

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

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PALMITATO DE
RETINOL: CONTROLE MICROBIOLÓGICO, AVALIAÇÃO DA
SEGURANÇA E EFICÁCIA NO TRATAMENTO DO
ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

MARLUS CHORILLI

ARARAQUARA – SP

2007

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

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PALMITATO DE
RETINOL: CONTROLE MICROBIOLÓGICO, AVALIAÇÃO DA
SEGURANÇA E EFICÁCIA NO TRATAMENTO DO
ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

MARLUS CHORILLI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr. Maria Virgínia Scarpa

Co-orientadora: Prof. Dr. Gislaine Ricci Leonardi

ARARAQUARA – SP

2007

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Câmpus de Araraquara

Chorilli, Marlus

C551d Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. / Marlus Chorilli. – Araraquara, 2007.
174 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Maria Virgínia Costa Scarpa

Co-orientador: Gislaine Ricci Leonardi

1. Sistemas nanoestruturados. 2. Palmitato de retinol. 3. Controle microbiológico. 4. Avaliação de segurança. 5. Farmacotécnica. I. Scarpa, Maria Virgínia Costa, orient. II. Título.

CDD: 616.0145

CAPES: 40300005

Autor: Marlus Chorilli

Título: Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo.

Trabalho apresentado e aprovado pela Comissão Julgadora em sessão realizada em 03/12/2007.

Prof. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres

1º examinador

Prof. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado

2º examinador

Prof. Dr. Telma Mary Kaneko

3º examinador

Prof. Dr. Leila Aparecida Chiavacci

4º examinador

Prof. Dr. Maria Virgínia Scarpa

Orientadora/Presidente

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós.”

Fernando Pessoa

Dedicatória

A Deus

Pela minha vida, pelas oportunidades recebidas, pela proteção e por me dirigir em todas as circunstâncias.

“Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos se percebeu, nem com os olhos se viu Deus além de Ti, que trabalha para aquele que nele espera” (Is. 64:4).

Aos meus pais

Luiz Antonio e Cleide, que sempre me guiaram pelo caminho do amor e da verdade, que sempre entenderam e apoiaram os meus sonhos, por serem os grandes responsáveis pela minha formação humana e intelectual. Meu eterno agradecimento.

Aos meus avôs

Linda, Nilza e Luiz (in memoriam), pelo apoio, carinho e por se fazerem sempre tão presentes na minha vida. Obrigado por tudo.

Aos meus irmãos

Grazielle e Giovanni, pelos bons momentos passados juntos, e à minha sobrinha Gabrielle, que em tão pouco tempo tem nos trazido incomparáveis alegrias.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Dr. Maria Virgínia Scarpa, por ser uma segunda mãe, uma amiga, uma conselheira e, principalmente, pela confiança de uma segunda orientação. Obrigado por fazer parte da minha história, por propiciar uma jornada inesquecível e que deixa recordações memoráveis.

À minha amiga e co-orientadora, Prof. Dr. Gislaine Ricci Leonardi, pela confiança, pelo estímulo nos momentos difíceis, pelos conselhos e por tudo o que representa na minha trajetória profissional. Muito obrigado.

Aos amigos da Pós-Graduação Andréa Lima, Andréa Moreno, Arnóbio, Bruna, Cris, Daniele Michelin, Daniela Longo, Greici, Juliane, Karen, Ketylin, Luana, Nelson, Rubiana, Traudi e Thalita, pelos bons momentos de descontração e, principalmente, pelo conhecimento que compartilharam comigo. Sem dúvida a amizade de vocês foi essencial para que eu conseguisse trilhar esse caminho com maior tranquilidade.

Aos meus amigos, especialmente Adriana, Alessandro, Ângela, Cíntia, Cristhian, Diogo, Franceli, Francyne, Leandro, Lucas, Luciana, Márcio, Mônica, Paulo, Rita, Rodrigo, Sílvia e Simone – “Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.” (Vinicius de Moraes).

Ao meu amigo Rodrigo Sanches pelo auxílio nas resoluções das imagens e elaboração da arte da capa da tese.

Aos Profs. Drs. Sílvia Stanisçuaski Guterres, Telma Mary Kaneko, Hérica Regina Nunes Salgado e Leila Aparecida Chiavacci pelas valiosas contribuições apresentadas na sessão de defesa da tese.

Ao Prof. Dr. Maria Luiza Ozores Polacow pelas enriquecedoras discussões no exame geral de qualificação.

Ao Prof. Dr. Paulo Cerri pela imensa ajuda na confecção das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa pela amizade, pelas longas conversas, pelos ensinamentos e pelo incentivo.

À Prof. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado pelos ensinamentos nas disciplinas, pela amizade e pelo auxílio nas análises microbiológicas.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Sarmiento pela colaboração nas análises de reologia.

Agradecimentos

Aos Profs. Drs. Adélia Emília de Almeida, Ana Dóris de Castro, Anselmo Gomes de Oliveira, Chung Man Chin, Maria Palmira Gremião, Raul César Evangelista e Vera Borges Isaac pelo exemplo de profissionarismo.

Aos Profs. Drs. Míriam Elias Cavallini, Neusa Maria Osti e Nelci Fenalti Höehr pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Celso Santilli, do Instituto de Química da Unesp – Araraquara, por permitir a utilização do reômetro.

Ao Dr. Álvaro Gomes, da Dow Corning, por acreditar neste projeto e fornecer sempre com muito boa vontade as matérias-primas necessárias.

Aos técnicos Maria de Fátima Rodrigues, Luis Potenza e Margareth Modolo (Unesp) e Maria Cristina Prado Ribeiro (Unimep) pela imprescindível colaboração.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação – Cláudia, Sônia e Laura e ao pessoal da portaria – Olívia e Sebastiana, pela atenção constante.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, especialmente Ana Lúcia, Ana Cristina, Moacir, Irani, Rita e Sônia, pelo auxílio e ajuda em diversas situações.

Aos meus ex e atuais alunos – sem dúvida vocês me motivaram a chegar até aqui. Obrigado por cada gesto de amizade e por me propiciarem a certeza que me realizo completamente na área acadêmica.

Aos alunos Paula Souza Prestes, Roberta Balansin Rigon e Pedro Melo Cartezani pela responsabilidade com que assumiram sua parcela neste projeto, e por fazerem com tamanha determinação o que se comprometeram.

Às voluntárias da pesquisa, pela confiança que em nós depositaram e pela seriedade e dedicação durante a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste sonho, cujos nomes estão ausentes neste texto, mas presentes na memória e no coração.

“Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira. Mas já tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum”.

Monteiro Lobato

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	XII
Lista de símbolos, unidades e/ou grandezas	XIV
Lista de tabelas	XV
Lista de figuras	XII
Resumo	XXII
Abstract	XXIII
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Envelhecimento cutâneo	04
2.2. Rugas	06
2.3. Palmitato de retinol (Vitamina A palmitato)	18
2.4. Sistemas nanoestruturados	20
2.4.1. Microemulsão: diagrama de fases	24
2.5. Cristais líquidos	28
2.6. Caracterização física dos sistemas nanoestruturados	34
2.6.1. Condutividade iônica	35
2.6.2. Densidade relativa	35
2.6.3. Estabilidade de formulações cosméticas	36
2.6.3.1. Teste de estabilidade preliminar (TEP)	36
2.6.4. Microscopia de luz polarizada	37
2.6.5. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	38
2.6.6. Comportamento reológico	41
2.6.6.1. Ensaio mecânico-dinâmico ou de oscilação	45
2.7. Controle de qualidade microbiológico	47
2.8. Potencial de irritação de formulações tópicas	48
III. OBJETIVOS	50
3.1. Objetivo principal	50
3.2. Objetivos secundários	50
IV. CASUÍSTICA & MÉTODOS	51
4.1. Material	51
4.1.1. Substâncias e reagentes	51
4.1.2. Equipamentos e vidrarias	52
4.1.3. Microrganismos	53
4.1.4. Animais	53
4.2. Métodos	54
4.2.1. Preparação das formulações	54
4.2.1.1. Diagrama de fases	54
4.2.2. Caracterização físico-química dos sistemas	55
4.2.2.1. Determinação da densidade relativa	55
4.2.2.2. Determinação da condutividade iônica	56
4.2.2.3. Teste de estabilidade preliminar (TEP)	56
4.2.2.3.1. Teste de centrifugação	57
4.2.2.3.2. Microscopia de luz polarizada para as formulações selecionadas	57
4.2.3. Sistemas acrescidos de palmitato de retinol	57
4.2.3.1. Desenvolvimento das formulações	57
4.2.3.1.1. Formulações selecionadas	57

4.2.3.2. Teste de estabilidade das formulações	58
4.2.3.2.1. Características organolépticas	58
4.2.3.2.2. Determinação da densidade relativa	58
4.2.3.2.3. Teste de centrifugação	59
4.2.3.2.4. Determinação do pH	59
4.2.3.2.5. Determinação da condutividade iônica	59
4.2.4. Análise estrutural das formulações acrescidas de PR	60
4.2.4.1. Microscopia de luz polarizada	60
4.2.4.2. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	60
4.2.4.3. Determinação do comportamento reológico	60
4.2.4.3.1. Ensaio de escoamento	61
4.2.4.3.2. Ensaio mecânico-dinâmico ou de oscilação	61
4.2.5. Controle de qualidade microbiológico	61
4.2.5.1. Validação do método de estimativa do número de microrganismos viáveis	62
4.2.5.2. Estimativa do número de microrganismos viáveis	62
4.2.5.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Escherichia coli</i>	62
4.2.5.4. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
4.2.5.5. Avaliação da eficácia das formulações nanoestruturadas como sistema conservante	63
4.2.5.5.1. Teste de desafio	64
4.2.5.5.2. Cálculo do valor D	64
4.2.6. Estudo de irritação das formulações tópicas	65
4.2.6.1. Irritação dérmica primária	65
4.2.6.1.1. Animais	65
4.2.6.1.2. Áreas de tratamento	66
4.2.6.1.3. Protocolo para verificação de irritação dérmica primária	66
4.2.6.1.3.1. Método de avaliação	66
4.2.6.2. Análise histológica	67
4.2.6.2.1. Grupos experimentais	67
4.2.6.2.2. Contenção dos animais	68
4.2.6.2.3. Processamento histológico	68
4.2.6.2.4. Análise histométrica e histopatológica	69
4.2.6.2.4.1. Análise histométrica	69
4.2.6.2.4.2. Análise histopatológica	69
4.2.7. Avaliação da eficácia na pele humana das formulações selecionadas	70
4.2.7.1. Triagem das voluntárias	70
4.2.7.2. Descrição da metodologia empregada no estudo	70
4.2.7.3. Análise estatística	72
V. RESULTADOS & DISCUSSÃO	73
5.1. Preparação das formulações	76
5.2. Caracterização físico-química dos sistemas	87
5.2.1. Formulações selecionadas	87
5.2.2. Determinação da densidade relativa	88
5.2.3. Determinação da condutividade iônica	88
5.2.4. Teste de estabilidade preliminar (TEP)	92
5.2.4.1. Teste de centrifugação	93
5.2.4.2. Microscopia de luz polarizada para as formulações selecionadas	93

5.3. Sistemas acrescidos de palmitato de retinol	97
5.3.1. Desenvolvimento das formulações	97
5.3.1.1. Diagrama de fases	97
5.3.1.2. Formulações selecionadas	99
5.3.2. Teste de estabilidade das formulações	100
5.3.2.1. Características organolépticas	100
5.3.2.2. Determinação da densidade relativa	100
5.3.2.3. Teste de centrifugação	101
5.3.2.4. Determinação do pH	101
5.3.2.5. Determinação da condutividade iônica	102
5.4. Análise estrutural das formulações acrescidas de PR	103
5.4.1. Microscopia de luz polarizada	103
5.4.2. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	108
5.4.3. Determinação do comportamento reológico	112
5.4.3.1. Ensaio de escoamento	112
5.4.3.2. Ensaio mecânico-dinâmico ou de oscilação	115
5.5. Controle de qualidade microbiológico	122
5.5.1. Validação do método de estimativa do número de microrganismos viáveis	122
5.5.2. Estimativa do número de microrganismos viáveis	123
5.5.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Escherichia coli</i>	124
5.5.4. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	124
5.5.5. Avaliação da eficácia das formulações nanoestruturadas como sistema conservante	126
5.5.5.1. Teste de desafio	126
5.5.5.2. Cálculo do valor D	128
5.6. Estudo de irritação das formulações tópicas	136
5.6.1. Irritação dérmica primária	136
5.6.2. Análise histológica	138
5.6.2.1. Análise histométrica da epiderme	138
5.6.2.2. Análise histopatológica da derme	144
5.7. Avaliação da eficácia na pele humana das formulações objeto de estudo	149
VI. CONCLUSÕES	154
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
VIII. ANEXOS	172
Anexo I – Parecer nº 10/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.	173
Anexo II – Protocolo nº 73/05 – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba.	174

LISTA DE ABREVIATURAS

A	água
ABC	Associação Brasileira de Cosmetologia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	água em óleo
AS	ágar Sabouraud
CMC	concentração micelar crítica
CTFA	<i>The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association</i>
EHL	equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EMB	ágar eosina azul de metileno
EPM	erro padrão da média
FIP	<i>Federation Internationale Pharmaceutique</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Mod.	modelo
O/A	óleo em água
OD	olho direito
OE	olho esquerdo
PBFO	brometo de perfluorooctila
PBLG	poli-benzil-L-glutamato
PFS	poliéter funcional siloxano
pH	potencial hidrogeniônico
PMNs	leucócitos polimorfonucleares
PR	palmitato de retinol
rpm	rotações por minuto
SANS	espalhamentos de nêutrons a baixo ângulo
SAXS	espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SFCP	silicone fluido de co-polímero glicol
SLT	sistema líquido transparente
SVT	sistema viscoso transparente
SLO	sistema líquido opaco
SVO	sistema viscoso opaco
ST	sistema semi-transparente

SF	separação de fases
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TEP	teste de estabilidade preliminar
TSA	ágar soja caseína
TSB	caldo soja caseína
TSI	ágar inclinado ferro-três açúcares
UFC	unidade formadora de colônia
UI	unidade internacional
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta A
VA	vitamina A
VAP	vitamina A palmitato
XLD	ágar xilose-lisina-desoxicolato

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES E/OU GRANDEZAS

Å	ângstron
G'	módulo de estocagem
G''	módulo de perda
M	molar
mM	milimolar
®	marca registrada
H_I	fase hexagonal normal
H_{II}	fase hexagonal reversa
Hz	hertz
MHz	megahertz
I_I	fase cúbica micelar
Lα	fase lamelar
μS	microSiemens
mPa.s	milipascal
N	Newton
Pa	Pascal
λ	comprimento de onda
R²	coeficiente de correlação
δ	densidade
η	viscosidade
[]	concentração
s⁻¹	segundo recíproco
t	temperatura absoluta
V_I	fase cúbica bicontínua

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição dos diagramas ternários.	55
Tabela 2.	Formulações selecionadas.	58
Tabela 3.	Formulações preparadas com concentração fixa de tensoativo e variações nas proporções de fase aquosa e oleosa.	88
Tabela 4.	Densidade relativa (g/cm^3) das três formulações estudadas para cada sistema ($n=3$).	88
Tabela 5.	Composição e concentração dos componentes nas formulações selecionadas.	99
Tabela 6.	Densidade relativa das formulações estudadas (g/cm^3).	100
Tabela 7.	Valores referentes ao pH das formulações 24 horas após a manipulação, armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C).	101
Tabela 8.	Valores de condutividade iônica em $\mu\text{S/cm}$ para as formulações estudadas.	102
Tabela 9.	Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos) nas formulações.	124
Tabela 10.	Desafio das formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>E. coli</i> .	126
Tabela 11.	Desafio das formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>S. aureus</i> .	126
Tabela 12.	Desafio das formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>P. aeruginosa</i> .	126
Tabela 13.	Desafio das formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>C. albicans</i> .	127
Tabela 14.	Desafio das formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>A. niger</i> .	127
Tabela 15.	Contagem de microrganismos nas formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>E. coli</i> .	128
Tabela 16.	Contagem de microrganismos nas formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>S. aureus</i> .	128
Tabela 17.	Contagem de microrganismos nas formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>P. aeruginosa</i> .	129
Tabela 18.	Contagem de microrganismos nas formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>C. albicans</i> .	129
Tabela 19.	Contagem de microrganismos nas formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} contaminadas com <i>A. niger</i> .	129
Tabela 20.	Valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para <i>P. aeruginosa</i> .	133
Tabela 21.	Valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para <i>C. albicans</i> .	133
Tabela 22.	Valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para <i>A. niger</i> .	133
Tabela 23.	Eritema observado no estudo de irritação dérmica primária, segundo escala de Draize, após 4 e 72 horas de tratamento com as formulações F_1 , F_{1v} , F_4 , F_{4v} e controle ($n=5$), aplicadas no dorso dos coelhos.	136
Tabela 24.	Espessura da camada córnea nos diferentes grupos experimentais.	138
Tabela 25.	Espessura da epiderme nos diferentes grupos experimentais.	139
Tabela 26.	Número de fibroblastos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar.	144
Tabela 27.	Número de leucócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar.	146
Tabela 28.	Constituição das formulações utilizadas nos estudos de avaliação de	150

	eficácia.	
Tabela 29.	Áreas* com traços de rugas na região periorbital dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) das voluntárias, dos diferentes grupos estudados, antes e depois do tratamento. * áreas de 1,2 cm ² em imagens com aumento de 10x.	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ptose das sobrancelhas.	07
Figura 2.	Rugas dinâmicas frontais.	08
Figura 3.	Ptose da ponta do nariz.	09
Figura 4.	Diferenças anatômicas existentes entre o sulco nasogeniano de uma criança (A) e de um idoso (B).	10
Figura 5.	Comparação do papo de peru (A) com o desenho de uma papada normal de um jovem (B).	11
Figura 6.	Rugas entrelaçadas em uma mulher de 65 anos.	12
Figura 7.	Linhas horizontais na testa de um homem de 75 anos.	12
Figura 8.	Pés de galinha na lateral dos olhos de um homem de 58 anos.	13
Figura 9.	Rugas atroficas.	13
Figura 10.	Rugas elásticas.	14
Figura 11.	Rugas de expressão na testa e nas bochechas de uma senhora.	14
Figura 12.	Estrutura química do palmitato de retinol.	20
Figura 13.	Estrutura das gotículas de microemulsão A/O e O/A.	23
Figura 14.	Digrama de fases – (a) titulação com fase aquosa; (b) representação dos pontos de titulação e regiões do diagrama de fases.	26
Figura 15.	Emulsões obtidas com diferentes concentrações do tensoativo polietilenoglicol perfluroalquilado com a fase oleosa brometo de perflurooctila (BPFO). Representação da classificação de Winsor. (A) Winsor I (fase oleosa em equilíbrio com fase emulsionada). (B) Winsor III (fase emulsionada em equilíbrio com fase aquosa e fase oleosa). (C) Winsor II (fase aquosa em equilíbrio com fase emulsionada). (D) Winsor IV (emulsão homogênea). (E) Microemulsão.	27
Figura 16.	Esquema ilustrativo do aparecimento das mesofases líquido-cristalinas.	30
Figura 17.	Arranjo estrutural de uma mesofase colestérica.	31
Figura 18.	Esquema ilustrativo de cristais líquidos liotrópicos – representação de moléculas anfifílicas solúveis em água com formação de micelas.	32
Figura 19.	Representação esquemática das principais fases líquido-cristalinas liotrópicas, respectivamente cristal líquido lamelar, cristal líquido hexagonal e cristal líquido cúbico.	33
Figura 20.	Diagrama esquemático de SAXS e difração dos raios X.	40
Figura 21.	Representação esquemática do efeito de cisalhamento, sendo em (a) o cubo hipotético sujeito à aplicação de força e em (b) o cubo sujeito a uma força tangencial na camada superior.	42
Figura 22.	Representação gráfica dos diferentes tipos de comportamentos reológicos.	44
Figura 23.	Reograma produzido por um material tixotrópico pseudoplástico em (a) e reograma produzido por um material reopético em (b).	45
Figura 24.	Representação esquemática do módulo de elasticidade complexo G^* (ω), seus componentes em fase G' (ω), fora de fase G'' (ω) e do ângulo de fase δ .	46
Figura 25.	Caixa de contenção com inclinação de 45° na parte frontal.	68
Figura 26.	Caixa de contenção com parte superior vazada.	68

- Figura 27.** Fotografia de uma voluntária configurada com grade de $1,2\text{cm}^2$ de área (imagem com aumento de 10 vezes). 71
- Figura 28.** Estrutura química básica dos silicones, sendo que R_1 e R_2 são usualmente os radicais orgânicos: metil, fenil, vinil, fluoropropil, hidroxila e halogênio. 74
- Figura 29.** Estrutura química do polissorbato 80. 75
- Figura 30.** Diagrama de fases pontual do sistema S_1 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: • SLT = sistema líquido transparente; • SVT = sistema viscoso transparente; ■ ST = sistema semi-transparente; ▼ SLO = sistema líquido opaco; ▼ SVO = sistema viscoso opaco; ■ SF= separação de fases. 77
- Figura 31.** Diagrama de fases fechado do sistema S_1 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVT = sistema viscoso transparente; ST = sistema semi-transparente; SLO = sistema líquido opaco; SVO = sistema viscoso opaco; SF= separação de fases. 78
- Figura 32.** Diagrama de fases pontual do sistema S_2 constituído por Hostaphat KL30[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: • SLT = sistema líquido transparente; • SLO = sistema líquido opaco; ▼ ST = sistema semi-transparente; ▼ SF = separação de fases. 79
- Figura 33.** Diagrama de fases fechado do sistema S_2 constituído por Hostaphat KL30[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SLO = sistema líquido opaco; ST = sistema semi-transparente; SF = separação de fases. 80
- Figura 34.** Diagrama de fases pontual do sistema S_3 constituído por Tween 80[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: • SLT = sistema líquido transparente; • SVT = sistema viscoso transparente; ▼ ST = sistema semi-transparente. 81
- Figura 35.** Diagrama de fases fechado do sistema S_3 constituído por Tween 80[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVT= sistema viscoso transparente; ST= sistema semi-transparente. 82
- Figura 36.** Diagrama de fases pontual do sistema S_4 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: • SLT = sistema líquido transparente; • ST = sistema semi-transparente; ▼ SVT = sistema viscoso transparente; ▼ SLO = sistema líquido opaco; ◆ SF= separação de fases. 83
- Figura 37.** Diagrama de fases fechado do sistema S_4 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVT = sistema viscoso transparente; SLO = sistema líquido opaco; ST = sistema semi-transparente; SF = separação de fases. 84
- Figura 38.** Diagrama de fases pontual do sistema S_5 constituído por DC 193[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: • SLT = sistema líquido transparente; • SF = separação de fases. 85

- Figura 39.** Diagrama de fases fechado do sistema S₅ constituído por DC 193[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SF = separação de fases. 86
- Figura 40.** Efeito da variação de percentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₁, constituído de silicone fluido de co-polímero glicol (fase oleosa), poliéter funcional siloxano (tensoativo) e água (fase aquosa). 89
- Figura 41.** Efeito da variação de percentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₂, constituído de silicone fluido de co-polímero glicol (fase oleosa), trilauril- 4 fosfato (tensoativo) e água (fase aquosa). 89
- Figura 42.** Efeito da variação de percentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₃, constituído de silicone fluido de co-polímero glicol (fase oleosa), polissorbato 80 (tensoativo) e água (fase aquosa). 90
- Figura 43.** Efeito da variação de percentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₄, constituído de adipato de diisopropila (fase oleosa), poliéter funcional siloxano (tensoativo) e água (fase aquosa). 90
- Figura 44.** Efeito da variação de percentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₅, constituído de adipato de diisopropila (fase oleosa), silicone fluido de co-polímero glicol (tensoativo) e água (fase aquosa). 91
- Figura 45.** Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F₁ do sistema S₁ (silicone fluido de co-polímero glicol, poliéter funcional siloxano e água) observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (400x). 94
- Figura 46.** Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F₁ do sistema S₁ (silicone fluido de co-polímero glicol, poliéter funcional siloxano e água) observado 15 dias após manipulação: **(a)** à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), **(b)** em geladeira (5 ± 2 °C) e **(c)** em estufa (37 ± 2 °C) (200x). 94
- Figura 47.** Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F₁ do sistema S₄ (adipato de diisopropila, poliéter funcional siloxano e água) observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (400x). 95
- Figura 48.** Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F₁ do sistema S₄ (adipato de diisopropila, poliéter funcional siloxano e água) observado 15 dias após manipulação: **(a)** à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), **(b)** em geladeira (5 ± 2 °C) e **(c)** em estufa (37 ± 2 °C) (200x). 95
- Figura 49.** Diagrama de fases do sistema S₁ constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®]/PR (fase oleosa), no qual: • SF (separação de fases); • SVO (sistema viscoso opaco); ▼ SLO (sistema líquido opaco); ▼ SVT (sistema viscoso transparente); ■ SLT (sistema líquido transparente). 98
- Figura 50.** Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F₁ do sistema S₁. **A.** tempo 24 horas (T₁); **B.** tempo trinta dias (T₃₀) na temperatura 104

	ambiente (25 ± 2 °C); C. tempo trinta dias (T_{30}) em estufa (37 ± 2 °C); D. tempo trinta dias (T_{30}) em geladeira (5 ± 2 °C) (200x).	
Figura 51.	Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F_{1v} do sistema S_1 . A. tempo 24 horas (T_1); B. tempo trinta dias (T_{30}) na temperatura ambiente (25 ± 2 °C); C. tempo trinta dias (T_{30}) em estufa (37 ± 2 °C); D. tempo trinta dias (T_{30}) em geladeira (5 ± 2 °C) (200x).	105
Figura 52.	Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F_4 do sistema S_1 . A. tempo 24 horas (T_1); B. tempo trinta dias (T_{30}) na temperatura ambiente (25 ± 2 °C); C. tempo trinta dias (T_{30}) em estufa (37 ± 2 °C); D. tempo trinta dias (T_{30}) em geladeira (5 ± 2 °C) (200x).	106
Figura 53.	Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F_{4v} do sistema S_1 . A. tempo 24 horas (T_1); B. tempo trinta dias (T_{30}) na temperatura ambiente (25 ± 2 °C); C. tempo trinta dias (T_{30}) em estufa (37 ± 2 °C); D. tempo trinta dias (T_{30}) em geladeira (5 ± 2 °C) (200x).	107
Figura 54.	Comparação da evolução das curvas de SAXS para as formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} à temperatura ambiente.	109
Figura 55.	Evolução das curvas de SAXS para a formulação F_1 nas diversas condições de armazenamento.	109
Figura 56.	Evolução das curvas de SAXS para a formulação F_{1v} nas diversas condições de armazenamento.	110
Figura 57.	Evolução das curvas de SAXS para a formulação F_4 nas diversas condições de armazenamento.	110
Figura 58.	Evolução das curvas de SAXS para a formulação F_{4v} nas diversas condições de armazenamento.	111
Figura 59.	Evolução das curvas de SAXS para a formulação F_5 nas diversas condições de armazenamento.	111
Figura 60.	Variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para as diferentes formulações armazenadas à temperatura ambiente por 24 horas (a) e por 30 dias (b), mantidas em estufa (c) e geladeira (d) após 30 dias de manipulação. Símbolos vazios representam a curva decrescente (diminuição da velocidade de cisalhamento).	114
Figura 61.	Variação do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas à temperatura ambiente após 24 horas de manipulação.	117
Figura 62.	Variação do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas à temperatura ambiente após 30 dias de manipulação.	119
Figura 63.	Variação do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas em estufa após 30 dias de manipulação.	120
Figura 64.	Variação do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas em geladeira após 30 dias de manipulação.	122
Figura 65.	Perfil de letalidade – log UFC/g x tempo (horas) de <i>P. aeruginosa</i> nas formulações F_1 (A), F_{1v} (B), F_4 (C) e F_{4v} (D).	130
Figura 66.	Perfil de letalidade – log UFC/g x tempo (horas) de <i>C. albicans</i> nas formulações F_1 (A), F_{1v} (B), F_4 (C) e F_{4v} (D).	131

Figura 67.	Perfil de letalidade – log UFC/g x tempo (horas) de <i>A. niger</i> nas formulações F ₁ (A), F _{1v} (B), F ₄ (C) e F _{4v} (D).	132
Figura 68.	Teste de irritação dérmica primária em coelhos após 4 horas.	137
Figura 69.	Teste de irritação dérmica primária em coelhos após 72 horas.	137
Figura 70.	Espessura da camada córnea nos diferentes grupos experimentais (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).	139
Figura 71.	Espessura da epiderme nos diferentes grupos experimentais (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).	140
Figura 72.	Fotomicrografias evidenciando a camada córnea e a epiderme de coelhos após os tratamentos: (A) – controle; (B) – F ₁ ; (C) – F _{1v} ; (D) – F ₄ ; (E) – F _{4v} (200x).	143
Figura 73.	Número de fibroblastos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).	144
Figura 74.	Fotomicrografias evidenciando a derme papilar dos grupos: (A) – Controle; (B) – F _{1v} . Observa-se maior número de fibroblastos (seta) no grupo em que se aplicou a formulação F _{1v} (1000x).	145
Figura 75.	Número de leucócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).	146
Figura 76.	Áreas* com traços de rugas das voluntárias, em seus diferentes grupos, antes e depois do tratamento (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).	151

RESUMO

O estudo de sistemas nanoestruturados tem chamado a atenção de um número cada vez maior de pesquisadores das áreas farmacêutica e cosmética, devido às inúmeras vantagens conferidas, como aumento da estabilidade e eficácia de princípios ativos. Os efeitos desses sistemas na pele são dificilmente relatados na literatura científica. Os objetivos deste trabalho foram: desenvolver e caracterizar físico-quimicamente sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol (PR); realizar os testes de estabilidade preliminares (TEP) para as formulações selecionadas; realizar o controle microbiológico bem como o teste de desafio para eficácia conservante para as formulações empregadas; verificar o efeito irritativo das formulações segundo escala de Draize e por análise histológica, além de avaliar a eficácia das formulações no tratamento do envelhecimento cutâneo. As formulações preparadas com silicone fluido de co-polímero glicol (SFCG), poliéter funcional siloxano (PFS) e água (S₁) e com adipato de diisopropila, PFS e água (S₄) apresentaram fases líquido-cristalinas do tipo lamelar. Os TEPs evidenciaram que as formulações F₁, F₂ e F₃ de todos os sistemas desenvolvidos se mantiveram estáveis durante o período do estudo. As formulações do sistema S₁ apresentaram maior formação e estabilidade de cristais líquidos no decorrer do experimento, sendo selecionadas para incorporação de PR. As formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} do sistema S₁ e a formulação F₅ do sistema S₄ apresentaram-se como fluidos pseudoplásticos não-Newtonianos. A formulação F₅ foi a mais tixotrópica, seguido pelas formulações F_{1v} e F₁. As condições de armazenamento, de acordo com os ensaios de escoamento e mecânico-dinâmicos, interferem na estruturação do sistema. As formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} não apresentaram contaminação microbiana, evidenciado pela estimativa do número de microrganismos viáveis e pela pesquisa de patógenos. O teste de desafio e o cálculo do valor D se mostraram métodos eficientes para a avaliação da propriedade conservante das formulações. As formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} não ocasionaram irritação dérmica de acordo com a escala de Draize e análises histológicas, as quais demonstraram que a formulação F_{1v} promoveu aumento significativo do número de fibroblastos na derme. Os estudos de eficácia na pele humana evidenciaram que as formulações acrescidas de PR proporcionaram redução nas rugas periorbitares das voluntárias, sugerindo a sua eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: sistemas nanoestruturados; palmitato de retinol; controle microbiológico; avaliação de segurança.

ABSTRACT

The study of nanostructured systems has interested an increasing number of pharmaceutical and cosmetic areas researchers, due to the great advantage, as increase of the stability and effectiveness of active substances. The effects of those systems in the skin poorly reported on the scientific literature. The aims of this work were: to develop and to characterize physico-chemically nanostructured systems containing retynil palmitate (RP); to carry out a preliminary stability tests (PST) for the selected formulations; to carry through the microbiological control as well the challenge test for preservative effectiveness for the used formulations; to evaluate the irritation effect of the formulations according to Draize scale and histological analysis, besides to evaluate the effectiveness of the formulations in the treatment of the cutaneous aging. The formulations prepared with silicon glycol copolymer (SGC), polyether functional siloxane (PFS) and water (S₁) and with diisopropyl adipate, PFS and water (S₄) presented liquid-crystalline phases with lamellar arrangement. The PST evidenced that the formulations F₁, F₂ and F₃ of all the developed systems remained stable throughout the period of study. The formulations of the S₁ system presented higher formation of liquid crystals and better stability, being selected for incorporation of RP. The formulations F₁, F_{1v}, F₄ and F_{4v} of the S₁ system and the formulation F₅ of the S₄ system presented as non-Newtonian pseudoplastic fluids. The formulation F₅ was the most thixotropic, followed by the formulations F_{1v} and F₁. The storage conditions, in accordance with draining and mechanic-dynamic assays, interfere with the structure of the system. The formulations F₁, F_{1v}, F₄ and F_{4v} did not present microbiological contamination, evidenced by the estimate of the number of viable microorganisms and by the presence of pathogens. The challenge test and the calculation of D value showed efficient methods for the evaluation of the preservative property of the formulations. The formulations F₁, F_{1v}, F₄ and F_{4v} did not cause dermic irritation in accordance with Draize scale and histological analysis, which demonstrated that the formulation F_{1v} caused significant increase of the number of fibroblasts in dermis. The studies of effectiveness in the skin human evidenced that the formulations added of PR provided to reduction in orbicular wrinkles of the volunteers, suggested its effectiveness in the treatment of the cutaneous aging.

Keywords: nanostructured systems; retynil palmitate; microbiological control; safety evaluation.

I. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento de novos veículos com o objetivo não só de aumentar a eficácia terapêutica de uma substância ativa, como também permitir a redução da sua dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais tóxicos (URBAN, 2004).

A aplicação de sistemas nanoestruturados como sistemas de liberação de fármacos tem sido alvo de crescente interesse dado às inúmeras vantagens que oferecem, como o aumento da solubilidade e da estabilidade de fármacos, possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas ou lipofílicas, capacidade de ação como sistemas reservatórios, diminuição da toxicidade, aumento da eficácia, bem como alteração da disponibilidade de fármacos, dependendo da forma de interação entre fármaco e sistema (BRINON et al., 1999).

Dentre os vários sistemas de transporte e liberação de princípios ativos na superfície cutânea, existem os cristais líquidos e as microemulsões. Os cristais líquidos apresentam propriedades de sólidos e líquidos, em virtude de possuírem ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos, além de mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos (SANTOS, 2006).

As microemulsões, por sua vez, podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável. Além disso, elas possuem gotículas da fase interna na ordem de nanômetros (nm). As substâncias ativas podem ser veiculadas nas microemulsões quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (OLIVEIRA & SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

A elucidação da estrutura interna de um sistema nanoestruturado é muito complexa. Técnicas sofisticadas são necessárias para atingir este objetivo, como espalhamento de raios-X a baixo ângulo – SAXS (RAMAN et al., 2003) e espalhamento de luz (*light scattering*) (SINTOV & SHAPIRO, 2004). Outros métodos como a condutividade iônica (SINTOV & SHAPIRO, 2004), viscosidade (SPICLIN et al., 2003) e microscopia de luz polarizada (KREILGAARD, 2002) também são frequentemente utilizados para o estudo do comportamento físico-químico de tais sistemas.

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, a indústria cosmética, bem como a farmacêutica, têm se mostrado interessadas no desenvolvimento de

sistemas nanoestruturados, uma vez que podem promover maior hidratação à pele, além de aumentar a eficácia e estabilidade de substâncias ativas (PARK & KIM, 1999; CUNHA JUNIOR et al., 2003; SINTOV & SHAPIRO, 2004).

Neste contexto, há relatos de que os cristais líquidos podem aumentar a hidratação cutânea, melhorar a estabilidade e/ou ação de fármacos. SPICLIN e colaboradores (2003) verificaram que sistemas nanoestruturados podem ser utilizados como transportadores para a liberação tópica do fosfato de ascorbil sódico. SANTOS e colaboradores (2005) observaram aumento da estabilidade de sistemas líquido-cristalinos contendo óleo de calêndula.

Apesar do crescente interesse por sistemas líquido-cristalinos, dificilmente encontram-se informações sobre estudos que avaliam histologicamente o efeito de formulações acrescidas de alta concentração de tensoativo na pele, que possivelmente podem ocasionar irritação cutânea.

A evidência e interpretação de possíveis efeitos indesejáveis no tecido cutâneo podem ser realizadas por meio de avaliação histopatológica e histométrica, uma vez que permitem a análise do tecido epitelial, da derme e também das características celulares. Além disso, ainda pode auxiliar o delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia da derme e no desenvolvimento de novos produtos cosméticos (MAIA CAMPOS et al., 1999; SILVA & MAIA CAMPOS, 2000).

Na preparação de sistemas nanoestruturados geralmente não são empregados conservantes microbiológicos, pois acredita-se que grandes quantidades de tensoativos podem dificultar o desenvolvimento de microrganismos (AL-ADHAM et al., 2003).

Quando se considera a qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos não estéreis e cosméticos se admite a presença de um número limitado de microrganismos, tendo em vista as características de sua utilização. Frequentemente, o critério é a pesquisa de microrganismos indicadores que, quando presentes em uma formulação, podem fornecer informações sobre o nível de sua contaminação e as condições higiênico-sanitárias durante o processamento, produção ou armazenamento (BRASIL, 1999).

No Brasil, os limites microbianos para medicamentos são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução nº 481/99 (BRASIL, 1999).

Uma vez que os cosméticos têm a probabilidade de serem expostos a contaminantes microbiológicos, é importante que estes tenham uma resistência própria contra o crescimento

microbiano. Para isto, é necessário que o sistema conservante seja adequado e eficaz para assegurar a estabilidade microbiológica, evitando-se os riscos eventuais da ação de toxinas e metabólitos microbianos. Assim, considerando-se que as fórmulas com alta concentração de tensoativos geralmente são desprovidas de conservantes, é de extrema importância que se tenha um controle microbiológico destas, para se assegurar um produto de boa qualidade, livre de determinados microrganismos, principalmente os potencialmente prejudiciais ao usuário, bem como garantir uma preparação estável, que permaneça como tal, mesmo após o uso contínuo pelo consumidor (LORENZETTI, 1984; CONSTÂNCIO, 1993).

Uma das alternativas para verificação da eficácia conservante das formulações é o método de regressão linear, o qual baseia-se no teste de desafio pela inoculação de microrganismos e verificação da redução daqueles que são viáveis, em diferentes tempos (OLIVEIRA, 1999).

Assim, este trabalho se propôs a desenvolver e caracterizar fisico-quimicamente sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol, realizar os testes de estabilidade preliminares para as formulações selecionadas, estudar o comportamento reológico das formulações por meio dos ensaios de escoamento e mecânico-dinâmicos, realizar o controle microbiológico bem como o teste de desafio para as formulações selecionadas, verificar o efeito irritativo na pele de coelhos das formulações por meio da avaliação de eritema e edema segundo escala de Draize e determinação de medidas histométricas e histopatológicas, além de avaliar a eficácia das formulações no tratamento do envelhecimento cutâneo, mediante aplicação das formulações na pele de mulheres que apresentam rugas periorbiculares.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Envelhecimento cutâneo

A face é a parte do corpo que mantém um relacionamento mais direto com o mundo. É principalmente através das expressões que o ser humano externa seus sentimentos e emoções como preocupação, raiva, alegria, dor e angústia. A busca por uma boa aparência, por uma imagem jovem, bela e desejada vem se generalizando e se tornando necessária tanto para o relacionamento profissional como pelo benefício estético. Por esta razão, há uma crescente preocupação das pessoas, de um modo geral, com relação aos cuidados estéticos (TAKACS et al., 2002).

A discussão relacionada à qualidade estética da pele tem-se tornado amplamente aceita e praticada. Um arsenal de produtos tem sido anunciado como fonte de rejuvenescimento, mas poucos deles têm apresentado comprovações científicas de real eficácia (FARAGE et al., 2007).

Todos os organismos chegam a uma fase regressiva de seu ciclo vital, que se manifesta por modificações anátomo-fisiológicas, as quais são conhecidas como envelhecimento. A pele, sendo um órgão de superfície, sofre as agressões do meio ambiente e ação de fatores extrínsecos, particularmente das radiações solares, as quais têm um papel relevante no envelhecimento cutâneo. Além disso, está sujeita à ação de fatores intrínsecos ou cronológicos, como hormonais, nutricionais e vasculares, os quais podem estar relacionados com as alterações no tecido conjuntivo da derme (ORÍÁ et al., 2003).

O processo de envelhecimento altera a estrutura e a função dos órgãos e, no caso da pele, modifica também seu aspecto. Os sinais clínicos e fisiológicos do envelhecimento cutâneo são numerosos e variados (TRELLES et al., 1998).

O envelhecimento intrínseco provavelmente resulta de um declínio programado geneticamente nas funções e capacidades fisiológicas. Clinicamente, o envelhecimento intrínseco é atrófico e resulta na perda progressiva da elasticidade, na atrofia da pele e no aumento das linhas de expressão. Os sinais fisiológicos do envelhecimento intrínseco incluem a atrofia epidérmica, o achatamento da junção dermo-epidérmica, a atividade metabólica mais lenta e o aumento do tamanho dos queratinócitos com a idade. Especificamente, a camada córnea permanece relativamente inalterada, mas a epiderme afina-se com um achatamento da junção dermo-epidérmica que é refletida por um aumento da fragilidade cutânea. Há

considerável diminuição na espessura da derme e na vascularização, assim como uma redução no número e capacidade biossintética de fibroblastos. Finas fibras elásticas dérmicas espessam com a idade e, então, desaparecem (MAUREL et al., 1980; TSUJI & HAMADA, 1981; LAPIÈRE, 1990; MARGELIN et al., 1993; BERNSTEIN et al., 1996; MORAGAS et al., 1998; ASHCROFT et al., 1999; BISCHOFF et al., 2000; BATISTELA et al., 2007).

O termo envelhecimento extrínseco e fotoenvelhecimento são frequentemente utilizados como sinônimos, embora outros fatores extrínsecos, diferentes da radiação solar, como o fumo, possam afetar a pele (KAMBAYASHI et al., 2003; VELASCO et al., 2004; WULF et al., 2004).

À medida que a pele envelhece, modificações como afinamento da derme e diminuição do conteúdo de colágeno, não podem ser evitadas. Essas alterações são aceleradas pela exposição crônica aos raios ultravioleta (UV), gerando a formação de radicais livres; com isso, há uma elevação no número de lesões oxidativas não reparadas, que alteram o metabolismo e são responsáveis pelo envelhecimento precoce (AZULAY et al., 2003; VELASCO et al., 2004).

As mudanças clínicas resultantes do fotoenvelhecimento causadas pelos efeitos acumulativos das exposições solares frequentes e prolongadas, especificamente da radiação UV, superposta ao envelhecimento intrínseco, podem abranger: enrugamento, aspereza ao toque, lividez, manchas hiperpigmentadas irregulares, telangiectasia e em alguns casos, queratose actínica e neoplasma cutâneo. Além disso, o fotoenvelhecimento altera a estrutura e a função da epiderme e da derme, provocando alterações perceptíveis como espessamento da camada córnea, indução de sudorese e produção de melanina (SANTORO, 2000). Observa-se na pele severamente fotodanificada perda da polaridade epidérmica (maturação ordenada) e atipia dos queratinócitos, principalmente nas camadas mais inferiores da epiderme. Outras mudanças significativas ocorrem na derme, como degeneração das fibras elásticas e colágenas, aparecimento de rugas, sulcos e manchas pigmentadas, além de coloração amarelada na pele e ocorrência de lesões pré-malignas ou malignas (NARDIN & GUTERRES, 1999; KAMBAYASHI et al., 2003; VELASCO et al., 2004).

2.2. Rugas

KAMBAYASHI e colaboradores (2003) afirmam que as mudanças nos componentes da derme podem ser o maior fator de estimulação da formação das rugas, que resultam na modificação de algumas propriedades físicas da pele.

Estudos mostraram que o mecanismo de formação das rugas é estimulado pela radiação UV e que a acumulativa exposição à luz solar induz ao aumento da produção das elastases pelos fibroblastos, levando à degeneração da elastina e à perda das fibras elásticas lineares, resultando na perda da elasticidade cutânea e formação das rugas faciais (AKAZAKI & IMOKAWA, 2001).

DZUBOW (2000) e STEINER (2000) afirmam que a formação das rugas faciais é um reflexo do conjunto de alterações ocorridas nas camadas da pele, que trazem como consequência o aumento anatômico da face, perda do tônus adequado, sulcos e flacidez cutânea. À medida que o tecido subcutâneo, tecido muscular e o volume ósseo diminuem, o estresse físico acumulado produz as alterações posteriores associadas com aparência envelhecida. Tradicionalmente, a pele não consegue retornar ao seu lugar de origem, levando ao acúmulo de dobras com ou sem sulcos ou depressões associados. O tecido perde seu suporte tornando-se ptótico. Para melhor entendimento de tais alterações, pode-se dividir a face em terços e observar as alterações nela ocorridas durante o envelhecimento facial.

Terço superior do rosto

O estresse dinâmico da testa é gerado pelas alterações configuracionais dos músculos frontais, sendo a mais comum a ptose da sobrancelha decorrente da atividade excessiva dos músculos frontais chamados de corrugador e prócerus. A diminuição do coxim gorduroso da sobrancelha se torna posteriorizada em relação à camada muscular desta, combinado com a presença de pele sobressalente e a atrofia óssea, provocando a ptose das sobrancelhas (Figura 1). Estas alterações levam à aparência aprofundada e submersa desta região. Os músculos frontais são freqüentemente utilizados para elevar as sobrancelhas ptosadas produzindo mais rugas dinâmicas frontais (Figura 2). Outra alteração muito comum no envelhecimento é o aparecimento de linhas radiais no canto dos olhos, conhecidas popularmente como pés-de-galinha. Elas surgem devido ao efeito do movimento de um dos músculos periorbitais incapazes de manter a sustentação deste contorno após o contínuo movimento de esticar e puxar (DZUBOW, 2000).



Figura 1. Ptose das sobrancelhas (DZUBOW, 2000).

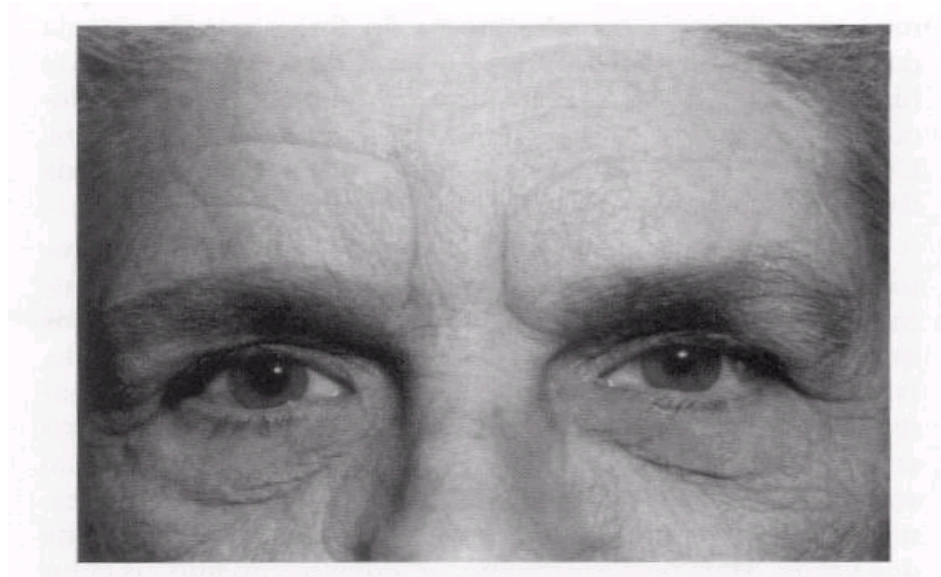


Figura 2. Rugas dinâmicas frontais (DZUBOW, 2000).

Terço medial do rosto

As modificações no terço medial da face pela idade compreendem as pálpebras, bochechas e nariz. A ptose palpebral é resultante do alongamento e falta de elasticidade dos tendões dos cantos lateral e medial das pálpebras associado à diminuição do tônus do músculo orbital, produzindo uma instabilidade da posição da pálpebra, a qual pode levar ao desenvolvimento ectrópio ou endotrópio. O nariz também sofre alterações estruturais. A ponta do nariz cai causando ptose da ponta do nariz (Figura 3), devido ao esticamento e falta de elasticidade do sistema que sustenta esta região. As bochechas também caem por causa da perda do coxim gorduroso bucal (HATZIS, 2004).

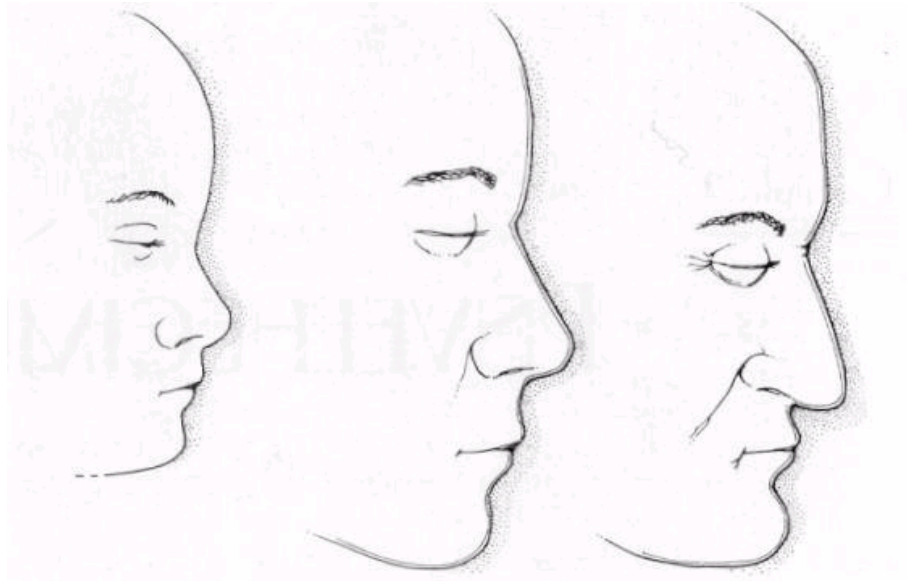


Figura 3. Ptose da ponta do nariz (DZUBOW, 2000).

Terço inferior do rosto

As alterações do terço inferior facial são mais drásticas. A diminuição do volume ósseo associada a ação gravitacional puxam a pele para baixo promovendo um excesso de tecido facial caído chamado de papadas. O sulco nasogeniano formado é derivado das intersecções dos músculos elevadores do lábio no tecido dérmico do sulco naso-labial. À medida que o tecido subcutâneo diminui com a idade e a pele excessiva se forma, o tecido redundante escorre sobre o ponto de inserção muscular no sulco (HATZIS, 2004). A Figura 4 apresenta as diferenças anatômicas existentes entre o sulco nasogeniano de uma criança (A) e de um idoso (B).

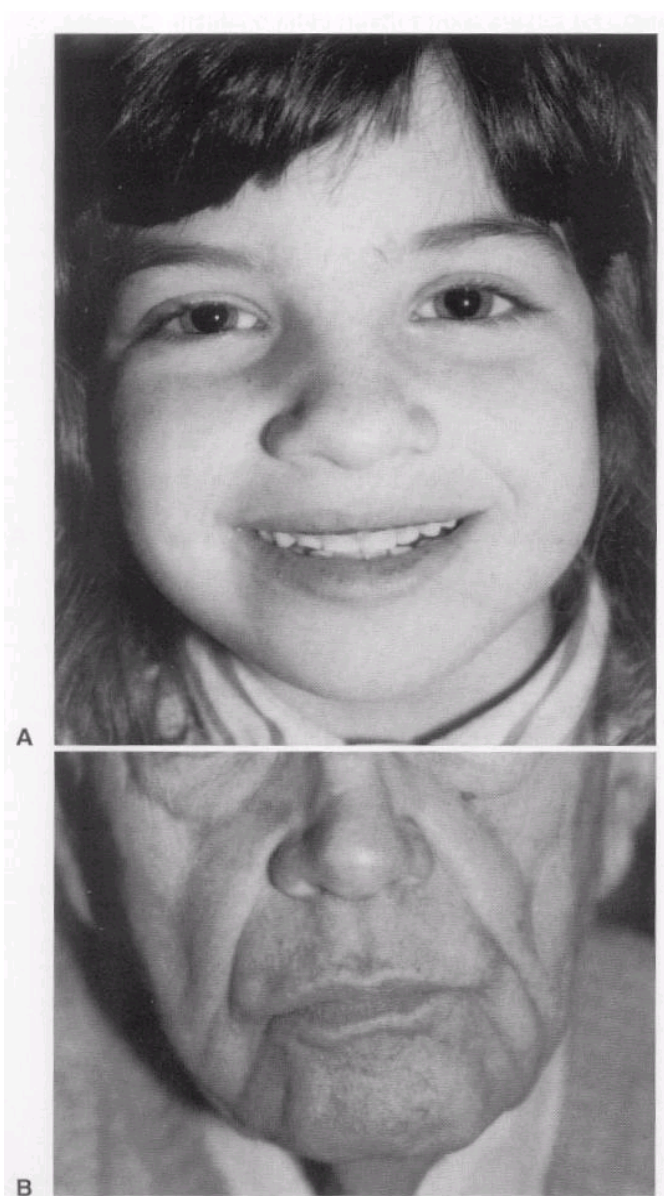


Figura 4. Diferenças anatômicas existentes entre o sulco nasogeniano de uma criança (A) e de um idoso (B) (DZUBOW, 2000).

De acordo com DZUBOW (2000), a deformidade em pescoço de peru decorre da redundância da pele (rugas gravitacionais) em conjunto com uma separação congênita dos músculos do platisma e protusão da gordura submentoniana (Figura 5).

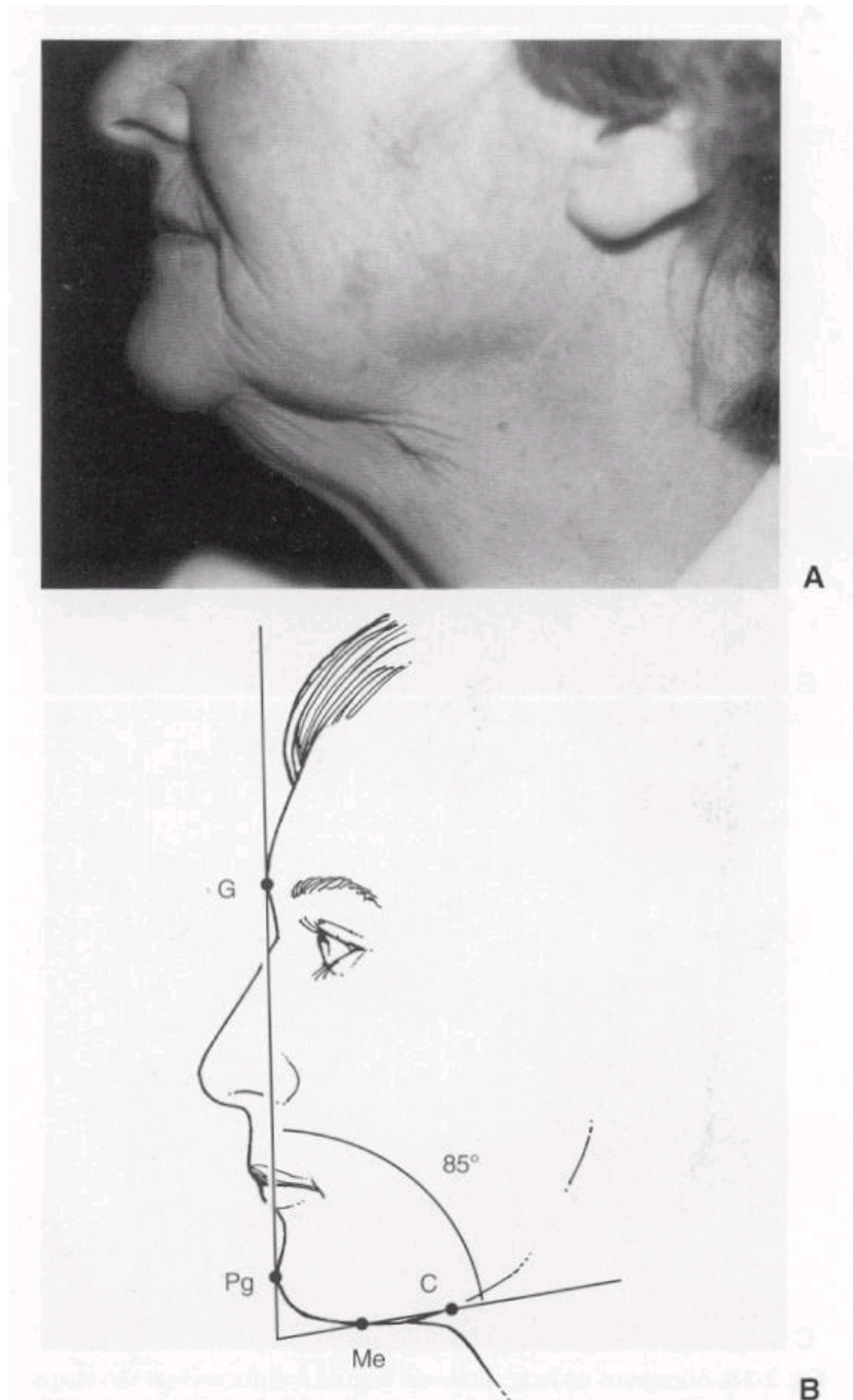


Figura 5. Comparação do papo de peru (A) com o desenho de uma papada normal de um jovem (B) (DZUBOW, 2000).

KLIGMAN e colaboradores (1985) classificaram as rugas em dois tipos: rugas entrelaçadas e rugas lineares do rosto. HATZIS (2004) afirma que as rugas entrelaçadas aparecem na pele que sofreu degeneração causada pela radiação solar, caracteristicamente no pescoço (Figura 6), enquanto as rugas lineares são as primeiras a tomarem o lugar das linhas

de expressão e são consideradas as pioneiras no envelhecimento da pele. Elas aparecem preferencialmente perpendiculares às fibras musculares do rosto. No caso de pele de pessoas jovens, este tipo de ruga desaparece quando os músculos faciais são contraídos; em peles envelhecidas, tornam-se permanentes.

As rugas lineares faciais são diferenciadas de acordo com quatro padrões (HATZIS, 2004):

- ✓ Linhas horizontais da testa (Figura 7);
- ✓ Sulcos na lateral dos olhos, conhecidos como pés de galinha (Figura 8);
- ✓ Rugas que nascem no nariz e ao redor da boca;
- ✓ Rugas faciais em fumantes, que representam um tipo especial de rugas prematuras, que também aparecem mais freqüentemente em mulheres.



Figura 6. Rugas entrelaçadas em uma mulher de 65 anos (HATZIS, 2004).

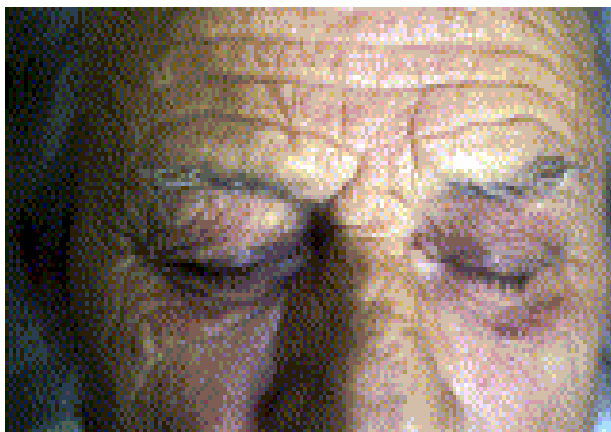


Figura 7. Linhas horizontais na testa de um homem de 75 anos (HATZIS, 2004).



Figura 8. Pés de galinha na lateral dos olhos de um homem de 58 anos (HATZIS, 2004).

Uma classificação de rugas mais recente foi descrita por PIÉRARD e colaboradores (2003), que distinguiram quatro tipos de rugas, de acordo com seu aspecto histológico e patogênico: atróficas, elásticas, de expressão e gravitacionais, sendo que as maiores diferenças estruturais entre elas podem ser encontradas principalmente na derme.

As rugas atróficas são rugas finas, paralelas entre si e que desaparecem quando colocada uma tensão transversal na pele (Figura 9). Elas se formam de acordo com a postura do corpo e aparecem devido à atrofia dos feixes de colágeno da camada dérmica reticular e da margem conectiva da epiderme. A presença de rugas está associada à diminuição da propriedade mecânica da pele e elasticidade (PIÉRARD et al., 2003).



Figura 9. Rugas atróficas (PIERARD et al., 2003).

As rugas elásticas tornam-se linhas permanentes pela ação da exposição solar. Quando estão totalmente desenvolvidas, tornam a pele mais rígida. São encontradas tipicamente nas bochechas, acima dos lábios e no nariz (Figura 10). A acumulação de elastose pode torná-las marcas permanentes, sendo este tipo de ruga muito menos proeminente em pessoas com pele escura que em peles claras (PIÉRARD et al., 2003).

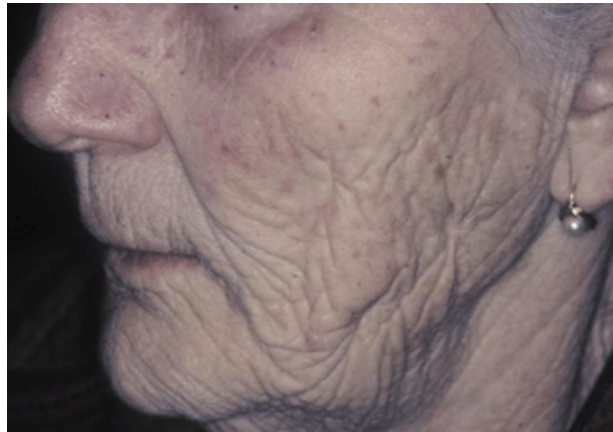


Figura 10. Rugas elásticas (PIÉRARD et al., 2003).

As rugas de expressão se tornam linhas permanentes principalmente de acordo com as forças impostas nos músculos faciais (Figura 11). As linhas do franzimento da testa e as linhas periorbitares são exemplos típicos deste tipo de rugas e possuem sua raiz no local conectivo da hipoderme com as margens (PIÉRARD et al., 2003).



Figura 11. Rugas de expressão na testa e nas bochechas de uma senhora (PIÉRARD et al., 2003).

As rugas gravitacionais são denominadas assim porque são resultantes da força gravitacional imposta no tecido que induz à formação de dobras e vergações da pele que perdeu sua rigidez por causa da perda da remodelação do tecido na hipoderme (PIÉRARD et al., 2003).

Um grande número de técnicas vem sendo desenvolvidas para a avaliação de rugas, como profilometria, técnicas tridimensionais, técnica de microscopia eletrônica e técnicas de microscopia confocal (AKAZAKI & IMOKAMA, 2001; AKAZAKI et al., 2002; ASPRES et al., 2003).

AKAZAKI e colaboradores (2002) citam como técnicas modernas empregadas a profilometria bidimensional com análise de imagens, observação da pele em microscópio eletrônico de varredura, ultra-sonografias, ressonância magnética, tomografia óptica, lasers e outras tecnologias digitais que mapeam a pele e ajudam a transcrevê-la em esculturas.

A ultra-sonografia cutânea mostra as alterações nas camadas celulares causadas pela ação da luz solar e envelhecimento cutâneo, indicando a evolução da resposta imune inflamatória, fibrose causada pela exposição da pele à radiação ionizante e até mesmo o grau de hidratação cutânea. A ressonância magnética capta imagens de diferentes regiões do corpo com o auxílio de um computador. É mais utilizada para estudar as reações alérgicas, efeito vasoconstritivo dos corticosteróides e no diagnóstico diferencial de tumores da pele, além de montar imagens das camadas da pele, sem precisar de uma biópsia ou exame laboratorial invasivo. A tomografia óptica permite a diferenciação do estrato córneo, epiderme e derme em um indivíduo (ASPRES et al., 2003).

Os métodos profilométricos são métodos clássicos que reproduzem modelos dos enrugamentos da pele, mostrando a impressão da superfície cutânea e a interface dos enrugamentos. São muito utilizados para medição do tamanho das rugas através da aplicação de silicone sobre a superfície da pele do indivíduo, de forma a obter uma escultura da pele analisada (HATZIS, 2004).

Os métodos de microscopia eletrônica podem medir a profundidade e a largura das rugas, enquanto os métodos de microscopia confocal medem apenas a largura das mesmas. Já os métodos tridimensionais permitem a obtenção do volume, área superficial, profundidade, largura, comprimento e número de rugas. Porém, a metodologia empregada neste método pode acarretar alguns erros técnicos indesejáveis, como o aparecimento de deformações

causadas pela opressão do material durante a sua aplicação e penetração dos reagentes usados nos experimentos nas partes profundas das rugas (AKAZAKI & IMOKAWA, 2001).

A profundidade e largura das rugas na região dos olhos são freqüentemente medidas pelo método tridimensional direto. AKAZAKI e colaboradores (2002) compararam as medidas de rugas obtidas por este método com a medida obtida pelo método de escultura. A profundidade em μm de cada ruga determinada pelo método tridimensional direto *in vivo* demonstrou que esta medida é sempre maior, o que permite concluir que o método de escultura não atinge as partes finas das rugas, sugerindo a superioridade do método tridimensional direto. Por outro lado, obteve-se o mesmo tamanho de largura das rugas nas duas técnicas.

O método tridimensional direto também pode apresentar algumas dificuldades como interferência da difusão da luz na morfologia tridimensional das rugas; manutenção da projeção da luz em um ângulo constante e redução da precisão da medida por interferência da pigmentação epidérmica. Existe também outra dificuldade mecânica que é a existência de finas fendas interrompidas por grandes rugas, que tornam as linhas obtidas na imagem descontínuas, causando a imprecisão das medidas (AKAZAKI et al., 2002).

Outra técnica empregada é a fotografia de filme 35 mm. Trata-se de uma técnica tradicional que representa a condição da pele do modo como é visualizada macroscopicamente, além de ser fácil e de grande utilidade para arquivo médico, aprendizagem e fins diagnósticos. A fotografia ultravioleta (UV) é mais avançada e utiliza o princípio da absorção da radiação UVA através da melanina da pele até atingir a derme, estimulando a emissão de fluorescência das fibras colágenas. Logo, é de extrema importância na documentação de mudanças na pigmentação da pele e danos causados pela radiação solar (ASPRES et al., 2003).

Atualmente, são muito empregadas as fotografias digitais, que possuem inúmeras aplicações clínicas, como a detecção de lesões na pele que podem ser guardadas e monitoradas pelo dermatologista através da sobreposição destas imagens na tela do computador, permitindo a verificação de possíveis alterações cutâneas durante um tratamento dermatológico e até mesmo em diagnóstico de tumores epiteliais. A ultra-sonografia a laser é uma análise espectrofotométrica da pele que envolve a sua iluminação com diferentes microondas no espectro visível e infravermelho. Sabendo que diferentes tecidos produzirão

diferentes leituras no espectro, com a ajuda de um computador, pode-se construir a imagem digital de cada estrutura cutânea (ASPRES et al., 2003).

Outro método aceito para avaliação de rugas e outras estruturas humanas é a planimetria por contagem de pontos. Esse é um método acurado e rápido, no qual utiliza-se sistemas, como grades, com pontos em intervalos regulares. Cada ponto corresponde a um polígono, cuja área deve ser conhecida (MANDARIM-DE-LACERDA, 1994).

Atualmente, observam-se vários tipos de tratamentos com a finalidade de retardar o envelhecimento, amenizando as rugas. Tais tratamentos podem ser divididos em tratamentos físicos e químicos. Dentre os físicos, a estimulação microgalvânica tem sido muito utilizada, uma vez que permite a compilação dos efeitos intrínsecos da corrente galvânica e da inflamação aguda para a recuperação tecidual (GUIRRO & GUIRRO, 2002). Tais métodos, todavia, apresentam uma série de inconvenientes, principalmente relacionados ao fato de serem invasivos, o que faz com que haja menor adesão ao tratamento. Logo, pode-se recorrer aos tratamentos químicos, os quais geralmente são não invasivos e, conseqüentemente, de grande aceitação pela população.

Dentre os tratamentos químicos destacam-se o *peeling* químico, o *peeling* físico, a aplicação de toxina botulínica e utilização de produtos cosméticos. O *peeling* químico, também chamado de quimioesfoliação, baseia-se na aplicação de agentes cáusticos à pele, produzindo destruição controlada da epiderme e sua reepitelialização. Propicia melhoramento da aparência da pele danificada por fatores extrínsecos, intrínsecos e também por cicatrizes remanescentes. Pode ser dividido em *peelings* superficiais, médios e profundos e geralmente são empregadas como substâncias ativas os alfa-hidroxiácidos (AHAs), beta-hidroxiácidos (ácido salicílico), ácido tricloroacético (TCA), resorcinol, ácido azelaico, solução de Jessner, dióxido de carbono (CO₂) sólido e tretinoína (VELASCO, 2004).

O *peeling* físico consiste na aplicação de produtos que contêm substâncias abrasivas, como microesferas de polietileno ou sílica, para remover células mortas e aumentar a permeabilidade cutânea para absorção de outros princípios ativos (AYHAN et al., 1998).

A toxina botulínica tipo A (Botox[®]) trata-se de um complexo de proteínas produzido pela bactéria *Clostridium botulinum*. Pequenas doses da toxina botulínica purificada injetável podem bloquear a liberação pelas células nervosas de acetilcolina, a qual sinaliza a contração muscular normalmente. Ao interferir seletivamente com a capacidade de contração dos músculos, as linhas de expressão são suavizadas (DASTOOR et al., 2007).

Além disso, cosméticos contendo substâncias ativas que visam tornar a pele mais saudável, regulando a produção de queratinócitos e o sistema de pigmentação, corrigir o processo de deterioração das fibras elásticas e colágenas e combater os radicais livres, como é o caso do palmitato de retinol, têm sido muito empregados (KEDE & SABATOVICH, 2004).

2.3. Palmitato de retinol (Vitamina A palmitato)

As primeiras observações relativas à vitamina A (VA) aparecem no período que se estende do fim do século XIX à Primeira Guerra Mundial (MAIA CAMPOS, 1990). A VA foi a primeira vitamina lipossolúvel a ser reconhecida, fato ocorrido em 1913, e desde então numerosos estudos vêm sendo conduzidos a fim de elucidar suas funções. Inicialmente, seu papel era apenas reconhecido na fisiologia do sistema visual. Atualmente, ela também é usada topicamente para o controle e prevenção de rugas, celulite, estrias e acne (SHAPIRO & SALIOU, 2001; GOMES et al., 2005).

As fontes alimentares mais comuns de VA são os órgãos de animais (coração, rins, fígado), os ovos, os laticínios e os peixes. Sua atividade também deriva de alguns carotenóides vegetais que ocorrem nas cenouras e nas verduras. Só os carotenóides que possuem pelo menos um anel não hidrosilado de β -ionona (α -, β - e γ -caroteno e criptoxantina) podem ser convertidos em VA e, portanto, podem ser chamados de pró-vitamina A (MAIA CAMPOS, 1990; ROBBERS et al., 1997).

A VA atua sobre a visão, sobre o crescimento e diferenciação tecidual. Sua deficiência pode acarretar várias doenças, entre as quais cegueira noturna, xerofthalmia, hiperqueratose cutânea, retardo do crescimento e pouca resistência à infecção. A função da VA na diferenciação tecidual pode ter relação com a síntese de glicoproteínas específicas (receptores ou reguladores celulares). Estudos indicam que a sua deficiência provoca um declínio no nível plasmático de uma macroglobulina que inibe as collagenases e outras proteinases da córnea. A consequência disso pode ser o desenvolvimento de lesões da córnea (ROBBERS et al., 1997; FU et al., 2002).

Pode-se dizer que a VA é a designação dada a todos os derivados da β -ionona (exceto os carotenóides) que possuem atividade biológica do *trans*-retinol. Logo, o termo geral para a VA (retinol) e seus derivados é retinóide (ROBBERS et al., 1997).

A função principal dos retinóides na pele relaciona-se à hiperproliferação da epiderme com aumento de estrato espinhoso e granuloso. Os efeitos estimulantes da VA e de seus derivados, na pele, tendem a combater as mudanças que ocorrem com o envelhecimento. A pele envelhecida mostra epiderme mais fina, camada de queratina também fina, malformada e reduzida a uma única camada de células contendo grânulos de queratina. Todos esses sinais de atividade reduzida tendem a ser combatidos pela aplicação tópica de doses adequadas de VA ou seus derivados, que contribuem para deixar a pele mais lisa e macia e, conseqüentemente, com aparência mais jovem e saudável (COUNTS et al., 1988; LEONARDI, 2004).

O retinol é a principal forma natural dessa vitamina, mas entre suas formas conhecidas estão os ésteres de acetato e palmitato de álcool e produtos de oxidação como o retinol, o ácido retinóico e o 3-deidrorretinol. As formas de ésteres têm boas características de estabilidade e os ésteres de acetato e palmitato do *trans*-retinol sinteticamente preparados são as principais formas comerciais de vitamina A (ROBBERS et al., 1997).

A isotretinoína ou ácido 13-*cis*-retinóico pode ser empregado por via oral em situações especiais. Seu uso é aprovado para acne cística recalcitrante. O uso desse produto deve ser acompanhado de perto, pois são comuns as reações indesejáveis, que podem exigir a interrupção do uso (ROBBERS et al., 1997).

A tretinoína ou ácido *trans*-retinóico, por sua vez, é encontrada em várias fórmulas (creme, gel e solução) para uso tópico. Ela parece aumentar a mitose e a rotatividade das células da epiderme, sendo usada para tratar a *acne vulgaris* (ROBBERS et al., 1997).

Assim, o ácido retinóico estimula os queratinócitos e a proliferação de fibroblastos, resultando em aumento na produção de colágeno, sendo responsável pela firmeza, maior espessura e resistência de traumas na derme, o que explica a atenuação das linhas de expressão e das rugas. A melhora da proliferação e maturação de queratinócitos resulta em uma textura mais lisa da superfície cutânea (SHAPIRO & SALIOU, 2001).

A vitamina A palmitato, ou palmitato de retinol (PR), por combater mudanças que ocorrem durante o envelhecimento e devido à sua maior estabilidade em relação à forma álcool, tem sido uma substância bastante empregada em produtos cosméticos (LEONARDI, 2004; MAIA CAMPOS, 1990). Sua fórmula molecular é $C_{36}H_{60}O_2$ e sua massa molar é 524,9 g/mol. O Parecer Técnico nº 3, de 22 de março de 2002, da Câmara Técnica de Cosméticos, que dispõe sobre a utilização de retinóides em produtos cosméticos, orienta que o PR seja

incorporado às preparações cosméticas na concentração máxima de 10.000 unidades internacionais – UI/g do produto acabado (BRASIL, 2002).

A Figura 12 apresenta a estrutura química do PR.

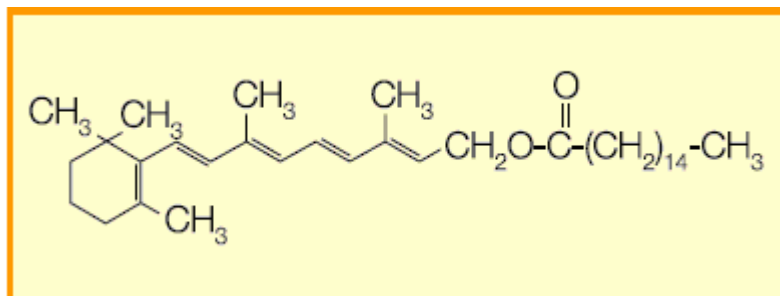


Figura 12. Estrutura química do palmitato de retinol (MAKENI CHEMICALS, 2004).

2.4. Sistemas nanoestruturados

Em soluções diluídas abaixo da concentração micelar crítica, as moléculas de tensoativo se auto-organizam formando soluções de agregados sejam em água ou em óleo. Aumentando a concentração de tensoativo, muitos sistemas isotrópicos e anisotrópicos poderão ser formados. O comportamento de fase torna-se mais estruturado quando estão presentes água, óleo e tensoativo, formando os mais variados tipos de sistemas, como emulsões, microemulsões e mesofases líquido-cristalinas (cristais líquidos) de diferentes geometrias (URBAN, 2004).

De acordo com GUTERRES e colaboradores (2007), os sistemas nanoestruturados, como nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, microemulsões, lipossomas e niossomas, têm sido desenvolvidos como uma alternativa aos promotores químicos clássicos de permeação cutânea, modulando e modificando a permeação de substâncias ativas.

Dentre os sistemas nanoestruturados, destacam-se as microemulsões. As microemulsões e emulsões são sistemas cujas interfaces são isentas de qualquer tipo de ordem orientacional, enquanto que os cristais líquidos caracterizam-se essencialmente pela presença dessa ordem orientacional (URBAN, 2004).

O termo microemulsão foi introduzido na literatura na década de 1940, mais precisamente em 1943, por Hoar e Schulman para definir um sistema fluido e translúcido obtido pela titulação até o ponto de clarificação de uma emulsão simples (óleo e água eram misturados com quantidades grandes de tensoativo iônico), com um álcool de cadeia média como o hexanol ou o pentanol. No ponto de clarificação não foi necessária agitação e uma dispersão transparente foi formada espontaneamente (OLIVEIRA et al., 2004). Segundo CUNHA JUNIOR e colaboradores (2003), Hoar e Schulman observaram, através de microscopia eletrônica, que as dispersões transparentes formadas eram constituídas de microgotículas de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) cercadas por um filme interfacial misto de tensoativo e co-tensoativo. O tamanho das gotículas variava de 100 a 600 nm, significativamente menor que o das emulsões simples iniciais, justificando seu aspecto transparente e o termo microemulsão.

Este termo foi revisado muitas vezes e a definição de Danielsson e Lindman em 1981 tem sido a mais aceita, a qual descreve que “as microemulsões são soluções líquidas, opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis, compostas de água, óleo e tensoativo” (CUNHA JUNIOR et al., 2003). As microemulsões podem vir associadas ou não a um co-tensoativo (OLIVEIRA et al., 2002; CUNHA JUNIOR et al., 2003; SINTOV & SHAPIRO, 2004). Segundo WARR (1995), microemulsões são líquidos que se compõem de água, óleo imiscível e um tensoativo localizado na interface entre os dois líquidos como uma monocamada.

Enquanto as emulsões são estabilizadas por agentes emulsivos comuns (tensoativos), as microemulsões podem conter co-tensoativos, cuja função é diminuir a tensão interfacial para valores abaixo dos limites proporcionados pelo tensoativo comum. No entanto, nos casos em que os tensoativos são capazes de cumprir integralmente essa função, a presença dos co-tensoativos não é necessária (OLIVEIRA et al., 2004). Os co-tensoativos também promovem fluidificação do filme interfacial formado pelo tensoativo, o que impede a elevação significativa da viscosidade do sistema obtido. Os principais co-tensoativos utilizados no preparo das microemulsões são álcoois e glicóis de baixa massa molecular e que apresentam uma cadeia carbônica entre dois e dez carbonos (OLIVEIRA et al., 2002; CUNHA JUNIOR et al., 2003; SINTOV & SHAPIRO, 2004).

VALENTA & SCHULTZ (2004), por sua vez, afirmam que alguns sistemas isotrópicos podem ser formados por tensoativos sem a necessidade da adição de um co-

tensoativo, sendo comprovada a estabilidade das microemulsões sem a presença deste componente. Este fato é muito interessante para aplicações tópicas, pois muitos dos co-tensoativos possivelmente podem levar a efeitos irritativos na pele. Logo, quanto menos tensoativo, menor a possibilidade de irritação mediante uso tópico.

Microemulsões são consideradas sistemas reservatórios, onde o fármaco encontra-se separado do meio de dissolução através de um revestimento, uma membrana ou simplesmente uma interface, a qual deve ser transposta para liberação do fármaco para o meio. Elas proporcionam um ambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, capazes de ligar ou associar moléculas de diferentes grupos de fármacos, com o objetivo de solubilizar, modular estabilidade ou melhorar o perfil de biodisponibilidade (OLIVEIRA & SCARPA, 2001).

No conceito de interface, pode-se imaginar uma superfície, a partir da qual duas regiões podem ser descritas: uma região externa representada pelo meio dispersante e que, geralmente, é de natureza aquosa e outra representada pela própria interface, com características particulares e propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante. Microemulsões representam bons exemplos de interface em cuja superfície uma série de fenômenos pode ocorrer, sendo considerado um sistema transportador capaz de direcionar a substância ativa para sítios específicos onde devem exercer seu efeito farmacológico, além de poder modular a velocidade de liberação, em função do tempo, sem alterar a estrutura química da molécula transportadora (OLIVEIRA & SCARPA, 2001).

De acordo com SINTOV & SHAPIRO (2004), o aspecto óptico desses sistemas resulta do fato de que as gotículas da fase dispersa são menores do que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente, ou seja, aproximadamente 150 nm. Logo, as partículas não espalharão luz, resultando num sistema opticamente transparente. O diâmetro das gotículas de microemulsões estáveis normalmente é entre 10-100 nm (100Å - 1000Å), enquanto que o diâmetro de uma emulsão comum é da ordem de 5000Å .

A orientação para que o sistema seja O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, traduzidas principalmente pelo seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo – EHL (OLIVEIRA et al., 2004).

A Figura 13 representa esquematicamente a organização das microemulsões.

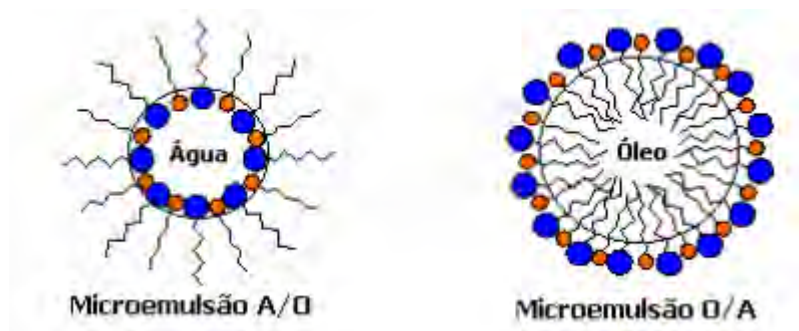


Figura 13. Estrutura das gotículas de microemulsão A/O e O/A (OLIVEIRA et al., 2004).

A escala de EHL foi introduzida pela primeira vez em 1948 por Griffin, permitindo classificar, numericamente, um composto segundo suas características de hidrofília e lipofília (BARATA, 1995; PRISTA et al., 2002).

Segundo CUNHA JUNIOR (2003), os valores da escala variam de zero a vinte, em função do tamanho da cadeia polar presente nas moléculas do tensoativo. Para PRISTA e colaboradores (2002), os valores de EHL variam de 1 a 50, aumentando estes à medida que a substância se torna mais hidrófila.

A partir da escala Griffin as substâncias são classificadas como agentes antiespuma (EHL entre 1 a 3); agentes tensoativos A/O (EHL entre 3 a 9); agentes tensoativos O/A (EHL entre 8 a 16) e agentes solubilizantes (EHL entre 16 a 18) (PRISTA et al., 2002).

Os valores inferiores a 10 indicam predominância da parte apolar, o que significa que essas substâncias são adequadas para o preparo de emulsões A/O enquanto àquelas que possuem valores superiores a 10 apontam a prevalência da região polar e, conseqüentemente, o seu emprego na obtenção de emulsões O/A (CUNHA JUNIOR et al., 2003).

O tratamento tópico de muitas doenças é freqüentemente limitado pela baixa permeabilidade cutânea das substâncias ativas. Muitos trabalhos têm indicado que os sistemas nanoestruturados, dependendo dos componentes utilizados na sua constituição, podem alterar a liberação cutânea e transdérmica de substâncias ativas hidrofílicas e lipofílicas quando comparadas com outras formulações tópicas convencionais, como pomadas, cremes, géis e loções (DREHER et al., 1997; SCHMALFU et al., 1997).

O aumento da liberação de princípios ativos pode ser explicado por meio de diferentes mecanismos. A composição e a estrutura desses sistemas possibilitam a incorporação de grandes quantidades de substâncias ativas, além de apresentarem alto potencial de solubilização de substâncias poucos solúveis (BAROLI et al., 2000; PELTOLA et al., 2003).

Outro mecanismo pode estar relacionado à potencialidade desses sistemas em criarem um ambiente favorável para partição da substância ativa para a pele e favorecer sua penetração no estrato córneo (BAROLI et al., 2000; ALVAREZ-FIGUEROA & BLANCO MENDEZ, 2001). Além disso, dependendo dos constituintes dos sistemas e pelo fato de apresentarem baixa ou nula tensão interfacial, a barreira difusional da pele pode ser modificada de maneira a facilitar a penetração no estrato córneo, aumentando a absorção percutânea (PARK & KIM, 1999; BAROLI et al., 2000; LEHMANN et al., 2001; PAOLINO et al., 2002; GUTERRES et al., 2007).

Outro ponto a ser destacado é a capacidade dos sistemas microemulsionados melhorarem a solubilidade e estabilidade dos fármacos, além de proporcionarem ação prolongada, vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo e poderem veicular substâncias ativas com diferentes graus de hidrofília/lipofília na mesma formulação (OLIVEIRA et al., 2002; CUNHA JUNIOR et al., 2003; SINTOV & SHAPIRO, 2004).

A presença de tensoativos aumenta a permeabilidade da membrana celular, o que facilita a absorção do fármaco, possibilitando uma maior biodisponibilidade. Além disso, devido à formação espontânea desses sistemas, fatores como intensidade e duração da agitação, temperatura, tempo de emulsificação, entre outros, podem ser evitados (CUNHA JUNIOR et al., 2003). Estes sistemas espontaneamente formados possuem propriedades físico-químicas específicas como transparência e estabilidade termodinâmica (SINTOV & SHAPIRO, 2004). Esses fatores tornam os sistemas nanoestruturados bastante atrativos do ponto de vista da produção farmacêutica (CUNHA JUNIOR et al., 2003).

Contudo, é importante considerar também que, devido às altas concentrações de tensoativos presentes nas microemulsões, estas podem levar à irritação cutânea. Dessa forma, torna-se necessário desenvolver veículos que facilitem o transporte de substâncias ativas através da pele por aumentar a penetração no estrato córneo sem causar maiores danos ao tecido (THEVENIN et al., 1996).

2.4.1. Microemulsão: diagrama de fases

Quando se modifica a composição de uma mistura de solventes miscíveis, as mudanças que se produzirão na solução podem acarretar importantes variações nas

propriedades termodinâmicas dos compostos que a compõe. Por outro lado, as observações dessas propriedades e sua evolução com a composição da solução podem fornecer informações específicas sobre a estrutura do meio (OLIVEIRA & SCARPA, 2001).

As microemulsões, com o aspecto de solução homogênea, mas com estrutura microheterogênea, constituem um campo de aplicação desse tipo de estudo. Nos sistemas microemulsionados, o objetivo principal é obter uma combinação entre os componentes, de modo a conseguir uma "solubilização" máxima da fase interna ou dispersa. O diagrama de fases descreve em que condição experimental é possível se obter microemulsões e as regiões limites de transição entre emulsões, separações de fases e microemulsões O/A e A/O (OLIVEIRA et al., 2004).

O modo mais usual de descrever esses sistemas, que podem apresentar de três a quatro componentes, é através do diagrama de fases pseudoternário, onde fase aquosa, fase oleosa e mistura de tensoativo/co-tensoativo são representadas nos vértices do triângulo. Esse tipo de diagrama também suporta outras misturas, como por exemplo, óleo, co-tensoativo e água/tensoativo (OLIVEIRA et al., 2004).

Outra forma de representar o sistema é por meio do diagrama de fases quaternário, onde tensoativo, co-tensoativo e água estão representados nos vértices do triângulo e o óleo na projeção bidimensional do mesmo. Neste caso, o primeiro triângulo corresponde a zero de óleo e, portanto, a um sistema de micelas mistas contendo água e tensoativo/co-tensoativo. Por isso, muitas vezes as microemulsões são tratadas como uma extensão de soluções micelares (OLIVEIRA & SCARPA, 2001).

Se a água e o óleo forem misturados com um tensoativo capaz de produzir uma emulsão leitosa, e essa emulsão for titulada com um co-tensoativo apropriado até formar um sistema opticamente transparente, pode-se determinar a relação tensoativo/co-tensoativo ideal para a obtenção da microemulsão (OLIVEIRA et al., 2004).

Segundo OLIVEIRA e colaboradores (2004), o diagrama de fases é definido para cada relação tensoativo/co-tensoativo. Para isso, pode-se preparar misturas binárias dos componentes, correspondentes a cada lado do triângulo.

Um exemplo é uma mistura de tensoativo (T) com fase oleosa (O) em várias proporções, titulando-se com a fase aquosa (A). Essas titulações são representadas, no diagrama, pelas linhas traçadas direcionadas ao infinito de fase aquosa, isto é, convergentes ao vértice do triângulo que representa 100% de fase aquosa (Figura 14a). O mesmo

procedimento pode ser utilizado para a mistura de tensoativo (T) com fase aquosa (A) titulada com a fase oleosa (O).

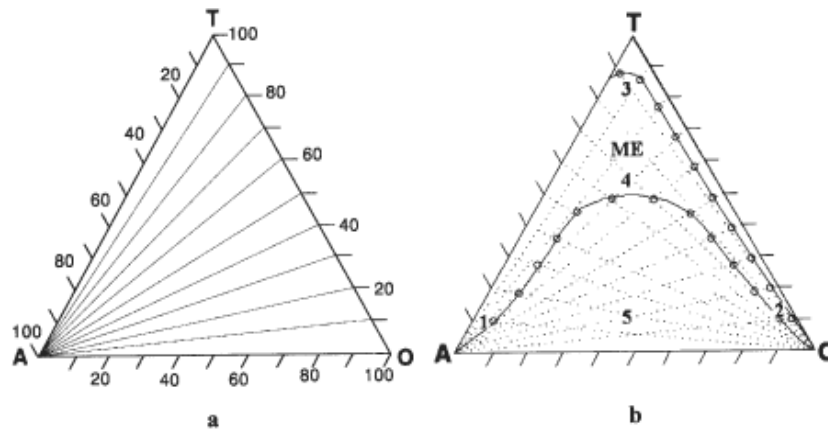


Figura 14. Diagrama de fases – (a) titulação com fase aquosa; (b) representação dos pontos de titulação e regiões do diagrama de fases (OLIVEIRA et al., 2004).

Normalmente, esses dois procedimentos são suficientes para se definir o diagrama de fases (Figura 14b). Os pontos da titulação referem-se às modificações verificadas no sistema, tais como separação de fases, sistema transparente líquido, sistema transparente gel, sistema opaco, etc. Esses pontos são calculados a partir das novas proporções entre os componentes da microemulsão depois da titulação (OLIVEIRA et al., 2004).

A região denominada de microemulsão, na Figura 14b, representa o domínio da existência do sistema opticamente transparente. As regiões 1-5 da Figura 14b descrevem as condições experimentais da existência dos diferentes tipos de sistemas (OLIVEIRA et al., 2004).

A região 1 representa um grande predomínio de fase aquosa, podendo-se observar pequena concentração relativa de tensoativo (<20%), representando microemulsão O/A. Numa diluição infinita com fase aquosa o sistema tende à formação de micelas mistas da mistura emulsiva, contendo a fase oleosa dissolvida em seu interior hidrofóbico.

A região 2, na qual predomina a fase oleosa, é pobre em fase aquosa e em mistura emulsiva, representando microemulsão A/O. Numa diluição infinita tende a formar micelas reversas, compostas por grande parte de fase externa oleosa, com fase aquosa dissolvida nas micelas inversas.

A região 3 é rica em mistura emulsiva, contém pouca fase aquosa e fase oleosa (Figura 14b). A estrutura que melhor representa essa região consiste de uma fase contínua onde a

mistura de tensoativo/co-tensoativo, óleo e água encontram-se em fase lamelar, em que tensoativo e co-tensoativo organizam-se na interface contínua óleo/água, separando ambas as fases.

A região 4 é intermediária entre as duas regiões (1 e 2) que possuem estruturas bem definidas (Figura 14b). A microestrutura do sistema corresponde a fases bicontínuas, as quais podem explicar a passagem gradual de um sistema O/A para A/O. Esse fenômeno pode ser acompanhado facilmente medindo-se a variação da condutividade, utilizando-se como parâmetro a adição de óleo numa microemulsão A/O ou de água numa microemulsão O/A.

A região 5 corresponde à região onde o sistema é muito instável e ocorre separação entre as fases aquosa e oleosa (Figura 14b).

A mistura dos constituintes da microemulsão nem sempre conduzirá a um sistema disperso homogêneo, podendo existir diferentes estruturas. Dependendo da natureza e do número de fases líquidas presentes, esses sistemas podem ser classificados no diagrama de fases de acordo com Winsor, que caracterizou alguns sistemas como: Região Winsor I – há equilíbrio entre fase oleosa com uma emulsão; Winsor II – constituída de uma fase aquosa em equilíbrio com uma emulsão; Winsor III – trifásica, contendo uma fase aquosa e outra oleosa, separadas por uma fase emulsionada; Winsor IV – região monofásica, representada por uma emulsão homogênea, conforme pode ser observado na Figura 15 (OLIVEIRA et al., 2004).

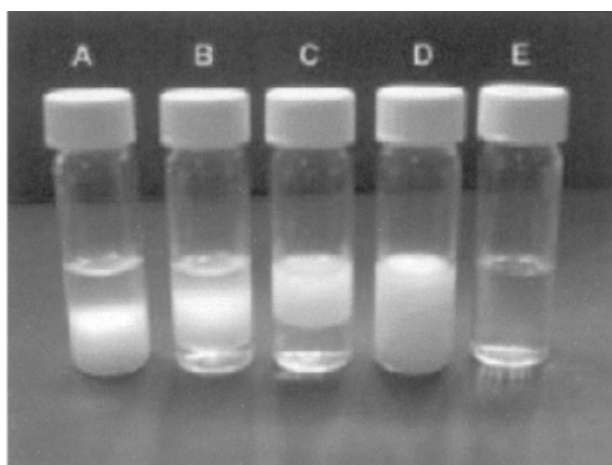


Figura 15. Emulsões obtidas com diferentes concentrações do tensoativo polietilenoglicol perfluoroalquilado com a fase oleosa brometo de perfluorooctila (BPF0). Representação da classificação de Winsor. (A) Winsor I (fase oleosa em equilíbrio com fase emulsionada). (B) Winsor III (fase emulsionada em equilíbrio com fase aquosa e fase oleosa). (C) Winsor II (fase aquosa em equilíbrio com fase emulsionada). (D) Winsor IV (emulsão homogênea). (E) Microemulsão (OLIVEIRA et al., 2004).

2.5. Cristais Líquidos

Os cristais líquidos (CLs) são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido. Em 1922, G. Friedel usou o termo “estado mesomórfico” (*mesos* – intermediário e *morphé* – forma) para definir este quarto estado da matéria; com isso, os cristais líquidos passaram a ser denominados como fases mesomórficas ou mesomórficas cristalinas. Apresentam, portanto, propriedades e características de sólidos e líquidos (FERRARI, 1998; FERRARI et al., 2004; MORAIS, 2006).

Esta fase intermediária apresenta propriedades características tanto de sólidos quanto de líquidos. Possui ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos, ou seja, esta mesofase tem propriedades mecânicas típicas do estado líquido, como fluidez e tensão superficial, mas certa ordem molecular; dessa forma, constitui uma fase fluida ordenada. A mesofase líquido-cristalina pode ainda, de acordo com o seu arranjo, exibir outras propriedades ópticas típicas do estado cristalino, como anisotropia (direção óptica), birrefringência e dicromismo (FERRARI, 1998; FERRARI et al., 2004; MORAIS, 2006).

Um sistema é anisotrópico quando todas as direções de propagação da luz não são equivalentes no seu interior e se a mesma propriedade é observada com intensidade variável em função da direção pela qual é avaliada (FERRARI, 1998).

A birrefringência, também conhecida como refração dupla, é encontrada em cristais, CLs ou em qualquer sistema anisotrópico. Ela é ocasionada pela variação da velocidade de uma onda de luz em diferentes direções. Um feixe individual de luz branca penetrando em um material separa-se em dois feixes, os quais são polarizados e vibram a ângulos retos, um em relação ao outro (FERRARI et al., 2004).

O dicromismo ocorre quando um componente de luz polarizada é absorvido mais fortemente que o outro. Em parte, ele irradia para o CL quando este é iluminado com luz natural. A coloração que apresenta, ao microscópio polarizado, é resultado da estrutura ordenada das moléculas, que por sua vez é semelhante àquela dos cristais verdadeiros. Quando a luz é branca, uma mistura de todas as cores reluz sobre um cristal líquido, a maioria das cores consegue atravessá-lo e uma pequena faixa de comprimento de onda é refletida e o cristal parece com a cor desses comprimentos de onda (FERRARI et al., 2004).

A fase líquida cristalina é termodinamicamente estável e representa o estado de fusão incompleto. A maioria dos compostos que apresentam este comportamento tem moléculas alongadas e possuem um ou mais grupos polares. Tais moléculas tendem a arranjar-se paralelamente, mantendo-se próximas por forças de Van der Waals (FERRARI et al., 2004; MORAIS, 2006).

Pode-se dividir os CLs em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. Os termotrópicos são formados pela influência da temperatura, são pouco estáveis e são substâncias orgânicas com estrutura molecular simbolizada pelos ésteres colestéricos (FERRARI, 1998; FERRARI et al., 2004; MORAIS, 2006). Os parâmetros relevantes nas transições de fase são basicamente a temperatura, e em menor grau a pressão, de onde vem a denominação termotrópica (BECHTOLD, 2005).

As estruturas líquido-cristalinas termotrópicas podem apresentar polimorfismo de fases, ou seja, o sistema pode passar por várias mesofases entre o sólido e o líquido isotrópico pela ação do calor. As transições de fase podem ser enantiotrópicas (quando a transição se dá tanto no ciclo de aquecimento quanto no de resfriamento) ou monotrópicas (quando a transição só é obtida no ciclo de resfriamento) (DUARTE, 2000).

Existem três subclasses de cristais líquidos intrínsecos: esmético; nemático (empregado principalmente para demonstrativos de aparelhos como relógios, calculadoras, televisão) e nemáticos quirais ou colestéricos, indicados para produtos cosméticos (SANTOS, 2006).

No caso de CLs esméticos, as moléculas estão arranjadas em camadas, isto é, com grau de ordem translacional. Nas camadas, os eixos moleculares se orientam preferencialmente ao longo de uma única direção. São conhecidos mais de dez tipos de mesofases que apresentam ordem esmética, com variação do ângulo entre o eixo molecular e as camadas. Em particular, numa fase esmética, os eixos longos moleculares são perpendiculares às camadas, ao longo de uma direção preferencial denominada de eixo diretor n , com seus centros de massa distribuídos aleatoriamente dentro das camadas, como mostrado na Figura 16 (DUARTE, 2000).

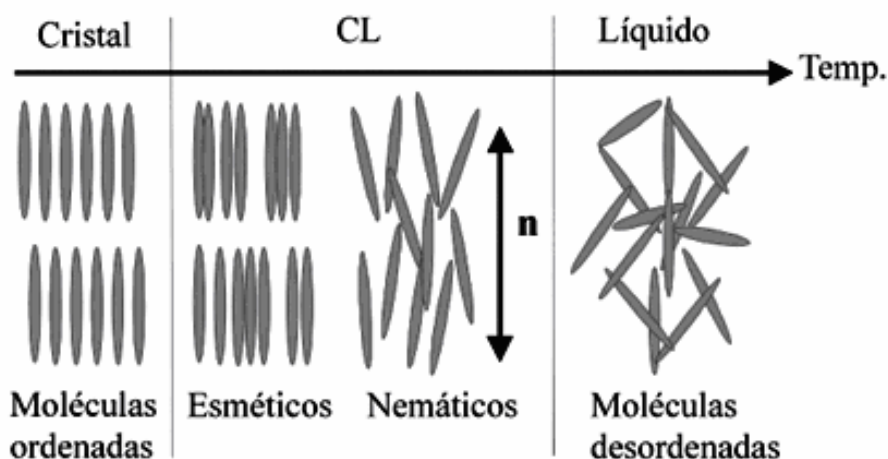


Figura 16. Esquema ilustrativo do aparecimento das mesofases líquido-cristalinas (BECHTOLD, 2005).

Na fase nemática, as moléculas apresentam ordem orientacional, ou seja, seus eixos maiores se alinham preferencialmente ao longo de uma dada direção privilegiada no espaço, sendo aquela do eixo diretor da fase n , sem ordem translacional (DUARTE, 2000).

Na mesofase colestérica, a estrutura líquido-cristalina é formada por moléculas quirais, as quais são caracterizadas por não possuírem simetria especular, isto é, são objetos que diferem de suas respectivas imagens especulares. A quiralidade foi descoberta por Pasteur pela separação dos enantiômeros dos cristais de tártaro de sódio-amônia (BECHTOLD, 2005).

Essa fase também apresenta uma direção de alinhamento preferencial das moléculas especificado pelo eixo diretor n , como a fase nemática. No entanto, este eixo diretor sofre um giro contínuo no espaço, gerando uma estrutura helicoidal, ilustrada na Figura 17, onde cada plano do colestérico tem as mesmas características que a fase nemática. A ausência de ordem translacional também confere razoável fluidez a essas mesofases (DUARTE, 2000).

Historicamente, a denominação colestérica foi conferida a esse tipo de mesofase, pois os primeiros materiais estudados que apresentam tal ordem foram os ésteres de colesterol (DUARTE, 2000).

As mesofases colestéricas apresentam dicroísmo por variação de temperatura, possuindo larga aplicação tecnológica principalmente na construção de sensores de temperatura. Apresentam uma reflexão seletiva da luz, sendo esse fato devido a variações provocadas por trocas em temperatura e pressão (BECHTOLD, 2005; DUARTE, 2000).

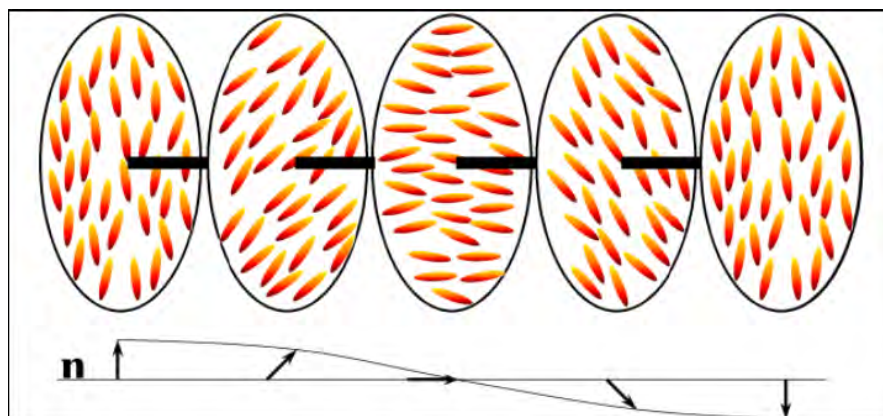


Figura 17. Arranjo estrutural de uma mesofase colestérica (DUARTE, 2000).

As primeiras observações de cristais líquidos liotrópicos foram feitas em 1950 por Elliott e Ambrose. Eles observaram a formação de uma fase líquida birrefringente dissolvendo-se poli-benzil-L-glutamato (PBLG) em clorofórmio. Estes cristais líquidos são misturas de compostos anfifílicos em um solvente, em geral a água. Os compostos anfifílicos são caracterizados por possuírem na mesma molécula dois grupos que diferem grandemente em suas propriedades de solubilidade. Uma parte da molécula é hidrofílica, altamente solúvel em água ou outros solventes polares, enquanto a outra parte é hidrofóbica, altamente solúvel em hidrocarbonetos ou solventes não-polares. Usualmente, pode-se dizer que estas moléculas são formadas por uma cabeça polar e uma cauda carbônica (BECHTOLD, 2005).

Nas misturas liotrópicas de moléculas anfifílicas, acima da concentração micelar crítica (CMC), formam-se aglomerados de moléculas que podem assumir formas e dimensões diferentes, chamadas micelas. Nas micelas, as cabeças hidrofílicas estão localizadas em permanente contato com a água, enquanto as caudas hidrofóbicas são mantidas no interior das micelas sem contato com o solvente, e mesmo após o aparecimento de micelas, continuam havendo moléculas anfifílicas dispersas na solução (Figura 18). Se utilizar solventes não-polares, serão formadas micelas reversas, onde a cauda fica na parte exterior em contato com o solvente e a cabeça polar no interior (BECHTOLD, 2005).

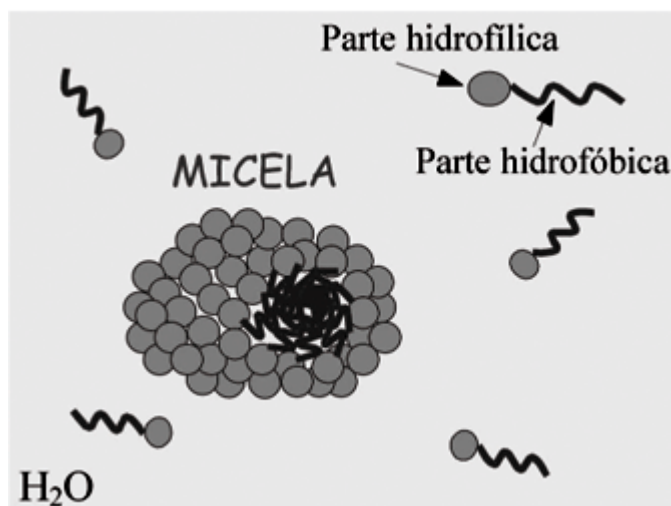


Figura 18. Esquema ilustrativo de cristais líquidos liotrópicos – representação de moléculas anfifílicas solúveis em água com formação de micelas (BECHTOLD, 2005).

A classe liotrópica depende da concentração de um material, um solvente que tenha papel ativo crítico na estrutura destes cristais líquidos e não simplesmente um veículo para as moléculas de tensoativo; ao contrário, é mais propriamente uma parte integrante da estrutura cristalina líquida. É formada quando certos compostos, geralmente agentes tensoativos, são tratados com solvente polar, mais comumente a água, que irá hidratar seletivamente a porção hidrofílica das moléculas de tensoativo, evitando as regiões hidrofóbicas (FERRARI, 1998; FERRARI et al., 2004; URBAN, 2004; FORMARIZ et al., 2005; MORAIS, 2006). Essa formação ocorre com a interação fraca entre o agente tensoativo anfifílico e moléculas de solventes, formando estruturas associadas e organizadas. Com isso, a formação depende da natureza hidrofílica ou lipofílica do tensoativo. Estes cristais são fortemente birrefringentes e a natureza física apresenta-se de forma variada (FERRARI, 1998; FERRARI et al., 2004; MORAIS, 2006).

Dentre as mesofases liotrópicas, as mais importantes e comumente observadas são: lamelar (“neat phase”), hexagonal (“middle phase”) e cúbica (“cubic phase”) (FERRARI, 1998; URBAN, 2004; FORMARIZ et al., 2005; MORAIS, 2006).

Na Figura 19, observam-se os diferentes tipos de formas obtidas de mesofases líquido-cristalinas liotrópicas.

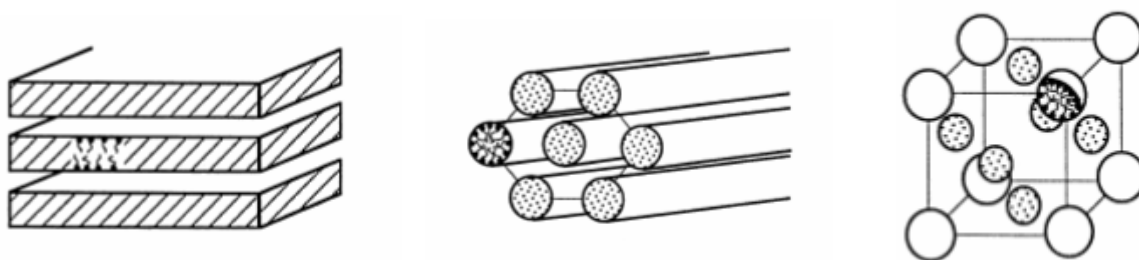


Figura 19. Representação esquemática das principais fases líquido-cristalinas liotrópicas, respectivamente cristal líquido lamelar, cristal líquido hexagonal e cristal líquido cúbico (BRINON et al., 1999).

A fase lamelar (designada $L\alpha$) é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede uni ou bidimensional. As cadeias hidrocarbônicas encontram-se no estado líquido e as bicamadas anfifílicas estão separadas por camadas de água ou óleo. Na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bi ou tridimensionais. Na fase H_I (fase normal), as moléculas do tensoativo se agrupam em micelas cilíndricas circulares, com água preenchendo o volume entre os cilindros, enquanto que na fase H_{II} (fase reversa), os cilindros contêm canais de água circundados pelas cabeças polares do tensoativo e a porção oleosa localizada ao redor dos cilindros (URBAN, 2004; FERRARI et al., 2004; MORAIS, 2006).

Fases cúbicas liotrópicas apresentam estruturas mais complicadas, as quais são visualizadas com maior dificuldade que as outras fases. Quase todas as fases fluidas tridimensionais observadas são de simetria cúbica, apesar das fases romboédricas, tetragonais e ortorrômbricas de topologia inversa também serem detectadas em alguns sistemas (URBAN, 2004). Há dois tipos de fase cúbica, a primeira é a cúbica bicontínua (V_I) que consiste no domínio contínuo de água dividindo-se em duas bicamadas contínuas de tensoativo; a segunda é a cúbica micelar (I_I), que consiste em micelas de tensoativo arranjadas em forma cúbica e separadas por uma fase aquosa contínua (BRINON et al., 1999).

Uma das maneiras de classificar as fases líquido-cristalinas é determinando a isotropia óptica da mesofase. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (URBAN, 2004; FORMARIZ et al., 2005; MORAIS, 2006).

Dentre os tipos de cristais líquidos encontrados nos produtos cosméticos, os liotrópicos são os mais predominantes e formam-se espontaneamente em muitos tipos de sistemas emulsionados. Quando presentes, por exemplo, na interface de uma emulsão A/O, aumentam a estabilidade da emulsão, pois promovem aumento na rigidez da membrana interfacial (FERRARI, 1998; MORAIS, 2006).

A utilização de cristais líquidos em cosméticos apresenta vantagens funcionais relacionadas ao fato de: promoverem liberação controlada de substâncias ativas; incorporarem princípios ativos em matrizes líquido-cristalinas ou mesmo em formulações que os contenham, pois os cristais líquidos protegem as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação; promoverem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (FERRARI, 1998; MORAIS, 2006).

SPICLIN e colaboradores (2003) verificaram que sistemas líquido-cristalinas foram empregados para promoverem liberação controlada do fosfato de ascorbil sódico. SANTOS e colaboradores (2005), por sua vez, observaram aumento da estabilidade de sistemas líquido-cristalinos contendo óleo de calêndula.

2.6. Caracterização física dos sistemas nanoestruturados

A elucidação da estrutura interna de um sistema nanoestruturado, além de ser muito importante, é também muito complexa. Assim, técnicas sofisticadas são necessárias para atingir este objetivo. Métodos como espalhamento de raios-X a baixo ângulo – SAXS (RAMAN et al., 2003), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo – SANS (REYNOLDS et al., 2004), espalhamento de luz (*light scattering*) (SINTOV & SHAPIRO, 2004), microscopia eletrônica de transmissão e ressonância magnética nuclear (KREILGAARD, 2002) estão sendo cada vez mais utilizadas nas últimas duas décadas. Outros métodos como a condutividade iônica (SINTOV & SHAPIRO, 2004), viscosidade (SPICLIN et al., 2003), espectroscopia de fotocorrelação (LEHMANN et al., 2001), microscopia de luz polarizada (KREILGAARD, 2002), entre outros, também são frequentemente utilizados para o estudo do comportamento físico-químico interno dos sistemas nanoestruturados.

A identificação das formas líquido-cristalinas pode ser realizada através da combinação de várias técnicas físico-químicas, como difração de nêutrons, SAXS e reologia, juntamente com a microscopia de luz polarizada, a qual é muito empregada devido ao fato das

formas serem facilmente detectadas devido à birrefringência (FERRARI, 1998; BRINON et al., 1999; URBAN, 2004; MORAIS, 2006).

A microscopia de luz polarizada é uma ferramenta vital para a identificação dos materiais líquido-cristalinos. As fotomicrografias são provas de texturas observadas, normalmente pelo uso de luz polarizada (FERRARI, 1998).

2.6.1. Condutividade iônica

A condutividade iônica, também chamada de condutância específica, é a capacidade de uma solução conduzir corrente elétrica. A condução da corrente elétrica em soluções eletrolíticas difere da dos metais, composta unicamente de elétrons livres. Nos líquidos, a condutividade elétrica é feita por íons (URBAN, 2004).

Medidas de condutividade são importantes como uma forma de determinar se a formulação possui domínio contínuo aquoso ou oleoso, bem como monitorar fenômenos como inversão de fases (LAWRENCE & REES, 2000).

2.6.2. Densidade relativa

Densidade (D) é a razão entre a massa de uma substância e o volume ocupado por esta massa. Logo, a densidade é igual à massa por unidade de volume e é dada pela equação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988):

$$D = \frac{\text{massa}}{\text{volume}} \quad (1)$$

A densidade é uma característica física da substância e pode ser usada como auxílio na sua identificação. Em geral, quando se dá a densidade de um sólido ou líquido, a massa é expressa em grama, e o volume, em mililitro ou centímetros cúbicos (HEIN & ARENA, 1998).

Uma vez que a densidade varia com a temperatura, é importante indicar a temperatura na qual foi realizado o ensaio de densidade (HEIN & ARENA, 1998).

A densidade relativa é a comparação da massa específica de uma substância com a de uma outra substância. No caso de sólidos e líquidos, a densidade relativa é tomada em relação à água. No caso de gases, a densidade relativa é tomada em relação ao ar ou hidrogênio (HEIN & ARENA, 1998).

2.6.3. Estabilidade de formulações cosméticas

O estudo de estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade (BRASIL, 2004; LEONARDI, 2004).

O estudo de estabilidade contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e material a ser utilizado; fornecer subsídios para aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica (BRASIL, 2004).

Os testes de estabilidade devem ser conduzidos sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade do produto no menor tempo possível; assim, as amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças que poderiam ocorrer durante o prazo de validade. Contudo, deve-se tomar cuidado para que essas condições não sejam tão extremas, fazendo com que provoquem alterações que não ocorreriam durante o tempo de utilização do produto (BRASIL, 2004).

Os estudos de estabilidade podem ser classificados de acordo com o tempo de duração, podendo ser estudos de curto prazo (envelhecimento acelerado) e de longo prazo (envelhecimento natural). Os estudos a curto prazo têm por finalidade prever a vida útil do produto quando este estiver sob as condições extremas de armazenamento de uso, enquanto os estudos a longo prazo têm por objetivo avaliar a vida útil real do produto sob condições habituais de estocagem e uso, com o objetivo de confirmar as estimativas efetuadas com os ensaios a curto prazo (BRASIL, 2004; LEONARDI, 2004).

2.6.3.1. Teste de estabilidade preliminar

O teste de estabilidade preliminar (TEP) consiste na realização de ensaios na fase inicial do desenvolvimento do produto. Empregam-se condições extremas de temperatura com

o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada produto (BRASIL, 2004).

2.6.4. Microscopia de luz polarizada

O microscópio de luz polarizada, também conhecido como microscópio petrográfico, utiliza luz polarizada (produzida por uma lâmina Polaroid – polarizador), sendo que este tipo de luz é denominado de luz polarizada plana. Para determinadas propriedades, emprega-se um segundo tipo de lâmina chamada analisador, que se apresenta como luz polarizada cruzada (FERRARI et al., 2004).

Este microscópio é projetado para observar e fotografar estruturas que são principalmente visíveis devido ao seu caráter óptico anisotrópico. Com a finalidade de realizar essa tarefa, o microscópio deve ser equipado com um polarizador posicionado no trajeto da luz, antes do material analisado, e um analisador (um segundo polarizador) localizado no caminho óptico entre a abertura traseira da objetiva e os tubos de observação ou o ponto da câmera. O contraste da imagem origina-se da interação da luz plano-polarizada com a substância birrefringente para produzir dois componentes individuais da onda, sendo cada um polarizado em planos mutuamente perpendiculares (DAVIDSON & ABRAMOWITZ, 2003).

A microscopia de luz polarizada é uma técnica muito usada para a verificação de estruturas internas de um sistema e fundamenta-se em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar (RESENDE, 2004).

A luz polarizada representa uma modificação da luz branca incidente, na qual o vetor elétrico vibra em todas as direções; essa modificação restringe as direções de vibração do vetor elétrico. Usualmente, esta modificação ocorre quando a luz branca incidente é transmitida através de prismas ou cristais especiais. Um cristal líquido, ao ser observado através de polarizadores, ocasionará bandas intensas de cores (FERRARI et al., 2004).

A transmissão da luz polarizada ocorre através de dois prismas quando estes estiverem dispostos em séries; uma vez que estes dois prismas estiverem dispostos entre si em um ângulo de 90°, a luz polarizada não será transmitida (FERRARI et al., 2004).

O comportamento de uma substância em relação ao efeito que causa na luz polarizada, pode ser classificado como anisotrópico ou isotrópico. Se o feixe de luz polarizada que

atravessar a substância for dividido em dois feixes de planos perpendiculares é porque as direções da propagação da luz no interior da substância não são equivalentes e o comportamento é conhecido como anisotropia. Se a substância permitir a passagem da luz polarizada sem modificação da sua propagação, tem-se o fenômeno de isotropia (DAVIDSON & ABRAMOWITZ, 2003; RESENDE, 2004; URBAN, 2004).

Ao microscópio com luz polarizada podem ser observados dois tipos de arranjos internos, o hexagonal e o lamelar. O arranjo cúbico se apresenta isotrópico, somente sendo detectado com outras técnicas de análise, como o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (RESENDE, 2004).

O arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica que o distingue facilmente do lamelar, quando observado ao microscópio de luz polarizada. Os agregados de tensoativo organizam-se em cilindros, que podem se empacotar formando uma fase fluida bidimensional. Por sua vez, o arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando espécies de ondas e estruturas denominadas “cruzes-de-malta” que são observadas ao microscópio com luz polarizada (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

2.6.5. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Para colaborar com o estudo estrutural das microemulsões e cristais líquidos, pode-se utilizar a técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), que fornece informações sobre tamanho, forma, quantidade e arranjo dos objetos espalhadores da amostra. Em um sistema diluído, em que as partículas estão isoladas umas das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ das diferentes partículas. Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si e o espalhamento medido refletirá sua geometria e o arranjo entre elas. Portanto, se as partículas estão correlacionadas, o fator de estrutura $S(q)$ caracteriza o arranjo e contém todas as informações sobre as interações entre as partículas (FRANZINI, 2006).

Ao irradiar uma amostra bifásica com a forma de uma plaqueta relativamente fina, com um feixe monocromático (luz visível, raios-X, nêutrons, elétrons), pode-se observar o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. No caso dos raios-X, o espalhamento deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica do sistema. A

dependência angular da intensidade espalhada por uma heterogeneidade está diretamente relacionada à densidade eletrônica através da transformada de Fourier (URBAN, 2004).

Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta partícula: $I(q) \propto P(q)$ (URBAN, 2004).

A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que para n partículas distribuídas ao acaso, de acordo com GLATTER (1982), tem-se:

$$I(q) \propto \sum_n P_n(q) \quad (2)$$

na qual $I(q)$ é a intensidade resultante e $P(q)$ é o fator de forma.

Segundo LECOMTE (1988), em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si; logo, o espalhamento será decorrente das características geométricas de cada partícula e do arranjo espacial formado pelo conjunto. Nesse caso, a intensidade espalhada por um conjunto com N partículas é escrita da seguinte forma:

$$I(q) = N.P(q).S(q) \quad (3)$$

na qual $I(q)$ é a intensidade resultante, N é número de objetos espalhadores, $P(q)$ é o fator de forma e $S(q)$ é o fator da estrutura do conjunto. Portanto, se as partículas estão correlacionadas, $S(q)$ caracteriza o arranjo, além de conter todas as informações sobre as interações entre as partículas. $S(q)$ pode assumir diferentes formas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras, além de ser difícil separar as contribuições $P(q)$ e $S(q)$. Em muitos casos, a presença de um máximo nas curvas de espalhamento a baixo ângulo pode ser relacionada com a presença de correlações entre as posições dos centros espalhadores. De acordo com LECOMTE (1988), a distância média de correlação, d , entre as partículas vizinhas (ou dois planos paralelos) pode ser determinada pelo valor da posição do máximo ($q_{\text{máx}}$), através da relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\text{máx}}} \quad (4)$$

O comportamento assintótico das curvas de SAXS, $I(q)$, para $q \rightarrow \infty$, produzido por um sistema de duas densidades eletrônicas, é dado pela lei de Porod:

$$I(q) = \frac{A}{q^4} + B \quad (5)$$

na qual A é proporcional à área da interface entre as partículas e a matriz líquida e B é a contribuição das flutuações da densidade eletrônica na matriz e nas partículas (GLATTER, 1982).

No caso de agregados com estrutura fractal, a intensidade $I(q)$ é proporcional a q^{-D} , na qual D é a dimensão fractal. Esta lei de potência é válida para valores intermediários de q , cuja localização e extensão dependem do tamanho das partículas primárias e de seus agregados (GLATTER, 1982).

A Figura 20 apresenta um exemplo de curva de espalhamento obtida a partir de medidas de SAXS e difração dos raios-X, na qual é possível se observar diferentes regiões. A região de Porod (altos valores de q) fornece informações sobre a superfície e rugosidade das partículas. A região de Guinier (baixos valores de q) fornece informação sobre o tamanho das partículas maiores ou agregados e a região de q intermediária a respeito da existência e da natureza de estruturas do tipo fractal. Na região de Bragg (valores de q muito pequenos), ocorre o fenômeno de difração dos raios-X (BRINKER & SCHERER, 1990).

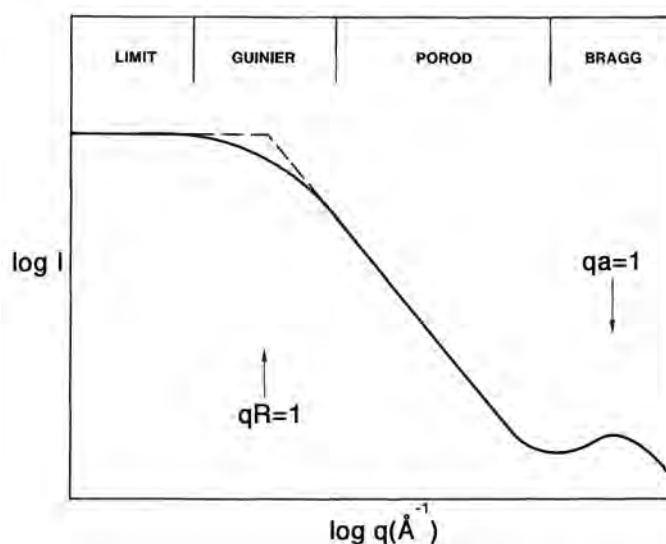


Figura 20. Diagrama esquemático de SAXS e difração dos raios X (BRINKER & SCHERER, 1990).

2.6.6. Comportamento reológico

Reologia é a ciência que estuda as propriedades de escoamento (fluxo) e de deformação da matéria sobre a ação de forças ou tensões. O termo reologia deriva da palavra grega “*rheo*” (escoamento) e “*logos*” (ciência) (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001; ALMEIDA & BAHIA, 2003; GENNARO, 2004; TONZAR, 2006).

A viscosidade pode ser entendida como a resistência interna ao fluxo, que um fluido apresenta, resultante da aplicação de uma força que causa deformação temporária ou permanente da matéria; ou simplesmente, a resistência do fluido frente ao fluxo ou movimento. Portanto, quanto maior a viscosidade, maior a resistência ao fluxo (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001; AULTON, 2005; TONZAR, 2006).

A reologia tem sido assunto de extrema importância nas indústrias cosméticas e farmacêuticas, uma vez que devem ser mantidas as características reológicas (como a consistência) dos produtos de lote para lote, assegurando a qualidade do produto acabado durante o tempo que permanece em prateleira (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001; ALMEIDA & BAHIA, 2003). Também, é importante durante a fase de desenvolvimento, quando se quer caracterizar o quanto o material pode ser despejado de um frasco, ser apertado em um tubo, manter a forma do produto no frasco, se espalhar na pele, etc. (LACHMAN et al., 2001).

Isaac Newton definiu a viscosidade (η) como sendo a razão entre a tensão de cisalhamento (*shear stress*) e a taxa de cisalhamento (*shear rate*), ($\tau / \dot{\gamma}$), pois foi o primeiro a perceber que a velocidade de fluxo (taxa/velocidade de cisalhamento - $\dot{\gamma}$) é diretamente proporcional à tensão aplicada (τ) (AULTON, 2005). Logo:

$$\text{Viscosidade (poise)} = \frac{\text{Tensão de cisalhamento (Pa)}}{\text{Taxa de cisalhamento (s}^{-1}\text{)}} \quad (6)$$

Fluidos simples que obedecem essa relação são chamados de fluidos Newtonianos, os quais caracterizam-se por viscosidade constante independente da velocidade de cisalhamento aplicada (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001; AULTON, 2005; TONZAR, 2006). A água, glicerina, clorofórmio, xaropes simples, tinturas, óleos vegetais e sistemas coloidais muito diluídos são exemplos desses fluidos (ALMEIDA & BAHIA, 2003; TONZAR, 2006).

O fenômeno da viscosidade é melhor compreendido considerando um cubo hipotético ordenado em camadas estratificadas em placas paralelas (fluido feito em camadas), que podem deslizar uma sobre as outras. Quando uma força tangencial é aplicada à camada superior, presume-se que cada camada subsequente irá mover-se a velocidades progressivamente decrescentes e que a camada mais inferior permanecerá estacionária, conforme Figura 21. Desse modo existirá um gradiente de velocidade e este será igual à velocidade da camada superior em ms^{-1} dividido pela altura do cubo em metros. O gradiente resultante é a velocidade de cisalhamento e terá como unidade o segundo recíproco (s^{-1}) (AULTON, 2005).

A tensão de cisalhamento é definida como a força atuante no cubo sobre a área da camada superior, tendo como unidade Newton por metro quadrado (N/m^2) ou Pascal (Pa) (ALMEIDA & BAHIA, 2003; AULTON, 2005).

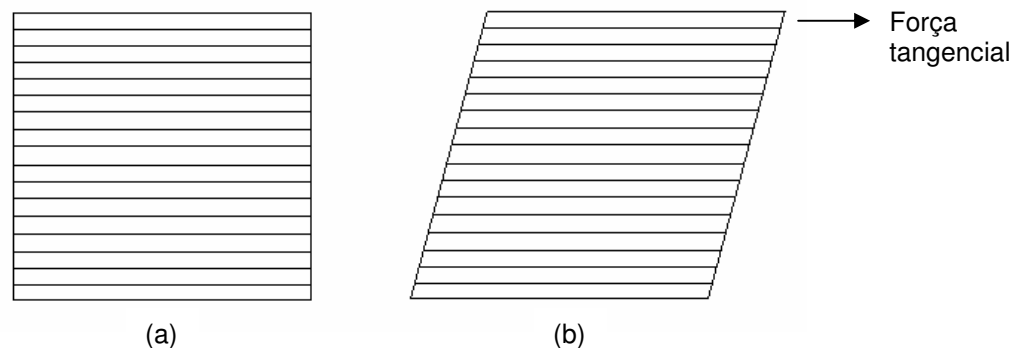


Figura 21. Representação esquemática do efeito de cisalhamento, sendo em (a) o cubo hipotético sujeito à aplicação de força e em (b) o cubo sujeito a uma força tangencial na camada superior (AULTON, 2005).

Um material não-newtoniano não tem relação proporcional direta entre a taxa e tensão de cisalhamento. O início do escoamento pode manifestar-se ou não só após certa pressão mínima exercida (valor de cedência) e a velocidade de cisalhamento não aumenta proporcionalmente com a elevação da tensão ou agitação que cria o escoamento (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001). Dessa forma, a viscosidade varia como uma função da taxa de cisalhamento e uma determinada viscosidade deve ser acompanhada da taxa de cisalhamento, na qual a tensão foi medida, bem como sua temperatura (TONZAR, 2006).

Em geral, a viscosidade de um líquido diminui com o aumento da temperatura, sendo que emulsões, cremes, dispersões, géis e loções apresentam comportamento não-Newtoniano (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001; AULTON, 2005; TONZAR, 2006).

Os sistemas podem ser classificados quanto ao tipo de escoamento em pseudoplásticos, plásticos e dilatantes (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

O valor de cedência caracteriza-se pela tensão de cisalhamento mínima necessária para produzir o escoamento. Os materiais plásticos ideais (ou de Bingham) se comportam dessa maneira (ALMEIDA & BAHIA, 2003). O fluxo plástico caracteriza-se quando seu reograma não passa pela origem, mas cruza o eixo da tensão de cisalhamento no valor de cedência (AULTON, 2005). O valor de cedência tem grande importância, sobretudo em preparações para as quais pretende-se que mantenham a sua forma até atingir a tensão suficiente para que sejam espalhadas sobre a pele ou mucosas. As pomadas com vaselina, parafinas, ceras e sílica são exemplos de materiais com esse comportamento (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

O comportamento pseudoplástico caracteriza-se pela diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da taxa de cisalhamento; emulsões e boa parte das suspensões são exemplos de materiais com esse comportamento (ALMEIDA & BAHIA, 2003; TONZAR, 2006). O seu reograma inicia-se na origem, mas há ponto de cedência; o material começa a fluir assim que uma tensão de cisalhamento é aplicada, sendo que a inclinação da curva diminui gradualmente com o aumento da velocidade de cisalhamento (AULTON, 2005).

O comportamento dilatante caracteriza-se com o aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Isso ocorre pois, quando a suspensão é agitada, o volume dos espaços interpartículas aumenta e a quantidade de líquido se torna insuficiente para assegurar a lubrificação, resultando no aumento da resistência ao escoamento (ALMEIDA & BAHIA, 2003). O seu reograma inicia na origem e não há ponto de cedência (AULTON, 2005).

A Figura 22 representa o reograma esquemático de materiais com comportamento Newtoniano, plástico, pseudoplástico e dilatante.

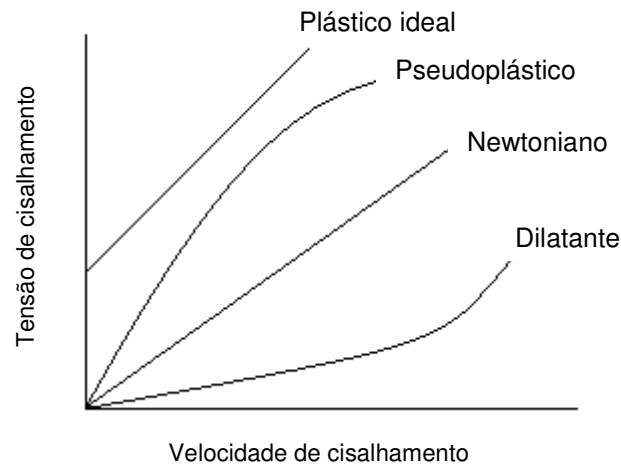


Figura 22. Representação gráfica dos diferentes tipos de comportamentos reológicos (adaptado de AULTON, 2005).

Alguns materiais têm ainda a viscosidade dependente do tempo de aplicação da taxa de cisalhamento. Isso ocorre quando o fluido é deformado à velocidade constante. Com isso, distinguem-se dois tipos de comportamento: tixotropia, que é a diminuição da viscosidade em função da velocidade de cisalhamento e antitixotropia, que é o aumento da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento (ALMEIDA & BAHIA, 2003; TONZAR, 2006).

Estes fenômenos são em geral reversíveis, retomando o fluido à sua viscosidade inicial algum tempo após cessar a deformação. Se a recuperação for instantânea, o material é denominado como não-tixotrópico; se não recuperar completamente ao seu estado inicial após um tempo significativo de repouso, o material é denominado tixotrópico. Quando os fenômenos de fluidificação e espessamento forem irreversíveis, são designados por reopexia (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

A tixotropia pode ser representada quantitativamente pela área de histerese entre as curvas ascendente e descendente de um gráfico que representa a relação velocidade de cisalhamento/tensão (PRISTA et al., 1990; ALMEIDA & BAHIA, 2003). Exemplos de materiais tixotrópicos são as dispersões de goma xantana e de hidroxipropilcelulose (ALMEIDA & BAHIA, 2003). A Figura 23 representa um reograma de um material pseudoplástico e dilatante mostrando tixotropia.

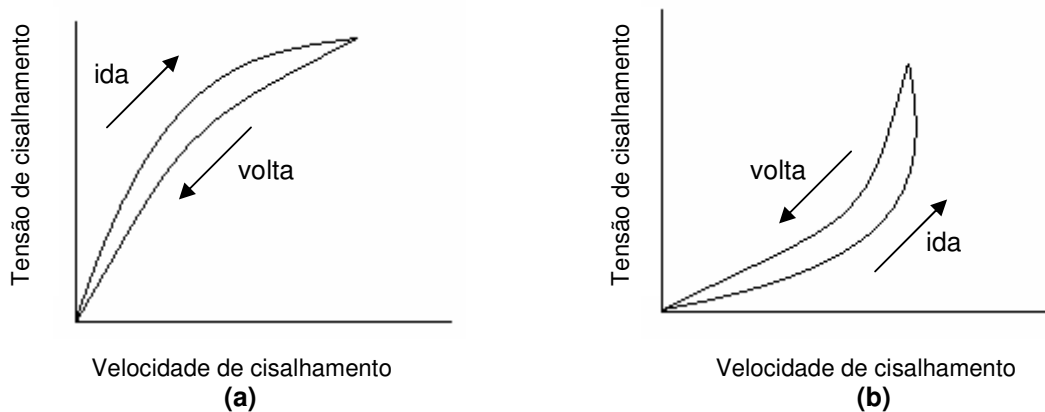


Figura 23. Reograma esquemático produzido por um material tixotrópico pseudoplástico em (a) e reograma produzido por um material reopético em (b) (adaptado de AULTON, 2005).

2.6.6.1. Ensaios mecânico-dinâmicos ou de oscilação

As medidas de oscilação requerem mínima perturbação do material e fornecem várias informações sobre a sua estrutura. Tipicamente, frequências superiores ou da ordem de MHz estão associadas ao estiramento ou rotação das ligações atômicas. As frequências baixas (Hz), por sua vez, estão relacionadas aos movimentos de estiramento ou deformação macromoleculares. Nos ensaios de escoamento, aplica-se um gradiente de tensão linear ou logarítmico unidirecional; no ensaio de oscilação, a tensão varia como uma onda senoidal. A amplitude da onda senoidal é proporcional à tensão ou torque aplicado, sendo que com a variação da frequência (ω), a velocidade com que o patamar da tensão sob e desce é alterada (TOKUMOTO, 1996).

A relação de fase entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) da amostra. Uma resposta puramente elástica é caracterizada por um ângulo de fase zero, isto é, as duas ondas são sobrepostas, enquanto a resposta de um fluido puramente viscoso é caracterizada por uma diferença de fase de 90° . Uma resposta viscoelástica está entre estes dois extremos, isto é, o ângulo de fase δ encontra-se entre 0 e 90° (OPERATIONS MANUAL OF RHEOMETERS, 1993).

O módulo de elasticidade complexo $G^*(\omega)$ é dado pela razão entre as amplitudes de tensão e de deformação, sendo seus componentes real e imaginário os módulos de estocagem – $G'(\omega)$ e de perda – $G''(\omega)$, respectivamente:

$$G^*(\omega) = \frac{\tau}{\gamma} = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (7)$$

$$G'(\omega) = G^*(\omega) \cdot \cos\delta \quad (8)$$

$$G''(\omega) = G^*(\omega) \cdot \sin\delta \quad (9)$$

$$\tan\delta = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (10)$$

na qual i é o número imaginário (SEARS & ZEMANSKY, 1971; GRAESSLEY, 1984). Estes módulos estão relacionados com o ângulo de fase δ conforme mostra a Figura 24, de forma que um aumento em $G'(\omega)$ resulta na diminuição de δ ; assim, as curvas de deformação e de tensão entram em fase, e se $G''(\omega)$ aumenta, ocorre o oposto. O componente real do módulo elástico G' é denominado de módulo de estocagem porque representa a energia estocada durante a deformação à tensão crescente e liberada na contração quando a tensão é relaxada. A parte imaginária do módulo G'' está relacionada ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível. Desse modo, G'' é denominado módulo de perda e leva em conta esta dissipação de energia (OPERATIONS MANUAL OF RHEOMETERS, 1993).

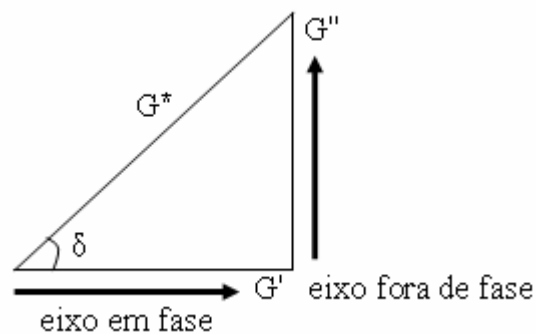


Figura 24. Representação esquemática do módulo de elasticidade complexo $G^*(\omega)$, seus componentes em fase $G'(\omega)$, fora de fase $G''(\omega)$ e do ângulo de fase δ (OPERATIONS MANUAL OF RHEOMETERS, 1993).

2.7. Controle de qualidade microbiológico

O objetivo do controle microbiológico de cosméticos é assegurar uma produção de boa qualidade, livre de determinados microrganismos, principalmente os potencialmente prejudiciais ao usuário, bem como garantir uma preparação adequada, que permaneça como tal, mesmo após uso contínuo pelo consumidor (CARTURAN, 1999).

Para estudos de eficácia, segurança e estabilidade microbiológica, geralmente, recomenda-se o ensaio de desafio para o sistema conservante. Esse teste deve ser feito quando o produto for susceptível à contaminação potencialmente perigosa ao consumidor (PINTO et al., 2003).

Em geral, é aceitável que a carga microbiana de um produto não-estéril mantenha-se dentro dos limites estabelecidos pelos compêndios oficiais com o tempo de armazenamento (vida útil); entretanto, não é desejável que aumente (PINTO et al., 2003).

O teste para avaliação de sistemas conservantes foi descrito pela primeira vez na Farmacopéia Americana em 1970, e abrangia somente produtos estéreis aquosos injetáveis, oftálmicos e nasais. Este método permaneceu inalterado por cerca de vinte e cinco anos devido à sua boa reprodutividade, contribuindo significativamente no estudo da eficácia do sistema conservante (PINTO et al., 2003). Neste teste, conhecido por “desafio”, inóculos de 10^5 - 10^6 de microrganismos-teste das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e dos fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* são inoculados no conservante ou nas formulações que os contenham, sendo feito um acompanhamento da viabilidade destes microrganismos nos tempos de incubação de 7, 14 e 28 dias (USP XXVII, 2004).

Para ORTH (1997), os testes de eficácia conservante são realizados com o objetivo de determinar o tipo e a concentração mínima de efetividade do conservante necessária para a conservação satisfatória das formulações.

De acordo com ORTH & STEINBERG (2003), tratam-se de testes de segurança de um produto. Embora os cosméticos e produtos que contenham água não necessitem ser estéreis, visto não serem aplicados em superfícies estéreis, formulações que se conservam adequadamente devem ter um sistema de conservação que as tornem, de certa forma, auto-esterilizáveis, ou seja, devem matar os microrganismos contaminantes em tempo suficientemente rápido de modo que não se tornem um perigo para a saúde e não passem por

alterações físicas inaceitáveis, como modificação de pH, cor, odor, viscosidade, dentre outros fatores.

Um método alternativo para a avaliação da eficácia de sistemas conservantes é baseado no fato de que uma determinada população de microrganismos quando exposta ao agente antimicrobiano perde sua viabilidade de modo regular e a fração de sobreviventes decresce exponencialmente com o tempo (ORTH, 1979). Assim, utiliza-se o valor D como sendo o tempo necessário para a redução de 90% da população de microrganismos-teste quando submetida ao agente letal sob condições constantes. Estes valores podem ser calculados por meio de uma curva expressa pela função obtida entre o log do número de sobreviventes e o tempo (regressão linear) após inoculação (OLIVEIRA, 1999).

Posteriormente, outras publicações como as da *Federation Internationale Pharmaceutique* (FIP), Farmacopéias Britânica, Européia e Japonesa, além da *The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association* (CTFA) publicaram seus métodos, havendo algumas diferenças de interpretações entre esses (PINTO et al., 2003).

Considerando a importância de se preparar sistemas nanoestruturados seguros do ponto de vista microbiano, torna-se relevante comprovar que estes produtos não necessitam de conservantes.

2.8. Potencial de irritação de formulações tópicas

Independente da composição que um produto tópico apresente, este deve ser seguro. Entende-se por segurança de produtos tópicos a ausência razoável de risco de lesão significativa em condições de uso consideravelmente previsíveis, ou seja, define-se segurança em termos de probabilidade de que o produto não provoque danos significativos (ROMANOWSKI & SCHUELLER, 1996).

Quando se pensa em segurança de produtos tópicos, deve-se entender que não existe 100% de segurança em nenhuma substância química, já que até mesmo água pode ser perigosa se administrada em quantidades inadequadas (ROMANOWSKI & SCHUELLER, 1996).

Apesar de não desejável, há relatos na literatura de reações adversas a matérias-primas presentes nas formulações tópicas (CHORILLI et al., 2007b; LACHAPELLE, 1994; GROOT et al., 1988). VIGLIOGLIA & RUBIN (1991) dividem as reações adversas a cosméticos em:

- reações irritativas: imediatas (ex: hidróxido de sódio) ou acumulativa (ex: tensoativos);
- reações alérgicas ou sensibilizantes: dermatite de contato (ex: por princípios ativos, veículos, conservantes) ou granuloma alérgico (ex: zircônio);
- dermatites por fotossensibilização: fototoxía ou fotoalergia;
- reações sistêmicas: por inalação (ex: fragrâncias) ou por absorção percutânea (ex: persulfato de amônio);
- reações físicas e outras: por oclusão (ex: foliculite por óleos);
- ação carcinogênica.

Das reações adversas, a mais comum para formulações tópicas é a irritação cutânea. Geralmente, as reações de irritação, decorrentes de penetração cutânea ou de mucosa dos ingredientes, estão relacionadas às concentrações de uso no produto final e sua formulação cosmética (BRASIL, 2003).

A evidência e interpretação de possíveis efeitos indesejáveis no tecido cutâneo podem ser realizadas por meio de avaliação histopatológica e histométrica, uma vez que permitem a análise do tecido epitelial, da derme e também das características celulares. Além disso, ainda pode auxiliar o delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia da derme e no desenvolvimento de novos produtos cosméticos (MAIA CAMPOS et al., 1999; SILVA & MAIA CAMPOS, 2000).

A análise histopatológica consiste na observação visual de biópsias ao microscópio óptico de luz que permite a avaliação qualitativa das diversas estruturas presentes no tecido cutâneo. A histopatologia, por ser uma análise qualitativa, deve ser complementada pela histometria, determinando a espessura da epiderme e da derme, como também quantificando os diversos tipos celulares, principalmente na derme (TADINI, 2005).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal:

- Desenvolver e caracterizar fisico-quimicamente sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol e avaliar a sua segurança e eficácia antienvelhecimento.

3.2. Objetivos secundários:

- Realizar os testes de estabilidade preliminares para as formulações selecionadas;
- Estudar o comportamento reológico das formulações;
- Avaliar a qualidade e a segurança microbiológica das formulações selecionadas;
- Verificar o efeito irritativo na pele de coelhos das formulações;
- Avaliar a eficácia das formulações no tratamento do envelhecimento cutâneo.

IV. CASUÍSTICA & MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Substâncias e reagentes

- Adipato de diisopropila (Ceraphyl 230[®], Germinal, Brazil);
- Água destilada;
- Poliéter funcional siloxano (DC 5329[®], Dow Corning, U.S.A.);
- Polissorbato 80 (Sorbix 80[®], polysorbate 80, Polytechno, Brazil);
- Silicone fluido de co-polímero glicol (DC 193[®], Dow Corning, U.S.A.);
- Trilauril-4-Fosfato (Hostaphat KL 340[®], Clariant, Switzerland);
- Ágar Sabouraud – AS (Sabouraud dextrose ágar, Acumedia Manufactures, Baltimore, Maryland);
- Caldo lactosado (Lactose broth, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Caldo tetracionato (Tetrathionate broth base, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Caldo selenito cistina (Selenite cystine enrichment broth, Merck, Germany);
- Ágar inclinado verde brilhante (Brilliant green ágar, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Ágar xilose-lisina-desoxicolato – XLD (xylose lysine desoxycholate ágar for microbiology, Merck, Germany);
- Ágar bismuto sulfito (Bismuth sulfite ágar acc. to Wilson-Blair for microbiology, Merck, Germany);
- Ágar inclinado ferro-três açúcares – TSI (Triple sugar iron ágar, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Glicerol (Henrifarma, Switzerland);
- Solução estéril de telurito de potássio 1% (Chapman tellurite solution 1%, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Ágar cefrimida (Cefrimide ágar base, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Ágar Vogel Johnson (Vogel-Johnson Ágar, Oxoid Ltda. Basingstoke, Hampshire, England);

- Caldo soja-caseína – TSB (Tryptic soy broth, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Ágar eosina azul de metileno – EMB (Levine EMB ágar; Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Solução de iodo 0,1 N;
- Ágar MacConkey (MacConkey ágar for microbiology, Merck, Germany);
- Ágar soja-caseína – TSA (Tryptic soy ágar, Difco, Becton Dickinson, Lê Pont de Claix, France);
- Caldo Sabouraud (Sabouraud 2% dextrose broth, Acumedia Manufactures, Baltimore, Maryland);
- Caldo Lethen – peptonas, lecitina de soja e Tween 80[®] (Lethen broth base, Merck, Germany);
- Solução de Bouin para fixação constituída por ácido pícrico, ácido acético e formol;
- Meio de inclusão para histologia – Histosec[®] Pastilhas – parafina + polímeros (Merck, Germany);
- Hematoxilina e Eosina para coloração dos cortes histológicos;
- Xylasin[®] (cloridrato de xilazina 2% - Laboratório Syntec);
- Dopalen[®] (cloridrato de ketamina 10%, Laboratório Agribands do Brasil);
- Palmitato de retinol (vitamina A palmitato oleosa) 1.000.000 UI/g (Roche, Germany).

4.1.2. Equipamentos e vidrarias

- Agitador magnético, Fisatom – Mod. 713;
- Agitador de tubos, Phoenix – Mod. AT-56;
- Alça de Drigalski;
- Alça de platina;
- Alça reta;
- Autoclave vertical, Phoenix – Mod. AV-50;
- Banho termostaticado, Fanem – Mod.100;
- Balança analítica, Gehaka – AG 200;
- Balança semi-analítica, Marte – AS 2000C;
- Centrífuga Excelsa II, Fanem – Mod. 206 BL;

- Condutivímetro Digimed – DM-31;
- Contador de colônias Phoenix, Mod. CP 600 Plus;
- Controlador microprocessado, Fanem – Mod. C-LT;
- Estufa de secagem e esterilização, Fanem – Mod. 315 SE;
- Geladeira Cônsul – CRA 36 - Multibrás S.A.;
- Grades para tubos de ensaio;
- Lâminas para microscopia;
- Lamínulas;
- Medidas de SAXS realizadas na linha D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP;
- Micropipeta de 100 e 1000 μ L – Sealpette;
- Microscópio luz polarizada - TYPE 102M – Motic;
- Ocular reticulada, Zeiss;
- Ocular milimetrada, Zeiss;
- Parafilm, Sigma;
- Peagômetro Micronal – Mod. B-474;
- Placas de Petri;
- Reômetro modelo Carri–Med CLS Rheometer – DP Union;
- Tubos para centrífuga, 10 mL – Excelsa II.

4.1.3. Microrganismos

- Cepas de *Salmonella* sp. (ATCC 19196), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

4.1.4. Animais

- Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, machos, albinos, adultos, peso entre 2-3 kg.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação das formulações

Os componentes (fase oleosa e tensoativo) foram pesados em balança semi-analítica e analítica. Em um frasco transparente com tampa, foram transferidas quantidades adequadas de tensoativo e óleo, sendo em seguida realizada a titulação com água (fase aquosa).

4.2.1.1. Diagrama de fases

Para a construção do diagrama de fases, utilizou-se o método da titulação aquosa, ou seja, titulou-se, com a água, a mistura formada pelos outros dois componentes (óleo e tensoativo).

Para a titulação, prepararam-se 9 formulações na quantidade de 2 mL cada, compostas por 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% de tensoativo e concentrações decrescentes de fase oleosa correspondentes a 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10%, respectivamente. As formulações foram tituladas com água (titulante) utilizando-se micropipeta.

Os sistemas foram preparados por mistura direta dos componentes aquecidos em banho termostático a 45° C para melhor homogeneização daqueles com alta viscosidade, seguida de leve homogeneização com a utilização de bastão de vidro. Para todos os sistemas, misturou-se óleo e tensoativo e adicionou-se a fase aquosa por último. Dessa maneira, construiu-se um diagrama ternário para cada sistema, conforme descrito na Tabela 1.

Durante o processo de titulação, os sistemas formados e suas consistências foram analisados visualmente, contra fundo escuro. Foram calculadas as concentrações de cada componente da formulação, obtendo-se misturas que foram utilizadas na delimitação das diferentes regiões existentes no diagrama de fases. Logo, foram delimitadas as transições de fase semi-sólida para sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT), sistema semi-transparente (ST), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF), sendo as regiões representadas nos diagramas de fases.

Representados como triângulos equiláteros, os diagramas de fase construídos mostram tanto a proporção de cada componente utilizado (diagrama pontual), bem como as regiões de domínio dos diferentes sistemas encontrados (diagrama de linhas fechado). Cada vértice do

triângulo corresponde a 100% de cada fase, estando representado no vértice superior o tensoativo, no vértice esquerdo a fase aquosa e, no direito, a fase oleosa.

Para a leitura das concentrações, em porcentagem, de cada componente em qualquer ponto do diagrama de fases, deve-se seguir a orientação horária, sendo que no eixo oposto ao vértice superior está representada a fase oleosa, no eixo oposto ao vértice esquerdo, o tensoativo, e no eixo oposto ao vértice direito, a fase aquosa.

Tabela 1. Composição dos diagramas ternários.

Sistema	Composição		
	Fase Oleosa	Tensoativo	Fase Aquosa
S ₁	Silicone fluido de co-polímero glicol	Poliéter funcional siloxano	Água
S ₂	Silicone fluido de co-polímero glicol	Trilauril-4-fosfato	Água
S ₃	Silicone fluido de co-polímero glicol	Polissorbato 80	Água
S ₄	Adipato de diisopropila	Poliéter funcional siloxano	Água
S ₅	Adipato de diisopropila	Silicone fluido de co-polímero glicol	Água

4.2.2. Caracterização físico-química dos sistemas

Pelo tamanho das gotículas dos sistemas nanoestruturados e pelo fato das estruturas poderem ser alteradas dependendo da composição e da temperatura, o exame direto das estruturas de sistemas nanoestruturados é muito difícil. Entretanto, técnicas indiretas podem ser utilizadas para verificação de sua estrutura interna (KREILGAARD, 2002).

Após descrição das regiões estabelecidas nos respectivos diagramas de fases, foram separadas três amostras de cada diagrama ternário desenvolvido. Essas foram escolhidas em função da proporção de tensoativo, a qual foi mantida constante em todas as formulações, enquanto as concentrações de fase oleosa e de fase aquosa variaram.

4.2.2.1. Determinação da densidade relativa

Após vinte e quatro horas de manipulação, as formulações foram submetidas ao teste para verificação de sua densidade.

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro e realizada em triplicata. Primeiramente, pesou-se o picnômetro vazio; logo após, pesou-se o mesmo com água e depois com a amostra. A partir de então, realizou-se o cálculo da densidade da água e da densidade da amostra para, em seguida, fazer-se o cálculo da densidade relativa através da equação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988):

$$\delta \text{ relativa} = \frac{\frac{\text{massa}_{\text{amostra}} - \text{massa}_{\text{picnômetro}}}{V_{\text{picnômetro}}}}{\frac{\text{massa}_{\text{água}} - \text{massa}_{\text{picnômetro}}}{V_{\text{picnômetro}}}} \quad (11)$$

4.2.2.2. Determinação da condutividade iônica

Após 24 horas de manipulação, utilizando-se condutivímetro (Digimed – DM-31) aferido com solução padrão de KCl 0,1 N, determinou-se a condutividade iônica das formulações selecionadas. Este teste foi realizado em triplicata, mantendo-se o ambiente de análise a 25 °C (FERRARI, 1998; MORAIS, 2006).

4.2.2.3. Teste de estabilidade preliminar (TEP)

As formulações selecionadas foram classificadas como macroscopicamente estáveis após 24 horas de sua manipulação e foram submetidas aos testes de estabilidade preliminares (TEP), de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004).

Tais formulações foram submetidas aos testes de centrifugação e análise microscópica (microscopia de luz polarizada). Em seguida, as mesmas sofreram estresse térmico, sendo submetidas a diferentes temperaturas durante o período de 15 dias.

As temperaturas foram de 25 ± 2 °C (temperatura ambiente), 5 ± 2 °C (geladeira) e 37 ± 2 °C (estufa). Após 15 dias, as amostras foram reanalisadas, após 1 hora para estabilização do sistema, sendo submetidas novamente aos testes de centrifugação e análise microscópica.

4.2.2.3.1. Teste de centrifugação

Foram pesados cinco gramas de cada amostra das formulações selecionadas e submetidas à centrífuga (Excelsa II - Fanem) a 3000 rpm durante trinta minutos, com vinte segundos para o tempo de aceleração e 20 segundos para o tempo de desaceleração. Neste teste, o produto deve permanecer estável e se houver qualquer sinal de instabilidade é necessária a reformulação (BRASIL, 2004).

4.2.2.3.2. Microscopia de luz polarizada para as formulações selecionadas

A microscopia de luz polarizada para as formulações selecionadas foi realizada colocando-se uma pequena quantidade das formulações sobre lâmina de vidro, coberta com lamínula, as quais foram analisadas com auxílio de microscópio de luz polarizada (TYPE 102M – Motic). Avaliou-se a homogeneidade da dispersão e, com auxílio de polarização, observou-se a presença de área de anisotropia, indicativo da presença de cristais líquidos. A análise foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Somente as formulações com indicação de presença de anisotropia foram selecionadas para continuação dos estudos.

4.2.3. Sistemas acrescidos de palmitato de retinol

4.2.3.1. Desenvolvimento das formulações

Ao sistema S_1 acrescentou-se 1% de palmitato de retinol (PR) na fase oleosa. Classificou-se o sistema obtido visualmente, contra fundo escuro. Foram delimitadas as transições de fase semi-sólida para sistema líquido transparente (SLT), sistema semi-transparente (ST), sistema viscoso transparente (SVT), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF).

4.2.3.1.1. Formulações selecionadas

Do sistema S_1 , constituído por água (fase aquosa), silicone fluido de co-polímero glicol (fase oleosa) e poliéter funcional siloxano (tensoativo), foram selecionadas duas formulações, sendo uma delas de região do diagrama de fases na qual se tinha sistema viscoso transparente

(SVT) e a outra de região de sistema viscoso opaco (SVO). Na primeira formulação, denominada F₁, a quantidade de tensoativo foi mantida em 60% e na segunda (F₄), a quantidade de tensoativo foi mantida em 40%, variando-se, nos dois casos, a concentração da fase aquosa e da fase oleosa. A estas formulações, adicionou-se 1% de PR, obtendo-se as formulações denominadas F_{1v} e F_{4v}, respectivamente. Foram priorizadas no trabalho formulações que apresentassem um mínimo de consistência para aplicação tópica (Tabela 2).

Tabela 2. Formulações selecionadas.

Componentes	F ₁ (%)	F _{1v} (%)	F ₄ (%)	F _{4v} (%)
Água	30,0	30,0	40,0	40,0
Silicone fluido de co-polímero glicol	10,0	9,0	20,0	19,0
Poliéter funcional siloxano	60,0	60,0	40,0	40,0
Palmitato de retinol	---	1,0	---	1,0

4.2.3.2. Teste de estabilidade das formulações

Realizou-se o estudo de estabilidade das formulações armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), as quais foram submetidas à leitura após 24 horas de sua manipulação e analisadas as características organolépticas, densidade relativa, teste de centrifuga, pH e condutividade iônica (SANTOS et al., 2005).

4.2.3.2.1. Características organolépticas

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro transparentes com o objetivo de facilitar a análise visual, sendo verificadas as alterações do tipo aspecto, odor, cor e homogeneidade em temperatura ambiente (BRASIL, 2004).

4.2.3.2.2. Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro e realizada em triplicata. Para a realização dos cálculos, primeiramente pesou-se o picnômetro vazio, depois

com água e posteriormente com a amostra. A densidade relativa foi então calculada através da equação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988):

$$\delta \text{ relativa} = \frac{\frac{\text{massa}_{\text{amostra}} - \text{massa}_{\text{picnômetro}}}{V_{\text{picnômetro}}}}{\frac{\text{massa}_{\text{água}} - \text{massa}_{\text{picnômetro}}}{V_{\text{picnômetro}}}} \quad (12)$$

4.2.3.2.3. Teste de centrifugação

A avaliação da estabilidade frente à centrifugação foi realizada empregando-se 5 gramas de cada amostra em estudo, centrifugando-as a 3000 rpm, por 30 minutos. Após a centrifugação, a formulação deve permanecer estável, ou seja, não deve haver separação de fases (BRASIL, 2004).

4.2.3.2.4. Determinação do pH

A medida de pH foi realizada em peagômetro, utilizando-se amostras diluídas em água. O pH foi medido após diluição das amostras na proporção de 1:10 em água recém-destillada (CHORILLI et al., 2006).

4.2.3.2.5. Determinação da condutividade iônica

Após 24 horas da manipulação, utilizando-se condutivímetro (Digimed – DM-31) aferido com solução padrão de KCl 0,1 N, determinou-se a condutividade iônica das formulações selecionadas. Este teste foi realizado em triplicata, mantendo-se a temperatura a 25 °C (FERRARI, 1998; MORAIS, 2006).

4.2.4. Análise estrutural das formulações acrescidas de PR

4.2.4.1. Microscopia de luz polarizada

Colocou-se uma pequena amostra das formulações nas lâminas de vidro as quais foram cobertas por uma lamínula. Em seguida, as formulações foram analisadas no microscópio de luz polarizada (Microscópio de luz polarizada – TYPE 102M – Motic) em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) nos tempos 24 horas e 30 dias, em estufa (37 ± 2 °C) e geladeira (5 ± 2 °C) após 30 dias de manipulação. Avaliou-se a presença de anisotropia, com o auxílio da polarização, sendo este um indicativo da presença dos cristais líquidos.

4.2.4.2. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Os estudos de SAXS foram realizados na estação de medidas D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), em Campinas-SP. A linha é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda (λ) de 1.408 Å, uma câmara de ionização, um detector vertical localizado a 858,45 mm da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento.

O espalhamento por partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

Como o feixe de raios-X incidente pontua no plano de detecção e na faixa de resolução do detector, não foi necessária realização de desconvolução das curvas de intensidade (MEZZALIRA, 2005).

4.2.4.3. Determinação do comportamento reológico

As formulações selecionadas foram analisadas por medidas reológicas utilizando-se reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100 (TA Instruments), modelo CLS 100, com dispositivo placa – placa de 20 mm de diâmetro. A distância entre a placa e o cone foi de 200 μm e a temperatura foi mantida constante a 25 °C com o auxílio de um dispositivo “Peltier”.

As propriedades reológicas dos sistemas foram avaliadas por ensaios de escoamento e por ensaios mecânico-dinâmicos ou de oscilação.

4.2.4.3.1. Ensaios de escoamento

No ensaio de escoamento, realizou-se um estudo da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento na região de 0 a 30 s⁻¹.

4.2.4.3.2. Ensaios mecânico-dinâmicos ou de oscilação

Nos ensaios reológicos por solicitação oscilatória, as medidas foram realizadas em função da frequência (0,01 – 2 Hz), aplicando uma tensão de 1 Pa.

4.2.5. Controle de qualidade microbiológico

As amostras foram avaliadas levando-se em consideração a Resolução 481/99 (BRASIL, 1999) e o fato de não conterem conservantes. Realizou-se a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos) pela técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*) e a pesquisa de bactérias patogênicas específicas (KONEMAN et al., 2001; PINTO et al., 2003; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Desse modo, alíquotas de 10g das formulações selecionadas foram acrescentadas em meios de cultura específicos, determinando-se o número total de microrganismos e a presença de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Nestas análises, foram utilizadas amostras representativas do conteúdo dos produtos conforme métodos preconizados na *United States Pharmacopeia* (USP XXVII, 2004) e por CARTURAN (1999) no Guia ABC de Microbiologia, da Associação Brasileira de Cosmetologia (ABC). As análises foram feitas em triplicata para cada uma das formulações. As formulações sujeitas ao controle microbiológico foram armazenadas em recipientes assepticamente limpos, longe de umidade e luz, em locais frescos e arejados, segundo a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988).

4.2.5.1. Validação do método de estimativa do número de microrganismos viáveis

Em placas de Petri previamente esterilizadas, foram adicionadas alíquotas de 1 mL das diluições 1:2 ou 1:10 das amostras em solução salina, 0,5 mL de suspensão microbiana (cerca de 10^2 UFC/mL) de cada microrganismo padrão estudado e 15 mL de TSA. O método foi realizado em duplicata para cada microrganismo e diluição (BOU-CHACRA et al., 2005).

O controle foi determinado simultaneamente, transferindo-se 0,5 mL de cada suspensão microbiana para placas contendo 15 mL de TSA (BOU-CHACRA et al., 2005).

4.2.5.2. Estimativa do número de microrganismos viáveis

Inicialmente, realizou-se a assepsia das embalagens das formulações com etanol 70%, seguindo-se pela pesagem de 10g da amostra em um béquer estéril. Foi realizada a diluição, transferindo-se para erlenmeyer estéril com 90 mL de meio Letheen (diluição 10^{-1}), o qual foi homogeneizado em vórtex. Deste primeiro frasco, transferiram-se 10 mL para o segundo, contendo 90 mL de salina estéril (diluição 10^{-2}), homogeneizando novamente. Prosseguiu-se com a transferência de 1 mL de cada diluição, acrescentando-se 15 a 20 mL de meio ágar soja-caseína (TSA) estéril, resfriado a uma temperatura aproximada de 45°C, em duas placas de cada diluição e ágar Sabouraud (AS) nas outras duas placas. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

A homogeneização foi realizada e, após a solidificação, as placas contendo o meio TSA foram incubadas por 24 horas a 36 ± 1 °C (crescimento de bactérias) e aquelas com AS, a 27 ± 1 °C por 7 dias (crescimento de bolores e leveduras). Após o período de incubação, fez-se a contagem das colônias crescidas nestes meios de cultura, calculando-se posteriormente o número de microrganismos/g do produto multiplicando-se pela diluição utilizada, os quais foram expressos em UFC/g.

4.2.5.3. Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*

Transferiram-se, assepticamente, 10 g de amostra para 90 mL de caldo lactosado para a pesquisa de *Salmonella* sp. e *E. coli*.

O caldo foi incubado a 36 ± 1 °C durante 24 horas. Após esse período, o meio foi observado quanto ao crescimento. No segundo dia, transferiu-se 1 mL do caldo lactosado para dois tubos contendo caldo tetrionato e caldo selenito cistina, que foram incubados a 36 ± 1 °C durante 24 horas, para a pesquisa de *Salmonella* sp. Após esse período semeou-se, com uma alça de platina, amostra do caldo tetrionato para um tubo contendo ágar inclinado verde brilhante e três placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito. Procedeu-se da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina e transferiu-se para os três meios, que foram incubados a 36 ± 1 °C durante 24 horas. Observou-se o crescimento e as características das colônias. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar inclinado ferro-três açúcares (TSI) e incubadas a 37 °C durante 24 horas.

Para a pesquisa de *E. coli*, transferiu-se 1 mL do caldo lactosado para a placa de Petri contendo ágar MacConkey. Incubou-se a 36 ± 1 °C durante 24 horas. Observou-se o crescimento e as características das colônias. As colônias suspeitas foram semeadas com alça de platina em placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno (EMB). Incubou-se a 36 ± 1 °C durante 24 horas.

4.2.5.4. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Transferiram-se assepticamente 10 g de amostra para 90 mL de caldo soja-caseína, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O caldo foi incubado a 36 ± 1 °C durante 24 a 48 horas. Após este período, o meio foi observado quanto ao crescimento. Semeou-se em placas de Petri contendo ágar Vogel Johnson para a pesquisa de *S. aureus*, e em placas de ágar cetrimida para a pesquisa de *P. aeruginosa*. Incubou-se a 36 ± 1 °C durante 24 horas. Depois, observou-se o crescimento e as características das colônias.

4.2.5.5. Avaliação da eficácia das formulações nanoestruturadas como sistema conservante

Com a finalidade de se avaliar a eficácia das formulações como sistema conservante, efetuou-se o teste de desafio e cálculo do valor D.

Para a realização destes experimentos, foi necessário inicialmente realizar ensaios preliminares para padronização do inóculo dos diferentes microrganismos usados, de modo a se quantificar o número de células em torno de 10^6 - 10^7 /microrganismos/g nas formulações.

4.2.5.5.1. Teste de desafio

Foram inoculados 10^6 células/g da amostra de cada um dos microrganismos-teste (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger*) cultivados previamente em caldo soja caseína (TSB) por 6 horas a 36 ± 1 °C (bactérias) e caldo Sabouraud a 27 ± 1 °C (fungos), individualmente, em 10g de cada uma das amostras (F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v}). Imediatamente após a inoculação, retirou-se amostras de 1g de cada uma das formulações nanoestruturadas contaminadas (tempo 0), diluindo-se em caldo Lethen e a seguir em tubos com solução salina até atingir a concentração necessária para a contagem de colônias, sendo posteriormente semeados 100 µL na superfície de placas contendo TSA e AS (PINTO et al., 2003; USP XXVII, 2004).

Após incubação a 36 ± 1 °C e 27 ± 1 °C, respectivamente, para bactérias e fungos, retirou-se amostras nos tempos de 7, 14 e 28 dias de incubação, realizando-se a contagem de colônias, sendo os valores expressos em UFC/g (PINTO et al., 2003; USP XXVII, 2004).

Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se como controle negativo creme Lanette® sem conservante e como controle positivo, creme Lanette® com os conservantes nipagin (0,18%), nipazol (0,02%) e imidazolidinil uréia (0,5%).

4.2.5.5.2. Cálculo do valor D

Foram inoculados 10^6 células/g da amostra de cada um dos microrganismos-teste (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger*) cultivados previamente em caldo soja caseína (TSB) por 6 horas a 36 ± 1 °C (bactérias) e caldo Sabouraud a 27 ± 1 °C (fungos), individualmente, em 10g de cada uma das amostras (F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v}). Imediatamente após a inoculação, retirou-se amostras de 1g de cada uma das formulações nanoestruturadas contaminadas (tempo 0), diluindo-se em caldo Lethen e a seguir em tubos com solução salina até atingir a concentração necessária para a contagem de colônias, sendo

posteriormente semeados 100 µL na superfície de placas contendo TSA e AS (PINTO et al., 2003; USP XXVII, 2004).

Após incubação a 36 ± 1 °C e 27 ± 1 °C, respectivamente, para bactérias e fungos, realizou-se a contagem de colônias, sendo os valores expressos em UFC/g. As contagens foram realizadas nos tempos de incubação de 2, 24 e 48 horas para bactérias e 4, 24, 48 horas e 7 dias para fungos, na temperatura ambiente. As modificações realizadas em relação ao protocolo publicado pela USP XXVII é que não foram feitas contagens nos tempos de 4 horas (bactérias) e 8 horas (fungos) (PINTO et al., 2003; USP XXVII, 2004).

Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se como controle negativo, creme Lanette® sem conservante e como controle positivo, creme Lanette® com os conservantes nipagin (0,18%), nipazol (0,02%) e imidazolidinil uréia (0,5%).

4.2.6. Estudo de irritação das formulações tópicas

O estudo de irritabilidade dérmica primária e análise histológica foram realizados para as formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} descritas na Tabela 2. Este estudo teve parecer favorável para execução pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (Parecer n° 10/2007) – Anexo 1.

4.2.6.1. Irritação dérmica primária

4.2.6.1.1. Animais

O estudo do efeito das formulações nanoestruturadas na pele foi realizado em coelhos.

Um dia antes de iniciar os tratamentos, foi realizada a tricotomia de cinco áreas no dorso dos animais, com máquina de tosquear n° 0, evitando lesão da epiderme, que poderia alterar as análises realizadas.

Todas as regras básicas de bioterismo e manipulação dos animais foram rigorosamente observadas, principalmente no que se refere às condições ambientais dos animais, desde parâmetros macro, como a sala, temperatura, umidade, ciclo claro/escuro, como parâmetros micro–dimensão das caixas/gaiolas e troca de cama (MARONA, 2003).

4.2.6.1.2. Áreas de tratamento

As áreas previamente tricotomizadas do dorso dos animais foram divididas em:

- 1) Controle;
- 2) Tratamento com F₁;
- 3) Tratamento com F_{1v};
- 4) Tratamento com F₄;
- 5) Tratamento com F_{4v}.

As áreas possuíam 2 cm² e receberam 1,5 g de formulação, exceto a área controle, que não recebeu tratamento.

4.2.6.1.3. Protocolo para verificação de irritação dérmica primária

Os testes de irritação dérmica primária seguiram a metodologia proposta pelo Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (2003).

Este teste consiste de uma aplicação única dos tratamentos e oclusão com um filme de PVC por 4 horas. Durante este período, os animais foram mantidos em caixas individuais. Após 4 horas, o produto foi retirado e os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração. Realizou-se a graduação de eritema e edema das áreas nos tempos 4 e 72 horas após a aplicação, segundo a escala de Draize.

4.2.6.1.3.1. Método de avaliação

Para a avaliação do edema e eritema empregou-se a escala de Draize, que avalia subjetivamente o eritema e edema presentes na pele, com uma graduação de 0 a 4 graus (HOFFMANN et al., 2005). Realizou-se um estudo cego simples, com as avaliações realizadas por dois pesquisadores diferentes.

Formação de eritema:

Grau 0 – pele normal: geralmente de cor branca, podendo apresentar-se rósea;

Grau 1 – eritema leve: a pele apresenta-se levemente avermelhada, em toda a área-teste;

Grau 2 – eritema moderado: a pele apresenta-se vermelha, geralmente em toda a área-teste;

Grau 3 – eritema definido: a pele apresenta-se com vermelhidão intenso e difuso em toda a área-teste;

Grau 4 – eritema severo: a pele apresenta-se vermelho-escura, com leve formação de escaras (injúrias em profundidade).

Formação do edema:

Grau 0 – nenhum edema: o valor do edema é igual a 0 (zero);

Grau 1 – edema leve: o valor do edema deve estar compreendido entre 0,25 mm e 0,49 mm;

Grau 2 – edema moderado: o valor do edema deve estar compreendido entre 0,5 mm e 0,74 mm;

Grau 3 – edema definido: o valor do edema deve estar compreendido entre 0,75 mm e 1 mm;

Grau 4 – edema severo: o valor do edema é maior do que 1 mm, podendo às vezes ser maior do que a área de exposição.

4.2.6.2. Análise histológica

4.2.6.2.1. Grupos experimentais

O estudo do efeito das formulações selecionadas na pele foi realizado em coelhos mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração. Foram utilizados 5 animais, conforme o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (2003). Foram realizadas as tricotomias de cinco áreas no dorso de cada animal, as quais receberam os seguintes tratamentos durante 15 dias:

- 1) Controle;
- 2) Tratamento com F₁;
- 3) Tratamento com F_{1v};

- 4) Tratamento com F₄;
- 5) Tratamento com F_{4v}.

4.2.6.2.2. Contenção dos animais

Os animais permaneceram em caixa de contenção que permitiu o tratamento no dorso, de modo a acomodá-los confortavelmente sem que ficassem estressados durante o tratamento.

A parte frontal da caixa apresentava uma abertura com inclinação de 45°, onde se encaixava a cabeça do animal, para maior conforto do coelho (Figura 25). A parte superior da caixa se apresentou quase que totalmente vazada, para permitir o tratamento na região dorsal do animal (Figura 26).



Figura 25. Caixa de contenção com inclinação de 45° na parte frontal.

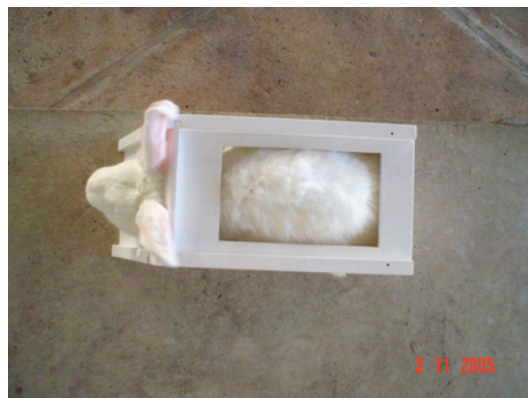


Figura 26. Caixa de contenção com parte superior vazada.

4.2.6.2.3. Processamento histológico

Após anestesia dos animais com cloridrato de xilazina/cloridrato de ketamina e sacrifício em câmara de CO₂, as áreas tratadas foram removidas e fixadas em solução de Bouin por 48 horas e tratadas convenientemente para inclusão em Histosec[®]. Foram obtidos 5 cortes histológicos não seriados de 5 µm de profundidade para cada lâmina, sendo três lâminas por área de tratamento. As lâminas foram processadas de forma a obter uma coloração em hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise histométrica e histopatológica.

4.2.6.2.4. Análise histométrica e histopatológica

4.2.6.2.4.1. Análise histométrica

Para essa análise utilizou-se ocular milimetrada de 10x (Zeiss) e objetiva de 40x, com a qual foi medida a espessura da epiderme e da camada córnea em 30 áreas escolhidas aleatoriamente para cada área de tratamento. Para a epiderme, obteve-se medidas em áreas planas, sem muitas papilas dérmicas, através da distância entre a membrana basal até a borda externa da camada córnea. A camada córnea foi mensurada em áreas onde se apresentava bem aderida à epiderme e foi considerada a distância entre a porção superior da camada granulosa até a superfície (POLACOW et al., 2004).

A partir dessas medidas, foi realizada a correção do coeficiente micrométrico, considerando que foi utilizada objetiva de 40x, e obtida a média e o desvio padrão de cada grupo experimental. A análise estatística foi realizada utilizando-se um software (programa GMC, versão 7.0) elaborado por MAIA CAMPOS (1998). O nível de significância considerado nos testes estatísticos foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.2.6.2.4.2. Análise histopatológica

Esta análise permitiu a determinação do número de fibroblastos e leucócitos, utilizando-se ocular reticulada da Zeiss e objetiva de 40x em uma área de 250 μm^2 (MANDARIM-DE-LACERDA, 1994). Para cada grupo experimental, foram obtidos 5 cortes não seriados por lâmina, sendo obtidas 3 lâminas. Quantificou-se 6 áreas por grupo experimental, sempre na região da derme papilar. Portanto, por animal, em cada tratamento, obteve-se uma área total de 22500 μm^2 (250 μm^2 x 6 áreas x 15 cortes).

Dos resultados referentes aos estudos histopatológicos, obteve-se a média e o desvio padrão de cada tipo celular para cada tratamento e realizou-se a análise estatística utilizando um software (programa GMC, versão 7.0) elaborado por MAIA CAMPOS (1998). O nível de significância considerado nos testes estatísticos foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.2.7. Avaliação da eficácia na pele humana das formulações selecionadas

4.2.7.1. Triagem das voluntárias

Para que este estudo se realizasse houve aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba (Protocolo nº 73/05) – Anexo 2. O estudo foi realizado em mulheres saudáveis, de pele branca ou morena clara, com idade entre 30 e 45 anos e portadoras de envelhecimento cutâneo facial.

Foram selecionadas 32 voluntárias que não faziam uso de medicamentos de uso crônico, exceto anticoncepcionais, as quais foram distribuídas em 4 grupos, com 8 voluntárias cada. Todas as voluntárias foram orientadas a evitar o sol durante o período do tratamento.

As voluntárias que possuíam o hábito de aplicar algum produto cosmético na região periorbital dos olhos foram orientadas a suspender o uso do produto um mês antes do início da pesquisa.

Após a leitura, cada voluntária assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), declarando estar plenamente de acordo em participar desta pesquisa, estando ciente dos procedimentos, riscos e benefícios.

4.2.7.2. Descrição da metodologia empregada no estudo

Para a avaliação da eficácia das formulações acrescidas de PR, foram utilizados 4 grupos, com 8 voluntárias cada. No grupo 1, não aplicou-se formulação (controle). No grupo 2, utilizou-se a formulação F₁, constituída de 30% de água (A), 10% de silicone fluido de copolímero glicol (SFCG) e 60% de poliéter funcional siloxano (PFS). No grupo 3, aplicou-se a formulação F_{1v}, composta por 30% de A, 9% de SFCG, 60% de PFS e 1% de PR. A formulação usada pelo grupo 4 foi composta de A (30%), SFCG (9%), PFS (60%), PR (1%), BHT (0,05%) e Cosmoguard[®] (0,1%), aqui denominada de F_{1va}.

As próprias voluntárias dos grupos 2, 3 e 4 foram orientadas a aplicar as formulações 1x/dia, no período da noite, durante 30 dias. Uma quantidade fixa da formulação foi aplicada sobre a pele da face da voluntária, incluindo a região palpebral, sendo distribuída em movimentos circulares durante 15 segundos.

A pele de todas as voluntárias foi previamente fotografada sempre no mesmo horário utilizando microscópio CCD color, modelo *Scope*. Trata-se de um equipamento que permite visualizar a pele com diferentes aumentos. A reavaliação foi realizada 30 dias após o término do tratamento. A análise da pele foi realizada avaliando a porcentagem de áreas com traços de rugas das fotos do pré e do pós-tratamento das voluntárias.

Para o cálculo da porcentagem de áreas com traços de rugas, as fotografias tiradas foram transferidas para o programa *Corel Phot-Paint 8*, onde as mesmas foram divididas em 266 áreas de $1,2 \text{ cm}^2$, em imagens com aumento de 10x, como ilustra a Figura 27.

A área com traços de ruga de cada voluntária foi calculada pela planimetria por contagem de pontos. MANDARIM-DE-LACERDA (1994) descreveu este sistema como teste regular de amostra quadrática, que nesse estudo foi realizado em forma de retículo com 266 quadrados de $1,2 \text{ cm}^2$ de área. Para visualizar melhor os resultados, fez-se o número total de áreas com traços de ruga em porcentagem, dividindo o número de quadrados com áreas de ruga pelo número total de quadrados das fotografias (266 quadrados) e depois multiplicando este número por 100 (Figura 27).

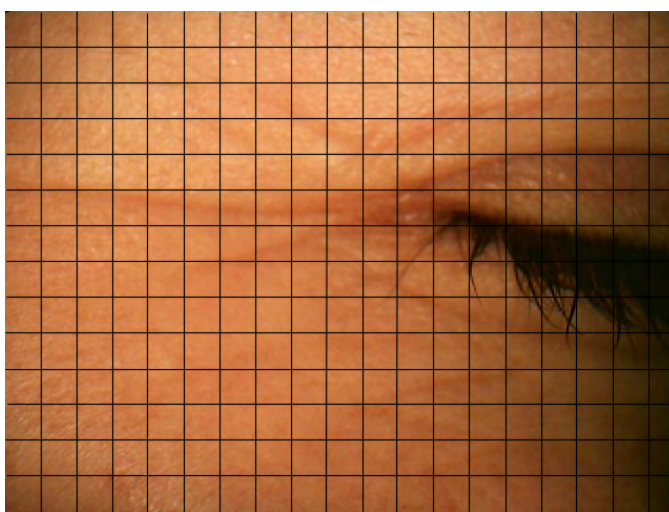


Figura 27. Fotografia de uma voluntária configurada com grade de $1,2 \text{ cm}^2$ de área (imagem com aumento de 10 vezes).

4.2.7.3. Análise estatística

A análise estatística dos efeitos das formulações na pele humana foi realizada em duas etapas.

Na primeira etapa, realizou-se uma série de testes visando determinar o tipo de distribuição dos dados amostrais, bem como o grau de homogeneidade das variâncias envolvidas no experimento. É importante conhecer a natureza da distribuição amostral porque ela define quais os testes mais adequados ao tratamento estatístico dos dados.

A distribuição foi normal, por isso empregou-se a análise de variância, seguido do teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

V. RESULTADOS & DISCUSSÃO

O cenário competitivo contemporâneo da indústria cosmética tem sido regido pela revolução tecnológica, globalização, competitividade com acentuada ênfase em preço, qualidade e satisfação do consumidor. Empresas que investem na inovação de seus produtos estão, portanto, buscando assegurar sua permanência ou expansão no mercado.

A indústria de matérias-primas para o mercado cosmético é bastante dinâmica, ou seja, o lançamento de novos polímeros, conservantes, umectantes e principalmente substâncias ativas têm sido constante. O formulador precisa estar atento e em contato com literaturas sobre estas novas matérias-primas para se manter atualizado neste mercado profissional (CHORILLI et al., 2006).

No desenvolvimento de novas formulações, é extremamente importante escolher os componentes de maneira a atingir os critérios desejados, como eficácia, segurança, estabilidade e aceitação pelo consumidor (AYANNIDES & KTISTS, 2002; FOX, 1986).

Logo, a tendência é ter-se cada vez mais disponíveis matérias-primas que permitam bom sensorial e boa estabilidade da formulação, tanto do ponto de vista microbiológico quanto físico-químico, propiciando um prazo de validade viável para comercialização do produto (LEONARDI, 2004).

Hoje em dia, não é suficiente que a formulação seja eficaz se não apresentar sensorial agradável, pois neste caso o consumidor não vai ser constante na sua aplicação, podendo não desfrutar de suas vantagens (GOMES et al., 1998).

Na primeira etapa deste trabalho, propôs-se desenvolver formulações com diferentes proporções de tensoativos a fim de obter sistemas nanoestruturados, objetivando melhor eficácia do ativo incorporado nas formulações.

Por outro lado, sabe-se que geralmente formulações que apresentam elevadas concentrações de tensoativos, quando aplicadas na pele, teoricamente podem ocasionar efeitos indesejáveis, principalmente relacionados com irritação cutânea.

Dessa maneira, buscou-se desenvolver formulações empregando-se tensoativos com baixo potencial irritante. Procurou-se utilizar nas formulações várias moléculas de silicones, em virtude dos mesmos serem muito usados na cosmetologia, por apresentarem vários benefícios à pele, como sensação de sedosidade sem ocasionar a aparência oleosa, além de ajudar na espalhabilidade da formulação, garantindo melhor homogeneidade das matérias-primas presentes na fórmula e, conseqüentemente, ocasionando bom sensorial (DONOLATO et al., 2001).

Os silicones são polímeros sintéticos, nos quais os átomos de silício estão ligados aos de oxigênio formando macromoléculas. Na estrutura química dos silicones, cada átomo de silício é ligado geralmente a dois grupos metila. Esses grupos metila podem ser substituídos por muitos outros, como exemplo, fenóis, vinila, trifluorpropila, entre outros (SILAEX, 2007). A estrutura química básica dos silicones é apresentada na Figura 28.

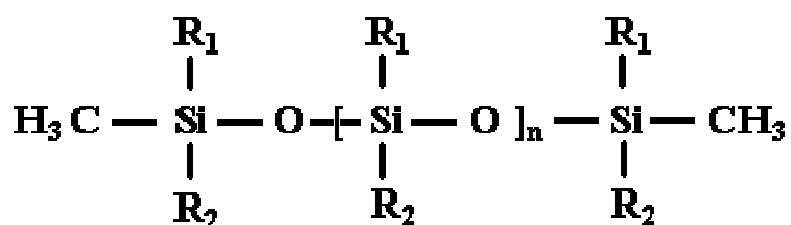


Figura 28. Estrutura química básica dos silicones, sendo que R₁ e R₂ são usualmente os radicais orgânicos: metil, fenil, vinil, fluoropropil, hidroxila e halogênio (SILAEX, 2007).

Desde que foram utilizados pela primeira vez em formulações cosméticas, o que aconteceu por volta de 1950, os silicones vêm propiciando inúmeros benefícios às formulações. Eles têm a propriedade de reduzir a “pegajosidade” das formulações, deixando a pele com a aparência mais natural possível, além de promover facilidade de espalhamento sem deixar a cútis com toque graxo ou oleoso, sendo que as formulações que apresentam em sua fase oleosa apenas silicones são consideradas totalmente *oil free*. Logo, os silicones atendem a várias exigências realizadas pelos formuladores, como aparência natural, toque leve, proteção, incorporação em produtos diferenciados (adolescentes, pele envelhecida) e não comedogenicidade (DONOLATO et al., 2001).

Atualmente, há no mercado silicones que também oferecem função emulsificante, como exemplo, o poliéter funcional siloxano (DC 5329[®]), empregado em alguns sistemas desenvolvidos na pesquisa. O DC 5329[®], segundo informações de literatura, pode ser empregado como emulsificante para uma série de óleos, apresentando como vantagem o fato de ser menos irritante. Como o objetivo do presente trabalho era desenvolver formulações líquido-cristalinas e estas geralmente apresentam teores relativamente altos de agentes emulsificantes, optou-se por utilizar tensoativos teoricamente menos irritantes (PRODUCT INFORMATION, 2002).

O primeiro sistema, S₁, foi constituído por um silicone oleoso (DC 193[®]) como fase oleosa, um silicone emulsificante (DC 5329[®]) como tensoativo e água como fase aquosa.

O DC 193[®] trata-se de um silicone fluido de co-polímero glicol não irritante para a pele e olhos. Como as formulações desenvolvidas seriam para utilização na região periorbicular, a utilização de componentes não irritantes tornou-se de extrema importância, uma vez que esta região é extremamente sensível (PRODUCT INFORMATION, 2004).

O S₂ foi formado por um silicone oleoso (DC 193[®]) como fase oleosa, um tensoativo derivado do ácido fosfórico (Hostaphat KL 340 D[®]), cujo nome químico é triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado e água como fase aquosa.

O Hostaphat KL 340 D[®] é um tensoativo compatível com substâncias aniônicas e não iônicas, dispersível em água e solúvel na maioria dos solventes orgânicos, hidrocarbonatos, ácidos graxos e ésteres. Caracteriza-se por apresentar ação emoliente, aumentando a capacidade de retenção de água devido à sua grande afinidade com os fosfolipídios da pele, além de originar formulações com alta estabilidade e excelente espalhabilidade (CLARIANT, 1999).

O S₃ foi formado por um silicone oleoso (DC 193[®]) como fase oleosa, um tensoativo não iônico clássico (polissorbato 80) e água como fase aquosa.

O monooleato de sorbitano, ou Tween 80[®], trata-se de um tensoativo não iônico muito empregado em formulações cosméticas. Está presente, inclusive, em ceras auto-emulsionantes não iônicas disponíveis no mercado. Apresenta como principais vantagens o fato de serem compatíveis com substâncias ácidas. A estrutura química do polissorbato 80 é apresentada na Figura 29. Uma das justificativas para a utilização deste tensoativo é o fato de que vários autores, utilizando tensoativos não iônicos, obtiveram sistemas líquido-cristalinos (BRINON et al., 1998; KUNIEDA et al., 1999; AL-BAWAB & FRIBERG, 2002).

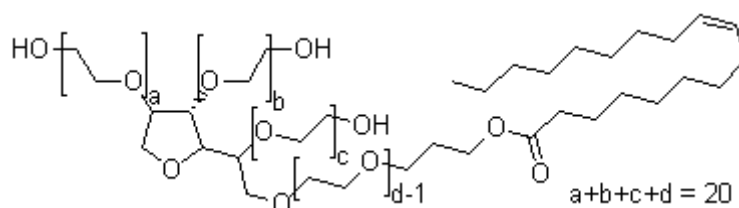


Figura 29. Estrutura química do polissorbato 80 (CHEMBLINK 2007).

O S₄ foi formado por um emoliente funcional (Ceraphyl 230[®]) como fase oleosa, um silicone emulsificante (DC 5329[®]) como tensoativo e água como fase aquosa.

O adipato de diisopropila (Ceraphyl 230[®]) trata-se de um éster graxo de cadeia curta, que apresenta funções emolientes.

O S₅ foi formado por um emoliente funcional (Ceraphyl 230[®]) como fase oleosa, um silicone oleoso que, segundo informações do fabricante, apresenta algumas propriedades tensoativas (DC 193[®]) e água como fase aquosa.

Assim, verifica-se que as matérias-primas empregadas foram escolhidas a fim de se investir em inovação no desenvolvimento de produtos cosméticos, ou seja, a obtenção de sistemas líquido-cristalinos em formulações constituídas por silicones.

5.1. Preparação das formulações

No âmbito da cosmetologia, os estudos de sistemas ternários têm sido usados para obter diferentes estruturas utilizando um único sistema óleo-tensoativo-água e para melhorar a compreensão de várias características físicas destas estruturas. Logo, o diagrama auxilia na determinação da natureza do produto resultante para cada mistura (FERRARI et al., 2003).

O método da titulação foi escolhido para a construção do diagrama de fases por apresentar a vantagem de se estudar um grande número de composições com relativa rapidez (BHARGAVA et al., 1987). Após titulação aquosa, foram calculadas as concentrações de cada componente da formulação para obtenção do diagrama.

Os diagramas foram construídos para os 5 sistemas estudados e descritos na Tabela 1, podendo os mesmos serem visualizados nas Figuras 31 a 40. A leitura dos diagramas foi feita no sentido horário, como exemplo, na Figura 31 o lado direito do diagrama refere-se ao DC 5329[®], a base refere-se ao DC 193[®] enquanto o lado esquerdo refere-se à água.

Os sistemas foram classificados como: sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT), sistema semi-transparente (ST), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF).

Os sistemas opticamente transparentes e líquidos foram considerados SLT, enquanto os sistemas transparentes mais viscosos, que apresentavam pouca ou nenhuma fluidez ao verter o frasco onde estavam contidos, foram denominados SVT. Para RESENDE (2004), a transparência apresentada por estes sistemas pode ser explicada pela capacidade do tensoativo de diminuir a tensão interfacial entre água e óleo a ponto de formar estruturas de tamanhos muito reduzidos, menores que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz visível, que não desviam luz.

Os pontos no diagrama em que se observou opacidade e liquidez nas formulações foram denominados SLO. Sistemas viscosos e opacos, por sua vez, foram denominados SVO. Além disso, sistemas que apresentaram separação de fases ao misturar determinadas proporções de tensoativo:óleo:água, foram denominados SF.

As Figuras 30 e 31 apresentam o diagrama de fases do sistema S_1 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), obtido após titulação aquosa. Observa-se na Figura 30 o diagrama de fases pontual e na Figura 31 o diagrama fechado.

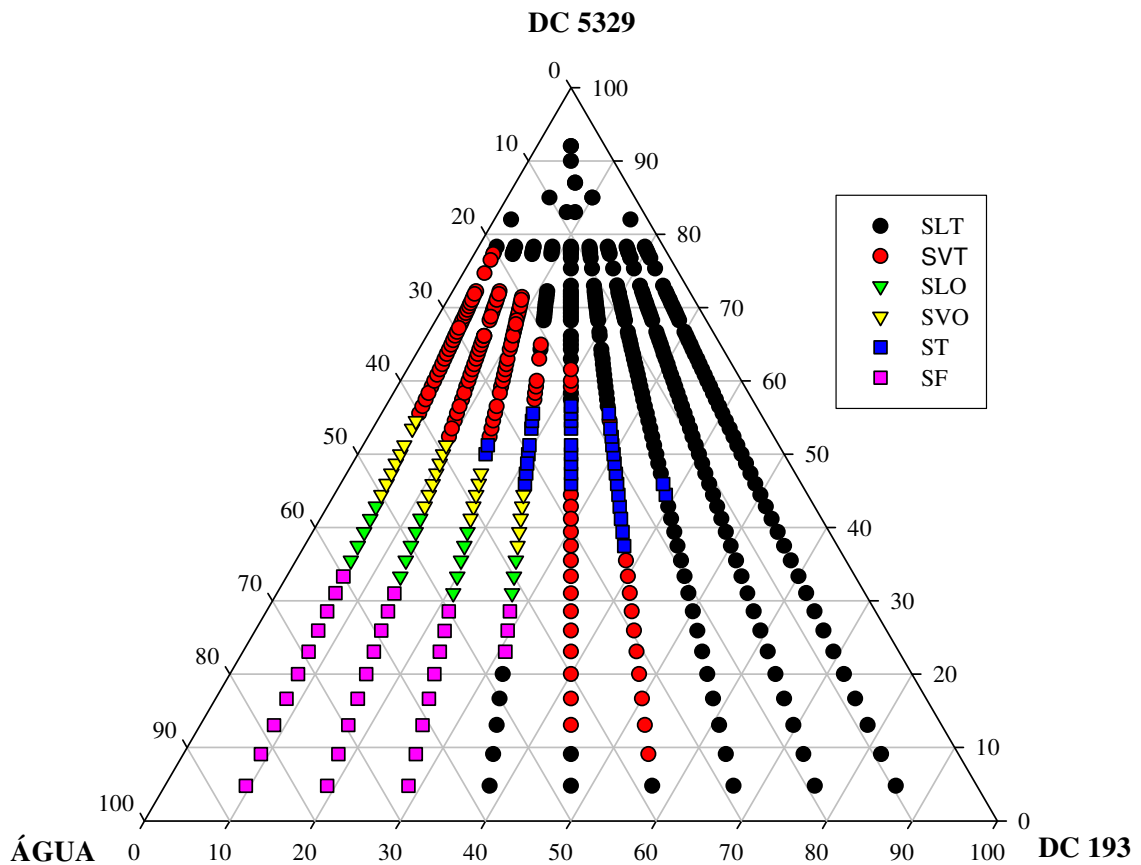


Figura 30. Diagrama de fases pontual do sistema S_1 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: • SLT = sistema líquido transparente; • SVT = sistema viscoso transparente; ■ ST = sistema semi-transparente; ▼ SLO = sistema líquido opaco; ▼ SVO = sistema viscoso opaco; ■ SF = separação de fases.

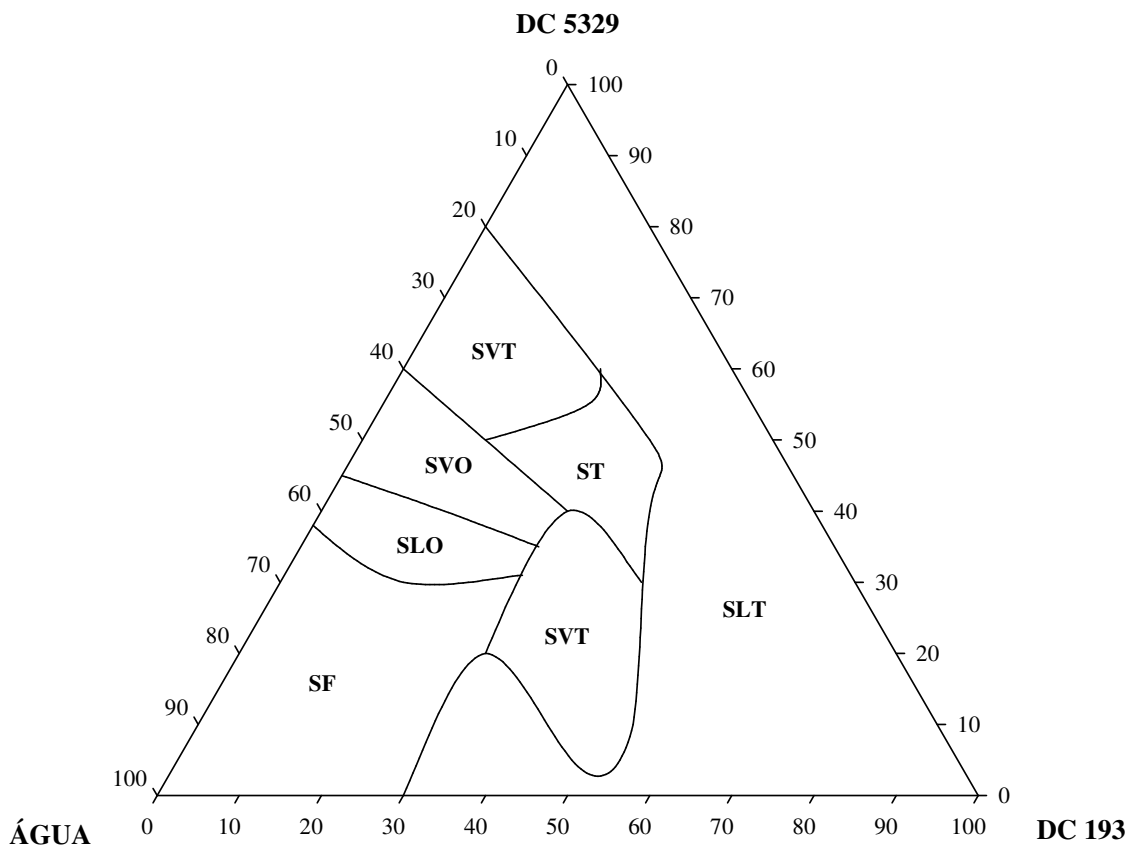


Figura 31. Diagrama de fases fechado do sistema S_1 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVT = sistema viscoso transparente; ST = sistema semi-transparente; SLO = sistema líquido opaco; SVO = sistema viscoso opaco; SF= separação de fases.

O diagrama de fases do sistema S_1 (Figuras 30 e 31) apresenta uma ampla área de SLT e possui duas regiões de SVT. Pelo fato de ter uma associação de um silicone emulsificante (DC 5329[®]) e um silicone oleoso que, segundo informações do fabricante, também apresenta algumas propriedades tensoativas (DC 193[®]), pode-se observar uma ampla faixa de formação de SLT, mesmo com baixas proporções de tensoativo.

Para este sistema, observa-se SF em proporções de tensoativo e óleo inferiores à 30%. À medida que a proporção de óleo aumenta (entre 30 e 55%), mesmo com concentrações de tensoativo inferiores à 30%, observa-se formação de SVT. A formação de SVT foi ainda observada em faixas com concentração de tensoativo superiores à 55%, água (20 a 40%) e óleo (até 30%).

Observou-se também a formação de SVO, SLO e ST.

As Figuras 32 e 33 apresentam o diagrama de fases do sistema S_2 constituído por Hostaphat KL30[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), obtido após titulação aquosa. Observa-se na Figura 32 o diagrama de fases pontual e na Figura 33 o diagrama fechado.

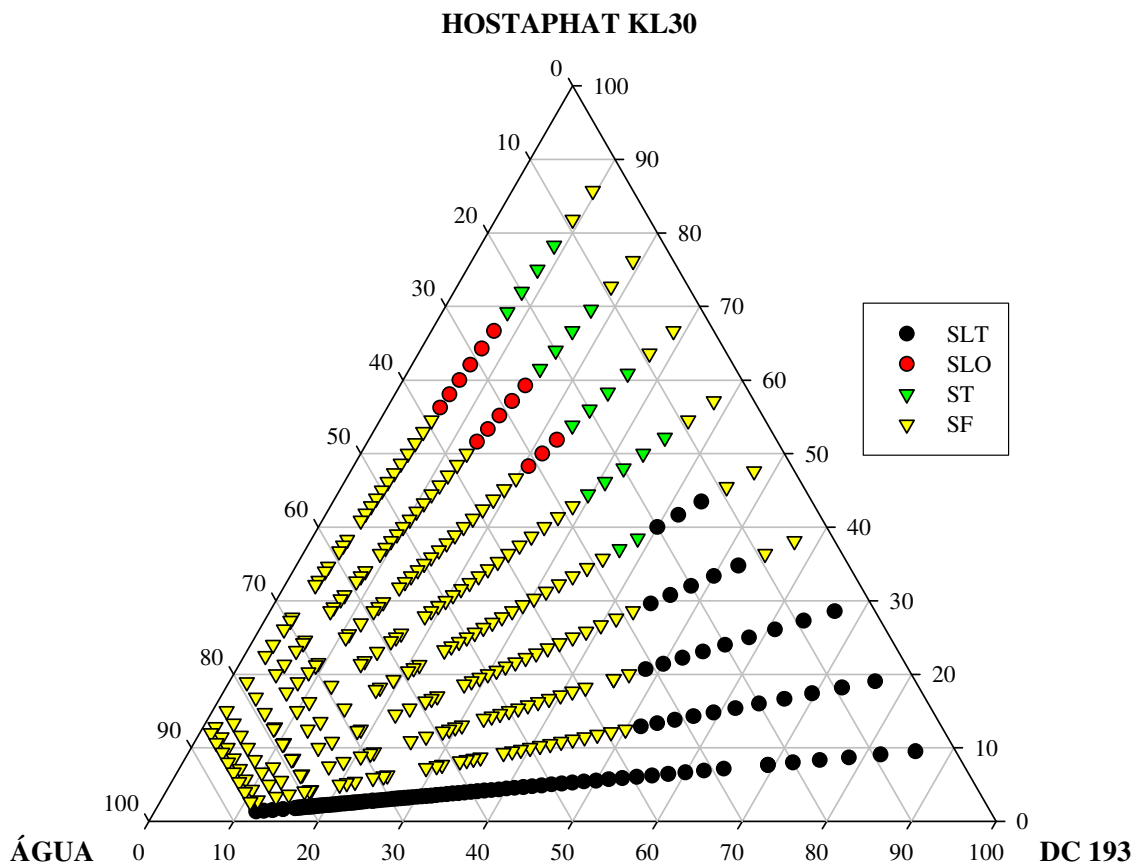


Figura 32. Diagrama de fases pontual do sistema S_2 constituído por Hostaphat KL30[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: ● SLT = sistema líquido transparente; ● SLO = sistema líquido opaco; ▼ ST = sistema semi-transparente; ▼ SF = separação de fases.

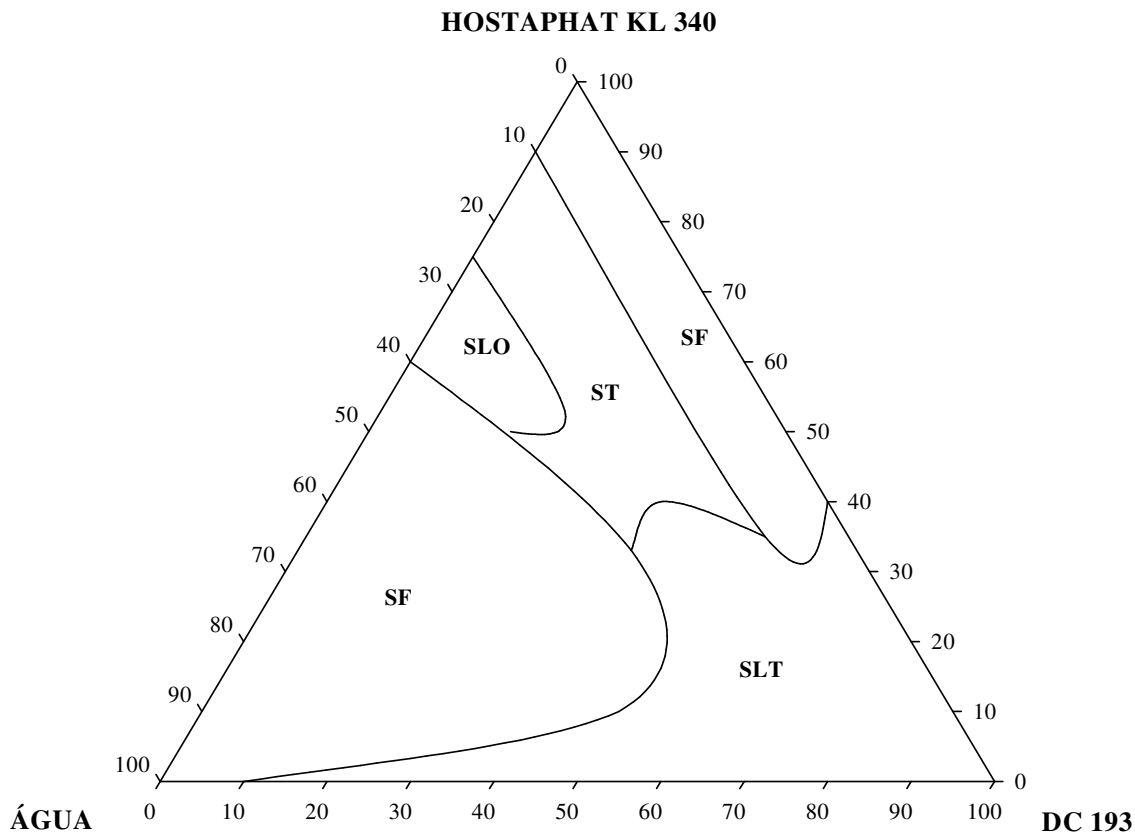


Figura 33. Diagrama de fases fechado do sistema S_2 constituído por Hostaphat KL30[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SLO = sistema líquido opaco; ST = sistema semi-transparente; SF = separação de fases.

O diagrama de fases do sistema S_2 (Figuras 32 e 33) apresenta uma ampla área de SF, dispondo-se em duas regiões. A faixa de SLT apresenta-se em uma ampla área formada por baixas concentrações de tensoativo (máximo de 40%). A faixa de SLO apresenta-se em uma área com concentrações de tensoativo entre 50 a 75%, óleo (até 20%) e água (25-40%).

No diagrama, não observa-se a formação de regiões de SVT e SVO.

As Figuras 34 e 35 apresentam o diagrama de fases do sistema S_3 constituído por Tween 80[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), obtido após titulação aquosa. Observa-se na Figura 34 o diagrama de fases pontual e na Figura 35 o diagrama fechado.

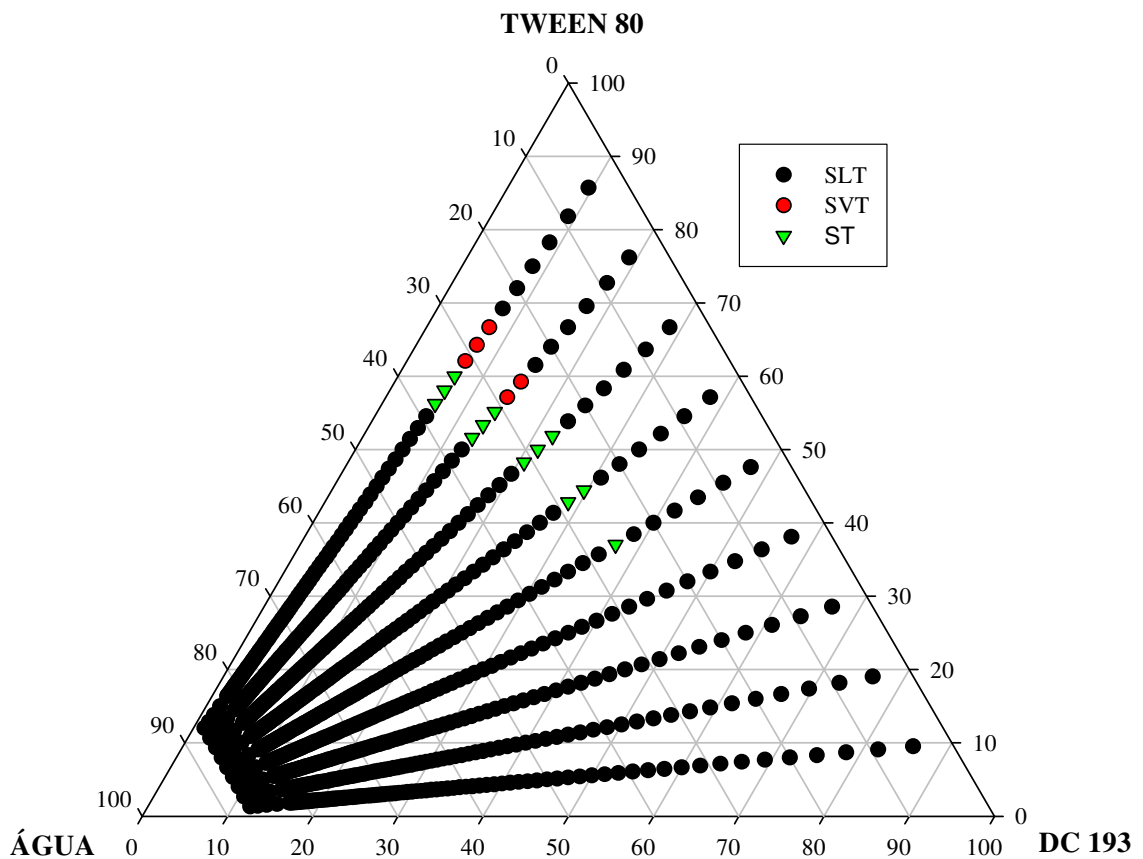


Figura 34. Diagrama de fases pontual do sistema S_3 constituído por Tween 80[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: ● SLT = sistema líquido transparente; ● SVT = sistema viscoso transparente; ▼ ST = sistema semi-transparente.

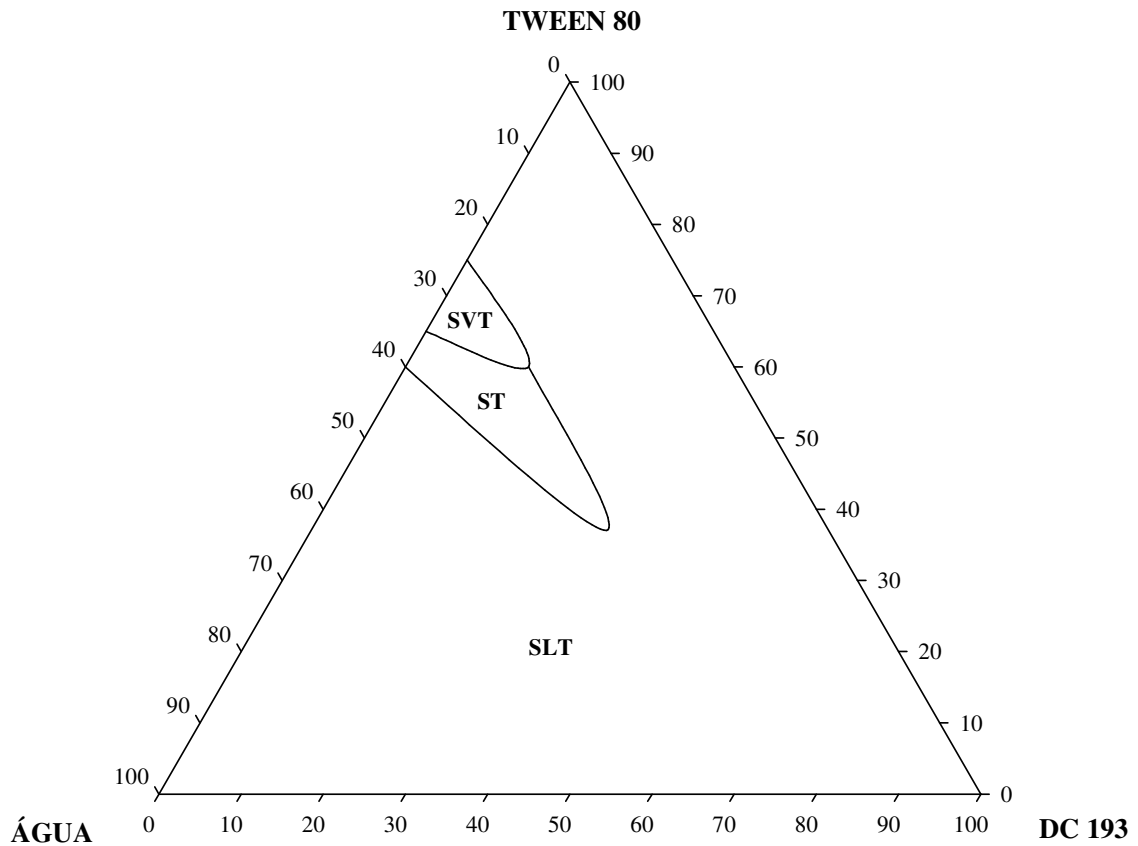


Figura 35. Diagrama de fases fechado do sistema S_3 constituído por Tween 80[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVT= sistema viscoso transparente; ST= sistema semi-transparente.

O diagrama de fases do sistema S_3 (Figuras 34 e 35) apresenta quase que em sua totalidade área de SLT. Encontra-se uma pequena área de SVT numa faixa de alta concentração de tensoativo e baixa concentração de óleo e água.

O diagrama não apresenta região de SLO, SVO e SF.

As Figuras 36 e 37 apresentam o diagrama de fases do sistema S_4 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), obtido após titulação aquosa. Observa-se na Figura 36 o diagrama de fases pontual e na Figura 37 o diagrama fechado.

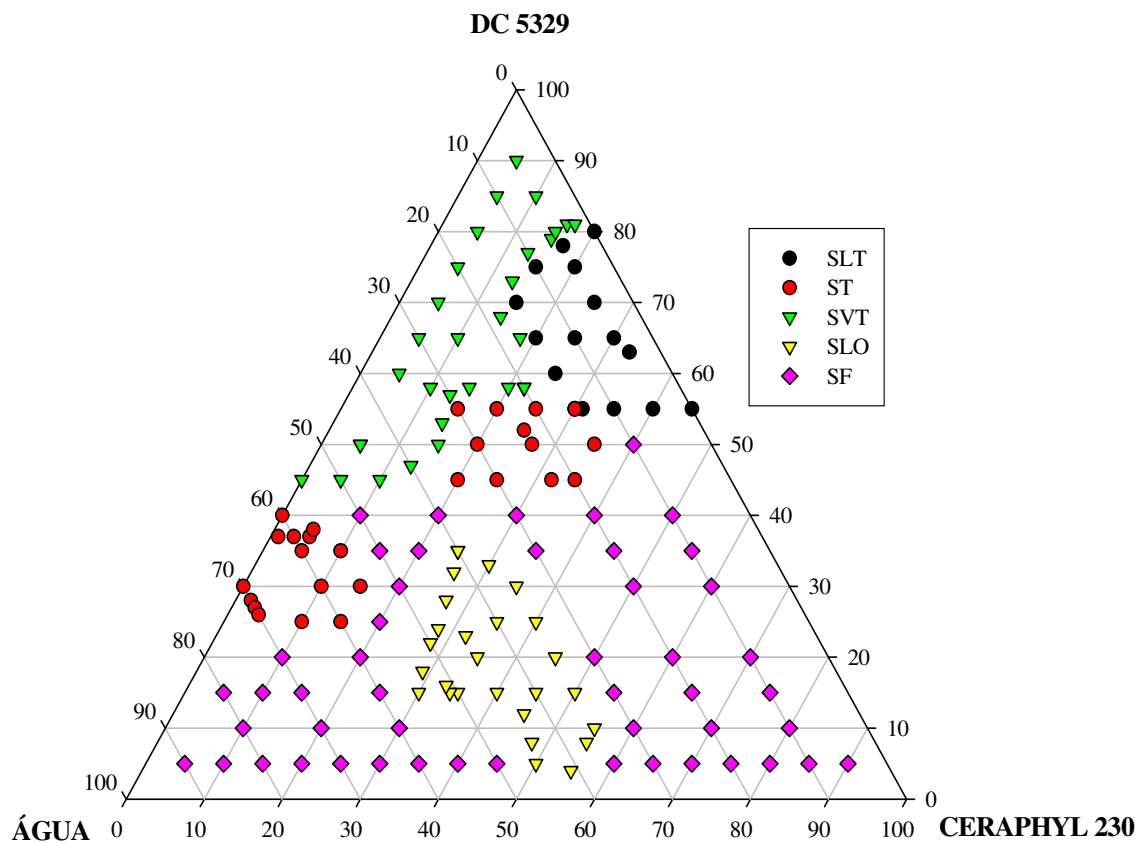


Figura 36. Diagrama de fases pontual do sistema S_4 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: ● SLT = sistema líquido transparente; ● ST = sistema semi-transparente; ▼ SVT = sistema viscoso transparente; ▼ SLO = sistema líquido opaco; ◆ SF = separação de fases.

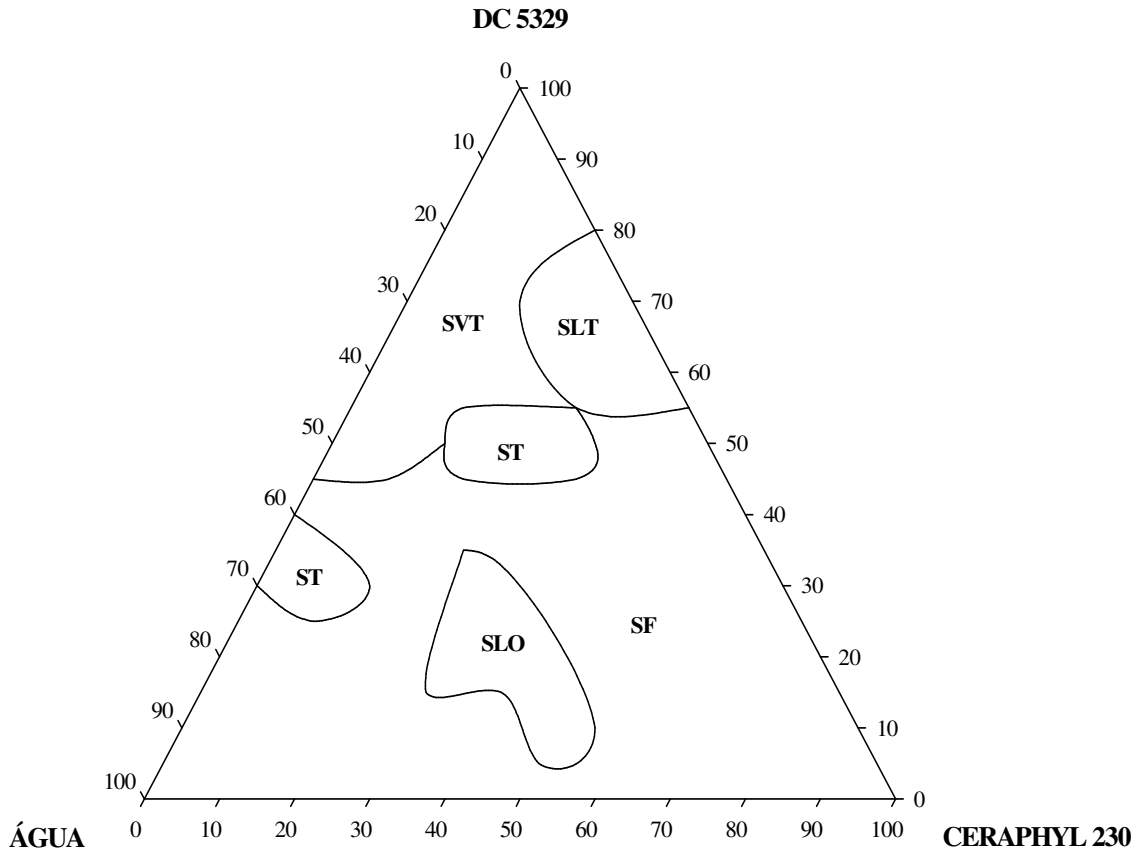


Figura 37. Diagrama de fases fechado do sistema S_4 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVT = sistema viscoso transparente; SLO = sistema líquido opaco; ST = sistema semi-transparente; SF = separação de fases.

A área de SLT do sistema S_4 (Figuras 36 e 37) encontra-se numa área de alta concentração de tensoativo (entre 58 a 80%) e baixa concentração de óleo (entre 10 a 32%). A área de SVT é encontrada a partir de 45% de tensoativo. Ainda existe uma ampla área de SF e duas regiões em que ocorre o aparecimento de ST. A área de SLO é pequena e situa-se numa região que abrange por volta de 5 a 38% de tensoativo.

Não se observa a formação de região de SVO.

As Figuras 38 e 39 apresentam o diagrama de fases do sistema S_5 constituído por DC 193[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), obtido após titulação aquosa. Observa-se na Figura 38 o diagrama de fases pontual e na Figura 39 o diagrama fechado.

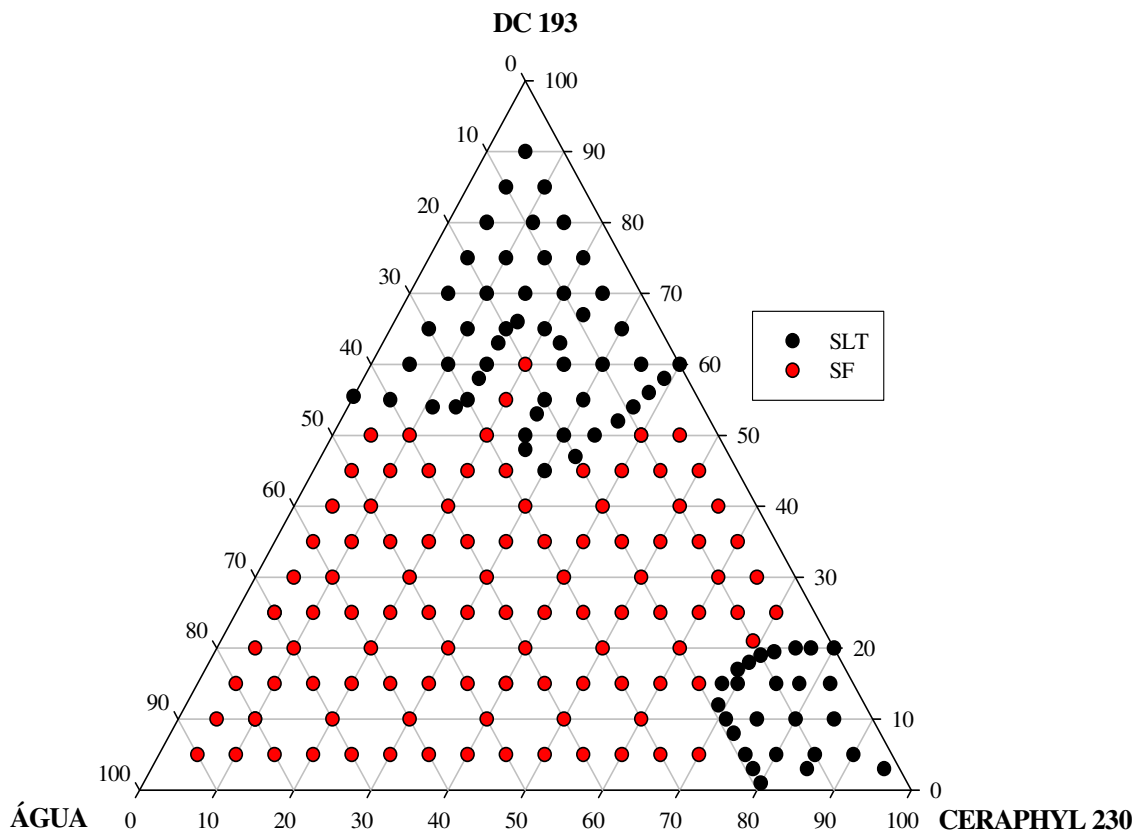


Figura 38. Diagrama de fases pontual do sistema S_5 constituído por DC 193[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: • SLT = sistema líquido transparente; • SF = separação de fases.

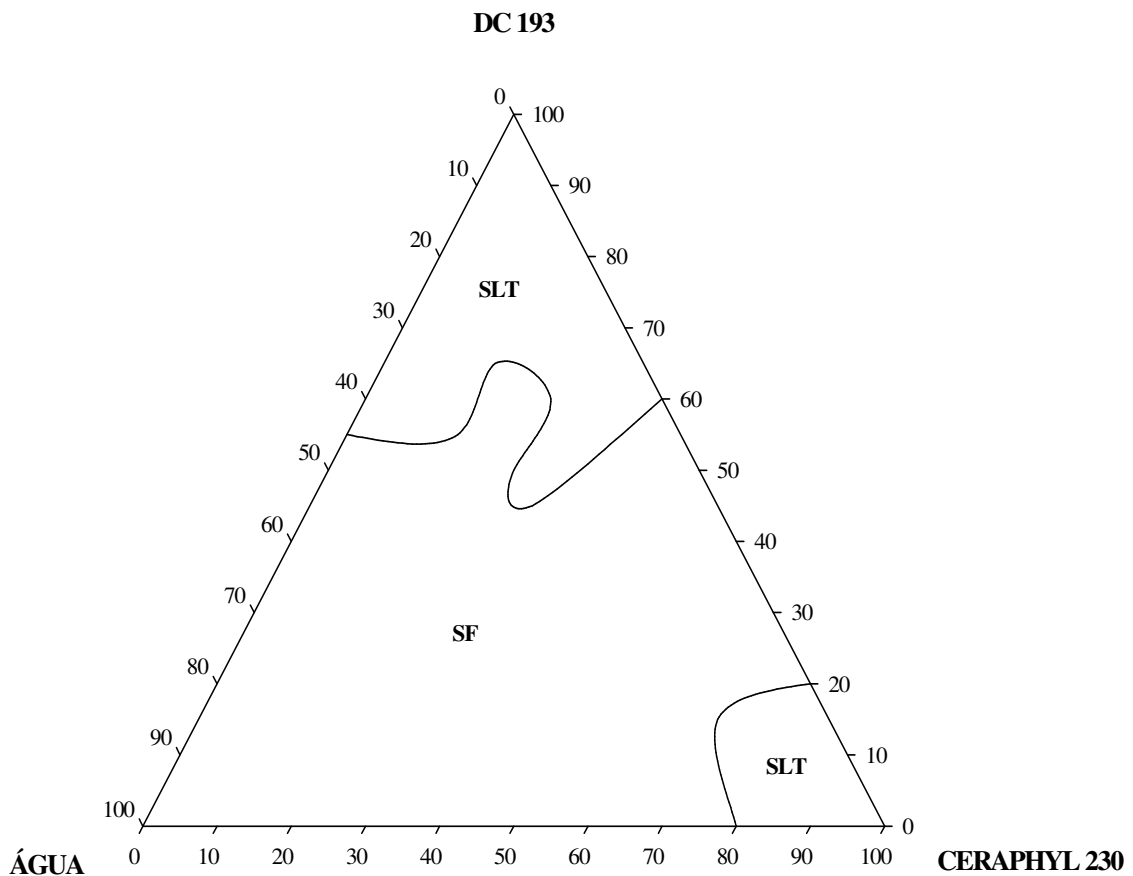


Figura 39. Diagrama de fases fechado do sistema S_5 constituído por DC 193[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e Ceraphyl 230[®] (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SF = separação de fases.

O diagrama de fases do S_5 (Figuras 38 e 39) é caracterizado apenas por dois tipos de sistema, SLT e SF, sendo esta última região a de maior predomínio no diagrama ternário. A região de SLT apresenta-se em duas regiões distintas, uma com alta concentração de tensoativo, enquanto a outra numa região de no máximo 20% de tensoativo.

Observa-se que não foram obtidas regiões de SVT, SLO, SVO e ST.

A partir dos diagramas ternários desenvolvidos para os sistemas S_1 a S_5 , observou-se que o sistema S_1 (Figuras 30 e 31) apresenta algumas características peculiares, como por exemplo, formação de SLT com uma ampla faixa de concentração de tensoativo, o que pode ser interessante para uma formulação de uso tópico, em virtude de que geralmente os tensoativos podem ser irritantes à pele. Além disso, no sistema S_1 observa-se a formação de SVT em duas faixas de concentração de tensoativo: uma entre 55-80% e a outra entre 5 e 40%,

consideração esta importante, pois um dos objetivos deste estudo foi trabalhar com sistemas nanoestruturados para aplicação na região próxima aos olhos. Logo, seria interessante a formulação apresentar certa consistência que permitisse a aplicação do produto e, conseqüentemente, fosse resistente ao escoamento.

Para o sistema S_2 (Figuras 32 e 33), verificou-se a presença de SLT com baixas proporções de tensoativo. Todavia, para este sistema não houve a formação de SVT, o que era imprescindível, em virtude do local de aplicação das formulações.

No sistema S_3 (Figuras 34 e 35), observou-se a formação de SLT em uma ampla área do diagrama, inclusive com baixas concentrações de tensoativo. Verificou-se a formação de SVT com uma concentração de tensoativo entre 65-75% e com concentração de óleo relativamente baixa. Assim, este sistema atende dois requisitos importantes: formação de SLT com baixa concentração de tensoativo e formação de SVT com baixa concentração de óleo.

O sistema S_4 (Figuras 36 e 37), por sua vez, destacou-se por apresentar área de SVT com concentração de tensoativo próxima a 45%. Além disso, apresentou área de SLT com concentrações de tensoativo entre 58-80% e baixa concentração de óleo (10-32%), abordagem que também pode ser interessante, em virtude de muitos óleos apresentarem propriedades comedogênicas. Logo, a obtenção de formulações com menores proporções de óleo também pode ser explorada.

Para o sistema S_5 (Figuras 38 e 39), observou-se a formação de SLT em duas regiões distintas, uma com concentração de tensoativo alta e a outra com concentração de tensoativo relativamente baixa (no máximo 20%). Todavia, para este sistema não houve a formação de SVT, o que seria extremamente importante em virtude do local de aplicação das formulações.

5.2. Caracterização físico-química dos sistemas

5.2.1. Formulações selecionadas

De cada sistema obtido, foram selecionadas três formulações para caracterização físico-química. Na seleção das formulações, utilizou-se como critério o fato de que, nos pontos selecionados, os sistemas de maior interesse, de acordo com os diagramas de fases obtidos (S_1 e S_4), eram regiões de SLT e SVT. Manteve-se constante o teor de tensoativo (60%) e variaram-se as proporções de fase aquosa e fase oleosa (Tabela 3).

Tabela 3. Formulações preparadas com concentração fixa de tensoativo e variações nas proporções de fase aquosa e oleosa.

	Formulações (%)		
	F ₁	F ₂	F ₃
Água	30,0	20,0	10,0
Óleo	10,0	20,0	30,0
Tensoativo	60,0	60,0	60,0

5.2.2. Determinação da densidade relativa

O valor de densidade relativa foi medido em triplicata pelo método do picnômetro para as formulações escolhidas.

A densidade da água observada foi de 1,01g/cm³, sendo que os resultados de densidade relativa das formulações estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Densidade relativa (g/cm³) das três formulações estudadas para cada sistema (n =3).

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
F ₁	1,04 ± 0,02	1,03 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,05 ± 0,04	1,03 ± 0,02
F ₂	1,03 ± 0,03	1,02 ± 0,01	1,07 ± 0,01	1,02 ± 0,03	1,05 ± 0,03
F ₃	1,04 ± 0,01	1,00 ± 0,03	1,06 ± 0,01	1,01 ± 0,03	1,01 ± 0,02

Verificou-se que não houve diferença significativa entre os resultados das densidades de cada sistema.

5.2.3. Determinação da condutividade iônica

Os valores da condutividade iônica dos sistemas podem ser visualizados nas Figuras 40 a 44. A Figura 40 apresenta os valores de condutividade iônica em $\mu\text{S/cm}$ das três formulações estudadas do sistema S₁. Os valores obtidos de condutividade iônica para as formulações F₁, F₂ e F₃ foram 13,57; 11,26 e 9,89 $\mu\text{S/cm}$, respectivamente (n = 3).

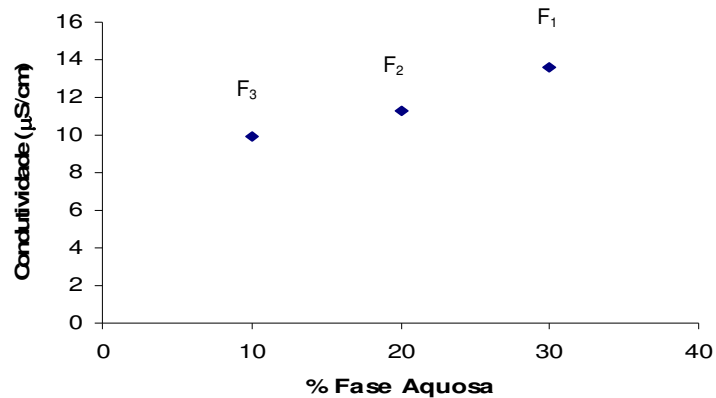


Figura 40. Efeito da variação de porcentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₁, constituído de silicone fluido de co-polímero glicol (fase oleosa), poliéter funcional siloxano (tensoativo) e água (fase aquosa).

A Figura 41 apresenta a média dos valores de condutividade iônica em $\mu\text{S}/\text{cm}$ das três formulações estudadas do sistema S₂. Os valores obtidos de condutividade iônica para as formulações F₁, F₂ e F₃ foram 642; 306 e 213 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente ($n = 3$).

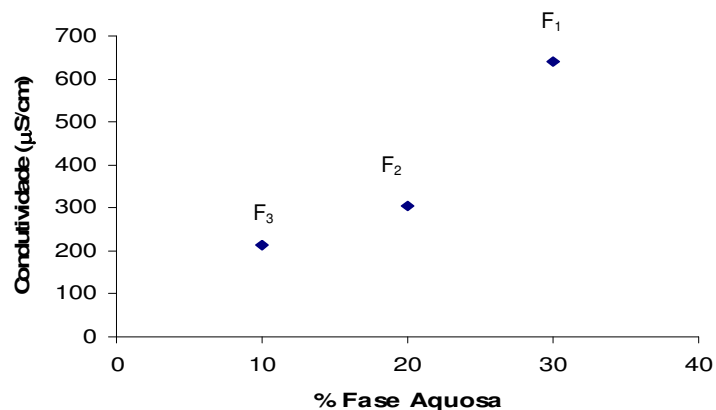


Figura 41. Efeito da variação de porcentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₂, constituído de silicone fluido de co-polímero glicol (fase oleosa), trilaúril-4-fosfato (tensoativo) e água (fase aquosa).

A Figura 42 apresenta a média dos valores de condutividade iônica em $\mu\text{S}/\text{cm}$ das três formulações estudadas do sistema S₃. Os valores obtidos de condutividade iônica para as formulações F₁, F₂ e F₃ foram 20,91; 19,28 e 18,56 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente ($n = 3$).

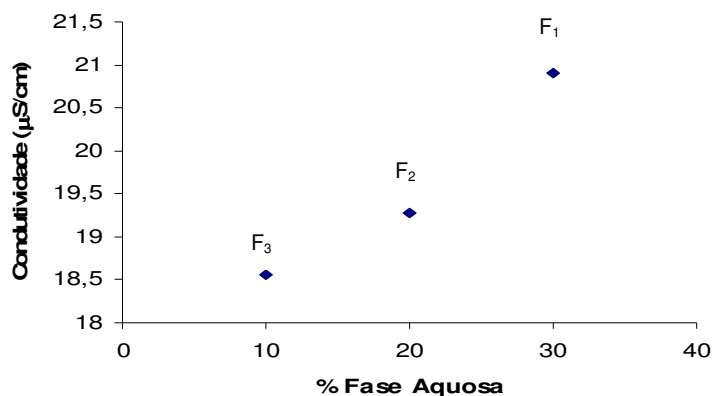


Figura 42. Efeito da variação de porcentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₃, constituído de silicone fluido de co-polímero glicol (fase oleosa), polissorbato 80 (tensoativo) e água (fase aquosa).

A Figura 43 apresenta a média dos valores de condutividade iônica em $\mu\text{S/cm}$ das três formulações estudadas do sistema S₄. Os valores obtidos de condutividade iônica para as formulações F₁, F₂ e F₃ foram 11,80; 9,60 e 2,77 $\mu\text{S/cm}$, respectivamente ($n = 3$).

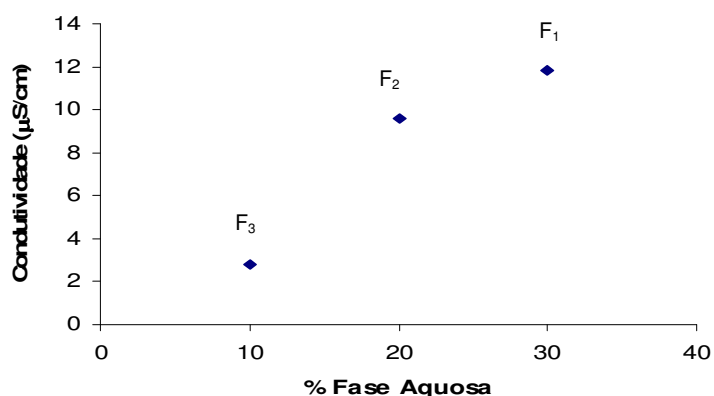


Figura 43. Efeito da variação de porcentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₄, constituído de adipato de diisopropila (fase oleosa), poliéter funcional siloxano (tensoativo) e água (fase aquosa).

A Figura 44 apresenta a média dos valores de condutividade iônica em $\mu\text{S/cm}$ das três formulações estudadas do S₅. Os valores obtidos de condutividade iônica para as formulações F₁, F₂ e F₃ foram 12,17; 7,72 e 6,21 $\mu\text{S/cm}$, respectivamente ($n = 3$).

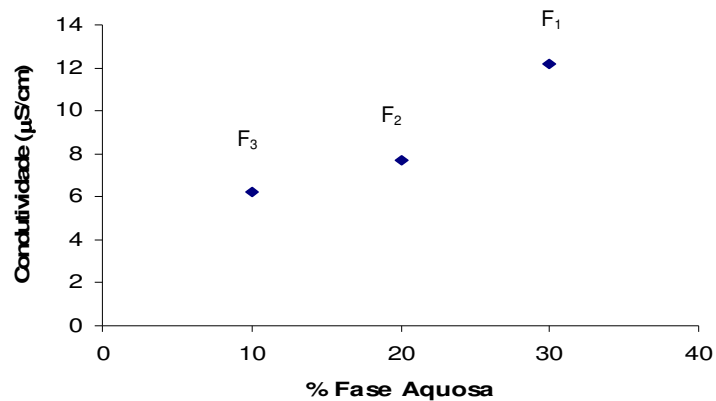


Figura 44. Efeito da variação de porcentagem de fase aquosa nos valores de condutividade iônica das formulações F₁, F₂ e F₃ do sistema S₅, constituído de adipato de diisopropila (fase oleosa), silicone fluido de co-polímero glicol (tensoativo) e água (fase aquosa).

Com o estudo da condutividade iônica foi possível observar que, com o aumento da concentração de água, o resultado da condutividade iônica também aumentou, confirmando que quanto maior a quantidade de água, maior o resultado da condutividade iônica devido à maior transferência de elétrons (MORAIS, 2006). Foi observado também que nas Figuras 40, 41 e 42, apesar das formulações serem constituídas com as mesmas proporções de fase aquosa, oleosa e de tensoativo e serem constituídas da mesma fase oleosa (DC 193[®]) e mesma fase aquosa, diferenciando-se apenas no tensoativo utilizado para cada sistema, houve bastante diversidade entre os resultados, os quais provavelmente foram resposta direta das características de cada tensoativo utilizado.

Pode-se concluir que o Hostaphat[®] (Figura 41) conduz elétrons com mais facilidade do que os outros tensoativos, pois seus resultados de condutividade iônica compreenderam uma faixa de 200 a 650 µS/cm, enquanto que os resultados do DC 5329[®] (Figura 40) compreenderam aproximadamente de 9 a 14 µS/cm e os do Tween 80[®] (Figura 42) de 18 a 21 µS/cm, um pouco mais elevado comparado ao DC 5329[®]. Nas Figuras 43 e 44, o que possivelmente interferiu nos resultados da condutividade iônica foram as propriedades da fase oleosa (Ceraphyl[®] 230) e do tensoativo utilizado (DC 5329[®] na Figura 43 e DC 193[®] na Figura 44), podendo ser comparados com os baixos valores de condutividade iônica obtidos na Figura 40, formulação na qual também se utilizou DC 5329[®] como tensoativo.

Nas formulações relacionadas às Figuras 40, 43 e 44 foram utilizados silicones que apresentam propriedades emulsificantes como tensoativo.

Nas formulações apresentadas nas Figuras 40 e 43, utilizou-se o mesmo silicone como tensoativo (DC 5329[®]), sendo este um emulsificante designado para preparações de emulsões

O/A, as quais formam vesículas de silicone onde se aglomeram os princípios ativos, além de possuírem propriedades estabilizadoras de sistemas nanoestruturados (PRODUCT INFORMATION, 2002).

Para as formulações cujos resultados de condutividade iônica estão descritos na Figura 41, verifica-se que o tensoativo utilizado possui forte propriedade emulsificante principalmente em emulsões O/A, produzido a partir da etoxilação do álcool natural C_{12/14} com subsequente reação com H₃PO₄ e neutralização com NaOH. Por tratar-se de um tensoativo iônico, a tendência é apresentar maior quantidade de cargas, justificando os altos valores de condutividade encontrados (CLARIANT, 1999).

Na Figura 42, observam-se os resultados de condutividade iônica de uma formulação em que se empregou um tensoativo não iônico. Os tensoativos não iônicos são os mais utilizados por não interagirem eletricamente com os outros componentes da formulação, pois não apresentam carga devido à sua afinidade com a água, exercendo apenas a função de reduzir a tensão interfacial entre a fase aquosa e oleosa. Como não apresentam cargas, conseqüentemente apresentam menor condutividade iônica, justificando os baixos valores de condutividade obtidos (MORAIS, 2006).

Obtidos os resultados de densidade e condutividade iônica para os cinco sistemas, verificou-se que nenhum deles apresentou valores discrepantes para que fosse necessária sua exclusão do estudo.

5.2.4. Teste de estabilidade preliminar (TEP)

Selecionou-se a formulação F₁ dos sistemas S₁ e S₄, que foi submetida ao TEP. Neste estudo, as formulações foram submetidas a condições de estresse, sendo acondicionadas em estufa (37 ± 2 °C), geladeira (5 ± 2 °C) e também mantidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). O teste foi realizado em dois períodos, 24 horas e 15 dias após a manipulação.

Os estudos de estabilidade preliminares se iniciaram após 24 horas de manipulação da formulação, pois de acordo com a literatura, formulações recém-preparadas podem não estar equilibradas plenamente, ou seja, elas podem não ter adquirido estabilidade logo após seu preparo, sendo desejável um período inicial para estabilização (DI MAMBRO, 2001).

5.2.4.1. Teste de centrifugação

O teste de centrifugação é um teste que permite avaliar a estabilidade de diferentes formulações, fornecendo informações rápidas sobre a separação de fases da dispersão, avaliando a coalescência ou a cremação, podendo predizer se o produto separará em função do tempo (AZZINI, 1999; SILVA & SOARES, 1996).

Logo, trata-se de um artifício que permite a rápida avaliação de possíveis instabilidades físico-químicas que as formulações podem apresentar (DI MAMBRO, 2001).

Nenhuma das formulações empregadas neste estudo apresentou separação de fases (coalescência, cremação ou floculação) após centrifugação. Logo, ambas apresentaram-se estáveis frente a este teste e aptas para o prosseguimento do estudo.

5.2.4.2. Microscopia de luz polarizada para as formulações selecionadas

As análises microscópicas foram realizadas no tempo 24 horas (T_1) e 15 dias (T_{15}) após a manipulação, sendo que os resultados podem ser observados nas Figuras 45 a 48.

Pôde-se verificar que os sistemas S_1 e S_4 apresentaram fases líquido-cristalinas lamelares em sua estrutura, evidenciado pela presença de estruturas semelhantes a “cruzes de malta”, as quais são características de fase lamelar.

Nas Figuras 45 e 46, foi possível observar, sob microscopia de luz polarizada, áreas anisotrópicas indicando presença de fases líquido-cristalinas do tipo lamelar, tanto nas primeiras 24 horas após a manipulação quanto depois de 15 dias, armazenadas sob diferentes condições térmicas, o que indica que possivelmente não houve mudanças conformacionais severas na estrutura interna do sistema, mesmo submetido ao estresse térmico. Na Figura 46(c), além da presença de fases líquido-cristalinas do tipo lamelar, observou-se possível presença de fase hexagonal, caracterizada pela presença de estrias.

A fase lamelar, ao se formar, assume um estado intumescido pelo fato da água ser adsorvida entre as camadas de tensoativo, formando o domínio hidrofílico do cristal líquido. A água situada entre as lamelas possui características de água ligada, devido às fortes interações entre suas moléculas e os grupos polares dos tensoativo. Isto não permite a perda por evaporação, necessitando de maior energia que a disponível à temperatura da superfície cutânea para evaporar (PARK et al., 2001; SANTOS, 2006).

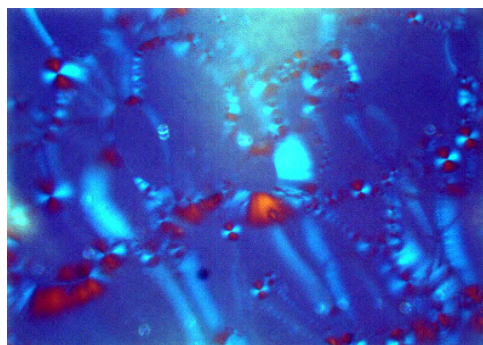


Figura 45. Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F_1 do sistema S_1 (silicone fluido de co-polímero glicol, poliéter funcional siloxano e água) observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (400x).

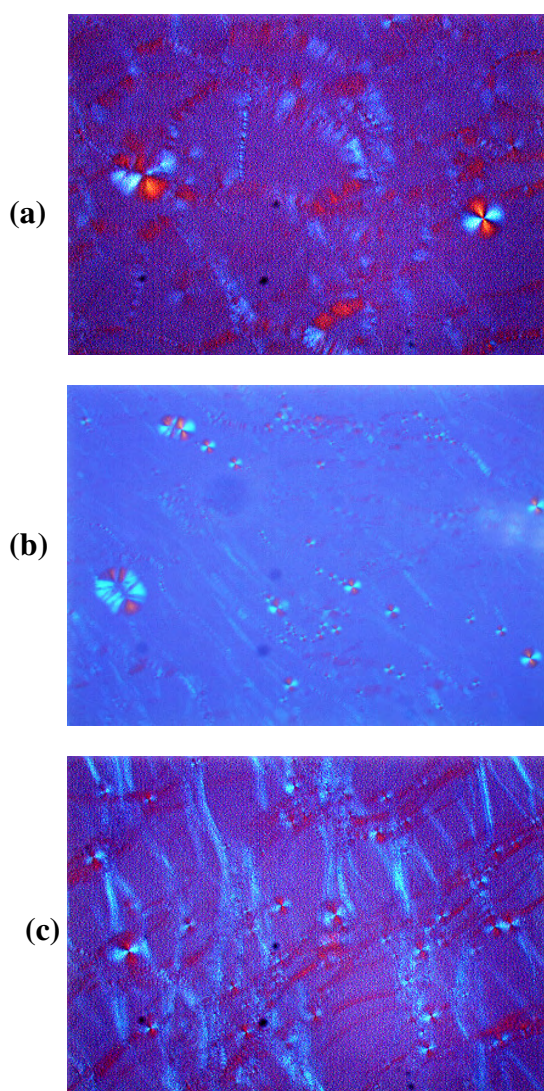


Figura 46. Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F_1 do sistema S_1 (silicone fluido de co-polímero glicol, poliéter funcional siloxano e água) observado 15 dias após manipulação: (a) à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), (b) em geladeira (5 ± 2 °C) e (c) em estufa (37 ± 2 °C) (200x).

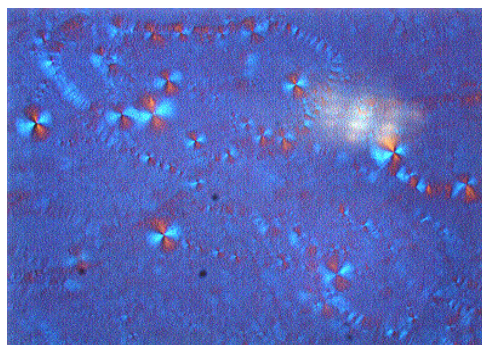


Figura 47. Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F₁ do sistema S₄ (adipato de diisopropila, poliéter funcional siloxano e água) observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (400x).

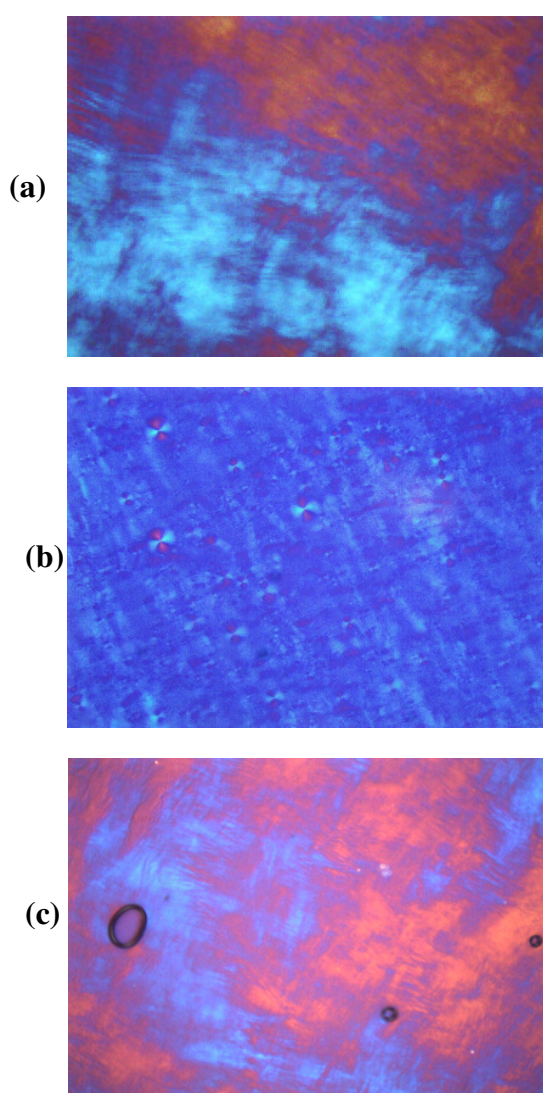


Figura 48. Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F₁ do sistema S₄ (adipato de diisopropila, poliéter funcional siloxano e água) observado 15 dias após manipulação: **(a)** à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), **(b)** em geladeira (5 ± 2 °C) e **(c)** em estufa (37 ± 2 °C) (200x).

A organização interna da fase hexagonal pode estar relacionada com o arranjo ocorrido entre os três componentes constituintes das formulações, principalmente entre a água e o tensoativo. Com o aumento da quantidade da água e conseqüente diminuição do tensoativo, a disposição da água em torno das cabeças polares do tensoativo pode se rearranjar para outras formas. As cabeças polares do tensoativo, na presença de aumento de fase aquosa estariam sendo hidratadas pela água devido à alta hidrofília desses grupos, promovendo organizações mais rígidas e mais complexas, típicas de fase hexagonal (SOTIRO, 2007).

Nas Figuras 47 e 48 também foi possível observar, sob luz polarizada, a presença de “cruzes de malta”, sugerindo a presença de fase líquido-cristalina do tipo lamelar. Quando o sistema foi mantido em estufa a 37 ± 2 °C por 15 dias observou-se a presença de “estrias”, o que sugere o aparecimento de fase líquido-cristalina hexagonal. Respostas mais conclusivas visando melhor elucidação da estrutura formada podem ser obtidas pela associação da técnica de microscopia de luz polarizada com espalhamentos de raios-X a baixo ângulo (SAXS). O que pode ser concluído desse sistema, através das análises de microscopia de luz polarizada, é que os resultados obtidos foram resposta direta da influência da temperatura.

É importante considerar também a temperatura em que as formulações foram armazenadas. De acordo com CADWALLADER (1989), a temperatura é importante na verificação da estabilidade da formulação uma vez que os produtos não podem ser isolados do seu meio ambiente. Logo, a influência de fatores como a variação de temperatura não podem ser desprezados nas avaliações de estocagem.

Segundo KLEIN (2002), a estabilidade está intrinsicamente relacionada com a temperatura à qual o produto é exposto. Logo, se as formulações forem expostas a temperaturas elevadas, as estruturas lamelares podem ser destruídas.

A diferença entre os resultados dos sistemas pode ser explicada a partir da fase oleosa, uma vez que esta é a única diferença entre os dois sistemas. Logo, pode-se sugerir que a formulação do sistema S₁ apresentou-se mais estável que a formulação do sistema S₄, pois esta permaneceu sem alterações estruturais com o passar do tempo, podendo ser observados os cristais líquidos do tipo lamelar nos tempos 24 horas e 15 dias, não ocorrendo o mesmo para o sistema S₄.

Para TYLE (1989), a proporção correta entre fase oleosa/tensoativo/fase aquosa é de extrema importância para a formação de sistemas líquido-cristalinos lamelares, uma vez que a interação óleo/tensoativo/água proporciona a formação de cristais líquidos ao redor dos glóbulos, aumentando a estabilidade das formulações.

Observou-se nestes sistemas que a formação de cristais líquidos influenciou de forma positiva a estabilidade, possibilitando a formação de formulações estáveis.

Estudos de FRIBERG (1971), BRINON e colaboradores (1998) e KLEIN (2002) sugerem que os cristais líquidos do tipo lamelar são responsáveis pela estabilização das formulações devido às estruturas lamelares formarem uma proteção ao redor dos glóbulos prevenindo a adesão e coalescência.

O uso de tensoativos não iônicos, como o DC 5329[®], segundo SANTOS (2006), promove a formação de fase líquido-cristalina. De acordo com MORAIS (2006), os cristais líquidos são formados também na presença de modificadores reológicos tais como álcool estearílico, cetílico e cetoestearílico. Os álcoois graxos de cadeia longa, na presença de tensoativo não-iônico, formam mesofases lamelares, pois se posicionam entre as moléculas de tensoativo e se intumescem devido à hidratação das cadeias de polioxietileno do tensoativo. MORAIS (2006) relatou que com tensoativos lipofílicos (esteárico e estearílico) de cadeia longa e saturada obtêm-se emulsões mais estáveis, pois a cadeia longa penetra mais profundamente na gotícula de óleo e é menos rígida em relação à rotação do que uma cadeia oléica que apresenta dupla ligação, além de apresentar porção polar reduzida em relação aos oleatos, o que é favorável à formação de fases lamelares.

5.3. Sistemas acrescidos de palmitato de retinol

5.3.1. Desenvolvimento das formulações

5.3.1.1. Diagrama de fases

O diagrama de fases do sistema S₁ acrescido de 1% de palmitato de retinol (PR) na fase oleosa, juntamente com o DC 193[®], é apresentado na Figura 49. Logo, o sistema apresentou como componentes: DC 193[®]/PR como fase oleosa, DC 5329[®] como tensoativo e água como fase aquosa.

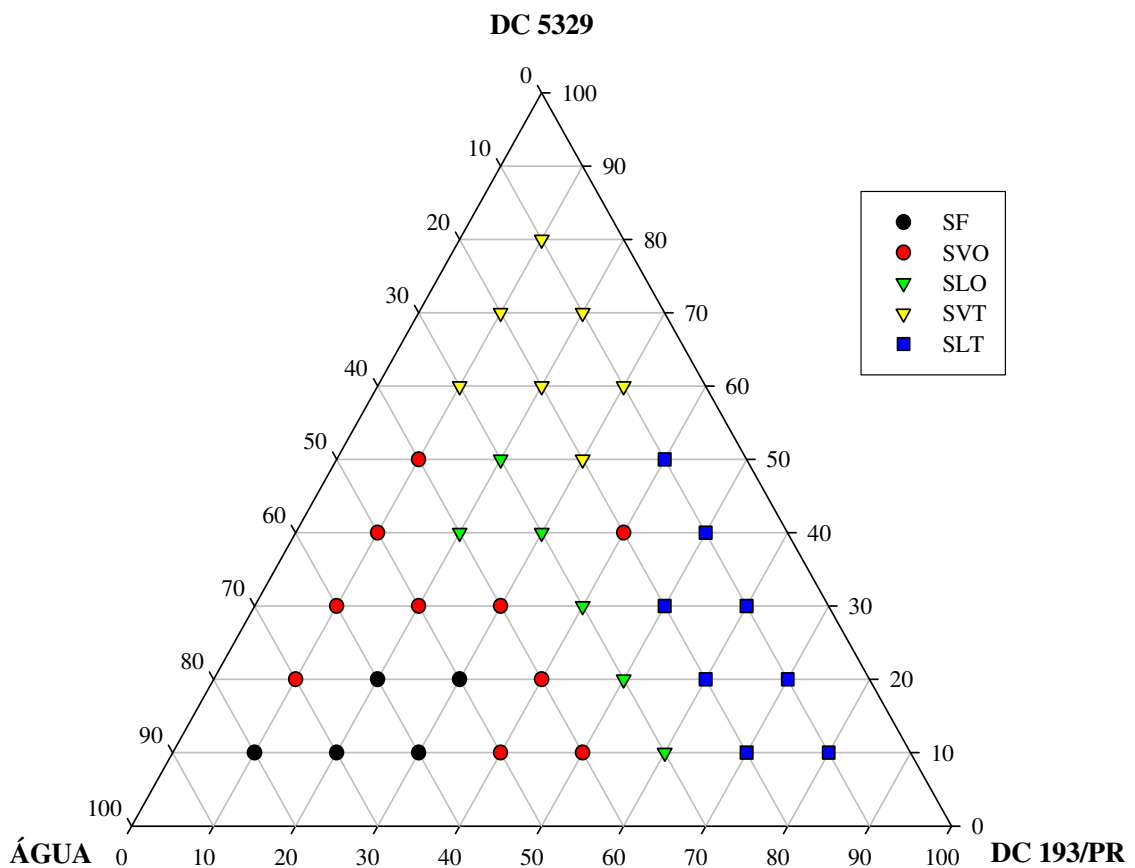


Figura 49. Diagrama de fases do sistema S_1 constituído por DC 5329[®] (tensoativo), água (fase aquosa) e DC 193[®]/PR (fase oleosa), no qual: ● SF (separação de fases); ● SVO (sistema viscoso opaco); ▼ SLO (sistema líquido opaco); ▼ SVT (sistema viscoso transparente); ■ SLT (sistema líquido transparente).

O diagrama de fases exibido na Figura 49 apresenta-se dividido com a prevalência de sistemas viscosos opacos (SVO). São observadas regiões de sistemas líquidos transparentes (SLT), as quais apresentam concentração de fase oleosa acima de 40% e regiões de sistemas viscosos transparentes (SVT), com concentração de tensoativo acima de 50%, principalmente entre 60-80%. As regiões que correspondem à separação de fases (SF) estão localizadas, pelo diagrama, em locais em que se teve baixa concentração de tensoativo. São observadas também regiões de sistemas líquidos opacos (SLO).

Assim, pode-se observar que a proporção água/tensoativo/óleo interfere no diagrama de fases. Portanto, o estudo do diagrama óleo/tensoativo/água, de acordo com COMELLES e colaboradores (1989), revela muitas possibilidades de acordo com os diferentes estados de

agregação molecular presentes em equilíbrio. Os domínios de solubilidade podem, por sua vez, corresponder a regiões como as de estruturas cristalinas e apresentarem um amplo espectro de possibilidades disponíveis simplesmente pela variação da proporção relativa dos componentes do sistema, permitindo o conhecimento das concentrações ideais entre os constituintes de uma determinada formulação; logo, os domínios de solubilidade auxiliam na determinação da concentração máxima e mínima limite para a obtenção de uma formulação estável e balanceada.

5.3.1.2. Formulações selecionadas

A Tabela 5 apresenta a composição e concentração dos componentes nas formulações selecionadas. Tais formulações foram escolhidas devido ao fato de que se pretendia verificar se sistemas viscosos transparentes (SVT) apresentariam ação diferente nos estudos de segurança e eficácia que os sistemas viscosos opacos (SVO). Logo, foram selecionados pontos dentro do diagrama de fases do sistema S_1 de SVT (F_1 e F_{1v}) e SVO (F_4 e F_{4v}), com o objetivo de comparar a eficácia das formulações em função do tipo de estrutura formada.

Tabela 5. Composição e concentração dos componentes nas formulações selecionadas.

Componentes	F_1 (%)	F_{1v} (%)	F_4 (%)	F_{4v} (%)
Água	30	30	40	40
Silicone fluido de co-polímero glicol (DC [®] 193)	10	9	20	19
Poliéter funcional siloxano (DC [®] 5329)	60	60	40	40
Palmitato de retinol	---	1	---	1

5.3.2. Teste de estabilidade das formulações

5.3.2.1. Características organolépticas

A análise macroscópica foi utilizada para seleção da formulação, visto que a avaliação visual da formulação é um método claro de detecção de separação de fases ou instabilidade, podendo fornecer informações importantes, como separação de fases das formulações (IDSON, 1993).

A instabilidade que pode ocorrer em sistemas como os desenvolvidos neste trabalho, pode se manifestar sob a forma de cremeação – com ou sem agregação e aumento do tamanho das gotículas, floculação – com ou sem cremeação, aumento do diâmetro das gotículas devido à diminuição da área interfacial e coalescência o que, por sua vez, resultaria em separação de fases (RIEGER, 1996).

Todavia, não houve alteração nas características organolépticas em nenhuma das 4 formulações quanto ao odor, cor e homogeneidade durante todo o período de 30 dias.

5.3.2.2. Determinação da densidade relativa

Estudos que visam a determinação da densidade relativa são importantes, visto que a medida de densidade pode estar relacionada ao controle de aeração da formulação (SANCTIS, 1999).

A determinação da densidade foi feita em triplicata pelo método do picnômetro para as quatro formulações. O valor da densidade da água resultou em $1,01 \text{ g/cm}^3$, sendo que os resultados das formulações estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Densidade relativa das formulações estudadas (g/cm^3).

Formulações	Densidade relativa (g/cm^3)
F ₁	$1,0292 \pm 0,02$
F _{1v}	$1,0340 \pm 0,01$
F ₄	$0,9764 \pm 0,02$
F _{4v}	$1,0328 \pm 0,01$

Observou-se que todas as formulações apresentaram densidade muito próxima à densidade da água ($1,01 \text{ g/cm}^3$). As formulações F₁ e F_{1v}, por apresentarem maior proporção

de água, apresentaram valores de densidade relativa de 1,0292 e 1,0340, respectivamente. A formulação F₄, que possui menor proporção de água, apresentou densidade de 0,9764 g/cm³. A formulação F_{4v}, embora apresente menor proporção de água, apresenta valor de densidade relativa de 1,0328. Talvez este quadro se apresente em decorrência de haver na formulação o palmitato de retinol, que pode estar aumentando a densidade da formulação.

5.3.2.3. Teste de centrifugação

Após 5 gramas de cada formulação terem sofrido um estresse físico em centrífuga – Excelsa II, Modelo 206 BL, por 30 minutos a 3000rpm, não se evidenciou mudanças quanto à homogeneidade das mesmas.

5.3.2.4. Determinação do pH

A média dos valores de pH (n = 3) encontrados para as formulações estudadas 24 horas após a manipulação em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) está apresentada na Tabela 7. Os resultados obtidos comprovam que não houve diferença em relação à média dos valores de pH obtidos imediatamente após a preparação das formulações.

Tabela 7. Valores referentes ao pH das formulações 24 horas após a manipulação, armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

Formulações	pH
F ₁	6,73
F _{1v}	6,94
F ₄	6,22
F _{4v}	6,13

A medida do pH das formulações é necessária para detectar alterações de pH com o tempo, assegurando que o valor de pH esteja compatível com os componentes da formulação e com o local de aplicação, evitando, dessa forma, irritações (AZZINI, 1999; CHARRO, 1997).

Observou-se, pelos resultados obtidos, que não houve grandes variações de pH entre as formulações e que todos os valores obtidos estão próximos ao neutro.

5.3.2.5. Determinação da condutividade iônica

Os resultados obtidos referentes à condutividade iônica dos sistemas podem ser visualizados na Tabela 8, que apresenta os valores de condutividade iônica em $\mu\text{S}/\text{cm}$ das formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} . Os ensaios foram realizados em triplicata.

De acordo com LATREILLE & PAQUIN (1990), a verificação da condutividade iônica das formulações é importante para monitoramento de sua estabilidade, uma vez que permite a observação da integridade da fase externa. Logo, permite a avaliação do conteúdo de água presente no sistema, identificando mudanças estruturais que possam ocorrer (KORHONEN et al., 2002).

Tabela 8. Valores de condutividade iônica em $\mu\text{S}/\text{cm}$ para as formulações estudadas.

Formulações	Condutividade iônica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
F_1	$23,84 \pm 6,35$
F_{1v}	$39,40 \pm 5,09$
F_4	$12,22 \pm 0,33$
F_{4v}	$36,00 \pm 3,11$

Observou-se que as formulações que apresentam maior proporção de água, que é o caso das formulações F_1 e F_{1v} , apresentam maiores valores de condutividade iônica. A formulação F_4 , que apresenta menor proporção de água, apresenta menor valor de condutividade iônica. A formulação F_{4v} , embora tenha menor proporção de água que a formulação F_1 , exibiu maior valor de condutividade iônica. Talvez, este fato tenha ocorrido devido ao fato da formulação F_{4v} apresentar PR, que por sua vez, pode estar oxidado, liberando íons. Embora na formulação a vitamina A esteja na sua forma de éster (PR), a qual, de acordo com a literatura, é uma das mais estáveis (ROBBERS et al., 1997), ela pode estar se oxidando, originando íons. Sabe-se que quanto mais íons houver no meio, maior a probabilidade de condução de eletricidade, o que faz com que os valores de condutividade iônica aumentem (AGMON, 1995).

5.4. Análise estrutural das formulações acrescidas de PR

5.4.1. Microscopia de luz polarizada

As Figuras 50, 51, 52 e 53 exibem, respectivamente, fotomicrografias sob luz polarizada das formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} com aumento de 200 vezes, sob diversas condições experimentais.

Após as amostras terem sido submetidas à análise em microscópio de luz polarizada (Microscópio de luz polarizada – TYPE 102M – Motic), pôde-se constatar a existência de fases líquido-cristalino lamelares nas quatro formulações. As diferenças que podem ser evidenciadas entre as formulações são quanto à formação de cristal líquido mediante as diferentes condições de armazenamento. As formulações F_{1v} e F_{4v} (Figuras 51 e 53) apresentam cristais nas diferentes temperaturas, enquanto nas formulações F_1 e F_4 (Figuras 50 e 52) houve diminuição na formação de cristais líquidos, quando estocadas à 37 ± 2 °C.

Outra diferença que pôde ser evidenciada entre as formulações foi a possível alteração na quantidade de cristais líquidos formada. A formulação F_{1v} teve um provável aumento na quantidade de cristais quando comparada com a formulação F_1 . A formulação F_{4v} teve uma diminuição na quantidade dos cristais quando comparada à F_4 .

Provavelmente, este efeito esteja relacionado à proporção do tensoativo, que modifica da formulação F_1 para a formulação F_4 . A estabilização das formulações pelo uso de tensoativos não iônicos, como o DC 5329[®], empregado em ambas as formulações, ocorre por meio de impedimento estérico e ligações de hidrogênio. Assim, a parte apolar do tensoativo se insere nas gotículas de óleo e os grupos hidrofílicos na fase aquosa. Os grupos hidrofílicos, por sua vez, causam impedimento estérico que inibem as gotículas de óleo de coalescerem, além de formarem ligação de hidrogênio com a água (SILVA & SOARES, 1996). Logo, se a proporção de tensoativo é maior, conseqüentemente a estabilização da formulação acaba sendo maior, o que propicia maior quantidade de cristais líquidos na formulação.

Outro aspecto a ser abordado é o apresentado por DAHMS (1986), que afirma que numa emulsão as gotículas de óleo geralmente estão revestidas por uma única camada de tensoativo, enquanto que em estruturas líquido-cristalinas lamelares as gotículas de óleo estão

circundadas por muitas bicamadas contendo o tensoativo. Assim, se a proporção de tensoativo for maior, geralmente consegue-se estabilizar mais as estruturas líquido-cristalinas lamelares formadas.

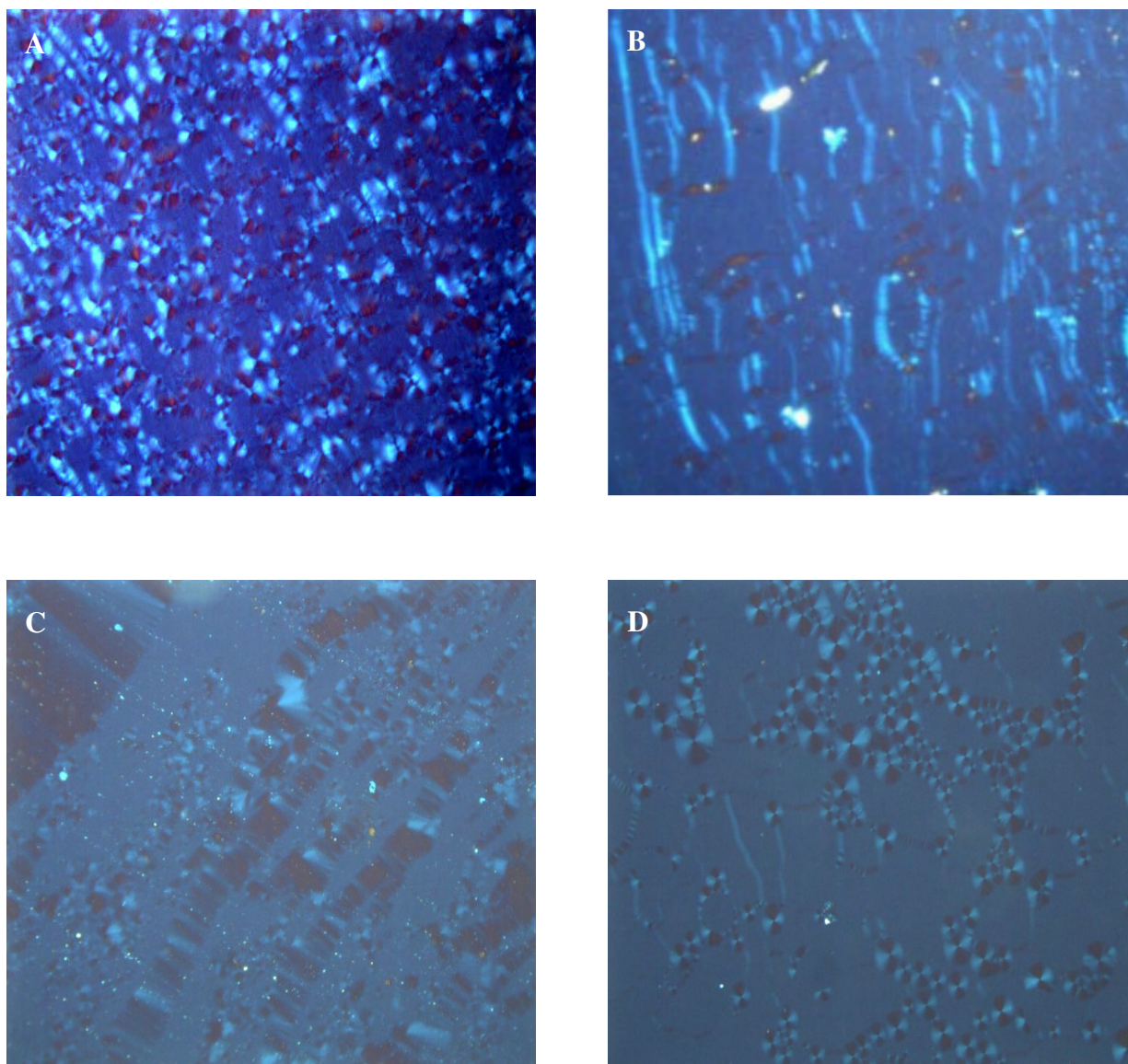


Figura 50. Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F_1 do sistema S_1 . **A.** tempo 24 horas (T_1); **B.** tempo trinta dias (T_{30}) na temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$); **C.** tempo trinta dias (T_{30}) em estufa ($37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$); **D.** tempo trinta dias (T_{30}) em geladeira ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) (200x).

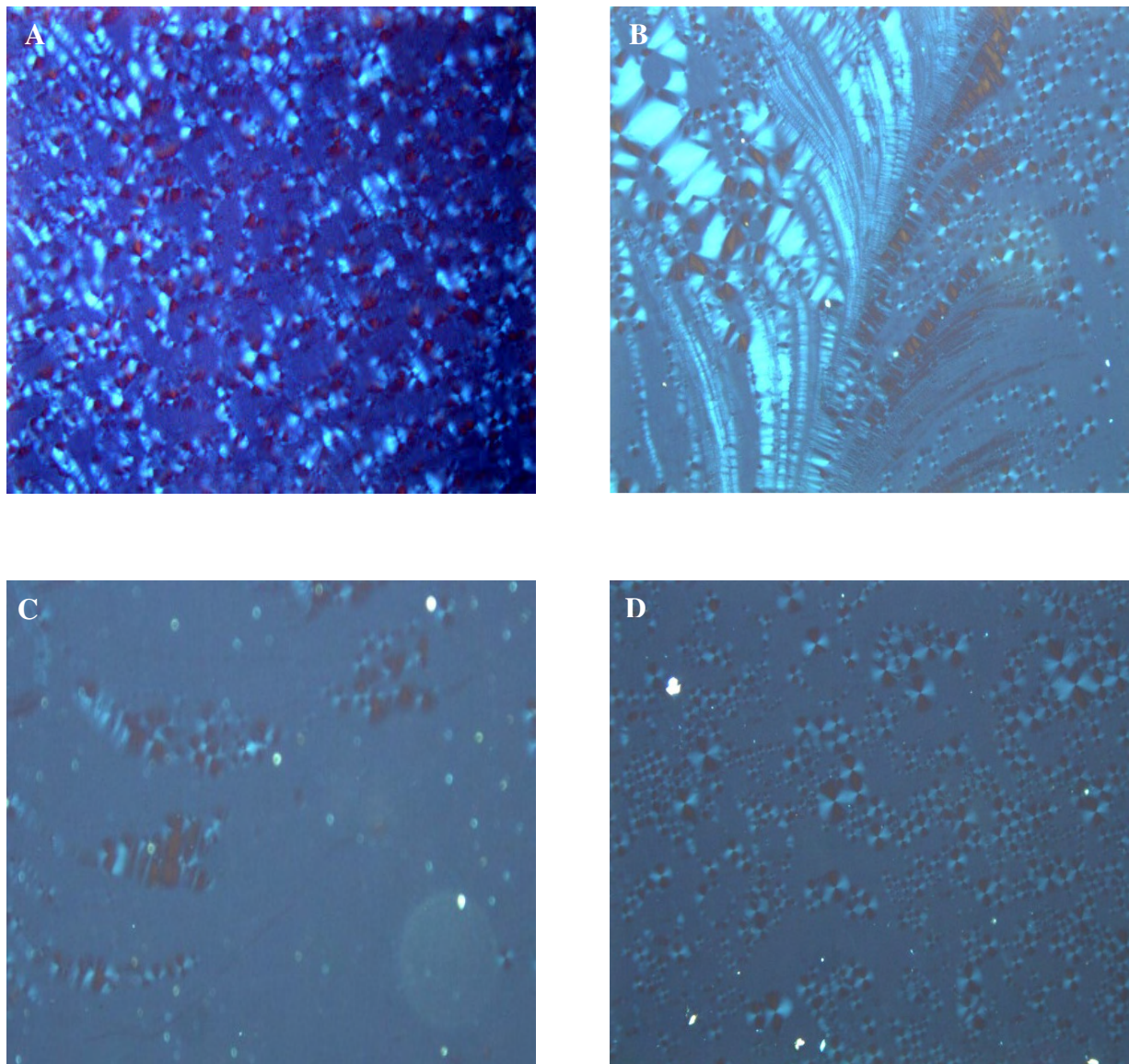


Figura 51. Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F_{1v} do sistema S₁. **A.** tempo 24 horas (T₁); **B.** tempo trinta dias (T₃₀) na temperatura ambiente (25 ± 2 °C); **C.** tempo trinta dias (T₃₀) em estufa (37 ± 2 °C); **D.** tempo trinta dias (T₃₀) em geladeira (5 ± 2 °C) (200x).

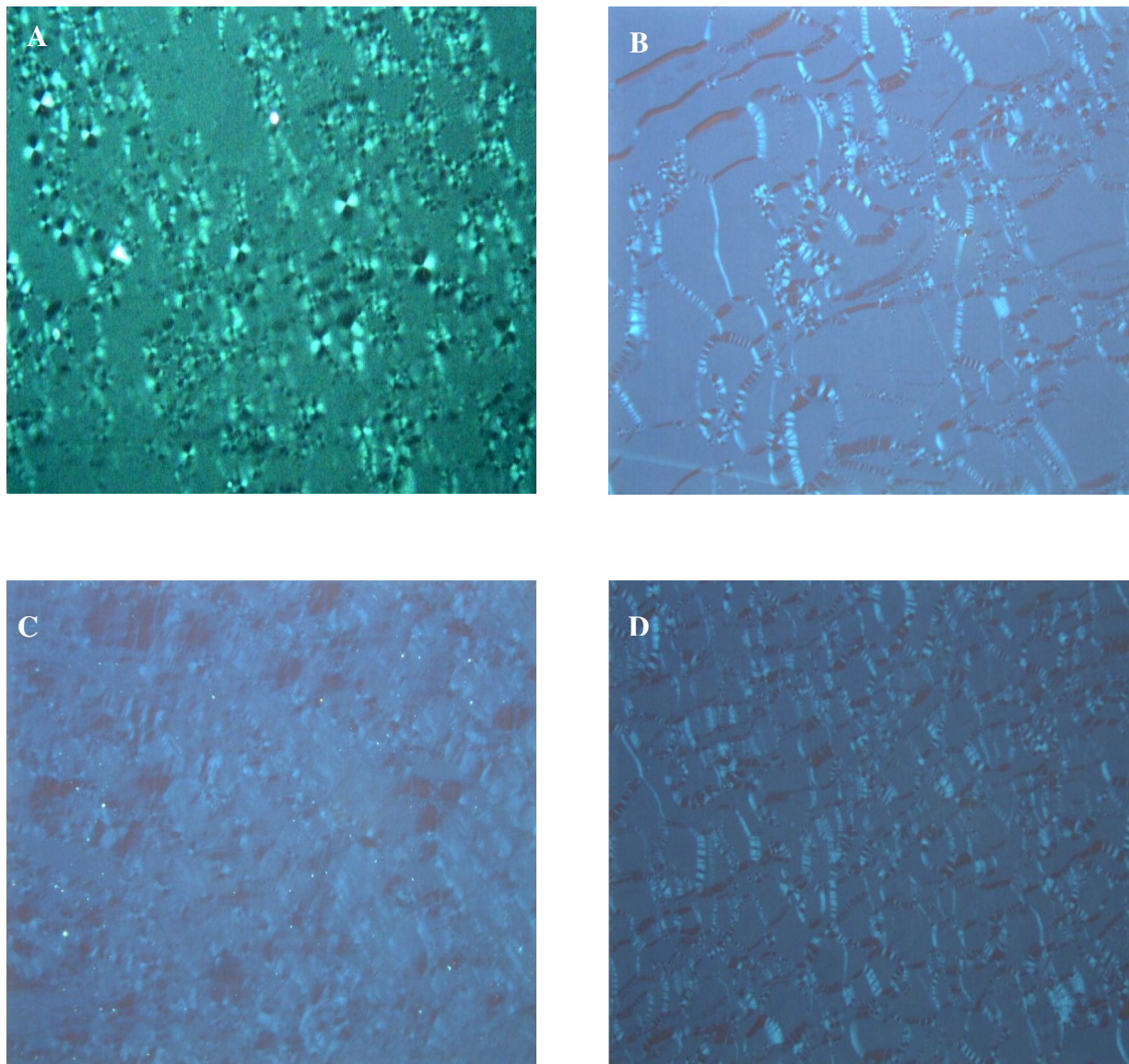


Figura 52. Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F₄ do sistema S₁. **A.** tempo 24 horas (T₁); **B.** tempo trinta dias (T₃₀) na temperatura ambiente (25 ± 2 °C); **C.** tempo trinta dias (T₃₀) em estufa (37 ± 2 °C); **D.** tempo trinta dias (T₃₀) em geladeira (5 ± 2 °C) (200x).

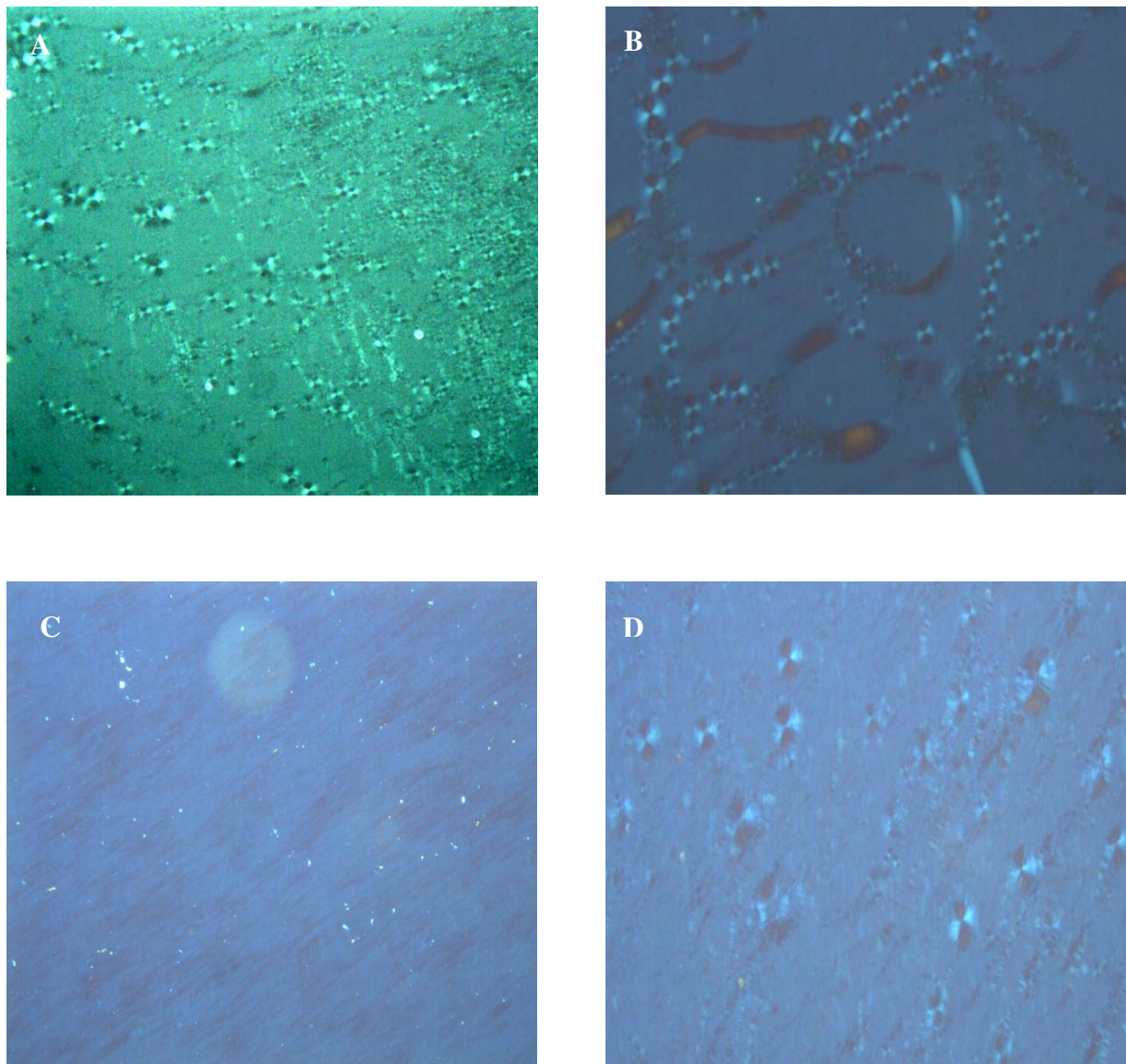


Figura 53. Fotomicrografias sob luz polarizada da formulação F_{4v} do sistema S₁. **A.** tempo 24 horas (T₁); **B.** tempo trinta dias (T₃₀) na temperatura ambiente (25 ± 2 °C); **C.** tempo trinta dias (T₃₀) em estufa (37 ± 2 °C); **D.** tempo trinta dias (T₃₀) em geladeira (5 ± 2 °C) (200x).

5.4.2. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) é usada para confirmar os tipos de estrutura e arranjo sugeridos por microscopia óptica de luz polarizada, além de identificar onde diferentes tipos de estruturas podem coexistir (MEZZENGA et al., 2005).

As curvas de SAXS para sistemas líquido-cristalinos exibem picos, cujo número e razão entre as distâncias de correlação permitem determinar o tipo de arranjo que os átomos formam na matriz. Para que, apenas pela análise da curva de SAXS um tipo de arranjo líquido-cristalino seja identificado, pelo menos três picos devem ser bem definidos.

Por meio da razão entre as distâncias é que pode-se definir o tipo de arranjo; logo, pode-se observar a existência de mesofases ordenadas como fase lamelar, a qual é composta por micelas planares ou lamelas com solvente entre elas, representada por três ou mais picos, cuja razão entre as distâncias deve ser 2, 3, e 4, respectivamente, enquanto que a fase composta por organização hexagonal de agregados cilíndricos observada pela existência de três ou mais picos deve apresentar valores de distância média entre partículas de 1,73, 2 e 3, respectivamente.

Pode-se calcular a distância de correlação entre as partículas (ou dois planos paralelos) a partir do valor de posição máxima do pico (q_{\max}), empregando a relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\max}} \quad (13)$$

Os resultados das medidas de SAXS, presentes na Figura 54, estão coerentes com os resultados obtidos por microscopia de luz polarizada, identificando fase lamelar para todas as formulações à temperatura ambiente, independente de apresentarem ou não palmitato de retinol.

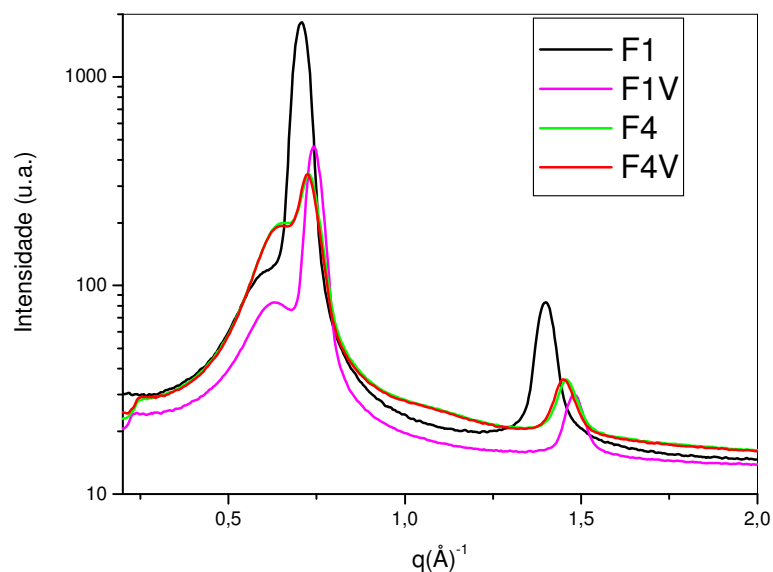


Figura 54. Comparação da evolução das curvas de SAXS para as formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} à temperatura ambiente.

Outro objetivo deste estudo foi verificar por SAXS se a temperatura poderia interferir na estruturação do sistema. Para tanto, as formulações foram armazenadas no tempo 24 horas em temperatura ambiente e no tempo 30 dias em temperatura ambiente, estufa e geladeira.

As Figuras 55, 56, 57, 58 e 59 apresentam, respectivamente, a evolução estrutural das formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} nas diversas condições de armazenamento.

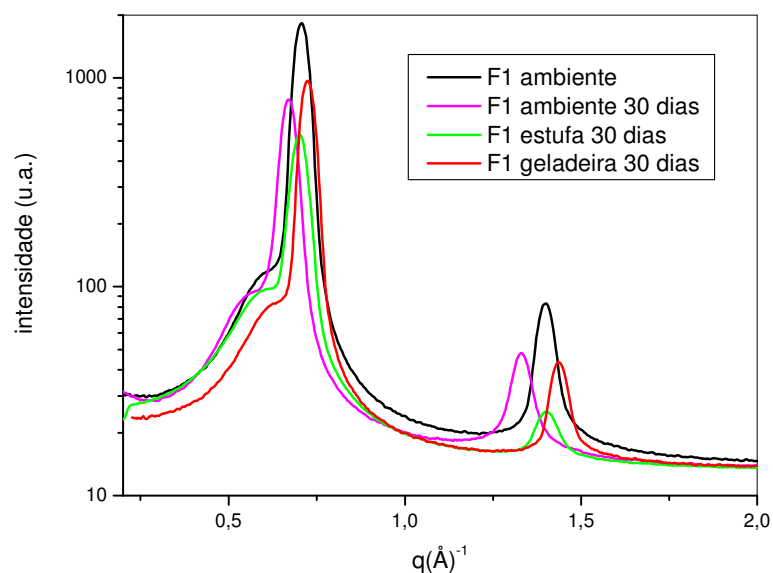


Figura 55. Evolução das curvas de SAXS para a formulação F₁ nas diversas condições de armazenamento.

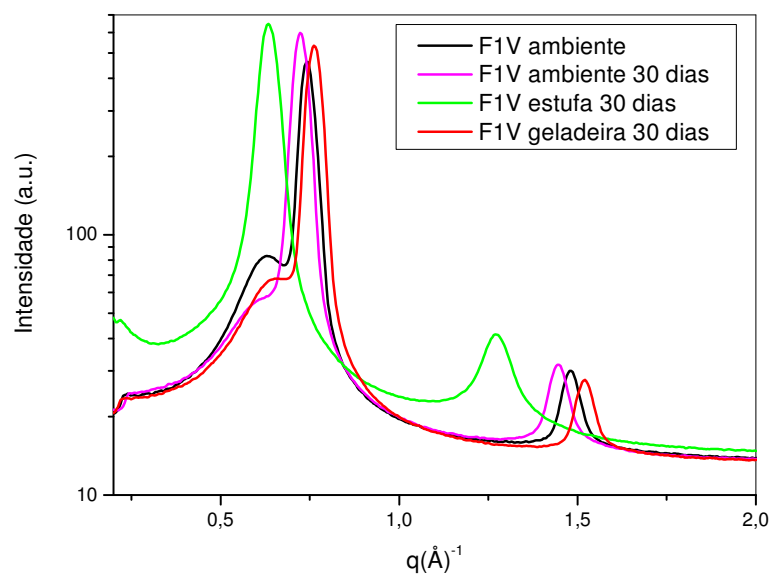


Figura 56. Evolução das curvas de SAXS para a formulação F_{1V} nas diversas condições de armazenamento.

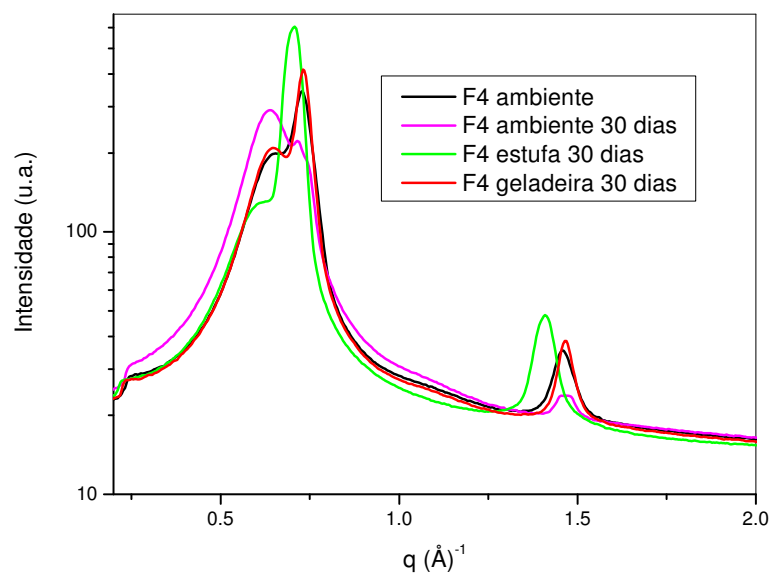


Figura 57. Evolução das curvas de SAXS para a formulação F₄ nas diversas condições de armazenamento.

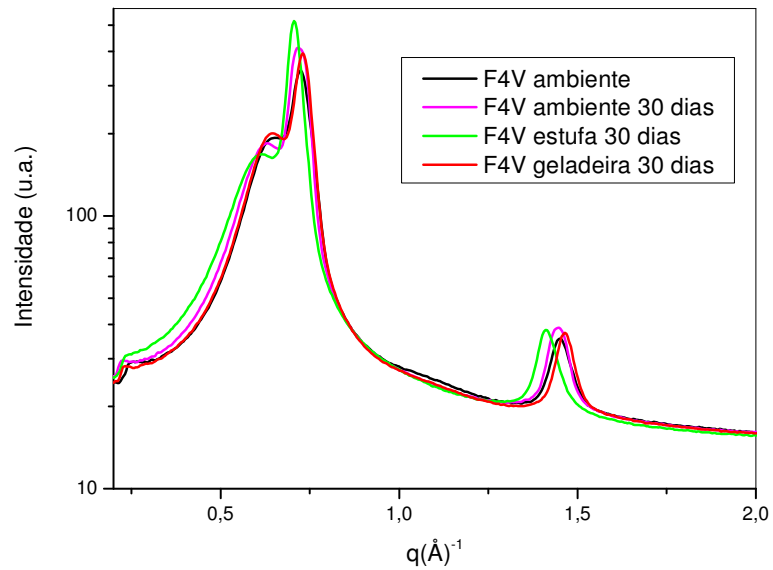


Figura 58. Evolução das curvas de SAXS para a formulação F_{4v} nas diversas condições de armazenamento.

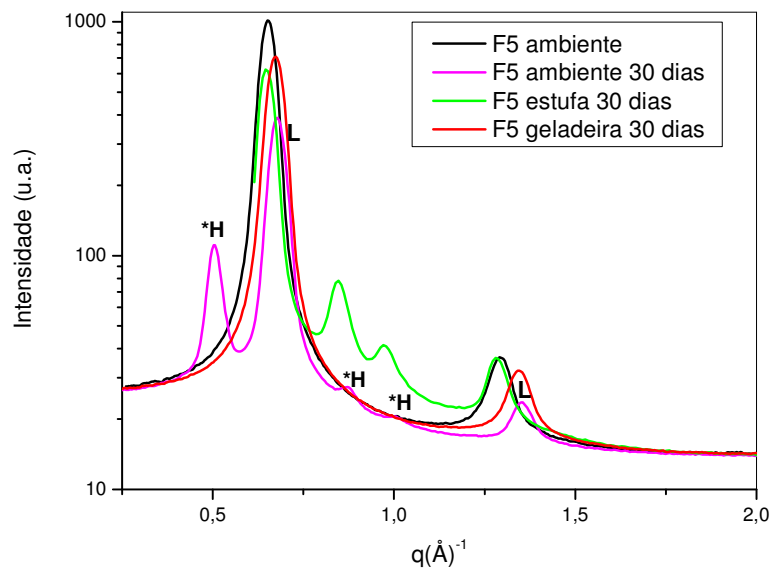


Figura 59. Evolução das curvas de SAXS para a formulação F₅ nas diversas condições de armazenamento.

As Figuras 55 a 58 evidenciam que para todas as formulações, independente da temperatura de armazenamento, observou-se apenas a presença de fases lamelares, as quais são as mais convenientes para sistemas de liberação dérmicos e transdérmicos (NÉMETH et al., 1988). Verificou-se que, em função do tempo, algumas formulações se desestruturaram mais

do que outras, comportamento evidenciado pelo alargamento dos picos, como é o caso das formulações F_1 , F_{2v} , F_4 e F_{4v} em estufa.

Para a formulação F_5 (Figura 59), observou-se também a presença de estruturas hexagonais quando armazenada em temperatura ambiente por 30 dias, o que sugere uma mistura de fases lamelares com fases hexagonais. Estes resultados corroboram com os verificados na microscopia de luz polarizada (Figura 48a). Quando este sistema foi armazenado em estufa por 30 dias, observou-se a presença de possíveis estruturas cúbicas, verificadas pelas distâncias entre os picos, o que também indica possível mistura de fases lamelares com fases cúbicas.

Sugere-se que a estruturação dessas formulações é dependente tanto da relação da natureza dos componentes quanto da proporção tensoativo/água. Para formulações com maior teor de água, observa-se maior estruturação do sistema. As moléculas do tensoativo agregam-se com água e formam pequenos domínios cristalinos orientados aleatoriamente. Os parâmetros de intensidade $I(q)$ do SAXS, produzidos por esses materiais exibem picos para valores diferentes de módulos do vetor de espalhamento q (URBAN, 2004).

5.4.3. Determinação do comportamento reológico

5.4.3.1. Ensaio de escoamento

De acordo com BERNI e colaboradores (2002), muitos estudos têm procurado elucidar as mudanças microestruturais que acontecem na fase lamelar sob cisalhamento. Alguns destes estudos procuraram mostrar que o perfil reológico está relacionado à concentração e à natureza do tensoativo empregado. Todavia, tem-se observado que determinadas características de fases lamelares independem do sistema tensoativo selecionado.

A Figura 60 mostra a variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para as diferentes formulações nas mais diversas condições de armazenamento. As curvas evidenciaram que as formulações comportam-se como sistemas não-newtonianos, pois não apresentam linearidade entre a tensão e a velocidade de cisalhamento, o que sugere que estas apresentam as características de fluidos pseudoplásticos, em virtude da diminuição da viscosidade. Tal comportamento é devido à desestruturação interna do sistema com o cisalhamento aplicado. Estes resultados revelam a presença de uma rede estruturada formada pela interação entre os componentes da formulação e que é gradualmente quebrada com o

aumento da velocidade de cisalhamento, reduzindo a resistência interna do sistema, e com isso, diminuindo a viscosidade.

A pseudoplasticidade é adequada para produtos indicados para uso tópico, pois após a aplicação da tensão a formulação apresenta facilidade para fluir, levando a um bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na superfície cutânea (BOODTS, 2003; GAO et al., 2003).

Segundo MORAIS (2006), as fases líquido-cristalinas apresentam alta viscosidade e a fase lamelar exhibe reologia pseudoplástica.

Os materiais pseudoplásticos, além de apresentarem a propriedade de “afinar-se” com a aplicação de velocidades de cisalhamento crescentes, podem apresentar o fenômeno de tixotropia, isto é, quando a velocidade de cisalhamento é removida, as tensões de cisalhamento são relaxadas e o sistema tende a readquirir a estrutura inicial, de tal forma que as curvas ascendentes e descendentes do reograma ficam deslocadas, resultando em uma área de histerese. Assim, a tixotropia é diretamente proporcional à área de histerese. Quanto maior a área de histerese, maior a tixotropia do sistema.

ALMEIDA & BAHIA (2003) definem tixotropia como uma alteração da viscosidade em função do tempo de deformação, sendo essa alteração representada pela perda da viscosidade do sistema. Os autores afirmam ainda que este fenômeno é reversível, em virtude de que a viscosidade inicial retoma algum tempo após cessar a deformação, porém não recuperando completamente seu estado inicial após um estado de repouso.

As propriedades tixotrópicas estão diretamente relacionadas com a interação entre os componentes da formulação. Nota-se que algumas formulações aqui analisadas, como a F₄ e F_{4v} (Figura 60), apresentam grau de tixotropia insignificantes, sobretudo quando armazenadas a temperatura ambiente por 24 horas e por 30 dias e também quando mantidas em estufa (Figura 60 (a), (b) e (c), respectivamente). Em contrapartida, formulações como a F₅ possuem alto grau de tixotropia, principalmente quando mantidas à temperatura ambiente por 24 horas e em estufa por 30 dias (Figura 60 (a) e (c), respectivamente).

O caráter tixotrópico das formulações pode ser atribuído a uma rede estruturada formada pelas interações entre os componentes do sistema. Devido à existência de forças de interações entre as regiões mais estruturadas, a estruturação pode ser destruída com o aumento da velocidade de cisalhamento e facilmente recomposta quando essa velocidade diminui. Com isto, as formulações que apresentam alto grau de tixotropia, como a F₅, apresentam também um maior grau de estruturação inicial.

Tais resultados parecem indicar também que a adição de PR não ocasionou alteração no comportamento reológico das formulações estudadas.

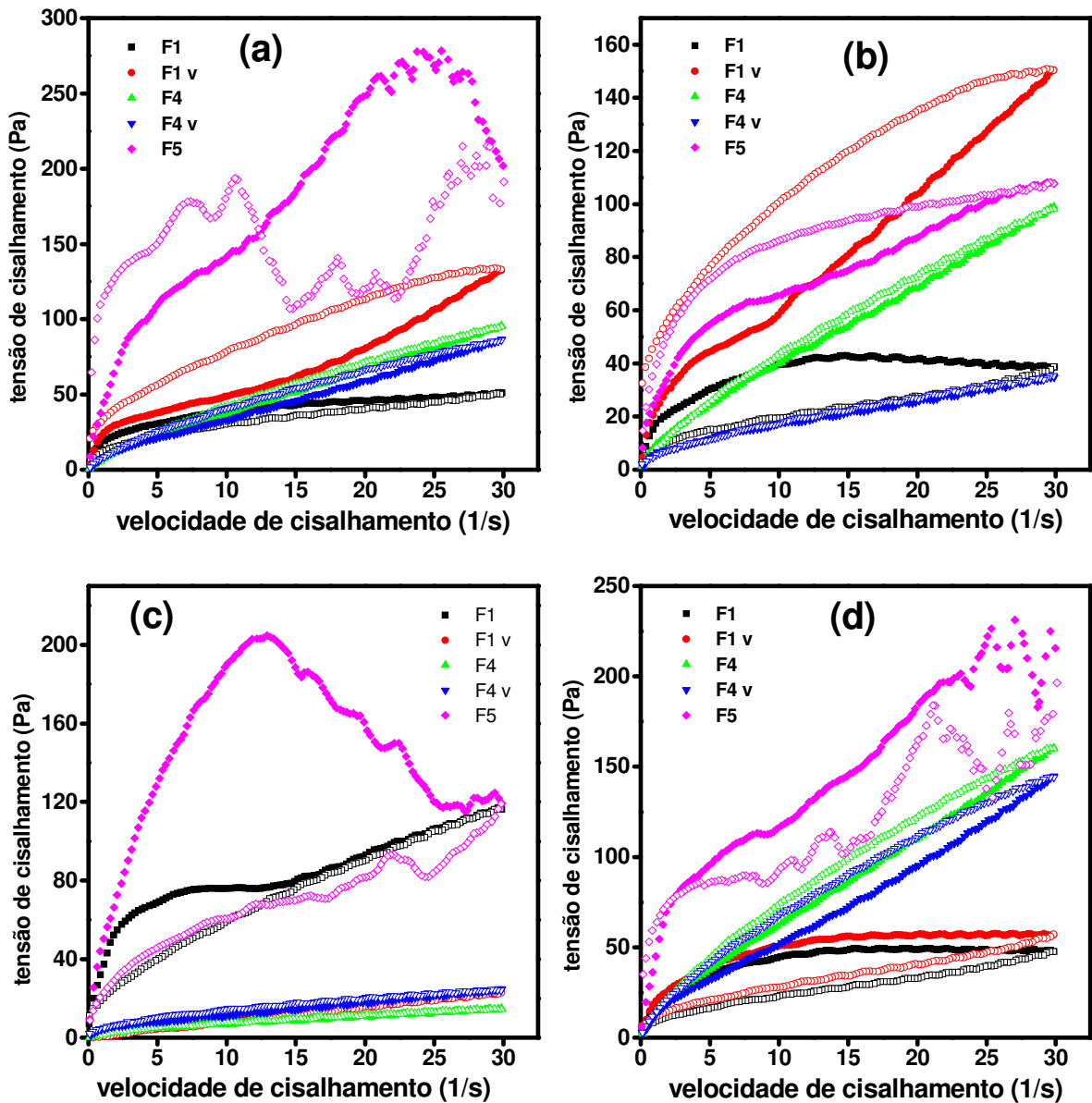


Figura 60. Variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para as diferentes formulações armazenadas à temperatura ambiente por 24 horas (a) e por 30 dias (b), mantidas em estufa (c) e geladeira (d) após 30 dias de manipulação. Símbolos vazios representam a curva decrescente (diminuição da velocidade de cisalhamento).

Verifica-se na Figura 60(b) uma área de histerese muito maior para a formulação F_1 quando comparada com a formulação F_4 . Este resultado está de acordo com os resultados de FERRARI e colaboradores (2004) e SANTOS (2006), que sugeriram que o aumento da área

de histerese é intimamente relacionado com o aumento na microestrutura das redes líquido-cristalinas, comprovando que a área de histerese é fortemente influenciada pela presença de cristais líquidos.

SANTOS (2006) verificou também que formulações constituídas por cristais líquidos possuem como característica o aumento da viscosidade em função do tempo. Segundo FERRARI e colaboradores (2004), o aumento geral na viscosidade juntamente com o aumento na concentração de tensoativo é facilmente explicado pela presença de estrutura líquido-cristalina, uma vez que também se relaciona com o aumento na microestrutura das redes líquido-cristalinas.

Outra questão importante e que merece ser destacada pela análise da Figura 60 é que a adição de PR parece ter propiciado o aumento na área de histerese, quando se compara as formulações F_{1v} e F_1 , analisadas no tempo 24 horas (Figura 60a), 30 dias à temperatura ambiente (Figura 60b) e 30 dias após armazenamento em geladeira (Figura 60d). Para a formulação F_{1v} armazenada em estufa (Figura 60c), observou-se menor área de histerese quando comparada à formulação F_1 . Este resultado possivelmente está relacionado ao fato de que em temperaturas mais altas, o PR presente no sistema oxidou, interferindo nas características reológicas da formulação e levando a uma diminuição da área de histerese.

Comparando as formulações F_4 e F_{4v} , observou-se que ambas as formulações apresentam áreas de histerese muito parecidas, independente das condições de armazenamento.

Para F_5 , observou-se significativa área de histerese independente das condições de armazenamento das formulações, sendo que quando mantidas em estufa por 30 dias, a área de histerese apresentada foi ainda maior (Figura 60c).

5.4.3.2. Ensaios mecânico-dinâmicos ou de oscilação

As medidas reológicas podem fornecer idéias relacionadas ao arranjo das moléculas de tensoativo num sistema tensoativo/água/óleo. A fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (GABBOUN et al., 2001; HYDE, 2001).

Deve-se ressaltar, todavia, que o tipo de arranjo estrutural de sistemas líquido-cristalinos só pode ser determinado com precisão pela associação de medidas de SAXS, reologia e microscopia de luz polarizada.

As medidas de reologia são utilizadas a fim de se determinar a viscosidade dinâmica, obtendo-se como resultado a curva de viscosidade em relação ao fluxo e à visco-elasticidade, por meio dos parâmetros módulo de armazenagem (G') e módulo de perda (G''), obtendo-se, neste caso, informação sobre o comportamento viscoelástico das amostras (SCHRAMM, 2002).

Assim, maiores informações sobre a estrutura das formulações com mínima perturbação do material podem ser obtidas por análises reológicas a partir da aplicação de solicitação oscilatória. Neste tipo de ensaio, a tensão de cisalhamento varia como uma onda senoidal e a relação entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) do sistema. A partir da razão destas duas grandezas, obtém-se o módulo elástico complexo G^* . A componente real do módulo elástico, G' , é denominada de módulo de armazenagem, porque representa a energia armazenada durante a deformação à tensão crescente, a qual é liberada quando a tensão é relaxada. A parte imaginária do módulo, G'' , deve-se ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível. Desse modo, G'' é denominado módulo de perda e leva em conta esta dissipação de energia (TOKUMOTO, 1996).

A Figura 61 exibe a evolução dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da frequência aplicada para as formulações armazenadas à temperatura ambiente por 24 horas. Observou-se que a formulação F_{1v} possui G' maior que F_1 , o que revela que a adição de PR para esta formulação aumentou a elasticidade do sistema, indicando que o PR contribui para a formação de uma rede estrutural, facilitando a sua incorporação no sistema.

Para a formulação F_4 , as curvas obtidas evidenciam que esta formulação possui características reológicas muito semelhantes a F_{4v} , visto que os módulos G' e G'' possuem valores semelhantes entre si. Além disto, para ambas as formulações, $G'' > G'$, o que revela a predominância do caráter viscoso desta composição. Estes resultados confirmam as medidas de escoamento (Figura 60a), onde se pode observar o comportamento semelhante das curvas (quase sobreposição) para estas formulações, além do grau de tixotropia insignificante, indicando baixo grau de estruturação. A adição de PR, neste caso, não alterou as características do sistema de forma marcante como observado para F_1 .

Os resultados também revelam que a alteração da proporção tensoativo:água diminuiu a elasticidade do sistema e abaixou a viscosidade.

KLEIN (2002) afirma que muitas vezes a orientação dos cristais líquidos é adequada para fornecer viscosidade ao redor das gotículas oleosas, mas não necessária o suficiente para evitar o fluxo, o que acaba por originar líquidos viscosos.

Também, a adição de Ceraphyl 230[®] (F₅) ao invés de DC 193[®] (F₁) promoveu um aumento pronunciado da elasticidade do sistema, bem como da viscosidade. As curvas mostram a independência de G' e G'' com a frequência. Estes resultados revelam que a alteração da fase oleosa para o Ceraphyl 230[®] contribuiu para a formação de uma rede estrutural consolidada, o que caracteriza esta formulação como um gel bem rígido. Isto confirma o alto grau de tixotropia e de viscosidade apresentados por F₅ nas medidas de escoamento nas diversas condições de armazenamento (Figura 60).

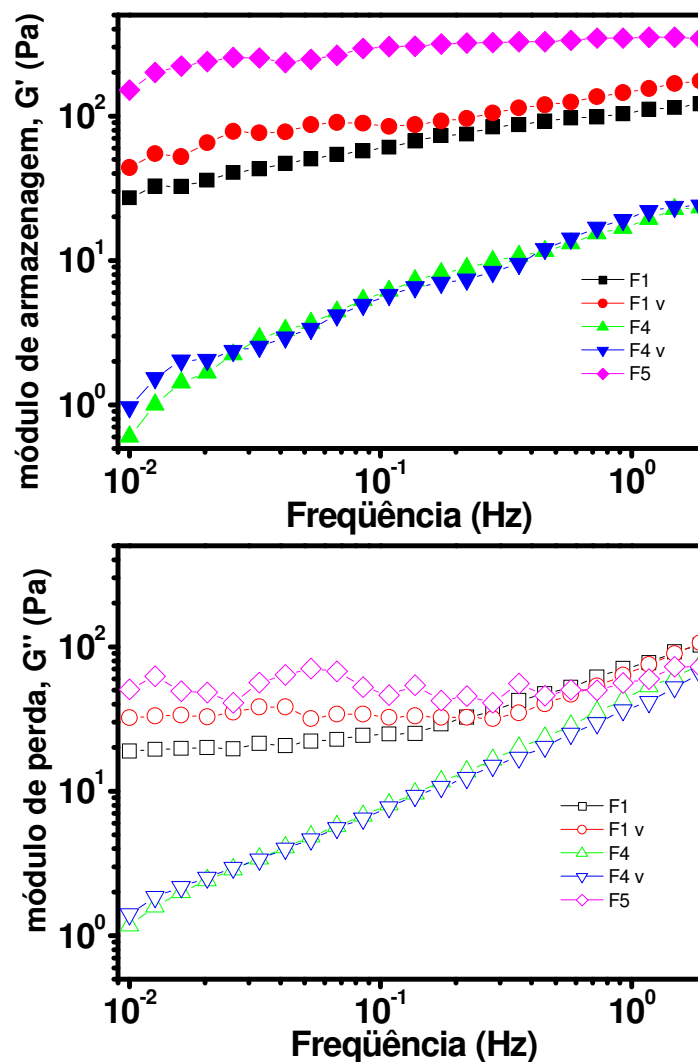


Figura 61. Variação do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas à temperatura ambiente após 24 horas de manipulação.

A Figura 62 apresenta a evolução dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da frequência aplicada para as formulações manipuladas após 30 dias e armazenadas em temperatura ambiente. À partir das curvas, observou-se que com o envelhecimento, F_{1v} aumentou o G' , enquanto F_1 diminuiu. Os resultados fortalecem a hipótese de que o PR está relacionado com a formação de interações entre os componentes que levam à formação da rede estrutural. Quando adicionado à formulação (F_{1v}) e com o envelhecimento, o PR contribuiu para o aumento das interações elásticas do sistema, daí o aumento de G' . Sem o PR na formulação, houve uma diminuição das interações (diminuição de G'), indicando que com o tempo, a formulação F_1 desestruturou-se gradualmente e o PR contribuiu certamente para a estabilidade do sistema. Ainda, F_{1v} possui G' próximo de F_5 , que é a formulação mais estruturada. Entretanto, F_5 apresentou diminuição considerável do módulo elástico em relação à formulação não envelhecida, fortalecendo a hipótese de que o envelhecimento promoveu uma diminuição das interações elásticas do sistema.

O aumento na proporção de água e de óleo promoveu a predominância do componente viscoso G'' para a amostra F_4 , sendo que não observa-se diferenças marcantes quando esta formulação está envelhecida à temperatura ambiente. Entretanto, para a amostra com PR (F_{4v}), houve aumento de G' , indicando novamente que o PR favoreceu o aumento das interações elásticas (maior G').

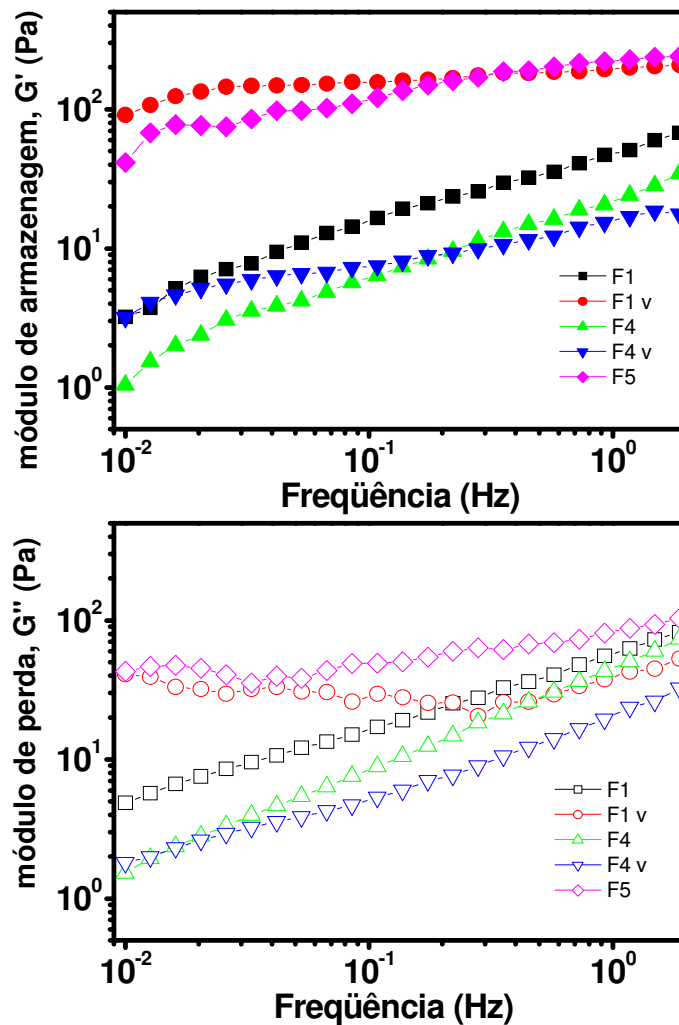


Figura 62. Variação do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas à temperatura ambiente após 30 dias de manipulação.

A Figura 63 apresenta a evolução dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da frequência aplicada para as formulações armazenadas 30 dias em estufa. À partir das curvas, observou-se que a formulação F_5 apresentou um pronunciado aumento de G' , sugerindo que a temperatura influenciou na formação de interações reticulares. Caso similar ocorreu com a amostra F_1 , que teve os valores de G' semelhantes às condições ambientes, recuperando a perda considerável de G' quando envelhecida à temperatura ambiente. Estes resultados sugerem que, assim como F_5 , houve um favorecimento da estruturação do sistema com a temperatura. O oposto ocorreu com a formulação F_{1v} , cujo número de interações elásticas diminuiu drasticamente (diminuição de G'), tornando-se um líquido essencialmente viscoso ($G'' > G'$). Estes resultados sugerem que a temperatura contribuiu para a

desestabilização estrutural da formulação, o que pode ser devido à oxidação do PR que estava incorporado ao sistema. Este quadro foi confirmado pelos ensaios de escoamento (Figura 60c).

As formulações F_4 e F_{4v} apresentam propriedades reológicas semelhantes, idêntico ao que acontece em temperatura ambiente, inclusive com um pequeno aumento de G'' para a amostra F_{4v} , o que fortalece a hipótese do PR auxiliar ainda mais na desestruturação do sistema quando submetido a temperaturas maiores.

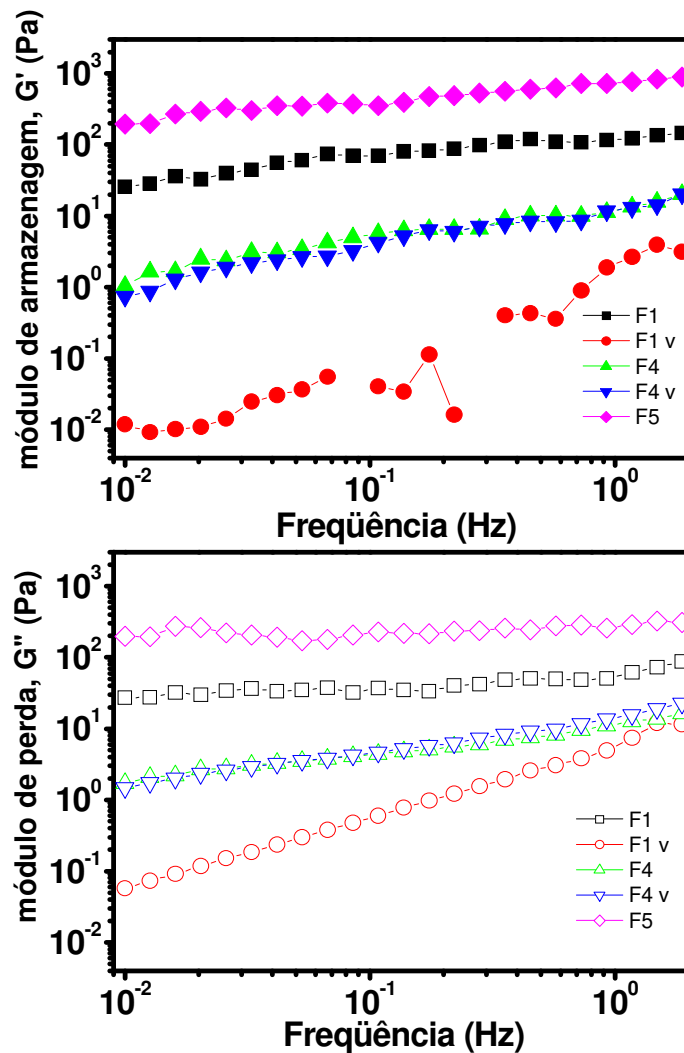


Figura 63. Variação do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas em estufa após 30 dias de manipulação.

A Figura 64 exibe a evolução dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da frequência aplicada para as formulações armazenadas por 30 dias em geladeira. A partir das curvas, observou-se que a diminuição da temperatura de armazenamento da formulação manteve a estrutura rígida de F_5 , entretanto, com valores abaixo dos observados

para a formulação mantida à temperatura ambiente e em estufa. Estes resultados revelam a diminuição da estruturação do sistema com a diminuição da temperatura. Todavia, baixas temperaturas contribuem para uma menor perda das interações elásticas entre os componentes da formulação, uma vez que os valores de G' nesta condição são maiores do que os observados para as formulações mantidas por 30 dias em temperatura ambiente.

Para F_1 , os valores de G' são maiores do que os obtidos para a formulação F_{1v} , exceto quando a formulação é mantida em estufa, em que o G' da formulação F_1 foi maior que o G' da formulação F_{1v} , ficando em um estado intermediário entre as condições ambiente e envelhecida por 30 dias. Estes resultados sugerem que a vitamina é susceptível à temperatura, pois não houve um favorecimento à estruturação, como aconteceu com as formulações envelhecidas à temperatura ambiente tanto nos tempo 24 horas quanto 30 dias após a manipulação.

As amostras F_4 e F_{4v} possuem as mesmas características reológicas, ou seja, valores de G' e G'' similares.

WANG e colaboradores (2006) também verificaram que a temperatura tem um importante efeito no comportamento reológico e na estrutura de fases líquido-cristalinas cúbicas, corroborando muito dos achados neste estudo. Os autores observaram que em baixas temperaturas, um sistema constituído por um tensoativo originado pela etoxilação de álcoois graxos composto por 59% de C_{12} e 41% de C_{14} com 12 moles de óxido de etileno ($C_{12-14}E_{12}$), apresentaram predomínio de G' sobre G'' , predominando o componente elástico. Este mesmo perfil foi verificado para F_1 , que apresentou valores de G' maiores do que os da formulação F_{1v} em baixas temperaturas. Em temperaturas medianas, foi observado aumento de G' e G'' , conferindo ao sistema a característica de líquido viscoelástico. Para a formulação F_5 em temperatura ambiente (Figura 61), observou-se também independência de G' e G'' com a frequência, contribuindo para a formação de uma rede estrutural consolidada, o que caracteriza esta formulação como um gel bem rígido.

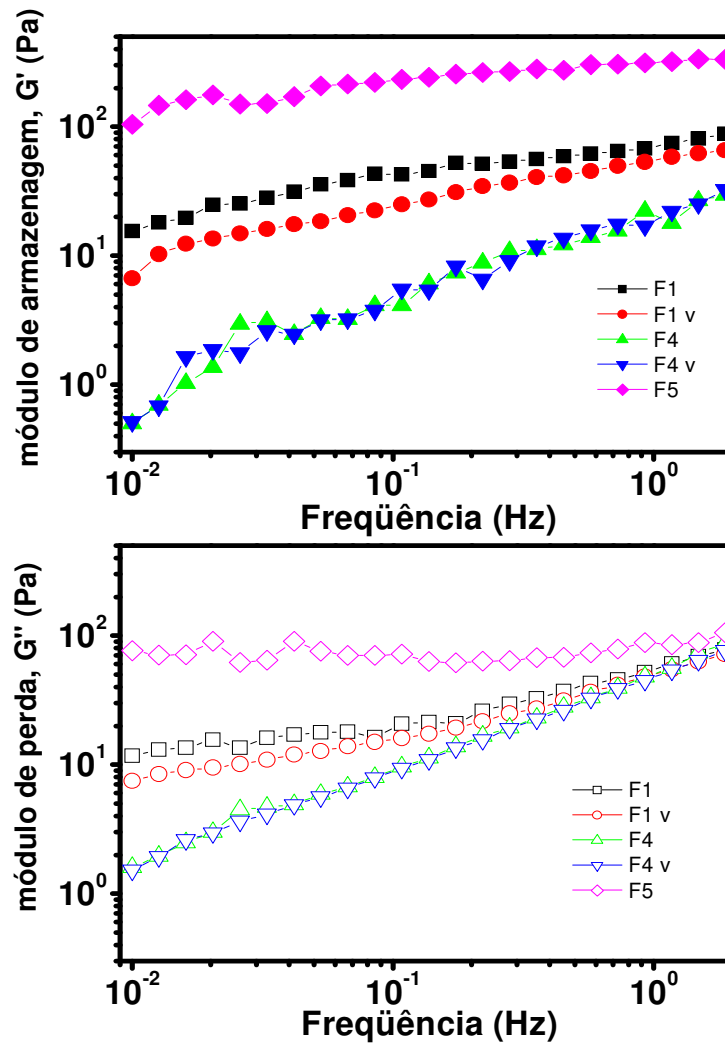


Figura 64. Variação do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para as diferentes formulações mantidas em geladeira após 30 dias de manipulação.

5.5. Controle de qualidade microbiológico

5.5.1. Validação do método de estimativa do número de microrganismos viáveis

No teste de validação, observou-se alta taxa de recuperação dos microrganismos nas condições adotadas. Dados superiores a 80% foram obtidos nas duas diluições empregadas. Algumas pequenas diferenças encontradas podem ser resultantes da variação do método empregado. De acordo com a recomendação oficial (USP XXVII, 2004), taxas de recuperação de 70% em testes de validação microbiológica mostram ausência de atividade antimicrobiana. Logo, pode-se afirmar que nas diluições empregadas os microrganismos estavam em número suficiente para realização dos experimentos.

5.5.2. Estimativa do número de microrganismos viáveis

Segundo ORTH (1984), praticamente todos os produtos cosméticos estão sujeitos à contaminação com microrganismos. O crescimento de fungos, bactérias e esporos nos produtos dependerá de uma série de fatores químicos e físicos, como disponibilidade de água, composição do produto que fornecerá nutrientes para os microrganismos, temperatura de estocagem, entre outros. PARKER (1984), por sua vez, afirma que uma formulação cosmética geralmente apresenta requisitos importantes para o crescimento microbiano, como água, vários minerais e vitaminas, além de ser um ambiente com oxigênio, pH e temperatura favoráveis.

A baixa qualidade microbiana de produtos não estéreis pode ocorrer principalmente devido à contaminação microbiana resultante da falta de higiene na fabricação e da baixa estabilidade dos constituintes da formulação. Durante a fabricação, é importante evitar que os microrganismos invadam o produto, o qual é um substrato com substâncias excelentes para o seu crescimento, provocando modificações visíveis ou não no produto final, tais como alteração de cor, odor, viscosidade, além de poder ocasionar reações tóxicas ao usuário (CARVALHO & PACHIONE, 1989).

McCARTHY (1984) cita várias características do crescimento de microrganismos em cosméticos. Dentre estas, tem-se descoloração, formação de odores ou gás e mudanças nas propriedades reológicas das formulações. Além disso, o autor aponta para o fato de que pode haver também modificações não visíveis, mas que indicam deterioração microbiana, as quais devem ser particularmente controladas se o produto for utilizado em queimados ou em outras situações em que há dano do epitélio cutâneo.

As matérias-primas, tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, podem fornecer nutrientes para o desenvolvimento de bactérias, fungos e leveduras em cosméticos. Matérias-primas de origem vegetal, por sua vez, são mais propensas à contaminação microbiana de diversas maneiras, como pelo ar, água, solo, manuseio humano e dentro da área de processamento dos materiais. As matérias-primas sintéticas, da mesma forma que as naturais, também podem ser alteradas pela decomposição promovida pelos microrganismos (NICOLETTI et al., 1997; ORTH, 1997).

CORBETT (1992) cita os microrganismos mais prováveis relacionados a algumas fontes de contaminação: água (*Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Flavobacterium* e *Achromobacter*), ar (esporos de fungos, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Bacillus* sp., leveduras e esporos bacterianos), matéria-prima (*Clostridium* sp., *Salmonella* sp., coliformes,

Actinomyces, bolores e leveduras) e pessoal operacional (coliformes, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*).

Os resultados das análises microbiológicas para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos) para as quatro formulações estudadas e suas matérias-primas podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos) nas formulações.

Amostras	Nº microrganismos (UFC/g)*	
	Bactérias	Bolores e leveduras
F ₁	< 10	< 10
F _{1v}	< 10	< 10
F ₄	< 10	< 10
F _{4v}	< 10	< 10
DC 193 [®]	< 10	< 10
DC 5329 [®]	< 10	< 10
Ceraphyl 230 [®]	< 10	< 10
Palmitato de retinol	< 10	< 10

*3 ensaios com 2 repetições

Os produtos não apresentaram contaminação microbiana em três ensaios (<10 UFC/g). Mesmo considerando a possibilidade de alguma contaminação durante a manipulação na elaboração dos produtos, os microrganismos não sobreviveram, em decorrência da própria composição das formulações. Nos três ensaios, os produtos testados tinham diferentes tempos de fabricação, ou seja, 24 horas, 30 e 60 dias. Ressalta-se, inclusive, que neste último, as amostras foram retiradas de frascos que estavam sendo usados no biotério para experimentos em animais e, portanto, sujeitos à maior contaminação.

5.5.3. Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*

Após realização dos ensaios para *Salmonella* sp. e *E. coli*, não se observou o crescimento destes patógenos, assegurando, dessa forma, a inocuidade das formulações.

5.5.4. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Após realização dos ensaios para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, não se observou o crescimento destes patógenos, assegurando, dessa forma, a inocuidade das formulações.

Os resultados obtidos para todas as formulações sugerem que as formulações estão aprovadas para uso quanto ao aspecto microbiológico.

Segundo a Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999, os produtos cosméticos sujeitos ao controle microbiológico ficam divididos em dois grupos, em função do local de aplicação e faixa etária. Dentre os produtos do tipo I, têm-se os produtos infantis, produtos para a área dos olhos ou produtos que possam entrar em contato com mucosas; entre os produtos do tipo II, encontram-se todos os demais produtos cosméticos susceptíveis à contaminação microbiana. Os limites microbianos foram considerados quanto à segurança do usuário e quanto à tolerância quantitativa da carga microbiana saprófita, a fim de manter a integridade do produto (FRAGA, 1999).

Para produtos do tipo I, os limites preconizados são 10^2 unidades formadoras de colônias (UFC)/g ou mL para microrganismos totais aeróbios, ausência de *Pseudomonas aeruginosa* em 1 g ou 1 mL, ausência de coliformes totais e fecais em 1 g ou 1 mL e ausência de clostrídios sulfito redutores em 1 g (exclusivamente em talcos). Para os produtos do tipo II, estabeleceu-se um limite de 10^3 UFC/g ou mL de microrganismos totais aeróbios, ausência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em 1 g ou 1 mL, ausência de coliformes totais e fecais em 1 g ou 1 mL e ausência de clostrídios sulfito redutores em 1 g (exclusivamente em talcos). Anteriormente a esta resolução, os limites microbianos utilizados foram os estabelecidos pela *Cosmetic Toiletry Fragrance Association* (CTFA), dos EUA, que preconizavam o limite de 500 UFC/g ou mL da amostra para produtos infantis e para a área dos olhos e de 1000 UFC/g ou mL da amostra para os demais produtos, devendo ainda todos estes produtos ter ausência de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (BAIRD & BLOOMFIELD, 1996).

As formulações empregadas neste trabalho tinham como objetivo a utilização na região próxima aos olhos. Logo, foram classificadas como produtos do tipo I, em que o nível de contaminação aceitável é menor. Observou-se que mesmo diante destas condições, as formulações mantiveram-se abaixo dos limites preconizados pela legislação brasileira. Também, não apresentaram crescimento de patógenos nos ensaios utilizando meio seletivo, confirmando a qualidade das formulações do ponto de vista microbiológico.

5.5.5. Avaliação da eficácia das formulações nanoestruturadas como sistema conservante

5.5.5.1. Teste de desafio

Os resultados do teste de desafio para as formulações com os microrganismos *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *C. albicans* (ATCC 10231) e *A. niger* (ATCC 16404) podem ser observados nas Tabelas 10 a 14.

Tabela 10. Desafio das formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *E. coli*.

Amostras	Tempo (dias)			
	0 (UFC/g)	7 (UFC/g)	14 (UFC/g)	28 (UFC/g)
F ₁	3,5.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{1v}	3,4.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F ₄	3,5.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{4v}	3,4.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
C+	3,5.10 ⁶	< 10	< 10	< 10

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes.

Tabela 11. Desafio das formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *S. aureus*.

Amostras	Tempo (dias)			
	0 (UFC/g)	7 (UFC/g)	14 (UFC/g)	28 (UFC/g)
F ₁	3,4.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{1v}	3,3.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F ₄	3,4.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{4v}	3,3.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
C+	3,2.10 ⁶	< 10	< 10	< 10

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes.

Tabela 12. Desafio das formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *P. aeruginosa*.

Amostras	Tempo (dias)			
	0 (UFC/g)	7 (UFC/g)	14 (UFC/g)	28 (UFC/g)
F ₁	3,2.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{1v}	3,1.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F ₄	3,2.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{4v}	3,1.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
C+	4,2.10 ⁶	< 10	< 10	< 10

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes.

Tabela 13. Desafio das formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *C. albicans*.

Amostras	Tempo (dias)			
	0 (UFC/g)	7 (UFC/g)	14 (UFC/g)	28 (UFC/g)
F ₁	1,1.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{1v}	1,9.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F ₄	1,1.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
F _{4v}	1,0.10 ⁶	< 10	< 10	< 10
C+	1,0.10 ⁶	< 10	< 10	< 10

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes.

Tabela 14. Desafio das formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *A. niger*.

Amostras	Tempo (dias)			
	0 (UFC/g)	7 (UFC/g)	14 (UFC/g)	28 (UFC/g)
F ₁	3,0.10 ⁶	7,0.10 ³	6,8.10 ³	5,0.10 ³
F _{1v}	3,1.10 ⁶	7,2.10 ³	7,0.10 ³	5,2.10 ³
F ₄	3,2.10 ⁶	7,4.10 ³	7,2.10 ³	5,4.10 ³
F _{4v}	3,1.10 ⁶	7,3.10 ³	7,1.10 ⁴	5,1.10 ³
C+	2,0.10 ⁶	< 10	< 10	< 10

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes.

A análise dos resultados mostrou que após 7 dias todos os microrganismos não foram recuperados, exceto o bolor *A. niger* (Tabela 14) que continuou viável até no mínimo 28 dias após inoculação, embora se tenha observado diminuição da sua carga microbiana. Não houve desenvolvimento perceptível do bolor neste período, pois a amostra não apresentou alterações visíveis de deterioração. No entanto, a quantidade de substâncias tensoativas em sua formulação não foi suficiente para destruir a quantidade de bolor cultivada. Como já é conhecido (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005), os conídios são mais resistentes do que o micélio vegetativo, devendo ser por isto a sua sobrevivência nas formulações. Além disto, necessitam de menor quantidade de água livre para sobrevivência.

Deve ser considerado que as formulações apresentaram ação fungistática, pois inibiram a reprodução do bolor, não o destruindo, o que também não é desejável. Embora a maioria dos metabólitos primários sejam produzidos durante seu crescimento, corre-se o risco de ainda ter alguns metabólitos secundários produzidos durante o crescimento inicial.

Nos demais ensaios para as formulações com todos os microrganismos (Tabelas 10 a 13), houve destruição total destes após 7 dias de inoculação, comprovando a ação antimicrobiana destas substâncias. Conforme relatos de AL-ADHAM et al. (2000), a destruição ocorre principalmente em função de danos provocados na membrana citoplasmática microbiana.

Segundo dados da USP XXX (2007), dentre os critérios de aceitação para eficácia conservante para produtos categoria 2, como é o caso das formulações empregadas neste estudo, tem-se:

- ✓ Bactérias: redução de 2 log da quantidade inicial em 14 dias e nenhum aumento do 14° ao 28° dia;
- ✓ Fungos: nenhum aumento em relação à quantidade inicial no 14° e 28° dia.

De acordo com os resultados observados nas Tabelas 10 a 14 e com os critérios estabelecidos pela USP XXX (2007), pode-se dizer que as formulações testadas apresentam eficácia conservante.

5.5.5.2. Cálculo do valor D

Nas Tabelas 15 a 19 e Figuras 65 a 67 podem ser observados os resultados do cálculo do valor D para as formulações.

Tabela 15. Contagem de microrganismos nas formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *E. coli*.

Amostras	Tempo (horas)			
	0 (UFC/g)	2 (UFC/g)	24 (UFC/g)	48 (UFC/g)
F ₁	1,2.10 ⁷	<10	<10	<10
F _{1v}	1,0.10 ⁷	<10	<10	<10
F ₄	1,4.10 ⁷	<10	<10	<10
F _{4v}	1,3.10 ⁷	<10	<10	<10
C+	3,5.10 ⁶	<10	<10	<10
C-	4,0.10 ⁵	2,3.10 ⁴	2,3.10 ⁴	2,3.10 ³

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes; C - controle negativo: creme Lanette sem conservantes.

Tabela 16. Contagem de microrganismos nas formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *S. aureus*.

Amostras	Tempo (horas)			
	0 (UFC/g)	2 (UFC/g)	24 (UFC/g)	48 (UFC/g)
F ₁	2,5.10 ⁶	<10	<10	<10
F _{1v}	2,3.10 ⁶	<10	<10	<10
F ₄	2,6.10 ⁶	<10	<10	<10
F _{4v}	2,4.10 ⁶	<10	<10	<10
C+	3,3.10 ⁶	2,0.10 ⁵	<10	<10
C-	5,1.10 ⁶	2,3.10 ⁴	2,0.10 ⁴	2,2.10 ³

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes; C - controle negativo: creme Lanette sem conservantes.

Tabela 17. Contagem de microrganismos nas formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *P. aeruginosa*.

Amostras	Tempo (horas)			
	0 (UFC/g)	2 (UFC/g)	24 (UFC/g)	48 (UFC/g)
F ₁	8,0.10 ⁶	1,1.10 ⁶	5,7.10 ⁵	1,0.10 ³
F _{1v}	8,3.10 ⁶	1,4.10 ⁶	6,0.10 ⁵	1,3.10 ³
F ₄	8,2.10 ⁶	1,3.10 ⁶	6,2.10 ⁵	1,8.10 ³
F _{4v}	8,1.10 ⁶	1,2.10 ⁶	5,9.10 ⁵	1,6.10 ³
C+	3,2.10 ⁶	<10	<10	<10
C-	4,3.10 ⁶	2,0.10 ⁴	2,0.10 ²	2,2.10 ²

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes; C - controle negativo: creme Lanette sem conservantes.

Tabela 18. Contagem de microrganismos nas formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *C. albicans*.

Amostras	Tempo (horas)			
	0 (UFC/g)	2 (UFC/g)	24 (UFC/g)	48 (UFC/g)
F ₁	1,8.10 ⁵	1,4.10 ⁵	4,4.10 ³	<10
F _{1v}	1,4.10 ⁵	1,0.10 ⁵	3,9.10 ³	<10
F ₄	2,1.10 ⁵	1,8.10 ⁵	4,7.10 ³	<10
F _{4v}	2,3.10 ⁵	2,0.10 ⁵	5,0.10 ³	<10
C+	2,0.10 ⁶	1,9.10 ²	<10	<10
C-	3,6.10 ⁴	3,3.10 ⁴	3,5.10 ⁴	3,5.10 ³

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes; C - controle negativo: creme Lanette sem conservantes.

Tabela 19. Contagem de microrganismos nas formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} contaminadas com *A. niger*.

Amostras	Tempo (horas)			
	0 (UFC/g)	2 (UFC/g)	24 (UFC/g)	48 (UFC/g)
F ₁	2,2.10 ⁵	1,0.10 ⁴	4,4.10 ³	1,0.10 ³
F _{1v}	2,5.10 ⁵	1,3.10 ⁴	4,7.10 ³	1,3.10 ³
F ₄	2,4.10 ⁵	1,2.10 ⁵	4,6.10 ³	1,2.10 ³
F _{4v}	2,7.10 ⁵	1,6.10 ⁵	4,9.10 ³	1,5.10 ³
C+	6,8.10 ⁵	1,9.10 ²	<10	<10
C-	3,9.10 ⁵	5,0.10 ⁴	2,2.10 ⁴	3,2.10 ³

C+ controle positivo: creme Lanette com conservantes; C - controle negativo: creme Lanette sem conservantes.

As Figuras 65, 66 e 67 apresentam, respectivamente, o perfil de letalidade – log UFC/g x tempo (horas) de *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger* nas formulações F₁ (A), F_{1v} (B), F₄ (C) e F_{4v} (D).

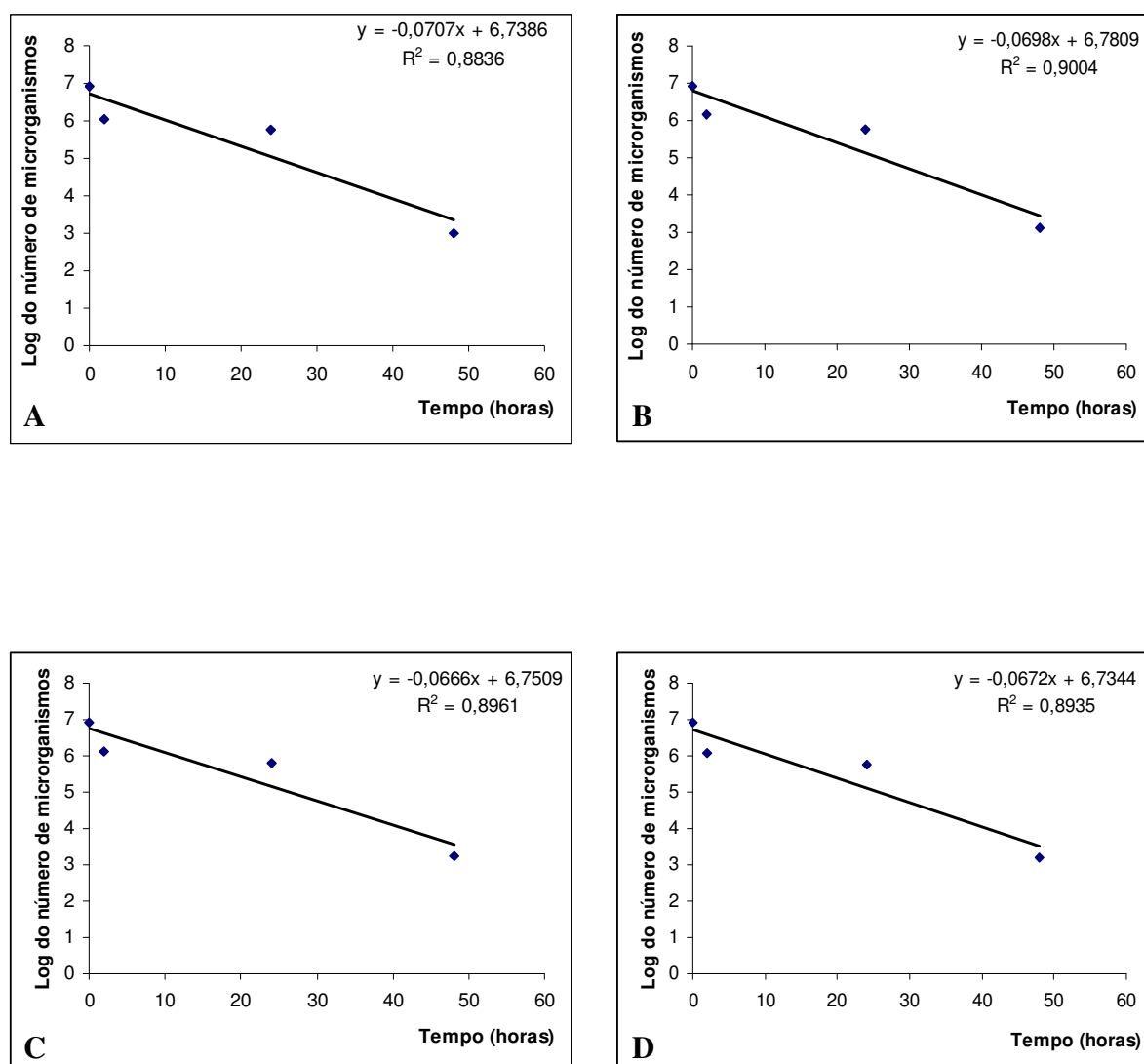


Figura 65. Perfil de letalidade – log UFC/g x tempo (horas) de *P. aeruginosa* nas formulações F₁ (A), F_{1v} (B), F₄ (C) e F_{4v} (D).

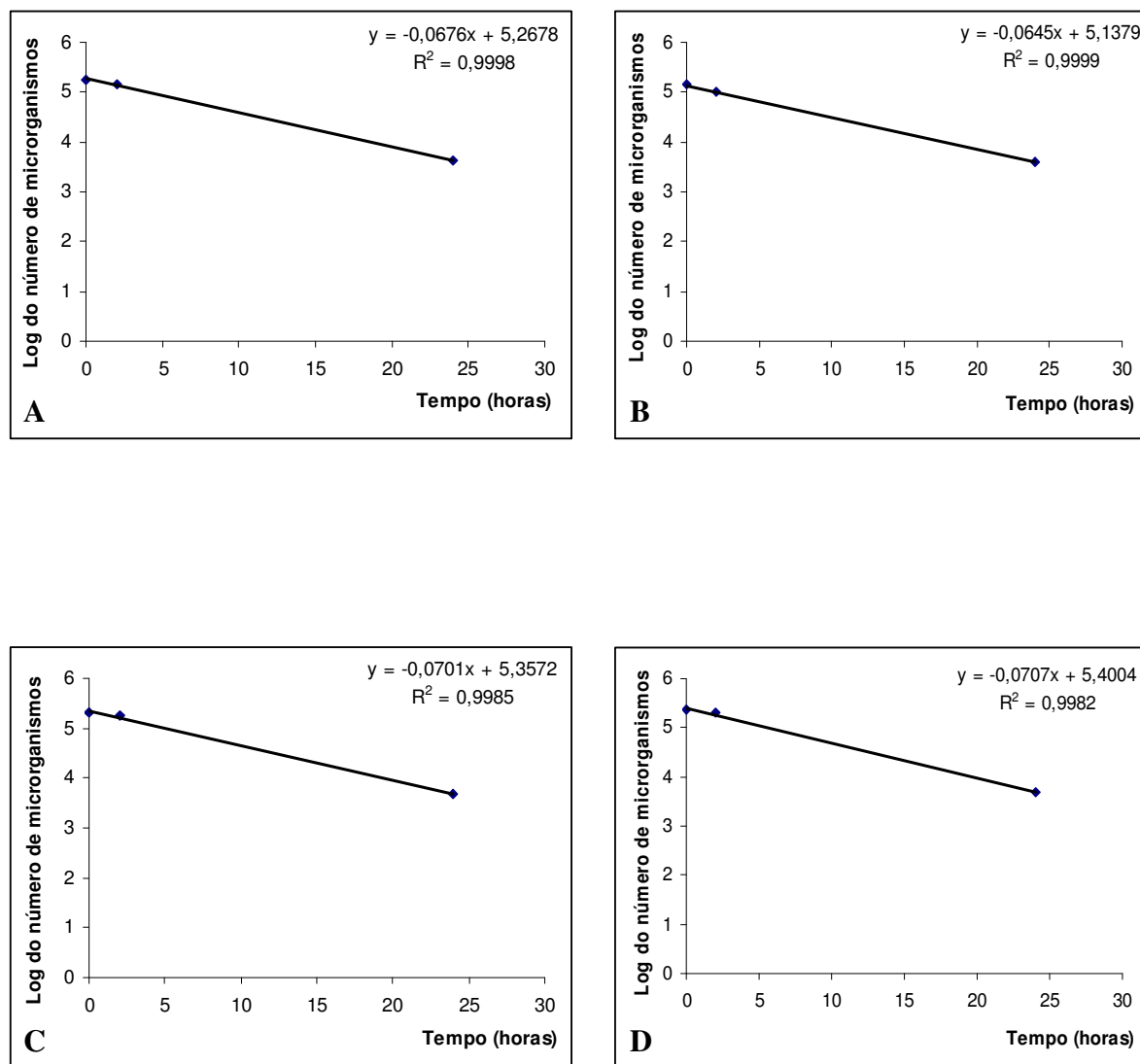


Figura 66. Perfil de letalidade – log UFC/g x tempo (horas) de *C. albicans* nas formulações F₁ (A), F_{1v} (B), F₄ (C) e F_{4v} (D).

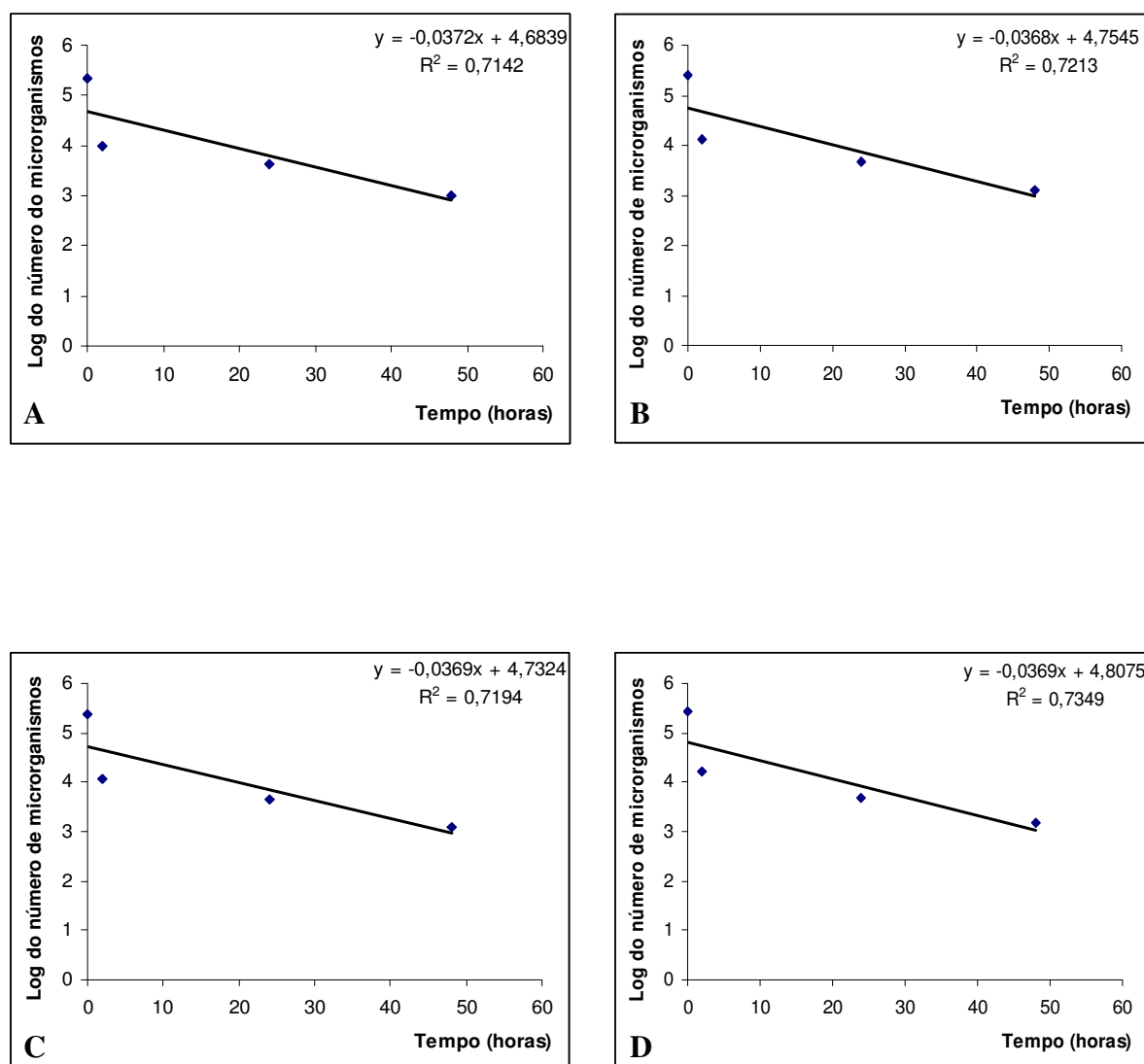


Figura 67. Perfil de letalidade – log UFC/g x tempo (horas) de *A. niger* nas formulações F₁ (A), F_{1v} (B), F₄ (C) e F_{4v} (D).

Não foi possível calcular o valor D para as formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} inoculadas com *E. coli* que passaram, respectivamente, de $1,2 \cdot 10^7$ UFC/g, $1,0 \cdot 10^7$ UFC/g, $1,4 \cdot 10^7$ UFC/g e $1,3 \cdot 10^7$ UFC/g para nenhuma bactéria após 2 horas de incubação, demonstrando efeito letal muito rápido. Dados semelhantes foram obtidos por AL-DHAM et al. (2000) ao realizarem o teste de desafio em diferentes formulações de microemulsões. Os autores verificaram que a

queda da viabilidade celular foi muito rápida, decaindo 5 log em 45 minutos com valor $D_{90\%}$ de 15 segundos, sendo principalmente devido à danos na membrana celular bacteriana.

Além disso, também não foi possível calcular o valor D para as formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} inoculadas com *S. aureus* que passaram, respectivamente, de $2,5 \cdot 10^6$ UFC/g, $2,3 \cdot 10^6$ UFC/g, $2,6 \cdot 10^6$ UFC/g e $2,4 \cdot 10^6$ UFC/g para nenhuma bactéria após 2 horas de incubação, demonstrando efeito letal muito rápido.

As Tabelas 20, 21 e 22 apresentam o valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para os microrganismos *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger*, respectivamente.

Tabela 20. Valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para *P. aeruginosa*.

Amostras	Valor D (horas)	Equação	Coefficiente de correlação (R^2)
F_1	14,14	$y = -0,0707x + 6,7386$	0,8836
F_{1v}	14,32	$y = -0,0698x + 6,7809$	0,9004
F_4	15,02	$y = -0,0666x + 6,7509$	0,8961
F_{4v}	14,88	$y = -0,0672x + 6,7344$	0,8935

Tabela 21. Valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para *C. albicans*.

Amostras	Valor D (horas)	Equação	Coefficiente de correlação (R^2)
F_1	14,79	$y = -0,0676x + 5,2678$	0,9998
F_{1v}	15,50	$y = -0,0645x + 5,1379$	0,9999
F_4	14,26	$y = -0,0701x + 5,3572$	0,9985
F_{4v}	14,14	$y = -0,0707x + 5,4004$	0,9982

Tabela 22. Valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para *A. niger*.

Amostras	Valor D (horas)	Equação	Coefficiente de correlação (R^2)
F_1	26,88	$y = -0,0372x + 4,6839$	0,7142
F_{1v}	27,17	$y = -0,0368x + 4,7545$	0,7213
F_4	27,10	$y = -0,0369x + 4,7324$	0,7194
F_{4v}	27,10	$y = -0,0369x + 4,8075$	0,7349

Observou-se que as amostras apresentaram diferentes atividades contra os microrganismos.

Para a formulação F_1 contaminada com *P. aeruginosa*, o valor D foi 14,14 horas (Tabela 20) apresentando células viáveis ($1,0 \cdot 10^3$ UFC/g) após 48 horas de inoculação. A formulação F_1 contaminada com *C. albicans*, com valor D 14,79 horas (Tabela 21) não apresentou células viáveis após 48 horas de inoculação. A mesma formulação contaminada com *A. niger* apresentou valor D de 26,88 horas (Tabela 22), decaindo de $2,2 \cdot 10^5$ UFC/g para $1,0 \cdot 10^3$ UFC/g, após 48 horas de inoculação. Porém, como também foi observado no teste de

desafio (Tabela 14), este número permaneceu constante por 28 dias. O fato da análise microbiológica não apresentar contaminantes provavelmente indica que, se ocorreu contaminação com bolores durante sua manipulação, estes deveriam estar em pequeno número, sendo mais facilmente destruídos. No caso do teste de desafio, o inóculo foi grande (cerca de 10^6 /g), não se conseguindo destruição total.

Para a formulação F_{1v} contaminada com *P. aeruginosa*, o valor D foi 14,32 horas (Tabela 20) apresentando células viáveis ($1,3 \cdot 10^3$ UFC/g) após 48 horas de inoculação. A formulação F_{1v} contaminada com *C. albicans*, com valor D 15,50 horas (Tabela 21) não apresentou células viáveis após 48 horas de inoculação. A mesma formulação contaminada com *A. niger* apresentou valor D de 27,17 horas (Tabela 22), decaindo de $2,5 \cdot 10^5$ UFC/g para $1,3 \cdot 10^3$ UFC/g, após 48 horas de inoculação. Porém, como também foi observado no teste de desafio (Tabela 14), este número de esporos permaneceu constante por 28 dias. Da mesma forma que para a formulação F_1 , o inóculo foi grande (cerca de 10^6 /g), não se conseguindo destruição total.

Já a formulação F_4 contaminada com *P. aeruginosa*, o valor D foi 15,02 horas (Tabela 20) apresentando células viáveis ($1,8 \cdot 10^3$ UFC/g) após 48 horas de inoculação. A formulação F_4 contaminada com *C. albicans*, com valor D 14,26 horas (Tabela 21) não apresentou células viáveis após 48 horas de inoculação. A mesma formulação contaminada com *A. niger* apresentou valor D de 27,10 horas (Tabela 22), decaindo de $2,4 \cdot 10^5$ UFC/g para $1,2 \cdot 10^3$ UFC/g, após 48 horas de inoculação. Porém, como foi observado no teste de desafio (Tabela 14), este número de esporos permaneceu constante por 28 dias. Da mesma forma que para as formulações F_1 e F_{1v} , o inóculo foi grande (cerca de 10^6 /g), não se conseguindo destruição total.

Para a formulação F_{4v} contaminada com *P. aeruginosa*, o valor D foi 14,88 horas (Tabela 20) apresentando células viáveis ($1,6 \cdot 10^3$ UFC/g) após 48 horas de inoculação. A formulação F_{4v} contaminada com *C. albicans*, com valor D 14,14 horas (Tabela 21), não apresentou células viáveis após 48 horas de inoculação. A mesma formulação contaminada com *A. niger* apresentou valor D de 27,10 horas (Tabela 22), decaindo de $2,7 \cdot 10^5$ UFC/g para $1,5 \cdot 10^3$ UFC/g, após 48 horas de inoculação. Porém, como foi observado no teste de desafio (Tabela 14), este número de esporos permaneceu constante por 28 dias. Da mesma forma que para as formulações F_1 , F_{1v} e F_4 , o inóculo foi grande (cerca de 10^6 /g), não se conseguindo destruição total.

A análise dos resultados mostra que as formulações F_1 , F_{1v} , F_4 e F_{4v} apresentam atividade antimicrobiana. Deve-se ressaltar que os microrganismos também apresentaram

comportamento diferente frente às formulações nanoestruturadas, o que justifica a necessidade de testá-los conforme preconiza a metodologia oficial (USP XXVII, 2004).

Na preparação de sistemas nanoestruturados, geralmente não são empregados conservantes microbiológicos. Uma das justificativas para tal medida baseia-se no fato de que tais sistemas apresentam grandes quantidades de tensoativos, o que dificultaria o desenvolvimento de microrganismos, inibindo seu crescimento (FRIBERG, 1984; CONSTÂNCIO, 1993). Os microrganismos não podem sobreviver em óleo, sendo a água necessária para seu crescimento e reprodução. Nestas formulações, a água está acessível em quantidade limitada aos microrganismos, sendo uma das principais causas da ação antimicrobiana.

Outra hipótese para a ação antimicrobiana seria o fato de estes sistemas afetarem a estrutura e função da membrana citoplasmática microbiana (JONES et al., 1997; BORTOLETTO et al., 1998). Há alguns relatos na literatura sobre as propriedades antimicrobianas de formulações nanoestruturadas, principalmente microemulsões (WRIGHT, 1996; AL-DHAM et al., 2000); todavia, não são conclusivos quanto ao modo de ação.

AL-DHAM e colaboradores (2000) avaliaram a estabilidade de várias formulações de microemulsões, sob o ponto de vista microbiológico, através da observação da cinética de morte e microscopia eletrônica de transmissão das bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os autores comprovaram que o rompimento das membranas foi a principal causa da morte que ocorreu de forma muito rápida, ou seja, em 45 segundos após contato com as substâncias.

FU e colaboradores (2006) também avaliaram a atividade antimicrobiana de várias formulações de microemulsões, verificando que houve melhor ação dos produtos quando a taxa de tensoativo:co-tensoativo foi na proporção de 3:2, apresentando, portanto, melhor ação antimicrobiana.

Quando se considera a qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos e cosméticos não estéreis se admite a presença de um número limitado de microrganismos, tendo em vista as características de sua utilização. Frequentemente, o critério é a pesquisa de microrganismos indicadores que, quando presentes em uma formulação, podem fornecer informações sobre o nível de sua contaminação e as condições higiênico-sanitárias durante o processamento, produção ou armazenamento (OLIVEIRA, 1999).

Pode-se sugerir que o teste de desafio e o cálculo do valor D se mostraram métodos eficientes para a avaliação da propriedade conservante das formulações F_1 , F_{1V} , F_4 e F_{4V} , o que já foi evidenciado para outros sistemas nanoestruturados estudados (WRIGHT, 1996; AL-DHAM et al., 2000).

5.6. Estudo de irritação das formulações tópicas

5.6.1. Irritação dérmica primária

Os resultados das análises de irritação dérmica primária após 4 e 72 horas de aplicação dos tratamentos, segundo a escala de Draize, em relação ao eritema, estão demonstrados na Tabela 23. Os resultados foram analisados pelo teste de Student Newman Keuls, com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Quanto ao edema local, não se evidenciou sua presença quando observadas as regiões de tratamento nos tempos 4 horas e 72 horas.

Tabela 23. Eritema observado no estudo de irritação dérmica primária, segundo escala de Draize, após 4 e 72 horas de tratamento com as formulações F₁, F_{1v}, F₄, F_{4v} e controle (n=5), aplicadas no dorso dos coelhos.

Formulações	T _{4h}	T _{72h}
	Média ± EPM	Média ± EPM
F ₁	0,4 ± 0,24	0,0 ± 0,00
F _{1v}	0,4 ± 0,22	0,0 ± 0,00
F ₄	0,5 ± 0,22	0,0 ± 0,00
F _{4v}	0,5 ± 0,23	0,0 ± 0,00
Controle	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

Observou-se, portanto, que não houve diferença estatisticamente significativa, mostrando que as formulações não causam irritabilidade na pele dos animais após 4 e 72 horas.

As Figuras 68 e 69 apresentam, respectivamente, o teste de irritação dérmica primária em coelhos após 4 e 72 horas de aplicação das formulações.



Figura 68. Teste de irritação dérmica primária em coelhos após 4 horas.



Figura 69. Teste de irritação dérmica primária em coelhos após 72 horas.

Segundo SAMPAIO & RIVITTI (2001), é importante verificar cuidadosamente os resultados de eritema e edema dos testes de irritação dérmica primária, pois há possibilidade de haver resultados falso-positivos e falso-negativos. As reações falso-positivas podem ocorrer quando a substância testada é um irritante primário ou é usada em concentração ou quantidade superior à preconizada. Também, podem ocorrer quando o veículo usado para o teste de contato é irritante para o paciente ou o teste foi realizado em áreas próximas a lesões em atividade.

As reações falso-negativas têm como principais causas: a substância testada acha-se em concentração ou quantidade inferior à preconizada; o veículo utilizado para o teste não é

adequado; o local do teste não é apropriado; a leitura foi feita em tempo inferior ao preconizado; o teste não permaneceu bem ocluído permitindo um mau contato com o tegumento, dentre outras (SAMPAIO & RIVITTI, 2001).

Neste experimento, procurou-se tomar cuidados com todos estes aspectos, seguindo todas as orientações descritas pela ANVISA para os testes de irritação dérmica primária (BRASIL, 2003).

Segundo TORNIER e colaboradores (2006), a escala de Draize consiste em avaliar o efeito de substâncias aplicadas topicamente na pele tricotomizada de coelhos, sendo este um dos melhores métodos para avaliar irritabilidade cutânea. Entretanto, a escala de Draize apresenta algumas desvantagens, como exemplo, algumas respostas fisiológicas na pele de coelho podem se apresentar diferentes aos agentes ambientais e químicos da pele humana e algumas vezes o desconforto animal perante alguns irritantes podem ser severos e causar escaras em sua pele.

5.6.2. Análise histológica

5.6.2.1. Análise histométrica da epiderme

Os resultados da espessura da camada córnea nos diferentes grupos experimentais estão presentes na Tabela 24 e Figura 70.

Tabela 24. Espessura da camada córnea nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Média (µm)	Desvio-Padrão
Controle	0,4160	0,124
F ₁	0,4680	0,144
F _{1v}	0,4816	0,139
F ₄	0,4187	0,137
F _{4v}	0,4267	0,128

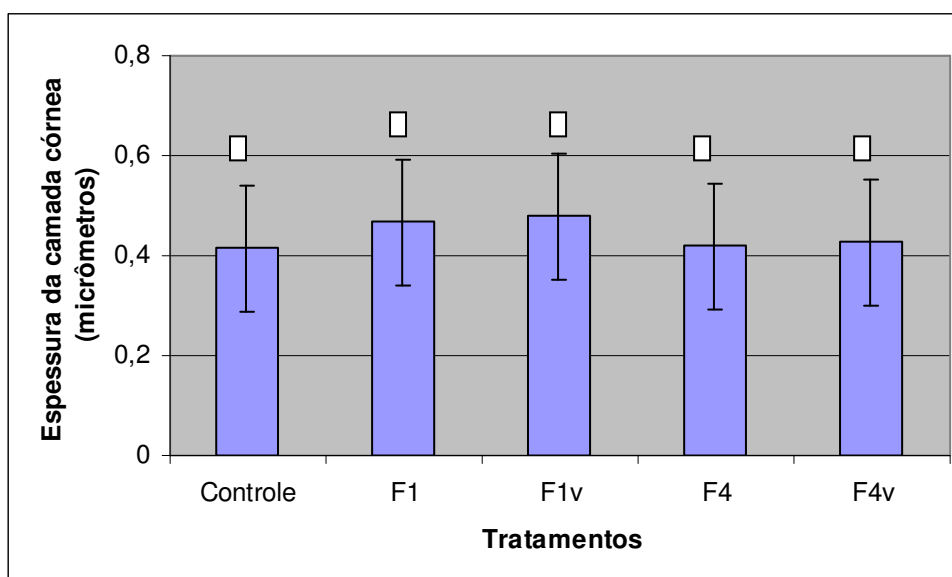


Figura 70. Espessura da camada córnea nos diferentes grupos experimentais (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).

Pela análise estatística, observou-se distribuição normal dos dados. Realizou-se análise de variância, seguindo um delineamento inteiramente ao acaso (ANOVA) e utilizou-se o teste F para verificar a diferença entre os tratamentos. O detalhamento da análise para comparação das médias, duas a duas, foi feito pelo teste de Tukey, considerando-se significativos os valores de $p < 0,05$. Observou-se que não houve aumento na espessura da camada córnea para as formulações aplicadas quando comparadas ao controle.

Os resultados da espessura da epiderme nos diferentes grupos experimentais estão presentes na Tabela 25 e Figura 71.

Tabela 25. Espessura da epiderme nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Média (μm)	Desvio-Padrão
Controle	1,377	0,284
F ₁	1,630	0,301
F _{1v}	1,688	0,262
F ₄	1,499	0,285
F _{4v}	1,567	0,302

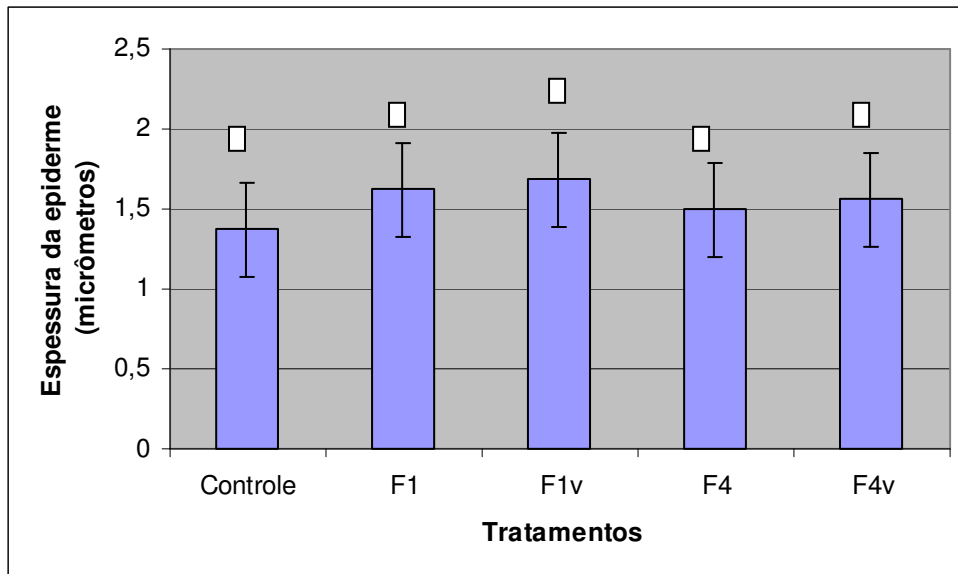


Figura 71. Espessura da epiderme nos diferentes grupos experimentais (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).

Pela análise estatística, observou-se distribuição normal dos dados. Realizou-se análise de variância, seguindo um delineamento inteiramente ao acaso (ANOVA) e utilizou-se o teste F para verificar a diferença entre os tratamentos. O detalhamento da análise para comparação das médias, duas a duas, foi feito pelo teste de Tukey, considerando-se 5 % de significância. Observou-se que não houve aumento na espessura da epiderme para as formulações aplicadas quando comparadas ao controle.

O objetivo principal ao realizar a análise histométrica da epiderme foi verificar se as formulações empregadas poderiam estar aumentando a hidratação cutânea, o que seria evidenciado por aumento nos espaços intersticiais. Sabe-se que algumas formulações cosméticas, vinculadas ou não de substâncias ativas, podem favorecer a hidratação cutânea, resultando em efeito benéfico à pele (LEONARDI et al., 2000b).

De acordo com LIBARDI (1999), o que faz a pele permanecer saudável, macia, com flexibilidade e elasticidade é a manutenção da hidratação cutânea e a capacidade que o organismo tem, não só de promover a renovação celular, mas também de sintetizar as substâncias que compõem a epiderme. Para um bom funcionamento do mecanismo de hidratação da pele, a camada córnea deve ser capaz de reter água, de modo que a taxa de evaporação da água sempre se mantenha num nível normal. PROKSCH e colaboradores (2005), por sua vez, afirmam que a hidratação cutânea está intrinsicamente relacionada com a integridade da camada córnea.

CHORILLI e colaboradores (2003), ao aplicarem formulações de gel em suínos observaram, por meio de análises histológicas, que o gel aquoso ocasionou aumento nos espaços intersticiais, evidenciando hidratação do tecido cutâneo. Provavelmente, isto se deve à película oclusiva conferida pelo gel, que dificulta a evaporação da água da pele para o meio ambiente, aumentando a retenção de água. Resultados semelhantes foram obtidos por MAIA CAMPOS et al. (1999) e BRADLEY et al. (1990), que também observaram expressivo aumento de hidratação cutânea proporcionado por gel aquoso.

SANTOS (2006), estudando os efeitos hidratantes de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristal líquido, observou aumento significativo da hidratação da pele após aplicação das emulsões em relação à área não tratada. O autor sugere que esta ação hidratante se deve à diminuição da perda de água transepidermal, visto que quando aplicadas à superfície cutânea, as formulações formam um filme oclusivo, impedindo a evaporação da água da camada córnea.

A atividade oclusiva conferida pelos cristais líquidos também foi citada em outros trabalhos, como os de BRINON e colaboradores (1998) e SANTOS e colaboradores (2005). Os autores sugerem que esta ação está relacionada à característica coloidal do sistema emulsionado, o qual possui organização no estado líquido-cristalino semelhante ao das bicamadas lipídicas que unem os queratinócitos, aumentando a coesão e, conseqüentemente, a capacidade de formação de filme (ROUX et al., 1994; KLEIN, 2002).

Para as formulações empregadas neste estudo, não se observou aumento estatisticamente significativo na espessura da camada córnea e epiderme, evidenciado pela Figura 72. GUIMARÃES & POLACOW (2006), todavia, observaram aumento significativo da espessura da epiderme para um sistema constituído pelos mesmos componentes utilizados neste trabalho (silicone fluido de co-polímero glicol, poliéter funcional siloxano e água), só que em concentrações diferentes, aplicando as formulações por um período de 15 dias, sugerindo assim aumento da hidratação devido ao aumento da espessura da epiderme. Logo, pode-se sugerir que a concentração dos componentes de uma formulação pode alterar os seus efeitos na pele.

A Figura 72 apresenta as fotomicrografias evidenciando a camada córnea e a epiderme de coelhos após os tratamentos, empregando aumento de 200x.

Pelas fotomicrografias, observa-se que não houve aumento significativo na espessura da camada córnea e epiderme após aplicação das formulações quando comparadas ao controle por um período de 15 dias, aplicando 1,5g de formulação por dia. As análises sugerem que não houve aumento da hidratação cutânea após o emprego das formulações. Uma questão

importante a ser abordada é que as formulações foram aplicadas por um período relativamente curto para se verificar efeitos significativos. Talvez, se aplicadas por um período maior, os resultados poderiam ter sido mais expressivos.

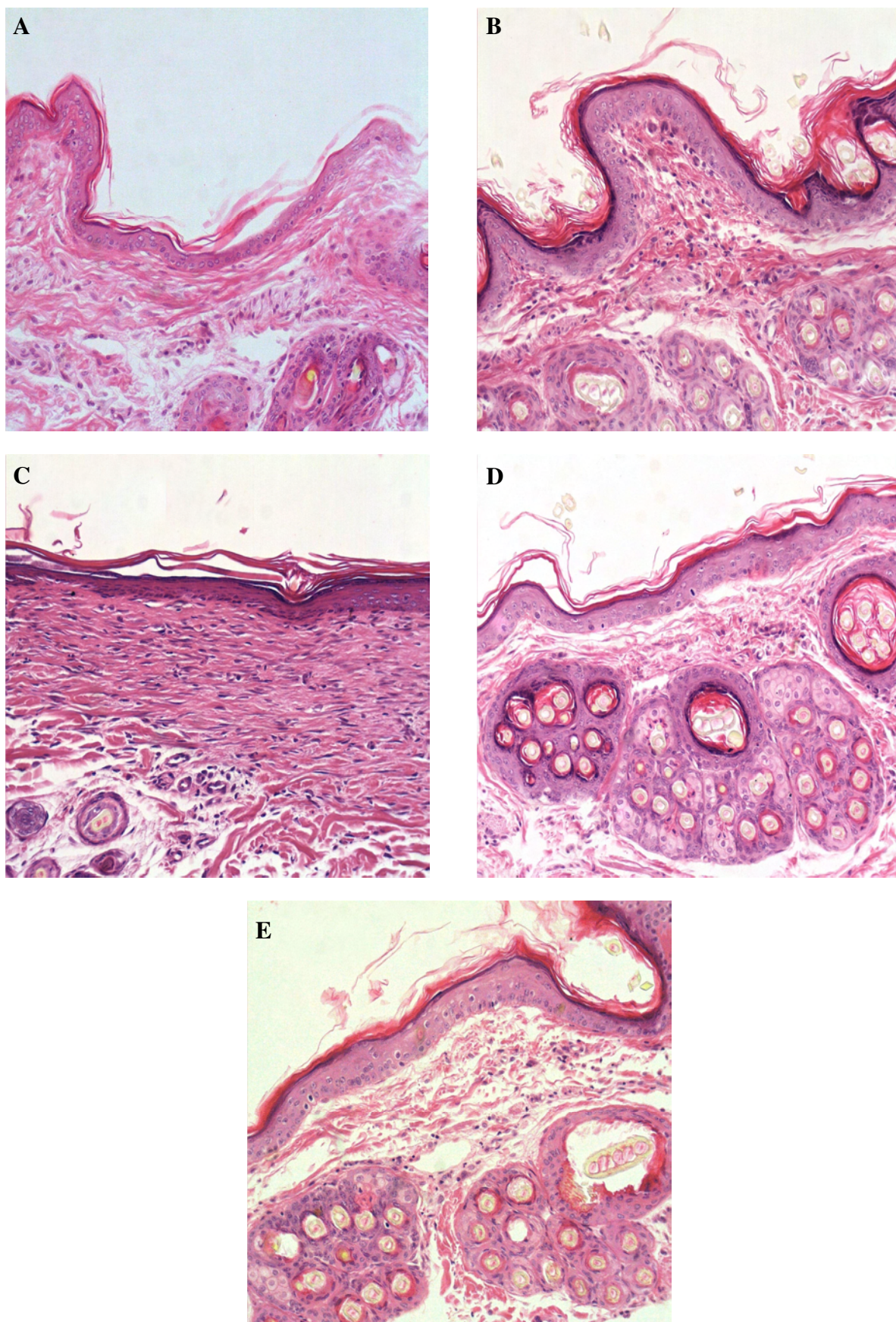


Figura 72. Fotomicrografias evidenciando a camada córnea e a epiderme de coelhos após os tratamentos: (A) – controle; (B) – F₁; (C) – F_{1v}; (D) – F₄; (E) – F_{4v} (200x).

5.6.2.2. Análise histopatológica da derme

Os resultados do número de fibroblastos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar estão presentes na Tabela 26 e Figura 73.

Tabela 26. Número de fibroblastos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar.

Grupos	Média	Desvio-Padrão
Controle	100,833	6,468
F ₁	118,833	3,621
F _{1v}	133,867*	9,966
F ₄	109,000	4,507
F _{4v}	131,333	7,848

*diferença significativa.

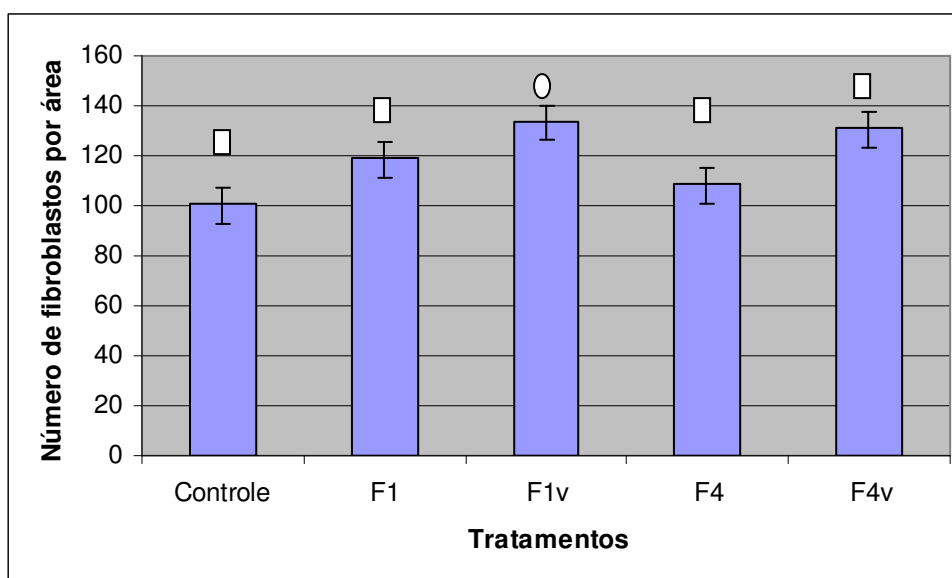


Figura 73. Número de fibroblastos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).

Pela análise estatística, observou-se distribuição não normal dos dados para o número de fibroblastos por área. Recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para análise dos resultados.

Os resultados evidenciaram que apenas a formulação F_{1v} difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$), ou seja, o número de fibroblastos apresentados nas áreas em que se aplicou a formulação F_{1v} é maior do que o apresentado pelo grupo em que não se aplicou formulação (controle). Esta diferença em relação ao número de fibroblastos na derme papilar pode ser

visualizada pelas fotomicrografias apresentadas na Figura 74, empregando um aumento de 1000x.

Quando se comparou os tratamentos entre si, observou-se que F_{1v} difere estatisticamente de F_4 . Todavia, o número de fibroblastos de F_4 não difere estatisticamente de F_1 e F_{4v} .

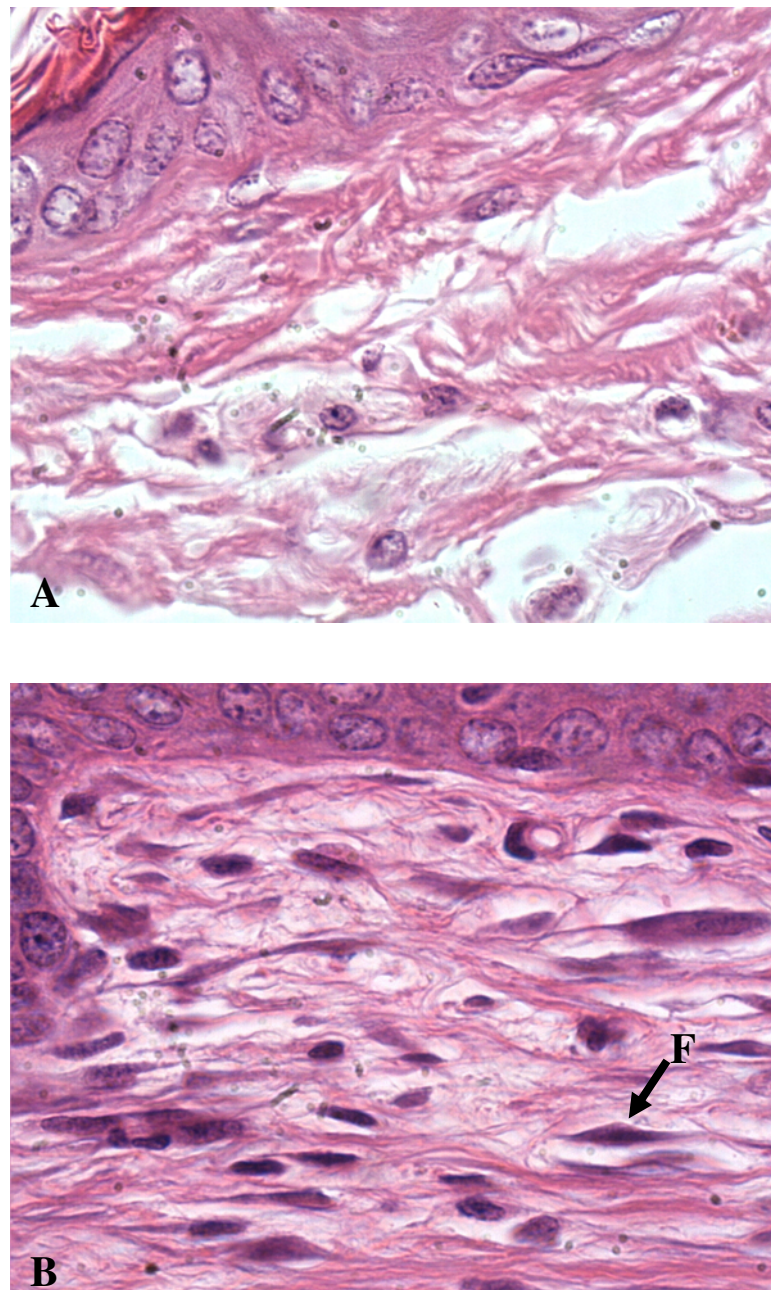


Figura 74. Fotomicrografias evidenciando a derme papilar dos grupos: (A) – Controle; (B) – F_{1v} . Observa-se maior número de fibroblastos (seta) no grupo em que se aplicou a formulação F_{1v} (1000x).

Os resultados do número de leucócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar estão presentes na Tabela 27 e Figura 75.

Tabela 27. Número de leucócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar.

Grupos	Média	Desvio-Padrão
Controle	14,300	6,304
F ₁	13,133	3,819
F _{1v}	16,867	5,031
F ₄	12,100	8,036
F _{4v}	16,867	7,310

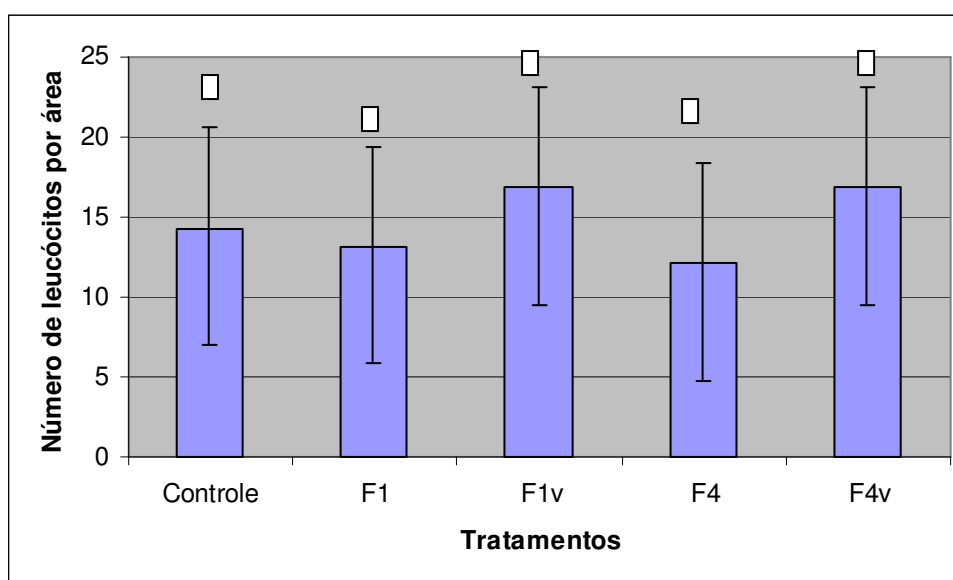


Figura 75. Número de leucócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes).

Pela análise estatística, observou-se distribuição normal dos dados para o número de leucócitos por área. Realizou-se análise de variância, seguindo um delineamento inteiramente ao acaso (ANOVA), e utilizou-se o teste F para verificar a diferença entre os tratamentos. O detalhamento da análise para comparação das médias, duas a duas, foi feito pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%.

Os resultados não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos quando comparados com o controle. Logo, nenhum dos tratamentos ocasionou aumento significativo no número de leucócitos na derme.

A mais comum das reações adversas para as formulações tópicas é a irritação cutânea, que pode ser definida como intolerância local, podendo corresponder a reações de desconforto menores, mas também a reações mais ou menos agudas, variando sua intensidade, desde ardor, coceira e pinicação, podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido. Todas estas reações se restringem à área em contato direto com o produto. Geralmente, as reações de irritação estão relacionadas às concentrações de uso no produto final e sua formulação cosmética (BRASIL, 2003).

Logo, formulações que apresentam grande quantidade de tensoativo, como as desenvolvidas neste estudo, teoricamente poderiam ocasionar uma irritação local. Para tanto, procurou-se empregar substâncias que apresentam propriedades tensoativas, mas que não são extremamente irritantes, como os silicones.

A evidência e interpretação de irritação no tecido cutâneo podem ser realizadas por meio de avaliação histopatológica e histométrica, uma vez que permite a análise do tecido epitelial, da derme e também das características celulares. Além disso, pode auxiliar o delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia da derme e no desenvolvimento de novos produtos cosméticos (MAIA CAMPOS et al., 1999; TADINI, 2005).

A análise histopatológica consiste na observação visual de biópsias ao microscópio óptico de luz que permite a avaliação qualitativa das diversas estruturas presentes no tecido cutâneo. A histopatologia, por ser uma análise qualitativa, deve ser complementada pela histometria, determinando a espessura da epiderme e da derme, como também quantificando os diversos tipos celulares, principalmente na derme (SILVA & MAIA CAMPOS, 2000).

Pode-se dizer que uma irritação causa na pele quadro semelhante ao apresentado por uma lesão. A lesão no tecido cutâneo é caracterizada por qualquer evento que danifique a estrutura ou função do tecido. Ela produz alteração na capacidade das células em realizarem seus mecanismos homeostáticos normais, desencadeando vários processos biológicos e histoquímicos, levando à ação vasomotora, com a finalidade de mobilizar todas as diferentes células encarregadas de combater a infecção e/ou agente agressor. Estes processos têm a finalidade de reparar as perdas de substâncias da maneira mais rápida possível, restaurando o equilíbrio fisiológico e contribuindo para a sobrevivência do organismo (KITCHEN & YOUNG, 1998).

Logo, um processo irritativo irá liberar mediadores inflamatórios, mobilizando uma série de células, principalmente neutrófilos e linfócitos, com finalidade de combater o agente agressor ou levar os processos imunitários que facilitariam este combate (ANDREWS, 1995).

Os mediadores inflamatórios funcionam como quimiotáticos e como fatores de crescimento para as células inflamatórias, sendo representados pelos leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos e linfócitos. Eles liberam também fatores de crescimento para células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. A liberação destes fatores pode levar, inclusive, à formação de tecido de granulação (FAZIO et al., 2001).

O fibroblasto é a principal célula para a formação do tecido de granulação, sintetizando ácido hialurônico, fibronectina, colágenos tipo I e III, elastina e proteases, como a colagenase (KITCHEN & YOUNG, 1998).

Tais informações devem ser analisadas para se entender o resultado de aumento de fibroblastos ocorridos na derme para o tratamento com a formulação F_{1v}, a qual apresenta 60% de tensoativo, 30% de água, 10% de óleo, incluindo 1% de PR. Em um primeiro instante, poderia-se acreditar que a formulação causou na pele um processo irritativo devido à grande quantidade de tensoativo. Todavia, tal processo não é confirmado por aumento do número de leucócitos (Tabela 27 e Figura 75), o que seria muito comum em casos de irritação, pois trata-se de células de defesa comuns em situações de lesão tecidual.

Logo, acredita-se que este aumento de fibroblastos verificado nas lâminas histológicas do grupo em que se utilizou a formulação F_{1v} seja devido ao emprego de PR (vitamina A palmitato).

O papel dos retinóides na pele parece ser mais bem desempenhado pelo ácido retinóico. Portanto, a maior atividade do PR na pele dependerá de sua conversão em ácido retinóico (LEONARDI, 1997). Essa conversão depende da clivagem enzimática da ligação éster no PR, além da capacidade da pele em oxidar o retinol, transformando-o em ácido retinóico. As estearases exercem atividade enzimática na pele, convertendo o retinol em ácido retinóico (CONNOR & SMIT, 1987; IDSON, 1993; TSUNODA & TAKABAYASHI, 1995).

De acordo com DUELL e colaboradores (1996), a aplicação tópica do ácido retinóico em pele humana pode causar eritema local, o que não ocorre na aplicação de PR, o qual sofre hidrólise enzimática na pele, convertendo-se em retinol e este em ácido retinóico e outros derivados.

Os retinóides na pele estão relacionados principalmente à hiperproliferação da epiderme com aumento de estrato espinhoso e granuloso (LEONARDI, 2004). Os derivados da vitamina A estimulam os queratinócitos e a proliferação de fibroblastos, resultando em aumento na produção de colágeno, sendo este responsável pela firmeza, pela maior espessura e resistência de traumas na derme, justificando, dessa forma, a sua utilização em protocolos para atenuação das linhas de expressão e das rugas. É importante frisar que, melhorando a

proliferação de queratinócitos, ocorre maior renovação na maturação dos queratinócitos, resultando em uma textura mais lisa da superfície da pele (SHAPIRO & SALIOU, 2001).

Acredita-se que a maior quantidade no número de fibroblastos observados para o grupo experimental que utilizou a formulação F_{1v} seja devido à presença de PR na fórmula, que estimula a proliferação de fibroblastos. É importante salientar que, embora a formulação F_{4v} também apresente em sua composição 1% de PR, está presente em um veículo com menor proporção de tensoativo (40%), o qual foi classificado de acordo com o diagrama de fases como sistema viscoso opaco (SVO), o que possivelmente influenciou na ação da substância ativa.

LEONARDI & MAIA CAMPOS (1998) verificaram que a penetração do PR depende do veículo no qual é incorporado, ou até mesmo de outros componentes ativos acrescentados na formulação. Assim, devido à menor quantidade de tensoativo na formulação, possivelmente não houve penetração adequada do PR a ponto de promover alterações estatisticamente significativas no número de fibroblastos.

5.7. Avaliação da eficácia na pele humana das formulações

A constituição das formulações utilizadas nos estudos de avaliação de eficácia está apresentada na Tabela 28. Empregaram-se no estudo as formulações F_1 e F_{1v} . A formulação F_{1v} foi acrescida de butilhidroxitolueno (BHT), substância antioxidante lipofílica muito empregada em formulações cosméticas (CHORILLI et al., 2007a), e de metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol, conservante microbiológico de amplo espectro (CHORILLI et al., 2007c), originando a formulação F_{1va} . O BHT foi utilizado apenas para comprovar a necessidade ou não de antioxidante para melhorar a ação do PR, pois há relatos na literatura de que os cristais líquidos podem aumentar a estabilidade de substâncias ativas nas formulações (FORMARIZ et al., 2005). O conservante microbiológico foi empregado somente para garantia de conservação do produto, visto que as voluntárias teriam contato direto com o produto, o que poderia levar à sua contaminação.

Tabela 28. Constituição das formulações utilizadas nos estudos de avaliação de eficácia.

Componentes	F ₁ (%)	F _{1v} (%)	F _{1va} (%)
Água	30,00	30,00	30,00
Silicone fluido de co-polímero glicol	10,00	9,00	8,85
Poliéter funcional siloxano	60,00	60,00	60,00
Palmitato de retinol	---	1,00	1,00
Butilhidroxitolueno (BHT)	---	---	0,05
Metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol	---	---	0,10

Os resultados expressos em porcentagem de áreas com traços de rugas nas fotografias da região periorbital de ambos os olhos das voluntárias, nos tempos T₀ e T₃₀ dias de tratamento, estão representados na Tabela 29 e Figura 76. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância seguida do Teste de Tukey.

Tabela 29. Áreas* com traços de rugas na região periorbital dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) das voluntárias, dos diferentes grupos estudados, antes e depois do tratamento. * áreas de 1,2 cm² em imagens com aumento de 10x.

Controle (Grupo 1)				F ₁ (Grupo 2)				F _{1v} (Grupo 3)				F _{1va} (Grupo 4)			
T ₀		T ₃₀		T ₀		T ₃₀		T ₀		T ₃₀		T ₀		T ₃₀	
OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
8,64	12,40	11,65	11,65	10,90	10,15	9,77	6,39	8,27	7,14	6,77	6,39	9,77	10,52	8,27	9,02
9,02	6,01	10,15	6,01	12,03	10,52	9,40	12,03	9,77	6,77	7,89	6,01	10,15	11,28	10,15	9,77
12,78	12,40	12,03	13,15	14,29	6,77	11,65	7,52	6,01	7,52	4,51	6,01	9,40	10,52	8,27	10,15
8,27	9,77	8,27	9,02	9,77	10,90	7,89	8,65	8,65	7,89	7,52	6,39	10,52	9,40	9,02	9,40
3,38	3,00	3,00	3,75	7,89	8,65	9,02	10,15	8,65	10,52	5,64	7,52	5,64	10,52	5,26	7,89
5,63	5,26	6,77	6,39	10,15	8,27	9,40	10,52	6,77	6,39	6,77	6,39	7,14	8,27	6,39	7,52
6,77	6,39	7,52	6,77	10,90	12,03	11,28	10,52	8,27	7,14	6,01	6,39	9,02	9,40	8,65	9,02
6,01	6,39	6,39	6,39	11,28	14,66	9,77	12,40	7,89	4,89	6,77	3,75	10,52	9,77	10,15	9,40
X=7,56	X=7,7	X=8,22	X=7,89	X=10,9	X=10,24	X=9,77	X=9,77	X=8,04	X=7,28	X=6,49	X=6,11	X=9,02	X=9,96	X=8,27	X=9,02
D=2,81	D=3,44	D=3,00	D=3,15	D=1,84	D=2,44	D=1,21	D=2,11	D=1,17	D=1,59	D=1,08	D=1,06	D=1,75	D=0,94	D=1,71	D=0,90

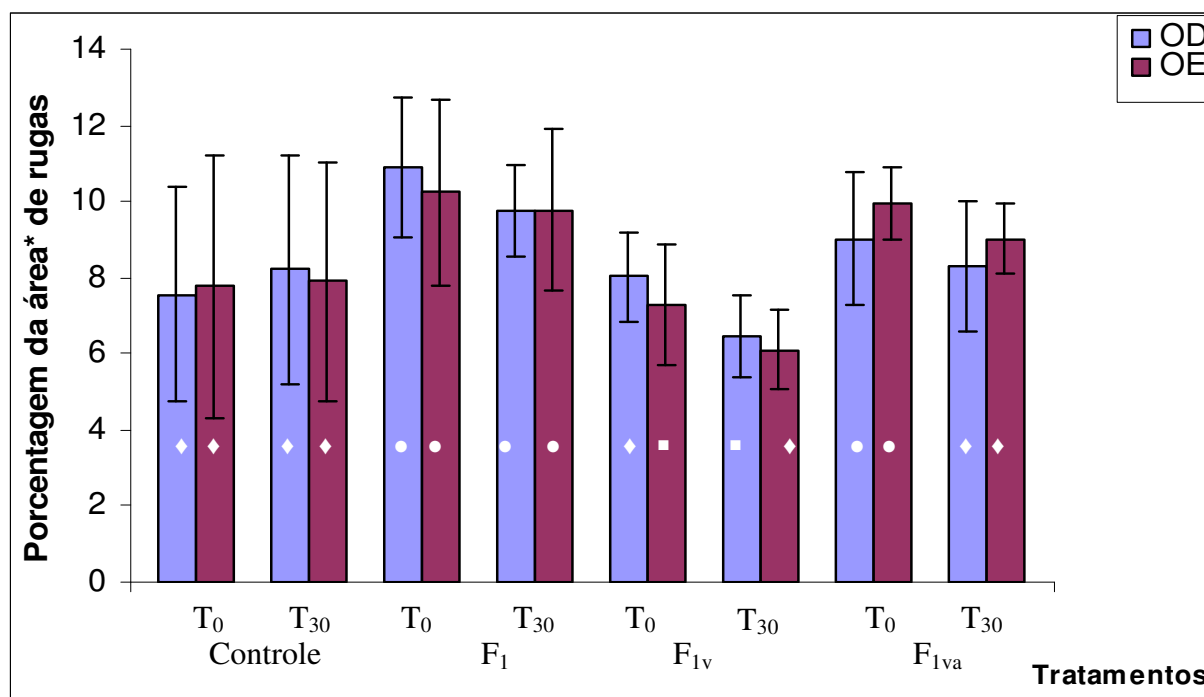


Figura 76. Áreas* com traços de rugas das voluntárias, em seus diferentes grupos, antes e depois do tratamento (símbolos iguais representam médias estatisticamente não diferentes). *áreas de 1,2 cm² em imagens com aumento de 10x.

O grupo 2, que recebeu a aplicação da base cosmética por 30 dias (F₁), não apresentou diferença estatisticamente significativa entre o pré e o pós tratamento, podendo-se dizer que a aplicação desse produto não diminuiu significativamente o número de rugas na região periorbicular, em nenhum dos olhos estudados. Por outro lado, esse tratamento permitiu a manutenção das condições da pele das voluntárias, mantendo-se estatisticamente igual o número de rugas (Figura 76).

A aplicação das formulações acrescidas de PR, tanto as utilizadas pelo grupo 3 (F_{1v}) quanto pelo grupo 4 (F_{1va}), proporcionaram redução significativa nas rugas periorbitulares das voluntárias após o período de 30 dias. Nas voluntárias do grupo 3, houve diminuição significativa das rugas no olho direito. Para as voluntárias do grupo 4, ocorreu diminuição significativa das rugas no olho esquerdo.

Esta diferença concernente à eficácia das formulações na diminuição das rugas em apenas um dos lados da face pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles o posicionamento no momento do sono, que pode contribuir para um aumento na quantidade de rugas. Existem trabalhos na literatura que relacionam, inclusive, o número de rugas em virtude de variações na pele que podem ocorrer durante o dia. TSUKAHARA e colaboradores (2004) avaliaram as variações nas rugas faciais no período da manhã e no período da tarde. Os

autores verificaram maior número de rugas pela manhã, em virtude dos efeitos da gravidade durante o sono, os quais foram atenuados durante o dia.

Esses resultados sugerem também que a presença de cristais líquidos nas formulações pode ter ocasionado melhor estabilidade química do PR, pois alguns estudos aventam a possibilidade de que o PR se oxida de modo relativamente rápido (LEONARDI, 2000a). Logo, como os resultados indicaram eficácia da formulação F_{1v}, em que não se adicionou antioxidante (BHT), acredita-se que a presença de cristais líquidos tenha sido importante para a manutenção do princípio ativo e conseqüentemente para a eficácia da formulação.

A melhora rápida das rugas, em 30 dias de tratamento com PR, provavelmente se deve ao fato de ter ocorrido uma potencialização dos efeitos desta vitamina na pele quando vinculada em um sistema líquido-cristalino do tipo lamelar, visto que este éster tem como funções a prevenção de algumas mudanças degenerativas associadas ao processo de envelhecimento da pele como, por exemplo, pele seca, escamosa e rugas (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 1997). Diversos trabalhos têm sugerido aumento da eficácia de substâncias ativas quando veiculadas em sistemas nanoestruturados. VUCINIĆ-MILANKOVIĆ e colaboradores (2007) verificaram aumento na hidratação cutânea utilizando diclofenaco de dietilamina presente em sistemas líquido-cristalinos lamelares. YANG e colaboradores (2002) notaram aumento da permeabilidade cutânea e conseqüentemente aumento da eficácia do aceclofenaco contra dores musculares veiculado em microemulsões.

ELLIS e colaboradores (1990) observaram diminuição acentuada das rugas e vincos e uma melhora na textura e elasticidade cutânea devido ao uso de uma base cosmética acrescida de vitamina A, que provocou compactação do estrato córneo, aumento da camada granular com maior espessura da epiderme, aumento do número de mitoses nos queratinócitos e presença de glicosaminoglicanas.

Assim, os resultados são animadores no que diz respeito à realização de pesquisas futuras para avaliar a estabilidade química das formulações com cristais líquidos acrescidas de PR, bem como a elaboração de novos estudos veiculando o PR em outros sistemas, como o S₄.

Sabe-se que há uma crescente divulgação de produtos antienvelhecimento cutâneo, muitos deles com a promessa milagrosa de tornar a pele mais jovem, bela e desejada, mas poucos deles apresentam evidências científicas de eficácia comprovada. Tais produtos não podem ser consumidos por informações empíricas, pelo contrário, devem ser divulgados através de embasamento científico. Por esta razão, há uma crescente preocupação dos cientistas com relação aos cuidados estéticos, a fim de proporcionar bem-estar e benefícios, ajudando na qualidade de vida das pessoas que utilizam os produtos antienvelhecimento.

Logo, trabalhos como os aqui apresentados se tornam amplamente importantes, pois verificam os benefícios decorrentes da utilização de produtos cosméticos e podem confirmar a eficácia dos mesmos.

VI. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Tanto o sistema S₁ (silicone fluido de co-polímero glicol, poliéter funcional siloxano e água) quanto o sistema S₄ (adipato de diisopropila, poliéter funcional siloxano e água) apresentaram fases líquido-cristalinas do tipo lamelar em sua estrutura.
- Os testes de estabilidade preliminares realizados evidenciaram que as formulações F₁, F₂ e F₃ de todos os sistemas desenvolvidos se mantiveram estáveis durante o período do estudo, mesmo diante do estresse térmico a que foram submetidas.
- Entre as formulações dos sistemas S₁ e S₄, pode-se dizer que as formulações do sistema S₁ apresentaram maior formação de cristais líquidos e maior estabilidade no decorrer do experimento.
- A proporção de 60% de tensoativo, 10% de óleo e 30% de água, tanto do sistema S₁ quanto do sistema S₄, resultaram em formulações estáveis e com adequada viscosidade; assim, a formulação F₁ foi selecionada para incorporação de PR e para análise do comportamento reológico, controle microbiológico, teste de desafio e efeitos na pele de coelhos.
- Todas as formulações estudadas apresentaram-se como sistemas não-newtonianos, com características de fluidos pseudoplásticos.
- A formulação F₅ foi a mais tixotrópica, evidenciado por sua maior área de histerese, seguido pela formulação F_{1v} e F₁, sendo que as formulações F₄ e F_{4v} apresentaram tixotropia praticamente insignificante.
- As condições de armazenamento, de acordo com os ensaios de escoamento e mecânico-dinâmicos, interferem na estruturação do sistema.

- A formulação F₅ apresentou mistura de fases líquido-cristalinas do tipo hexagonal e cúbica quando mantida em estufa por 30 dias, o que foi comprovado pelos ensaios mecânico-dinâmicos e de SAXS.
- As formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} não apresentaram contaminação microbiana, evidenciado pela estimativa do número de microrganismos viáveis e pela pesquisa de patógenos.
- O teste de desafio mostrou que após 7 dias todos os microrganismos foram destruídos, exceto o bolor *A. niger*, que continuou viável até no mínimo 28 dias após inoculação.
- Os microrganismos-teste (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*) apresentaram comportamentos diferentes frente às formulações, evidenciado pelas diferenças nos valores D apresentados.
- O teste de desafio e o cálculo do valor D se mostraram métodos eficientes para a avaliação da propriedade conservante das formulações.
- As formulações F₁, F_{1v}, F₄ e F_{4v} não ocasionaram irritação dérmica primária de acordo com a escala de Draize.
- As análises histológicas evidenciaram que as formulações estudadas não são irritantes para a pele e que a formulação F_{1v} ocasionou aumento significativo do número de fibroblastos na derme, o que possivelmente resulta em aumento na produção de colágeno.
- Os estudos de eficácia na pele humana evidenciaram que as formulações acrescidas de PR proporcionaram redução nas rugas periorbiculares das voluntárias, sugerindo a sua eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGMON, N. The Grotthuss mechanism. **Chem. Phys. Let.**, v.244, p.456-462, 1995.

AL-ADHAM, I.S.I; KHALIL, E.; AL-HMOUD, N.D; KIERANS, M.; COLLIER, P.J. Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. **J. Appl. Microbiol.**, v.89, p.32-39, 2000.

AL-BAWAB, A.; FRIBERG, S.E. Phase behavior of the α -hydroxyoctanoic acid/Laureth 4/with oil/water system and preliminary evaluation of the phase changes during evaporation of its emulsion. **J. Cosmet. Sci.**, v.53, n.5-6, p.151-164, 2002.

AKAZAKI, S.; IMOKAWA, G. Mechanical methods for evaluating skin surface architecture in relation to wrinkling. **J. Dermatol. Sci.**, v.27, suppl.1, p.S5-S10, 2001.

AKAZAKI, S.; NAKAGAWA, H.; KAZAMA, H.; OSANAI, O.; KAWAI, M.; TAKEMA, Y; IMOKAWA, G. Aged-related changes in skin wrinkles assessed by a novel three-dimensional morphometric analysis. **Br. J. Dermatol.**, v.147, n.4, p.689-695, 2002.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: interesse e aplicação na área cosmético-farmacêutica. **Cosmet. Toiletries**, v.15, n.3, p.96-100, 2003.

ALVAREZ-FIGUEROA, M.J.; BLANCO-MENDEZ, J. Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. **Int. J. Pharm.**, v.215, n.1-2, p.57-65, 2001.

ANDREWS, J.M. **Cirurgia plástica**. São Paulo: Atheneu, 1995. p.1-2.

ASHCROFT, G.S.; GREENWELL-WILD, T.; HORAN, M.A.; WAHL, S.M.; FERGUSON, M.W. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. **Am. J. Pathol.**, v.155, n.4, p.1137-46, 1999.

ASPRES, N; EGERTON, I.B.; LIM, A.C.; SHUMACK, S.P. Imaging the skin. **Austr. J. Dermatol.**, v.44, n.1, p.19-27, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação, referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.57-73.

AYANNIDES, C.A.; KTISTIS, G.G. Stability estimation of emulsions of isopropyl myristate in mixtures of water and glycerol. **J. Cosmet. Sci.**, v.53, n.3, p.165-173, 2002.

*As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

AYHAN, S.; BARAN, C.N.; YAVUZER, R.; LATIFOGLU, O.; CENETOGLU, S.; BARAN, N.K. Combined chemical peeling and dermabrasion for deep acne and posttraumatic scars as well as aging face. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.102, n.4, p.1238-1246, 1998.

AZULAY, M.M.; LACERDA, C.A.M.; PEREZ, M.A.; FILGUEIRA, A.L.; CUZZI, T. Vitamina C. **An. Bras. Dermatol.**, v.78, n.3, p.265-272, 2003.

AZZINI, R.G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. 1999. 169p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BAIRD, R.M.; BLOOMFIELD, S.F. **Microbial quality assurance in cosmetic, toiletries & non-sterile pharmaceuticals**. New York: Taylor & Francis, 1996. 258p.

BARATA, E.A.F. **A cosmetologia: princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 1995. p.62-65.

BAROLI, B.; LOPES-QUINTELA, M.A.; DELGADO-CHARRO, M.B.; FADDA, A.M.; BLANCO-MENDEZ, J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. **J. Control. Release**, v.69, n.1, p.209-218, 2000.

BATISTELA, M.A.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.2, p.59-62, 2007.

BEAUCAGE, G. Approximations leading to a unified exponential/power-law approach to small-angle scattering. **J. Appl. Crystallogr.**, v.28, n.6, p.717-728, 1995.

BECHTOLD, I.H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Rev. Bras. Ens. Fis.**, v.27, n.3, p.333-342, 2005.

BERNI, M.G.; LAWRENCE, C.J.; MACHIN, D. A review of the rheology of the lamellar phase in surfactant systems. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.98, n.2, p.217-243, 2002.

BERNSTEIN, E.F.; CHEN, Y.Q.; KOPP, J.B. Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.34, p.209-218, 1996.

BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharm. Technol.**, v.3, p.46-54, 1987.

BISCHOFF, J.E.; ARRUDA, E.M.; GROSH, K. Finite element modeling of human skin using an isotropic, nonlinear elastic constitutive model. **J. Biomech.**, v.33, n.6, p.645-652, 2000.

BOODTS, J.B. **Estabilidade química e física de formulações dermocosméticas contendo retinaldeído**. 2003. 123p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

BORTOLETO, R.K.; OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Tertiary structural changes of the alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus* on association with liposome membranes. **Arch. Biochem. Bioph.**, v.351, n.1, p.47-52, 1998.

BOU-CHACRA, N.A.; GOBI S.S.; OHARA, M.T.; PINTO, T.J.A. Antimicrobial activity of four different dental gel formulas on cariogenic bacteria evaluated using the linear regression method. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.41, n.3, p.323-331, 2005.

BRADLEY, C.R.; ALMIREZ, R.G.; CONNER, D.P.; RHYNE, P.R.; PECK, C.C. Noninvasive transdermal chemical collection. II. In vitro and in vivo skin permeability studies. **Skin Pharmacol.**, v.3, n.4, p.227-235, 1990.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries temáticas. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, DF, 2004. v.1. 52p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 jul. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, DF, 2003. 47p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 jul. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Câmara Técnica de Cosméticos. Parecer técnico nº 3, de 22 de março de 2002. **Utilização de retinóides em cosméticos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 out. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 27 set. 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 jul. 2006.

BRINKER, C.J.; SCHERER, G.W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. Los Angeles: Academic Press, 1990.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J.F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Release**, v.60, n.1, p.67-76, 1999.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; TRANCHANT, J.F.; POUGET, T.; COUARRAZE, G. Influence of lamellar liquid crystal structure on percutaneous diffusion of hydrophilic tracer from emulsions. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.49, n.1, p.1-11, 1998.

CADWALLADER, D.E. Stability testing – its role in pre-formulation and formulation of cosmetic products. **Cosmet. Toiletries**, v.104, n.11, p.87-102, 1989.

CARTURAN, G.F. **Guia ABC de microbiologia: controle microbiológico na indústria e produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. 2.ed. São Paulo: ABC, 1999. 78p.

CARVALHO, V.L.G., PACHIONE, V.M. Controle microbiológico em cosméticos. **Aerosol Cosmet.**, v. 36, p.10-12, 1989.

CHARRO, M.B.D. Sistemas dispersos heterogêneos. In: JATO, J.L.V. **Tecnologia Farmacéutica: Aspectos fundamentais de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas**. Madri: Editorial Sintesis S.A., 1997. v.1. p.207-316.

- CHEMBLINK. Online Informational Database of Chemicals from China. Tween 80. Disponível em: <<http://www.chemblink.com.br/products/9005-65-6C.htm>>. Acesso em: 10 set. 2007.
- CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; SALGADO, H.R.N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.3, p.113-118, 2007a.
- CHORILLI, M.; SCARPA, M.V.; LEONARDI, G.R.; FRANCO, Y.O. Toxicologia dos cosméticos. **Acta Farm. Bonaer.**, v.26, n.1, p.144-154, 2007b.
- CHORILLI, M.; SALGADO, H.R.N. CORRÊA, M.A. Utilização de conservantes antimicrobianos em cosméticos. **Bio Farma Rev. Téc. Cient. Farm., Bioq., Anal. Clín. e Toxicol.**, v.2, p.291-304, 2007c.
- CHORILLI, M.; UDO, M.S.; CAVALLINI, M.E.; LEONARDI, G.R. Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux GAI-45 TS. **Rev. Ciênc. Farm. Básica e Apl.**, v.27, n.3, p.237-246, 2006.
- CHORILLI, M.; RIBEIRO, M.C.A.P.; POLACOW, M.L.O.; PIRES-DE-CAMPOS, M.S.M.; LEONARDI, G.R. Efeito de bases dermocosméticas na hidratação da pele. **Cosmet. Toiletries**, v.15, n.1, p.56-58, 2003.
- CLARIANT. Division Functional Chemicals. 1999. Disponível em: <<http://www.valdezlink.com/inipol/media/Hostaphat%20KL%20340%20D.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2006.
- COMELLES, F.; MEGIAS, V.; SÁNCHEZ, J.; PARRA, J.L.; COLL, J.; BALAGUER, F.; PELEJERO, C. Applications of ternary systems in specific cosmetic formulations. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.11, n.1, p.5-19, 1989.
- CONNOR, M.J.; SMIT, M.H. Terminal-group oxidation of retinol by mouse epidermis – inhibition *in vitro* and *in vivo*. **Biochem. J.**, v.244, n.2, p.489-492, 1987.
- CONSTÂNCIO, K.F.S. Contaminação microbiológica de produtos cosméticos. **Rev. Racine**, v.11, p.13-14, 1993.
- CORBETT, R.J. Preservation of cosmetics and toiletries: microbiological overview. **Parfüm. Kosmet.**, v.73, n.1, p.22-27, 1992.
- COUNTS, D.F.; SKREKO, F.F.; McBEE, J.; WICH, A.G. The effect of retinyl palmitate on skin composition and morphometry. **J. Soc. Cosm. Chem.**, v.39, n.4, p.235-40, 1988.
- CUNHA JUNIOR, A.S.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.66, n.3, p.385-391, 2003.
- DAHMS, G. Properties of O/W emulsions with anisotropic lamellar phases. **Cosmet. Toiletries**, v.101, n.11, p.113-115, 1986.

DASTOOR, S.F.; MISCH, C.E.; WANG, H.L. Botulinum toxin (Botox) to enhance facial macroesthetics: a literature review. **J. Oral Implantol.**, v.33, n3, p.164-171, 2007.

DAVIDSON, M.W.; ABRAMOWITZ, D. Polarized Light Microscopy. Olympus America Inc. and The Florida State University. Disponível em: <<http://microscope.fsu.edu/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html>>. 2003. Acesso em: 14 jul. 2006.

DI MAMBRO, V.M. **Desenvolvimento de formulações com superóxido dismutase: avaliação da estabilidade física das formulações e da atividade enzimática.** 2001. 138p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

DONOLATO, C.A.; GOMES, A.L.; DIAS, T.C.S. Silicones em soluções inovadoras para os cuidados com a pele. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 15, 2001, São Paulo – SP. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2001. p.1-9.

DREHER, F.; WALDE, P.; WALTHER, E.W. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. **J. Control. Release**, v.45, n.17, p.131-140, 1997.

DUARTE, E.L. **Estudo de fases termotrópicas por microscopia óptica, medidas de densidade, entálpicas e espalhamento de raios X.** 2000. 100p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

DUELL, E.A.; DERGUINI, F.; KANG, S.; ELDER, J.T.; VOORHEES, J.J. Extraction of human epidermis treated with retinol yield retro-retinoids in addition to free retinol and retinyl esters. **Soc. Invest. Dermatol.**, v.107, n.2, p.178-82, 1996.

DZUBOW, L. Rugas. In: COLEMAN, W.P.; HANKE, C.W.; ALT, T.H.; ASKEN, S. **Cirurgia cosmética: princípios e técnicas.** 2.ed. Rio de Janeiro, Revinter, 2000. p.7-17.

ELLIS, C.N.; WEISS, J.S.; HAMILTON, T.A.; HEADINGTON, J.T.; ZELICKSON, A.S.; VOORHEES, J.J. Sustained improvement with prolonged topical tretinoin (retinoic acid) for photoaged skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.23, 4pt1, p.629-37, 1990.

FARAGE, M.A.; MILLER, K.W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H.I. Structural characteristics of the aging skin: a review. **Cutan. Ocul. Toxicol.**, v.26, n.4, p.343-57, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FAZIO, M. J.; ZITELLI, J.A.; GOSLEN, J.B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN, W.P.; HANK, C.W.; ASKEN, S. **Cirurgia cosmética: princípios e técnicas.** 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

- FERRARI, C.; SILVEIRA, F.R.X.; BELTRAMI-JUNIOR, L.M. **Uso de cristais líquidos em cosméticos**. 2004. 94p. Monografia (Especialização). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2004.
- FERRARI, M.; MONTEIRO, L.C.L.; NETZ, D.J.A.; ROCHA-FILHO, P.A. Identifying cosmetic forms and crystalline phases from ternary systems. **Cosmet. Toiletries**, v.118, n.8, p.61-70, 2003.
- FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba**. 1998. 147p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.
- FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.41, n.3, p.301-313, 2005.
- FOX, C. Rationale for the selection of emulsifying agents. **Cosmet. Toiletries**, v.101, n.11, p.25-44, 1986.
- FRAGA, D.F.T. Preservação de cosméticos. **Cosmet. Toiletries**, v.11, n.2, p.49-53, 1999.
- FRANZINI, C.M. **Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral**. 2006. 119p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2006.
- FRIBERG, S. Liquid crystalline phases in emulsions. **J. Colloid Interface Sci.**, v.32, n.2, p.49-53, 1971.
- FRIBERG, S.E. Microemulsions in relation to cosmetics and their preservation. In: KABARA, J.J. **Cosmetic and drug preservation, principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 1984.
- FU, X.; FENG, F.; HUANG, B. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for antimicrobial activity of glycerol monolaurate. **Int. J. Pharm.**, v.321, n.1-2, p.171-175, 2006.
- FU, P.P.; HOWARD, P.C.; CULP, S.J.; XIA, Q.; WEBB, P.J.; BLANKENSHIP, L.R.; WAMER, W.G.; BUCHER, J.R. Do topically applied skin creams containing retinyl palmitate affect the photocarcinogenicity of simulated solar light? **J. Food Drug Anal.**, v.10, n.4, p.262-268, 2002.
- GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **Int. J. Pharm.**, v.212, n.1, p.73-80, 2001.
- GAO, T.; TIEN, J.M.; CHOI, Y.H. Sunscreen formulas with multilayer lamellar structure **Cosmet. Toiletries**, v.118, n.10, p.41-52, 2003.
- GENNARO, A.R. **Remington; a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2208p.

- GLATTER, O. **Small-angle x-rays scattering**. London: Academic Press, 1982.
- GOMES, M.M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v.5, n.3, p.275-282, 2005.
- GOMES, A.L.; LANGER, C.M.; OLIVEIRA, E.C.; VAIOLETTO, L. Diferentes tipos de pele: diferentes necessidades cosméticas. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 12, 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1998. p.220-31.
- GRAESSLEY, W.W. **Physical properties of polymers**. Washington, DC: American Chemical Society, 1984.
- GROOT, A.C.; BRUYNZEEL, D.P.; BOS, J.D.; VAN DER MEEREN, L.M.; VAN JOOST, T.; JAGTMAN, B.A.; WEYLAND, J.W. The allergens in cosmetics. **Arch. Dermatol.**, v.124, n.10, p.1525-1529, 1988.
- GUIMARÃES, G.N.; POLACOW, M.L.O. Desenvolvimento de sistemas microemulsionados: estudo histopatológico de seu efeito na pele. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA, 14, 2006. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: UNIMEP, 2006.
- GUIRRO, R.R.J.; GUIRRO, E.C.O. **Fisioterapia dermato-funcional**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2002.
- GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v.2, p.147-157, 2007.
- HATZIS, J. The wrinkle and its measurement- a skin surface profilometric method. **Micron**, v.35, n.3, p.201-219, 2004.
- HEIN, M.; ARENA, S. **Fundamentos de química geral**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998. p.31-33.
- HOFFMANN, S; COLE, T; HARTUNG, T. Skin irritation: prevalence, variability and regulatory classification of existing on vivo data from industrial chemicals. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.41, n.3, p.159-166, 2005.
- HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K. **Handbook of applied surface and colloid chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p.299-332.
- IDSON, B. Vitamins and the skin. **Cosmet. Toiletries**, v.108, n.2, p.79-94, 1993.
- JONES, M.N.; SONG, Y.H.; KASZUBA, M.; REBOIRAS, M.D. The interaction of phospholipid liposomes with bacteria and their use in the delivery of bactericides. **J. Drug Target.**, v.5, n.1, p.25-34, 1997.

- KAMBAYASHI, H. ODAKE, Y. TAKADA, K. FUNASAKA, Y. ICHIHASHI, M. Involvement of changes in stratum corneum keratin in wrinkle formation by chronic ultraviolet irradiation in hairless mice. **Exp. Dermatol.**, v.12, n.2, p.22-27, 2003.
- KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2004.
- KITCHEN, S.; YOUNG, S. Reparo dos tecidos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10.ed. São Paulo: Manole, 1998. p.46-58.
- KLEIN, K. Liquid crystals and emulsions: a wonderful marriage. **Cosmet. Toiletries**, v.117, n.5, p.30-34, 2002.
- KLIGMAN, A.M.; ZHENG, P.; LAVKER, R.M. The anatomy and pathogenesis of wrinkles. **Br. J. Dermatol.**, v.113, n.1, p.37-42, 1985.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WASHINGTON, C.W. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Medsi, 2001. 1465p.
- KORHONEN, M.; LEHTONEN, J.; HELLEN, L.; HIRVONEN, J.; YLIRUUSI, J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. **Int. J. Pharm.**, v.247, n.1-2, p.103-114, 2002.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.54, suppl.1, p.S77-S98, 2002.
- KUNIEDA, H.; UMIZU, G.; YAMAGUCHI, Y. Mixing effect of polyoxyethylene-type nonionic surfactants on the liquid crystalline structures. **J. Colloid Interface Sci.**, v.218, n.1, p.88-96, 1999.
- LACHAPELLE, J.M. Toxicidade orgânica e geral. In: PRUNIÉRAS, M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2.ed. São Paulo: Andrei Editora, 1994. p.325-356.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.1. p.211-221.
- LAPIÈRE, C.M. The ageing dermis: the main cause for the appearance of 'old' skin. **Br. J. Dermatol.**, v.122, suppl.35, p.5-11, 1990.
- LATREILLE, B.; PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **J. Food Sci.**, v.55, n.6, p.1666-1668, 1990.
- LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.45, n.1, p.89-121, 2000.
- LECOMTE, A. **Application de la diffusion des rayon-x a l'étude de separation de phases amorphes et aux procedes sol-gel**. 1988. Tese (doutorado). L'Universite de Limoges, 1988.

LEHMANN, L.; KEIPERT, S.; GLOOR, M. Effects of microemulsion on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.52, n.2, p.129-136, 2001.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: MedFarma, 2004. p.105-112.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidades de formulações cosméticas. **Int. J. Pharm. Compound.**, v.3, n.4, 2001. p.154-156.

LEONARDI, G.R. **Avaliação da estabilidade e efeito no conteúdo aquoso do extrato córneo de formulações cosméticas contendo, ou não, vitaminas A ou E ou ceramidas**. 2000. 98p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000a.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Study of the moisturizing effect of the formulations containing or not vitamins A, E or ceramides on the skin human, by a non-invasive method. In: INTERNATIONAL COMSETIC EXPO, 2000, Miami. **Proceedings**. Miami, 2000b. p.38-41.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Influence of glycolic acid as a component of different dermocosmetic formulation on skin penetration by vitamin A. **J. Cosmet. Sci.**, v.49, n.1, p.23-32, 1998.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Vitamina A e seus derivados. **Rev. Cosmiatr. Med. Est.**, v.5, n.4, p.24-7, 1997.

LEONARDI, G.R. **Influência do ácido glicólico na penetração cutânea da vitamina A palmitato e na estabilidade física de formulações dermocosméticas**. 1997. 114p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

LIBARDI, F.S. Lactato de amônio. **Cosmet. Toiletries**, v.11, n.4, p.50-53, 1999.

LORENZETTI, O.J. A preservative evaluation program for dermatological and cosmetic preparations. In: KABARA, J.J. **Cosmetic and drug preservation**; principles and practice. New York: Marcel Dekker, 1984. p.441-463.

LOCHHEAD, R.Y. Emulsions. **Cosmet. Toiletries**, v.109, n.5, p.93-103, 1994.

MAIA CAMPOS, G. **G.M.C. Software versão 7.0**. Ribeirão Preto: Departamento de Estomatologia. Faculdade de Odontologia, USP, 1998.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; RICCI, G.; SILVA, G.M.; SANTOS, E.B.; LOPES, R.A.; SEMPRINI, M. Histopathological, morphometric and stereologic studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid. **J. Cosmet. Sci.**, v.50, p.159-170, 1999.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. **Determinação de vitaminas lipossolúveis, D3, E e A em cremes cosméticos por cromatografia líquida de alta eficiência.** 1990. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1990.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Manual de quantificação morfológica:** morfometria, alometria e astereologia. 2.ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994. p.8-13.

MARGELIN, D.; FOURTANIER, A.; THEVENIN, T.; MEDAISKO, C.; BRETON, M.; PICARD, J. Alterations of proteoglycans in ultraviolet-irradiated skin. **Photochem. Photobiol.**, v.58, n.2, p.211-218, 1993.

MAKENI CHEMICALS. Vitamina A palmitato 1.0. Disponível em: <www.makeni.com.br>. Acesso em: 25 out. 2007.

MARONA, H.R.N. Princípios éticos da experimentação animal. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.24, n.2, p.97-106, 2003.

MASSARO, R.C.; ZABAGLI, M.S.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P.; DEL LAMA, D.S.; ROCHA-FILHO, P.A. O/W dispersions development containing liquid crystals. **Boll. Chim. Farm.**, v.142, n.7, p.264-270, 2003.

MASSON, D.S.; MORAIS, G.G.; MORAIS, J.M.; ANDRADE, F.F.; SANTOS, O.D.H.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA-FILHO, P.A. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of O/W emulsions. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v.26, n.4, p.463-468, 2005.

MAUREL, E.; BOUISSOU, H.; PIERAGGI, M.T.; JULIAN, M. Age dependent biochemical changes in dermal connective tissue. Relationship to histological and ultrastructural observations. **Connect. Tissue Res.**, v.8, n.1, p.33-39, 1980.

McCARTHY, T.J. Formulated factors affecting the activity of preservatives. In: KABARA, J.J. **Cosmetic and drug preservation;** principles and practice. New York: Marcel Dekker, 1984. p.359-387.

MEZZALIRA, G. **Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de técnicas de espalhamento de luz e de raios-X a baixo ângulo.** 2005. 124p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MEZZENGA, R.; MEYER, C.; SERVAIS, C.; ROSMOCANU, A.I.; SAGALOWICZ, L.; HAYWARD, R.C. Shear rheology of lyotropic liquid crystals: a case study. **Langmuir**, v.21, n.8, p.3322-3333, 2005.

MORAGAS, A.; GARCIA-BONAFE, M.; SANS, M.; TORAN, N.; HUGUET, P.; MARTIN-PLATA, C. Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.20, n.6, p.493-499, 1998.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.58, n.2, p.343-356, 2004.

NARDIN, P.; GUTERRES, S.S. Alfa-hidroxiácidos: aplicações cosméticas e dermatológicas. **Cad. Farm.**, v.15, n.1, p.7-14, 1999.

NÉMETH, Z.S.; HALÁSZ, L.; PÁLINKÁS, J.; BÓTA, A.; HORÁNYI, T. Rheological behavior of a lamellar liquid crystalline surfactant-water system. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.145, p.107-119, 1998.

NICOLETTI, M.A., ORSINE, E.M.A., BOU CHACRA, N.A. Sistemas conservantes em formulações cosméticas. **Cosmet. Toiletries**, v.9, n.3, p.28-33, 1997.

ORIÁ, R.B.; SANTANA, E.N.; FERNANDES, M.R.; FERREIRA, F.V.A.; BRITO G.A. C. 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.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; Microemulsões I: Fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v.13, n.9-10, p. 73-79, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CERA, L.F.R. Microemulsões II: Aplicações de liberação de fármacos. **Infarma**, v.14, n.7-8, p.76-80, 2002.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORRÊA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsão: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova**, v.27, n.1, p.131-138, 2004.

OLIVEIRA, R.V.M. **Avaliação do sistema conservante em xampu anticaspa com cetoconazol a 2%**. 1999. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

OPERATIONS manual for the Carri-Med CSL range of rheometers using version 5.0 software, Carri-Med, England, 1993.

ORTH, D.S.; STEINBERG, D.C. Fator segurança no teste de eficácia de preservante. **Cosmet. Toiletries**, v.15, n.3, p.76-81, 2003.

ORTH, D.S. Avaliação do risco microbiológico de matérias-primas. **Cosmet. Toiletries**, v.9, n.3, p.34-35, 1997.

ORTH, D.S. Evaluation of preservatives in cosmetic products. In: KABARA, J.J. **Cosmetic and drug preservation; principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.403-421.

ORTH, S.S. Linear regression method for rapide determination of cosmetic preservative efficacy. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.30, p.321-332, 1979.

PAOLINO, D.; VENTURA, C.A.; NISTICÒ S.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and *in vivo* human skin tolerability. **Int. J. Pharm.**, v.244, n.1-2, p.21-31, 2002.

PARK, B.D.; KIM, Y.; LEE, M.; YOUM, J.K.; JEONG, S.; CHOI, E.H.; LEE, S.H. Properties of a pseudoceramide multilamellar emulsion *in vitro* and *in vivo*. **Cosmet. Toiletries**, v.116, n.6, p.65-76, 2001.

PARK, K; KIM, C. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. **Int. J. Pharm.**, v.181, n.2, p.173-179, 1999.

PARKER, M.S. Design and assessment of preservative systems for cosmetics. In: KABARA, J.J. **Cosmetic and drug preservation; principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.389-401.

PELTOLA, S.; SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; KIESVAARA, J.; SUHONEN, T.M.; URTTI, A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. **Int. J. Pharm.**, v.254, n.2, p.99-107, 2003.

PIÉRARD, G.E.; UHODA, I.; PIÉRARD, C.F. From skin microrelief to wrinkle: an area ripe for investigation. **J. Comest. Dermatol.**, v.2, n.1, p.21-28, 2003.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

POLACOW, M.L.O.; PIRES-DE-CAMPOS, M.S.M.; LEONARDI, G.R.; CARVALHO, L.S.; RIBEIRO, M.C.A.P.; MONTEBELO, M.I.L. Eleito do ultra-som na permeação cutânea do tiratricol: análise histológica. **Rev. Bras. Fisioter.**, v.8, n.1, p.53-60, 2004.

PRISTA, L.N; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3.ed. Lisboa: Fund. Cal. Gulbenkian, 1990. v.2, p.422.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R.; LOBO, J.S. **Tecnologia farmacêutica**. 6.ed. Lisboa: Fund. Cal. Gulbenkian, 2002. v.1, p.623-633.

PROKSCH, E.; NISSEN, H.P.; BREMGARTNER, M.; URQUHART, C. Bathing in a magnesium-rich Dead Sea salt solution improves skin barrier function, enhances skin hydration and reduces inflammation in atopic dry skin. **Int. J. Dermatol.**, v.44, n.2, p.151-157, 2005.

PRODUCT INFORMATION. Dow Corning – DC 5329[®]. 2002.

PRODUCT INFORMATION. Dow Corning – DC 193[®]. 2004.

RAMAN, I.A.; SUHAIMI, H.; TIDDY, G.J.T. Liquid crystals and microemulsions formed by mixtures of a non-ionic surfactant with palm oil and its derivatives. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.106, p.109-127, 2003.

RESENDE, K.X. **Obtenção e caracterização de sistemas microemulsionados não-iônicos e estudo da atividade antibiótica *in vitro* de eritromicina base nesse sistema.** 2004. 103p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

REYNOLDS, P.A.; HENDERSON, M.J.; WHITE, J.W. A small angle neutron scattering study of the interface between solids and oil-continuous emulsions and oil-based microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.232, n.1, p.55-65, 2004.

RIEGER, M.M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmet. Toiletries**, v.8, n.5, p.47-53, 1996.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia.** São Paulo: Premier, 1997, p.103-104.

ROMANOWSKI, P; SCHUELLER, R. Fundamentals of cosmetic product safety testing: a discussion of commonly employed test methods. **Cosmet. Toiletries**, v.111, n.10, p.79-86, 1996.

ROUX, D.; CYRUS, R.; NALLET, F. Lyotropic lamellar L α phases. In: GELBART, W.M.; BEN-SHAUL, A.; ROUX, D. **Micelles, membranes, microemulsions and monolayers.** Berlin: Springer, 1994. p.303-338.

SAMPAIO, S.; RIVITTI, E. **Dermatologia.** 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p.3-17.

SANCTIS, D.S. Emulsões para uso externo. **Rev. Racine**, v.53, p.53-63, 1999.

SANTORO, M.I.R.M.; SILVA, F.C.F.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Stability analysis of emulsions containing UV and IR filters. **Cosmet. Toiletries**, v.115, n.12, p.55-60, 2000.

SANTOS, O.D.H. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética *in vivo* de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristal líquido.** 2006. 133p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SANTOS, O.D.H.; MIOTTO, J.V.; MORAIS, J.M.; ROCHA-FILHO, P.A.; OLIVEIRA, W.P. Attainment of emulsions with liquid crystals from marigold oil using the required HLB method. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v.26, p.243-249, 2005.

SCHMALFU, U.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. **J. Control. Release**, v.46, p.279-285, 1997.

SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. 3rd.ed. Karlsruhe: ThermoHaake, 2002. 291p.

SEARS, F.W.; ZEMANSKY, M.W. **Física**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1971.

SHAPIRO, S.S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. **Nutrition**, v.17, n.10, p.839-844, 2001.

SILAEX. Disponível em: <<http://www.silaex.com.br/silicone.htm>>. Acesso em: 10 set. 2007.
SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. **Cosmet. Toiletries**, v.8, n.5, p.37-46, 1996.

SILVA, G.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in skin care formulation. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.22, n.3, p.169-179, 2000.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **J. Control. Release**, v.95, n.2, p.173-183, 2004.

SOTIRO, K.R. **Estudo da estabilidade química, física e permeação cutânea da eritromicina veiculada em sistemas líquido-cristalinos para tratamento da *Acne vulgaris***. 2007. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2007.

SPICLIN, P.; HOMAR, M.; ZUPANCIC-VALANT, A.; GASPERLIN, M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **Int. J. Pharm.**, v.256, n.1-2, p.65-73, 2003.

STEINER, D. A pele e o climatério. **RBM Ginecol. Obstetr.**, v.12, n.2, 2000.

TADINI, K.A. **Desenvolvimento e avaliação de formulações dermocosméticas contendo Dimetilaminoetanol (DMAE)**. 2005. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

TAKACS, A.P.; VALDRIGHI, V.; ASSENCIO-FERREIRA, V.J. Fonoaudiologia e estética: unidas a favor da beleza facial. **Rev. CEFAC**, v.4, p.111-116, 2002.

THEVENIN, M.A.; GROSSIORD, J.L.; POELMAN, M.C. Sucrose esters/cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: assessment of bicontinuous structures. **Int. J. Pharm.**, v.137, p.177-186, 1996.

TOKUMOTO, M.S. **Evolução estrutural durante a transição sol gel em suspensões coloidais aquosas de SnO₂: abordagem reológica**. 1996. 95p. Dissertação (Mestrado).

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 1996.

TONZAR, A.C. Medições de viscosidade e reologia em cosméticos. **Cosmet. Toiletries**, v.18, n.3, p.56-58, 2006.

TORNIER, C; ROSDY, M; MAIBACH, H. In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: Reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols. **Toxicol. In Vitro**, v.20, n.4, p.401-416, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 718p.

TRELLES, M.A.; RIGAU, J.; MELLOR, T.K.; GARCIA, L. A clinical and histological comparison of flashscanning versus pulsed technology in carbon dioxide laser facial skin resurfacing. **Dermatol. Surg.**, v.24, n.1, p.43-49, 1998.

TSUJI, T.; HAMADA, T. Age-related changes in human dermal elastic fibres. **Br. J. Dermatol.**, v.105, n.1, p.57-63, 1981.

TSUKAHARA, K.; MORIWAKI, S.; HOTTA, M.; FUJIMURA, T.; KITAHARA, T. A study of diurnal variation in wrinkles on the human face. **Arch. Dermatol. Res.**, v.296, p.169-174, 2004.

TSUNODA, T.; TAKABAYASHI, K. Stability of all-trans-retinol in cream. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.46, n.4, p.191-198, 1995.

TYLE, P. Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH Publ., 1989. p.125-162.

URBAN, M.C.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. 136p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

USP XXX. The United States Pharmacopoeia: USP 30; The National Formulary; NF 22. By authority of the United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, 2007.

USP XXVII. The United States Pharmacopoeia: USP 27; The National Formulary; NF 22. By authority of the United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, 2004.

VALENTA, C.; SCHULTZ, K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. **J. Control. Release**, v.95, n.2, p.257-265, 2004.

VELASCO, M.V.R.; STEINER, D.; RIBEIRO, M.E.; OKUBO, F.R.; BEDIN, V. Rejuvenescimento da pele por peeling químico: enfoque no peeling de fenol. **An. Bras. Dermatol.**, v.79, n.1, p.91-99, 2004.

VIGLIOGLIA, P.A.; RUBIN, J. **Cosmiatria II**; ciencia que comprende la atención cosmética de la piel sana o enferma. Buenos Aires: AP Americana, 1991. 406p.

VUCINIĆ-MILANKOVIĆ, N.; SAVIĆ, S.; VULETA, G.; VUCINIĆ, S. The physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation of natural surfactants-based emulsions as vehicles for diclofenac diethylamine. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.33, n.3, p.221-234, 2007.

YANG, J.H.; KIM, Y.I.; KIM, K.M. Preparation and evaluation of aceclofenac microemulsion for transdermal delivery system. **Arch. Pharm. Res.**, v.4, p.534-40, 2002.

WANG, H.; ZHANG, G.; DU, Z.; LI, Q.; WANG, W.; LIU, D.; ZHANG, X. Effect of temperature on dynamic rheological behavior of discontinuous cubic liquid crystal. **J. Colloid Interface Sci.**, v.300, n.1, p.348-53, 2006.

WARR, G.G. Shear and elongational rheology of ternary microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.**, v.103, p. 273-279, 1995.

WRIGHT, C.D. Antimicrobial oil-in-water emulsions. **US Patent 5.547.677**, 1996.

WULF, H.C.; SANDBY-MOLLER, J. KOBAYASI, T.; GNIADECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v.35, n.3, p.185-191, 2004.

VIII. ANEXOS

Anexo I – Parecer nº 10/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

Anexo II – Protocolo nº 73/05 – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba.