

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

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
DESPIGMENTANTE *IN VITRO* DE EMULSÕES MÚLTIPLAS A/O/A CONTENDO
DIPALMITATO KÓJICO**

DIANA GLEIDE MARCUSSI

ARARAQUARA – SP

2012

DIANA GLEIDE MARCUSSI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
DESPIGMENTANTE *IN VITRO* DE EMULSÕES MÚLTIPLAS A/O/A CONTENDO
DIPALMITATO KÓJICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Co-orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA

2012

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade da vida e sempre colocar ótimas pessoas no meu caminho.

À minha família pelo apoio, dedicação, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Correa pelos ensinamentos, incentivo, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela paciência, dedicação, confiança, compreensão, e, acima de tudo, pela amizade. Agradeço pela oportunidade de mais este trabalho.

Aos amigos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Giovana Calixto, pela grande ajuda nas análises do reômetro, texturômetro e nos programas gráficos; Liliane, que me ensinou a calcular o tamanho das gotículas; Fabíola com o auxílio do uso do microscópio óptico, Fernanda, na análise do potencial zeta e Jovan com os ensaios de bioadesão

Ao José Ricardo e Paulo Renato com os ensinamentos e sugestões da realização do teste do radical DPPH.

Aos técnicos Ilza, Margarete, Fátima e Mateus, que me auxiliaram nas tarefas do dia-a-dia dos laboratórios.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.

As facilidades nos impedem de caminhar e mesmo as críticas nos auxiliam muito."

Chico Xavier

Sumário

I. INTRODUÇÃO	8
II. OBJETIVOS	12
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
PELE	13
<i>Epiderme</i>	14
Melanina.....	14
Eumelanina.....	14
Feomelanina	15
Melanócitos	15
Melanogênese.....	15
ALTERAÇÕES NA PELE	16
<i>Fatores que afetam a pigmentação</i>	16
COSMÉTICOS.....	16
<i>Definição de cosméticos</i>	16
EMULSÕES	17
EMULSÃO MÚLTIPLA.....	18
DIPALMITATO KÓJICO	19
ANTIOXIDANTES	20
<i>Avaliação do potencial antioxidante in vitro</i>	21
DESPIGMENTANTES	21
<i>Avaliação da atividade despigmentante in vitro</i>	22
IV. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	23
V. MATERIAIS & MÉTODOS	24
5.1 MATERIAIS.....	24
5.2. MÉTODOS	25
5.2.1 <i>Desenvolvimento das formulações</i>	25
5.2.2 <i>Caracterização físico-química das emulsões múltiplas A/O/A</i>	25
5.2.2.1 Análise macroscópica	25
5.2.2.2. Análise microscópica	25
5.2.2.3. Quantificação e distribuição dos glóbulos	26
5.2.2.3.1. Utilizando-se microscópio óptico	26
5.2.2.3.2. Utilizando-se espalhamento dinâmico de luz	26
5.2.2.4. Determinação do pH	26
5.2.2.5. Determinação da condutividade elétrica	26
5.2.2.6. Determinação do potencial zeta	26
5.2.2.7. Determinação do comportamento reológico	27
5.2.2.8. Teste de Bioadesão.....	27
5.2.3 <i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	28
5.2.4. <i>Ação despigmentante in vitro</i>	28
5.2.4.1. Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% da solução de dipalmitato kójico usando tirosinase com concentrações de 480 U/mL.....	29

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES	30
6.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS A/O/A	31
6.2.1 <i>Análise macroscópica</i>	31
6.2.2. <i>Análise microscópica</i>	31
6.2.3. <i>Quantificação e distribuição dos glóbulos</i>	32
6.2.3.1. Utilizando-se microscópio óptico	32
6.2.3.2. Utilizando-se espalhamento dinâmico de luz.....	33
6.2.4. <i>Determinação do pH</i>	34
6.2.5. <i>Determinação da condutividade elétrica</i>	35
6.2.6. <i>Determinação do potencial zeta</i>	36
6.2.7. <i>Determinação do comportamento reológico</i>	37
6.2.8. <i>Teste de Bioadesão in vitro</i>	39
6.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	41
6.5. AÇÃO DESPIGMENTANTE <i>IN VITRO</i>	42
6.5.1 <i>Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% da solução de dipalmitato kójico usando tirosinase com concentrações de 480 U/mL</i>	44
VII. CONCLUSÃO	44
VIII. BIBLIOGRAFIA BÁSICA	46

RESUMO

Atualmente, tem-se observado um aumento da preocupação de homens e mulheres com a aparência do rosto e corpo, impulsionado, principalmente, pelos padrões estéticos estabelecidos pela mídia. Para tanto, as indústrias farmacêuticas e cosméticas têm realizado grande número de pesquisas objetivando o desenvolvimento de formulações que amenizam o envelhecimento e alguns distúrbios cutâneos, como hiperpigmentações. Uma das patologias de pele mais frequentes é o melasma, uma manifestação de hiperpigmentação, causada pela hipermelanogênese simétrica e progressiva, ocasionada, geralmente, por irregularidades hormonais, exposição à luz solar e fatores genéticos. Além do protetor solar, no tratamento é indicado o uso de substâncias despigmentantes, dentre elas o dipalmitato kójico (DK), que é clivado em ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroxi-metil-4H-piran-4-ona) por uma esterase após absorção pelas células da pele. O ácido kójico (AK) inibe a ação da tirosinase como quelante de íons e promove a diminuição da eumelanina e seu monômero precursor. Para promover uma liberação controlada e melhorar a estabilidade do sistema, o DK pode ser incorporado em emulsões múltiplas, isto é, sistemas complexos compostos por duas emulsificações, onde os dois tipos de emulsões (A/O e O/A ou O/A e A/O) existem simultaneamente, constituindo emulsões do tipo A/O/A ou O/A/O. Este trabalho teve como objetivos incorporar o DK em emulsões múltiplas (EM) A/O/A, caracterizar físico-quimicamente os sistemas obtidos e avaliar as ações antioxidante e despigmentante *in vitro* das formulações desenvolvidas. A caracterização físico-química foi realizada por meio de análises microscópicas, quantificação e distribuição das gotículas, determinação do valor de pH, condutividade elétrica, potencial zeta, comportamento reológico e teste de bioadesão das formulações. O tamanho das gotículas, de acordo com o uso do microscópio óptico e do espalhamento dinâmico de luz, é de aproximadamente 1µm. Os valores de pH, condutividade elétrica e bioadesão não foram alterados com a incorporação do DK. Na análise reológica, as formulações com e sem DK apresentaram um comportamento reopético ou anti-tixotrópico. A atividade antioxidante foi determinada com base na ação seqüestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e a ação despigmentante *in vitro* foi avaliada quanto à inibição da tirosinase, pelo método enzimático, com leitura espectrofotométrica, porém não foi possível estimar os valores de tais atividades, indicando apenas que o ácido kójico é mais potente que o dipalmitato kójico.

Palavras-chave: emulsões múltiplas, dipalmitato kójico, atividade antioxidante *in vitro*, ação despigmentante *in vitro*.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND DEPIGMENTING ACTIVITIES *IN VITRO* OF W/O/W EMULSION CONTAINING KOJIC DIPALMITATE

ABSTRACT

Currently, there has been a growing concern for men and women with the appearance of the face and body, driven primarily by aesthetic standards set by the media. For this, the pharmaceutical and cosmetic industries have conducted numerous research projects aiming at the development of formulations that mitigate the aging and some skin disorders such as hiperchromies. One of the most frequent pathologies of skin is melasma, a manifestation of hyperpigmentation caused by hipermelanogenesis symmetrical and progressive, caused usually by hormonal irregularities, exposure to sunlight and genetic factors. In addition to sunscreen, the treatment is indicated the use of depigmenting substances, among them the kojic dipalmitate (DK), which is cleaved into kojic acid (5-hydroxy-2-hydroxy-methyl-4H-piran-4-one) by esterase after absorption by the skin cells. The kojic acid inhibits the action of tyrosinase as a chelator of ions and promotes the reduction of eumelanin and its precursor monomer. To promote a controlled release and improve the stability of the system, the DK can be incorporated into multiple emulsions, that is, complex systems composed of two emulsifications, where the two types of emulsions (W/O and O/W or O/W and W/O) exist simultaneously, forming emulsions of type W/O/W or O/W/O. This work aimed to incorporate the DK in emulsion W/O/W, physical-chemical systems obtained and to evaluate the antioxidant and depigmenting action *in vitro* of the developed formulations. The physico-chemical characterization was performed by microscopic analysis, quantification and size distribution, determination of pH, conductivity, zeta potential and bioadhesive test of the formulations. The droplet size in accordance with the use of light microscopy and dynamic light scattering is approximately 1µm. The pH, electrical conductivity and bioadhesion have not changed with the addition of DK. In the rheological analysis, formulations with and without DK behaved as rheopectic or anti-thixotropic. The antioxidant activity was determined based on the action of capturing the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and depigmenting action *in vitro* was evaluated for the inhibition of tyrosinase, the enzymatic method with spectrophotometric reading, however it was not possible to estimate the values of such activities, indicating only that kojic acid is more potent than kojic dipalmitate.

Keywords: multiple emulsion; kojic dipalmitate; *in vitro* antioxidant activity; *in vitro* depigmenting action.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Componentes e concentração das matérias-primas empregadas na preparação das emulsões	30
Tabela 2: Componentes e concentração das matérias-primas empregadas na preparação das emulsões múltiplas A/O/A com DK.	31
Tabela 3: Valores máximo, mínimo e médio dos raios dos glóbulos da EM em μm .	32
Tabela 4: Valores de condutividade elétrica das formulações com e sem DK.	35
Tabela 5: Bioadesão da EM sem e com DK.	39
Tabela 6: Porcentagem de inibição da tirosinase pelo Ácido kójico em diferentes concentrações.	43
Tabela 7: IC_{50} do ácido kójico nos tempos de 60, 120 e 180 min.	43
Tabela 8: Porcentagem de inibição do DK e do DK incorporado na EM.	44

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular do Ácido Kójico.	11
Figura 2: Estrutura molecular do Dipalmitato Kójico.	11
Figura 3: Produção de eumelanina a partir de tirosina com ação da tirosinase (ROCHA & MOREIRA, 2007).	11
Figura 4: Estrutura esquemática da pele (OBAGI, 2004).	13
Figura 5: Óleo mineral em emulsão aquosa (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).	17
Figura 6: Morfologia dos glóbulos múltiplos, segundo Florence e Whitehill, 1982.	18
Figura 7: Reação química da redução do radical DPPH pela substância antioxidante.	21
Figura 8: Microscopia da emulsão múltipla sem DK em aumento de 100 x.	31
Figura 9: Distribuição do tamanho dos glóbulos da EM analisados por microscópio óptico.	32
Figura 10: Distribuição do tamanho dos glóbulos múltiplos por espalhamento dinâmico de luz realizado em triplicata.	33
Figura 11: Distribuição do potencial zeta da EM.	36
Figura 12: Perfil reológico da EM sem DK.	37
Figura 13: Perfil reológico da EM com DK.	38
Figura 14: Comparativo entre os perfis reológicos das EMs sem e com DK.	38
Figura 15: Atividade antioxidante do dipalmitato kójico.	41
Figura 16: Atividade antioxidante do ácido kójico.	41
Figura 17: Porcentagem inibição da tirosinase pelo ácido kójico em diferentes concentrações.	43

I. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento altera a estrutura e a função dos órgãos. No caso da pele, que é um órgão externo, também ocasiona modificação do seu aspecto. É muito importante estudar estas alterações na pele que ocorrem com o envelhecimento, principalmente quando ocorrem precocemente, não somente porque as mudanças no aspecto exterior revelam, freqüentemente, as disfunções que ocorrem, mas porque a aparência traz conseqüências psíquicas sobre o comportamento da pessoa, tanto diante de si mesma como diante das outras (RIEGER, 1996; LÉVÈQUE, 1997).

Sendo assim, o estudo do rejuvenescimento cutâneo vem merecendo mais esforços no sentido de reverter o processo natural de envelhecimento da pele. Existe, inclusive, um grande esforço empreendido por diversas áreas como geriatria, cosmiaatria, fisioterapia e cirurgia plástica no sentido de compreender e elucidar o processo natural do envelhecimento (ARAÚJO et al., 1995).

Contrações musculares, estresse, doenças, trauma na pele, sol, variação acentuada de peso são fatores que acentuam o processo de envelhecimento (SAUERBRONN et al., 1998).

Os sinais clínicos do envelhecimento cutâneo, numerosos e variados, vêm sendo estudados por métodos não invasivos publicados na literatura (BLICHMANN & SERUP, 1988; WATANABE et al., 1991; LÉVÈQUE, 1997; PINTO et al., 1997; RODRIGUES et al., 1997). Além disso, os adventos de vários instrumentos adequados e precisos têm permitido avaliar o estado de hidratação do estrato córneo *in vivo*, proporcionando dessa forma, grandes avanços no estudo do envelhecimento cutâneo (TAGAMI et al., 1980).

São utilizados hoje inúmeros princípios ativos nas formulações com o objetivo de obter rejuvenescimento da face, colo e dorso das mãos, os quais são importantes para manter a textura saudável da pele. Dentre as substâncias empregadas no mercado com o objetivo de combater o envelhecimento cutâneo tem-se os antioxidantes (ARAÚJO et al., 1995; PYTEL et al., 2005).

O processo de oxidação está relacionado à formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Segundo Harris (2006), dentre as fontes de radicais livres existentes, tem-se: fontes biológicas como flavinas (FADHs), hemoglobina, catecolaminas, tetra-hidropteridinas, nitro-compostos aromáticos e melanina; venenos como paraquat, adriamicina, antamicina; complexos de cobre e ferro, hidroquinonas, tióis, glutaciona; radiação ionizante e luz ultravioleta (UV).

A reatividade depende do radical em estudo e do substrato presente. De acordo com Harris (2006), a peroxidação lipídica pode ocasionar: comprometimento das membranas celulares e do manto hidrolipídico; desativação de sítios ativos de enzimas e receptores celulares, decorrente da oxidação de resíduos de aminoácidos; lesões em DNA, levando ao comprometimento da codificação para as sínteses protéicas (inviabilidade celular); lesões mutagênicas (tumores); surto oxidativo, degradação de catecolaminas, da cadeia respiratória da mitocôndria e do sistema P450 do retículo endoplasmático.

Sabe-se que o organismo humano possui eficientes mecanismos de defesa contra os radicais livres, caracterizados por um conjunto de enzimas e compostos antioxidantes que mantêm essas espécies altamente reativas em concentrações subtóxicas (CADENAS, 1989). Quando ocorre um desequilíbrio entre os processos de produção e destruição das espécies reativas de oxigênio induzido, por exemplo, pela ação da radiação UV, estabelece-se uma condição em que o ataque oxidativo das biomoléculas é favorecido, o que pode propiciar diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o envelhecimento cutâneo (HARMAN, 1992).

A relação causal observada entre estresse oxidativo, diversas patologias e processos degenerativos em humanos despertou o interesse para a exploração de moléculas com atividade antioxidante, capazes de interferir com a geração dos radicais livres de oxigênio ou com as reações por eles desencadeadas (PYTEL et al., 2005).

Para a determinação da atividade antioxidante dos diversos compostos, podem ser utilizadas metodologias tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Dentre os métodos *in vivo* empregados, tem-se a quantificação de peróxidos cutâneos, método não invasivo que avalia o estresse oxidativo celular e a porcentagem de captura de radicais livres cutâneos gerados a partir da indução por radiação UV (MORLIERE, 1992; LEBEL et al., 1992). Dentre os métodos *in vitro* disponíveis, destacam-se aqueles que conseguem medir a capacidade que as substâncias têm de seqüestrar radicais livres ou inibir a peroxidação lipídica, como a capacidade de redução do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) para o composto 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (ROGINSKY & LISSI, 2005).

A ação dos radicais livres sobre a pele pode acarretar em alterações pigmentares, conhecidas como discromias, as quais são utilizadas para designar alterações na cor da pele, que depende de cinco tipos de pigmentos, sobretudo da melanina. As discromias podem se manifestar principalmente nas formas de hipocromias ou hiperpigmentações (BENY, 2000; BENECH, 2002).

Hipocromias são alterações com ausência de pigmento e hiperpigmentações são alterações com excesso de pigmento em alguma região da pele, com destaque para as efélides, lentigos e melasmas, que podem ser originados ou agravados a partir da exposição solar (AZULAY et al., 2006).

As efélides são caracterizadas por pequenas máculas amarronzadas em áreas expostas ao sol. Tornam-se mais pigmentadas após exposição solar, em contraste com os lentigos, que se caracterizam por manchas hiperocrômicas pequenas, de limites bem nítidos (AZULAY et al., 2006).

O melasma caracteriza-se por um quadro constituído por manchas castanhas, de limites irregulares, localizadas em áreas de exposição solar. Na maioria das vezes, limita-se à face, porém pode surgir no colo e nos membros superiores. Pode surgir na gravidez (cloasma gravídico) ou com o uso de hormônios exógenos (pílulas anticoncepcionais e terapias de reposição). O tratamento baseia-se na fotoproteção e na utilização de agentes despigmentantes (CUCÉ & FESTA NETO, 1990).

As substâncias despigmentantes mais efetivas, como a hidroquinona, inibem a síntese da melanina, e um dos mecanismos envolvidos é a inibição da tirosinase, enzima que media a formação da melanina a partir da tirosina (ROBINS, 1991; LEE & CHOI, 1998).

A tirosinase é uma enzima multifuncional que contém cobre e é encontrada em tecidos animais, cogumelos e algumas plantas. É a enzima chave no primeiro estágio da via da melanogênese, catalisando a conversão da L-tirosina em L-Dopaquinona (KHANON et al., 2000).

São relatados na literatura para avaliação da atividade antioxidante tanto ensaios *in vivo*, como estudo em animais ou ensaios clínicos em seres humanos, quanto *in vitro*, como métodos de cultura celular, cultura de tecidos e enzimáticos. Os métodos enzimáticos são empregados para verificar a atividade inibitória de agentes despigmentantes sobre a atividade de enzimas envolvidas na melanogênese, principalmente sobre a tirosina e L-Dopa. Neste método, a tirosinase, em geral retirada de cogumelos, é adicionada ao substrato tirosina, em presença e ausência do agente despigmentante em estudo. A atividade inibitória é então avaliada pela medida da produção de intermediários da via melanogênica pela leitura espectrofotométrica (MASUDA et al., 1996).

Dentre as substâncias empregadas recentemente como despigmentantes, destaca-se a utilização do ácido kójico (Figura 1), produzido por fungos *Aspergillus oryzae*. No entanto, devido à sua propriedade lábil oxidativa, vem sendo empregado por meio de seu éster: dipalmitato kójico (Figura 2), o qual é hidrolisado pelas esterases presentes nas células da pele promovendo a liberação do ácido kójico *in situ* (BALAGUER et al., 2007).

O ácido kójico, por sua vez, inibe a ação da tirosinase, enzima que converte tirosina em eumelanina e seu monômero no melanócito (Figura 3), promovendo uma ação despigmentante da pele.

A concentração recomendada de dipalmitato kójico em uma formulação cosmética é de 0,2 a 2,0% em cremes e emulsões fluidas não iônicas, géis, géis-creme e loções aquosas. Os efeitos esperados surgirão após 2 a 4 semanas de uso contínuo, dependendo das características da pele (BALAGUER et al, 2007).

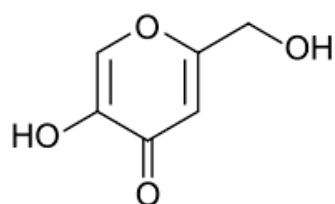


Figura 1: Estrutura molecular do ácido kójico

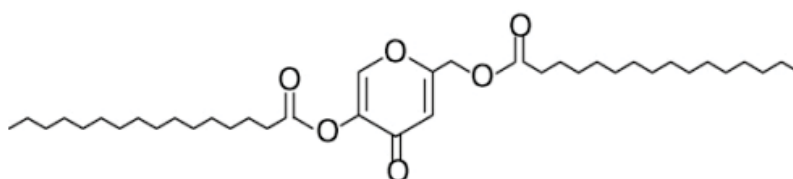


Figura 2: Estrutura molecular do dipalmitato kójico

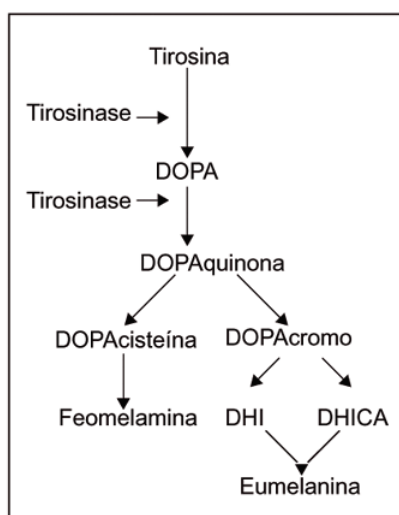


Figura 3: Produção de feomelanina e eumelanina a partir de tirosina com ação da tirosinase (ROCHA & MOREIRA, 2007).

Pode-se melhorar a eficácia das atividades antioxidante e despigmentante do dipalmitato kójico incorporando-o em emulsões múltiplas.

Emulsões múltiplas são sistemas complexos em que há uma fase dispersa contendo pequenas gotas de outra fase dispersa em seu interior numa fase dispersante, podendo ser caracterizadas nas formas A/O/A ou O/A/O (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 1997).

Esses sistemas são utilizados na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e química como um potencial de aplicações biofarmacêuticas ou como veículos de vários fármacos. Algumas de suas aplicações são: proteção do organismo contra substâncias com propriedade locais irritantes ou gosto desagradável, função de depósito de interfase e liberação controlada (SILVA & SOARES, 1996).

Entretanto, um sistema estável adequado é necessário, pois as vantagens de utilização de emulsão múltipla como uma formulação inovadora de distribuição de uma substância só pode ser feita com uma estrutura vesicular intacta (LINDENSTRUTH & MULLER, 2004).

A estabilidade de uma emulsão múltipla é fundamental para tornar o sistema bem estruturado, portanto alguns fatores são essenciais: determinar o tipo e as características químicas dos agentes emulsionantes utilizados; caracterizar a influencia da razão entre volume da fase oleosa e aquosa na produção e estabilidade da emulsão múltipla; determinar a proporção mais adequada entre os tensoativos da emulsão primária e múltipla, determinar o método de manipulação mais adequado e padronizar e validar os métodos de análise da estabilidade do sistema múltiplo (MORAIS, 2008).

Embora veículos como as emulsões múltiplas possam aumentar a eficácia das substâncias veiculadas, o emprego progressivamente de princípios ativos nas indústrias cosmética e farmacêutica com finalidade de prevenir e tratar alterações relacionadas com o envelhecimento e despigmentação da pele carecem não somente de estudos biológicos que avaliem os seus possíveis efeitos cutâneos benéficos, mas também de estudos que avaliem a estabilidade química dessas substâncias no produto final (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 1997).

II. OBJETIVOS

Desenvolver um sistema de emulsões múltiplas para incorporação do dipalmitato kójico que otimize a utilização desta substância no tratamento do envelhecimento e da hiperpigmentação cutâneos, mediante aumento da eficácia de sua atividade antioxidante e despigmentante. Este trabalho visou o desenvolvimento científico e tecnológico na Área de Fármacos e Medicamentos e propôs:

- Desenvolver e caracterizar emulsões múltiplas acrescidas de dipalmitato kójico;
- Avaliar a estabilidade físico-química dos sistemas;
- Analisar as atividades antioxidante e despigmentante *in vitro* das formulações obtidas.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pele

A pele humana (Figura 4) é o maior órgão do corpo humano, ocupando uma área de mais de 1m² de superfície, e corresponde a 20% do peso corporal. Apresenta-se como um manto de revestimento que isola os componentes orgânicos do meio exterior. É um órgão que forma uma barreira protetora dos tecidos mais profundos contra a ação de agentes físicos, químicos e bacterianos (MARTINS, 2003).

O pH da pele possui importância fundamental, pois quando se utiliza produtos com pH parecido ou igual ao da pele, reações alérgicas, irritantes e sensibilizantes são evitadas, diminuindo-se a perda de atividade do produto, obtendo-se melhores resultados (MARTINS, 2003).

A pele é constituída por três camadas: epiderme, derme e hipoderme e anexos cutâneos (OBAGI, 2004).

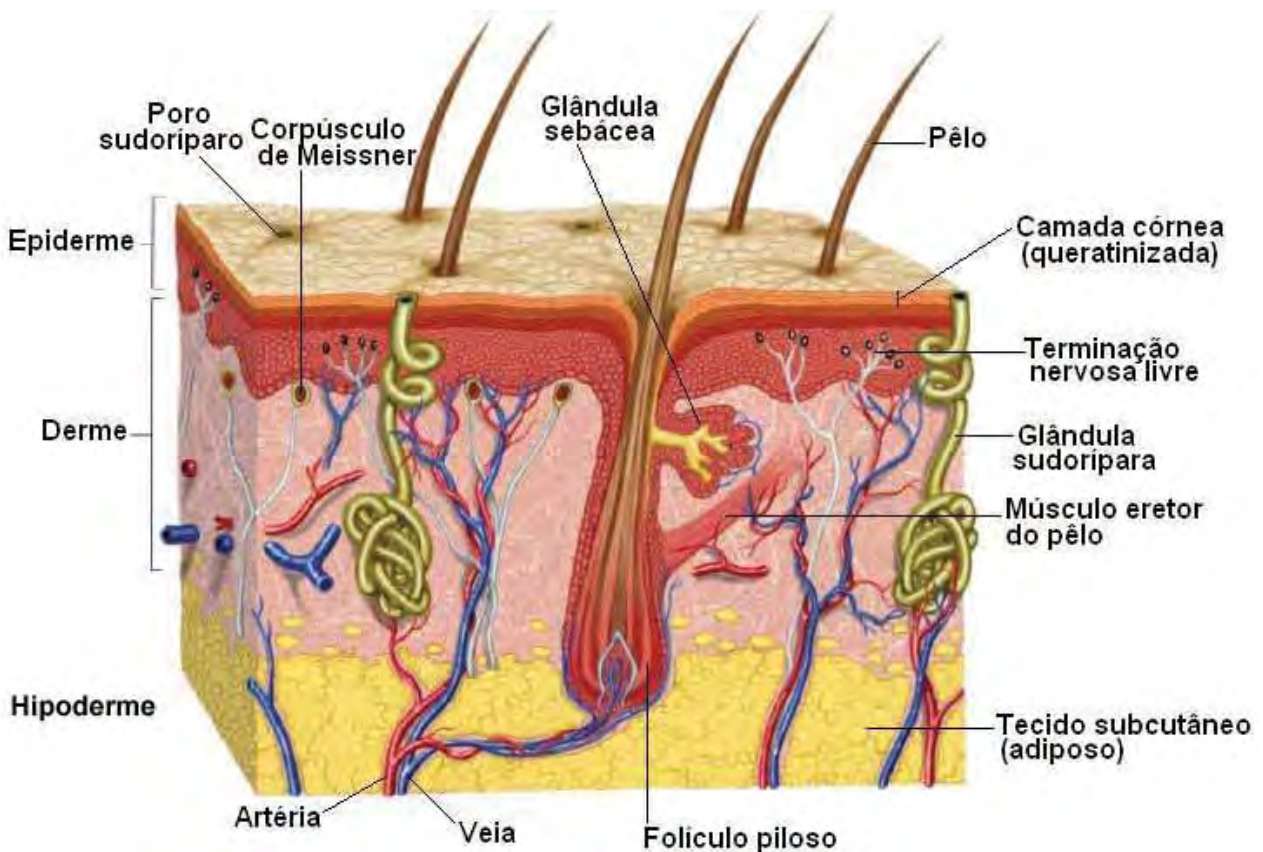


Figura 4: Estrutura esquemática da pele (OBAGI, 2004).

Epiderme

A epiderme é um epitélio estratificado pavimentoso, que comporta os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A epiderme subdivide-se, da derma para a superfície, em: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo. Sendo o estrato córneo a camada mais importante para a cosmetologia, pois as vias de penetração de cosméticos estão associadas a proteínas e lipídeos do mesmo (OBAGI, 2004; MARTINS, 2003).

Derme

A derme é a camada intermediária constituída de tecido conjuntivo de apoio da epiderme, é composta por colágeno e elastina juntamente com uma substancia denominada substancia fundamental e é subdividida em: derme superficial ou papilar e derme profunda ou reticular (OBAGI, 2004).

Melanina

A melanina é um termo genérico empregado para descrever um grupo diversificado de biopolímeros heterogêneos, pigmentados, polifenólicos de alto peso molecular. Apesar de possuírem precursores semelhantes e de fenoxidase nos estágios iniciais de síntese, as melaninas possuem origem, composição química e propriedade físicas diversas. Ocorrem nos tecidos vivos na forma insolúvel e são encontradas praticamente em todos os organismos vivos (SILVA, 1998).

Nos seres humanos a melanina é produzida pelas células dendríticas especializadas, os melanócitos, responsável pela coloração da pele, cabelo e olhos. Os melanócitos absorvem a luz visível e a ultravioleta (UV), protegendo a pele contra danos provocados pelas radiações, especificamente as radiações ultravioleta A e B (THIBODEANS, 2004).

A melanina é classificada em:

Eumelanina

É um pigmento insolúvel, de coloração variável de marrom a preto, contendo pequena quantidade de enxofre. É um biopolímero com estrutura indol, produzido pela co-polimerização da

dopa-oxidase e de seus produtos de ciclização. É uma substância resultante da polimerização oxidativa de compostos indólicos derivados de dihidroxifenilalanina (NOGUEIRA, 2002; THIBODEANS, 2004, OLIVEIRA & ALMEIDA, 2003).

Feomelanina

É um pigmento heterogêneo, de coloração variável de amarelo a marrom avermelhado e sintetizado a partir de tirosina e cisteína. É solúvel em álcalis e resulta da polimerização da cisteinildopa e produtos de ciclização. Degradada facilmente pela radiação ultravioleta, é menos fotoestável do que a eumelanina (NOGUEIRA, 2002; THIBODEANS, 2004).

Raramente a feomelanina e a eumelanina são encontradas na forma isolada, pois durante a melanogênese formam-se melaninas em diferentes proporções, o que explica as diferentes tonalidades de pele (HERNANDEZ & FRESNEL, 1999).

Melanócitos

Na pele normal, os melanócitos são encontrados apenas na camada basal. Eles estão dispersos entre os queratinócitos dessa camada. Por meio de prolongamentos de seu citoplasma, chamados de processos dendríticos, cada melanócito está em contato com 30 a 40 queratinócitos (OLIVEIRA & ALMEIDA, 2003).

Os melanócitos localizados na camada basal da epiderme e folículo pilo-sebáceo produzem e secretam, continuamente, a melanina para os queratinócitos, sendo essa atividade diminuída gradativamente com o envelhecimento do indivíduo (NOGUEIRA, 2002; THIBODEANS, 2004).

Melanogênese

A melanina é sintetizada em organelas celulares denominadas melanossomos a partir de um precursor comum, a tirosina. A síntese melânica é estimulada principalmente pela radiação UV (NOGUEIRA, 2002).

A síntese da melanina começa com a oxidação enzimática da L-tirosina à L-dopa, que por sua vez, é oxidada a dopaquinona e ocorre em aerobiose. Com a transformação espontânea da dopaquinona em leucodopadromo e dopacromo inicia-se uma cascata bioquímica, a qual termina com a formação do pigmento eumelanina. A conjugação de dopaquinona com cisteína ou glutatona resulta em

cisteinildopa e glutathionildopa. Ambos passam por uma série de transformações, gerando a feomelanina. Além destas enzimas, fatores não enzimáticos interferem na síntese do pigmento, tais como pH, concentração de tios e íons metálicos ou oligoelementos como o cálcio (GUILLEN, 2007).

A tirosinase é uma cuproproteína que contém uma fração glicídica que controla o processo melanogênico. É sintetizada na superfície do retículo endoplasmático rugoso e depois transferida para o complexo de Golgi associada com o lisossomo, no qual é ativada pela adição de uma cadeia de açúcar, antes de ser secretada em vesículas. Um pré-melanossomo liberado do complexo de Golgi funde-se com a vesícula para formar o melanossomo (GUILLEN, 2007).

Alterações na pele

Fatores que afetam a pigmentação

Os fatores que alteram a pigmentação da pele são genéticos, hormonais e ação dos raios UV, sendo que, todos os estágios da melanogênese estão sob controle genético. As características dos melanossomas são codificadas pelos genes de pigmentação. A gravidez e a administração de anticoncepcionais podem produzir uma mudança na coloração da epiderme. Os estrógenos e a progesterona provocam a hiperpigmentação do rosto e da epiderme genital. E em relação à ação dos raios UV é válido salientar que a ação dos raios UVB ativa os melanócitos e estimula a tirosinase. A produção aumentada de melanina é uma reação defensiva da pele, protegendo da formação do eritema actínico (NOGUEIRA, 2002).

Cosméticos

Definição de cosméticos

De acordo com a resolução RDC nº 21, de 14 de julho de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade

oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (BRASIL, 2005).

Os componentes de um produto cosméticos devem estar descritos nos compêndios técnicos de *International Nomenclature of Cosmetics Ingredients (INCI)* garantindo, assim, uma maior segurança. Não devem apresentar nenhum risco à saúde humana nas condições de uso preconizadas ou razoavelmente previsíveis (RIBEIRO, 2006).

Emulsões

Dentre inúmeros veículos utilizados para as formulações com ativos cosmetológicos, a emulsão (Figura 5) faz parte de um grupo de veículos que apresentam boa aceitação por parte dos consumidores. É resultante da dispersão de uma fase interna formada por gotículas ou glóbulos de um líquido distribuídos em um outro veículo no qual é imiscível, a fase externa, empregando um sistema tensoativo. Trata-se de uma mistura termodinamicamente instável, exigindo criterioso estudo de sua estabilidade física, química e físico-química que dará indicações sobre o seu comportamento e desempenho no decorrer de determinado intervalo de tempo (prazo de validade). As informações obtidas no estudo de estabilidade são particularmente importantes para os veículos emulsionados, pois quando estocados podem gerar sinais de desestabilização como: cremeação, sedimentação, floculação, coalescência e, por fim, separação de fases.

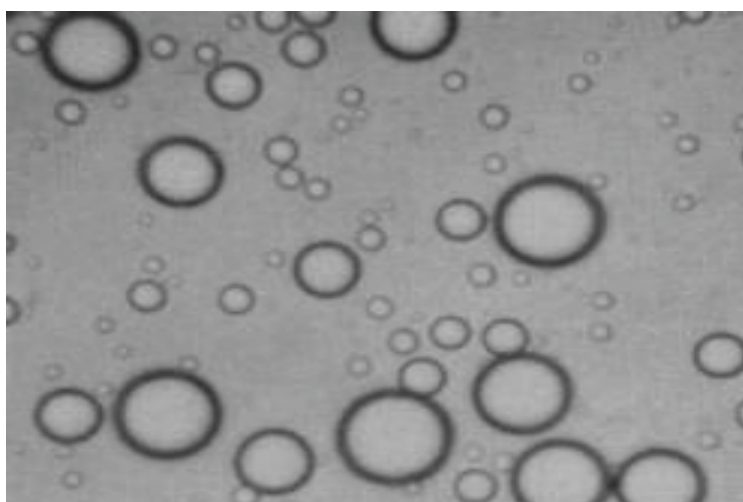


Figura 5: Óleo mineral em emulsão aquosa (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Considerando as fases contínuas e descontínuas de uma emulsão simples, classificamos como tipo óleo-em-água (O/A), aquela em que o óleo constitui a fase dispersa, interna ou descontínua e a água, a fase dispersante, externa ou contínua; caso ocorra a água como fase dispersa, serão obtidas emulsões (A/O). As emulsões do tipo O/A são quantitativamente mais utilizadas devido ao seu aspecto menos oleoso e com sensorial mais agradável para aplicações tópica.

A subdivisão das fases em gotículas e a formação da emulsão trazem como principais vantagens a maior facilidade de espalhamento, a possível potenciação da penetração, absorção e consequente atividade dos componentes da ação emoliente de seus constituintes, a possibilidade de separação de compostos incompatíveis, de mistura de elementos não miscíveis e proteção a compostos quimicamente instáveis (SILVA & SOARES, 1996).

Emulsão múltipla

Emulsão múltipla é uma emulsão na qual a fase dispersa contém gotículas de uma outra fase dispersa em seu interior. Esta segunda fase está fisicamente separada por uma fase dispersa de composição distinta. São sistemas onde os dois tipos de emulsão (A/O e O/A ou O/A e A/O) existem simultaneamente, podendo assim ser do tipo A/O/A (Figura 6) ou O/A/O. Sistemas ainda mais complexos como A/O/A/O e O/A/O/A, glóbulos múltiplos contendo glóbulos múltiplos, têm sido descritos (VASILJEVIC et al., 2005).

Segundo Florence & Whitehill (1982), as emulsões podem ser classificadas de acordo com sua morfologia em: tipo A, glóbulos múltiplos que apresentam um único glóbulo grande interno; tipo B, glóbulos múltiplos que apresentam quantidade razoável de glóbulos pequenos internos e tipo C, glóbulos múltiplos que apresentam grande quantidade de glóbulos pequenos internos.

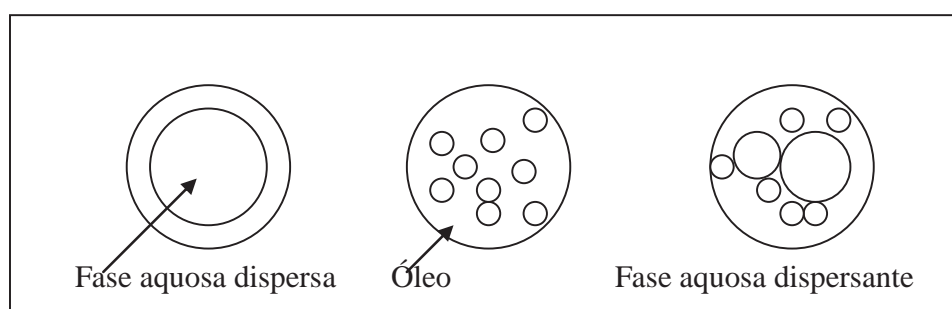


Figura 6: Morfologia dos glóbulos múltiplos, segundo Florence & Whitehill (1982).

Emulsões múltiplas possuem várias aplicações em área da indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia e química em geral (RAYNAL et al., 1996).

Este sistema possui propriedades particulares, tais como: (a) capacidade de encapsulamento de ativos cosméticos ou fármacos; (b) proteção da substância encapsulada quanto a processo de oxidação; (c) habilidade de veicular substâncias incompatíveis, por exemplo, com características hidrofílico/lipofílico/hidrofílico para emulsões A/O/A, respectivamente, em um mesmo sistema e (d) liberação prolongada do ativo ou fármaco encapsulado (RAYNAL et al., 1996).

A aplicação de emulsões múltiplas pelas ciências cosmética, farmacêutica e química em geral tem suas limitações no que diz respeito a dificuldades em caracterizar e elucidar os parâmetros envolvidos em sua estabilidade e seus mecanismos de liberação e de obtenção (LAUGEL et al., 1998). Assim, o uso de emulsões múltiplas como veículo para liberação controlada de ativos cosméticos ou fármacos depende do sucesso de formulações, usando óleos e emulsificantes que produzam características adequadas de estabilidade e possuam baixa toxicidade (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Luca et al. (1990) salientaram que a possibilidade de introduzir ativos na fase aquosa interna e externa permite um perfil de liberação com ação prolongada e imediata numa mesma formulação, pois a liberação prolongada do ativo contido na primeira fase dispersa, ou a mais interna, é esperada pelo fato deste ter que transpor duas interfaces. A possibilidade de se desenvolver sistemas com perfil de liberação sustentado proporciona benefícios em termos de cinética de liberação do ativo ou fármaco e possibilita redução nas dosagens e número de aplicações usuais do produto cosmético e/ou farmacêutico.

Dipalmitato kójico

O ácido kójico foi isolado pela primeira vez a partir do *Aspergillus orizae* em 1907, mais recentemente, foi descoberto, que é produzido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e grande número de espécies fúngicas, isoladas a partir de alimentos fermentados procedentes do Japão (SU, 1999).

A estrutura química desse metabólito foi descrita pela primeira vez em 1916 e corresponde ao 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona. É facilmente solúvel em água, etanol e acetona (AL-EDRESI & BAIE, 2010).

Tem sido demonstrando, que o ácido kójico inibe a tirosinase de cogumelo e a polifenoloxidase (PPO) purificada da batatata (SANDOVAL, 1999).

O ácido kójico apresenta vários níveis de ação que coloca em evidência a propriedade despigmentante, pois inativa a tirosinase principalmente por quelação do íon cobre em sítios ativos da enzima, suprimindo a tautomerização do dopacromo 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico. Também atua como um antioxidante e inibe a conversão de o-quinonas da L-dopa, norepinefrina e dopaquinona correspondente (RIBEIRO & OHARA, 2002; KOBAYASHI et al., 1995; SU, 1999).

É facilmente incorporado à formulação, mas também tem problemas de estabilidade. Não é tóxico e muito pouco irritante (SU, 1999).

Por ser instável ao calor (40 °C) e oxidar-se facilmente, principalmente com presença de luz, alguns derivados semissintéticos do ácido kójico estão sendo produzidos. O grupo c-7-hidroxil é comumente modificado para formar ester ou ester hidroxifenil ou também é usado para formar derivados de glicosídeos ou peptídeos (AL-EDRESI & BAIE, 2010).

Recentemente, o ácido kójico está sendo incorporado em cosméticos na sua forma de ester dipalmítico, ou seja, em dipalmitato kójico, que é hidrolisado por esterases localizadas nas células da pele e promovem a liberação do ácido kójico *in situ* (AL-EDRESI & BAIE, 2010).

O dipalmitato kójico é um pó branco, lipossolúvel, estável no calor e na luz e também possui uma estabilidade em uma ampla faixa de pH, que vai de 4 a 9, o que proporciona uma maior flexibilidade das formulações em que é incorporada (RIBEIRO & OHARA, 2002).

Antioxidantes

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com as de substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os antioxidantes interrompem a cadeia de radicais livres. Existem duas propriedades que são requeridas em um antioxidante. A primeira é que o antioxidante deve reagir rapidamente com o radical livre, gerando um novo radical. A segunda propriedade é a que as novas espécies de radicais devem ser tão não-reativas que não vão atrair outras moléculas ao redor (THOMAS, 2000).

Um bom antioxidante lipossolúvel efetivo deve apresentar taxa constante para combater radicais livres muito maior que a vitamina E; o radical livre intermediário deve ser rapidamente reduzido ou como a vitamina E, deve pausar a oxidação e por último, uma concentração efetiva do antioxidante deverá apresentar o estresse do radical local. No plasma, antioxidantes hidrossolúveis combatem radicais como superóxido pelo menos tão rápido como ascorbato ou apresentar uma concentração no plasma igual ou maior que o ascorbato (THOMAS, 2000).

No estresse oxidativo causado pela exposição prolongada a radiação UV, os antioxidantes naturais da pele são severamente diminuídos, resultando em uma proteção insuficiente e danos celulares. Os danos oxidativos podem desencadear fotoenvelhecimento e câncer de pele (ROPKE et al., 2003).

Existem pelo menos três meios que afetam a concentração de antioxidante pela radiação UV, entre eles destacam-se: absorvância de luz; reação com oxigênio reativo, gerada pela interação entre fotossensibilizador e luz UV, e mecanismo de reciclagem de antioxidante, no qual um antioxidante pode poupar a expansão do outro (ROPKE et al., 2003).

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

Atualmente, existe um aumento no uso e na mensuração da atividade antioxidante em alimentos, medicamentos e cosméticos. O método de determinação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos, pela reação com DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazil) foi inicialmente descrito por Brand-Williams et al e apresenta como fundamento a redução do radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil, o qual apresenta um máximo de absorção em 517 nm. Com base no decaimento da absorvância, pode-se avaliar a presença de compostos capazes de doar H^{\cdot} ou sequestrar o radical, que após o equilíbrio da reação permite calcular a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH (BUENGER et al., 2006; BRAND-WILLIAMNS et al., 1995)

A reação do antioxidante ocorre com o elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio do radical DPPH• que é reduzido por um átomo de hidrogênio formando a hidrazina.

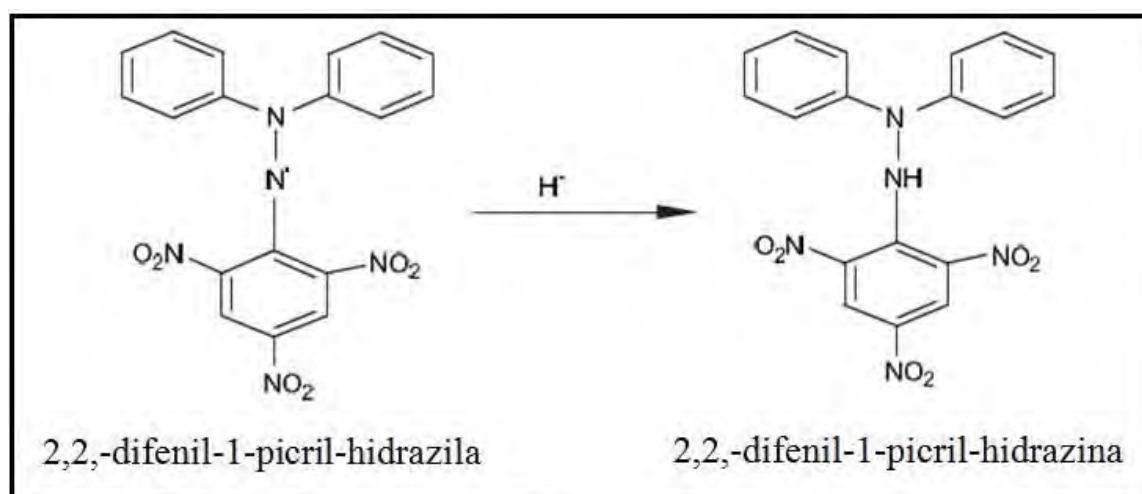


Figura 7: Reação química da redução do radical DPPH pela substância antioxidante.

Despigmentantes

As hiperpigmentações podem ser tratadas por diferentes técnicas tais como a utilização de substâncias químicas despigmentantes, “peeling” (esfoliação da pele) com substâncias químicas e tratamento com raios “laser” (GRIMES, 1999; LAM et al 2001).

As substâncias despigmentantes atuam diretamente na região discrômica hiperpigmentada e podem ser formuladas em diferentes produtos cosméticos e diferentes apresentações (CASTRO et al., 1997).

A atividade dos despigmentantes pode ser decorrente de diversos mecanismos de ação, como supressão da síntese ou maturação da tirosina; inibição da síntese da tirosinase; inibição direta ou inibição competitiva e não competitiva da atividade da tirosinase; inibição indireta da tirosinase via quelação de oligoelementos; toxicidade seletiva aos melanócitos; esfoliação; adsorção de melanina pré-formada; reação de redução e estimulação da melanina dos queratinócitos (ZUIDHOFF & RIJSBERGEN, 2001; SILVA, 1998; MAEDA & FUKUDA, 1991).

Avaliação da atividade despigmentante *in vitro*

Dentre os ensaios “*in vitro*”, existem os métodos enzimáticos, de cultura celular e cultura de tecidos.

Os métodos enzimáticos são empregados para verificar a atividade inibitória de agentes despigmentantes sobre a atividade de enzimas envolvidas na melanogênese, principalmente sobre a tirosina e L-Dopa. Entretanto, esses métodos não detectam a atividade sobre outras etapas da melanogênese. Neste método, a tirosinase, em geral retirada de cogumelos, é adicionada ao substrato tirosina ou L-Dopa, em presença e ausência do agente despigmentante em estudo. A atividade inibitória é então avaliada pela medida da produção de intermediários da via melanogênica pela leitura espectrofotométrica (MASUDA et al., 1996)

Os métodos de cultura celular podem avaliar o efeito inibitório dos compostos ativos sobre qualquer etapa da biossíntese da melanina, como a inibição da síntese de açúcar de cadeia lateral ou a transferência de enzimas entre organelas, mas não são aplicáveis para produtos acabados com a formulação incompatível com a cultura. (SU, 1999).

Nesse método, os despigmentantes são adicionados a um meio de cultura para avaliar seu efeito inibitório sobre a melanogênese em células de melanoma de camundongo ou melanócito humano cultivados, originários geralmente de pele de cirurgia de mama ou de pele de prepúcio de recém-nascidos (MASUDA et al., 1996; MAJMUDAR & SMITH, 1998).

O método de cultura em tecidos é empregado para avaliar a eficácia de substâncias despigmentantes em produtos acabados, mas ainda não substituem totalmente a pele humana (LEE & KIM, 1995; MASUDA et al., 1996; SU, 1999).

Esse método é, algumas vezes, usado para estudar a interação dos melanócitos com suas células vizinhas e com os tecidos. Geralmente são empregados folículos dissecados de camundongos ou pele de cobaia (MASUDA et al., 1996).

Apesar das limitações, os testes “in vitro” têm provado sua utilidade para avaliação de segurança e eficácia além da escolha de substâncias ativas (MAJMUDAR & SMITH, 1998).

IV. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

A Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos apresentou um crescimento médio deflacionado composto de 10,6% nos últimos 13 anos, tendo passado de um faturamento líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 21,7 bilhões em 2008 (ABIHPEC, 2010).

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC, 2010), vários fatores têm contribuído para este excelente crescimento do setor, dentre eles: participação crescente da mulher brasileira no mercado de trabalho; a utilização de tecnologia de ponta e o conseqüente aumento da produtividade, favorecendo os preços praticados pelo setor, que tem aumentos menores do que os índices de preços da economia em geral; aumento da expectativa de vida, o que traz a necessidade de conservar uma impressão de juventude; lançamentos constantes de novos produtos atendendo cada vez mais às necessidades do mercado.

Dentre as matérias-primas bastante utilizadas como despigmentantes, encontra-se a hidroquinona, que é o despigmentante mais eficaz. Porém, apresenta problemas de instabilidade e sabe-se também que esta substância tem efeito citotóxico sobre melanócitos e potencial mutagênico para as células de mamíferos; pode causar sérias irritações na pele, além de causar a ocronose exógena, o que resultou em sua proibição em países como África do Sul, Tailândia e outros. Além disso, seu efeito despigmentante é reversível com a suspensão da aplicação do produto (CASTRO et al., 1997; SU 1999).

Embora seja utilizada há muito tempo, vem sendo substituída por novos clareadores de pele, devido a tais questões de segurança. Recentemente, nota-se o aumento do uso do dipalmitato kójico como despigmentante, que é um éster derivado do ácido kójico e possui algumas vantagens sobre este: apresenta estabilidade frente a luz e calor e suporta uma larga faixa de pH nas formulações em que é incorporado.

Associado a sistemas como emulsões múltiplas, a ação antioxidante e despigmentante do dipalmitato kójico pode, dessa forma, ter sua eficácia aumentada.

Este trabalho, além de contribuir com o processo de ensino, na vertente da produção do conhecimento, enfoca o desenvolvimento de novas tecnologias e inovações, propondo o equacionamento de problemas apresentados pela sociedade que busca a ótica científica para ajudar a solucioná-los, trocando o empirismo pela ciência.

Os objetos de estudo, desenvolvimento de emulsões múltiplas, estudos de estabilidade e avaliação das atividades antioxidantes e despigmentantes de formulações, são muito importantes para a formação do profissional farmacêutico, que trabalha com o desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações.

V. MATERIAIS & MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Soluções e reagentes

Foi empregado o dipalmitato kójico (Via Farma, Brasil). Na preparação das formulações foram utilizados água (Milli-Q), monooleato de sorbitano (Span[®] 80, Audaz, Brasil), monooleato de sorbitano etoxilado 20 OE (Tween[®] 20, Vetec, Brasil) e vaselina líquida (Teclab, Brasil). Na determinação da atividade antioxidante *in vitro* das formulações, foi empregado o radical 2,2,-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH (Fluka, Buchs, Suíça) e metanol absoluto (Synth, Brasil). Na avaliação da ação despigmentante *in vitro*, foram utilizados L-tirosina frasco com 25g (Sigma, U.S.A.), tirosinase obtida do cogumelo *Agaricus bisporus* 25 KU, 3960 U/mg em frasco com 6,4 mg (Sigma, U.S.A.) e ácido kójico (Via Farma, Brasil).

5.1.2 Equipamentos

O DK e o AK foram pesado em balança METTLER, modelo H10. Todas as demais matérias-primas foram pesadas em balança semi-analítica, Micronal B160. A análise microscópica das emulsões

foi realizada em microscópio Leitz DM RXE (LeicaTM). Na quantificação e distribuição dos glóbulos múltiplos, foi utilizado analisador de partícula Zetasizer Nano ZS ZEN3600. A centrifugação das amostras foi realizada em Centrífuga (Sorvall®TC6) com utilização dos tubos de centrífuga Falcon (BD®). O pH foi determinado em peagômetro digital (Digimed DM-23) e a condutividade elétrica em condutivímetro (Digimed DM-32). O potencial zeta foi verificado em Zetasizer Nano ZS ZEN3600. A determinação do comportamento reológico foi realizada em reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100, modelo CLS 100. O teste de bioadesão foi determinado no analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems®, Surrey, Inglaterra). Na determinação da atividade antioxidante, foi utilizado o espectrofotômetro ultravioleta-visível Hitashi[®] 2000. Para avaliação da ação despigmentante *in vitro*, foi empregado leitor espectrofotométrico de microplacas universal Bio-Tek[®] ELX 800.

5.2. MÉTODOS

5.2.1 Desenvolvimento das formulações

As emulsões múltiplas A/O/A foram inicialmente desenvolvidas através do diagrama de fases ternário com os componentes: monooleato de sorbitano (Span[®] 80, Audaz, Brasil), monooleato de sorbitano etoxilado 20 OE (Tween[®] 80, Vetec, Brasil), vaselina líquida (Teclab, Brasil), água (Milli-Q) e dipalmitato kójico (Via Farma, Brasil).

5.2.2 Caracterização físico-química das emulsões múltiplas A/O/A

5.2.2.1 Análise macroscópica

O aspecto macroscópico, as propriedades organolépticas e a homogeneidade foram avaliados após 24 horas do preparo.

5.2.2.2. Análise microscópica

As emulsões múltiplas foram observadas em microscópio óptico Leitz DM RXE (LeicaTM), em temperatura ambiente. As amostras foram dispostas sobre lâminas, com sobreposição de lamínulas, e as imagens captadas com aumento de 100 x.

5.2.2.3. Quantificação e distribuição dos glóbulos

5.2.2.3.1. Utilizando-se microscópio óptico

A contagem aproximada de glóbulos múltiplos foi realizada utilizando câmara para contagem de hemácias por cm^3 de amostra (NAKHARE; VYAS, 1996), com auxílio de microscópio Leitz DM RXE (LeicaTM), acoplado a uma câmera que digitaliza as imagens captadas no software Motic Images Plus 2.0.

5.2.2.3.2. Utilizando-se espalhamento dinâmico de luz

O tamanho e a distribuição dos glóbulos múltiplos também foram determinados através de analisador de partícula óptico Zetasizer Nano ZS ZEN3600 – Malvern Instruments, através do espalhamento dinâmico de luz. Tal método é baseado em espectroscopia de correção de fótons ou espalhamento quase-elástico de luz. Este caracteriza o tamanho das partículas (granulometria) iluminando-as com laser. As amostras foram inicialmente diluídas em água destilada na proporção de 1:20 e aplicadas na cubeta do aparelho com o auxílio de uma seringa hipodérmica adaptada. As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.2.4. Determinação do pH

Para a determinação do pH, as amostras foram preparadas da seguinte maneira: foi diluído 1g de formulação em 10 mL de água destilada. Em seguida, o valor de pH foi verificado em peagômetro digital (Digimed DM-23). Este ensaio foi realizado em triplicata.

5.2.2.5. Determinação da condutividade elétrica

Determinou-se a condutividade elétrica inserindo diretamente o eletrodo nas amostras. O condutímetro (Digimed DM-32) foi calibrado com solução de KCl 0,1N.

5.2.2.6. Determinação do potencial zeta

Os valores de potencial zeta foram obtidos a partir da derivação da mobilidade eletroforética determinada utilizando Zetasizer Nano ZS ZEN3600 – Malvern Instruments. Este sistema analisa a mobilidade das partículas e colóides (0,02 a 3,0 μm de diâmetro) em dispersões líquidas utilizando medidas independentes e simultâneas com laser Doppler em quatro ângulos diferentes (8,9; 17,6; 26,3; 35,2°. As amostras foram inicialmente diluídas em água destilada na proporção de 1:20 e aplicadas na cubeta do aparelho com o auxílio de uma seringa hipodérmica adaptada. As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.2.7. Determinação do comportamento reológico

Os sistemas foram analisados por medidas reológicas utilizando reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100, modelo CLS 100, com dispositivo cone – placa de 40 mm de diâmetro, empregando ensaios de escoamento e mecânico-dinâmicos ou de oscilação.

5.2.2.8. Teste de Bioadesão

A bioadesão dos sistemas foi avaliada através da medida da força necessária para destacar a formulação mantida em contato com pele animal, utilizando para isso o analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems®, Surrey, Inglaterra), através do teste Hold Until Time. A pele utilizada foi obtida de orelhas de porcos domésticos provenientes de abatedouro local, separada da cartilagem com o auxílio de uma lâmina e depois separada do tecido adiposo, sendo posteriormente dermatomizada com auxílio de um dermatômetro (Nouvag TCM 300, Goldach, USA) na espessura de 500 μm , retirando-se o estrato córneo, epiderme e parte da derme. Antes do ensaio, as peles foram hidratadas com solução de NaCl 0,9%, os pêlos foram removidos com auxílio de uma tesoura e foram afixadas na prova com o auxílio de anéis de borracha.

As emulsões múltiplas (7,5 g) foram colocados em tubos de centrífuga, tipo Falcon (BD®), com capacidade para 45 ml e centrifugados a 3500 rpm por 3 min (Sorval, modelo TC 6 DuPont), para eliminação das bolhas de ar e tornar suas superfícies lisas. A pele foi colocada na prova cilíndrica superior. O teste iniciou-se com a prova superior descendo até encontrar a amostra (detectada por uma força de gatilho de 2 mN) a uma velocidade constante de 1 mm/s, e permanecendo em contato com a pele por 60 segundos. Nenhuma força foi aplicada durante a fase de contato. A prova foi lentamente removida a uma velocidade constante de 0,5 mm/s e a força necessária para destacar a amostra da pele foi determinada através da curva força pelo tempo. O trabalho de adesão, ou seja, área sob a curva

determinada durante a fase de retirada da prova foi determinada utilizando o software Texture Exponent Lite do equipamento.

5.2.3. Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante do dipalmitato kójico foi determinada através do teste com o radical livre DPPH, através do seqüestro desses radicais livres. Nesse método foi preparada uma solução 0,06 mM de DPPH em metanol. Para o preparo da solução de DPPH, foi pesada a quantidade de 2,4 mg de DPPH com adição de 100 mL de metanol num balão volumétrico. Em seguida foram preparadas as amostras em cinco diferentes concentrações de partida de DK em metanol: 100 µg/ml; 200 µg/ml; 400 µg/ml; 1000 µg/ml e 2000 µg/m, com concentrações reais de 2,5 µg/ml 5,0 µg/ml 10,0 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml, pois aplica-se um fator de diluição do ensaio. Também foram preparadas as amostras da emulsão múltipla contendo DK diluídas em água: 100 µg/ml; 200 µg/ml; 400 µg/ml; 1000 µg/ml e 2000 µg/m, com concentrações reais do DK de 2,5 µg/ml 5,0 µg/ml 10,0 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml . Utilizou-se o ácido kójico como padrão antioxidante nas concentrações 100 µg/m; 200 µg/m; 400 µg/m e 1000 µg/m, porém suas concentrações reais são 2,5 µg/ml 5,0 µg/ml 10,0 µg/ml e 25 µg/ml.

Em ambiente escuro, foram transferidos 0,1 ml de cada diluição das amostras e padrões em tubos de ensaio.

Foram adicionados 3,9 ml da solução de DPPH em cada tudo e aguardados 30 minutos para iniciar a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 517 nm. Além da solução com a amostra, foi realizada a leitura da solução controle contendo 3,9 ml DPPH e 0,1 ml de metanol. Para avaliação da atividade captadora de radical livre foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH pela equação 1:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

onde: A0 = absorvância do controle;

A1 = absorvância da amostra.

5.2.4. Ação despigmentante *in vitro*

Realizou-se o ensaio da reação enzimática da tirosinase utilizado por Kobayashi et al. (1995) e Khanon et al. (2000). Em cada poço das microplacas foram adicionados 10,0 µL de solução aquosa de

tirosinase (480 U/mL), 70 µL de solução tampão pH 6,8 e 70 µL de solução aquosa de tirosina (0,3 mg/mL). A estes poços foram adicionados 60 µL de água (controle) ou 60 µL de ácido kójico solubilizado em água em diferentes concentrações de partida: 20 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL e 400 µg/mL, porém suas concentrações reais são: 5,71 µg/mL, 14,28 µg/mL, 28,57 µg/mL, 57,14 µg/mL e 114,28 µg/mL devido ao fator de diluição do ensaio. Dessa forma, teve-se um volume final de 210 µL por poço. A absorbância foi medida a 490 nm num leitor espectrofotométrico de microplacas no início da reação (leitura no tempo 0). As microplacas foram incubadas a 30 ± 1 °C durante 60 minutos. Os dados foram registrados em um computador acoplado ao aparelho. A atividade inibitória foi obtida de acordo com a equação 2. A concentração correspondente à atividade inibitória 50% (AI 50%) do ácido kójico foi calculada a partir da equação da reta, obtida da relação porcentagem de atividade inibitória pela concentração.

$$IA (\%) = [((C-T_0)-(S-T_0))/(C-T_0)] \times 100 \quad (2)$$

Onde: IA = atividade inibitória;

C = absorbância do controle a 490 nm;

S = absorbância da amostra;

T₀ = absorbância no tempo zero.

5.2.4.1. Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% da solução de dipalmitato kójico usando tirosinase com concentrações de 480 U/mL

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 10,0 µL de solução aquosa de tirosina (480 U/mL), 70µL de solução tampão pH 6,8 e 70 µL de solução aquosa de tirosina (0,3 mg/mL). Posteriormente, foram adicionadas diferentes amostras de emulsão múltipla contendo DK e de DK solubilizado em metanol em diferentes concentrações (20 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL e 400 µg/mL, porém suas concentrações reais são: 5,71 µg/mL, 14,28 µg/mL, 28,57 µg/mL, 57,14 µg/mL e 114,28 µg/mL devido ao fator de diluição do ensaio). Dessa forma, obteve-se um volume final de 210 µL por poço. A absorbância foi medida a 490 nm num leitor espectrofotométrico de microplacas no início da reação (leitura no tempo 0). As microplacas foram incubadas a 30 ± 1 °C durante 60 minutos. Os dados foram registrados em um computador acoplado ao aparelho. A atividade

inibitória foi obtida de acordo com a equação 2 e os valores foram comparados aos obtidos para o ácido kójico.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento das formulações

As formulações foram obtidas pelo método de emulsificação em duas etapas. Inicialmente foi obtida a emulsão primária e posteriormente a hidrofílica (EM). Para o desenvolvimento de uma formulação estável, utilizou-se o diagrama ternário, onde foram feitas trinta e seis formulações diferentes modificando a concentração de cada componente, e após a análise macroscópica de estabilidade foi possível determinar a formulação a ser utilizada (Tabelas 1 e 2).

O diagrama ternário é constituído por três eixos que formam os três lados de um triângulo equilátero, cada qual representando de 0 a 100% de um dos componentes. Cada ponto corresponde a uma única composição, a qual é obtida pela sua extrapolação nos respectivos eixos (FORMARIZ et al., 2005). As concentrações de cada componente da formulação em que se observou macroscopicamente a formação dos diferentes sistemas foram empregadas para delimitar as diferentes regiões existentes no diagrama.

Tabela 1: Componentes e concentração das matérias-primas empregadas na preparação das emulsões múltiplas A/O/A sem DK.

Etapas	Componente	Função	F1 (%)
Emulsão primária	Água destilada	Veículo	35
	Span 80 (EHL 4,3)	Emulsificante não iônico	20
	Vaselina líquida	Emoliente	45
Emulsão Múltipla	Emulsão primária	Fase dispersante	80
	Solução de 40% de Tween 20	Emulsificante não iônico	10
	Água	Veículo	10

Tabela 2: Componentes e concentração das matérias-primas empregadas na preparação das emulsões múltiplas A/O/A com DK.

Etapas	Componente	Função	F2 (%)
Emulsão primária	Água destilada	Veículo	35
	Span 80 (EHL 4,3)	Emulsificante não iônico	20
	Vaselina líquida	Emoliente	43,75
	dipalmitato kójico	Princípio ativo	1,25
Emulsão Múltipla	Emulsão primária	Fase dispersante	80
	Sol. aquosa 40% de Tween 20	Emulsificante não iônico	10
	Água destilada	Veículo	10

6.2. Caracterização físico-química das emulsões múltiplas A/O/A

6.2.1. Análise macroscópica

Após 24h da formulação das amostras realizadas através do diagrama de fases ternário, apenas em uma delas não houve separação de fases, apresentada na Tabela 1.

Das características organolépticas, a emulsão múltipla tem coloração branca e é viscosa e opaca. Já seu odor é característico.

6.2.2. Análise microscópica

Através do microscópio óptico Leitz DM RXE (Leica™), pode-se analisar as EM microscopicamente.

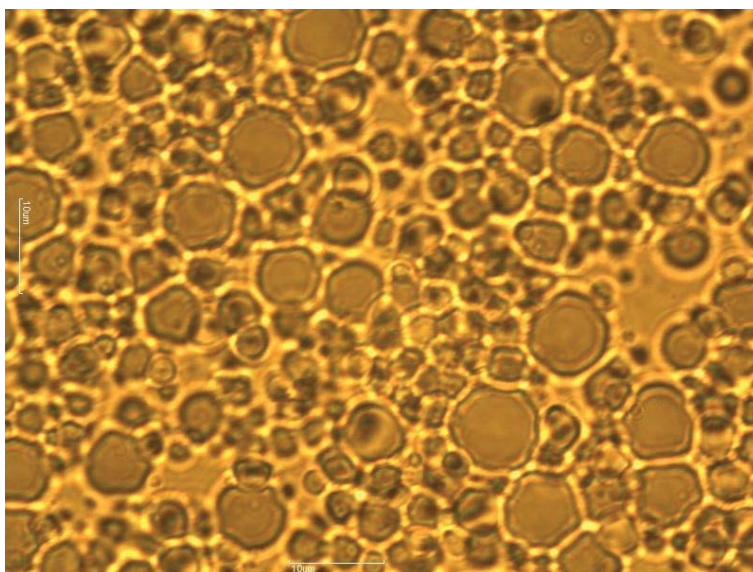


Figura 8: Microscopia da emulsão múltipla sem DK em aumento de 100 x.

6.2.3. Quantificação e distribuição dos glóbulos

6.2.3.1. Utilizando-se microscópio óptico

Com auxílio de microscópio Leitz DM RXE (Leica™), acoplado a uma câmera que digitaliza as imagens captadas no software Motic Images Plus 2.0, pode-se quantificar e analisar o tamanho dos glóbulos (Tabela 3) e através do Figura 9, pode-se calcular a distribuição do tamanho dos glóbulos da EM.

Tabela 3: Valores máximo, mínimo e médio dos raios dos glóbulos da EM em μm .

		Aprox.
Máximo:	12,4872	
Mínimo:	0,0564	
Número de Intervalos	10,82	11
Amplitude :	12,4308	
Amplitude interna:	1,149	1,15
Média:	1,534546	

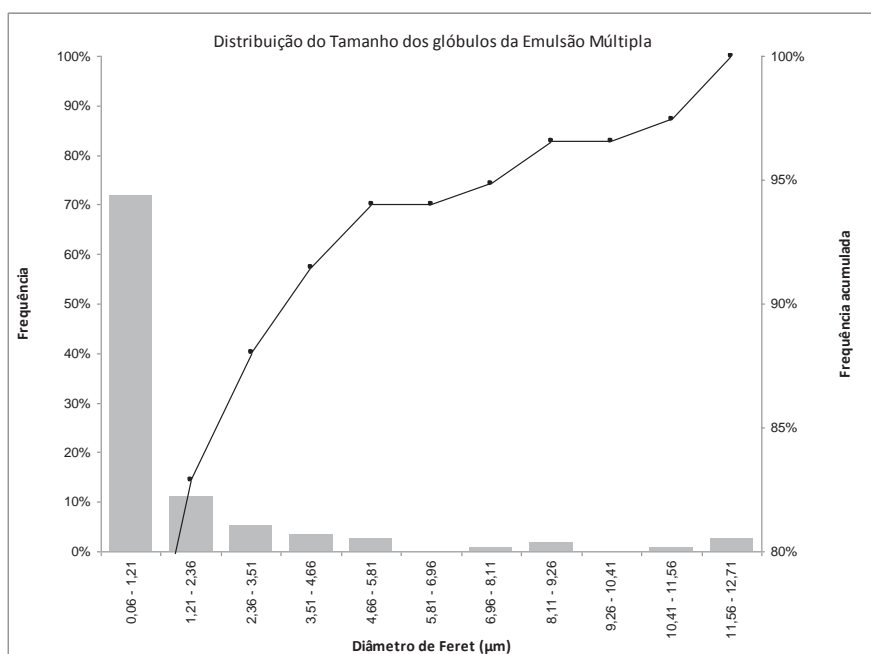


Figura 9: Distribuição do tamanho dos glóbulos da EM analisados por microscópio óptico.

De acordo com o resultado apresentado no gráfico, 72% dos glóbulos da formulação possuem tamanho de 0,06 a 1,21 μm .

Diferentes tamanhos de glóbulos podem ser obtidos dependendo do método de emulsificação escolhido, explicando a influência do método de obtenção na estabilidade do sistema (JEONG; OH; KIM, 2001).

A distribuição granulométrica de um sistema em dispersão depende da velocidade de agitação entre as fases dispersa e dispersante durante o processo de emulsificação e da velocidade de adição de uma fase sobre a outra (BROOKS; RICHMOND; ZERFA, 1998).

O tamanho dos glóbulos de uma emulsão determina a probabilidade da presença de fenômenos como floculação e coalescência. Geralmente, quanto menor o tamanho dos glóbulos dispersos, maior a estabilidade do sistema (JEONG; OH; KIM, 2001).

6.2.3.2. Utilizando-se espalhamento dinâmico de luz.

O tamanho e a distribuição dos glóbulos múltiplos também foram determinados através de analisador de partícula óptico Zetasizer Nano ZS ZEN3600 – Malvern Instruments, por espalhamento dinâmico de luz.

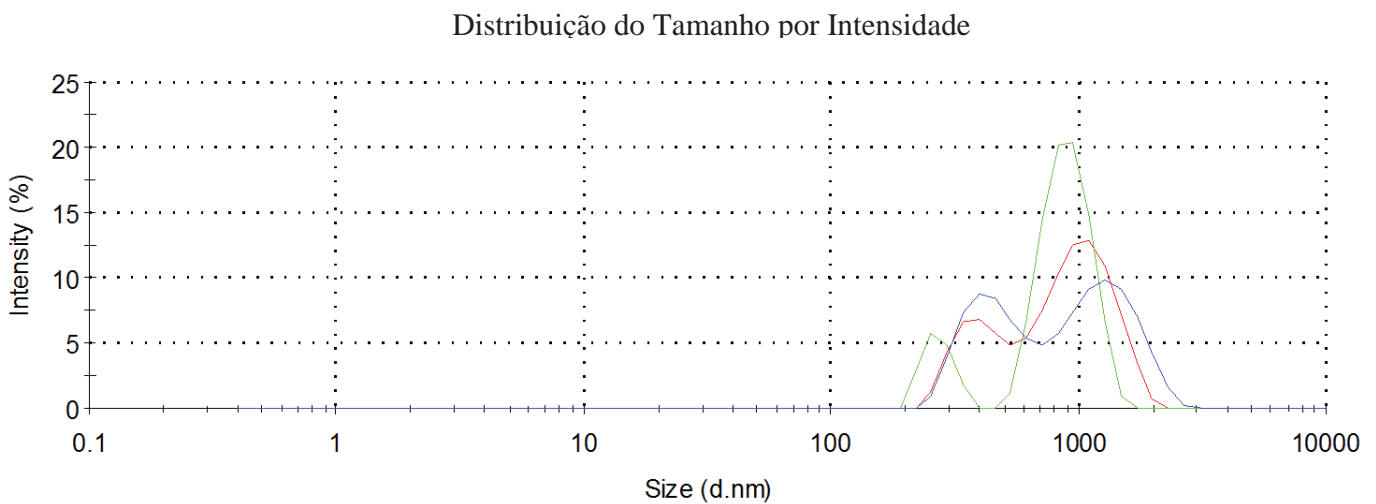


Figura 10: Distribuição do tamanho dos glóbulos múltiplos por espalhamento dinâmico de luz realizado em triplicata.

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica que mede o tamanho de partículas, tipicamente com tamanho menor de 1 μm . As partículas, neste caso os glóbulos, são iluminados por um

feixe de luz laser, onde ocorre o espalhamento da luz. A intensidade da luz espalhada, detectada num ângulo determinado varia numa taxa dependente da velocidade de difusão da partícula, a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho. Dados do tamanho da partícula podem ser gerados a partir da análise da variação na intensidade da luz espalhada (PECORA, 1985).

Medindo-se num ângulo de 173° ao invés de 90° , o feixe de luz incidente e o espalhamento de luz detectado não precisam atravessar totalmente a amostra. Primeiramente, isto reduz a chance de que os fótons incidentes e espalhados encontrem mais de uma partícula, reduzindo a chance de espalhamento múltiplo. Em segundo, como partículas grandes tendem a espalhar luz principalmente na direção frontal, e contaminantes na amostra são relativamente grandes, os efeitos desses, tais como poeira, são fortemente reduzidos (KASKUBA, CONNAH & MATTISON, 2004).

De acordo com essa técnica utilizada, 73,3% dos glóbulos da formulação possuem uma média de $1,016 \mu\text{m}$, valor este bastante próximo do indicado no ensaio acima, com uso de microscópio óptico.

6.2.4. Determinação do pH

O pH da EM foi determinado através de peagômetro (Digimed DM – 23), diluindo-se a amostra em água na proporção 1:10 e realizado em triplicata.

Os resultados das triplicatas do pH das EM sem DK foram: 4,73; 4,65 e 4,48. Já os resultados em triplicata das amostras com DK foram: 4,46; 4,68 e 4,52; concluindo-se que não houve alteração significativa com a incorporação do ativo, pois através da análise do teste t de Student $p(0,05) = 0,58$.

O pH é determinado por potenciometria, pela determinação da diferença de potencial entre dois eletrodos – o de referência e o de medida – imersos na amostra a ser analisada, e depende da atividade dos íons de hidrogênio em solução

A definição de pH é o logaritmo negativo da concentração molar de íons de hidrogênio. Representa convencionalmente a acidez ou a alcalinidade de uma solução. A escala de pH vai de 1 (ácido) a 14 (alcalino), sendo que o valor 7 é considerado neutro (BRASIL, 2008).

A pele apresenta pH levemente ácido (4,6 – 5,8), que contribui para que ocorra proteção bacteriana e fungicida em sua superfície. Além disso, as secreções cutâneas apresentam apreciável capacidade tamponante, importante propriedade, uma vez que o pH da pele é freqüentemente alterado em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo a pele a uma série de agentes agressores, em especial microorganismo.

Dependendo dos valores de pH, as concentrações de íons H^+ e OH^- adsorvidos na interface A/O alteram a carga do glóbulo. Em baixos valores de pH há aumento da concentração de H^+ em solução e

conseqüentemente, aumento da concentração deste íon na interface da emulsão, que neutraliza a carga negativa líquida do sistema disperso. Para o íon OH^- , o efeito de adsorção seletiva na interface ocorre em altos valores de pH resultando em aumento da carga líquida negativa da emulsão (JAYME; DUSTAN; GEE, 1999). Assim, para emulsões com valores de pH próximo à neutralidade, os íons adsorvidos na interface possivelmente não permitiriam uma ligação efetiva entre o dipalmitato kójico e a superfície do glóbulo.

O pH é um parâmetro importante a ser considerado, uma vez que grandes variações nos valores das formulações estudadas podem representar incompatibilidades químicas entre os componentes da formulação e conseqüentemente comprometer a eficácia e a segurança da substância ativa veiculada (ANVISA, 2004). Além de ser um parâmetro relacionado com a estabilidade intrínseca de uma formulação, Ansari (2009) comenta que o controle do pH para produtos de aplicação tópica, a longo prazo, é fundamental para assegurar que os mesmos não causem alterações na microbiota da pele, irritação cutânea ou interferência no processo de queratinização.

6.2.5. Determinação da condutividade elétrica

Determinou-se a condutividade elétrica inserindo diretamente o eletrodo nas amostras. O condutivímetro (Digimed DM-32) foi calibrado com solução de KCl 0,1N e o ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados em triplicata da condutividade da EM sem DK e com DK estão descritos na tabela abaixo. Conclui-se que não houve alteração significativa da condutividade elétrica da EM com a incorporação do ativo, já que a quantidade de água em ambas é igual. Utilizando-se o teste t de Student $p(0,05) = 0,3104$.

Tabela 4: Valores de condutividade elétrica das formulações com e sem DK.

Formulação	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		
	EM sem DK	35,8	32,72
EM com DK	30,03	32,54	33,14

A verificação da condutividade iônica pode ser usada para distinguir sistemas A/O dos O/A, por isso é considerada um importante parâmetro nos estudos de estabilidade por ser capaz de identificar mudanças na distribuição de fases.

Em termos de condutividade, as propriedades elétricas do óleo e da água são bem distintas. Essas diferenças podem ser usadas para correlacionar a quantidade de água em um fluxo de óleo, permitindo observar a integridade da fase externa (MIKULA, 1992).

Masmoudi et al. (2005) relataram que é difícil avaliar a velocidade de estabilização da emulsão somente pela condutividade elétrica, porque não há uma relação linear entre o aumento da condutividade e o fenômeno de instabilidade.

6.2.6. Determinação do potencial zeta

Os valores de potencial zeta foram obtidos a partir da derivação da mobilidade eletroforética determinada utilizando Zetasizer Nano ZS ZEN3600 – Malvern Instruments.

As amostras foram inicialmente diluídas em água destilada na proporção de 1:20 e aplicadas na cubeta do aparelho com o auxílio de uma seringa hipodérmica adaptada. O ensaio foi realizado em triplicata.

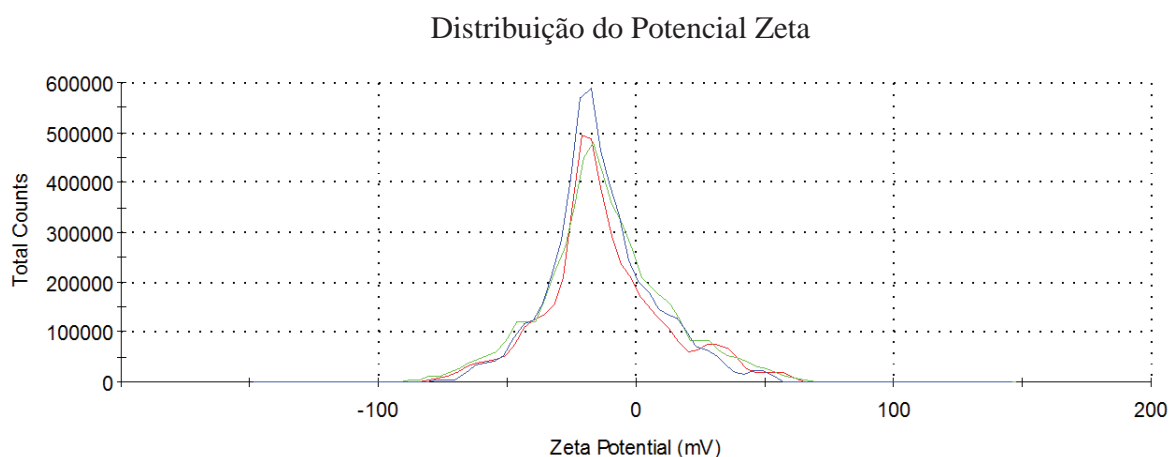


Figura 11: Distribuição do Potencial Zeta da EM.

Os resultados do potencial zeta analisado da EM, realizado em triplicata, foram de: -12,7mV; -12,4mV e -13,8mV.

O potencial zeta resulta das cargas elétricas na superfície da partícula, está relacionada com a estabilidade física do sistema coloidal, podendo ser medido com a amostra diluída em água ou no meio de dispersão original (OBEIDAT et al., 2010). Quando o potencial zeta de um sistema fornece um valor elevado, ou seja, superior a +30mV ou inferior a -30mV, indica que as partículas tendem a repelir umas das outras, o que pode indicar que o sistema será estável, porém se o valor de potencial zeta for

baixo ou nulo haverá uma tendência de aproximação das partículas e o sistema pode flocular facilmente (PANDOCHI, 2009).

6.2.7. Determinação do comportamento reológico

As emulsões múltiplas foram analisadas por medidas reológicas utilizando reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100, modelo CLS 100, com dispositivo cone – placa de 40 mm de diâmetro, empregando ensaios de escoamento e mecânico-dinâmicos ou de oscilação.

As figuras abaixo mostram a reologia da EM sem o princípio ativo (dipalmitato kójico), da EM com DK e um comparativo entre as duas formulações.

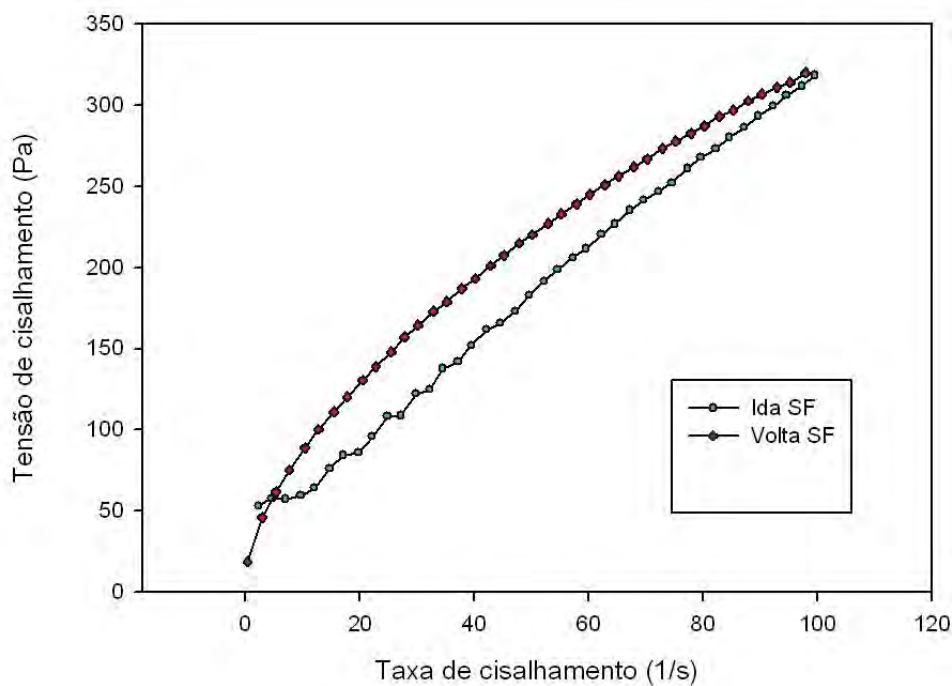


Figura 12: Curva de fluxo da EM sem DK.

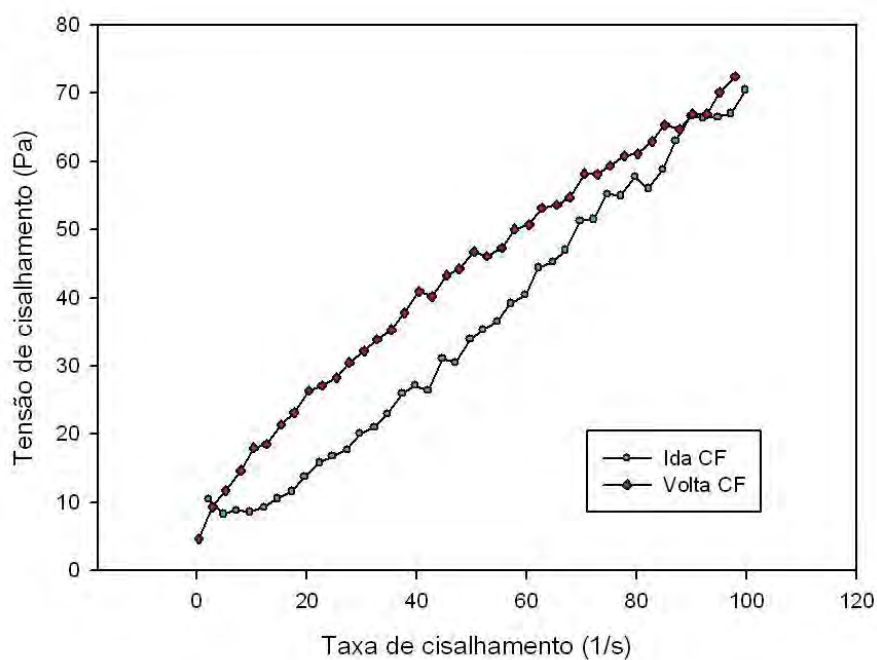


Figura 13: Curva de fluxo da EM com DK.

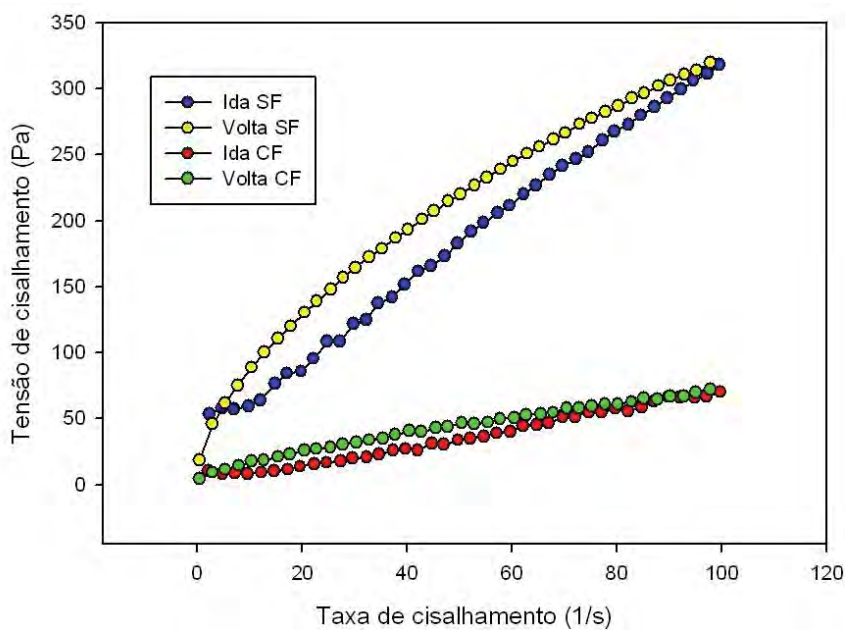


Figura 14: Comparativo das curvas de fluxo das EMs sem e com DK.

As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Cada categoria de produto deve apresentar, assim, um comportamento reológico adequado à aplicação respectiva, sendo conveniente conhecer as velocidades de deformação das operações a que vão estar sujeitas (LEONARDI, MAIA CAMPOS, 2001).

O termo reologia tem origem do grego *rheo* (fluxo) e *logos* (ciência), foi sugerido por Bingham e Crawford, para descrever as deformações de sólidos e a fluidez de líquidos (LABA, 1993; LEONARDI, MAIA CAMPOS, 2001)

Nos estudos de reologia existem os sistemas denominados Newtonianos e os não-Newtonianos. As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentam fluxo não Newtoniano, que normalmente é representado por 3 tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante (ANSEL, 2000).

Os fluidos não-newtonianos que apresentam uma dependência da tensão de cisalhamento com o tempo para uma taxa de deformação constante como uma propriedade reológica são subdivididos em tixotrópico e reopético (NAÉ, 1993). São tixotrópicos os fluidos que apresentam diminuição da taxa cisalhante ou da viscosidade, com o tempo de aplicação de certa taxa de cisalhamento, enquanto que os reopéticos apresentam aumento da tensão cisalhante ou da viscosidade com o tempo, mantendo-se a mesma taxa de deformação (PAL; YAN; MASLIYAH, 1992).

As EMs analisadas mostraram um comportamento reológico do tipo reopético ou anti-tixotrópico, onde há um aumento da tensão de cisalhamento ou viscosidade com o tempo e é um fenômeno raro de acontecer, porém essa alteração de viscosidade retorna ao seu normal, ou seja, é reversível.

A construção de reograma é útil para caracterizar quaisquer tipos de emulsões. Processos de instabilidade que causam a destruição dos glóbulos aumentam o volume da fase externa, e conseqüentemente provocam diminuição da viscosidade aparente da amostra em função do tempo (PY et al., 1994).

Quanto maior a diminuição da viscosidade com o tempo, maior a quantidade de fase dispersa, ou seja, menor a quantidade de glóbulos múltiplos (VASILJEVIC; VULETA; PRIMORAC, 2005). Porém isso não se aplica à formulação em análise, pois sua viscosidade aumentou com o tempo.

6.2.8. Teste de Bioadesão *in vitro*

Foram avaliadas suas amostras de EM, com e sem DK, para se fazer um comparativo e analisar se há alteração na capacidade bioadesiva da formulação com a incorporação do princípio ativo. Os resultados encontram-se na tabela 5:

Tabela 5: Bioadesão da EM sem e com DK.

	Bioadesão (N.s)	Força máxima (N)
EM sem DK	0,0166	0,01035
EM com DK	0,0163	0,00988

Utilizando o equipamento de analisador de textura, a força mais frequentemente avaliada em tais testes é a força de ruptura à tração. Neste teste, a força necessária para remover a formulação a partir de um modelo de membrana é medida e os resultados obtidos expressam uma curva que traduz a força necessária para separar a formulação do substrato biológico o trabalho de tração e o pico de força máxima para a ruptura (CARVALHO et al., 2010).

O estudo da adesão em sistemas biológicos é definido por dois conceitos básicos: o de bioadesão, um fenômeno de ligação entre macromoléculas sintéticas ou biológicas e o tecido biológico; e a mucoadesão, um tipo de bioadesão onde a interação primária dos materiais bioadesivos ocorre com um substrato constituído de muco (FERRARINI et al., 2007).

A bioadesão pode ser definida como qualquer substância que possa aderir a um substrato biológico e seja capaz de se manter na superfície por um longo período de tempo através de forças interfaciais (IRONS & ROBINSON, 2003).

A duração do efeito terapêutico em formulações convencionais é desfavorável devido à dificuldade de retenção da substância ativa no local de ação. Com isso, a eficácia terapêutica de um componente não depende apenas da sua atividade farmacológica intrínseca, mas de fatores relacionados aos componentes usados na formulação que favoreça o aumento do tempo de residência *in situ* da forma farmacêutica. Portanto, o desenvolvimento de formulações bioadesivas de liberação controlada é importante pela sua superioridade em relação às formas farmacêuticas convencionais (FERRARINI et al., 2007).

Uma abordagem amplamente utilizada para explicar as propriedades bioadesivas de sistemas dérmicos e transdérmicos é baseada na crença de que forças inter-atômicas ou intermoleculares são estabelecidas na interface de interação entre a pele e o material adesivo. Repka & McGinity (2001) apontam que vários mecanismos de adesão tem sido estudados e propostos, tais como, ligações de pontes de hidrogênio, considerações termodinâmicas da energia livre de superfície e do ângulo de contato entre adesivo e substrato, interpenetração da cadeia polimérica, e a taxa de molhamento do polímero interagindo com a pele.

As características bioquímicas da pele dos mamíferos não pode ser considerada a mesma entre as espécies pertencentes a este mesmo filo animal, mas de acordo com Scheuplein & Blank (1971) se alguma generalização é possível de ser feita, em particular, a pele do porco e do porquinho-da-índia podem servir como modelo aproximado para a pele humana.

Os resultados mostram que não há diferença na bioadesão com a adição do princípio ativo e que a capacidade de bioadesão destas formulações é relativamente baixa, porém está bem próxima da de géis poliméricos contendo CMCNa 1,5%, analisada por Oliveira (2011).

6.3. Avaliação da atividade antioxidante

Após a leitura das absorvâncias das amostras, calculou-se a porcentagem de inibição de DPPH do DK e do AK através da equação (1).

$$\% \text{ inibição do DPPH} = [(A0 - A1) / A0] \times 100 \quad (1)$$

onde: A0 = absorvância do controle; A1 = absorvância da amostra.

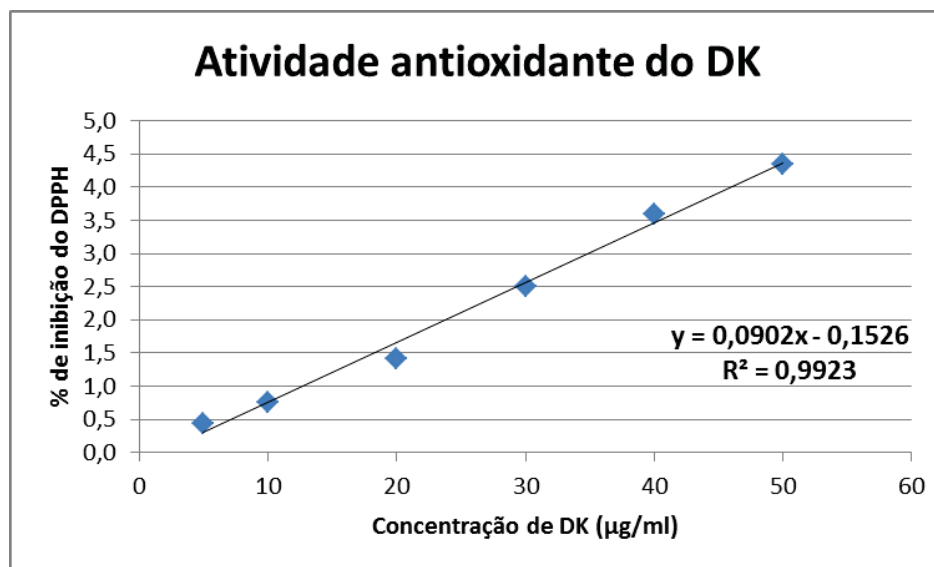


Figura 15: Atividade antioxidante do dipalmitato kójico.

Utilizando-se a equação da reta, é possível encontrar o IC₅₀ do DK: 0,556mg/ml.

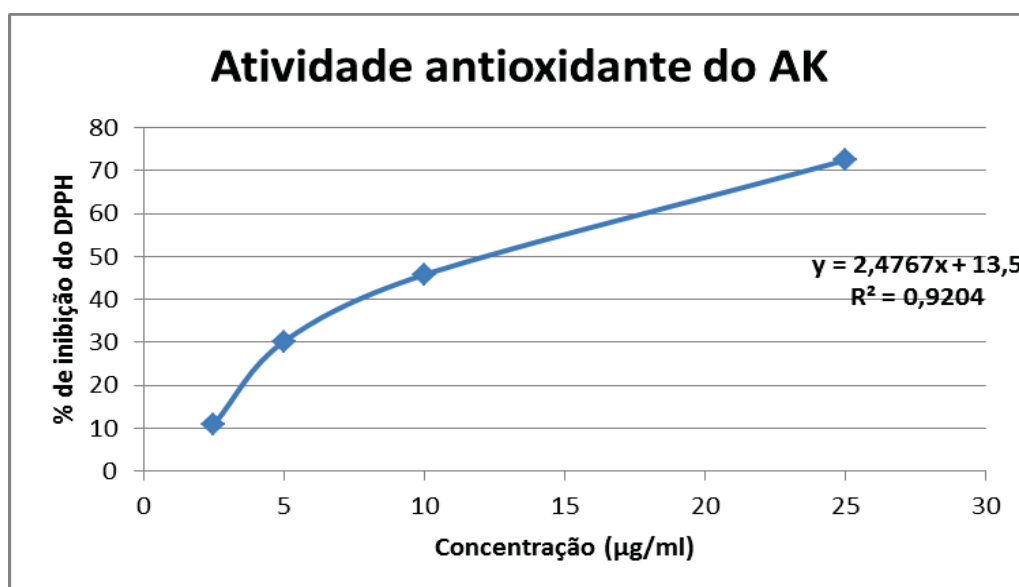


Figura 16: Atividade antioxidante do ácido kójico.

Utilizando-se a equação da reta, o IC₅₀ calculado do ácido kójico é de: 14,73 µg/ml.

O radical livre de DPPH• é estável, de coloração púrpura absorve luz a 517 nm, porém quando é reduzido para o composto 2,2-difenil-picril-hidrazina adquire coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção no comprimento de onda selecionado. Assim, o decréscimo da absorbância corresponde à porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional e pode ser utilizado para determinar a capacidade sequestradora de radicais livres (atividade antioxidante) da substância teste (MAGALHÃES et al., 2008).

A porcentagem de DPPH consumido pela substância-teste corresponde à atividade antioxidante, sendo que a concentração da substância-teste necessária para decrescer a quantidade inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória 50% (IC₅₀). Portanto, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua IC₅₀ e maior sua atividade antioxidante (SOARES et al., 1997).

Não foi possível calcular o IC₅₀ do DK incorporado na EM, pois os dados de absorbâncias não tinham relação nem linearidade com as concentrações analisadas, não sendo possível utilizar a equação da reta. Portanto, não foi possível comparar a capacidade antioxidante do DK incorporado na EM com o DK em solução.

6.5. Ação despigmentante *in vitro*

De acordo com a equação abaixo (2), foi possível calcular as porcentagens de inibição das diferentes concentrações de ácido kójico (tabela 4), para, posteriormente traçar uma comparação com o dipalmitato kójico:

$$IA (\%) = [(C-T_0)-(S-T_0)]/(C-T_0) \times 100 \quad (2)$$

onde IA = atividade inibitória;

C = absorbância do controle a 490 nm;

S = absorbância da amostra;

T₀ = absorbância no tempo zero.

Tabela 6: Porcentagem de inibição da tirosinase pelo Ácido kójico em diferentes concentrações.

Concentração do AK ($\mu\text{g/ml}$)	% de inibição		
	60 min	120 min	180 min
5,710	35,61	41,18	33,25
14,28	52,84	48,86	45,76
28,57	74,96	68,35	58,24

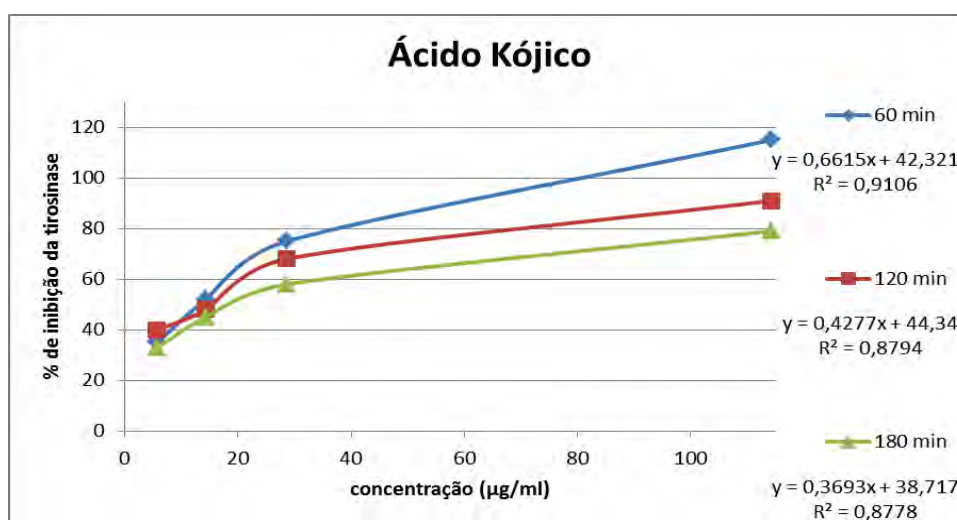


Figura 17: Porcentagem inibição da tirosinase pelo Ácido Kójico em diferentes concentrações.

Através das equações das retas contidas no gráfico, é possível calcular a IC_{50} do ácido kójico nos três diferentes tempos, mostrados na tabela a seguir:

Tabela 7: IC_{50} do ácido kójico nos tempos de 60, 120 e 180 min.

	Tempo (min)		
	60	120	180
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	11,6	13,23	30,55

De acordo com os resultados, é possível afirmar que a atividade despigmentante do AK é diminuída com passar do tempo, pois seu IC_{50} tem valor maior no tempo de 180 min (Tabela 7).

6.5.1 Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% da solução de dipalmitato kójico usando tirosinase com concentrações de 480 U/mL

Após 60, 120 e 180 min de incubação, analisou-se as absorbâncias e, conseqüentemente, as porcentagens de inibição da tirosinase do dipalmitato kójico e do dipalmitato kójico incorporado na emulsão múltipla.

Tabela 8: Porcentagem de inibição do DK e do DK incorporado na EM.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo (min)					
	60		120		180	
	DK na EM	DK	DK na EM	DK	DK na EM	DK
5,71	12,13	-1,15	122,39	-48,00	164,66	9,55
14,28	12,68	23,56	115,21	6,95	142,22	19,75
28,57	20,83	22,98	84,56	3,59	91,77	5,73
57,14	25,01	5,17	56,52	6,71	57,77	-7,64
114,28	32,97	10,34	41,30	3,11	39,55	26,75

De acordo com os dados de porcentagem de inibição da tirosinase do DK em solução e do DK incorporado na EM, conclui-se que não é possível fazer uma análise do IC_{50} em ambas as situações, pois não há uma relação de linearidade entre as concentrações e a porcentagem de inibição da tirosinase.

O ácido kójico foi adotado como controle positivo da inibição da reação, pois sabe-se que é um potente inibidor da tirosinase *in vitro* (SANDOVAL, 1999).

VII. CONCLUSÃO:

Diante dos resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que a formulação desenvolvida apresentou resultados esperados em relação às análises macroscópicas e de tamanho e distribuição dos glóbulos (análises microscópicas), através do microscópio óptico e do espalhamento dinâmico de luz, apresentando um tamanho de aproximadamente 1 μm de diâmetro dos glóbulos múltiplos.

De acordo com a análise estatística, utilizando-se teste t de Student, com nível de significância (0,05), as emulsões múltiplas não tiveram diferenças no pH, condutividade elétrica e teste de bioadesão após a incorporação do dipalmitato kójico.

Levando-se em consideração o potencial zeta, a emulsão múltipla analisada possui alta estabilidade ao longo do tempo (média de -13 mV) em função das forças de repulsão.

A emulsão múltipla com ou sem dipalmitato kójico incorporado apresentou um comportamento não-newtoniano reopético ou anti-tixotrópico, ou seja, sua viscosidade tende a aumentar com o tempo, quando aplica-se uma força, porém este é um fenômeno reversível. Pode-se observar que na formulação com o princípio ativo, é necessário aplicar uma força 4 vezes menor para se obter a mesma deformação.

Em relação à atividade antioxidante, o IC₅₀ calculado do dipalmitato kójico foi de 0,556 mg/ml, enquanto que o IC₅₀ do ácido kójico foi de 14,73 µg/ml, ou seja, a capacidade antioxidante do dipalmitato é aproximadamente 38 vezes menor que a do ácido kójico. Ainda que a essa atividade seja inferior à do ácido kójico, sabe-se que a ação tópica do primeiro está relacionada com a clivagem enzimática de sua ligação éster pelas enzimas estearases da pele.

Analisando-se a ação despigmentante, pode-se calcular apenas o IC₅₀ do ácido kójico, utilizado como controle, que foi de: 11,6 µg/ml após 60 minutos de incubação a 35°C no ensaio com a tirosinase. Os valores de IC₅₀ do DK em solução de metanol e do mesmo incorporado na emulsão múltipla não foram possíveis de se calcular, pois não houve uma relação de linearidade entre as concentrações das amostras e as absorbâncias.

Alguns possíveis fatores podem explicar a falta de resultados para análise das atividades antioxidante e despigmentante do DK na formulação: a baixa concentração do princípio ativo na EM (1%); um valor muito alto de IC₅₀ para ação despigmentante, a qual não foi analisada; a solubilidade do DK, onde em solventes lipofílicos não foi possível sua total solubilização, mesmo com o auxílio do ultra-som; a lenta liberação do DK de dentro das gotículas, o qual foi analisado até 24h, pois o DK deve transpor duas interfaces; ou o reagente, no caso o DPPH, estava em baixa concentração.

Davis e Walker (1987), Yazan et al. (1995), Garti (1997 a e b) e Benichou et al. (2004) identificaram os possíveis mecanismos para a liberação do princípio ativo a partir de sistemas múltiplos: difusão do ativo não ionizado através da camada intermediária; difusão do ativo ionizado ou não ionizado através de membranas líquidas óleo/água e coalescência da fase interna e ruptura dos glóbulos múltiplos. Portanto, é relevante salientar que alguns ensaios deveriam ser realizados para, primeiramente, analisar o comportamento do DK dentro dos glóbulos, tal como: coeficiente de

partição, pois substâncias extensamente lipofílicas, como é o caso do DK, podem não migrar da fase oleosa para a aquosa.

Em suma, não foi possível analisar as atividades antioxidante e despigmentante do DK incorporado na emulsão múltipla para se traçar um perfil comparativo, apenas pode-se afirmar que o DK possui menores atividades que o ácido kójico.

VIII. BIBLIOGRAFIA BÁSICA

AL-EDRESI, S.; BAIE S. In-vitro and in-vivo evaluation of a photo-protective kojic dipalmitate loaded into nano-creams. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 251-265, 2010.

ANSARI, S.A. Skin pH and skin flora. In: BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. New York: India: Informa Healthcare, 2009. p.221-232.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR., L. V.. *Farmacotécnica — Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos*. São Paulo: Premier, 2000. p.288-291.

ARAÚJO, A.L.N.; PINTO, S.F.M.; SOBRINHO, O.A.P.; SODRÉ, R.L.; NOGUEIRA, M.E. Peeling químico: avaliação de ácido glicólico, ácido retinóico e ATA. **Rev. Cosmiatr. Med Est.**, v.3, n.3, p.41-4, 1995. VI. DISSEMINAÇÃO E AVALIAÇÃO

AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos). Panorama do setor Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em: http://www.abihpec.org.br/conteudo/Panorama2009_Portugues.pdf. Acesso em: 01 abr. 2010.

BECHTOLD, I.H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Rev. Bras. Ens. Fis.**, v.27, n.3, p.333-342, 2005.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 108-109, p. 29-41, 2004.

BENECH, G. Novo ativo clareador extraído de cítricos. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, p.51-53, 2002.

BLICHMANN, C.W.; SERUP, J. Assessment of skin moisture. **Acta Dermatol. Venereol.**, v.68, p 284-90, 1988.

BRAND-WILLIAMNS; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebersm.Wiss.u.technol**, v.28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 47p, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2ª edição, Brasília: ANVISA, 2008.

BROOKS, B. W.; RICHMOND, H.N.; ZERFA, M. Phase inversion and drop formation in agitated liquid – liquid dispersions in the presence of nonionic surfactants. In: BINKS, B. P. **Modern Aspects of Emulsion Science**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry (Ed), 1998, p. 175-203.

BUENGER, J.; ACKERMANN, H. et al. An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, p. 135-146, 2006.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, v.58, p.79-110, 1989.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery system. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.46, n.1, p. 1-17, 2010.

CASTRO, A. C.; PIMENTEL, L. C.; DORANDE, I. Tratamento da hiperpigmentação: uva-ursiva versus hidroquinona. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 9, p. 39-43, 1997.

COSTA, A. F.; **Farmacognosia**. 5ª edição, volume II. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2002. pg. 742, 743, 744, 745, 746, 747.

CUCÉ, L.C.; FESTA NETO, C. **Manual de Dermatologia**. São Paulo: Atheneu, 1990. 493p.

DAVIS, S. S.; WALKER, I.M. Multiple emulsions as targetable delivery systems. **Methods in Enzimology**, v. 149, p. 51-62, 1987.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ed., v.II, 2010.

FERRARINI, M.; BABY, A.R.; PINTO, C.A.S.O.; VELASCO, M.V.R.; PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M. Influência do Kollidon® 90 F e do Polyox® WSR301NF na força de adesão de comprimidos bucais de clorexidina. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, n.4, p.541-547, 2007.

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. **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.; A.A. SILVA-JUNIOR; GREMIAO, M.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsoes e fases liquidas cristalinas como sistemas de liberacao de farmacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.301-313, 2005.

GARTI, N. Double emulsions – scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicolchemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 123-124, p. 233-246, 1997a.

GARTI, N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Berlin, v. 30, n. 03, p. 222-235, 1997b.

GLASL, H Zur photometrie in der drogenstandardisierung- 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.123, p.1979-1987, 1983

GRIMES, P. E. The safety and efficacy of salicylic acid chemical peels in darker racial-ethnic groups. **Dermatol_Surg**, New York, v. 25, p. 18-22, 1999.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R.J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug discovery today*, v.15, n.23-24, p.1032-1040, 2010.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mut. Res.**, v.275, p.257-266, 1992.

HARRIS, M.I.N.C. **Envelhecimento: alterações cutâneas e tratamentos dermatológicos e cosméticos**. São Paulo: Racine, 2006.

HERNANDEZ, M; FRESNEL, M.M.M. **Manual de Cosmetologia**. São Paulo: Revinter, p. 19-45, 1999.

IRONS, B.K.; ROBINSON, J.R. Bioadhesives in drug delivery. In: PIZZI, A.; MITTAL, K.L. *Handbook of Adhesive Technology*. New York: Marcel Dekker, 2003. p.957-970.

JAYME, M. L.; DUNSTAN, D. E.; GEE, M. L. Zeta potentials of gum Arabic stabilized oil in water emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, p. 459-465, 1999.

JEONG, M. W.; OH, S. G.; KIM, Y. C. Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 181, p. 247-253, 2001.

KASZUBA, M.; CONNAH, M.; MATTISON, K. High concentration particle size measurements using dynamic light scattering. **Lab Plus International**, Mavern-UK, 2004.

KHANONM, F.; KAYAHARA, H.; TADASA, K. Tyrosinase inhibitory activity of bangladeshi indigenous medicinal plants. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.69, n.9, p.1967-1969, 2000.

KOBAYASHI, Y.; KAYAHARA, H.; TADASA, K.; NAKAMURA, T.; TANAKA, H. Synthesis of amino acid derivatives of kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.9, p.1745-1746, 1995.

LABA, D. *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries*. New York: Marcel Dekker, 1993. P.09-33.

LAM, A.Y.M.; WONG, D.S.Y.; LAM, L.K.; HO, W.S., CHAN, H. H. L. A Retrospective Study on the Efficacy and Complications of Q-Switched Alexandrite Laser in Treatment of Acquired Bilateral Nevus of Ota-like Macules. **Dermatologic Surgery**, New York, v. 27, p. 937-942, 2001.

LEBEL, C.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. Evaluation of probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v.5, p.227-231, 1992.

LEE, K.K.; CHOI, J.D. *Areca catechu* L. Extract. II. Effects on inflammation and melanogenesis. **Journal of Cosmetic Science**, Washington v.49, p.351-359, 1998.

LEE, O. S.; KIM, E. J. Skin Lightening. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v. 110, p. 51-56, 1995.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Substâncias ativas em dermatologia. **Racine**, v.1, n.36, p.11-3, 1997.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.. Estabilidade de formulações cosméticas. *Int. J. Pharm. Compounding*, v. 3, n. 4, p.154-156, 2001.

LÉVÊQUE, J. L. Caracterização biofísica do fotoenvelhecimento cutâneo. **Cosmét. Lin.**, n.106, p. 55-66, 1997.

MAEDA, K.; FUKUDA, M. In Vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, New York, v. 42, p. 316-368, 1991.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v.613, p.1-19,2008.

MAJMUDAR, G.; JACOB, G.; LABOY, Y.; FISHER, L. Na in vitro method for Screening skin-whitening products. *Journal of Cosmetic Science*, Washington, v.49, p. 361-367, 1998.

MARTINS, S. Bioquímica e fisiologia da pele humana aplicados no desenvolvimento de formulações cosméticas. **Apostila Racine Cosmetologia Express: desenvolvimento de produtos cosméticos**. São Paulo, v. 4, p. 62-100, 2003.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int. J. Pharm.*, v.289, n.1/2, p.117-131, 2005.

MASUDA, M.; TEJIMA, T.; SUZUKI, T. Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries*, v.111, p.65-77, 1996.

MIKULA, R.J. Emulsion characterization. In: SCHRAMM, L.L. **Emulsions – Fundamentals and Applications in the petroleum industry**. Washington: Advances in Chemistry Series, 1992. p.70-130.

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)**.

Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 158p, 2006.

MORLIERE, P. Ultraviolet A et peau: implications d'espèces activées de l'oxygène, tendances actuelles et résultats récents. **Phatol. Biol.**, v.40, p.160-168, 1992.

NAÉ, H.N. Introduction to rheology. In: LABA, D. Rheological properties of cosmetics and toiletries. New York: Marcel Dekker, 1993. p.9-33. Cosmetic Science and Technology Series, v.13.

NOGUEIRA, A.C.S. Efeito da radiação ultravioleta na cor, na perda protéica e nas propriedades mecânicas do cabelo (Dissertação de Mestrado – Unicamp). P. 3-5, 2002.

OBAGI, Z. E. Anatomia e fisiologia da pele: uma visão pessoal. Rio de Janeiro: **Revinter**, p. 13-22, 2004.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MULLER, R. H.; KECK, C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **Eur J Pharm Biopharm**, v, 76, p, 56-67, 2010.

OLIVEIRA, P. L. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas líquido-cristalinos contendo palmitato de retinol: quantificação química, avaliação da atividade antioxidante, estudos de liberação e bioadesão *in vitro*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 183p, 2011.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int. J. Pharm.*, v.289, n.1/2, p.117-131, 2005.

MASUDA, M.; TEJIMA, T.; SUZUKI, T. Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries*, v.111, p.65-77, 1996.

PAL, R.; YAN, Y.; MASLIYAH, J. Rheology of Emsulsions. In: SCHRAMM, L.L. Emulsions - Fundamentals and Applications in the petroleum industry. Washington: Advances in Chemistry Series, 1992. p.131-170.

PECORA, R. **Dynamic Light Scattering**. ISBN 0306417901, Springer, 436p, 1985.

PINTO, P.; GALEGO, N.; SILVA, N.; FITAS,M.; QUARESMA, P.; MAGALHÃES, C.; HENRIQUES, A.; RIBEIRO, H.M.; PEREIRA, L.M.; RODRIGUES, L. Definição de critérios de avaliação dos efeitos sobre a superfície cutânea de cremes hidratantes: I – análise após uma aplicação. **Rev. Port. Farm.**, v.47, n.1, p.23-34, 1997.

PY, C.; ROUVIERE, J.; LOLL, P.; TAELEMAN, M. C.; TADROS, T. F. Investigation of multiple emulsion stability using rheological measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 91, p. 215-225, 1994.

- PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; GESZTESI, J.L.; COSTA, F. Estudo in vivo de atividade antirradicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, sup.3, p.S323-328 2005.
- RIBEIRO, C. Comportamento consumidor de produtos *personal care* e naturais. **In:** Cosmetic Show. Disponível em: www.medicatriz.com.br/cosmeticosecnicos. Acesso em: 01 abr. 2010.
- RIBEIRO, C.; OHARA, M. T. Hiperpigmentação localizada da pele – Manifestação inestética que exige cuidados. **Revista Racine**, São Paulo, v.67, p. 62-66, 2002.
- RIBEIRO, C. J. **Cosmetologia aplicada a Dermoestética**. 1ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.
- RIEGER, M. O envelhecimento intrínseco. **Cosmet. Toiletr.**, v.8, n.4, p.34-50, 1996.
- REPKA, M.A.; MCGINITY, J.W. Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical films produced by hot-melt extrusion. *Journal of Controlled Release*, v.70, p.341-351, 2001.
- ROBINS, A.H. **Biological perspectives on human pigmentation**. Great British: Cambridge University Press, 1991. 253p.
- RODRIGUES, L.; PINTO, P.; SILVA, N.; GALEGO, N.; QUARESMA, P.; FITAS, M.; PEREIRA, L.M. Caracterização da eficácia biológica de hidratantes por análise dinâmica do conteúdo hídrico epidérmico e profilometria de transmissão luminosa. **Cosmet. Toiletr.**, v.9, n.2, p. 44-9, 1997.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v.92, n.2, p.235-254, 2005
- ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. Pothomorphe umbellata Extract Prevents alfa-Tocopherol Depletion after UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology** v, 78, p. 436-439, 2003.
- SANDOVAL, B. Tratamiento del melasma com Ácido Kójico. **Folia Dermatológica Peruana**, Lima, v.10, n. 1, p. 53-56, 1999.
- SAUERBRONN, A.V.D.; FONSECA, A.M.; BAGNOLE, V.R.; ASSIS, J.S.; PINOTTI, J.A.; Efeitos do hipoestrogenismo e do envelhecimento sobre a pele. **Rev. Ginec. e Obstet.**, 9(4):246-251, 1998.
- SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H. Permeability of skin. *Physiological Reviews*, v.51, n.4, p.702-747, 1971.
- SILVA, E. C., **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade das formulações contendo arbutina, associada ou não ao ácido glicólico**. Dissertação de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 1998.
- SILVA, E. C.; SOARES, I. C. Tecnologia de Emulsões. **Cosmetics and Toiletries** (Edição em português), v. 8, p. 37-45, 1996.
- SIMÕES, C. M. O. et al; **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Editora da UFSC, Porto Alegre, 2007. pg 895, 896.

SOARES, J.R.; DINIS, C.P.; CUNHA, A.P.; ALMEIDA, L. Antioxidant activities of some extracts of thymus zygis. **Free Radical Research**, v.26, n.5, p.469-478, 1997.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e a atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SU, E. G. Formulando com branqueadores da pele, **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 57-63, 1999.

TAGAMI, H.; OHI, M.; IWATSUKI, K.; KANAMARU, Y.; YAMADA, M.; ICHIJO, B. Evaluation of the skin surface hydration in vivo by electrical measurement. **J. Invest. Dermatol.**, v. 75, n. 6, p. 500 – 7, 1980.

THIBODEAUS, A. Controle das MMPs durante o branqueamento da pele. **Cosmetic & Toiletries**. São Paulo, ISSN 0103-4030, v. 16, n. 4, p. 72-74, 2004.

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v. 16, n° 7/8, p. 716-718, 2000.

VASILJEVIC, D; VULETA, G.; PRIMORAC, M. The characterization of the semi-solid W/O/W emulsions with low concentration of the primary polymeric emulsifier. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 27, p. 81-87, 2005.

WATANABE, M.; TAGAMI, H.; HORRI, I.; TAKAHASHI, M.; KLIGMAN, A.M. Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis. **Arch. Dermatol.**, v.127, n.9, p.1689-92, 1991.

YAZAN, Y.; ARALP, U.; SEILLER, M.; GROSSIORD, J. L.; PVP in multiple emulsions. **Cosmetic & Toiletries**, New York, v. 110, n. 09, p. 53-57, 1995.

ZUIDHOFF, H. W.; VAN, RIJSBERGEN, J. M. Whitening Efficacy of frequently used whitening ingredients. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v. 116, n. 1, p. 53-59, 2001.