva de DSC

Amostras	T _{onset} /°C	T _{peak} /°C	ΔH (J/g)
Procetyl	-13,3	-1,6	56,6
Isoleron	-16/1,4	-7,7/12,5	18,3/98,1
AK	147,5	156,2	219,9

A partir da curva de DSC podemos observar o comportamento individual dos componentes das formulações e do princípio ativo (AK). O Procetyl apresenta a menor temperatura de fusão, pois tem o pico a $-1,6^{\circ}\text{C}$. O Isoleron possui dois picos, sendo que o primeiro pico está a $-7,7^{\circ}\text{C}$ e o segundo está a $12,5^{\circ}\text{C}$, indicando a presença de polimorfismo. O ácido kójico possui a temperatura do ponto de fusão mais alta ocorrendo em $147,5^{\circ}\text{C}$.

As curvas obtidas através das misturas com aquecimento (A) e das misturas físicas (B) das três formulações com a incorporação de ácido kójico 2% estão apresentadas na Figura 5.

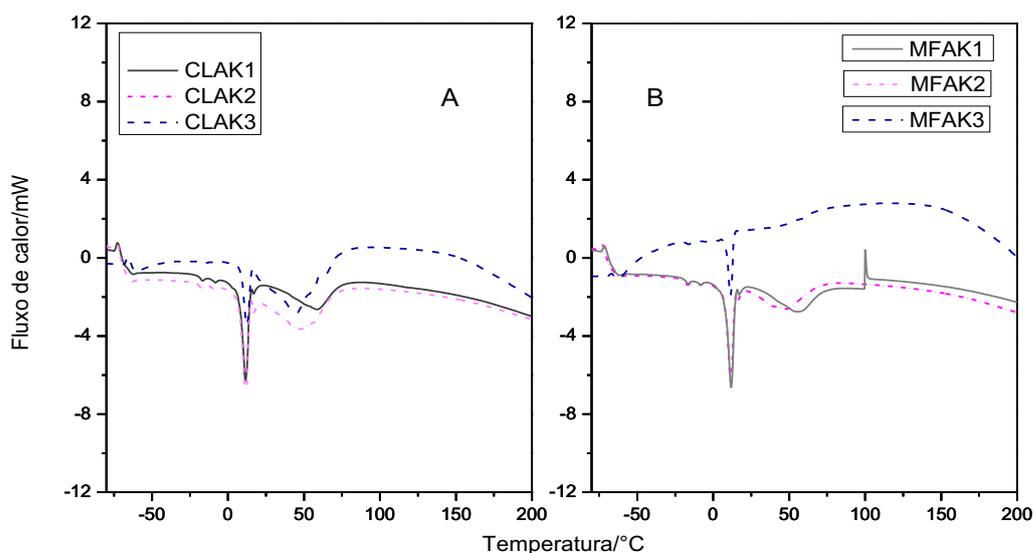


Figura 5. Curvas DSC: Cristais líquidos (A) e mistura física dos componentes (B), atmosfera de nitrogênio, $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, fluxo de gás de $50\text{ mL}/\text{min}$, temperatura de -80° a 200°C .

Tabela 4. Dados das curvas DSC dos cristais líquidos e das misturas físicas contendo ácido kójico

Amostras	T_{onset}/°C	T_{peak}/°C	ΔH (J/g)
CLAK1	0,4	11,5; 58,4	40,13
CLAK2	0,9	11,5; 48,1	36,6
CLAK3	6,0	12,1; 44,0	23,37
MFAK1	0,9	12,1; 57,4	43,95
MFAK2	1,9	11,5; 47,7	39,54
MFAK3	6,0	11,5; ----	20,59

Todas as formulações apresentam pico endotérmico entre 11,5°C e 12,1°C que corresponde à fusão do Isoleron. As formulações CLAK1, CLAK2, CLAK3, MFAK1 e MFAK2 possuem ainda um segundo pico entre 44,0°C e 58,4°C que corresponde à perda de água. A formulação MFAK3 não possui o segundo pico devido a maior concentração de água e a grande solubilidade do AK em água, sugerindo que o AK encontra-se solubilizado na fase aquosa da formulação MFAK3 e está menos disperso nos outros componentes.

Em nenhuma formulação há a presença de qualquer curva endotérmica próxima de 156°C que indicaria a fusão do AK, o que sugere que o AK está disperso nas formulações.

Na curva da formulação MFAK1 houve a presença de um ruído a 100°C.

As curvas obtidas através das misturas com aquecimento (C) e das misturas físicas (D) das três formulações sem a incorporação de ácido kójico estão apresentadas na figura 6.

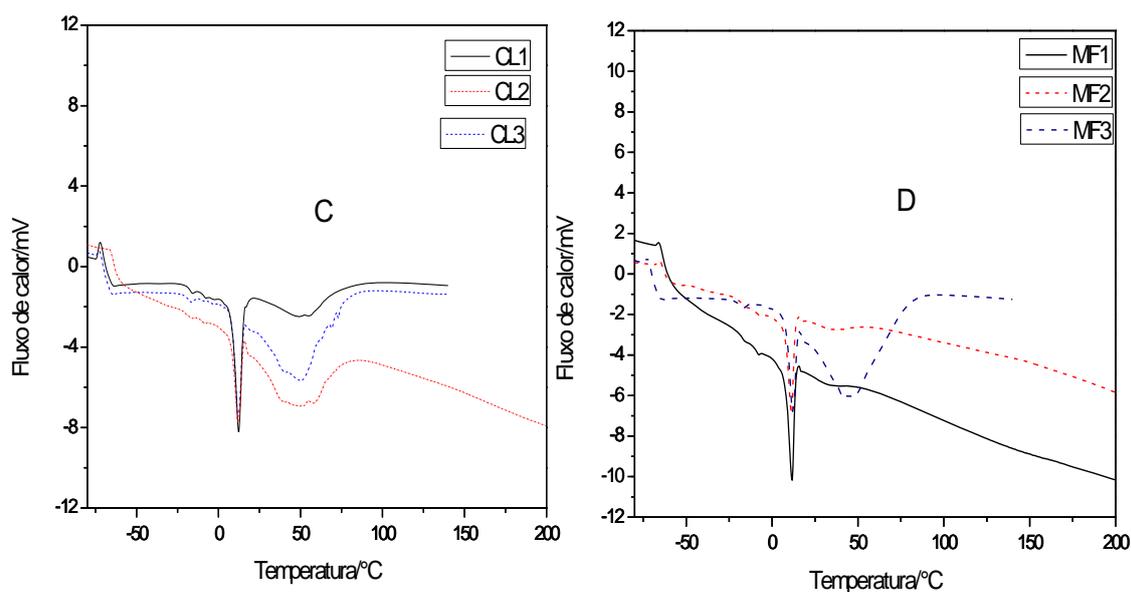


Figura 6. Curvas DSC: cristais líquidos (C) e mistura física dos componentes (D), atmosfera de nitrogênio, 10°C/min, fluxo de gás de 50 mL/min, temperatura de -80° a 200°C.

Tabela 5. Dados das curvas DSC dos cristais líquidos e das misturas físicas

Amostras	$T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{peak}}/^{\circ}\text{C}$	ΔH (J/g)
CL1	2,9	12,1	47,6
CL2	4,9	12,1; 48,7	35,0
CL3	5,4	12,6; 50,3	23,74
MF1	1,9	11,5	43,32
MF2	0,9	11,5	38,02
MF3	6,4	12,1; 42,6	19,67

As formulações sem AK apresentaram o mesmo comportamento das quais foram adicionadas o AK em relação ao primeiro pico, representando a fusão da fase oleosa.

A formulação MF3 apresentou um segundo pico, pois é a formulação com maior porcentagem de água. Em comparação com a formulação MFAK3 pode-se notar a diferença da presença do segundo pico, surgindo que o AK se solubiliza melhor na água, impedindo sua perda.

Considerando que a entalpia do Isoleron em 100% é de 116,5 J/g, então em 35% será de 40,7 J/g, 30% será de 34,9 J/g e 20% será igual a 23,2 J/g.

Tabela 6. Valores de entalpia esperado e verificado das formulações

Amostras	ΔH (J/g)_{esperado}	ΔH (J/g)_{verificado}
CL1	40,7	47,6
CL2	34,9	35,0
CL3	23,28	23,74
MF1	40,7	43,32
MF2	34,9	38,02
MF3	23,28	19,67
CLAK1	40,7	40,13
CLAK2	34,9	36,6
CLAK3	23,28	23,37
MFAK1	40,7	43,95
MFAK2	34,9	39,54
MFAK3	23,28	20,59

A pequena variação de entalpia em relação à valores verificados e calculados (Figura 4) sugere que o AK está pouco disperso na fase oleosa.

Por motivos de problemas técnicos as amostras CL1, CL3 e MF3, que não possuem AK em sua formulação, foram aquecidas até 140°C, não ocasionando problemas nas discussões, pois os principais eventos ocorreram antes de atingir essa temperatura.

4.3. TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A partir dos dados obtidos pela termobalança TA Instruments SDT 2960 (simultaneous TG-DTA) é possível observar tais curvas (figura 7):

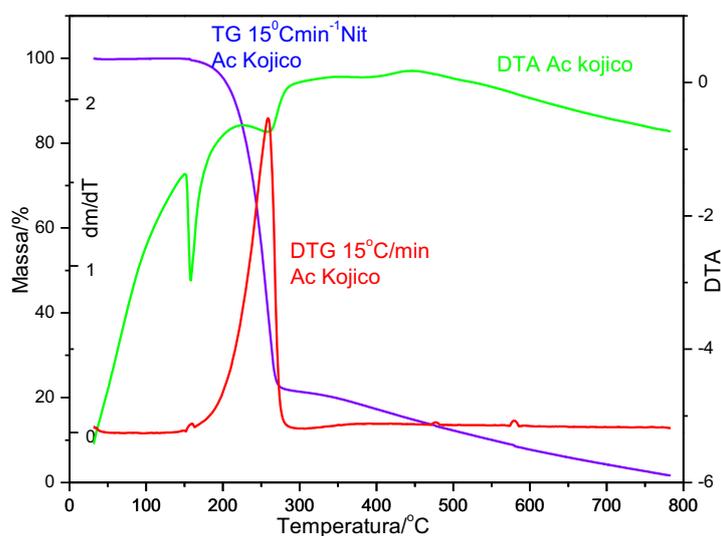


Figura 7. Curvas de TG, DTG e DTA

A curva TG demonstra que o AK apresenta uma única etapa de perda de massa, que se inicia a 156°C e termina a 274°C, perdendo 77% de massa, seguida da decomposição. Informações valiosas podem ser obtidas através do TG quando os processos forem de dessorção, decomposição e oxidação.

A curva DTG indica com exatidão as temperaturas de início e término de reação em qual instante a velocidade de reação é máxima. Também permite distinguir claramente a presença de outros picos que indicam outras reações.

Na curva DTG obtida pelos dados da termobalança é possível reafirmar a presença de apenas uma reação na decomposição do AK, tendo seu pico em 258,6°C, indicando que essa é a temperatura em que há maior velocidade de reação.

Na curva DTA, o início do primeiro pico é caracterizado pela temperatura na qual o AK começa a se fundir e o segundo pico é referente à decomposição do ácido AK.

5. CONCLUSÃO

Os resultados das curvas DSC das formulações demonstram que o AK se encontra disperso nas formulações, não havendo mudanças significativas entre as formulações.

As curvas de TG, DTG e DTA, sugerem que o AK não contém impurezas e que possui estabilidade até 156°C.

Através do estudo térmico das formulações e por motivos econômicos, a formulação 3 que contém menos fase oleosa, isto é, que contém maior proporção de água, seria a amostra mais viável para a incorporação do ácido kójico. No entanto, de acordo com os estudos de caracterização físico-química e de retenção e permeação cutânea *in vitro* realizados por Golçalez (2013) e devido à aparência dura e quebradiça da formulação 3, que não causaria um sensorial agradável, esta formulação não seria a escolhida. A formulação mais adequada para uso tópico segundo as conclusões de Gonzalez (2013) é a formulação 2.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. F.; NOGUEIRA, L. C.; VARELLA, T. N.. Dermatologia e gestação. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, Abr. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005000200009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Out. 2014.
- Farmacopeia brasileira. 5a ed. Brasília, 2010.
- BECHTOLD, I. H.. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Rev. Bras. Ensino Fís.**, São Paulo, v. 27, n. 3, Set. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-11172005000300006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Out. 2014.
- BECHTOLD, I. H.. **Efeitos de superfície de contorno na orientação de cristais líquidos liotrópicos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Física), Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BIRKINSHAW, J. H., CHARLES, J. H. V., LILLY, C. H.; RAISTRICK, H. Kojic Acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone). **Philos. Trans.**, B, v. 220, 1931.
- BROWN, M. **Introduction to thermal analysis**. Dordrecht/Boston/Londres: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- COSTA, M. C. et al. In vivo reflectance confocal microscopy in a typical case of melasma. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 5, Oct. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962012000500021&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 Out. 2014.
- DUNFORD, H.B. Free radicals in iron-containing systems. **Free Radical Biol. Med.** 3, 1987.
- DURAN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and microbial technology**, 31, p. 907-931, 2002.
- FATACCIOLO, D. R. Rejuvenescimiento facial integral em los tres niveles de profundidad. **Dermatolol Peru**, v. 11, p. 45-54, 2001.
- FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 41, n. 3, set. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000300003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 Out. 2014.
- GIRON, D., GOLDBRONN, C. Use of DSC and TG for identification and quantification of the dosage form. **Journal of thermal analysis**, v. 48, n 3, p 473-483, 1997.

GONÇALEZ, M. **Avaliação da permeação cutânea in vitro de sistemas nanoestruturados contendo ácido kójico**. 2012. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia Bioquímica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2012.

GUIRRO, E; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermatofuncional: fundamental, recursos, patologias**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HIRATA, L. L. et al. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n 3, p 418-24, jun. 2014.

IBRAHIM, H.G. et.al. Effects of solutes characteristics and concentration on a lyotropic liquid crystal: solute-induced phase change. **Pharm. Res.**, Arlington, v.10, p.737-742, 1993.

IONASHIRO, M. **Giolito: fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10a. edição. Ed. Guanabara Koogan, 2004

LI ZHIBIN et al. Investigation of the compatibility of a multi-component TN liquid crystal mixture and a multi-component cholesteric liquid crystal mixture by DSC. **Journal of Thermal Analysis**, v. 53, p. 333-335, 1998.

MATOS, J. R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

MENDONÇA, C. S. et al. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis**, vol. 115, n 3, pp 2277-2285, mar. 2014.

MERCK INDEX, 14a ed., 2006.

MULLER-GOYMANN, C.C.; FRANK, S.G. Interaction of lidocaine and lidocaine HCl with the liquid crystal structure of topical preparation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.29, p.147-159, 1986.

NASCIMENTO, L. V.; PORTO, J. A. Senescência cutânea. **An. Bras. Dermatol.**, v. 65, n. 3, p. 111-112, 1990.

ORÍ, R.B., et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histomorfometria e autofluorescência. **An. Bras. Dermatol.**, v.78, n.4, p.425-434, 2003.

PUPPO, A., HALLIWELL, B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. **Biochem. J.**, v. 249, 1988.

PURIM, K. S. M.; AVELAR, M. F. Fotoproteção, melasma e qualidade de vida em gestantes. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 5, Mai 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032012000500007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Out. 2014.

ROCHA, L.; MOREIRA, L.. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, fev. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442007000100006&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 14 Set. 2014.

ROMAGUERA LLACH, C.. Curso de dermatología y venereología: I. Pigmentaciones y acromías. **Anales de medicina y cirugía**, v. 22, n. 25, 1947. Disponível em: <<http://www.raco.cat/index.php/AnalesMedicina/article/view/183051/264540>>. Acesso em: 15 Set. 2014.

SMITS, H. N.; BARHAM, B. L. Köjic acid: a review. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, v. 37, p. 91-113, 1934.

STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. **Cosm. Toil.**, São Paulo, v. 7, 1995.

TEIXEIRA, J. S. et al. Envelhecimento e percepção corporal de idosos institucionalizados. **Rev. bras. geriatr. gerontol.**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-98232012000100007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 Out. 2014.

USP, v. 3, 2012.