



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS**

---

**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***

**PAULA LACERDA OLIVEIRA**



**ARARAQUARA – SP**

**2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

**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***

**PAULA LACERDA OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Prof. Dr. Maria Virgínia Scarpa

**Co-orientador:** Prof. Dr. Marlus Chorilli

**ARARAQUARA-SP**

**2011**



## Ficha Catalográfica

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

O48d Oliveira, Paula Lacerda  
Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas líquido-cristalinos contendo palmitado de retinol: quantificação química, avaliação da atividade antioxidante, estudos de liberação e bioadesão *in vitro* / Paula Lacerda Oliveira. – Araraquara, 2011  
183 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Orientador: Maria Virgínia Scarpa  
Co-orientador: Marlus Chorilli

1. Sistemas líquido-cristalinos. 2. Palmitato de retinol, 3. DPPH. 4. Liberação *in vitro*. 5. Bioadesão *in vitro*. I. Scarpa, Maria Virgínia, orient. II. Chorilli, Marlus, co-orient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

*Folha de Aprovação*

---

**Presidente e Orientador** - Prof. Dr. Maria Virgínia Scarpa

**Co-Orientador** – Prof. Dr. Marlus Chorilli

**1º Examinador** – Prof. Dr. Eneida de Paula

**2º Examinador** – Prof. Dr. Sandra Helena Pulcinelli



**Araraquara, 22 de março de 2011.**

## *Dedicatória*

---

### *Dedico este trabalho e todas as etapas da minha vida à:*

*Deus, meu Senhor e Criador, que sempre me deu forças para seguir o seu caminho, ainda que muitas vezes eu não entendesse o propósito d'Ele para mim.*

**“As pessoas podem fazer seus planos, porém é o Senhor Deus quem dá a última palavra (Provérbios 16.1).”**

*Aos meus pais **Cláudio** e **Sílvia** por inúmeros motivos ... pelo grande amor e carinho que me deram, pela educação e princípios de vida e inclusive pelo grande esforço em me proporcionarem os estudos.*

*Aos meus irmãos **Mário** e **Caio** que sempre estiveram muito presentes na minha vida, desde a nossa infância muito feliz.*

*À minha querida **avó Vera** que sempre foi e é uma boa lembrança de doçura que tenho no meu coração. Ao meu **avô Kléber** “in memoriam” pelas boas lembranças que tenho da minha tenra infância na sua companhia.*

*Aos meus tios **Renata**, **Márcia**, **Sérgio**, **John**, **César** e **Stela** por todos os bons momentos que passamos juntos.*

*Aos meus queridos primos que os guardo no coração pelo grande amor que há entre nós: **Maurício**, **Marina**, **Fernando**, **Thiago**, **Murilo**, **Sabrina**, **Serginho** e **Alexandre**.*

*Ao meu querido namorado **Rafael**, um pessoal tão querida e que tanto eu admiro, chegou trazendo imensas alegrias e a certeza de Deus na minha vida. Sentirei muitas saudades dos momentos muito felizes e descontraídos que tivemos em Araraquara.*

*E às minhas mais que amigas, às “irmãzinhas”, **Jemima**, **Renata** e **Thais** que foram a família que Deus me deu enquanto eu estive em Araraquara. E com muito carinho à querida **Jemima** pela grande irmã, amiga e companheira que se tornou na minha vida.*

## Agradecimentos

---

Tenho especial agradecimento à minha orientadora **prof. Dr. Maria Virgínia Scarpa** pela oportunidade de realizar este trabalho e pela oportunidade de amadurecimento pessoal e profissional que me trouxe durante os anos em que eu estive na sua companhia.

Ao meu co-orientador **prof. Dr. Marfus Chorilli** que vem me acompanhando na minha vida acadêmica e científica desde a minha época de graduação. Agradeço muito seu carinho, atenção e colaboração!

À todos os professores e funcionários que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, aos **prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa** e **prof. Dr. Wagner Villegas** pela disponibilização de matérias-primas e aos **prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, Dr. Maria Palmira Daffon Gremião** e **Dr. Vera Lúcia Borges Isaac** pela disponibilização de uso dos equipamentos em seus laboratórios. E também com especial agradecimento aos funcionários **Maria de Fátima, Margarete, Angélica, Giovani, Dudu, Matheus, Osmar, Ilza** e **Marcos** pela atenção e ajuda que sempre prestaram.

Ao **prof. Dr. José Paschoal Batistutti** pelo auxílio que me deu em alguns cálculos referentes à validação analítica efetuada neste trabalho.

Aos **prof. Dr. Marcos Antônio Côrrea** e **Dr. Leila Aparecida Chiavacci** pelas valiosas sugestões no meu exame geral de Qualificação, que muito colaboraram para o amadurecimento de idéias deste trabalho. Às **prof. Dr. Eneida de Paula** e **Dr. Sandra Helena Pulcinelli** pela grande contribuição na lapidação final do trabalho.

À empresa **Dow Corning do Brasil®** que gentilmente forneceu os silicões utilizados neste trabalho. Ao **CNPQ** pela bolsa financeira de estudos concedida.

Aos estagiários **Bete** e **Daniel** pela colaboração, sempre com muita dedicação, que prestaram na realização de algumas etapas deste trabalho. Às colegas de mestrado **Vanessa** e **Vânia** que colaboraram na realização dos testes de atividade antioxidante *in vitro*, em especial, à **Vânia** pelo nosso reencontro no laboratório depois de termos morado juntas.

Aos colegas de trabalho pela oportunidade de levar um “pedacinho” da contribuição de cada um de vocês na minha vida: **Flávia Ribeiro, Eliete, Flávia Chiva, Flávia Fiorentino, Lucélia, Rudy, Cris Laignier, Sílvio, Josi, Gisela, Fernanda, Bruna, Ana Paula, Juliana, Guilherme Emerick, Grazi, Patrícia, Letícia, Jack, Geysi, Bruna, Márcia, Ju** e **Elô**.

Ao meu querido **Rafael** pelas vezes que me buscou tão tarde da noite na faculdade, sempre com muita alegria, boa vontade e disposição. Te amo tanto, meu Amor !!!

Aos funcionários da Biblioteca que sempre prestaram seus serviços com muito carinho e dedicação: **Ana, Rita, Max, Camila** e **Moacir**. Às funcionárias **Cláudia, Laura, Sônia** e **Ângela**, da seção de Pós-Graduação, pela competência que sempre realizaram seu trabalho. E aos funcionários da portaria da Unesp (**Olívia, Chico** e **Tiana**) e do Residencial Marina (**Carlos, Edilson, Luiz** e **Vagner**) que sempre zelaram por todos.

*“ Quando estiver em dificuldade  
E pensar em desistir,  
Lembre-se dos obstáculos  
Que já superou.  
OLHE PARA TRÁS.*

*Se tropeçar e cair,  
levante,  
Não fique prostrado,  
Esqueça o passado.  
OLHE PARA FRENTE.*

*Ao sentir-se orgulhoso,  
Por alguma realização pessoal,  
Sonde suas motivações.  
OLHE PARA DENTRO.*

*Antes que o egoísmo o domine,  
Enquanto seu coração é sensível,  
Socorra aos que o cercam.  
OLHE PARA OS LADOS.*

*Na escalada rumo às altas posições  
No afã de concretizar seus sonhos,  
Observe se não está pisando em alguém  
OLHE PARA BAIXO.*

*Em todos os momentos da vida,  
Seja qual for sua atividade,  
Busque a aprovação de Deus!  
OLHE PARA CIMA.*

*Nunca se afaste de seus sonhos,  
pois se eles se forem,  
você continuará vivendo,  
mas terá deixado de existir. “*

*Ó Senhor Deus, eu te agradeço de todo o coração; diante de todos os deuses eu canto hinos de louvor a ti. Por causa do teu amor e da tua fidelidade, eu me ajoelho virado para o teu santo Templo e dou graças a ti. Pois tens mostrado que o teu nome e as tuas promessas estão acima de tudo. Quando te chamei, tu me respondeste e, com o teu poder, aumentaste as minhas forças.*

*Ó Senhor Deus, todos os reis da terra te louvarão quando ouvirem falar das tuas promessas. Eles cantarão a respeito das coisas que tu, ó Senhor, tens feito, pois grande é a tua glória. Tu estás lá nas alturas, mas assim mesmo te interessas pelos humildes, e os orgulhosos não podem se esconder de ti.*

*Quando estou cercado de perigos, tu me dás segurança. A tua força me protege do ódio dos meus inimigos; tu me salvas pelo teu poder. Tu cumprirás tudo o que me prometeste. O teu amor dura para sempre, ó Senhor Deus. Não abandones o trabalho que começaste.*

### **Salmos 138**

**Charles Chaplin (1889-1977)**

## RESUMO

---

As hipóteses mais modernas baseiam o processo de envelhecimento cutâneo em duas teorias: o intrínseco (ou cronológico) e o extrínseco (ou fotoenvelhecimento). Tanto no envelhecimento intrínseco como no extrínseco, as principais alterações da pele são caracterizadas por formação de rugas, flacidez e perda da elasticidade. O palmitato de retinol (PR) é um análogo sintético da vitamina A indicado topicamente para prevenir ou retardar algumas mudanças estruturais e funcionais da pele associadas ao processo de envelhecimento cutâneo, porém é um princípio ativo que apresenta estabilidade química limitada frente à umidade, oxigênio, ácidos, metais e exposição à luz. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema líquido-cristalino à base de silicone para a liberação prolongada e maximização da estabilidade do palmitato de retinol. Utilizando-se o método de titulação da fase aquosa, foram construídos dois diagramas ternários de fases, ambos constituídos por Procetyl AWS<sup>®</sup> (tensoativo) e água e por silicone DC 5330<sup>®</sup> (fase oleosa no diagrama 1) ou silicone DC 5329<sup>®</sup> (fase oleosa no diagrama 2). Nos estudos de estabilidade preliminar, as formulações do diagrama 1 (A, B, C e D) e do diagrama 2 (E, F, G e H) foram avaliadas nos seguintes estudos: microscopia de luz polarizada, centrifugação, pH, condutividade eletrolítica, índice de refração e reologia. Dentre estas formulações estudadas preliminarmente, a formulação G<sub>PR</sub> foi selecionada para ser conduzida aos estudos posteriores após a incorporação de 1% do princípio ativo, pois demonstrou a formação de fases líquido-cristalinas evidenciadas sob luz polarizada no microscópio óptico, apresentou-se compatível com o pH fisiológico da pele, apresentou pequeno coeficiente de variação das medidas realizadas referentes aos parâmetros físico-químicos e menor capacidade de desestruturar a bicamada lipídica da pele em função de possuir menor concentração de tensoativo. A metodologia analítica validada para a quantificação química do palmitato de retinol acrescido na formulação G<sub>PR</sub> demonstrou que o prazo de validade do produto esteve compreendido entre 135 e 150 dias à 5,0 ± 2,0°C e 25,0 ± 2,0°C e entre 7 e 15 dias à 40,0 ± 2,0°C. Com a realização do estudo da atividade antioxidante e do perfil de liberação *in vitro*, verificou-se que a formulação G<sub>PR</sub> também foi capaz em aumentar a estabilidade funcional e prolongar a liberação do palmitato de retinol. O estudo de bioadesão *in vitro* no analisador de texturas em associação com o método reológico oscilatório elucidou de modo conclusivo que a maior capacidade de fixação das formulações testadas à pele do modelo animal utilizado esteve diretamente relacionado com o predomínio do comportamento elástico (G') em tais formulações.

**Palavras-chaves:** sistemas líquido-cristalinos; palmitato de retinol, DPPH, liberação *in vitro*; bioadesão *in vitro*.



## ABSTRACT

---

Current hypotheses based on the process of skin aging in two theories: the intrinsic (or chronological) and extrinsic (or photoaging). Both in the extrinsic as intrinsic aging, the main skin disorders are characterized by wrinkles, flaccidity and loss of elasticity. Retinyl palmitate (RP) is a synthetic analogue of vitamin A given topically to prevent or delay some structural and functional changes of the skin associated with aging, but is an active principle that has limited chemical stability against moisture, oxygen, acids, metals and exposure to light. Thus, the aim of this study was to develop liquid crystalline system silicon-based for extended release and maximizing the stability of retinyl palmitate in order to optimize the use of topically active principle in the prevention and / or mitigation of aging skin. Using the method of titration of the aqueous phase, was built two ternary phase diagrams, both consist of Procetyl AWS® (surfactant) and water and silicone DC 5330® (oil phase diagram 1) or silicone DC 5329® (phase oil in diagram 2). In preliminary studies of stability, the formulations of the diagram 1 (A, B, C and D) and the formulations of the diagram 2 (E, F, G and H) were evaluated in the following studies: polarized light microscopy, centrifugation, pH, electrolytic conductivity, refraction index and rheology. Among these formulations studied preliminarily, the formulation G RP-loaded was selected to be conducted to further studies, since it showed the formation of liquid crystalline phases evidenced by polarized light in an optical microscope, presented consistent with the physiological pH of skin, had a small coefficient of variation of measurements related to the physicochemical and less ability to disrupt the lipid bilayer of the skin due to have a lower concentration of surfactant. The validated analytical methodology for chemical quantification of retinyl palmitate loaded in the formulation G liquid-crystalline, which demonstrated the validity of the product was between 135 and 150 days to  $5.0 \pm 2.0$  ° C and at  $25, 0 \pm 2.0$  ° C and between 7 and 15 days to  $40.0 \pm 2.0$  ° C. With the implementation of the study of antioxidant activity and the release profile *in vitro*, it was noted that the formulation G<sub>PR</sub> was also able to increase the functional stability and prolong the release of retinyl palmitate. The study of bioadhesion *in vitro* in texture analyzer in combination with the oscillatory rheological method elucidated conclusively that the greatest binding capacity of test preparations to the skin of the animal model used was directly related to the predominance of elastic behavior (G') in such formulations.

**Keywords:** liquid crystalline systems; retinyl palmitate; DPPH; release *in vitro*; bioadhesion *in vitro*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

A	= área;
AA	= atividade antioxidante;
Abs	= absorvância;
ANVISA	= Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
A/O	= água em óleo;
C934P	= carbopol 934P;
C940	= carbopol 940;
CE	= condutividade eletrolítica;
CMCNa	= carboximetilcelulose sódica;
CMC	= concentração micelar crítica;
CV	= coeficiente de variação;
DPPH	= 2,2-difenil-1-picril-hidrazila;
DNA	= ácido desoxirribonucléico;
DP	= desvio padrão;
EHL	= equilíbrio hidrófilo-lipófilo;
EO	= oxietilênicas;
F	= força;
Fr	= fator de recuperação;
IL-10	= interleucina-10;
INCI	= do inglês, <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i> ;
INMETRO	= Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;
IR	= índice de refração;
MMP-1	= metaloproteínase-1 da matriz;
O/A	= óleo em água;
OECD	= do inglês, <i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i> ;
PBS	= tampão fosfato de sódio (abreviatura em inglês, <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCA	= 2-pirrolidona-5-ácido carboxílico;
pH	= potencial hidrogeniônico;
PO	= oxipropilênicas;
p/p	= peso / peso;
PR	= palmitato de retinol;

RE	= Resolução;
rpm	= rotações por minuto;
SCCL	= do inglês, <i>Stratum Corneum Cathepsin L-like protease</i> ;
SF	= separação de fases;
SLO	= sistema líquido opaco;
SLT	= sistema líquido transparente;
SST	= sistema semitransparente;
SVO	= sistema viscoso opaco;
SVT	= sistema viscoso transparente;
TNF- $\alpha$	= fator alfa de necrose tumoral;
TEA	= teste de estabilidade acelerada;
TEP	= teste de estabilidade preliminar;
UI	= unidades internacionais;
UV	= ultravioleta;
UVA	= ultravioleta A;
UVB	= ultravioleta B;
UVC	= ultravioleta C;

# LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES E GRANDEZAS

---

## Símbolos

$dy$	= altura da camada molecular
$\tan \delta$	= ângulo de fase;
$^{\circ} C$	= graus Celsius;
$k$	= coeficiente de consistência;
$k$	= constante da velocidade de liberação;
$[ ]$	= concentração;
$r^2$	= coeficiente de correlação linear;
$\lambda$	= comprimento de onda;
$\lambda_{\text{máx.}}$	= comprimento de onda de máxima absorção;
$\zeta_{\text{relativa}}$	= densidade relativa;
$G$	= energia livre de Gibbs;
$\Gamma_i$	= excesso superficial positivo;
$L_{\alpha}$	= fase líquido cristalina lamelar;
$H_I$	= fase líquido cristalina hexagonal normal;
$H_{II}$	= fase líquido cristalina hexagonal reversa;
$Q$	= fase líquido cristalina cúbica;
$n$	= índice de escoamento;
®	= marca registrada;
$m$	= massa;
$   $	= módulo;
$G'$	= módulo de armazenamento, ou elástico;
$G''$	= módulo de perda, ou viscoso;
$\pm$	= mais ou menos;
%	= porcentagem;
$Q_{\text{real}}$	= quantidade da substância ativa liberada em $\mu\text{g/mL}$ ;
$Q$	= quantidade da substância ativa liberada em $\mu\text{g/cm}^2$ ;
$\text{sen } \hat{i}$	= seno do ângulo de incidência;
$\text{sen } \hat{r}$	= seno do ângulo de refração;
$\Sigma$	= somatória;
$\gamma$	= taxa de cisalhamento;
$\tau$	= tensão de cisalhamento.

$t$	= tempo;
$t_A$	= tempo da estabilidade acelerada;
$t_P$	= tempo da estabilidade preliminar;
$t_0$	= tempo experimental;
$t_r$	= tempo de relaxamento da tensão;
$\Delta G$	= variação da energia livre de Gibbs;
$\Delta H$	= variação de entalpia;
$\Delta S$	= variação de entropia;
$dv$	= velocidade de deslocamento;
$\eta$	= viscosidade;
$V$	= volume;

### **Unidades**

Hz	= hertz;
cm	= centímetro;
cm <sup>2</sup>	= centímetro quadrado;
$\mu\text{g}$	= micrograma;
mg	= miligrama
M	= molar;
m	= metro;
m <sup>2</sup>	= metro quadrado;
mL	= mililitros;
N	= newton;
nm	= nanômetros;
Pa	= Pascal.

### **Grandezas**

N	= dureza;
N.s	= bioadesão;
N.s	= compressão;
$\text{l}^{\text{s}^{-1}}$	= taxa de cisalhamento;
N/m	= tensão superficial ou interfacial;
Pa	= tensão de cisalhamento;
$\text{Pa}^{-1}$	= compliância;
Pa.s	= viscosidade.

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b> – Classificação dos testes, de acordo com a finalidade. ....	49
<b>Tabela 2</b> – Ensaio necessários para a validação do método analítico segundo a finalidade. ....	49
<b>Tabela 3</b> – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações líquido-cristalinas selecionadas do diagrama 1 para estudo nos TEP. ....	65
<b>Tabela 4</b> – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações líquido-cristalinas selecionadas do diagrama 2 para estudo nos TEP. ....	65
<b>Tabela 5</b> – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações emulsionadas I e J selecionadas do diagrama 2 para determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> e estudo da liberação <i>in vitro</i> , respectivamente. ....	66
<b>Tabela 6</b> – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações líquido-cristalinas K e L selecionadas do diagrama 2 para ensaio de bioadesão <i>in vitro</i> . ....	66
<b>Tabela 7</b> – Concentração percentual (% p/p) dos polímeros empregados para o preparo dos géis avaliados no ensaio de bioadesão <i>in vitro</i> . ....	67
<b>Tabela 8</b> – Concentrações utilizadas das soluções de palmitato de retinol (material referência) em 2-propanol para a construção da curva analítica do método espectrofotométrico, na região do UV, no comprimento de onda de máxima absorção (em nanômetros). ....	72
<b>Tabela 9</b> – Concentrações utilizadas das soluções de palmitato de retinol (matéria prima) para a construção do intervalo linear do método espectrofotométrico, na região do UV, no comprimento de onda de máxima absorção (em nanômetros). ....	73
<b>Tabela 10</b> – Preparo das amostras para determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do palmitato de retinol ou do ácido retinóico, por espectrofotometria, no comprimento de onda de 517 nm. ....	77
<b>Tabela 11</b> – Preparo das amostras para verificação da especificidade da reação de redução do radical livre DPPH. ....	78
<b>Tabela 12</b> – Preparo das amostras para determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> das formulações G e I contendo ou não 1% de palmitato de retinol, por espectrofotometria, no comprimento de onda de 517 nm. ....	79
<b>Tabela 13</b> – Composição dos meios receptores. ....	80
<b>Tabela 14</b> – Resultados da determinação do potencial hidrogeniônico (pH) das formulações A, B, C e D (diagrama 1), no TEP, nos tempos $t_{1P}$ e $t_{2P}$ . ....	104
<b>Tabela 15</b> – Resultados da determinação do potencial hidrogeniônico (pH) das formulações E, F, G e H (diagrama 2), no TEP, nos tempos $t_{1P}$ e $t_{2P}$ . ....	104

<b>Tabela 16</b> – Resultados da determinação da condutividade eletrolítica das formulações A, B, C e D (diagrama 1), no TEP, nos tempos $t_{1P}$ e $t_{2P}$ . .....	105
<b>Tabela 17</b> – Resultados da determinação da condutividade eletrolítica das formulações E, F, G e H (diagrama 2), no TEP, nos tempos $t_{1P}$ e $t_{2P}$ . .....	107
<b>Tabela 18</b> – Resultados da determinação do índice de refração das formulações A, B, C e D (diagrama1), no TEP, nos tempos $t_{1P}$ e $t_{2P}$ . .....	109
<b>Tabela 19</b> – Resultados da determinação do índice de refração das formulações E, F, G e H (diagrama2), no TEP, nos tempos $t_{1P}$ e $t_{2P}$ . .....	110
<b>Tabela 20</b> – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento das formulações A, B, C e D, nos TEP. ....	112
<b>Tabela 21</b> – Média da triplicata da viscosidade aparente (Pa.s) obtida a partir da curva de viscosidade das formulações A, B, C e D, do diagrama 1. ....	112
<b>Tabela 22</b> – Média da triplicata de cada área de histerese calculada a partir da curva de escoamento das formulações A, B, C e D, do diagrama 1. ....	114
<b>Tabela 23</b> – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento das formulações E, F, G e H, nos TEP. ....	116
<b>Tabela 24</b> – Média da triplicata da viscosidade aparente obtida a partir da curva de viscosidade das formulações E, F, G e H, do diagrama 2. ....	116
<b>Tabela 25</b> – Média da triplicata de cada área de histerese calculada a partir da curva de escoamento das formulações E, F e G, do diagrama 2. ....	117
<b>Tabela 26</b> – Valores de absorvância do palmitato de retinol (material referência) em soluções de pentano e 2-propanol para a construção da curva analítica pelo método espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm. ....	121
<b>Tabela 27</b> – Valores de absorvância do PR (matéria-referência) em solução de pentano e 2-propanol, obtidos por espectrofotometria, no comprimento de onda de 327nm, para obtenção do intervalo linear do método analítico. ....	123
<b>Tabela 28</b> – Valores de absorvância do palmitato de retinol (padrão secundário) em soluções de pentano e 2-propanol para a construção da curva analítica pelo método espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm. ....	124
<b>Tabela 29</b> – Valores de absorvância do palmitato de retinol (padrão secundário) em soluções de pentano e 2-propanol medidas pelo analista 1 para determinar a repetibilidade do método analítico por espectrofotometria, na região do UV, em 327 nm. ....	126
<b>Tabela 30</b> – Valores de absorvância do palmitato de retinol (padrão secundário) em soluções de pentano e 2-propanol medidas pelo analista 2 para determinar a repetibilidade do método analítico por espectrofotometria, na região do UV, em 327 nm. ....	126

<b>Tabela 31</b> – Preparo das soluções de PR (padrão secundário) para o teste de recuperação do método espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm. ....	127
<b>Tabela 32</b> – Valores de absorbância obtidos pelo analista 1 na quantificação do PR (padrão secundário) adicionado à matriz (formulação G) para determinar o fator de recuperação do método analítico, na região do UV, em 327 nm. ....	127
<b>Tabela 33</b> – Valores de absorbância obtidos pelo analista 2 na quantificação do PR (padrão secundário) adicionado à matriz (formulação G) para determinar o fator de recuperação do método analítico, na região do UV, em 327 nm. ....	128
<b>Tabela 34</b> – Resultados da determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da formulação G <sub>PR</sub> , em tempos pré-estabelecidos, durante 135 dias de TEA. ....	133
<b>Tabela 35</b> – Resultados da determinação da condutividade eletrolítica (μS/cm) da formulação G <sub>PR</sub> , em tempos pré-estabelecidos, durante 135 dias de TEA. ....	133
<b>Tabela 36</b> – Resultados da determinação do índice de refração da G <sub>PR</sub> , em tempos pré-estabelecidos, durante 135 dias de TEA. ....	134
<b>Tabela 37</b> – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento da G <sub>PR</sub> , armazenada à 25,0 ± 2,0°C, nos TEA. ....	136
<b>Tabela 38</b> – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento da formulação G <sub>PR</sub> , armazenada à 40,0 ± 2,0°C, nos TEA. ....	136
<b>Tabela 39</b> – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento da formulação G <sub>PR</sub> , armazenada à 5,0 ± 2,0°C, nos TEA. ....	136
<b>Tabela 40</b> – Média da triplicata da viscosidade aparente obtida a partir da curva de viscosidade da formulação G <sub>PR</sub> , em diferentes temperaturas de armazenamento. ....	137
<b>Tabela 41</b> – Determinação do módulo elástico e do módulo viscoso da formulação G <sub>PR</sub> , em períodos de tempo pré-determinados no TEA, em diferentes temperaturas de armazenamento. ....	138
<b>Tabela 42</b> – Valores de absorbância em comprimento de onda de 327 nm, obtidos na quantificação analítica do PR a partir de sua matriz, em períodos de tempo pré-determinados, durante os TEA (25,0 ± 2,0°C). ....	141
<b>Tabela 43</b> – Valores de absorbância em comprimento de onda de 327 nm, obtidos na quantificação analítica do PR a partir de sua matriz, em períodos de tempo pré-determinados, durante os TEA (40,0 ± 2,0°C). ....	141
<b>Tabela 44</b> – Valores de absorbância em comprimento de onda de 327 nm, obtidos na quantificação analítica do PR a partir de sua matriz, em períodos de tempo pré-determinados, durante os TEA (5,0 ± 2,0°C). ....	141



<b>Tabela 45</b> – Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) do PR em períodos de tempo pré-determinados, nas condições de armazenamento na temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), na estufa ( $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e na geladeira ( $05,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). .....	142
<b>Tabela 46</b> – Relação entre os valores da média das absorvâncias no comprimento de onda de 300, 350 e 370 nm pelo valor da média de absorvância no comprimento de onda de 326nm, no TEA ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). .....	143
<b>Tabela 47</b> – Relação entre os valores da média das absorvâncias no comprimento de onda de 300, 350 e 370 nm pelo valor da média de absorvância no comprimento de onda de 326nm, no TEA ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). .....	143
<b>Tabela 48</b> – Relação entre os valores da média das absorvâncias no comprimento de onda de 300, 350 e 370 nm pelo valor da média de absorvância no comprimento de onda de 326nm, no TEA ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). .....	144
<b>Tabela 49</b> – Média dos valores de absorvância ( $\lambda = 517 \text{ nm}$ ) obtidos pela reação de redução do radical DPPH $^{\bullet}$ pelo PR. ....	145
<b>Tabela 50</b> – Média dos valores de absorvância ( $\lambda = 517 \text{ nm}$ ) obtidos pela reação de redução do radical DPPH $^{\bullet}$ pelo AR. ....	145
<b>Tabela 51</b> – Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das formulações G e I, contendo, ou não, 1% de palmitato de retinol, em períodos de tempo pré-estabelecidos, durante 30 dias de avaliação. ....	147
<b>Tabela 52</b> – Fator de recuperação (Fr) do palmitato de retinol solubilizado nas soluções receptoras testadas. ....	151
<b>Tabela 53</b> – Quantidade de PR liberado ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) e a correspondente porcentagem de liberação, a partir da formulação $G_{\text{PR}}$ , em função do tempo (h), $\lambda = 327 \text{ nm}$ . ....	152
<b>Tabela 54</b> – Quantidade de PR liberado ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) e a correspondente porcentagem de liberação a partir da formulação $J_{\text{PR}}$ , em função do tempo (h), $\lambda = 327 \text{ nm}$ . ....	152
<b>Tabela 55</b> – Determinação da ordem de reação da liberação <i>in vitro</i> do PR a partir das formulações $G_{\text{PR}}$ e $J_{\text{PR}}$ (diagrama 2) utilizando o parâmetro de coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ). ....	154
<b>Tabela 56</b> – Constante da velocidade k de liberação do PR a partir das formulações envolvidas no estudo. ....	155
<b>Tabela 57</b> – Trabalho de bioadesão <i>in vitro</i> (N.s) e da força máxima (N) necessária para o destaque do substrato biológico das amostras analisadas. ....	157
<b>Tabela 58</b> – Viscosidade complexa (Pa.s) das amostras analisadas. ....	163
<b>Tabela 59</b> – Estudo do comportamento reológico das amostras avaliadas por determinação do módulos $G'$ e $G''$ e do ângulo de fase ( $\delta$ ). ....	165

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática dos tipos de rugas faciais mais comuns. ....	32
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática da capacidade de penetração na pele (estrato córneo, epiderme e derme) das radiações do espectro eletromagnético, na região do ultravioleta, em diferentes comprimentos de onda, em nanômetros. ....	33
<b>Figura 3</b> – Fórmula estrutural dos retinóides. ....	36
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática da estrutura química de compostos anfifílicos. ....	38
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática das micelas, dependendo da natureza do solvente: (a) micelas esféricas; (b) micelas reversas. ....	39
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática de sistemas nanoestruturados formados por agregados de moléculas anfifílicas. ....	40
<b>Figura 7</b> – Demonstração do escoamento de um fluido entre duas placas paralelas com o líquido preenchendo a distância $dy$ entre as placas. ....	43
<b>Figura 8</b> – Curvas de escoamento representativas dos diferentes comportamentos reológicos: (A) = fluido newtoniano; (B) = fluido binghamiano ou plástico ideal; (C) = pseudoplástico; (D) = dilatante; (E) = pseudoplástico com limite de escoamento. ....	46
<b>Figura 9</b> – Curvas de fluxo para fluidos com comportamento dependente do tempo. ....	47
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática de um diagrama ternário de fases. ....	48
<b>Figura 11</b> – Reação química de redução do radical DPPH <sup>•</sup> pela substância antioxidante. ....	54
<b>Figura 12</b> – Esquema da célula de difusão do equipamento Microette Plus - Hanson Research <sup>®</sup> , empregada nos estudos de liberação <i>in vitro</i> . ....	55
<b>Figura 13</b> – Representação esquemática que traduz a curva de liberação <i>in vitro</i> de substâncias ativas que obedecem à cinética de ordem zero. ....	56
<b>Figura 14</b> – Representação esquemática que traduz a curva de liberação <i>in vitro</i> de substâncias ativas que obedecem à cinética de primeira ordem. ....	57
<b>Figura 15</b> – Representação esquemática que traduz a curva de liberação <i>in vitro</i> de substâncias ativas que obedecem a cinética de pseudoprimeira ordem (lei de Higuchi). ....	57
<b>Figura 16</b> – (a) Procedimento de dissecação da pele proveniente da orelha de suínos; (b) Procedimento de dermatomização; (c) Remoção de pele dermatomizada na espessura de 500 $\mu\text{m}$ . ....	83
<b>Figura 17</b> – (a) Hidratação das peles dermatomizadas de suínos em tampão Hank's - pH 7,4; (b) Pele dermatomizada presa à sonda do texturômetro <i>Stable Micro Systems TA-XT2i</i> . ....	84

<b>Figura 18</b> – (a) Texturômetro <i>Stable Micro Systems</i> TA-XT2i, com controle da temperatura em $32 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ; (b) Sonda com o substrato biológico (pele dermatomizada de suínos) entrando em contato com a amostra a ser analisada. ....	85
<b>Figura 19</b> – Gráfico característico da análise de bioadesão: (1) Área ou trabalho de adesão; (2) Força máxima necessária para o destaque do substrato biológico da amostra analisada. ....	86
<b>Figura 20</b> – Diagrama ternário de fases (1) pontual do sistema constituído por Procetyl AWS <sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5330 <sup>®</sup> (fase oleosa) e água: $\blacklozenge$ = sistema líquido transparente; $\blacklozenge$ = sistema viscoso transparente; $\blacktriangledown$ sistema semitransparente; $\blacktriangle$ sistema viscoso opaco; $\blacksquare$ separação de fases. ....	89
<b>Figura 21</b> – Diagrama ternário de fases (1) das regiões de transição do sistema constituído por Procetyl AWS <sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5330 <sup>®</sup> (fase oleosa) e água: <b>SLT</b> = sistema líquido transparente; <b>SVT</b> = sistema viscoso transparente; <b>SVO</b> = sistema viscoso opaco; <b>SST</b> = sistema semitransparente; <b>SF</b> = separação de fases. ....	90
<b>Figura 22</b> – Diagrama ternário de fases (2) pontual do sistema constituído por Procetyl AWS <sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5329 <sup>®</sup> (fase oleosa) e água: $\blacklozenge$ sistema líquido transparente; $\blacklozenge$ sistema viscoso transparente; $\blacktriangledown$ sistema líquido opaco; $\blacktriangle$ sistema viscoso opaco. ....	90
<b>Figura 23</b> – Diagrama ternário de fases (2) das regiões de transição do sistema constituído por Procetyl AWS <sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5329 <sup>®</sup> (fase oleosa) e água: <b>SLT</b> = sistema líquido transparente; <b>SVT</b> = sistema viscoso transparente; <b>SLO</b> = sistema líquido opaco; <b>SVO</b> = sistema viscoso opaco. ....	91
<b>Figura 24</b> – Diagrama ternário de fases (2) constituído por Procetyl AWS <sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5329 <sup>®</sup> + PR (fase oleosa) e água: $\blacklozenge$ sistema líquido transparente; $\blacklozenge$ sistema viscoso transparente; $\blacktriangledown$ sistema líquido opaco; $\blacktriangle$ sistema viscoso opaco. ....	93
<b>Figura 25</b> – Diagrama ternário de fases (2) das regiões de transição do sistema constituído por Procetyl AWS <sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5329 <sup>®</sup> + PR (fase oleosa) e água: <b>SLT</b> = sistema líquido transparente; <b>SVT</b> = sistema viscoso transparente; <b>SLO</b> = sistema líquido opaco; <b>SVO</b> = sistema viscoso opaco. ....	94
<b>Figura 26</b> – Fórmula estrutural do palmitato de retinol. ....	94
<b>Figura 27</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação A armazenada à $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no $t_{1P}$ , após 24 horas (b) no $t_{2P}$ , após 15 dias. ....	96
<b>Figura 28</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação B armazenada à $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no $t_{1P}$ , após 24 horas (b) no $t_{2P}$ , após 15 dias. ....	97
<b>Figura 29</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação C armazenada à $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no $t_{1P}$ , após 24 horas (b) no $t_{2P}$ , após 15 dias. ....	97
<b>Figura 30</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação D armazenada à $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no $t_{1P}$ , após 24 horas e (b) no $t_{2P}$ , após 15 dias. ....	97
<b>Figura 31</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação E armazenada à $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ): (a) cristal líquido de fase lamelar; (b) cristal líquido de fase hexagonal. ....	98

- Figura 32** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação E, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (b) ciclo estufa /geladeira; (c) estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (d) geladeira -  $05,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ . ..... 99
- Figura 33** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação F, armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ): (a) cristal líquido de fase lamelar; (b) cristal líquido de fase hexagonal. .... 99
- Figura 34** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação F, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (b) ciclo estufa /geladeira; (c) estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (d) geladeira -  $05,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ . .... 99
- Figura 35** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G, armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ): (a) cristal líquido de fase lamelar; (b) cristal líquido de fase hexagonal. .... 100
- Figura 36** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (b) ciclo estufa /geladeira; (c) estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (d) geladeira -  $05,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ . .... 100
- Figura 37** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação H, armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ). .... 100
- Figura 38** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação H, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (b) ciclo estufa /geladeira; (c) estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (d) geladeira -  $05,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ . .... 101
- Figura 39** – Visualização macroscópica do aspecto, após 24 horas de manipulação das formulações A, B, C e D conduzidas ao teste de centrifugação à 3000rpm, por 30 minutos. .... 103
- Figura 40** – Visualização macroscópica do aspecto, após 24 horas de manipulação das formulações E, F, G e H conduzidas ao teste de centrifugação à 3000rpm, por 30 minutos. .... 103
- Figura 41** – Condutividade eletrolítica das formulações A, B, C e D (diagrama 1) em função da porcentagem de fase aquosa, no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ). .... 106
- Figura 42** - Condutividade eletrolítica das formulações E, F, G e H (diagrama 2) em função da porcentagem de fase aquosa, no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ). .... 107
- Figura 43** – Índice de refração das formulações A, B, C e D (diagrama 1), no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ). .... 109
- Figura 44** - Índice de refração das formulações E, F, G e H (diagrama 2), no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ). .... 110
- Figura 45** – Reograma da curva de escoamento das formulações A, B, C e D (diagrama 1), armazenadas à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após: 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ). .... 111
- Figura 46** – Reogramas da curva de escoamento das formulações E, F, G e H, no TEP, após 24 horas à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  (—■—) e após 15 dias, armazenadas nas seguintes condições:  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  (—◆—),  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  (—◆—); ciclo  $40,0/5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  (—▲—) e  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  (—▼—). .... 115
- Figura 47** – Espectro de varredura do PR em mistura de 2-propanol e pentano (95:5) para determinação do comprimento de onda de máxima absorção. .... 119

<b>Figura 48</b> – Espectro de varredura dos excipientes da matriz analítica sem a substância de interesse para determinar a seletividade do método analítico espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm. ....	120
<b>Figura 49</b> – Curva analítica do palmitato de retinol (material referência), no intervalo de 10 UI/mL a 15 UI/mL, no comprimento de onda de 327 nm. ....	122
<b>Figura 50</b> – Intervalo linear do método analítico na faixa de concentrações entre 0,3125 UI/mL a 17,5 UI/mL, no comprimento de onda de 327 nm. ....	123
<b>Figura 51</b> – Curva analítica do palmitato de retinol (matéria prima), no intervalo de 5,0 µg/mL a 17,5 µg/mL, no comprimento de onda de 327 nm. ....	125
<b>Figura 52</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 24 horas de manipulação mantida à temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C). ....	129
<b>Figura 53</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 7 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente (25,0 ± 2,0°C), (b) estufa (40,0 ± 2,0°C) e (c) geladeira (5,0 ± 2,0°C). ....	130
<b>Figura 54</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 15 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente (25,0 ± 2,0°C), (b) estufa (40,0 ± 2,0°C) e (c) geladeira (5,0 ± 2,0°C). ....	130
<b>Figura 55</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 30 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente (25,0 ± 2,0°C), (b) estufa (40,0 ± 2,0°C) e (c) geladeira (5,0 ± 2,0°C). ....	130
<b>Figura 56</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 60 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente (25,0 ± 2,0°C), (b) estufa (40,0 ± 2,0°C) e (c) geladeira (5,0 ± 2,0°C). ....	131
<b>Figura 57</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 90 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente (25,0 ± 2,0°C), (b) estufa (40,0 ± 2,0°C) e (c) geladeira (5,0 ± 2,0°C). ....	131
<b>Figura 58</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 135 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente (25,0 ± 2,0°C), (b) estufa (40,0 ± 2,0°C) e (c) geladeira (5,0 ± 2,0°C). ....	131
<b>Figura 59</b> – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G <sub>PR</sub> , após 150 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente (25,0 ± 2,0°C), (b) estufa (40,0 ± 2,0°C) e (c) geladeira (5,0 ± 2,0°C). ....	132
<b>Figura 60</b> – Reograma da curva de escoamento da formulação G <sub>PR</sub> , após 7, 15, 30, 60 e 90 dias, armazenada à: 5,0 ± 2,0 °C (—▲—), 25,0 ± 2,0 °C (—■—) e 40,0 ± 2,0 °C (—♦—) . ....	135
<b>Figura 61</b> - Reograma das curvas de fluência e relaxação da formulação G <sub>PR</sub> , armazenada à 5,0 ± 2,0 °C, nos tempos: (1) 7 dias; (2) 15 dias; (3) 30 dias; (4) 60 dias; (5) 90 dias. ....	139
<b>Figura 62</b> - Reograma das curvas de fluência e relaxação da formulação G <sub>PR</sub> , armazenada à 25,0 ± 2,0 °C, nos tempos: (1) 7 dias; (2) 15 dias; (3) 30 dias; (4) 60 dias; (5) 90 dias. ....	139

<b>Figura 63</b> - Reograma das curvas de fluência e relaxação da formulação $G_{PR}$ , armazenada à $40,0 \pm 2,0$ °C, nos tempos: (1) 7 dias; (2) 15 dias; (3) 30 dias; (4) 60 dias; (5) 90 dias. ....	140
<b>Figura 64</b> – Porcentagem de degradação do PR presente na formulação $G_{PR}$ em função do tempo, nas diferentes condições de armazenamento. ....	142
<b>Figura 65</b> – Determinação da porcentagem de inibição do radical DPPH' reduzido em função da concentração (mg/mL) dos princípios ativos testados. ....	146
<b>Figura 66</b> – Atividade antioxidante (%) da formulação $G_{PR}$ (quadrados fechados) e G (quadrados abertos), durante 30 dias de estudo, nos seguintes tempos: 48h (preto); 7 dias (vermelho); 15 dias (verde); 21 dias (azul); e, 30 dias (rosa). ....	148
<b>Figura 67</b> – Atividade antioxidante (%) da formulação $I_{PR}$ (quadrados fechados) e I (quadrados abertos), durante 30 dias de estudo, nos seguintes tempos: 48h (preto); 7 dias (vermelho); 15 dias (verde); 21 dias (azul); e, 30 dias (rosa). ....	148
<b>Figura 68</b> – Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das seguintes amostras: (■) formulação $G_{PR}$ ; (■) PR adicionado à formulação $G_{PR}$ ; (■) formulação $I_{PR}$ ; (■) PR adicionado à formulação $I_{PR}$ . ....	150
<b>Figura 69</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações $G_{PR}$ (à esquerda) e $J_{PR}$ (à direita), de acordo com o modelo matemático de cinética de ordem zero. ....	153
<b>Figura 70</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações $G_{PR}$ (à esquerda) e $J_{PR}$ (à direita), de acordo com o modelo matemático de cinética de primeira ordem. ....	153
<b>Figura 71</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações $G_{PR}$ (à esquerda) e $J_{PR}$ (à direita), de acordo com o modelo matemático de cinética de pseudoprimeira ordem. ....	154
<b>Figura 72</b> – Comparação dos valores do trabalho de bioadesão <i>in vitro</i> (N.s) medidos em analisador de textura para as amostras dos géis poliméricos. ....	158
<b>Figura 73</b> – Comparação dos valores da força máxima (N) necessária para o destaque entre a sonda do analisador de textura e as amostras dos géis poliméricos. ....	158
<b>Figura 74</b> – Comparação dos valores do trabalho de bioadesão <i>in vitro</i> (N.s) medidos em analisador de textura entre as formulação $G_{PR}$ e os géis poliméricos na concentração de 1,5%. ....	160
<b>Figura 75</b> – Comparação dos valores do trabalho de bioadesão <i>in vitro</i> (N.s) medidos em analisador de textura entre as formulações e o gel de C940 2%. ....	161
<b>Figura 76</b> – Comparação dos valores da força máxima (N) necessária para o destaque entre a sonda do analisador de textura e as amostras analisadas. ....	162
<b>Figura 77</b> – Evolução temporal de $G'$ para as amostras analisadas dos géis poliméricos: CMCNa-1,5% (■), CMCNa-2,0% (□), C940-0,5% (●), C940-0,75% (○), C940-1,0% (◐), C940-1,5% (◑), C940-2,0% (⊗), C934P-0,5% (▲), C934P-0,75% (△), C934P-1,0% (▴), C934P-1,5% (▾), C934P-2,0% (⊗). ....	166

# SUMÁRIO

---

<b>Resumo</b>	.....	viii
<b>Abstract</b>	.....	ix
<b>Lista de Abreviaturas</b>	.....	x
<b>Lista de Símbolos, Unidades e Grandezas</b>	.....	xii
<b>Lista de Tabelas</b>	.....	xiv
<b>Lista de Figuras</b>	.....	xviii
<b>Sumário</b>	.....	xxiii
<b>I. – INTRODUÇÃO</b>	.....	26
<b>II. – REVISÃO DA LITERATURA</b>	.....	31
2.1. – Processo do Envelhecimento Cutâneo	.....	31
2.2. – Palmitato de Retinol (PR)	.....	35
2.3. – Sistemas Nanoestruturados: Cristais Líquidos	.....	38
2.3.1. – Microscopia de Luz Polarizada	.....	42
2.3.2. – Viscosidade e Comportamento Reológico	.....	42
2.3.3. – Diagrama de Fases	.....	47
2.4. – Validação de Metodologia Analítica	.....	48
2.4.1. – Especificidade e Seletividade	.....	50
2.4.2. – Linearidade e Faixa Linear de Trabalho	.....	50
2.4.3. – Limite de Quantificação	.....	50
2.4.4. – Limite de Detecção	.....	51
2.4.5. - Precisão	.....	51
2.4.6. – Exatidão e Recuperação	.....	52
2.4.7. - Robustez	.....	52
2.5. – Estudo da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	.....	53
2.6. – Estudo de Liberação <i>in vitro</i>	.....	54
2.7. – Estudo de Bioadesão <i>in vitro</i>	.....	57
<b>III. – OBJETIVOS</b>	.....	61
3.1. – Objetivo Geral	.....	61
3.2. – Objetivos Específicos	.....	61
<b>IV. – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	.....	63
4.1. – Materiais	.....	63
4.1.1. – Substâncias e Reagentes	.....	63
4.2. – Métodos	.....	64
4.2.1. – Desenvolvimento dos Sistemas Líquido-Cristalinos: Construção do Diagrama de Fases Ternário	.....	64

4.2.2. – Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) das formulações líquido-cristalinas selecionadas (A à H) sem palmitato de retinol .....	67
4.2.3. – Validação do Método Analítico para Quantificação do palmitato de retinol acrescido à Formulação G <sub>PR</sub> .....	69
4.2.4. – Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) da formulação líquido-cristalina G <sub>PR</sub> acrescida de 1% de palmitato de retinol .....	75
4.2.5. – Determinação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> do palmitato de retinol pelo método de redução do radical DPPH .....	76
4.2.6. – Estudo de Liberação <i>in vitro</i> do palmitato de retinol .....	79
4.2.7. – Estudo da Bioadesão <i>in vitro</i> de formulações líquido-cristalinas e géis poliméricos .....	82
<b>V. – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	88
5.1. – Desenvolvimento dos Sistemas Líquido-Cristalinos: Construção do Diagrama de Fases Ternário .....	88
5.2. – Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) das formulações líquido-cristalinas selecionadas sem palmitato de retinol .....	95
5.3. – Validação do Método Analítico empregado para quantificação do palmitato de retinol acrescido à formulação líquido-cristalina G <sub>PR</sub> .....	118
5.4. – Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) da formulação líquido-cristalina G <sub>PR</sub> acrescida de 1% de palmitato de retinol .....	128
5.5. – Determinação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> do palmitato de retinol .....	144
5.6. – Estudo de Liberação <i>in vitro</i> do palmitato de retinol .....	150
5.7. – Estudo da Bioadesão <i>in vitro</i> .....	156
<b>VI. – CONCLUSÕES</b> .....	169
<b>VII. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	171



## ***I. - Introdução***

---

## I. – INTRODUÇÃO

---

A consolidação de produtos cosméticos desenvolvidos para uma visão com propostas terapêuticas multifuncionais possibilitou o desenvolvimento de um novo segmento na cosmetologia denominado de Cosmética Dermatológica (KLIGMAN, 2002).

O atual momento de valorização da qualidade de vida e do bem estar pessoal, principalmente pela preocupação com a aparência e a saúde da pele, vêm contribuindo para o desenvolvimento de produtos dermocosméticos embasados em atributos funcionais mensuráveis dentro deste novo segmento que aproxima as fronteiras entre a cosmética e a dermatologia (MAGDASSI, 1997; DRAELOS, 2001; DRAELOS, 2009)

O tratamento tópico antienvhecimento constitui-se, sem dúvida, na área de maior interesse e evolução no mercado de produtos para cuidados com a pele (FOX, 1995).

À luz da compreensão científica etiopatológica atual, as hipóteses modernas mais aceitas baseiam o processo de envelhecimento cutâneo em dois tipos. O primeiro tipo diz respeito ao envelhecimento intrínseco, o qual é determinado, principalmente, por fatores genéticos (TAGAMI, 2008) e está relacionado com a ocorrência de algumas alterações típicas, como secura e afinamento da pele, formação de colágeno menos flexível, menor retenção de água no estrato córneo e diminuição do número e da capacidade elástica das fibras de elastina devido à deterioração progressiva da pele na sua estrutura e em suas funções, com o decorrer do tempo (ROENIGK, 1995).

Em paralelo à formação dita endógena, existem vários fatores exógenos que originam precocemente as alterações degenerativas cutâneas, destacando-se as radiações ultravioletas (UV) provenientes da exposição solar excessiva, as quais expõem a pele a uma situação que aumenta a formação de radicais livres (SAIJA *et al.*, 1998; KOHEN & GATI, 2000; TZAPHLIDOU, 2004). Por este fato, o envelhecimento extrínseco é mais comumente denominado de fotoenvelhecimento (FUTORYAN & GILCHREST, 1994).

Os radicais livres são pequenas moléculas instáveis produzidas a partir da dissipação de energia de um átomo de oxigênio, que de alguma forma perdeu um elétron de sua camada mais externa e, por isso, possui um elétron desemparelhado no seu orbital externo. Essa situação faz com que o átomo inicie reações químicas em cadeia que levam à ruptura ou alteração das rotas metabólicas das células sadias da pele para extrair um elétron de qualquer partícula, molécula ou

átomo em sua vizinhança, a fim de recuperar a valência mais estável e, em decorrência, a estabilidade (ARUOMA, 1998; OLIVEIRA, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

Bioquimicamente, as alterações celulares quantitativa e qualitativas na epiderme (em queratinócitos, células de Langerhans e melanócitos), nas proteínas da matriz extracelular dérmica e no ácido desoxirribonucléico (DNA) (HALLIWELL *et al.*, 1995; BERGENDI *et al.*, 1999) geradas pela formação dos radicais livres comprovam que o estresse oxidativo é uma das causas do fotoenvelhecimento. Em indivíduos idosos ou em pessoas com estresse oxidativo crônico originado pelos efeitos deletérios da exposição solar excessiva, o sistema antioxidante endógeno torna-se menos eficiente ou está saturado e surge, portanto, a necessidade do uso de antioxidantes tópicos para capturar as espécies reativas de oxigênio remanescentes (SORG *et al.*, 2006).

Dentre os antioxidantes tópicos disponíveis, o trabalho dos pesquisadores Tsuchiya *et al.* (1992), Tesoriere *et al.* (1997), Sorg; Tran; Saurat (2001) & Sorg; Kuenzli; Kaya (2005) mostram a capacidade dos retinóides (família da qual faz parte a vitamina A, seus derivados naturais e análogos sintéticos) exercerem atividade sequestradora de radicais livres *in vitro*, contribuindo para a resolução de problemas associados ao envelhecimento cutâneo.

Nos tratamentos dermatológicos mais modernos que buscam retardar e, até mesmo atenuar os efeitos do envelhecimento cutâneo, o palmitato de retinol é um análogo sintético do ácido retinóico que vem sendo preferivelmente empregado por causa de sua baixa atividade irritante comparada ao seu precursor (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2007). Além de diminuir os riscos toxicológicos, a aplicação tópica de produtos contendo palmitato de retinol para o tratamento do fotoenvelhecimento torna-se interessante, pois este derivado sofre clivagem enzimática de sua ligação éster, pelas enzimas estearases da pele, convertendo-se no metabólito ativo que possui poderosa atividade antioxidante, o ácido *all-trans*-retinóico (BOLLAG, 1983; TANG & RUSSELL, 1991; SORG *et al.*, 2006).

Adicionalmente, os retinóides também se tornaram compostos de referência na dermatocosmetologia devido à capacidade de estimulação mitótica e metabólica que estes compostos possuem, pela modulação da expressão de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular, o que, em consequência, proporcionam modificações histológicas na derme e na epiderme (GUDAS *et al.*, 1994; KANG, 2005).

Stratigos & Katsambas (2005) apontam que muitos estudos clínicos comprovam que algumas mudanças estruturais na pele causadas pela excessiva exposição ao sol podem ser revertidas pelo uso tópico de retinóides.

Porém, a literatura recente tem apontando que o uso terapêutico do palmitato de retinol ainda é limitado devido à instabilidade química que o mesmo apresenta frente à umidade, oxigênio, ácidos, metais e exposição à luz (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2005). Em seus estudos, Papageorgiou & colaboradores (2007) demonstram que o palmitato de retinol é um composto antioxidante que apresenta baixa fotoestabilidade em formulações cosméticas.

Nos estudos de estabilidade do palmitato de retinol encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas constituídas por Precirol ATO 5, Pluronic F68 e quelato de sódio, Carafa e colaboradores (2008) descobriram que o sistema apresentava alta eficiência de encapsulamento da substância ativa, mas não foi capaz de protegê-la da fotodegradação pois o palmitato de retinol distribuiu-se, preferencialmente, na superfície das partículas, tornando-se parcialmente exposto à fase externa aquosa.

O estudo de Carlotti & seu grupo de pesquisa (2004) demonstrou que o palmitato de retinol adicionado aos sistemas encapsulados, tais como, nanocápsulas Lipotec<sup>®</sup>, microcápsulas Taggravit<sup>®</sup> A-1, lipossomas de fosfatidilcolina e lipossomas Lipotec<sup>®</sup> protegeram o éster da vitamina A das reações de hidrólise e de oxidação, ao longo do tempo; enquanto que a substância ativa adicionada em géis de hidroetilcelulose, em pH 4,0 e 8,0, apresentou menor estabilidade. Os resultados do grupo de pesquisa mencionado demonstrou que as nanocápsulas e os lipossomas também melhoraram a fotoestabilidade do palmitato de retinol.

Mehta & colaboradores (2009) apontam que as pesquisas realizadas nos últimos anos demonstram que o desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados têm sido muito relevantes em estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes no que diz respeito à estabilidade de armazenamento, liberação lenta do princípio ativo veiculado e aumento da permeação das substâncias ativas através da pele. Exemplos deste tipo de sistema já investigados são nanoesferas (SHIM *et al.*, 2004), nanocápsulas (MILÃO *et al.*, 2003; MIYAZAKI *et al.*, 2003), nanoemulsões (CALVO *et al.*, 1996; MÜLLER-GOYMANN, 2004), nanopartículas lipídicas sólidas (JENNING; SCHÄFER-KORTING; GOHLA, 2000; MEHNERT & MÄDER, 2001), microemulsões (MEHTA *et al.*, 2009), fases líquido-cristalinas (MUZZALUPO *et al.*, 2009), lipossomas (VERMA *et al.*, 2003; TORCHILIN, 2005) e niossomas (SHAHIWALA & MISRA, 2002).

Particularmente, os cristais líquidos liotrópicos têm despertado interesse na indústria químico-farmacêutica e de cosméticos no desenvolvimento de produtos dermatológicos como sistemas de liberação tópica de princípios ativos frente às formulações convencionais por apresentarem alta estabilidade termodinâmica, transparência, favorável capacidade de

solubilização e encapsulamento de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, melhora da biodisponibilidade, uma ampla gama de propriedades reológicas e imensa similaridade com a pele (biocompatíveis), além de poderem contribuir com a hidratação cutânea da pele fotoenvelhecida por retenção de água no estrato córneo (JAHN *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; WILLIAMS & BARRY 2004; MUZZALUPO *et al.*, 2009).

Em seu artigo, Snelders (1997) fez um levantamento histórico comentando que, em 1888, o químico austríaco Friedrich Reinitzer notou que o composto sólido benzoato de colesterila se transformava em um líquido turvo em 145,5°C e acima de 178,5°C formava um líquido claro. No ano seguinte, o professor alemão de física Otto Lehmann, que já vinha realizando estudos sistemáticos sobre este tipo de comportamento, descreveu pela primeira vez os cristais líquidos, definindo-os como sendo um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido (SNELDERS, 1997). Na década de 1920, os cientistas George Friedel e Daniel Vorländer realizaram pesquisas fundamentais que contribuiriam para a expansão dos conhecimentos conquistados até o momento, porém, o interesse para as aplicações dos cristais líquidos só ocorreu durante a descoberta de sua capacidade de mudança de estados através de propriedades eletroópticas, realizada por George H. Heilmeyer (TYLE, 1989).

Tendo em vista o efeito dos retinóides e seus derivados sintéticos na atenuação e na melhora dos sinais cutâneos que traduzem a pele envelhecida, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver um sistema líquido-cristalino à base de silicone para a liberação prolongada e maximização da estabilidade do palmitato de retinol, a fim de otimizar a utilização deste princípio ativo na prevenção e/ou atenuação do envelhecimento cutâneo. Dois sistemas água/óleo/tensoativo, diferindo entre si no silicone utilizado na fase oleosa, foram desenvolvidos e quatro formulações de cada um dos dois sistemas foram estudadas quanto às suas propriedades físico-químicas nos estudos de estabilidade preliminar. Dentre as oito formulações estudadas, uma formulação foi eleita para a incorporação do palmitato de retinol e posteriormente foi avaliada em parâmetros físico-químicos e por quantificação química nos estudos de estabilidade acelerada e também conduzida aos ensaios de liberação e de bioadesão *in vitro*. Funcionalmente, a atividade antioxidante *in vitro* da formulação de escolha foi determinada pelo método de redução do radical DPPH<sup>•</sup>. Em paralelo ao estudo desta formulação escolhida, outras formulações foram também selecionadas para serem avaliadas conjuntamente em função da finalidade de cada ensaio experimental realizado, buscando enriquecer a discussão dos fenômenos ocorridos.

## *II. - Revisão da Literatura*



## II. – REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1. – Processo de Envelhecimento Cutâneo

---

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo considerado altamente diferenciado por conter aproximadamente  $1,0 \times 10^{11}$  células de origens epiteliais, mesenquimais e neurais. Ocupa uma área média de  $2 \text{ m}^2$ , correspondendo à cerca de 10 a 15% do peso corporal e recebe cerca de um terço do total de suprimento sanguíneo do organismo (WANG *et al.*, 2003; LEONARDI, 2004).

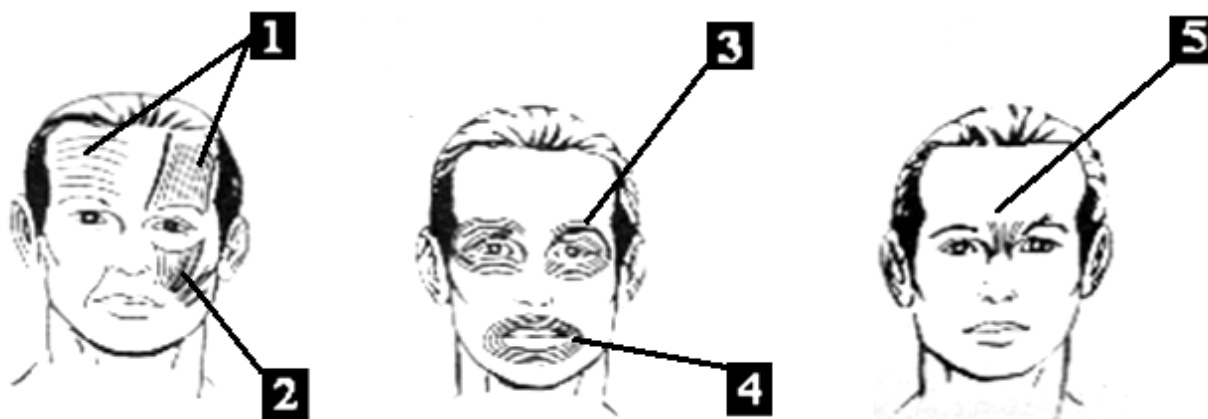
O processo de envelhecimento da pele é um fenômeno biológico muito complexo. Embora seja difícil definir precisamente a natureza bioquímica exata deste processo (BUCHLI, 2002), as hipóteses mais modernas baseiam o envelhecimento cutâneo em duas teorias: a teoria do envelhecimento intrínseco e a do extrínseco (TZAPHLIDOU, 2004; TAGAMI, 2008).

O envelhecimento intrínseco é determinado por fatores genéticos e encontra-se diretamente relacionado com a diminuição dos níveis de hormônios esteróides (estrógeno, testosterona, dehidroepiandrosterona e seus ésteres sulfato) e outros hormônios de homeostase do organismo (melatonina, insulina, cortisol, tiroxina), com o aumento da sinalização celular via citocina de fibroblastos senescentes e como resultado de danos endógenos cumulativos devido à contínua formação de espécies reativas de oxigênio pelo metabolismo celular oxidativo. Enquanto que no envelhecimento extrínseco os danos celulares aleatórios, resultantes de mutações induzidas por radicais livres durante os processos metabólicos, são intensificados por fatores ambientais, como: poluição do ar, tabagismo, abuso de álcool, má nutrição e exposição ao sol, sendo que este último fator contribui em até 80% para o envelhecimento prematuro da pele (PUIZINA-IVIĆ, 2008; TAGAMI, 2008).

Tanto no envelhecimento intrínseco como no extrínseco, as principais alterações da pele são caracterizadas por formação de rugas (PUIZINA-IVIĆ, 2008). A atrofia e o afrouxamento dos músculos cutâneos, assim como a debilidade dos septos do tecido adiposo subcutâneo, a força da gravidade e a perda de substância fundamental dos ossos da face são responsáveis pela formação das rugas e acentuam a senilidade dos traços (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999; TZAPHLIDOU, 2004).

Dependendo da idade e de fatores ambientais, as rugas apresentam uma profundidade que varia de 100 $\mu$ m até alguns milímetros. Segundo Peyrefitte, Martini & Chivot (1998), existem cinco tipos de rugas de expressão que são as mais comuns, conforme representadas na Figura 1:

1. As rugas da testa, as primeiras rugas a surgirem, são horizontais e perpendiculares ao músculo frontal, o qual se contrai formando a ruga.
2. O aprofundamento dos sulcos nasogenianos (rugos da asa do nariz aos cantos da boca) é devido à ação dos músculos elevadores do lábio superior e dos zigomáticos.
3. A contração do músculo orbicular das pálpebras provoca rugas radiais no ângulo externo dos olhos.
4. As rugas em torno da boca são causadas pelas contrações do músculo orbicular dos lábios.
5. As rugas horizontais e verticais da raiz do nariz se desenvolvem sob a ação dos músculos piramidal para as horizontais e superciliar para as verticais.

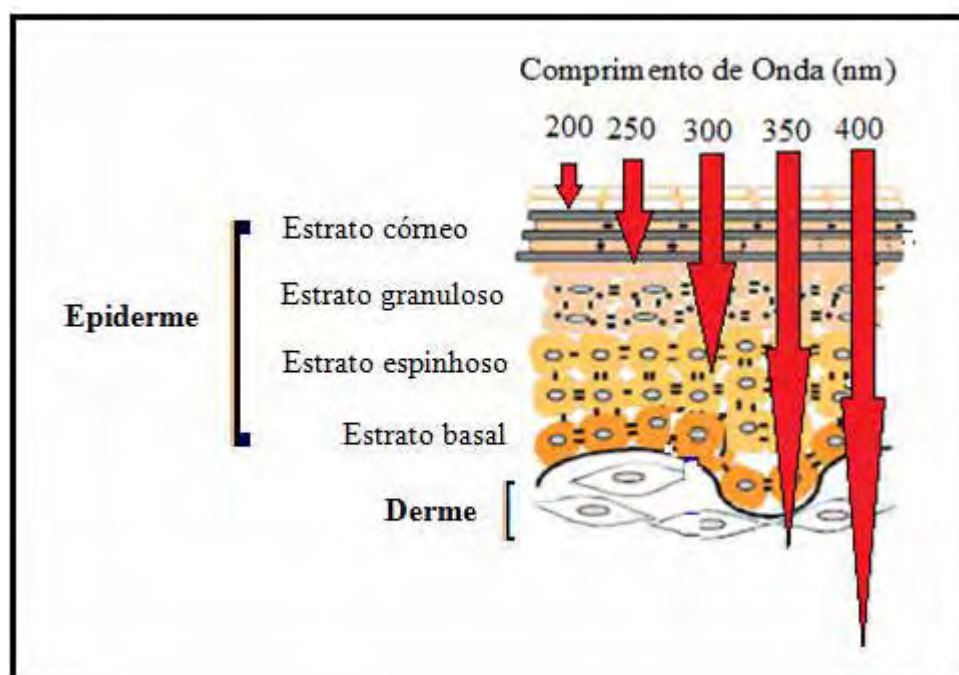


**Figura 1** – Representação esquemática dos tipos de rugas faciais mais comuns (adaptado de PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998, p.419).

A correlação entre radicais livres e fotoenvelhecimento é incontestável, pelo simples fato de que a radiação solar, através dos seus raios ultravioletas (UV) A e B, gera espécies tóxicas de  $O_2$  que produzem uma série de danos na pele. Os efeitos biológicos resultantes de reações químicas desencadeadas pelas espécies reativas de oxigênio podem, ou não, serem visíveis, como: inflamação, eritema, edema, perda de elasticidade e luminosidade da pele, formação de rugas, desidratação cutânea e aparecimento de manchas hipo e hiperpigmentadas que traduzirão o envelhecimento precoce (MANSUR, 2003; GOLDSTEIN, 2008; ZUSSMAN *et al.*, 2010).



O espectro eletromagnético solar que atinge a superfície terrestre compreende as radiações UV, que se subdividem em: radiações ultravioleta C (UVC, 200-290nm), ultravioleta B (UVB, 290-320nm) e ultravioleta A (UVA, 320-400nm, sendo que a radiação UVA divide-se em UVA I ou longo, 340-400nm e UVA II ou curto, 320-340nm), a radiação visível (400-800nm) e infravermelha (acima de 800nm), como esquematizado na Figura 2 (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).



**Figura 2** – Representação esquemática da capacidade de penetração na pele (estrato córneo, epiderme e derme) das radiações do espectro eletromagnético, na região do ultravioleta, em diferentes comprimentos de onda, em nanômetros (adaptado de SCOTTI *et al.*, 2007).

Apenas 5% dos raios UV atingem a Terra, mas são os maiores responsáveis pelos efeitos nocivos nos indivíduos. Desse montante das radiações ultravioletas capazes de atingirem a superfície terrestre, 95% são do tipo UVA e destes, aproximadamente 80%, a pele não consegue desviar, penetrando até a derme (LENAERS *et al.*, 2007).

Como representado na Figura 2, o comprimento de onda dos raios UVA favorece a profunda penetração na camada dérmica, com possíveis danos cumulativos aos componentes estruturais da pele, como fibras de colágeno e elastina, tendo como consequência o fotoenvelhecimento. As radiações UVA potencializam o efeito das radiações UVB, da qual somente 10% atingem a camada basal da epiderme, após serem parcialmente absorvidas por queratinócitos e melanina, causando eritemas e também podendo provocar lesões ao DNA

epidérmico e as células de Langerhans, suprimindo, assim, a resposta imunológica da pele. As radiações UVC são altamente eritematógenas e prejudiciais ao tecido vivo, com efeitos carcinogênicos e mutagênicos, mas são absorvidas, em sua maioria, pela camada de ozônio que recobre a Terra (OLIVEIRA *et al.*, 2004b; LENAERS *et al.*, 2007).

O dano ao DNA gerado pelas espécies reativas de oxigênio formadas pela exposição direta da radiação UV sobre a epiderme e a derme subjacente acarreta o fotoenvelhecimento por meio da sinalização molecular célula-célula, produzindo proteínas mensageiras (citocinas) que se ligam à superfície das células-alvo na derme e na epiderme (queratinócitos e fibroblastos) e provocam respostas ao estresse produzido. As citocinas geradas em resposta ao estresse levam à altos níveis de metaloproteinase-1 da matriz (MMP-1) na derme, também conhecida por colagenase-1, o que leva à degradação do colágeno na matriz extracelular da derme e conseqüentemente ao enrugamento devido à perda do tônus da pele pela desorganização das fibras de colágeno no tecido conectivo dérmico (GOLDSTEIN, 2008).

A lesão ao DNA nos queratinócitos da epiderme, induzida pela radiação UV, também ativa caminhos imunossupressores que inibem o sistema imunológico cutâneo impedindo-o de reagir contra desafios ambientais e tumores. O fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) das citocinas imunossupressoras e a interleucina-10 (IL-10) têm sido observados entre o repertório de respostas celulares que se segue à irradiação UV (GOLDSTEIN, 2008).

O fotodano ao DNA, produzido por transferência de carga de um cromóforo endógeno excitado ou por reação com espécies reativas de oxigênio, oxidam a guanina para 8-oxo-guanina no DNA nuclear e mitocondrial. Embora a radiação UVA tenha maior capacidade de penetrar as camadas da pele, a penetração da radiação UVB traz maiores danos ao DNA porque o espectro de emissão dos seus fótons é o mesmo espectro de absorção do DNA das células, podendo causar reações de degradação nas bases de pirimidina: timina e citosina (FERGUSON & DOVER, 2006; LENAERS *et al.*, 2007).

Com o objetivo de se proteger contra as lesões endógenas ao DNA ou da degradação fotoinduzida, a pele possui um complexo sistema de defesa enzimático para neutralizar a ação dos radicais livres e um sistema de defesa para reparo do DNA danificado. O sistema de defesa enzimático é constituído pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutatona, ubiquinona e pelas vitaminas C e E (RAMOS & PÉREZ, 2010). O mecanismo de reparo do DNA danificado consiste na eliminação dos fotoprodutos por excisão de nucleotídeos em duas etapas: (1) reparo total do genoma, em que a proteína XPC é responsável por realizar um sistema de vigilância da molécula do DNA por inteiro, e (2) reparo acoplado à transcrição, que elimina especificamente

os danos em fitas transcritas de DNA detectados pela RNA polimerase (BUCHLI, 2002; LENAERS *et al.*, 2007).

Porém, ainda que a pele tenha um eficiente sistema de defesa antioxidante, em indivíduos idosos ou em pessoas com estresse oxidativo crônico originado pelos efeitos deletérios da exposição solar excessiva, as espécies reativas de oxigênio podem afetar constituintes celulares, tais como membranas, enzimas e DNA e surge, portanto, a necessidade do uso de antioxidantes tópicos para capturar as espécies reativas de oxigênio remanescentes (BAUMANN, 2002; SORG *et al.*, 2006).

## 2.2. Palmitato de Retinol (PR)

---

Sendo o órgão mais exposto ao meio ambiente, a pele é especialmente vulnerável aos danos oxidativos causados pelos radicais livres. Atualmente, existem relevantes estudos clínicos que fornecem evidências científicas referentes aos benefícios alcançados na pele pela aplicação tópica de antioxidantes, razão pela qual a indústria dermocosmética tem desenvolvido formulações dermatológicas que os contenha (RAMOS & PÉREZ, 2010).

Os retinóides possuem a capacidade de capturarem o oxigênio singlete, um radical livre altamente reativo que pode ser mutagênico por induzir danos aos DNA. A propriedade antioxidante dos componentes desta família os torna responsáveis em evitarem a peroxidação lipídica, processo este que seria responsável por alterações dermo-epidérmicas específicas, manifestadas principalmente por elastose actínica e lesões de queratose senil (LUPO, 2001; MAIA CAMPOS, 2006).

Além do potencial antioxidante dos retinóides, a capacidade de estimulação mitótica e metabólica destes compostos os consagraram na dermato-cosmetologia no tratamento de problemas associados ao envelhecimento cutâneo, seja relacionado com mudanças associadas à idade, ou àquele decorrente do fotoenvelhecimento, por influenciarem na diferenciação dos queratinócitos, regularem a expressão de várias proteínas epidérmicas, aumentarem a espessura da epiderme e da camada granulosa, aumentarem a síntese de colágeno nas papilas dérmicas, diminuir a resistência dos desmossomos e regularem a atividade dos melanócitos (JOUANDEAUD *et al.*, 2004; LEONARDI, 2004; DARLENSKI; SURBER; FLUHR, 2010).

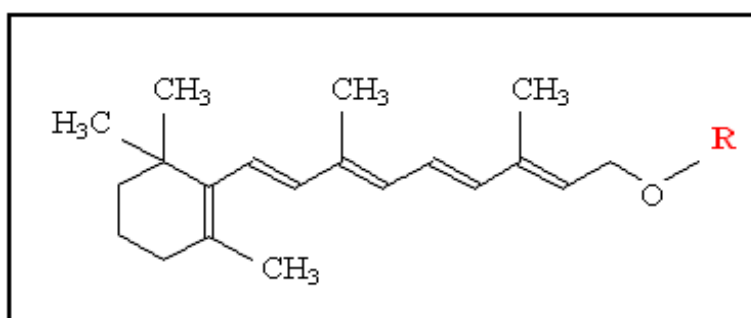
O envelhecimento natural da pele é acompanhado por algumas mudanças estruturais e funcionais deste órgão, como: redução do número de fibroblastos no interstício dérmico, redução

da síntese de colágeno e aumento da degradação de colágeno e elastina na derme, malformação da camada de queratina e redução do estrato granular a uma única camada de células contendo grânulos de queratina (LEONARDI, 2004; FU *et al.*, 2007). Através da determinação de marcadores celulares e histológicos, Varani & seu grupo de pesquisa (2000) demonstraram que a aplicação tópica de 1% de retinol, por sete dias, em quatro grupos de faixas etárias diferentes, resultou na redução dos níveis das metaloproteinases da matriz MMP1 e MMP9, aumentou o crescimento dos fibroblastos em cerca de três vezes e aumentou a expressão de colágeno dérmico.

O benefício da aplicação tópica dos retinóides também tem sido observado na pele fotoenvelhecida (FU *et al.*, 2007). Em revisão da literatura, Tierney & Hanke (2010) identificaram que a aplicação de retinóides tópicos nos pacientes, em 41,67% dos estudos, produziram melhora em nível histológico na pele, incluindo alterações na espessura da epiderme e derme, compactação do estrato córneo, maior produção de colágeno tipo I e III e formação de dímeros de timina.

Os retinóides constituem uma família da qual faz parte a vitamina A, seus derivados naturais e análogos sintéticos (KANG, 2005), os quais são indicados topicamente para o tratamento de doenças de pele, especialmente com ação preventiva, para retardar ou evitar certas alterações degenerativas associadas ao processo de envelhecimento, como a pele seca e descamativa e a formação de rugas (LUPO, 2001; MAIA CAMPOS, 2006).

Na estrutura molecular de um retinóide natural é possível identificar três partes fundamentais, como ilustrado na Figura 3: um anel não aromático, uma cadeia poliisoprênica e um grupo funcional terminal polar com carbonos e oxigênio (VAHLQUIST, 1999; JOUANDEAUD *et al.*, 2004).



**Figura 3** – Fórmula estrutural dos retinóides (obtido da FARMACOPÉIA EUROPÉIA 5.0, 2005).

Os análogos sintéticos do ácido retinóico são classificados em três gerações, com base nas suas características estruturais. As moléculas da 1ª geração são o retinol e os compostos que dele podem derivar metabolicamente, como a tretinoína, isotretinoína, alitretinoína, retinaldeído e os ésteres de retinila. Da 2ª geração fazem parte os retinóides monoaromáticos (em que o anel  $\beta$ -ionona é aromático), como, o etretinato e a acitretina. Na 3ª geração estão integrados os retinóides poliaromáticos como o tazaroteno e o adapaleno (DARLENSKI; SURBER; FLUHR, 2010).

A Farmacopéia Européia 5.0 (2005) descreve que as moléculas da 1ª geração variam estruturalmente de acordo com o grupo polar funcional presente no radical (R) terminal da molécula, podendo ser: R<sub>1</sub>: H = retinol, R<sub>2</sub>: OH = retinal, R<sub>3</sub>: COOH = ácido retinóico (isômero ácido 11-*trans*-retinóico = tretinoína e isômero ácido 13-*cis*-retinóico = isotretinoína), R<sub>4</sub>: CO-CH<sub>3</sub> = retinol acetato, R<sub>5</sub>: CO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> = retinol propionato, R<sub>6</sub>: CO-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub> = retinol palmitato.

No trabalho de Benevenuto & colaboradores (2010) verificou-se por meio da análise histológica e histométrica que formulações contendo filtros UV suplementadas com palmitato de retinol melhoram o eritema e diminuíram o número de células fotodanificadas, além de manterem a espessura da epiderme viável na pele de camundongos sem pelo; ao passo que na formulação sem estabilizante ocorreu redução na espessura da epiderme viável devido à atrofia induzida pela radiação UV.

Buscando compreender se os efeitos protetores ao DNA das células, após a exposição da pele aos raios UVB, são receptores-dependentes ou ligados a outras propriedades da molécula, Sorg & colaboradores (2005) demonstram que os retinóides tópicos (retinol, retinaldeído e palmitato de retinol) diminuíram significativamente ( $\approx 50\%$ ) o número de células apoptóticas e a formação de dímeros de timina na epiderme de ratos expostos aos raios UVB, de modo similar ao ácido retinóico. Com isso, conclui-se que a proteção aos danos do DNA ocorre por mecanismo independente da ativação de receptores nucleares de retinóides.

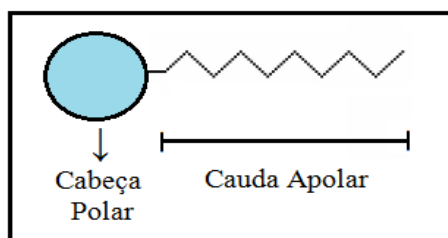
Papageorgiou & colaboradores (2007) propuseram o uso do palmitato de retinol em substituição ao ácido retinóico nos tratamentos dermatológicos que buscam retardar e, até mesmo melhorar os efeitos do envelhecimento cutâneo, devido à baixa atividade irritante deste princípio ativo em comparação ao seu precursor e por sua ação tópica estar relacionada com a clivagem enzimática de sua ligação éster pelas enzimas estearases da pele (BOLLAG, 1983; TANG & RUSSELL, 1991; SORG *et al.*, 2006), independente de receptores nucleares do ácido retinóico (SORG *et al.*, 2005).

### 2.3. – Sistemas Nanoestruturados: Cristais Líquidos

---

A interação de substâncias farmacologicamente ativas com interfaces de agregados supramoleculares de compostos anfifílicos representa um campo de estudo muito relevante na área farmacêutica devido ao potencial destas estruturas em atuarem como sistemas transportadores de fármacos e pelas implicações biológicas da presença destes compostos em fórmulas farmacêuticas, aumentando a estabilidade e a biodisponibilidade de um grande número de compostos de uso terapêutico (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

Os compostos anfifílicos são moléculas cuja estrutura química contém grupos com polaridades diferentes e interligadas, ou seja, uma região hidrofílica (iônica ou não) e uma região hidrofóbica, a qual pode ser representada por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas com mais de oito grupos metilênicos. Usualmente pode-se dizer que estas moléculas são formadas por uma cabeça polar e uma cauda apolar, conforme representado na Figura 4 (SCHRAMM, 2000).



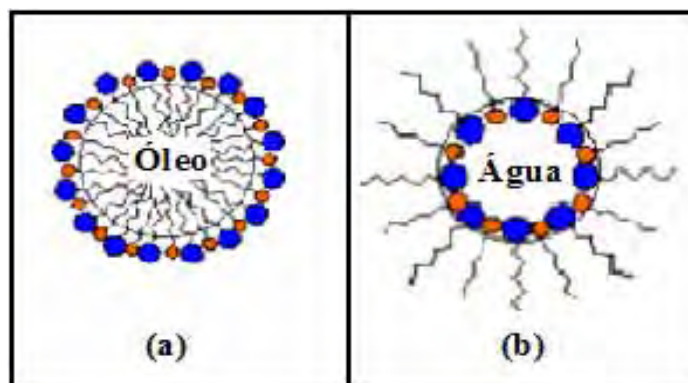
**Figura 4** – Representação esquemática da estrutura química de compostos anfifílicos.

Em decorrência da presença de regiões com polaridades diferentes nas moléculas anfifílicas, uma de suas principais propriedades é a de adsorção em superfícies ou interfaces (líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido), promovendo a redução significativa da tensão superficial ou interfacial, ainda que empregados em baixíssimas concentrações. De posse desta propriedade, as moléculas anfifílicas também são chamadas de tensoativos (PREVIDELLO *et al.*, 2006; SANTOS, 2010).

A medida quantitativa da tendência à redução de superfície é a tensão superficial ou interfacial ( $\gamma$ ). Assim, a tensão superficial pode ser interpretada como uma força por unidade de área que se opõe ao aumento da superfície. No sistema internacional (S.I.), a unidade de tensão superficial/interfacial é o newton por metro (N/m) (NETZ & ORTEGA, 2002).

Na interface óleo/água, as moléculas anfifílicas estão agregadas com as caudas hidrocarbônicas mergulhadas no óleo e as cabeças polares na água, formando as micelas

esféricas; enquanto que as micelas reversas são formadas pelos anfifílicos em interfaces água/óleo, em que as cabeças hidrofílicas estão voltadas para o núcleo e as caudas hidrofóbicas em contato com o diluente (ambos esquematizados na Figura 5) (LAWRENCE & REES, 2000).



**Figura 5** – Representação esquemática das micelas, dependendo da natureza do solvente: (a) micelas; (b) micelas reversas (adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

A presença de uma interface induz efeitos físico-químicos no sistema, que podem ser abordados de um ponto de vista termodinâmico. A energia livre de Gibbs (equação 1) na formação de sistemas micro e nanoestruturados depende dos tensoativos reduzirem a tensão superficial de interfaces óleo-água e mudarem a entropia do sistema tal que:

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad \text{[Equação 1],}$$

sendo que,  $\Delta G_f$  é a energia livre de formação,  $\gamma$  é a tensão superficial na interface óleo/água,  $\Delta A$  é a mudança na área interfacial após a microemulsificação,  $T$  é a temperatura e  $\Delta S$  é a mudança de entropia do sistema (LAWRENCE & REES, 2000).

Com base na teoria termodinâmica, a formação e a estabilização de sistemas micro e nanoestruturados resulta de uma grande energia de adsorção livre (adsorção positiva) do tensoativo combinado com uma tensão interfacial muito baixa (OLIVEIRA *et al.*, 2009), o suficiente para que a energia interfacial positiva (dada por  $\gamma A$ , onde  $A$  é a área interfacial) possa ser compensada pela energia livre de agitação ( $\Delta G_m$ ), comprovando, assim, a grande importância da combinação ideal entre tensoativos, responsáveis pela redução da tensão interfacial entre óleo e água (ATKINS & DE PAULA, 2008; SURMAN *et al.*, 2009).

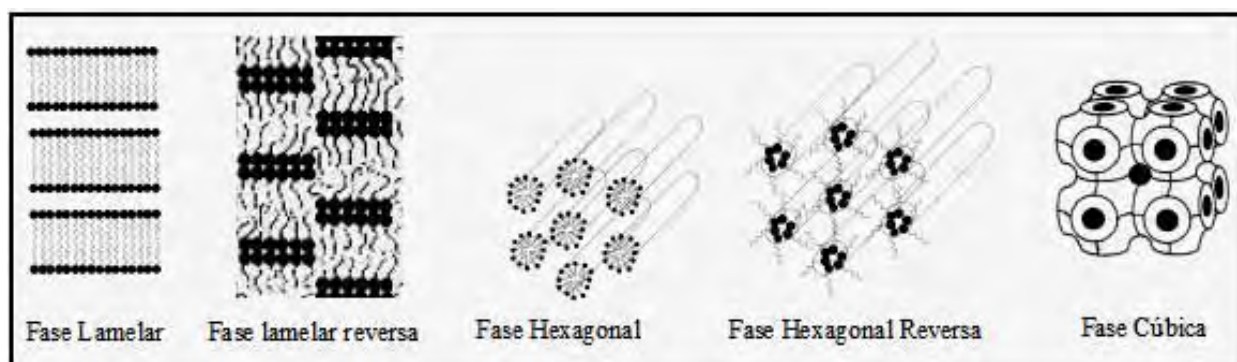
À medida que se eleva a concentração dos tensoativos no diluente, ocorre uma saturação da interface, permitindo que os monômeros formem espontaneamente agregados moleculares, de tamanho coloidal, as micelas, em um processo chamado micelização. As micelas mantêm-se em equilíbrio dinâmico com seus monômeros (PREVIDELLO *et al.*, 2006).

A concentração em que ocorre a micelização, numa dada temperatura, é denominada concentração micelar crítica (CMC). A CMC é uma faixa estreita de concentração característica para cada tensoativo, na qual ocorre uma transição súbita em suas propriedades físico-químicas como, por exemplo, tensão superficial, condutividade, pressão osmótica e espalhamento de luz. Esta transição corresponde à concentração a partir da qual se torna termodinamicamente favorável a formação de agregados micelares (FERREIRA *et al.*, 2005).

Em uma concentração acima da CMC, para uma temperatura fixa e na presença de um solvente em excesso (aquoso ou orgânico), os agregados de moléculas anfifílicas adquirem um nível maior de ordem no espaço e podem formar cristais líquidos liotrópicos como um fenômeno comum de auto-organização molecular para atingir a estabilidade termodinâmica (BECHTOLD, 2005; FORMARIZ *et al.*, 2005; PREVIDELLO *et al.*, 2006).

Os cristais líquidos, também são designados como estado intermediário ou mesomórfico (*mesos* = intermediário; *morphé* = forma) da matéria, por possuírem propriedades simétricas e mecânicas intermediárias entre os sólidos cristalinos e os líquidos isotrópicos (TYLE, 1989).

Dentre a vasta gama de microestruturas liotrópicas possíveis de serem formadas com a dispersão de moléculas anfifílicas em água, óleo ou na presença dos dois componentes, existem três formas bem conhecida: as fases lamelares ( $L_a$ ), hexagonais ( $H_I$  = hexagonal normal e  $H_{II}$  = hexagonal reversa) e cúbicas ( $Q$ ) (conforme Figura 6) (MUZZALUPO *et al.*, 2009).



**Figura 6** – Representação esquemática de sistemas nanoestruturados formados por agregados de moléculas anfifílicas (adaptado de LAWRENCE & REES, 2000; BURDUCEA, 2004; PASQUALI; BREGNI; SERRAO, 2005).

O arranjo estrutural das fases lamelares ( $L_a$ ), hexagonais ( $H$ ) e cúbicas ( $Q$ ) é obtido por solvatação de moléculas anfifílicas que resultam em diferentes geometrias cônicas ou cilíndricas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). eficiência terapêutica do fármaco



Na fase lamelar, as moléculas anfifílicas estão dispostas em infinitas camadas bidimensionais dispostas paralelamente com alternância entre camadas polar e apolar, sendo que as cabeças polares das moléculas estão direcionadas para o meio aquoso e as cadeias hidrocarbônicas se dispõem na direção oposta, de modo a evitar a água (MUZZALUPO *et al.*, 2009). A ordenação da bicamada não é afetada pelo efeito gravitacional, o que mantém constante a distância vertical entre as camadas. Apesar de possuir uma elevada concentração de tensoativo, esta fase líquido-cristalina se caracteriza por sua relativa fluidez, com isso, as bicamadas podem deslizar facilmente uma sobre as outras (PASQUALI; BREGNI; SERRAO, 2005).

À medida que aumenta-se a concentração do tensoativo, a largura da camada da fase lamelar também aumenta e possibilita a inclusão lateral entre moléculas. Isto leva a uma mudança de fase e, dependendo da polaridade do agente de solvatação e do próprio tensoativo, a transição resulta na formação da fase hexagonal normal ( $H_I$ ) ou hexagonal reversa ( $H_{II}$ ). A fase hexagonal é nomeada após as micelas serem empacotadas hexagonalmente em estruturas cilíndricas de comprimento indefinido, por meio do qual seus grupos funcionais polares podem estar do lado de fora ou de dentro da estrutura (MUZZALUPO *et al.*, 2009).

A fase  $H_I$  é constituída por micelas cilíndricas dispostas em um retículo bidimensional hexagonal e a água forma uma fase contínua que completa o espaço entre os cilindros; enquanto que a fase  $H_{II}$  contém núcleos de água rodeados pelos grupos polares ou iônicos das moléculas de substâncias anfifílicas, com o volume restante ocupado completamente pelas cadeias de hidrocarbonetos, preenchendo os vazios entre os cilíndricos empacotados hexagonalmente (PASQUALI; BREGNI; SERRAO, 2005; MUZZALUPO *et al.*, 2009).

A forma cúbica normal ou a cúbica inversa formam micelas inversas esféricas e/ou elipsoidais (MUZZALUPO *et al.*, 2009). As fases cúbicas possuem uma viscosidade muito elevada e não apresentam birrefringência (PASQUALI; BREGNI; SERRAO, 2005), por este motivo, não são reconhecidas opticamente pelo microscópio de luz polarizada, porque são isotrópicas, mas podem ser distinguidos de soluções micelares isotrópicas por sua alta viscosidade e rigidez (BURDUCEA, 2004).

A outra classe de cristais líquidos é dependente da temperatura para a sua formação, por isso são ditos termotrópicos (*thermé* = calor; *tropé* = alteração) (SINGH, 2000).

Métodos apropriados para a investigação e a caracterização de cristais líquidos liotrópicos são frequentemente usados em laboratórios farmacêuticos, na etapa de desenvolvimento. Dentre esses métodos ressalta-se a microscopia de luz polarizada e a reologia (PATEL & PATEL, 2010).

### **2.3.1. – Microscopia de Luz Polarizada**

A microscopia de luz polarizada é uma ferramenta vital para a distinção de materiais isotrópicos e anisotrópicos, diante disso, os cristais líquidos são facilmente detectados através dessa técnica devido à sua propriedade de birrefringência (FRIBERG; HILTON; GOLDSMITH, 1987).

As ondas de luz, polarizadas através de um cristal de Nicol, passam pelos materiais isotrópicos (exemplo, mesofase cúbica) com velocidade constante, emergindo da superfície do mesmo sem alteração do plano da luz polarizada, pois esses materiais não são capazes de desviar o plano de luz incidente. Ao passo que a capacidade dos materiais anisotrópicos (como exemplo, mesofases lamelares e hexagonais) em desviarem o plano de luz incidente, faz com que as ondas de luz o atravessem a diferentes velocidades, apresentando propriedades ópticas que mudam dependendo da direção de propagação da luz através da substância e da orientação do plano vibracional (NETZ & ORTEGA, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A transição do estado sólido cristalino ao estado líquido isotrópico não é um estado único, mas uma sucessão de transições passando por diversas mesofases termodinamicamente estáveis, assim, os cristais líquidos liotrópicos podem formar uma série de estruturas específicas. De posse dessa informação, a observação da textura óptica dos materiais anisotrópicos por microscopia de luz polarizada é considerada um dos mais importantes métodos para a identificação e classificação preliminar deste grande número de diferentes fases líquido-cristalinas (BURDUCEA, 2004).

Em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa, como SOTIRO (2007) e CARVALHO (2009), já comenta-se que as regiões mesofásicas desviam o plano da luz polarizada, e com isso são obtidas imagens característica do tipo de fase formada. Por exemplo, a fase lamelar pode ser identificada através da visualização das “cruzes de malta”, a fase hexagonal através da presença de estrias ou estruturas parecidas com fibras e as estruturas isotrópicas, como microemulsões e fases cúbicas, são visualizadas como campo escuro por não desviarem a propagação da luz polarizada.

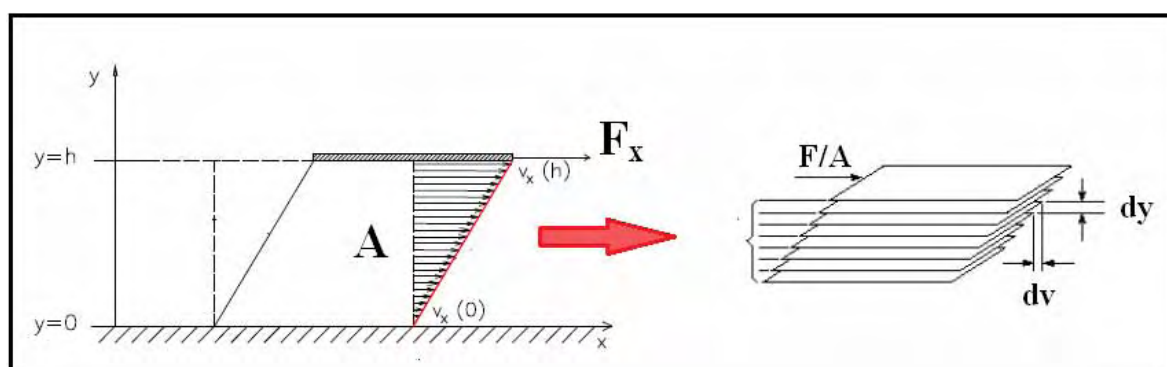
### **2.3.2. – Viscosidade e Comportamento Reológico**

O termo reologia foi inventado pelo professor Bingham da Universidade de Lafayette, para designar o estudo de deformação e fluxo da matéria sobre a ação de forças. Esta definição

foi aceita, em 1929, com a fundação da Sociedade Americana de Reologia (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1991).

Em 1678, Robert Hooke constituiu a premissa básica da teoria clássica de elasticidade nos sólidos. Enquanto que na outra extremidade de pensamento, Isaac Newton deu atenção aos líquidos e publicou, em 1687, a hipótese associada ao fluxo de cisalhamento constante: “A resistência decorrente da falta de deslizamento dos líquidos é proporcional à velocidade com que as camadas do líquido estão separadas umas das outras (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1991).

A lei de fluxo de Newton considera o modelo de camadas paralelas de líquido. Considera-se que a camada inferior é fixa e a aplicação de uma força constante sobre a camada superior faz com que cada uma das camadas movam-se com velocidade diretamente proporcional à sua distância da camada inferior estacionária (Figura 7) (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2005).



**Figura 7** – Demonstração do escoamento de um fluido entre duas placas paralelas com o líquido preenchendo a distância  $dy$  entre as placas (adaptado de BARNES; HUTTON; WALTERS, 1991; NAÉ, 1993).

O efeito de uma força tangencial sobre as sucessivas camadas moleculares paralelas do líquido produzem um deslocamento. Contudo, a camada superior sofre o maior deslocamento, enquanto que a camada mais inferior de todas permanece fixa (NETZ & ORTEGA, 2002); ou seja, o movimento das camadas paralelas obedece um gradiente de velocidade, ou taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ), que corresponde à diferença entre a velocidade de deslocamento ( $dv$ ) entre dois planos do líquido separados pela altura da camada molecular ( $dy$ ), como expressa a equação 2 (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2005):

$$\gamma = \frac{dv}{dy} \quad \text{[Equação 2]}$$

A velocidade de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) tem como unidade  $s^{-1}$  (1/segundo) (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

A força  $F$  aplicada por unidade de área  $A$ , requerida para iniciar o fluxo de uma camada molecular sobre a outra, é chamada tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), como expressa a equação 3 (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1991). A tensão de cisalhamento tem como unidades Newton por metro quadrado ( $N/m^2$ ) ou Pascal (Pa) (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

$$\tau = \frac{F}{A} \quad \text{[Equação 3]}$$

Nos fluidos newtonianos, a magnitude do gradiente de cisalhamento é proporcional à tensão de cisalhamento aplicada, como expressa a equação 4. Assim, se (NETZ & ORTEGA, 2002):

$$\frac{dv}{dy} = \dot{\gamma} \text{ e } F = \tau; \quad \text{temos } \dot{\gamma} \propto \tau \quad \text{[Equação 4]}$$

Introduzindo uma constante de proporcionalidade, pode-se expressar essa relação, denominada equação de fluxo de Newton (equação 5), como (NETZ & ORTEGA, 2002):

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad \text{[Equação 5]}$$

Logo,  $\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$ , onde  $\eta$  é o coeficiente de viscosidade [Equação 6]

Para os líquidos ideais, o coeficiente  $\eta$  é uma medida da resistência do material ao escoamento e é designado viscosidade dinâmica, tendo como dimensões Pascal.segundo (Pa.s) (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

No caso dos sólidos de Hook, a constante de proporcionalidade entre tensão e taxa de cisalhamento é definida como *módulo de Young* ( $G$ ). O módulo  $G^*$  inclui o módulo elástico, ou de armazenamento ( $G'$ ), e o módulo viscoso, ou de perda ( $G''$ ) do comportamento reológico, bem como o ângulo de fase ( $i$ ) entre esses dois módulos, como descrito na equação 7 (NAÉ, 1993):

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{[Equação 7]}$$

Entretanto, a maioria dos materiais não obedece totalmente às leis de Newton (fluidos ideais) e nem de Hooke (sólidos ideais). Esses materiais que exibem, ao mesmo tempo, comportamento elástico e de fluxo, são chamados viscoelásticos, com isso, sua viscosidade não é constante ( $\eta_{ap}$ ) e muda como função da velocidade de cisalhamento aplicada à amostra (NAÉ, 1993).

O modelo matemático para exprimir o comportamento viscoelástico é a lei da potência, de acordo com a equação 8 (ALMEIDA & BAHIA, 2003):

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \quad \text{[Equação 8]}$$

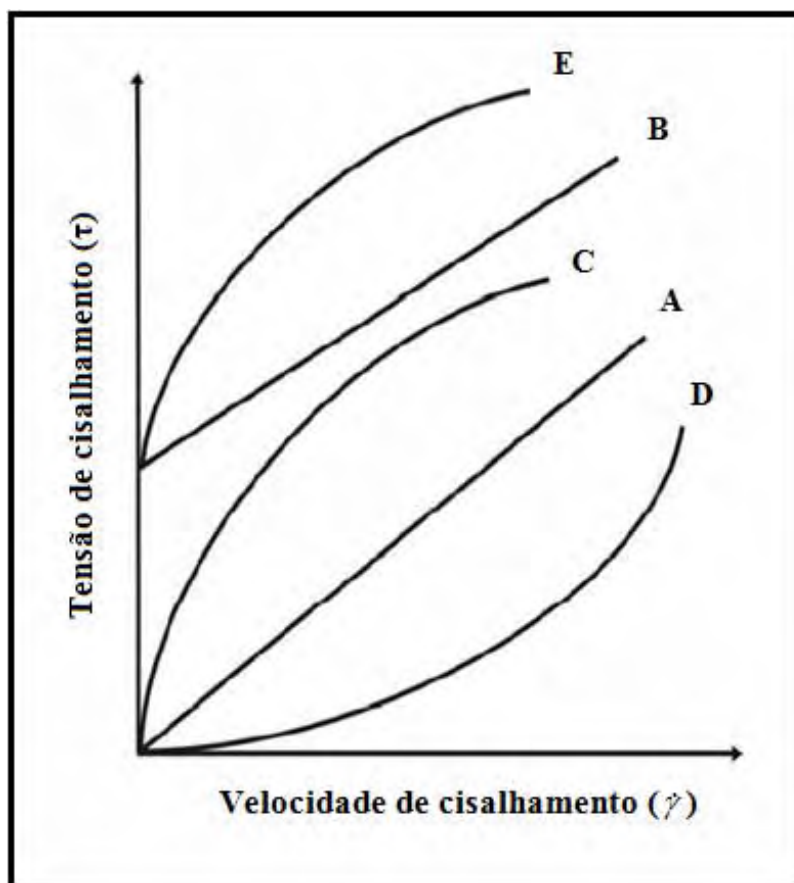
Na qual,

$k$  = coeficiente de consistência e tem as unidades da viscosidade;

$n$  = índice de escoamento, adimensional e caracteriza o desvio em relação ao comportamento newtoniano ( $n = 1$ ).

Os sistemas podem ser classificados quanto ao tipo de escoamento, ou fluxo, em reofluidificantes (também designados pseudoplásticos) em que  $n < 1$ , reofluidificantes com valor de cedência (ou plásticos) e reoespessantes (ou dilatantes) onde  $n > 1$  (ALMEIDA & BAHIA, 2003; ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2005).

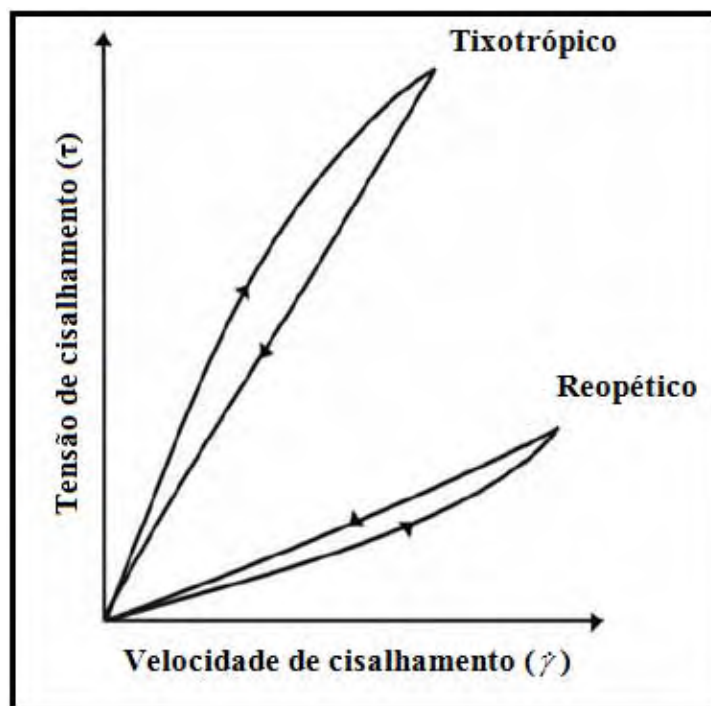
A Figura 8 representa as curvas de escoamento de diferentes tipos de comportamento reológico. A representação gráfica exhibe as relações tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) *versus* velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ).



**Figura 8** – Curvas de escoamento representativas dos diferentes comportamentos reológicos: (A) = fluido newtoniano; (B) = fluido binghamiano ou plástico ideal; (C) = pseudoplástico; (D) = dilatante; (E) = pseudoplástico com limite de escoamento (adptado de BARNES; HUTTON; WALTERS, 1991).

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 aumenta com o tempo, mantendo-se a mesma taxa de deformação. Ambos os fenômenos são reversíveis, sendo a reopexia um fenômeno raro de acontecer (PAL; YAN; MASLIYAH, 1992).

Os dois fenômenos estão representados no mesmo gráfico, variando tensão de cisalhamento e taxa de deformação, como mostra a Figura 9.



**Figura 9** – Curvas de fluxo para fluidos com comportamento dependente do tempo (adaptado de PAL; YAN; MASLIYAH, 1992).

Para verificar graficamente a existência de tixotropia, determina-se a velocidade de cisalhamento em ciclos nos quais se aumenta e diminui a tensão de cisalhamento. Se as curvas obtidas em cada direção forem diferentes, se obtém uma área de histerese, que caracteriza bem o fluxo tixotrópico (PAL; YAN; MASLIYAH, 1992).

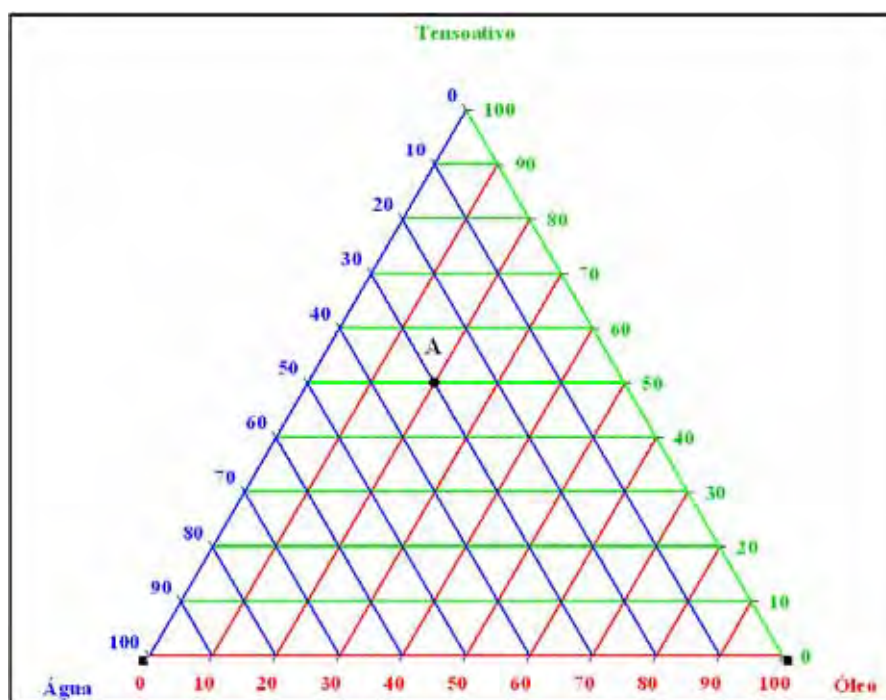
### 2.3.3. – Diagrama de Fases

A construção de diagrama de fases pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais os sistemas micro e nanoestruturados existem e em quais proporções os componentes presentes limitam as regiões de transição de fases entre emulsão, microemulsões A/O e O/A, fases líquido-cristalinas e separação de fases (OLIVEIRA *et al.*, 2004a; FORMARIZ *et al.*, 2005).

O modo mais usual de descrever sistemas de três componentes é através do diagrama ternário de fases, onde 100% da concentração de cada um dos componentes é representada no vértice do triângulo, de acordo com a seguinte ordem: tensoativo no vértice superior, água no vértice esquerdo e óleo no vértice direito. Para a leitura das concentrações de cada componente (em %), deve-se seguir orientação no sentido anti-horário, sendo que no eixo oposto ao vértice

superior está representada a fase oleosa, no eixo oposto ao vértice esquerdo representa-se o tensoativo e no eixo oposto ao vértice direito, a fase aquosa.

Por exemplo, o ponto A destacado na Figura 10 é de uma formulação constituída por 20% de fase oleosa (linhas vermelhas), 30% de fase aquosa (linhas azuis) e 50% de tensoativo (linhas verdes).



**Figura 10** – Representação esquemática de um diagrama ternário de fases.

## 2.4. – Validação de Metodologia Analítica

---

As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos como um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e como uma necessidade progressiva de obter dados analíticos comparáveis e consistentes, para a eliminação de barreiras técnicas entre os países.

Segundo o Grupo de Trabalho EURACHEM (1998), validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer. No âmbito nacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL-ANVISA, 2003) diz que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.



Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar métodos não-normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normalizados (INMETRO, 2010). E a revalidação da metodologia analítica deve acontecer nas seguintes circunstâncias: mudanças na síntese da substância ativa, mudanças na composição do produto acabado ou qualquer alteração no procedimento analítico (BRASIL-ANVISA, 2003).

Para a realização da validação / revalidação de metodologias analíticas, a ANVISA (BRASIL-ANVISA, 2003) sugere quatro categorias e os ensaios necessários para cada uma delas, conforme as Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Classificação dos testes, de acordo com a finalidade.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do Teste</b>
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação.

**Tabela 2** – Ensaios necessários para a validação do método analítico segundo a finalidade.

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II</b>		<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
		<b>Quantitativo</b>	<b>Ensaio-Limite</b>		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo Linear	Sim	Sim	*	*	Não
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão e Recuperação	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* Se houver comprovação da reprodutibilidade, não é necessária a comprovação da precisão Intermediária.

Como visto na Tabela 2, os parâmetros investigados no processo de validação para a determinação quantitativa de princípios ativos, a fim de demonstrar o desempenho do método são: **especificidade, linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e recuperação** (BRASIL-ANVISA, 2003).

### **2.4.1. – Especificidade e Seletividade**

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL-ANVISA, 2003). Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2010).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, apenas depois de assegurada a seletividade do método, os demais parâmetros analíticos devem ser analisados.

### **2.4.2. – Linearidade e Faixa Linear de Trabalho**

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela elaboração de uma curva analítica construída a partir da análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser  $= 0,99$  (BRASIL-ANVISA, 2003).

O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é freqüentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático (INMETRO, 2010).

A faixa linear de trabalho é o intervalo especificado entre os limites máximo e mínimo de quantificação de um método analítico. É estabelecida pela confirmação de que o método apresenta linearidade dentro de uma faixa de trabalho em que os resultados apresentem precisão e exatidão confiáveis (BRASIL-ANVISA, 2003).

### **2.4.3. – Limite de Quantificação**

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL-ANVISA, 2003).

#### 2.4.4. – Limite de Detecção

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL-ANVISA, 2003).

#### 2.4.5. – Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis (BRASIL-ANVISA, 2003):

**1. Repetibilidade** (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando a faixa linear de trabalho, ou seja, triplicata de três concentrações (baixa, média e alta) ou um mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste.

**2. Precisão intermediária** (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

**3. Reprodutibilidade** (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou como o coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas. A equação 9 refere-se ao CV%:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

[Equação 9]

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL-ANVISA, 2003).

#### **2.4.6. – Exatidão e Recuperação**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL-ANVISA, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, realizar triplicata de três concentrações diferentes (baixa, média e alta) (BRASIL-ANVISA, 2003). A exatidão (**E**) é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente ( $CM_e$ ) e a concentração teórica ( $C_t$ ) correspondente do material de referência adicionado, conforme a equação 10:

$$E = \frac{CM_e}{C_t} \times 100 \quad \text{[Equação 10]}$$

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são:

- Aplicar a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência);
- Comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada (metodologia farmacopeica ou outro procedimento validado), cuja exatidão tenha sido estabelecida;
- Ensaio de recuperação: adição de concentração conhecida do analito a uma mistura dos componentes da formulação (placebo contaminado).

#### **2.4.7. – Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (BRASIL-ANVISA, 2003).

## 2.5. – Estudo da Atividade Antioxidante *in vitro*

---

No sistema biológico, antioxidantes endógenos são definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada com a de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação do substrato. O estresse oxidativo acarretado pelo desequilíbrio na produção de antioxidantes endógenos (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) à favor da formação das espécies reativas pró-oxidantes de oxigênio são responsáveis por alterações funcionais no sistema biológico, dentre elas, o envelhecimento (SINGH & SINGH, 2008).

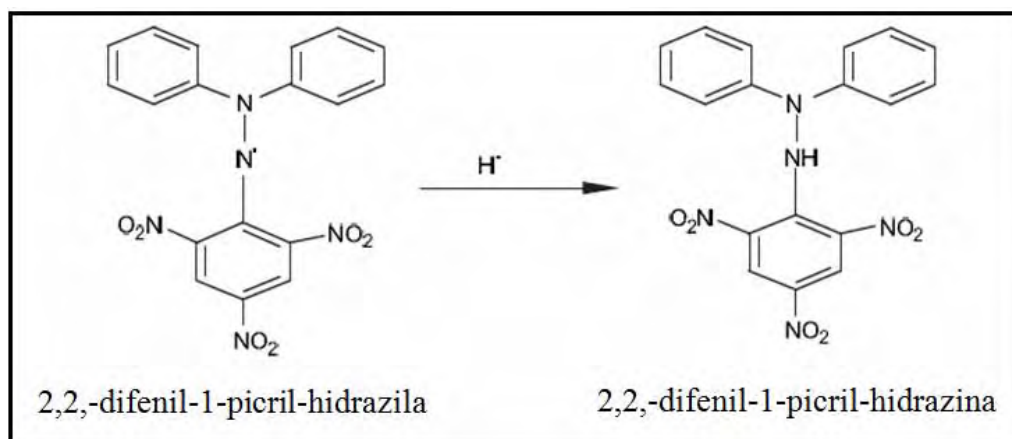
Em indivíduos idosos ou em pessoas com estresse oxidativo crônico originado pela exposição solar excessiva, o sistema antioxidante endógeno torna-se menos eficiente ou está saturado e surge, portanto, a necessidade do uso de antioxidantes exógenos para capturar as espécies reativas de oxigênio remanescentes (KOHEN & GATI, 2000; SORG *et al.*, 2006).

Os antioxidantes exógenos são de uso tópico. Dentre os antioxidantes tópicos disponíveis, o trabalho dos pesquisadores Tsuchiya *et al.* (1992), Tesoriere *et al.* (1997), Sorg; Tran; Saurat (2001) e Sorg; Kuenzli; Kaya (2005) destacam a capacidade dos retinóides (família da qual faz parte a vitamina A, seus derivados naturais e análogos sintéticos) exercerem atividade sequestradora de radicais livres *in vitro*, contribuindo para a resolução de problemas associados ao envelhecimento cutâneo.

Existem muitas metodologias *in vitro* disponíveis para medir a atividade antioxidante de substâncias baseadas na habilidade em que elas têm para sequestrar radicais livres ou inibir a peroxidação lipídica (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Uma das metodologias mais usadas consiste em avaliar a capacidade da substância-teste em reduzir o radical livre de DPPH<sup>•</sup> (2,2,-difetil-1-picril-hidrazila) para o composto 2,2,-difetil-1-picril-hidrazina (ROGINSKY & LISSI, 2005).

A Figura 11 demonstra que o elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio do radical DPPH<sup>•</sup> é reduzido por um átomo de hidrogênio formando a hidrazina.



**Figura 11** – Reação química de redução do radical DPPH<sup>•</sup> pela substância antioxidante.

O radical livre de DPPH<sup>•</sup> 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 seqüestradora 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% (IC<sub>50</sub>). Portanto, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua IC<sub>50</sub> e maior sua atividade antioxidante (SOARES *et al.*, 1997).

## 2.6. – Estudo de Liberação *in vitro*

---

A utilização de ensaios *in vitro* para o estudo da liberação de princípios ativos tem assumido importância crescente no suporte ao desenvolvimento galênico como perspectiva de caracterização das formulações, por meio da determinação dos parâmetros de velocidade e extensão da liberação (TOSCANO *et al.*, 2001).

Levando em consideração às contribuições do veículo em disponibilizar a substância ativa incorporada, destaca-se a importância de realizar estudos prévios de liberação *in vitro*, na fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos, para obter dados valiosos sobre as

particularidades estruturais do veículo e determinar a capacidade deste em liberar o agente terapêutico, de modo a proporcionar uma atividade biológica adequada e eficaz do produto acabado (SATO *et al.*, 2007). Destaca-se ainda a importância dos ensaios de liberação *in vitro* da substância ativa de sua formulação como importante subsídio na obtenção de dados sobre a estabilidade do produto e a influência do processo de manufatura no desempenho de liberação da substância ativa no produto acabado (SHAH; ELKINS; WILLIAMS, 2002).

A liberação *in vitro* do princípio ativo, a partir de formas farmacêuticas de uso tópico, têm sido extensivamente estudada, usando o sistema de difusão das células de Franz com membrana sintética (SIEWERT *et al.*, 2003). O sistema, constituído por um compartimento doador e um compartimento receptor entre os quais a membrana sintética é posicionada, deve possibilitar agitação constante, temperatura controlada e facilidade de amostragens da solução receptora (OECD, 2004).

Como demonstra o esquema representado na Figura 12, o desenvolvimento de um sistema *in vitro* para avaliar a liberação baseia-se em etapas cruciais, como: a seleção da fase receptora adequada, a seleção da membrana artificial de suporte, a presença do fármaco no compartimento doador em dose infinita (TOSCANO *et al.*, 2001), o controle da temperatura do fluido receptor em 32°C para refletir a temperatura da pele normal, o tempo de agitação, a constituição do agitador magnético por um material inerte e não adsorvente e a ausência de bolhas no sistema (SIEWERT *et al.*, 2003).



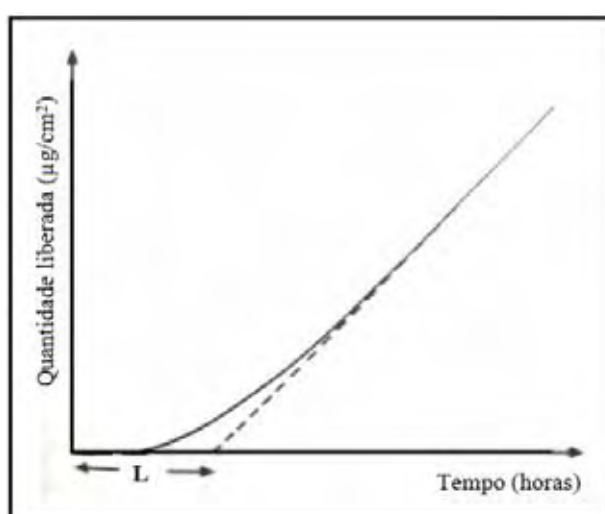
**Figura 12** – Esquema da célula de difusão do equipamento Microette Plus - Hanson Research<sup>®</sup>, empregada nos estudos de liberação *in vitro*.

Nos sistemas reservatórios, a substância ativa encontra-se separada do meio de dissolução através de uma interface de agregados supramoleculares de compostos anfifílicos, devendo transpor essa barreira para ser liberado para o meio. Nesse contexto está inserido o conceito dos sistemas transportadores de fármacos, os quais são capazes de compartimentalizar a substância ativa e podem controlar a sua velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

Os testes de liberação realizados em adequadas condições *in vitro* têm produzido resultados que confirmam a aplicabilidade do estudo e têm sido úteis para prover informações sobre a liberação da substância ativa a partir da sua matriz (TOSCANO *et al.*, 2001; OECD, 2004).

A compreensão de como as moléculas da substância ativa passam pelas membranas sintéticas leva ao entendimento dos fatores que influenciam na liberação da substância ativa, a partir de sua matriz. Esta compreensão pode ser elucidada por tratamento matemático dos dados obtidos (AULTON, 2005).

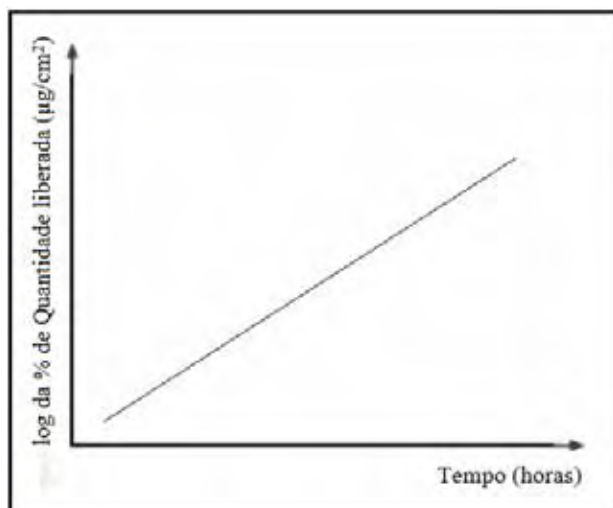
Em um processo de ordem zero, relaciona-se a quantidade de massa  $m$  difundida acumulada que passa por unidade de área pela membrana em função do tempo, como demonstra a Figura 13. O estado estacionário (*steady-state*) é alcançado quando o gráfico se torna linear e a extrapolação da porção linear até o eixo do tempo, ou seja, para  $m = 0$ , têm-se o valor de *lag time*  $L$  (AULTON, 2005).



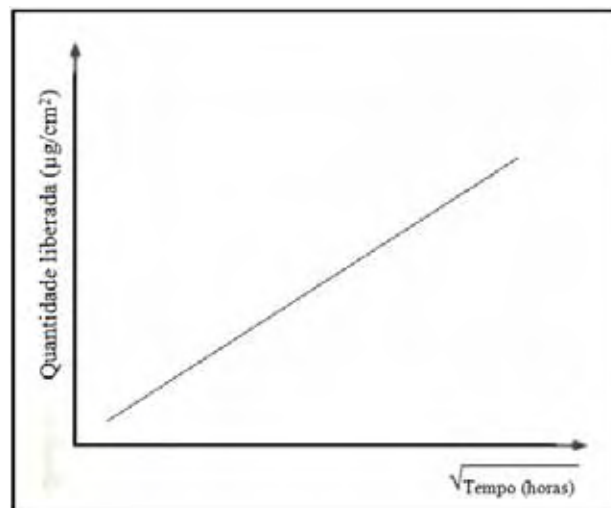
**Figura 13** – Representação esquemática que traduz a curva de liberação *in vitro* de substâncias ativas que obedecem a cinética de ordem zero.



Nos casos em que o veículo funciona como um mecanismo controlador da velocidade de cedência, a liberação da substância ativa do veículo é a etapa limitante para sua posterior ação terapêutica no local de ação. A Figura 14 demonstra o exemplo de liberação de uma substância que segue cinética de primeira ordem e a Figura 15 exhibe o comportamento de substâncias que possuem cinética de liberação de pseudoprimeira ordem ou que atendem a equação de Higuchi, isto é, a quantidade liberada é proporcional à raiz quadrada do tempo (AULTON, 2005).



**Figura 14** – Representação esquemática que traduz a curva de liberação *in vitro* de substâncias ativas que obedecem a cinética de primeira ordem.



**Figura 15** – Representação esquemática que traduz a curva de liberação *in vitro* de substâncias ativas que obedecem a cinética de pseudoprimeira ordem (lei de Higuchi).

## 2.7. – Estudo de Bioadesão *in vitro*

---

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).

Data do início da década de 1980 o conceito de incorporar moléculas adesivas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de substâncias ativas, de modo a favorecer que a formulação estabeleça um contato íntimo com o tecido de absorção, liberando a substância no local de ação, com o conseqüente aumento da biodisponibilidade (HÄGERSTRÖM, 2003; WOODLEY, 2001).

Ferrarini e colaboradores (2007) apontam que a utilização de uma formulação bioadesiva possui como vantagens o alcance de uma terapia mais eficiente no uso de produtos tópicos pela permanência da substância ativa no local de ação. O aumento no tempo de contato da formulação com a superfície de absorção, combinado com a liberação controlada da substância ativa, favorece a permeabilidade do ativo através do tecido, diminui o número de administrações do produto e mantém um elevado gradiente de concentração entre a superfície absorptiva e a camada de princípio ativo depositada sobre esta (WOODLEY, 2001; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

As formulações que possuem a capacidade de adesão à superfície da pele formam um filme no local de aplicação (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Quase todos os materiais bioadesivos descritos na literatura são polímeros com alto peso molecular, tais como os polímeros de ácido acrílico, policarbofil e derivados da celulose (NIELSEN; SCHUBERT; HANSEN, 1998).

A adesão entre uma superfície biológica e a superfície de um polímero hidrofílico, ou a superfície ao qual o polímero hidrofílico foi enxertado ou adsorvido, decorre de interações entre as cadeias do polímero e as macromoléculas da superfície da pele. Para obter uma adesão máxima deve haver interação máxima entre as cadeias poliméricas do bioadesivo e as macromoléculas da superfície da pele pelo fenômeno de adsorção em cadeia (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Embora o estudo dos mecanismos envolvidos na avaliação de bioadesão *in vitro* tenha evoluído nos últimos vinte anos, nenhuma metodologia *in vitro* padrão foi especificamente desenvolvida para avaliar a bioadesão. A maioria das metodologias *in vitro* encontradas na

literatura é baseada na força necessária para romper a ligação entre o substrato biológico e o material avaliado (CARVALHO *et al.*, 2010).

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).

Hägerström & Edsman (2001) determinaram as propriedades mucoadesivas de géis poliméricos na mucosa nasal de suínos pelo método de força de ruptura à tração em analisador de textura em conjunto com a determinação de mucoadesão baseada em medidas reológicas. Os autores discutem que embora a determinação de mucoadesão por ensaios reológicos esteja tornando-se comum, há uma grande desvantagem em realizar as medidas reológicas isoladamente, pois os resultados obtidos podem variar consideravelmente dependendo da concentração e da sensibilidade a íons do polímero e os resultados podem não fornecer informações sobre as regiões mais fracas de mucoadesão, uma vez que não existe a interpenetração em camadas.

O uso em conjunto de técnicas reológicas associada com a realização do método de ruptura à tração em texturômetro podem avaliar *in vitro* a capacidade de fixação do bioadesão na pele ou na mucosa de modelos animais de modo satisfatório e muito próximo ao das condições reais *in vivo*.

Bromberg & pesquisadores (2004) avaliaram as propriedades reológicas e mucoadesivas de géis compostos por nove tipos de copolímeros em bloco (Pluronic) enxertados no ácido poli-acrílico através das ligações C-C com ou sem o uso do agente de ligação di-metacrilato de etileno-glicol (EGDMA). Os ensaios reológicos demonstraram que a elasticidade dos hidrogéis aumentou em função do peso molecular das unidades oxídicas de poli-propileno (PPO), bem como na presença de EGDMA. Nos ensaios de tração, a força de ruptura foi proporcional ao módulo  $G'$  nos géis.

### ***III. – Objetivos***

---

### III. – OBJETIVOS

---

#### 3.1. – Objetivo Geral

---

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um sistema líquido-cristalino à base de silicone para a liberação prolongada e a maximização da estabilidade química do palmitato de retinol, a fim de otimizar a utilização deste princípio ativo topicamente na prevenção e/ou atenuação do envelhecimento cutâneo.

#### 3.2. – Objetivos Específicos

---

- Desenvolvimento e caracterização física e físico-química de sistemas líquido-cristalinos contendo ou não palmitato de retinol (PR) 1%;
- Realização dos Testes de Estabilidade Preliminar e Acelerada de formulações selecionadas do diagrama de fases ternário, contendo ou não PR 1%;
- Validação de metodologia analítica para quantificação do PR e determinação do prazo de validade da formulação;
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do PR puro e acrescido às formulações contendo ou não cristais líquidos pelo método de redução do radical DPPH<sup>•</sup>;
- Avaliação da liberação *in vitro* do PR incorporado nas formulações contendo ou não cristais líquidos;
- Avaliação da bioadesão *in vitro* das formulações contendo 1% de PR.

## ***IV. – Materiais e Métodos***

---

## IV. – MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. – MATERIAIS

---

#### 4.1.1. – Substâncias e Reagentes

- Água destilada.
- Água ultrapura Milli Q.
- Ácido clorídrico, Synth.
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP, (INCI: PPG-5-ceteth-20), Procetyl AWS<sup>®</sup>, Mapric.
- Álcool etílico, Synth.
- Álcool isopropílico, Quimex.
- Butil-hidroxi-tolueno, Pharmaspecial.
- Cloreto de potássio (KCl), Chemco.
- Cloreto de sódio (NaCl), Chemco.
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), Sigma-Aldrich.
- Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Vetec - Química Fina.
- Glicose, Neon Comercial.
- Hidróxido de sódio, Synth.
- Monoestearato de sorbitano polioxietileno (20), Polissorbato 60, Basf.
- Monoleato de sorbitano, Span 80, Croda.
- Monolaurato de sorbitano polioxietileno (20), Polissorbato 20, Sigma-Aldrich.
- Monoleato de sorbitano polioxietileno (20), Tween 80, Mapric.
- Palmitato de retinol – matéria prima (1.000.000 UI/g), Purifarma.
- Palmitato de retinol – material referência (1.800.000 UI/g), Sigma-Aldrich.
- Polietilenoglicol 400, Pharmaspecial.
- Pentano, Merck.
- Propilenoglicol, Via Farma.
- Silicone poliéter funcional siloxano, (INCI: PEG-12-dimeticone), DC 5329<sup>®</sup>, Dow Corning.
- Silicone polisiloxano poliéter copolímero, (INCI: PEG/PPG-15/15-dimeticone), DC 5330<sup>®</sup>, Dow Corning.

## 4.2. – MÉTODOS

---

### 4.2.1. – Desenvolvimento dos Sistemas Líquido-Cristalinos: Construção do Diagrama de Fases Ternário

Para a construção do diagrama de fases ternário, nove formulações constituídas inicialmente da mistura de tensoativo (Procetyl AWS<sup>®</sup>) e fase oleosa (contendo 0,005% de BHT e silicone DC 5330<sup>®</sup> no diagrama 1 ou silicone DC 5329<sup>®</sup> no diagrama 2) nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, e 9:1, foram previamente pesadas e tituladas com fase aquosa (água destilada e deionizada em sistema Milli-Q da Millipore), com o auxílio de uma micropipeta, até perfazer uma quantidade final de 2g.

Após a mistura direta dos componentes, as formulações foram aquecidas em banho à 45°C e homogeneizadas com a utilização de bastão de vidro. As preparações obtidas foram armazenadas em frascos transparentes de vidro com tampa e mantidas em repouso, por 24 horas à 25 ± 2°C para aguardar estabilização do sistema e observar eventuais mudanças em suas características.

As formulações que foram adicionadas de palmitato de retinol (PR) também foram preparadas por titulação da fase aquosa e a substância ativa foi incorporada juntamente à fase oleosa do sistema na proporção de 1%.

No processo de titulação da fase aquosa, para cada mudança de consistência visualmente detectada, as concentrações de cada componente da formulação (tensoativo, fase aquosa e fase oleosa) foram transformadas em porcentagem, obtendo-se misturas que foram utilizadas na delimitação das diferentes regiões existentes no diagrama de fases ternário construído, representado por um triângulo equilátero. Dessa forma, foi possível representar no diagrama de fases a delimitação entre as diferentes regiões: sistema líquido transparente (SLT); sistema viscoso transparente (SVT); sistema semitransparente (SST); sistema líquido opaco (SLO); sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF).

Para cada um dos dois diagramas desenvolvidos, foram escolhidas quatro formulações macroscopicamente estáveis e opticamente transparentes para serem avaliadas em parâmetros físicos e físico-químicos, durante os Testes de Estabilidade Preliminar (TEP).

A composição percentual (% p/p) e a caracterização física visual das formulações líquido-cristalinas escolhidas para estudo nos TEP estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.



**Tabela 3** – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações líquido-cristalinas selecionadas do diagrama 1 para estudo nos TEP.

		Composição (% p/p)				Caracterização Física
		PR	DC 5330 <sup>®</sup>	Procetyl AWS <sup>®</sup>	Água purificada	
Formulações	A	---	20	30	50	SVT
	B	---	30	20	50	SVT
	C	---	20	20	60	SLT
	D	---	10	20	70	SLT

SVT = sistema viscoso transparente; SLT = sistema líquido transparente.

**Tabela 4** – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações líquido-cristalinas selecionadas do diagrama 2 para estudo nos TEP.

		Composição (% p/p)				Caracterização Física
		PR	DC 5329 <sup>®</sup>	Procetyl AWS <sup>®</sup>	Água purificada	
Formulações	E	---	20	30	50	SVT
	F	---	30	30	40	SVT
	G	---	60	30	10	SLT
	H	---	50	40	10	SLT

SVT = sistema viscoso transparente; SLT = sistema líquido transparente.

Dentre as oito formulações estudadas nos TEP, a formulação G foi escolhida para incorporar 1% do PR e posteriormente ser avaliada nos demais estudos realizados neste trabalho, os quais foram: avaliação dos parâmetros físico-químicos e quantificação química do princípio ativo nos Testes de Estabilidade Acelerada (TEA), ensaios de determinação da atividade antioxidante e do perfil de liberação *in vitro* do PR e avaliação da bioadesão *in vitro* em analisador de textura e por medidas reológicas oscilatórias de tal formulação eleita.

Em conjunto com a formulação G líquido-cristalina eleita nos TEP, as formulações emulsionadas I e J, as quais não contêm cristais líquidos, foram escolhidas para também serem estudadas nos ensaios de determinação da atividade antioxidante e do perfil de liberação do PR *in vitro*, respectivamente. A composição (em % p/p) das formulações emulsionadas encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5** – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações emulsionadas I e J selecionadas do diagrama 2 para determinação da atividade antioxidante *in vitro* e estudo da liberação *in vitro*, respectivamente.

Formulações	Composição (% p/p)				Caracterização Física
	PR	DC 5329 <sup>®</sup>	Procetyl AWS <sup>®</sup>	Água purificada	
I	1	29	10	60	SLO
J	1	29	20	50	SVO

SLO = sistema líquido opaco; SVO = sistema viscoso opaco.

Para avaliar a influência dos cristais líquidos nos testes propostos, o desempenho da formulação líquido-cristalina G foi avaliado em comparação com formulações pertencentes à região emulsionada do diagrama de fases ternário. Em função das condições metodológicas, foi necessário escolher uma formulação com menor viscosidade (form. I; SLO) na realização dos ensaios de atividade antioxidante *in vitro* para não entupir as ponteiros da micropipeta automática e uma formulação com maior viscosidade (form. J; SVO) na realização dos ensaios de liberação *in vitro*, para evitar escoamento das células de difusão de Franz modificadas.

No ensaio de bioadesão *in vitro*, as formulações A, E, F e G contendo 1% de PR foram avaliadas conjuntamente com formulações de géis hidrofílicos poliméricos de carboximetilcelulose sódica (CMCNa), carbopol 940 (C940) e carbopol 934P (C934P). Neste estudo, também introduziu-se novas formulações, K e L, para serem avaliadas buscando melhor compreender a influência do tensoativo e do silicone na fixação do produto final à pele.

A composição (em % p/p) das formulações K e L está descrita na Tabela 6 e a concentração percentual (% p/p) dos polímeros empregados para o preparo dos géis encontra-se na Tabela 7.

**Tabela 6** – Composição percentual (% p/p) e caracterização física visual das formulações K e L selecionadas do diagrama 2 para ensaio de bioadesão *in vitro*.

Formulações	Composição (% p/p)				Caracterização Física
	PR	DC 5329 <sup>®</sup>	Procetyl AWS <sup>®</sup>	Água purificada	
K	1	24	30	45	SVO
L	1	34	30	35	SVO

SVT = sistema viscoso transparente.

**Tabela 7** – Concentração percentual (% p/p) dos polímeros empregados para o preparo dos géis avaliados no ensaio de bioadesão *in vitro*.

<b>Polímero</b>	<b>Concentração (% p/p)</b>
CMCNa	1,5
	2,0
C940	0,5
	0,75
	1,0
	1,5
	2,0
C934P	0,5
	0,75
	1,0
	1,5
	2,0

#### **4.2.2. – Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) das formulações líquido-cristalinas selecionadas (A à H) sem palmitato de retinol**

Após 24 horas de manipulação, as formulações A à D do diagrama 1 e as formulações E à H do diagrama 2 foram submetidas aos Testes Preliminares de Estabilidade (TEP), segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004).

Durante os 15 dias do TEP, as formulações dos diagramas 1 e 2 tiveram seus parâmetros comparados à  $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , em ambiente protegido da luz. Previamente, o predomínio de sistemas opticamente transparentes e a ausência de separação de fases demonstrou que o diagrama 2 foi mais interessante em relação ao 1 para a escolha de uma formulação a ser avaliada nos ensaios posteriores. Diante disso, fez-se um estudo mais detalhado das formulações E à H submetendo-as à outras três condições de armazenamento: estufa ( $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ), geladeira ( $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) e ciclos alternados de 24 horas entre aquecimento ( $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) e resfriamento ( $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).

No tempo  $t_{1P}$  (após 24 horas) e  $t_{2P}$  (após 15 dias), tais formulações tiveram suas características de desempenho avaliadas nos seguintes estudos: microscopia de luz polarizada, centrifugação, pH, condutividade eletrolítica, índice de refração, ensaios de escoamento e viscosidade.

Para a execução dos ensaios realizados, as amostras de cada uma das formulações que estavam mantidas em condições de aquecimento, resfriamento e ciclo de aquecimento e resfriamento, aguardavam por uma hora para que pudessem atingir a temperatura ambiente.

#### **4.2.2.1. – Microscopia de Luz Polarizada**

Após 24 horas de manipulação, as formulações opticamente transparentes dos diagramas 1 e 2 foram analisadas no microscópio de luz polarizada Carl Zeiss® - modelo Axioskop 40, no aumento de 10 vezes, acoplado a uma câmera fotográfica SONY Cyber-shot - Carl Zeiss - resolução 10.1 mega pixels. Dentre estas formulações previamente selecionadas, as formulações A à D (diagrama 1) e E à H (diagrama 2) foram escolhidas por apresentarem áreas de anisotropia, um indicativo da presença de cristais líquidos lamelares (**L $\alpha$** ) e hexagonais (**H**).

As análises foram realizadas colocando-se, aproximadamente, 0,01g de cada uma das formulações sobre uma lâmina de vidro, a qual foi recoberta com uma lamínula. A análise foi realizada em temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C).

#### **4.2.2.2. – Centrifugação**

Como teste preditivo de estabilidade, amostras de cinco gramas de cada uma das oito formulações selecionadas (A à H) foram submetidas à centrifugação (Excelsa II – Fanem) à 3000 rpm à  $25,0 \pm 2,0$  °C, por 30 minutos, com vinte segundos para o tempo de aceleração e 20 segundos para o tempo de desaceleração. Neste teste, as formulações deveriam manter-se sem separação de fases e caso o fenômeno acontecesse, outras formulações seriam escolhidas para serem caracterizadas físico-quimicamente nos TEP (ANVISA, 2004).

#### **4.2.2.3. – Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)**

Após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e quinze dias ( $t_{2P}$ ) de manipulação das oito formulações em exame (A à H), a medida de pH foi realizada no peagômetro digital GEHAKA® – PG 1000 à temperatura de  $25,0 \pm 2,0$  °C, utilizando-se amostras diluídas na proporção de 10% em água destilada. O teste foi feito em triplicata para cada amostra avaliada.

Antes do uso do peagômetro, a limpeza do aparelho era realizada e a sensibilidade do eletrodo determinada, utilizando-se soluções tampão de referência (em pH 4,0 e 7,0) e, quando aplicável, ajustava-se o equipamento (ANVISA, 2007).

#### **4.2.2.4. – Determinação da Condutividade Eletrolítica**

Após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e quinze dias ( $t_{2P}$ ) de manipulação das oito formulações em estudo (A à H), a condutividade eletrolítica foi determinada em condutivímetro Digimed<sup>®</sup> – DM31, aferido com solução padrão de KCl 0,1N de condutância específica de 146,9  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , à temperatura de  $25,0 \pm 2,0$  °C. O teste foi realizado em triplicata para cada amostra avaliada.

#### **4.2.2.5. – Determinação do Índice de Refração**

Após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e quinze dias ( $t_{2P}$ ) de manipulação das oito formulações em exame (A à H), o índice de refração foi determinado, em triplicata para cada amostra avaliada, no refratômetro de Abbé Carl Zeiss Jena<sup>®</sup>. O equipamento foi calibrando com água destilada (índice de refração = 1,333), em ambiente climatizado à  $20 \pm 1,0$ ° C (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### **4.2.2.6. – Determinação das Propriedades de Escoamento e da Viscosidade**

Após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e quinze dias ( $t_{2P}$ ) de manipulação das oito formulações estudadas (A à H), as propriedades de escoamento e a viscosidade foram determinadas, em triplicata, na temperatura de  $25,0 \pm 0,5$ °C, no reômetro HAAKE - modelo RHEOSTRESS RS-1. Para a realização das medidas utilizou-se o sensor do tipo placa-placa (C35/2°Ti) e a espessura da amostra entre os sensores foi de 0,105 mm. Os experimentos foram realizados com taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) na faixa de 0,001-120 segundos. Os dados de cada análise foram ajustados seguindo o modelo matemático da lei da potência (como demonstra equação 8, item 2.3.2.) e coletados do software *Rheowin 3 Data* em computador acoplado ao reômetro.

#### **4.2.3. – Validação do Método Analítico para Quantificação do palmitato de retinol acrescido à Formulação G<sub>PR</sub>**

A monografia 217 da Farmacopéia Européia 5.0 (2005) refere-se à determinação da atividade da vitamina A (*all-trans-retinol*) concentrada, matéria prima, por espectrofotometria na região ultravioleta.

Como o método normalizado foi usado neste trabalho fora do escopo proposto na farmacopéia, tal metodologia analítica foi validada segundo os critérios constantes no **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, publicado como anexo da **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**.

#### **4.2.3.1. – Descrição do método analítico para quantificação do palmitato de retinol (PR) acrescido à formulação G**

Dissolver de 25-100mg do palmitato de retinol em 5 mL de pentano R e diluir com 2-propanol R, de modo que se obtenha concentrações de 10 UI/mL à 15 UI/mL. A solução deve apresentar máxima absorção entre 325 e 327 nm.

A absorvância (Abs) das soluções contendo palmitato de retinol também foram medidas nos comprimentos de onda de 300nm, 326nm, 350nm e 370 nm. Calculou-se a razão  $Abs_{\lambda} / Abs_{326}$  e as razões calculadas não poderiam exceder o valor de 0,593 ( $\lambda = 300nm$ ), de 0,537 ( $\lambda = 350nm$ ) e de 0,142 ( $\lambda = 370nm$ ). Caso uma ou mais das proporções  $Abs_{\lambda} / Abs_{326}$  excedessem os valores dados ou se o comprimento de onda de máxima absorção do palmitato de retinol não estivesse entre 325 e 327 nm, o método analítico não seria aplicável.

#### **4.2.3.2. – Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do palmitato de retinol (PR)**

O comprimento de onda de máxima absorção do PR foi determinado a partir de uma solução de 10UI/mL da matéria prima em 2-propanol R e pentano R (95:5) e analisada por espectrofotometria ultravioleta na região de 200 a 400nm. O branco utilizado foi uma solução constituída pela mistura dos reagentes 2-propanol e pentano, na proporção 95:5.

#### **4.2.3.3. – Preparo da solução-estoque (300 UI/mL) do PR material referência**

Quantidade equivalente a 33, 334 mg de palmitato de retinol (1.800.000 UI/g) foi pesada e transferida para balão volumétrico de 200 mL contendo 5 mL de pentano e aproximadamente 100 mL de 2-propanol. Após a adição do material de referência pesado, completou-se o volume do balão volumétrico com quantidade suficiente de 2-propanol, obtendo-se uma solução com concentração de 166,67  $\mu g/mL$  de palmitato de retinol.

Assim, o volume de 1 mL desta solução correspondia a 300 Unidades Internacionais (UI) de palmitato de retinol material referência.

#### **4.2.3.4. – Preparo da solução-estoque (300 UI/mL) do PR matéria prima**

Quantidade equivalente a 30,0 mg de palmitato de retinol (1.000.000 UI/g) foi pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL contendo 5 mL de pentano e aproximadamente 30 mL de 2-propanol. Após a adição da matéria prima pesada, completou-se o volume do balão volumétrico com quantidade suficiente de 2-propanol, obtendo-se uma solução com concentração de 300 µg/mL de palmitato de retinol.

Assim, o volume de 1 mL desta solução correspondia a 300 Unidades Internacionais (UI) de palmitato de retinol matéria prima.

#### **4.2.3.5. – Verificação da Seletividade do Método Analítico**

A seletividade do método analítico foi avaliada por comparação do espectro de varredura da matriz isenta do PR com o da solução de 10UI/mL da matéria prima (item 4.2.3.2.). O método só pode ser considerado seletivo se não houver nenhum componente da matriz que apresente absorção no mesmo comprimento de onda analítico do ativo e que interfira na intensidade do pico do PR.

A amostra foi preparada pesando-se quantidade equivalente a 25 mg da formulação G sem PR e transferida com 5 mL de pentano para um balão volumétrico de 20 mL. O volume final do balão foi completado com 2-propanol. Para ajustar o equipamento, foi feita uma leitura de pentano e 2-propanol como branco.

#### **4.2.3.6. – Verificação da Linearidade do Método Analítico**

Para a construção da curva analítica do PR (material referência) utilizou-se o intervalo entre 10 UI/mL a 15 UI/mL, recomendado pela Farmacopéia Européia 5.0 (2005).

Cinco diluições, realizadas em triplicata, foram preparadas por adição de alíquotas da solução de trabalho (descrita no item 4.2.3.3.) em balões volumétricos de 5 mL, com auxílio de

micropipeta. Em seguida, o volume do balão foi completado com 2-propanol, obtendo-se cinco diferentes concentrações, conforme descrito na Tabela 8. A leitura das absorvâncias foi realizada no comprimento de onda de 327 nm, utilizando a mistura de solventes pentano e 2-propanol para (5:95) para fazer a leitura do branco no equipamento.

**Tabela 8** – Concentrações utilizadas das soluções de palmitato de retinol (material referência) em 2-propanol para a construção da curva analítica do método espectrofotométrico, na região do UV, no comprimento de onda de máxima absorção (em nanômetros).

<b>Volume em µL da solução de PR (material referência)</b>	<b>Volume de 2-propanol</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Concentração (UI/mL)</b>
92,60	q.s.p. 5 mL	5,556	10,00
104,20	q.s.p. 5 mL	6,252	11,25
111,10	q.s.p. 5 mL	6,666	12,00
119,00	q.s.p. 5 mL	7,140	12,85
138,90	q.s.p. 5 mL	8,334	15,00

A curva analítica e o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) foram calculados no programa Origin 7.0, a partir do gráfico **absorvância** em função da **concentração**.

A curva analítica linear representativa pode ser expressa pela equação 11:

$$\text{Abs} = a [\text{PR}] + b \quad \text{[Equação 11]}$$

Na qual,

Abs = absorvância do PR obtida no comprimento de onda de máxima absorção;

a = coeficiente angular da reta

[PR] = concentração do palmitato de retinol

b = intercepto da curva em relação ao eixo da absorvância do PR.

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) é usado para indicar o quanto a reta, obtida na construção da curva analítica, é adequada como modelo matemático (INMETRO, 2010).

#### 4.2.3.7. – Determinação da Faixa Linear de Trabalho do Método Analítico

Para verificar se o método analítico estudado apresenta uma faixa linear de trabalho mais ampla do que aquela recomendada pela Farmacopéia Européia 5.0 (2005), construiu-se o gráfico



de intervalo linear definido como **Absorbância/ Concentração** em função do **log da concentração**.

A partir da solução de trabalho descrita no item **4.2.3.4.**, alíquotas foram retiradas e colocadas em balões volumétricos de 10 mL, com auxílio de micropipeta. Em seguida, o volume do balão foi completado com 2-propanol, obtendo uma série de concentrações, conforme demonstra a Tabela 9. A leitura das absorbâncias foi realizada no comprimento de onda de 327 nm, utilizando a mistura de solventes pentano e 2-propanol para (5:95) para fazer a leitura do branco no equipamento.

**Tabela 9** – Concentrações utilizadas das soluções de palmitato de retinol (matéria prima) para a construção do intervalo linear do método espectrofotométrico, na região do UV, no comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda = 327$  nm).

<b>Volume em <math>\mu</math>L da solução de PR (matéria prima)</b>	<b>Volume de 2-propanol</b>	<b>Concentração (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Concentração (UI/mL)</b>
10,40	q.s.p. 10 mL	0,3125	0,3125
14,00	q.s.p. 10 mL	0,4167	0,4167
20,80	q.s.p. 10 mL	0,625	0,625
41,60	q.s.p. 10 mL	1,250	1,250
55,60	q.s.p. 10 mL	1,667	1,667
41,70	q.s.p. 10 mL	2,500	2,500
83,40	q.s.p. 10 mL	5,000	5,000
200,00	q.s.p. 10 mL	6,000	6,000
250,00	q.s.p. 10 mL	7,500	7,500
285,60	q.s.p. 10 mL	8,570	8,570
307,60	q.s.p. 10 mL	9,230	9,230
333,40	q.s.p. 10 mL	10,000	10,000
384,60	q.s.p. 10 mL	11,538	11,538
416,60	q.s.p. 10 mL	12,500	12,500
444,40	q.s.p. 10 mL	13,334	13,334
500,00	q.s.p. 10 mL	15,000	15,000
538,40	q.s.p. 10 mL	16,150	16,150
583,40	q.s.p. 10 mL	17,500	17,500

#### **4.2.3.8. – Determinação do Limite de Quantificação do Método Analítico**

A menor concentração da faixa linear de trabalho (item **4.2.3.7.**) foi estabelecida como sendo o limite de quantificação do método analítico. Considera-se como limite de quantificação a menor concentração do PR que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

#### **4.2.3.9. – Determinação do Limite de Detecção do Método Analítico**

Partindo da solução de trabalho preparada conforme o item **4.2.3.3.**, alíquotas decrescentes desta solução foram retiradas e colocadas em balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com 2-propanol em q.s.p. 10 mL, de modo a obter soluções diluídas com concentrações decrescentes de PR. Como o limite de detecção é considerado como a menor concentração do PR em solução que possa ser detectada, porém não quantificada (sem apresentar precisão e exatidão), este valor foi estabelecido como a menor concentração de PR em solução que foi capaz de apresentar absorvância detectável em 327 nm, no espectrofotômetro.

#### **4.2.3.10. – Verificação da Precisão do Método Analítico**

A precisão intra-corrída (repetibilidade) foi realizada retirando-se seis alíquotas de 416,60µL da solução estoque recém preparada, item **4.2.3.3.**, completando o volume para 10 mL com 2-propanol, obtendo-se assim seis soluções diluídas com a concentração teórica de 12,50 µg/mL de PR. A absorvância de cada uma das seis soluções foi lida, em triplicata, no comprimento de onda de 327 nm.

A precisão intermediária foi realizada do mesmo modo como descrito na repetibilidade, porém, foi executada por outro analista, após dois dias do primeiro analista executar os testes de avaliação da repetibilidade.

Considera-se que o método analítico possui precisão se apresentar coeficiente de variação (CV)  $\leq 5\%$  (BRASIL-ANVISA, 2003).

#### **4.2.3.11. – Verificação da Exatidão do Método Analítico**

O ensaio de recuperação consistiu no processo utilizado para verificar a exatidão do método analítico. A porcentagem de PR (padrão secundário) recuperado (**R**) foi calculada pela equação 10 (item **2.4.6.**). Valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL-ANVISA, 2003).

Quantidades equivalentes a 20mg, 25mg e 30mg da formulação G, adicionada ou não de 1% de PR padrão secundário, foram pesadas e colocadas em béqueres.

Aos béqueres adicionou-se 5mL de pentano e as soluções foram transferidas para balões volumétricos de vidro âmbar de 20mL, sendo os volumes completados com 2-propanol. Caso o método analítico recuperasse 100% do PR padrão secundário adicionado à formulação, seriam obtidas soluções com concentrações teóricas de 10,0 µg/mL, 12,5µg/mL e 15,0 µg/mL de PR.

Cada uma das concentrações teóricas de PR foi preparada em triplicata. As soluções obtidas foram agitadas em vórtex, por 3 minutos, posteriormente procedendo-se à leitura de absorbância das amostras, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 327 nm.

#### **4.2.4. – Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) da formulação líquido-cristalina G<sub>PR</sub> acrescida de 1% de palmitato de retinol**

Como já comentado anteriormente, a partir do estudo preliminar das oito formulações (A à H), identificou-se que a formulação G demonstrou propriedades mais interessantes para a incorporação do princípio ativo utilizado nesta pesquisa, conforme poderá ser verificado na discussão dos resultados, no tópico V.

A Tabela 4 apresenta a composição da formulação G sem a adição da substância ativa. Nas etapas de estudo em que a formulação foi acrescida de 1% de palmitato de retinol para ser avaliada, a mesma passou a ser designada como “G<sub>PR</sub>”.

Conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), a periodicidade mais usual de avaliação das amostras nos Testes de Estabilidade Acelerada (TEA) são nos seguintes tempos: 24 horas ( $t_{1A}$ ) e aos 7° ( $t_{2A}$ ), 15° ( $t_{3A}$ ), 30° ( $t_{4A}$ ), 60° ( $t_{5A}$ ) e 90° ( $t_{6A}$ ) dias. Este período de avaliação foi estendido para 150 dias nas análises em microscópio de luz polarizada e nos ensaios de estabilidade química para determinar o prazo de validade do produto e correlacionar a degradação do princípio ativo com a estrutura de fase interna presente no sistema.

Em períodos de tempo pré-determinados, durante os 90 dias do TEA, os ensaios realizados com as amostras da formulação G<sub>PR</sub> à  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e à  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  foram: avaliação da estrutura de fase interna pela técnica de microscopia de luz polarizada, estudo das propriedades físico-químicas (pH, condutividade eletrolítica e índice de refração) e do comportamento reológico (viscosidade, área de histerese, grau tixotrópico e ensaios dinâmicos oscilatórios).

A realização dos ensaios de microscopia de luz polarizada e determinação das propriedades físico-químicas da formulação  $G_{PR}$  foram realizadas conforme metodologia já descrita no estudo de estabilidade preliminar (itens 4.2.2.1. e 4.2.2.3. à 4.2.2,5.).

A metodologia de estudo do comportamento reológico da formulação  $G_{PR}$  apresenta-se detalhada a seguir, pois foi mais minucioso do que aquela realizada preliminarmente.

#### **4.2.4.1. – Determinação do Comportamento Reológico**

Para a realização das medidas utilizou-se o sensor do tipo placa-placa (C35/2°Ti) no reômetro HAAKE - modelo RHEOSTRESS RS-1e a espessura da amostra entre os sensores foi de 0,105 mm. Os dados de cada análise foram ajustados seguindo o modelo matemático da lei da potência (como demonstra equação 8, item 2.3.2.) e coletados do software *Rheowin 3 Data* em computador acoplado ao reômetro.

Nos períodos de tempo pré-determinados para a realização dos TEA, a formulação  $G_{PR}$  foi avaliada, em triplicata, na temperatura de 25° C., pelos seguintes ensaios reológicos:

- Propriedades de fluxo (ensaio de escoamento), tixotropia e área de histerese das amostras, com tensão de cisalhamento de 0-100 Pa por um período de 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para a curva descendente, obtendo dados a cada segundo.
- Ensaio mecânico-dinâmico ou de oscilação (varredura de frequência): as amostras foram submetidas a uma tensão de cisalhamento de 0,5 Pa, utilizando frequências de 0,1-5,0 Hz.
- Propriedade de deformação (fluência e relaxamento), com duração de 300 segundos após aplicação da tensão de cisalhamento crescente até 0,5 Pa e 300 segundos no tempo de recuperação, após cessar a tensão de cisalhamento até 0 Pa.

#### **4.2.5. – Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* do palmitato de retinol pelo método de redução do radical DPPH**

##### **4.2.5.1.–Preparo da solução estoque DPPH 1042,60 $\mu$ M em etanol absoluto**

Quantidade equivalente a 3,70 mg de DPPH ( $PM = 394,32g/mol$ ) foi pesada e adicionada a 9 mL de etanol absoluto, obtendo-se assim uma solução estoque com concentração de 1042,60 $\mu$ M.

A solução foi homogeneizada, armazenada em frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetada e usada no mesmo dia da análise.

#### 4.2.5.2. – Determinação da atividade antioxidante *in vitro* do palmitato de retinol (PR) e do ácido retinóico (AR)

Para ambos os princípios ativos, palmitato de retinol (PR) e ácido retinóico (AR), preparou-se uma solução estoque (1:100) com a adição de 0,05 g de matéria prima em 5 mL de etanol absoluto, obtendo uma solução com concentração de 10 mg/mL.

Utilizando-se micropipeta automática, dez amostras foram preparadas pela mistura de 90µL da solução estoque de DPPH (item 4.2.5.1.) e volumes variáveis entre etanol absoluto e solução estoque (1:100) de PR ou AR, conforme composição apresentada na Tabela 10.

**Tabela 10** – Preparo das amostras para determinação da atividade antioxidante *in vitro* do palmitato de retinol ou do ácido retinóico, por espectrofotometria, no comprimento de onda de 517 nm.

Amostra *	Solução estoque de DPPH (µL)	Etanol absoluto (µL)	Solução estoque de PR ou AR	[PR/AR] final (mg/mL)
1 (controle)	90	810	---	---
2	90	790	20	0,22
3	90	770	40	0,44
4	90	750	60	0,67
5	90	730	80	0,89
6	90	720	90	1,00
7	90	710	100	1,11
8	90	690	120	1,33
9	90	670	140	1,56
10	90	650	160	1,78

\* Cada amostra foi preparada em duplicata e homogeneizada em vórtex.

As dez amostras, de cada uma das substâncias ativas, foram preparadas em duplicata e permaneceram em incubação na temperatura ambiente, na ausência de luz, por 20 minutos. Após este tempo requerido, fez-se a leitura do branco com etanol absoluto para calibrar o espectrofotômetro e a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 517 nm.

O valor de absorbância da amostra 1 (controle) é considerada como controle e equivale a 100%. Após 20 minutos de reação, o decaimento dos valores de absorbância das amostras 2 a 10, em relação à amostra 1, correspondem a quantidade de DPPH reduzido.

Os valores de absorvância foram transformados em porcentagem de atividade antioxidante (AA), usando a equação 12:

$$\% \text{ AA} = \frac{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \quad [\text{Equação 12}]$$

Na qual,

$\text{Abs}_{\text{controle}}$  = absorvância da amostra 1 em 517 nm, após 20 minutos de reação na ausência de luz;

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$  = absorvância das amostra 2 a 10 em 517 nm, após 20 minutos de reação na ausência de luz.

Para avaliar se a absorvância lida em 517 nm é específica à reação de redução do radical livre DPPH, foram preparadas dez amostras constituídas por alíquotas variáveis entre etanol absoluto e solução estoque (1:100) de PR ou AR, com volume final de 900  $\mu\text{L}$ , conforme composição apresentada na Tabela 11.

**Tabela 11** – Preparo das amostras para verificação da especificidade da reação de redução do radical livre DPPH.

Amostra *	Etanol absoluto ( $\mu\text{L}$ )	Solução (1:100) de PR ou AR	Amostra	Etanol absoluto ( $\mu\text{L}$ )	Solução (1:100) de PR ou AR
1	900	---	6	810	90
2	880	20	7	800	100
3	860	40	8	780	120
4	840	60	9	760	140
5	820	80	10	740	160

\* Cada amostra foi preparada em duplicata e homogeneizada em vórtex.

Caso as amostras indicadas na Tabela 11 apresentassem absorvância maior que zero em 517 nm, este valor seria descontado das respectivas amostras descritas na Tabela 10.

#### 4.2.5.3. – Determinação da atividade antioxidante *in vitro* das formulações G e I contendo 1% de palmitato de retinol

Utilizando-se micropipeta automática, dez amostras foram preparadas pela mistura de 90 $\mu\text{L}$  da solução estoque recém preparada de DPPH (item 4.2.5.1.) e 810 $\mu\text{L}$  entre volumes

variáveis de etanol absoluto e da formulação em análise contendo ou não 1% de PR, conforme composição apresentada na Tabela 12.

**Tabela 12** – Preparo das amostras para determinação da atividade antioxidante *in vitro* das formulações G e I contendo ou não 1% de palmitato de retinol, por espectrofotometria, no comprimento de onda de 517 nm.

<b>Amostra *</b>	<b>Solução estoque de DPPH (µL)</b>	<b>Etanol absoluto (µL)</b>	<b>Formulação G e I com ou sem 1% de PR (µL)</b>
1 (controle)	90	810	---
2	90	790	20
3	90	770	40
4	90	750	60
5	90	730	80
6	90	720	90
7	90	710	100
8	90	690	120
9	90	670	140
10	90	650	160

\* Cada amostra foi preparada em duplicata e homogeneizada em vórtex.

Em períodos de tempos pré-determinados (48 horas, 7, 15, 21 e 30 dias), após a manipulação das formulações G e I mantidas à  $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ , as dez amostras foram preparadas em duplicatas e permaneceram em incubação na temperatura ambiente, na ausência de luz, por 20 minutos. Após este tempo requerido, fez-se a leitura do branco com etanol absoluto para calibrar o espectrofotômetro e a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 517 nm.

O valor de absorbância da amostra 1 (controle) é considerado como controle e equivale a 100%. Os valores de absorbância das amostras 2 a 10, no tempo de 20 minutos, foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (% AA), usando-se a equação 12.

#### **4.2.6. – Estudo de Liberação *in vitro* do palmitato de retinol**

##### **4.2.6.1. – Estudo da solubilidade do palmitato de retinol em meios receptores**

Foi realizado estudo prévio para determinar a solubilidade do palmitato de retinol em diferentes meios receptores, conforme composição apresentada na Tabela 13.

**Tabela 13** – Composição dos meios receptores.

Amostras	Composição (% v/v)						pH do tampão
	Etanol	Tween20	Tween80	Tween60	2propanol	PBS+0,005% BHT	
1	10	---	---	---	---	*	5,8
2	10	4	---	---	---	*	5,8
3	10	---	4	---	---	*	5,8
4	---	4	---	---	---	*	5,8
5	---	---	4	---	---	*	5,8
6	---	---	---	---	---	*	5,8
7	10	---	---	---	---	*	7,4
8	10	4	---	---	---	*	7,4
9	10	---	4	---	---	*	7,4
10	---	4	---	---	---	*	7,4
11	---	---	4	---	---	*	7,4
12	---	---	---	---	---	*	7,4
13	---	---	---	4	---	*	7,4
14	---	---	---	---	*	---	---

\* Volume preparado em q.s.p. utilização no estudo.

A solução tampão fosfato (PBS) - pH 7,4 foi preparada segundo metodologia descrita na USP (2008), como segue: 50 mL da solução de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) - 0,2M foi colocada em um balão volumétrico de 200 mL; em seguida, adicionou-se 39,1 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) - 0,2M e o volume do balão foi completado com água destilada. O pH foi verificado em peagômetro e procedido os ajustes para pH 7,4, com HCl puro ou solução de NaOH 10%.

Como a concentração do princípio ativo não deve exceder 10% da solubilidade de saturação da solução receptora para manter as condições “*sink*” (OECD, 2004), a quantidade de palmitato de retinol utilizada para verificar sua solubilidade nos meios receptores testados foi de 3,57mg/mL, ou seja, uma concentração dez vezes maior, caso passasse pela membrana sintética 100% do palmitato de retinol liberado da matriz.

Os diferentes meios receptores, contendo palmitato de retinol adicionado em excesso, foram agitados em homogeneizador de tubos por 24 horas. Cada meio receptor foi preparado em triplicata. Após esse tempo, o palmitato de retinol não solubilizado foi separado dos meios receptores por filtração em membrana de acetato de celulose SARTORIUS® RC de porosidade 0,45µm.

Alíquotas de 70µL da solução filtrada foram adicionadas em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume final com a correspondente solução receptora testada. Após a determinação da absorbância destas soluções teste, no comprimento de onda de 327 nm, a escolha da solução receptora a ser utilizada no estudo de liberação *in vitro* foi baseada no fator de



recuperação (Fr) que cada meio receptor foi capaz de solubilizar do palmitato de retinol. A absorbância encontrada para o palmitato de retinol nas soluções de 2-propanol foi considerada como 100%.

#### 4.2.6.2. – Condições de execução do estudo de liberação *in vitro* do palmitato de retinol acrescido às formulações $G_{PR}$ e $J_{PR}$

O ensaio de liberação *in vitro* do PR das formulações  $G_{PR}$  e  $J_{PR}$  contendo 1% de PR foi realizado utilizando seis células de difusão modificadas de Franz (Hanson Research) que possuem uma área de difusão de  $1,77 \text{ cm}^2$  e um volume nominal do compartimento receptor de 7mL.

O compartimento doador permaneceu fechado durante o período do ensaio, após ser completamente preenchido com  $269,8 \pm 0,5 \text{ mg}$  da formulação  $G_{PR}$  e com  $273,7 \pm 0,5 \text{ mg}$  da formulação  $J_{PR}$ . O compartimento receptor foi totalmente preenchido com solução receptora de 2-propanol e esta foi continuamente agitada com 300 rpm e mantida a  $32,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por banho circulante. Uma membrana sintética de acetato de celulose com diâmetro de poro de  $0,45 \mu\text{m}$  foi colocada entre o compartimento doador e o receptor da célula de difusão, após serem hidratadas com água por 30 minutos.

As seis células de difusão foram utilizadas no experimento, sendo que uma delas foi preenchida apenas com a formulação base (branco) e as outras cinco células com a formulação acrescida de PR. Nos intervalos de tempo de 1, 2, 4, 8 e 12 horas, alíquotas de 1 mL da solução receptora das seis células de difusão foram retiradas para a quantificação por método analítico espectrofotométrico ( $\lambda = 327\text{nm}$ ) do PR liberado da formulação. Após a coleta das amostras, o meio receptor foi novamente repostado com 1 mL de 2-propanol.

A partir dos valores de absorbância obtidos, a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  de PR presente nas amostras foi calculada pela equação de reta 11 (item 4.2.3.6.).

A quantidade em  $\mu\text{g/mL}$  de PR liberado para o meio foi calculada pela equação 13:

$$Q_{\text{real}}(t) = C_{\text{calculada}}(t) \cdot V_r + \sum^{n-1} C_a \cdot V_a \quad \text{[Equação 13]}$$

Na qual,

$Q_{\text{real}}(t)$  = quantidade real liberada no tempo t (horas);

$C_{\text{calculada}}(t)$  = concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) calculada da coleta no tempo t;

- $V_r$  = volume da solução da célula receptora da célula de difusão (mL);  
 $C_a$  = concentração da amostra removida;  
 $V_a$  = volume de amostra removido.

A quantidade liberada em  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PR calculada pela equação 13 foi dividida pela área de exposição para liberação, obtendo-se a quantidade liberada da substância ativa em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

A partir das curvas de liberação do PR *in vitro*, a constante de velocidade da liberação da substância ativa para cada formulação foi calculada pela equação 14, descrita abaixo:

$$k = \frac{\Delta[\text{PR}]}{\Delta t} \quad \text{[Equação 14]}$$

Na qual,

$\Delta[\text{PR}]$  = variação da concentração de PR em  $\text{g}/\text{mL}$  entre o tempo final e o inicial;

$\Delta t$  = variação entre tempo final e o inicial.

O perfil de liberação das formulações estudadas foi avaliado matematicamente seguindo modelos de ordem zero, primeira ordem e pseudoprimeira ordem, através da determinação do coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) das curvas de liberação *in vitro*.

#### 4.2.7. – Estudo da Bioadesão *in vitro* de formulações líquido-cristalinas e géis poliméricos

Utilizando os métodos de força de ruptura à tração em analisador de textura e medidas reológicas oscilatórias em reômetro, avaliou-se o potencial de bioadesão *in vitro* das formulações A, E, F, G, K e L contendo 1% de PR.

De modo a determinar a performance bioadesiva das seis formulações estudadas, também mediu-se a bioadesão *in vitro* de géis hidrofílicos poliméricos de carboximetilcelulose sódica (CMCNa), carbopol 940 (C940) e carbopol 934P (C934P) em diferentes concentrações (conforme Tabela 7), pois já é bem relatado na literatura que esses polímeros possuem excelente capacidade de adesão à superfície da pele.

#### 4.2.7.1. – Preparo das amostras analisadas

As formulações A, E, F, G, K e L foram preparadas conforme metodologia descrita no item 4.2.1.

Os géis foram preparados por dispersão da quantidade requerida de polímero em água destilada, usando um agitador magnético por aproximadamente 1 hora. Após esse período, o pH foi ajustado para 6,5 com a adição de solução de NaOH - 2M e as amostras permaneceram armazenadas à  $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  por uma noite.

Todas as amostras testadas foram avaliadas após 24 horas de sua manipulação.

#### 4.2.7.2. – Preparo do substrato biológico

O substrato biológico utilizado neste estudo foram peles da orelha de suínos, proveniente de quatro animais diferente, abatidos em frigorífico. Assim que recebidas, as orelhas foram lavadas com água destilada e o excesso de água foi removido com papel absorvente.

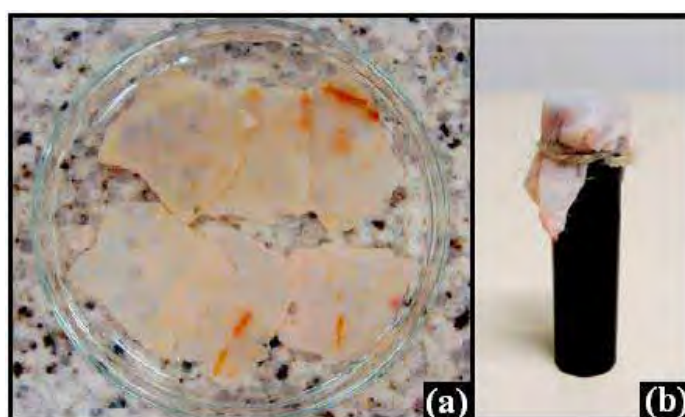
Após a higienização das orelhas, utilizou-se tesoura e bisturi cirúrgicos para a remoção da cartilagem das orelhas (dissecação) e, posteriormente, o substrato biológico foi dermatomizado na espessura de  $500\mu\text{m}$ , com auxílio do dermatômetro. O material biológico obtido pelos procedimentos de dissecação e dermatomização (como demonstra a Figura 16) foi mantido em freezer até o seu uso no experimento.



**Figura 16** – (a) Procedimento de dissecação da pele proveniente da orelha de suínos; (b) Procedimento de dermatomização; (c) Remoção de pele dermatomizada na espessura de  $500\mu\text{m}$ .

Para a execução do experimento, as peles dermatomizadas foram hidratadas e permaneceram até o seu uso em tampão Hank's com solução salina balanceada - pH 7,4. O tampão Hank's foi preparado pela mistura de 0,4g de cloreto de potássio, 0,06g de fosfato básico de potássio, 0,04g de fosfato anidro básico de sódio, 0,35g de bicarbonato de sódio, 1g de glicose e 8 g de cloreto de sódio para 1L de solução com água destilada fervida.

A Figura 17 ilustra em (a) as peles sendo hidratadas no tampão mencionado e em (b) visualiza-se a pele dermatomizada com a face epidérmica voltada para cima, previamente hidratada, presa por elástico à sonda do equipamento.



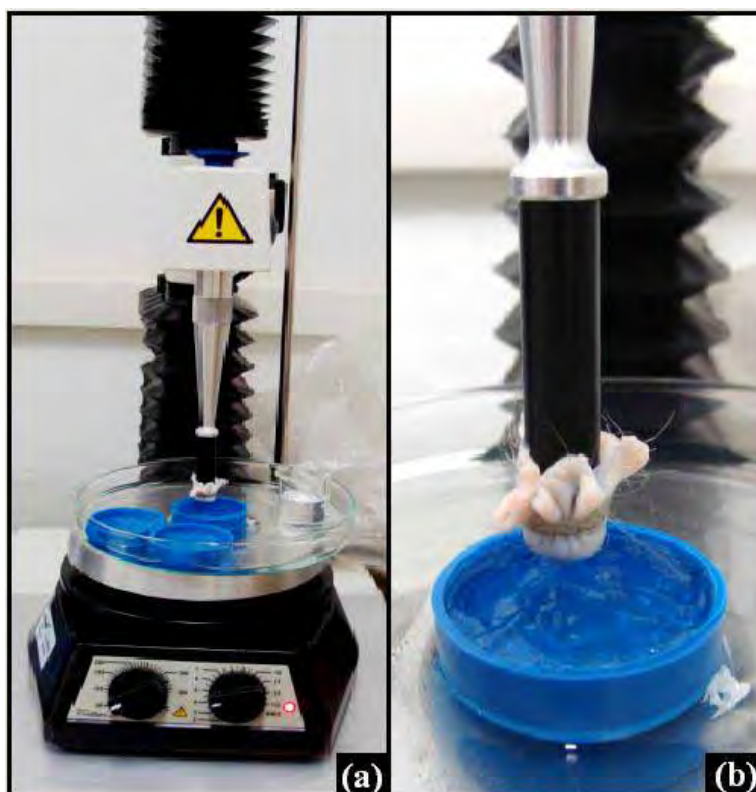
**Figura 17** – (a) Hidratação das peles dermatomizadas de suínos em tampão Hank's - pH 7,4; (b) Pele dermatomizada presa à sonda do texturômetro *Stable Micro Systems TA-XT2i*.

#### **4.2.7.3. – Condições experimentais das medidas de bioadesão *in vitro* pelo método de força de ruptura à tração**

O teste de bioadesão *in vitro* das amostras com o substrato biológico pelo método de força de ruptura à tração, realizado em sextuplicata, obedeceu às seguintes condições:

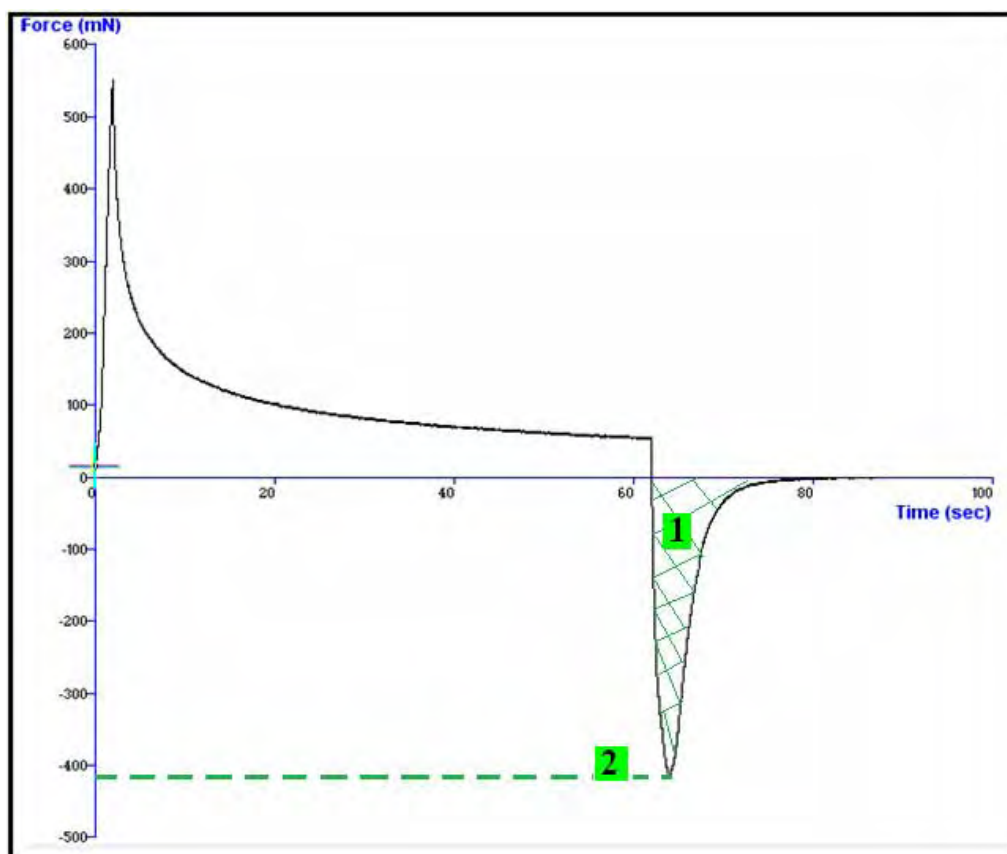
- Velocidade pré-teste: 1mm/s;
- Velocidade do teste: 0,5 mm/s;
- Velocidade pós-teste: 0,5mm/s;
- *Trigger force*: 0,002N;
- Tempo de contato entre a amostra e o substrato biológico: 60 segundos;
- Temperatura de realização do ensaio:  $32^{\circ} \pm 1,0$  C.

A Figura 18 apresenta o analisador de texturas em uso no ensaio de bioadesão *in vitro*.



**Figura 18** – (a) Texturômetro *Stable Micro Systems TA-XT2i*, com controle da temperatura em  $32,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ; (b) Sonda com o substrato biológico (pele dermatomizada de suínos) entrando em contato com a amostra a ser analisada.

Após o tempo de contato pré-determinado entre a amostra e o substrato biológico, o trabalho de descompressão requerido para a sonda, contendo o substrato biológico, retornar à sua posição original foi calculado pelo programa *Texture Exponent Lite* e expressa a capacidade bioadesiva da amostra analisada. A força máxima necessária para a descompressão é representada graficamente pelo pico do trabalho de bioadesão, como pode ser observado na Figura 19.



**Figura 19** – Gráfico característico da análise de bioadesão: (1) Área ou trabalho de adesão; (2) Força máxima necessária para o destaque do substrato biológico da amostra analisada.

#### 4.2.7.4. – Condições experimentais das medidas de bioadesão por medidas reológicas oscilatórias

A determinação da bioadesão *in vitro* por medidas reológicas oscilatórias foi realizada à  $32,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  em reômetro HAAKE – modelo RHEOSTRESS RS-1, usando o sensor placa-placa (C35/2° Ti) com a espessura de 0,105 mm das amostras entre os sensores.

As medidas de varredura de tensão foram feitas para determinar a região em que os módulos  $G'$  e  $G''$  do material respondem dentro da região de viscoelasticidade linear.

O teste de varredura de frequência foi realizado com frequências variáveis de 0,1 a 10,0 Hz à com tensão de cisalhamento constante a 0,5 Pa. O módulo elástico (ou armazenamento,  $G'$ ), o módulo viscoso (ou de perda,  $G''$ ), tangente de delta ( $\tan \delta$ ) e o ângulo de fase ( $^\circ$ ) foram usados como medidas do comportamento reológico.

## ***V. – Resultados e Discussão***

---

## V. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1. – Desenvolvimento dos Sistemas Líquido-Cristalinos: Construção do Diagrama de Fases Ternário

---

Para caracterizar em que condições experimentais um único sistema óleo/tensoativo/água existe e em quais proporções os componentes presentes limitam as regiões de transição de fases entre emulsão, microemulsões A/O e O/A, fases líquido-cristalinas e separação de fases, construiu-se o diagrama de fases ternário pelo método de titulação da fase aquosa.

O método da titulação foi escolhido para a construção do diagrama de fases por apresentar a vantagem de se estudar um grande número de composições com relativa rapidez (BHARGAVA; NARURKAR; LIEB, 1987; LAWRENCE & REES, 2000).

O diagrama 1 é composto pelo tensoativo Procetyl AWS<sup>®</sup>, silicone DC 5330<sup>®</sup> e água. O diagrama 2 é composto pelo tensoativo Procetyl AWS<sup>®</sup>, silicone DC 5329<sup>®</sup> e água.

As matérias primas utilizadas nos diagramas ternários desenvolvidos nesta pesquisa foram cuidadosamente escolhidas, pois já se sabe que os excipientes influenciam nas características do produto final comercializado como eficácia, segurança (não-toxicidade e não-irritabilidade), estabilidade e aceitação pelo consumidor (CHORILLI *et al.*, 2009).

Chorilli *et al.* (2009) e Reeth (2009) destacam que a utilização dos silicones como matéria prima transmitem um sensorial de suavidade, maciez aveludada, excelentes características de espalhabilidade e não oleosidade para as formulações cosméticas a que pertencem, melhorando a percepção negativa associada com outros ingredientes. Estes ingredientes também são considerados não comedogênicos e não acnéicos, ao contrário de muitas matérias primas oclusivas.

O tensoativo não iônico empregado neste trabalho foi o polímero tri-bloco (Procetyl AWS<sup>®</sup>), o qual também contribuiu para que os sistemas desenvolvidos resultassem em produtos dermocosméticos seguros para o uso tópico, uma vez que Tadros (2008) afirma que a capacidade emulsificante em baixas concentrações de tensoativos não-iônicos e o alto peso molecular de tais tensoativos propiciam a ausência de irritação na pele, e por isso, são mais tolerados.

Há relatos de que os tensoativos não-iônicos podem ser mais eficientes no aumento de extensão das regiões de microemulsões em estudos de comportamento de fases (LAWRENCE & REES, 2000).

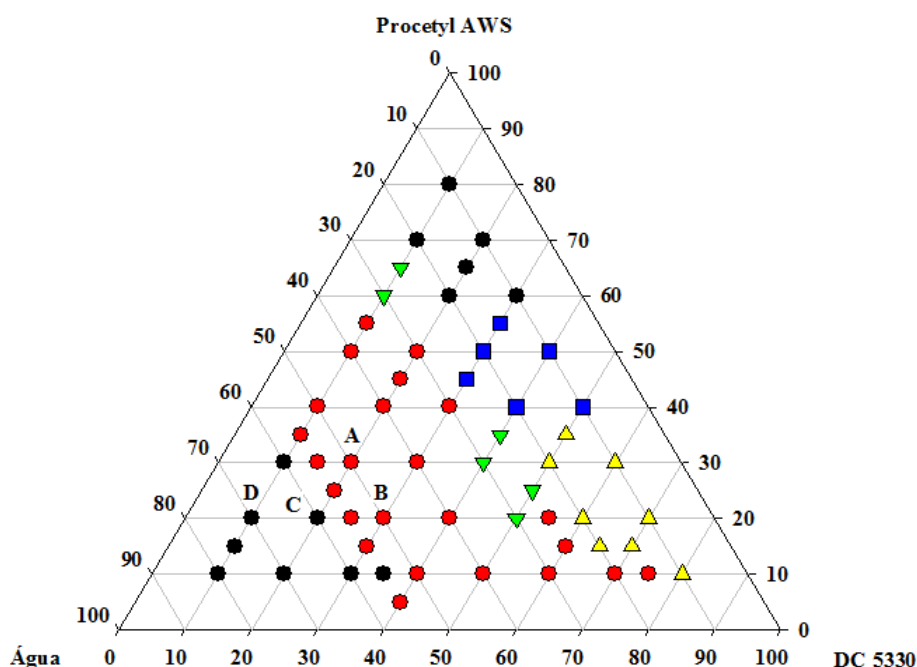


O emprego do referido tensoativo nos diagramas ternários desenvolvidos demonstrou ser interessante porque o mesmo possui uma longa cadeia de hidrocarbonetos. No desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados, Formariz & colaboradores (2005) comentam que o uso de um tensoativo com cadeia hidrocarbônica longa mostra-se mais interessante para a formação de fases líquido-cristalinas, impedindo a possibilidade do solvente (geralmente a água) solubilizar a molécula anfifílica e originar soluções de moléculas dispersas e desordenadas.

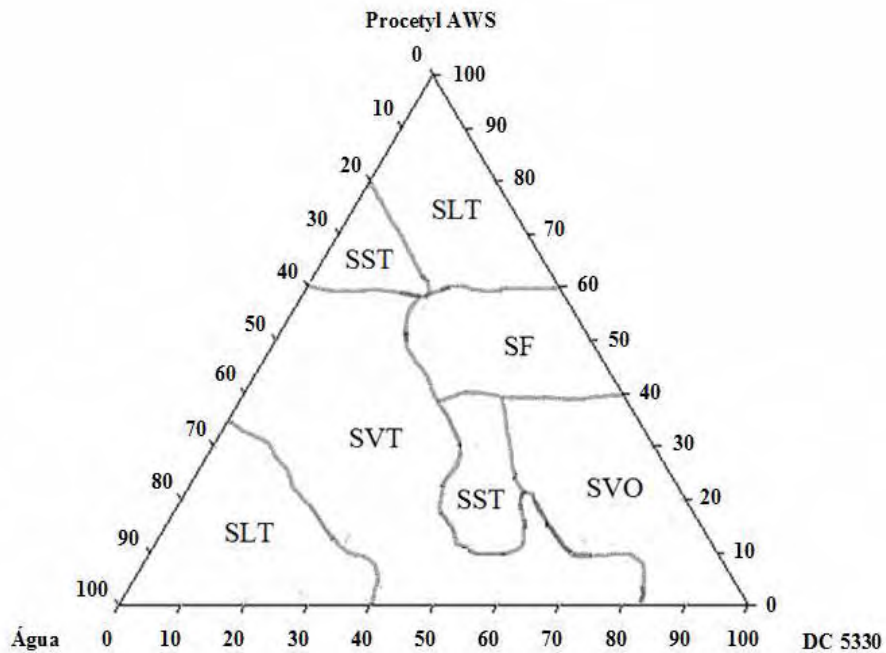
As pesquisas de Wang & Zhou (2009) confirmam que o uso de tensoativos com cadeia hidrocarbônica longa é responsável pela formação de um rico comportamento de fases líquido-cristalinas nos sistemas a que pertencem.

O aumento do comprimento da cadeia hidrofóbica no tensoativo aumenta energia de coesão. Netz & Ortega (2002) explicam que o predomínio das forças moleculares de coesão sobre as de adesão em interfaces de mistura água/óleo faz com que o sistema procure o seu estado de menor tensão, o que resulta em diminuir ao máximo a interface líquido/líquido.

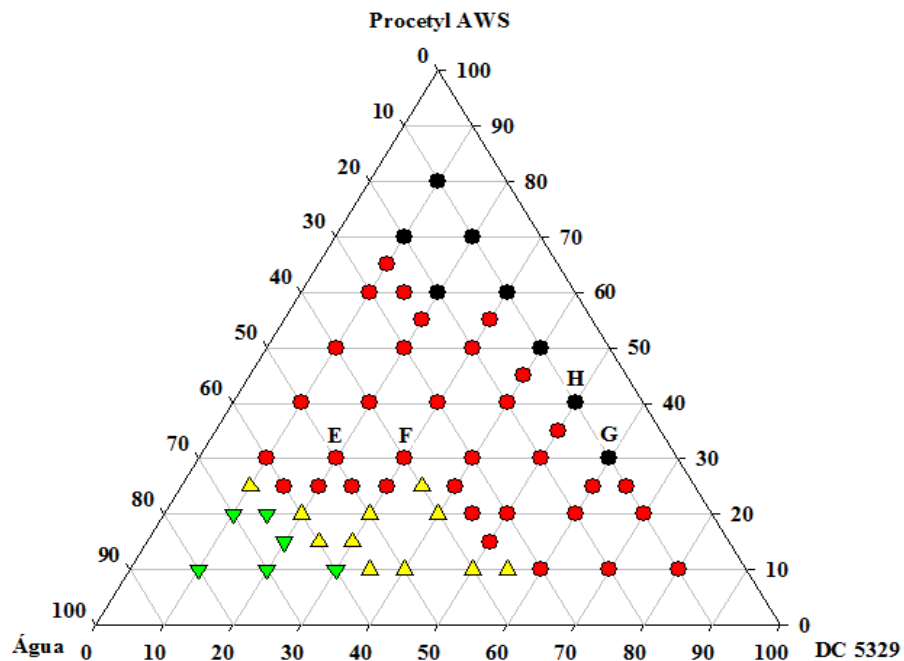
O comportamento das fases existentes nos diagramas de fases ternários, número 1 e 2, é representado graficamente na forma de pontos contendo as formulações estudadas (nas Figuras 20 e 22, respectivamente) e na forma de regiões (nas Figuras 21 e 23, respectivamente).



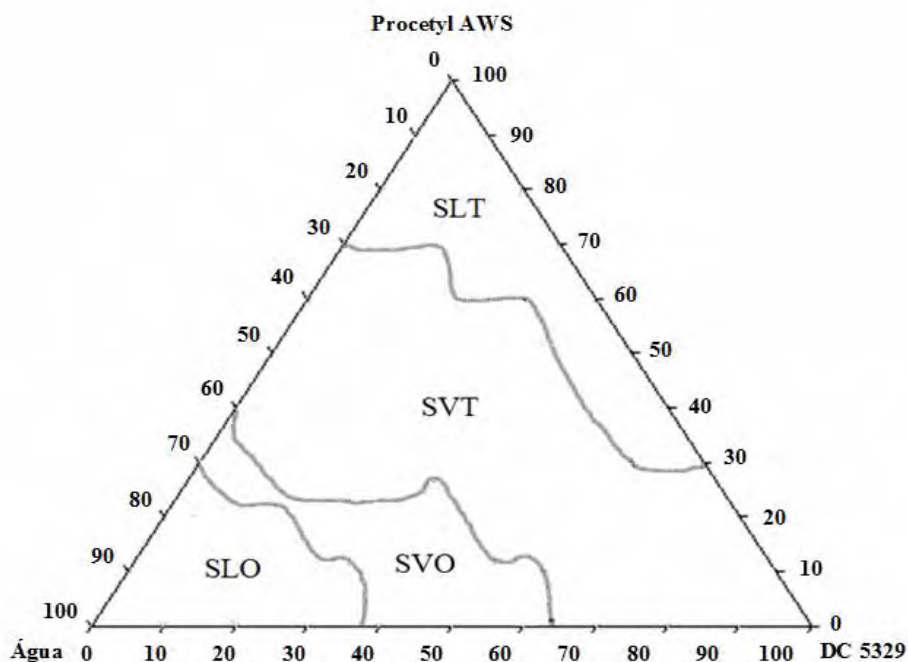
**Figura 20** – Diagrama de fases ternário (1) pontual do sistema constituído por Procetyl AWS<sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5330<sup>®</sup> (fase oleosa) e água: ● = sistema líquido transparente; ● = sistema viscoso transparente; ▽ = sistema semitransparente; ▲ = sistema viscoso opaco; ■ = separação de fases.



**Figura 21** – Diagrama de fases ternário (1) das regiões de transição do sistema constituído por Procetyl AWS<sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5330<sup>®</sup> (fase oleosa) e água: **SLT** = sistema líquido transparente; **SVT** = sistema viscoso transparente; **SVO** = sistema viscoso opaco; **SST** = sistema semitransparente; **SF** = separação de fases.



**Figura 22** – Diagrama de fases ternário (2) pontual do sistema constituído por Procetyl AWS<sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5329<sup>®</sup> (fase oleosa) e água: ◆ sistema líquido transparente; ◆ sistema viscoso transparente; ▼ sistema líquido opaco; ▲ sistema viscoso opaco.



**Figura 23**– Diagrama de fases ternário (2) das regiões de transição do sistema constituído por Procetyl AWS® (tensoativo), silicone DC 5329® (fase oleosa) e água: **SLT** = sistema líquido transparente; **SVT** = sistema viscoso transparente; **SLO** = sistema líquido opaco; **SVO** = sistema viscoso opaco.

Em ambos os diagramas, as regiões de transição entre as fases foram classificadas macroscopicamente em: sistemas líquidos transparentes (SLT), sistemas viscosos transparentes (SVT), sistemas semitransparentes (SST), sistemas líquidos opacos (SLO), sistemas viscosos opacos (SVO) e separação de fases (SF).

O predomínio de regiões constituídas por sistemas opticamente transparentes nos dois diagramas de fases desenvolvidos, como apresentado nas Figuras 21 e 23, é um indicativo de que o tensoativo empregado reduziu a tensão interfacial entre água/silicone de tal modo que favoreceu a formação de sistemas coloidais termodinamicamente estabilizados.

Na redução da tensão interfacial próxima a zero, o sistema emulsifica espontaneamente e as gotículas dispersas adquirem tamanho homogêneo e tornam-se muito pequenas, com aproximadamente 10 nm de diâmetro (PIIRMA, 1992). O reduzido tamanho das gotículas para diâmetro menores do que 140nm faz com que as partículas não espalhem luz por terem diâmetro menor do que  $\frac{1}{4}$  do comprimento de onda de luz incidente e, com isso, os sistemas formados são opticamente transparentes (FORMARIZ *et al.*, 2005).

No primeiro diagrama desenvolvido observa-se na Figura 20 que a formação de SLT está compreendida nas concentrações de 10 a 30% do silicone DC 5330®, enquanto que os SVT estão compreendidos numa ampla faixa de concentração, variando de 10 até 75% na composição do

silicone e de 5 até 55% na concentração do tensoativo. Ao passo que na Figura 21 observa-se que a transição de SVT para SVO é acarretada pelo aumento da concentração do silicone DC 5330<sup>®</sup> e passa por uma região intermediária com formação de SST; enquanto o aumento na concentração do tensoativo resultante na transição de SVO para SLT com uma região intermediária de instabilidade caracterizada por separação de fases entre os componentes das formulações.

A representação pontual do diagrama 2, ilustrada na Figura 22, demonstra que a formação de emulsões (sistemas opacos) está vinculada à formulações constituídas por baixas concentrações de tensoativo e fase oleosa e altas concentrações de fase aquosa.

Na Figura 22 também pode-se observar que acima de 55% do silicone DC 5329<sup>®</sup>, em formulações constituídas por 10% de tensoativo ocorre a formação de sistemas micro e nanoestruturados identificados pelos sistemas transparentes. À medida que a concentração do tensoativo torna-se superior a 20%, ocorre um efeito sinérgico com o silicone do silicone DC 5329<sup>®</sup> na formação de sistemas termodinamicamente estáveis, sendo necessário apenas 15% de silicone para ocorrer a formação de tais sistemas.

Em 1999, Hill fez a colocação de que pesquisadores do Centro de Pesquisa & Desenvolvimento da Dow Corning (Michigan) não têm observado a formação de nanoestruturas ordenadas, tais como fases líquido-cristalinas, na classe de silicones do DC 5330<sup>®</sup>. Por outro lado, na série de silicones a que pertence o DC 5329<sup>®</sup>, dependendo das unidades oxietilênicas (OE) presentes no polímero, já foram observadas estruturas em bicamadas como vesículas e fases líquido-cristalinas  $L_\alpha$  e  $L_3$  (para  $n = 6-8$ ), micelas e fases líquido-cristalinas  $L_\alpha$  e  $H_1$  (para  $n = 10-12$ ) e, micelas e fase líquido-cristalina  $H_1$  (para  $n = 16-18$ ).

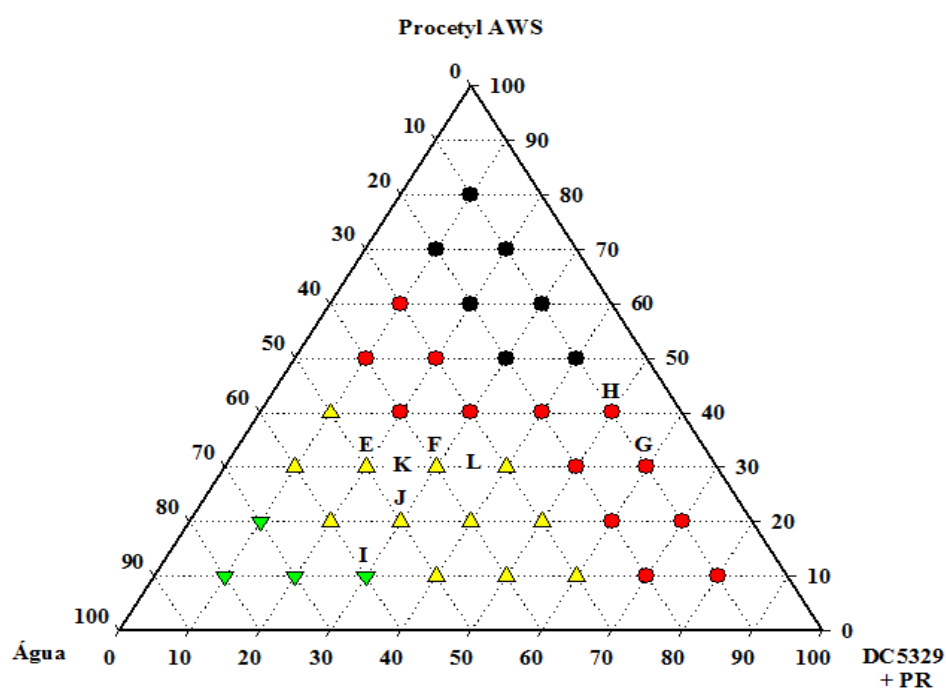
Essas informações colaboram para evidenciar que os silicones empregados como fase oleosa neste trabalho tendem a apresentar comportamentos de fase bem diferentes no mesmo sistema água/tensoativo, o que pode ser notado pela análise comparativa das Figuras 21 e 23. As figuras em questão demonstram que no segundo diagrama não ocorreu separação de fases e ainda, houve formação de maiores regiões de sistemas opticamente transparentes.

Porém, ainda é desconhecido o mecanismo responsável pelo maior nível de ordem e orientação dos agregados anfifílicos na interface líquido/líquido, promovido pelo silicone DC 5329<sup>®</sup>. Muitos mecanismos podem estar envolvidos na formação de sistemas micro e nanoestruturados como um fenômeno de auto-organização molecular para atingir a estabilidade termodinâmica, entre eles: forças de atração entre as moléculas (forças dipolo permanente, dipolo induzido e dipolo transitório), estabilização estérica, posição configuracional adotada pelo

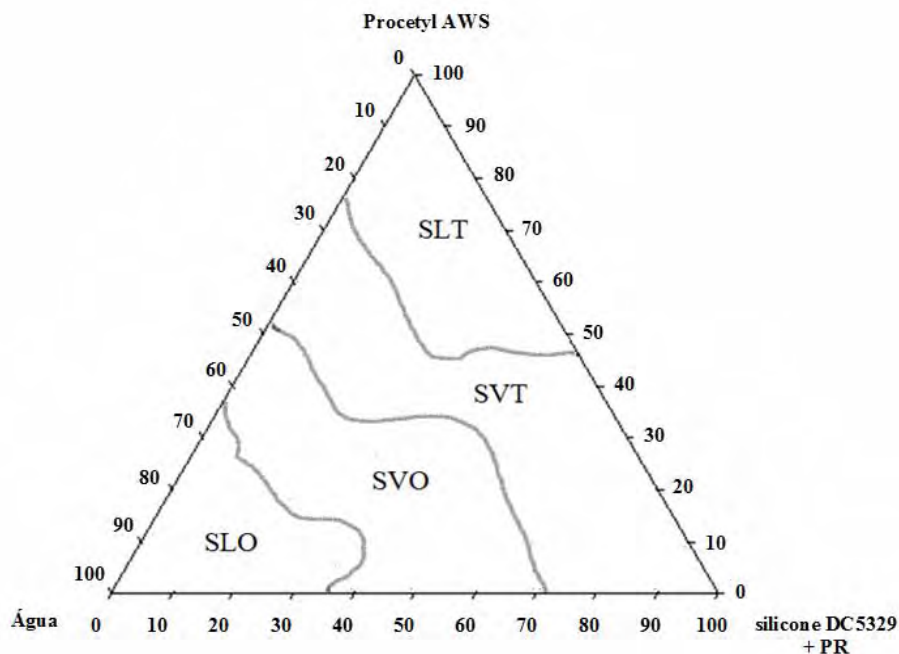
grupo siloxano devido à flexibilidade das ligações Si-O-Si, contribuição do valor de EHL da molécula para reduzir a tensão interfacial próxima a zero e a propagação da compressão exercida pela sobreposição das cadeias POE (PIIRMA, 1992; HILL, 1999; TADROS, 2008).

Diante da expansão de regiões pertencentes aos sistemas micro e nanoestruturados, conferida pela presença do silicone DC 5329<sup>®</sup>, o diagrama de fases 2 foi escolhido para a incorporação do palmitato de retinol (PR).

Após a incorporação do PR no sistema (2) desenvolvido, a Figura 24 representa pontualmente as formulações do segundo diagrama e na Figura 25 o diagrama de fases ternário está representando a delimitação entre as regiões dos sistemas formados.

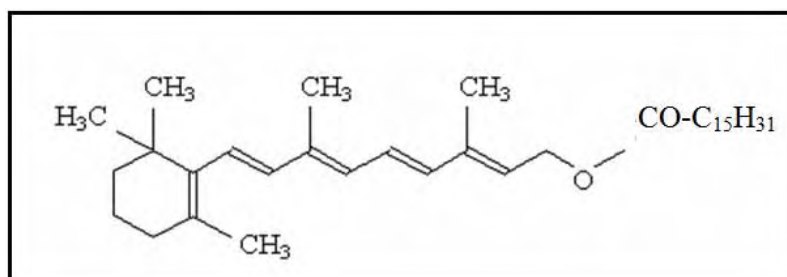


**Figura 24** – Diagrama de fases ternário (2) constituído por Procetyl AWS<sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5329 + PR (fase oleosa) e água:  $\blacklozenge$  sistema líquido transparente;  $\color{red}\blacklozenge$  sistema viscoso transparente;  $\color{green}\blacktriangledown$  sistema líquido opaco;  $\color{yellow}\blacktriangle$  sistema viscoso opaco.



**Figura 25** – Diagrama de fases ternário (2) das regiões de transição do sistema constituído por Procetyl AWS<sup>®</sup> (tensoativo), silicone DC 5329<sup>®</sup> + PR (fase oleosa) e água: **SLT** = sistema líquido transparente; **SVT** = sistema viscoso transparente; **SLO** = sistema líquido opaco; **SVO** = sistema viscoso opaco.

Ainda que acrescido em 1% nas formulações do diagrama 2, pode-se inferir que a presença de uma extensa cadeia carbônica (CO-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>; Figura 26) no radical terminal do éster de retinol parece contribuir de modo significativo para aumentar o tamanho das gotículas dispersas, o que, conseqüentemente, resultou na redução da região de SLT e ampliação da região pertencente aos SVO, como pode ser visto pela comparação dos diagramas apresentados nas Figuras 23 e 25.



**Figura 26** – Fórmula estrutural do palmitato de retinol.

## 5.2. – Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) das formulações líquido-cristalinas selecionadas sem palmitato de retinol

---

As formulações escolhidas para serem estudadas no Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) pertencem aos sistemas opticamente transparentes dos diagramas de fases, uma vez que a transparência óptica de tais formulações é resultado da formação de sistemas coloidais termodinamicamente estabilizados pelo tensoativo, teoricamente com diâmetro das gotículas para valores menores do que 140 nm.

Em decorrência da presença de regiões com polaridades diferentes nas moléculas anfífilas, os tensoativos podem interagir com o estrato córneo e desestruturar a bicamada lipídica da matriz intercelular, fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina para uma forma líquida desordenada. Com isso, ocorre uma perda da função de barreira impermeável exercida pelo estrato córneo e, assim, a permeabilidade cutânea que é aumentada, está diretamente relacionada à indução de respostas irritativas na pele (WILLIAMS & BARRY, 2004; ALENIUS *et al.*, 2008).

Baseando-se neste conhecimento científico, foi considerado como segundo critério de escolha, para estudo no TEP, eleger dentre as formulações transparentes àquelas que apresentassem as menores concentrações necessárias de tensoativos para a formação de fases líquido-cristalinas.

Partindo desses dois critérios de escolha, as formulações escolhidas dos diagramas 1 (designadas como **A**, **B**, **C** e **D**, na Tabela 3) e 2 (designadas como **E**, **F**, **G** e **H**, na Tabela 4) tiveram seus parâmetros comparados à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , em ambiente protegido da luz. O interesse prévio em incorporar o palmitato de retinol na fase oleosa do segundo diagrama desenvolvido, em função de ausência de separação de fases e a presença de uma maior região composta por sistemas micro e nanoestruturados, ampliou as condições de armazenamento das formulações E, F, G e H para: geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e ciclos alternados de 24 horas entre aquecimento  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  / resfriamento ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), como recomenda o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (2004).

No tempo  $t_{1P}$  (após 24 horas) e  $t_{2P}$  (após 15 dias), as oito formulações (A à H) tiveram suas características de desempenho avaliadas nos seguintes estudos: microscopia de luz polarizada, centrifugação, pH, condutividade eletrolítica, índice de refração, ensaios de escoamento e viscosidade.

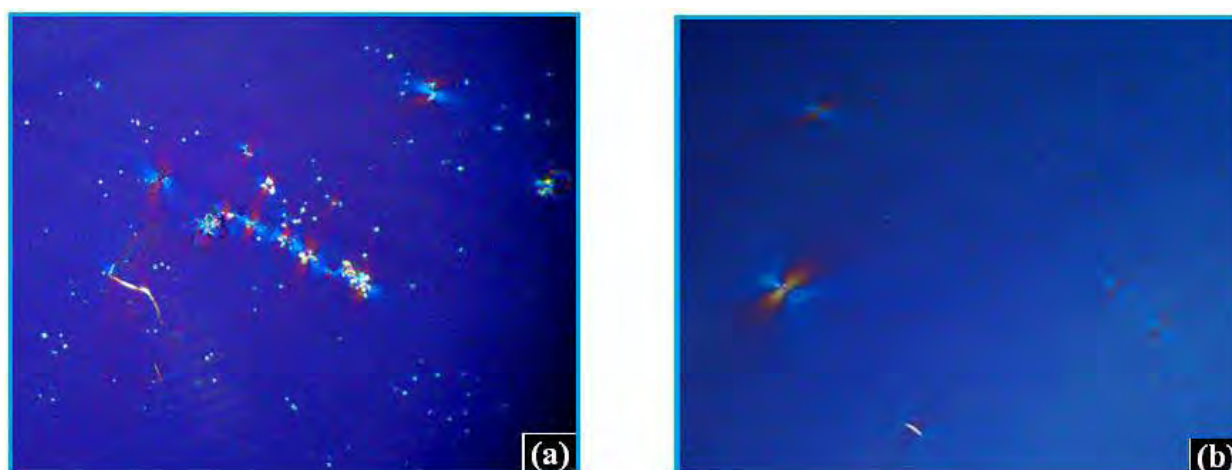
Para a execução dos ensaios realizados, as amostras de cada uma das formulações que estavam mantidas em condições de aquecimento, resfriamento e ciclo de aquecimento e resfriamento, aguardavam por uma hora para que pudessem atingir a temperatura ambiente.

### 5.2.1. – Microscopia de Luz Polarizada

Existe uma grande variedade de métodos disponíveis para caracterizar os sistemas micro e nanoestruturados. Jahn & colaboradores (2002) relatam que a técnica de microscopia de luz polarizada é muito usada para avaliar o tipo de arranjo formado em tais sistemas, permitindo facilmente a distinção entre fases isotrópicas formadas nos sistemas microestruturados das fases anisotrópicas presentes nos sistemas nanoestruturados.

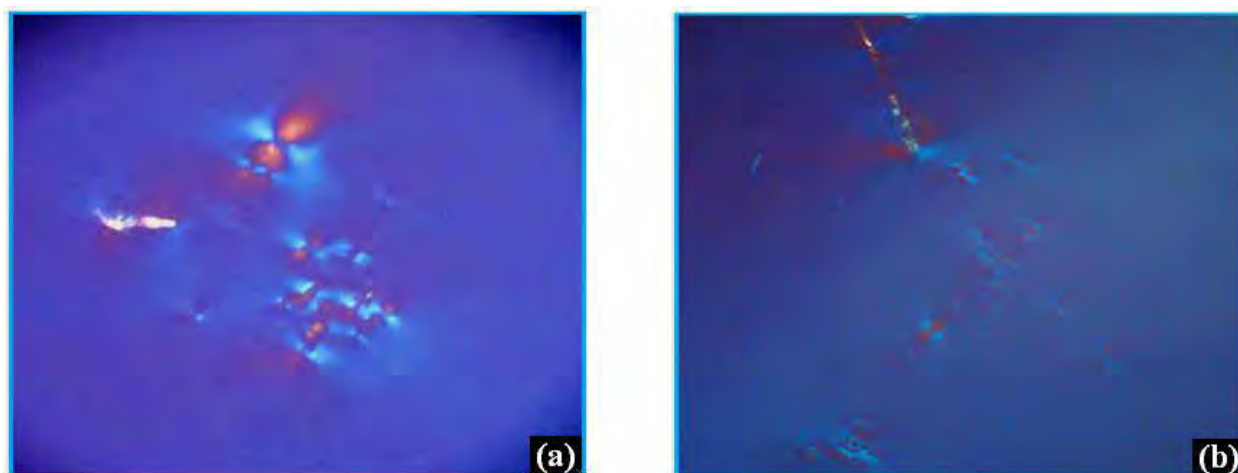
#### 5.2.1.1. – Fotomicrografias das formulações A, B, C e D, do diagrama 1

As Figuras 27 a 30 exibem as fotomicrografias obtidas sob luz polarizada, das formulações A à D, nessa ordem.

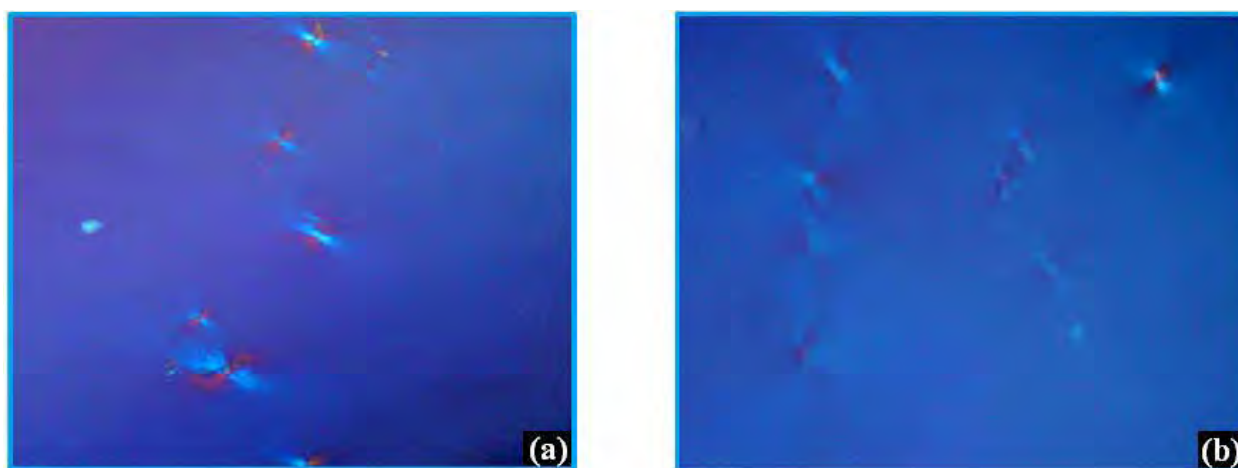


**Figura 27** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação A armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no  $t_{1P}$ , após 24 horas (b) no  $t_{2P}$ , após 15 dias.

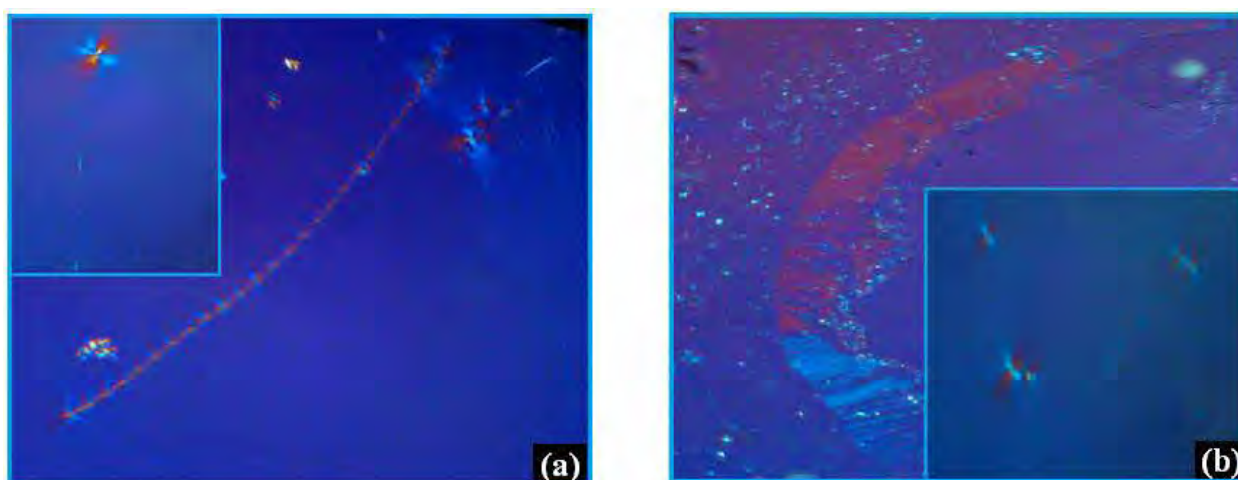




**Figura 28** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação B armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no  $t_{1P}$ , após 24 horas (b) no  $t_{2P}$ , após 15 dias.



**Figura 29** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação C armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no  $t_{1P}$ , após 24 horas (b) no  $t_{2P}$ , após 15 dias.



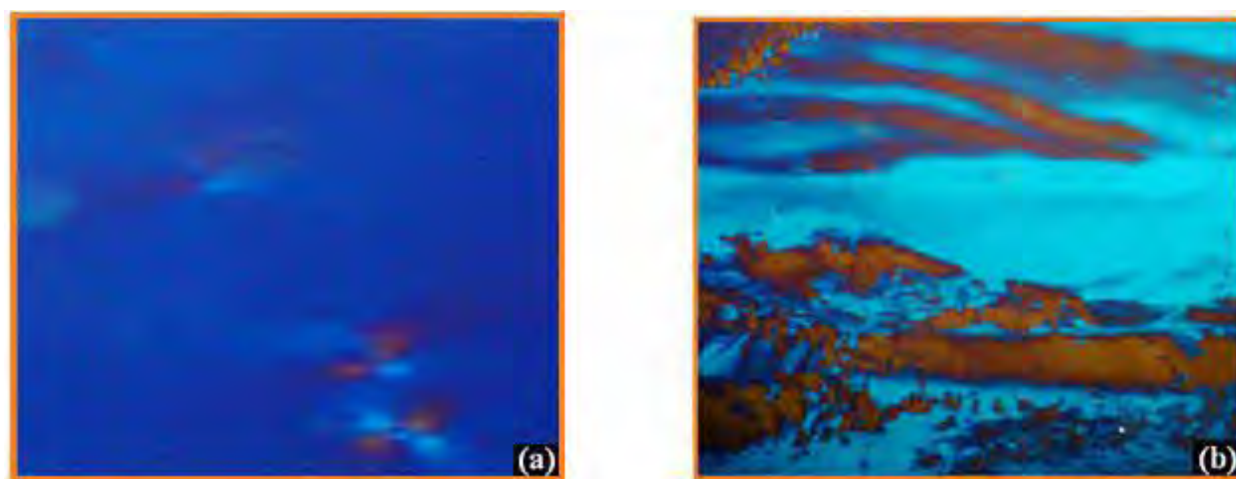
**Figura 30** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação D armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP: (a) no  $t_{1P}$ , após 24 horas e (b) no  $t_{2P}$ , após 15 dias.

As fotomicrografias de luz polarizada apresentadas na Figuras 27 a 30 das formulações em estudo demonstram que todas elas possuem a presença de cruces de malta, as quais, segundo Schuetze & Mueller-Goymann (1992) caracterizam a presença de sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar. Porém, no tempo  $t_{2P}$  nota-se que tais estruturas tornaram-se menos abundantes, principalmente na formulação D em que as cruces de malta são apenas visualizadas no detalhe da imagem, pois já não faziam mais parte de todo o campo microscópico da fotomicrografia 30 (b).

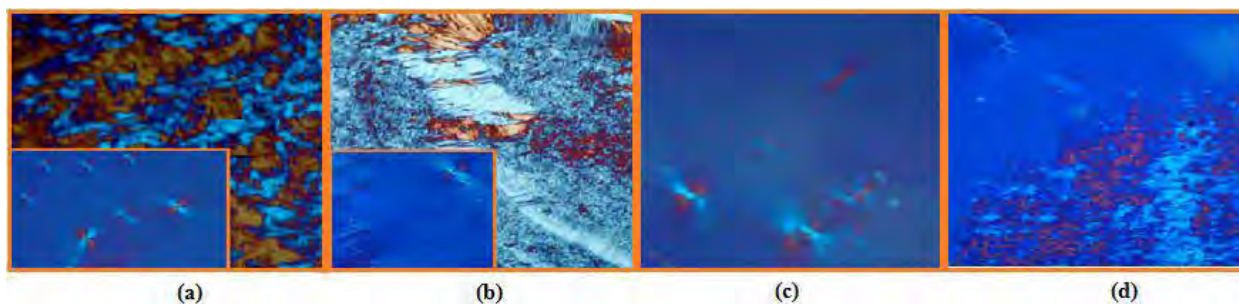
Embora tenhamos detectado a formação de cristais líquidos de fase lamelar nas quatro formulações, após 15 dias elas apresentaram a formação de áreas isotrópicas no campo microscópico (fotomicrografias não apresentadas). Esse pequeno intervalo de tempo em que as formulações foram capazes de manter a estrutura líquido-cristalina formada confirma as observações experimentais do grupo de pesquisa de Hill (1999) que não observaram a formação de nanoestruturas ordenadas com uso da classe de silicone a qual pertence o DC 5330<sup>®</sup>.

#### 5.2.1.2. – Fotomicrografias das formulações E, F, G e H, do diagrama 2

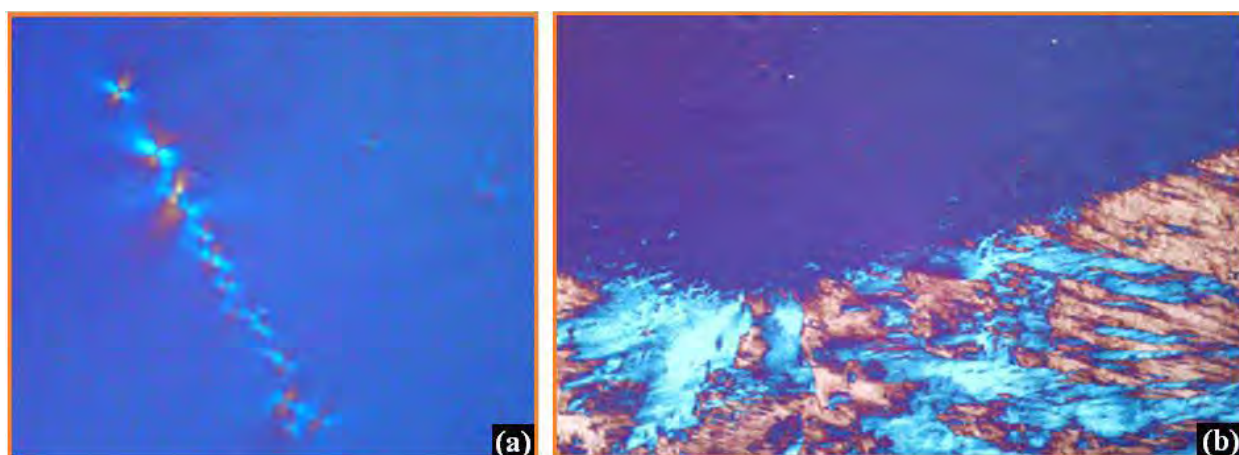
As Figuras 31 a 38 exibem as fotomicrografias sob luz polarizada, das formulações E à H obtidas nas diferentes condições de armazenamento.



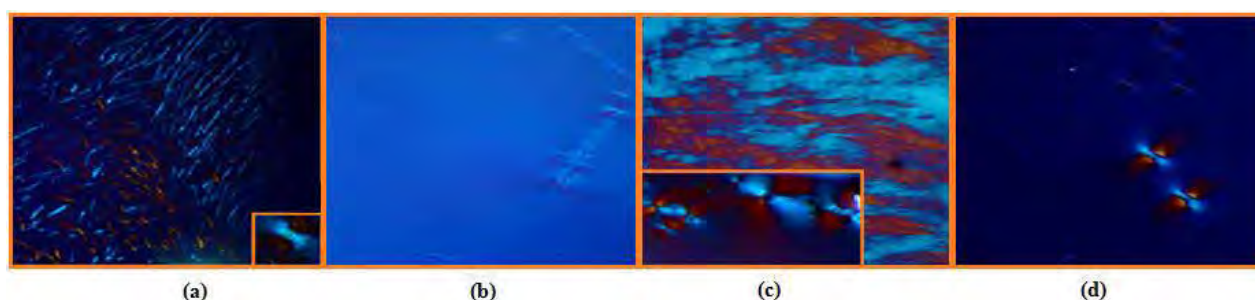
**Figura 31** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação E armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ): **(a)** cristal líquido de fase lamelar; **(b)** cristal líquido de fase hexagonal.



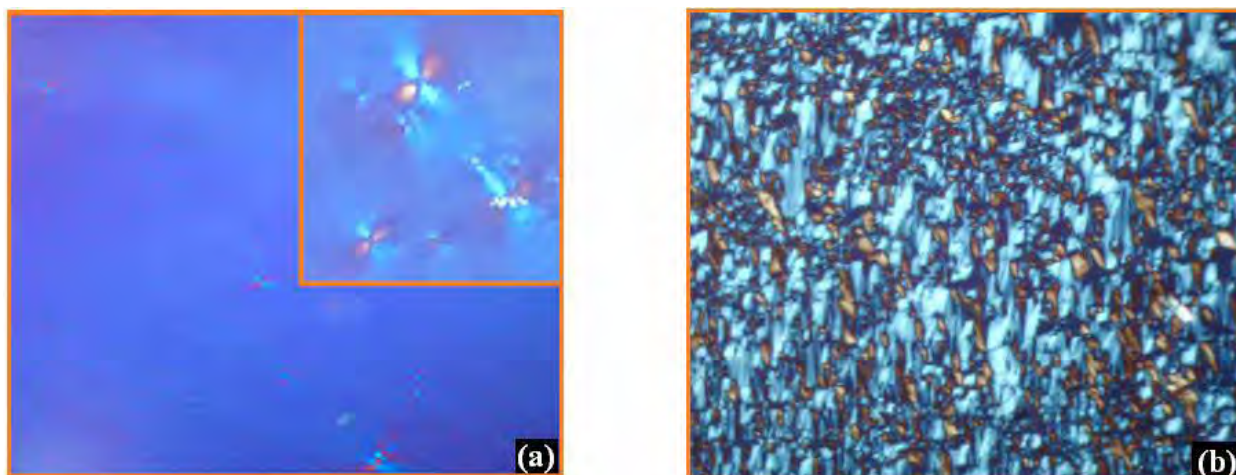
**Figura 32** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação E, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: **(a)** geladeira -  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(b)** ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(c)** estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(d)** ciclo estufa /geladeira.



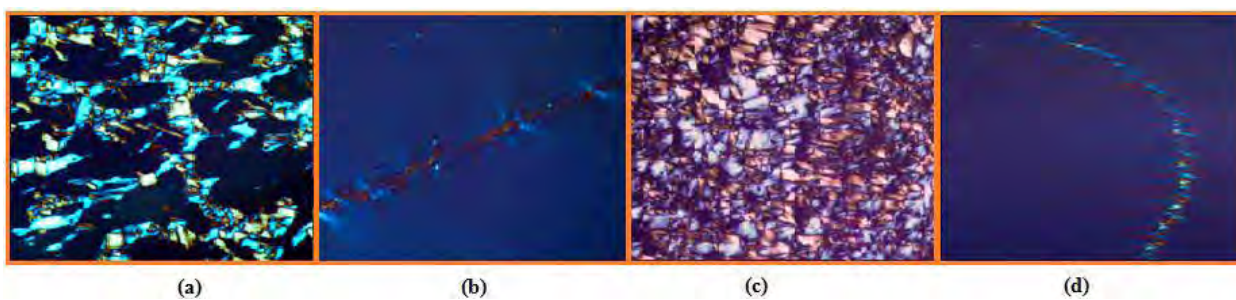
**Figura 33** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação F, armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ): **(a)** cristal líquido de fase lamelar; **(b)** cristal líquido de fase hexagonal.



**Figura 34** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação F, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: **(a)** geladeira -  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(b)** ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(c)** estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(d)** ciclo estufa /geladeira.



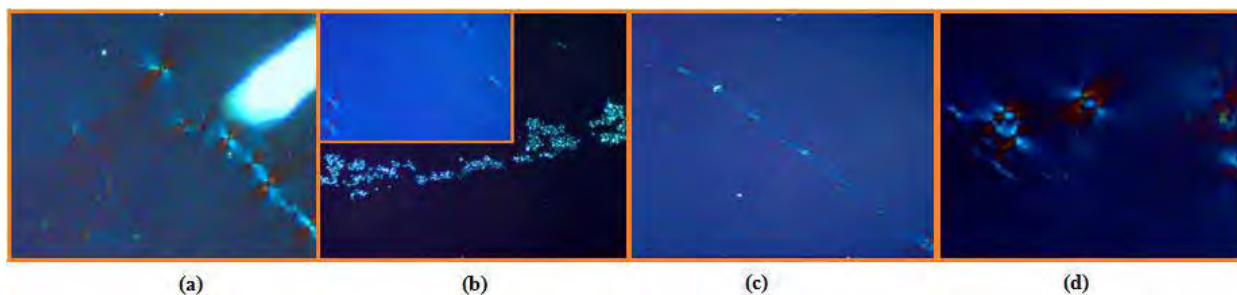
**Figura 35** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G, armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ): (a) cristal líquido de fase lamelar; (b) cristal líquido de fase hexagonal.



**Figura 36** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: (a) geladeira -  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (b) ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (c) estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; (d) ciclo estufa /geladeira.



**Figura 37** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação H, armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ).



**Figura 38** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação H, após 15 dias ( $t_{2P}$ ) no TEP, armazenada nas seguintes condições: **(a)** geladeira -  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(b)** ambiente -  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(c)** estufa -  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ; **(d)** ciclo estufa /geladeira.

Sob a luz polarizada, as fotomicrografias das formulações E, F e G (Figuras 31, 33 e 35, respectivamente) evidenciam em **(a)** a formação de cristais líquidos de fase lamelar, detectados pela presença de cruzeiros de malta e em **(b)** observa-se a formação de cristais líquidos de fase hexagonal, detectados pela presença de estruturas semelhantes a estrias ou mosaicos.

Segundo Constantinides & Scarlat (1997), tanto a fase lamelar quanto a fase hexagonal são características de sistemas mesofásicos.

Com a observação das Figuras 31, 33 e 35 em comparação com a Figura 37, pode-se sugerir que o aumento da concentração de 30% do Procetyl AWS<sup>®</sup> das formulações E, F e G para 40% na formulação H favoreceu a organização das moléculas anfifílicas apenas em camadas duplas bidimensionais dispostas paralelamente, caracterizando a formação unicamente de sistemas mesofásicos de fase lamelar, que puderam ser evidenciadas pela presença de cruzeiros de malta na fotomicrografia de luz polarizada.

Essa constatação experimental está de acordo com os dados da literatura, pois no trabalho de revisão científica de Pasquali, Bregni & Serrao (2006) os autores relatam que, embora os cristais líquidos liotrópicos de fase lamelar possuam relativa fluidez e as fases hexagonais sejam mais consistentes, a fase  $L_\alpha$  necessita de uma maior concentração de tensoativo para sua formação em comparação com a concentração de tensoativo requerida para a formação de fases  $H_I$  e  $H_{II}$ .

Completando o mesmo raciocínio, Gabboun *et al.* (2001) & Hyde (2001) apontam que as mesofases líquido-cristalinas podem ser grosseiramente caracterizadas verificando-se a viscosidade. A fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso (como foi o caso da formulação H) e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel (como exemplo, as formulações E e F), enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada.

As formulações E, F e G apresentaram a formação simultânea de fases hexagonais e lamelares, porém a formulação G foi caracterizada macroscopicamente no diagrama de fases como SLT, do mesmo modo que a formulação H também é um SLT. Contudo, nos estudos de viscosidade (item 5.2.6.2.) foi constatado que a formulação G possui maior consistência do que a formulação H, justificando o porquê que tal formulação provavelmente apresentar a formação de fases hexagonais e lamelares.

Acredita-se que o aumento da concentração de fase aquosa ( $G = H < F < E$ ) também contribuiu para a formação de sistemas liotrópicos de fase lamelar para o surgimento de fases hexagonais. Muzzalupo & colaboradores (2009) explicam que, à medida que, aumenta-se a concentração do solvente, a espessura da fase lamelar também aumenta e possibilita a inclusão lateral entre as moléculas anfifílicas solvatadas. Este processo leva a uma mudança de fase e, dependendo da polaridade do agente de solvatação e do próprio tensoativo, a transição resulta em formação da fase hexagonal normal ( $H_I$ ) ou hexagonal reversa ( $H_{II}$ ).

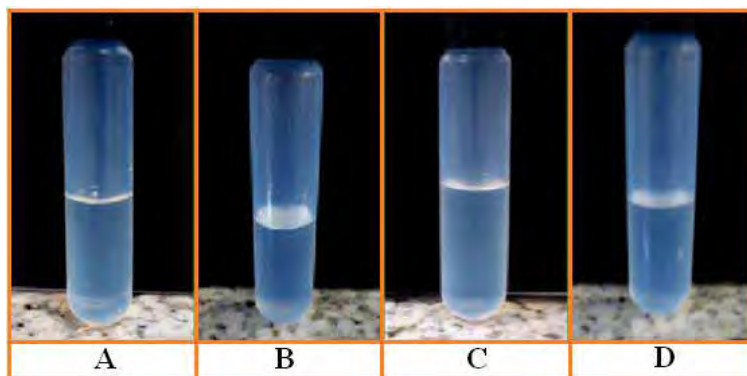
No tempo  $t_{2P}$ , as fotomicrografias indicam que as quatro formulações estudadas mantêm suas características anisotrópicas de fase hexagonal na maioria das condições de armazenamento. No caso da formulação E, observa-se na Figura 32 (c) que ainda que as estruturas características de fase hexagonal não tenham sido detectadas, sob luz polarizada à  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , a presença de fase lamelar manteve a estabilidade do sistema.

### 5.2.2. – Centrifugação

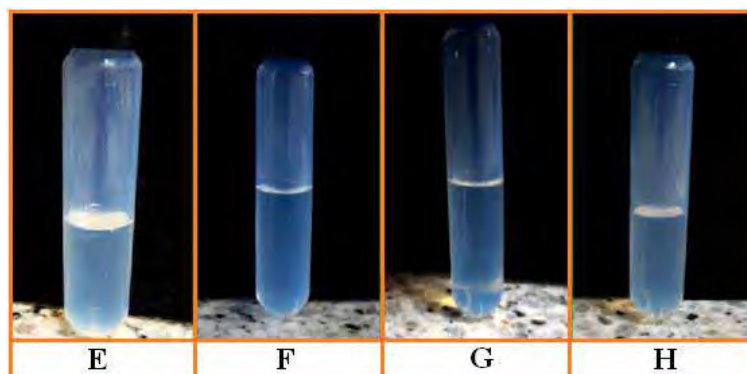
Na fase inicial de desenvolvimento de um produto, o ensaio de centrifugação é uma importante ferramenta para fornecer informações rápidas sobre sinais de instabilidade do sistema, como a separação de fases (ANVISA, 2004).

Lachman, Lieberman & Kanig (2001) ressaltam a importância da realização deste teste descrevendo relatos científicos indicando que a centrifugação a 3750 rpm, numa centrífuga de 10 cm de raio, por um período de 5 horas, é equivalente ao efeito da gravidade durante um ano.

Após 24 horas de manipulação, as formulações A à H foram submetidas ao teste de centrifugação e em seguida foram avaliadas macroscopicamente quanto à separação de fases, em anteparo de fundo preto, para facilitar a visualização, como está apresentado nas Figuras 39 e 40.



**Figura 39** – Visualização macroscópica do aspecto, após 24 horas de manipulação das formulações A, B, C e D conduzidas ao teste de centrifugação à 3000rpm, por 30 minutos.



**Figura 40** – Visualização macroscópica do aspecto, após 24 horas de manipulação das formulações E, F, G e H conduzidas ao teste de centrifugação à 3000rpm, por 30 minutos.

Como pode ser visualizado nas Figuras 39 e 40, as formulações avaliadas foram consideradas macroscopicamente estáveis por não apresentaram separação de fases.

De acordo com a Lei de Stokes, a separação das fases óleo e água é dependente do tamanho das gotículas da fase dispersa e da viscosidade da fase contínua (MIKULA, 1992). Baseando-se no princípio da lei de Stokes, pode-se esperar a ausência de coalescência nos sistemas nanoestruturados, uma vez que a transparência óptica de tais sistemas é conferida pelo reduzido diâmetro da fase interna.

Conjuntamente ao pequeníssimo tamanho das gotículas, Tadros (2008) acrescenta que as densas camadas adsorvidas nos sistemas nanoestruturados garante a ausência de deformação na interface e a ruptura do filme líquido entre as gotículas, prevenindo desta maneira a separação de fases.

### 5.2.3. – Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Como recomendado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), o potencial hidrogeniônico (pH) das formulações estudadas (A à H) foi medido após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ) da manipulação. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 14 e 15.

**Tabela 14** – Resultados da determinação do potencial hidrogeniônico (pH) das formulações A, B, C e D (diagrama 1), no TEP, nos tempos  $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ .

		pH			
		Formulação A	Formulação B	Formulação C	Formulação D
Tempo	$t_{1P}$	5,76	5,92	5,69	5,72
	$t_{2P}$	5,61	5,68	5,52	5,34
$\Delta$ pH		0,15	0,24	0,17	0,38

**Tabela 15** – Resultados da determinação do potencial hidrogeniônico (pH) das formulações E, F, G e H (diagrama 2), no TEP, nos tempos  $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ .

		pH															
		Formulação E				Formulação F				Formulação G				Formulação H			
		Condições de Armazenamento															
		A	E	G	C	A	E	G	C	A	E	G	C	A	E	G	C
Tempo	$t_{1P}$	5,32	5,32	5,32	5,32	5,43	5,43	5,43	5,43	5,61	5,61	5,61	5,61	5,08	5,08	5,08	5,08
	$t_{2P}$	5,55	5,56	5,58	5,43	5,49	5,43	5,69	5,44	5,75	5,85	5,77	5,62	5,47	5,57	5,64	5,53
$\Delta$ pH		0,23	0,24	0,26	0,11	0,06	0	0,26	0,01	0,14	0,24	0,16	0,01	0,39	0,49	0,56	0,45

A = ambiente; E = estufa; G = geladeira; C = ciclo.

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 microflora da pele, irritação cutânea ou interferência no processo de queratinização.



Com isso, conclui-se que a pequena variação do  $\Delta$  pH indica que todas as formulações apresentaram estabilidade intrínseca. Os valores do parâmetro medido também indicam que as formulações também mantiveram-se compatíveis com o pH fisiológico da pele. Contudo, a formulação G destacou-se entre as demais pela menor variação que apresentou do  $\Delta$  pH entre as medidas nas diversas condições de armazenamento a que foi submetida e, preferencialmente, por enquadrar-se mais que as outras na faixa ideal do pH superficial da pele durante todo o tempo de estudo.

#### 5.2.4. – Determinação da Condutividade Eletrolítica

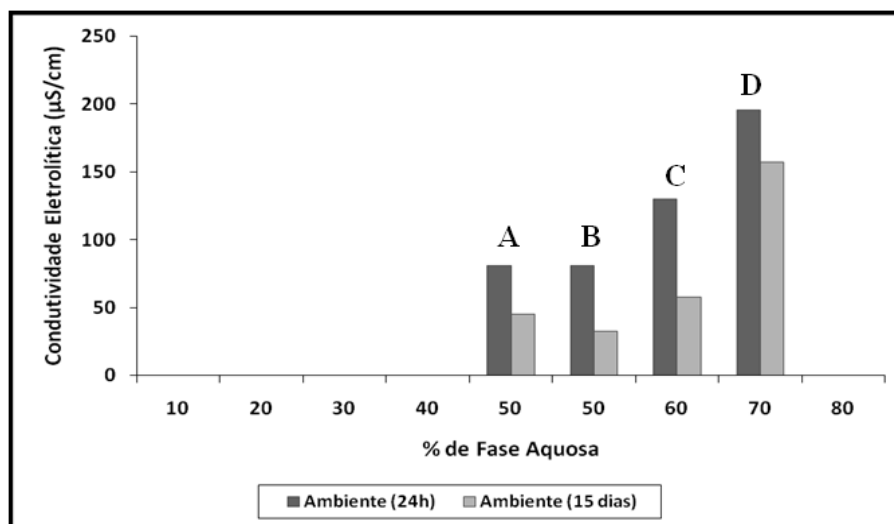
A verificação da condutividade iônica pode ser usada para distinguir sistemas A/O dos O/A, por isso é considerada um importante parâmetro nos estudos de estabilidade por ser capaz de identificar mudanças na distribuição de fases.

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).

Os resultados das determinações de condutividade eletrolítica ( $\mu$ S/cm) das formulações do diagrama 1 estão apresentados na Tabela 16 e representados graficamente na Figura 41 em função da porcentagem de fase aquosa.

**Tabela 16** – Resultados da determinação da condutividade eletrolítica das formulações A, B, C e D (diagrama 1), no TEP, nos tempos  $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ .

		Condutividade Eletrolítica ( $\mu$ S/cm)			
		Formulação A	Formulação B	Formulação C	Formulação D
Tempo	$t_{1P}$	80,90	81,30	129,90	195,90
	$t_{2P}$	45,50	32,40	57,80	156,90
CV (%)		28,47	42,53	39,25	14,08



**Figura 41** – Condutividade eletrolítica das formulações A, B, C e D (diagrama 1) em função da porcentagem de fase aquosa, no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ).

Os resultados da Tabela 16, evidenciados pela Figura 41, demonstram que os valores de condutividade em todas as formulações diminuíram com o decorrer do tempo.

Na formulação D esta redução não foi tão intensa como nas demais. Isso pode ter ocorrido pela evaporação de água das formulações ou por mudança do domínio de fase contínua nos sistemas.

A avaliação deste parâmetro em conjunto com o índice de refração pode elucidar melhor qual dos dois mecanismos foi responsável pela diminuição da condutividade eletrolítica nas formulações A, B, C e D.

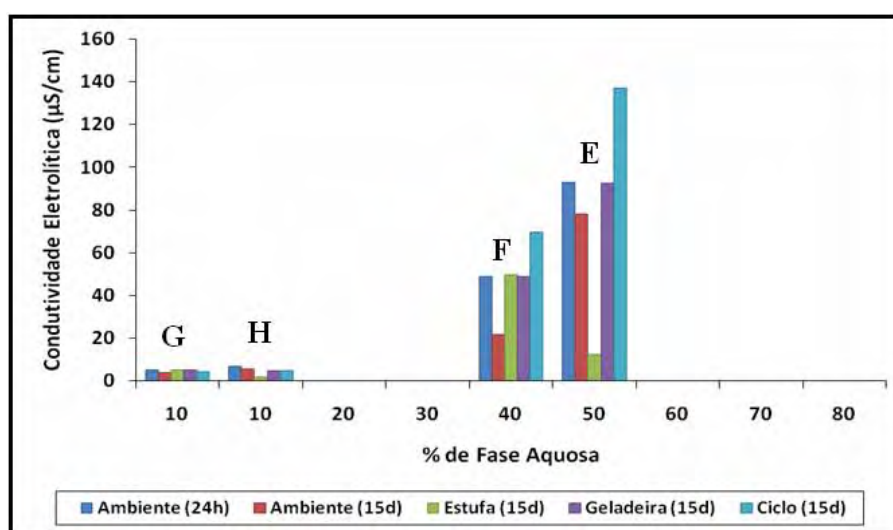
Os resultados obtidos das medidas de condutividade eletrolítica ( $\mu\text{S/cm}$ ) das formulações do diagrama 2 estão expostos na Tabela 17 e representados graficamente na Figura 42 em função da porcentagem de fase aquosa.

**Tabela 17** – Resultados da determinação da condutividade eletrolítica das formulações E, F, G e H (diagrama 2), no TEP, nos tempos  $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ .

Condutividade Eletrolítica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )																	
Formulação E				Formulação F				Formulação G				Formulação H					
Condições de Armazenamento																	
Tempo		A	E	G	C	A	E	G	C	A	E	G	C	A	E	G	C
		$t_{1P}$	93,08	93,08	93,08	93,08	49,00	49,00	49,00	49,00	5,33	5,33	5,33	5,33	7,08	7,08	7,08
$t_{2P}$	78,20	12,34	92,70	136,90	21,90	49,60	48,80	69,80	3,83	5,18	5,08	4,19	5,78	1,96	4,68	4,69	
CV (%)		55,41				40,11				12,47				23,01			

A = ambiente; E = estufa; G = geladeira; C = ciclo.

O coeficiente de variação (CV) foi calculado utilizando-se os valores da mesma condição de armazenamento nos dois tempos medidos ( $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ ). Realizou-se uma média entre os CV obtidos, de modo a obter um único valor para cada formulação.



**Figura 42** – Condutividade eletrolítica das formulações E, F, G e H (diagrama 2) em função da porcentagem de fase aquosa, no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ).

Observando-se a Figura 42, nota-se que independente da condição de armazenamento das formulações G e H, a condutividade eletrolítica manteve-se baixa, sendo que na formulação G este parâmetro apresentou menor coeficiente de variação do que a formulação H (ver Tabela 17), nas diferentes temperaturas testadas.

Os resultados da Tabela 17 demonstram que a condutividade eletrolítica das formulações G e H foram muito próximas, uma vez que ambas possuem a mesma concentração de fase aquosa. No entanto, pode-se inferir que a ligeira redução deste valor da formulação H para a G (tempo  $t_{1P}$ ) está relacionada com o aumento em 10% na concentração da fase oleosa do sistema (silicone DC 5329<sup>®</sup>).

O aumento em 10% na concentração do silicone DC 5329<sup>®</sup> da formulação E para a F levou a uma redução bem maior da condutividade eletrolítica entre essas formulações comparativamente com aquela que ocorreu entre as formulações H e G, pois no primeiro caso, a concentração de fase aquosa também varia na composição das formulações.

Dentre as quatro formulações estudadas, a formulação E apresentou maior CV entre as medidas nas diferentes condições de armazenamento devido à brusca redução da condutividade eletrolítica da amostra armazenada na estufa, no tempo  $t_{2P}$ . Ainda assim, pode-se observar na Figura 32(c), item 5.2.1., que a formulação manteve-se estável em função da presença das cruces de malta. Assim, para elucidar melhor o mecanismo responsável por esta variação conduziu uma análise em conjunto utilizando da variação da condutividade eletrolítica e do índice de refração, no tempo  $t_{2P}$ .

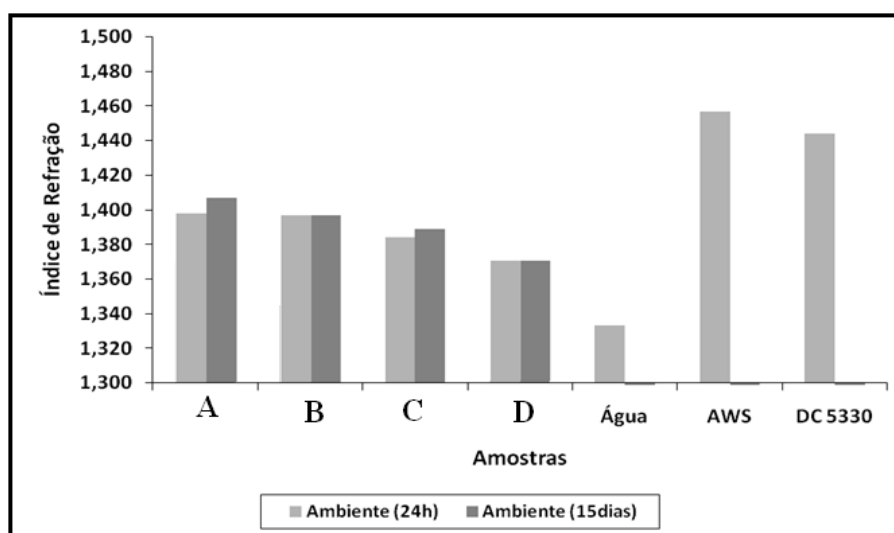
### 5.2.5. – Determinação do Índice de Refração

Como o índice de refração é um parâmetro físico-químico relacionado com a identidade das substâncias (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988), é possível avaliar se a condição de armazenamento influenciou de modo significativo na composição das formulações estudadas.

Os valores do índice de refração da água, do tensoativo Procetyl AWS<sup>®</sup>, dos silicones DC 5330<sup>®</sup> e DC 5329<sup>®</sup> são, respectivamente, 1,333, 1,457, 1,444 e 1,432. Os resultados das determinações do índice de refração das formulações do diagrama 1 estão apresentados na Tabela 18 e Figura 43, enquanto que os resultados das formulações do diagrama 2 encontram-se na Tabela 19 e Figura 44.

**Tabela 18** – Resultados da determinação do índice de refração das formulações A, B, C e D (diagrama 1), no TEP, nos tempos  $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ .

		Índice de Refração			
		Formulação A	Formulação B	Formulação C	Formulação D
Tempo	$t_{1P}$	1,398	1,397	1,384	1,370
	$t_{2P}$	1,407	1,397	1,389	1,370



**Figura 43** – Índice de refração das formulações A, B, C e D (diagrama 1), no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ).

O índice de refração da água é  $1,333$  à  $20,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , com isso, formulações que possuem predomínio de fase aquosa em sua composição, como é o caso da formulação D, apresentam valores de índice de refração bem inferiores aos de formulação que possuem maior concentração do silicone DC 5330<sup>®</sup> ( $\text{IR} = 1,444$ ), como por exemplo, a formulação B.

No tempo  $t_{2P}$ , a determinação deste parâmetro demonstrou que as formulações B e D não apresentaram alterações quantitativas na sua composição.

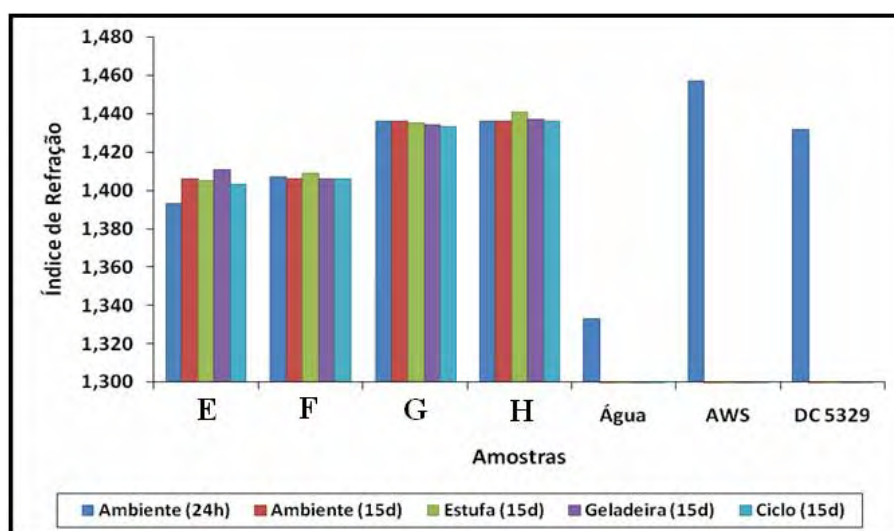
Enquanto que nas formulações A e C tiveram um aumento no índice de refração, no tempo  $t_{2P}$ . No caso dessas formulações, provavelmente ocorreu evaporação da fase aquosa, pois a água é o componente que tem o menor índice de refração e estando presente em menor concentração, o índice de refração da formulação tende a aumentar.

Assim, retomando as justificativas do item 5.2.4., a intensa redução da condutividade eletrolítica das formulações A e C provavelmente ocorreu por diminuição de fase aquosa e, no caso da formulação B pode ter ocorrido por mudança do domínio de fase contínua do sistema.

**Tabela 19** – Resultados da determinação do índice de refração das formulações E, F, G e H (diagrama 2), no TEP, nos tempos  $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ .

Índice de Refração																
Formulação E				Formulação F				Formulação G				Formulação H				
Condições de armazenamento																
Tempo	A				E				G				C			
	$t_{1P}$	1,393	1,393	1,393	1,393	1,407	1,407	1,407	1,407	1,436	1,436	1,436	1,436	1,436	1,436	1,436
$t_{2P}$	1,406	1,405	1,411	1,403	1,406	1,409	1,406	1,406	1,436	1,435	1,434	1,433	1,436	1,441	1,437	

A = ambiente; E = estufa; G = geladeira; C = ciclo.



**Figura 44** – Índice de refração das formulações E, F, G e H (diagrama 2), no TEP, após 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ) de armazenamento em diferentes temperaturas.

De modo análogo ao discutido anteriormente para as formulações do diagrama 1, sabe-se que no tempo  $t_{1P}$ , o predomínio de fase aquosa na formulação E faz com que a mesma apresente menor índice de refração do que uma formulação que possua predomínio do silicone em sua composição, como é o caso da formulação G.

A determinação do índice de refração das formulações F, G e H demonstrou que as mesmas apresentaram pequenas variações em seus valores, no tempo  $t_{2P}$ .

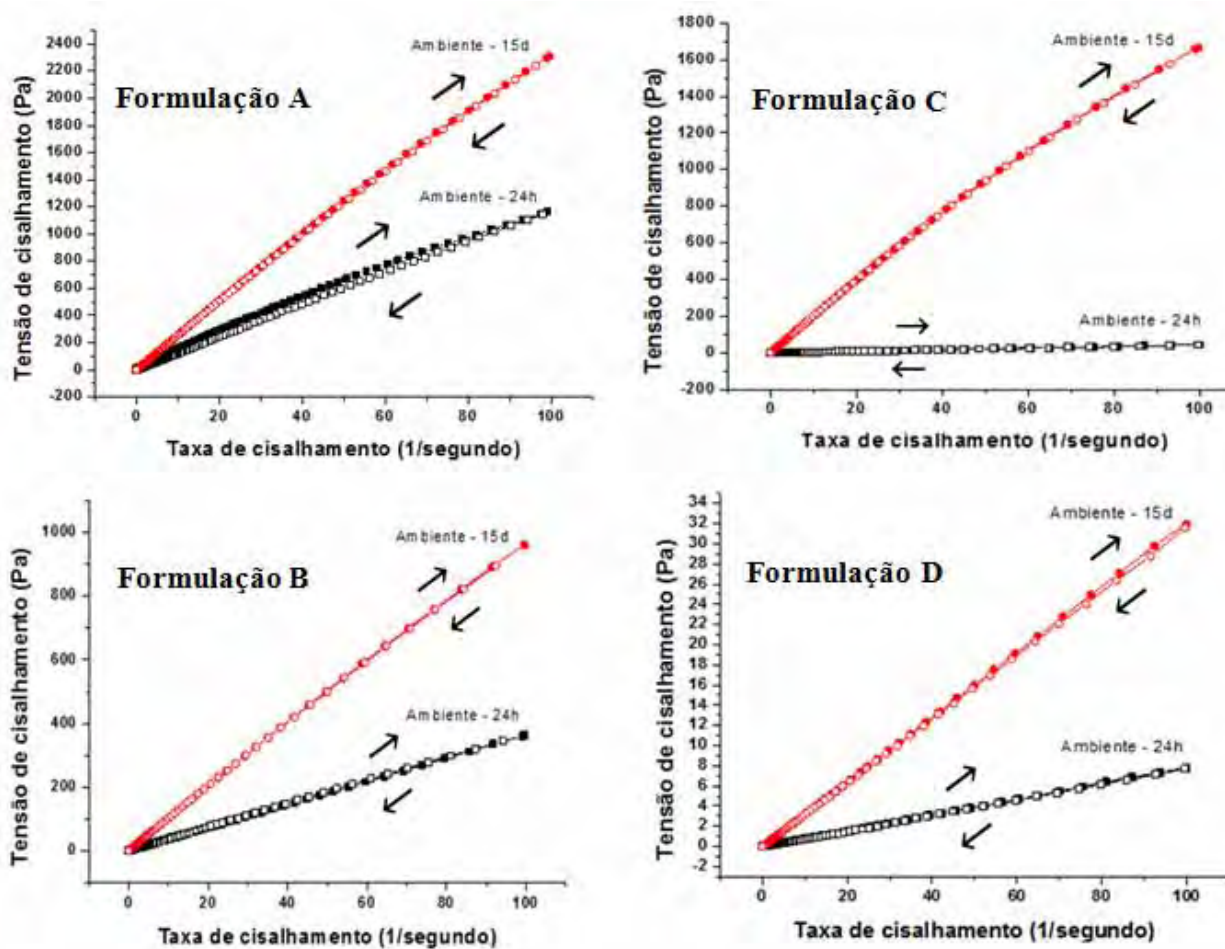
Todavia, a determinação deste parâmetro para a formulação E sinalizou que ocorreram razoáveis alterações em sua composição. No tempo  $t_{2P}$ , como o índice de refração também aumentou na amostra armazenada na geladeira, pode-se sugerir que a brusca redução da condutividade eletrolítica da formulação em questão (item 5.2.4.), na estufa, pouco está

relacionada com a evaporação de água no sistema e sim, como uma nova organização entre as moléculas dos componentes de tal sistema.

## 5.2.6. – Ensaio de escoamento e Determinação da Viscosidade

### 5.2.6.1. – Reogramas das formulações A, B, C e D, do diagrama 1

As curvas de escoamento das formulações A, B, C e D (diagrama 1), tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ), estão representadas nos reogramas da Figura 45.



**Figura 45** – Reograma da curva de escoamento das formulações A, B, C e D (diagrama 1), armazenadas à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , no TEP, após: 24 horas ( $t_{1P}$ ) e 15 dias ( $t_{2P}$ ).

Dependendo do tipo de escoamento apresentado, os fluidos podem ser classificados em newtonianos e não newtonianos.

Para avaliar as propriedades de fluxo das formulações A, B, C e D, utilizou-se o modelo matemático da lei da potência (equação 8, item 2.3.2.) para determinar o índice de consistência  $k$  e o índice de escoamento  $n$  dos sistemas. O índice  $n = 1$  representa o comportamento newtoniano e desvios em relação a este comportamento são classificados como pseudoplásticos para  $n < 1$  ou dilatantes para  $n > 1$ .

A Tabela 20 apresenta os valores de  $k$  e  $n$ , calculados através da equação 8.

**Tabela 20** – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento das formulações A, B, C e D, nos TEP.

Tempo	Formulações	Índice de consistência $k$ (Pa.s)	Índice de escoamento $n$	Coefficiente de correlação $R^2$	Tipo de escoamento
$t_{1P}$	A	32,99	0,78	1,00	Pseudoplástico
	B	3,54	1,00	1,00	Newtoniano
	C	0,43	1,01	1,00	Newtoniano
	D	0,08	1,02	1,00	Newtoniano
$t_{2P}$	A	35,40	0,99	1,00	Pseudoplástico
	B	26,63	0,97	1,00	Pseudoplástico
	C	11,31	0,91	1,00	Pseudoplástico
	D	0,31	1,00	1,00	Newtoniano

Na Tabela 21 encontram-se os valores de viscosidade (Pa.s) das formulações A, B, C e D determinadas no ponto de máxima velocidade de cisalhamento ( $s^{-1}$ ).

**Tabela 21** – Média da triplicata da viscosidade aparente (Pa.s) obtida a partir da curva de viscosidade das formulações A, B, C e D, do diagrama 1.

		Viscosidade Aparente (Pa.s)	
		$t_{1P}$	$t_{2P}$
Formulações	A	11,72	23,15
	B	3,65	16,71
	C	0,43	9,64
	D	0,08	0,32



Pelos valores apresentados na Tabela 20, pode-se observar que o coeficiente de correlação  $R^2$  esteve muito próximo ou igual a 1,0 para as formulações estudadas. É importante ressaltar que, neste caso, o  $R^2$  não significa que os intervalos tratados matematicamente estão dentro de uma faixa linear, e sim que a lei da potência foi um modelo matemático adequado ( $R^2 > 0,99$ ) para realizar o ajuste da curva de escoamento e demonstrou ser confiável para determinar o comportamento de fluxo das formulações testadas.

Pelos dados apresentados na Tabela 20, enquanto a formulação A apresentou comportamento de fluido pseudoplástico, a formulação D apresentou comportamento de fluido newtoniano, durante os 15 dias de estudo. Ao passo que no tempo  $t_{1P}$  as formulações B e C tinham um comportamento de fluxo newtoniano e no tempo  $t_{2P}$  este comportamento ganhou características de escoamento pseudoplástico.

Assim, pode-se dizer que as formulações B e C (no tempo  $t_{1P}$ ) e a formulação D (em ambos os tempos) apresentaram viscosidade constante, por isso é chamada viscosidade dinâmica, independente da velocidade de cisalhamento aplicada à amostra. No caso da formulação A, a viscosidade determinada no ponto de máxima velocidade de cisalhamento é chamada viscosidade aparente, pois apresentou variações em função da velocidade de cisalhamento aplicada à amostra.

Em materiais com comportamento de fluxo newtoniano, o  $n = 1$  transforma a lei da potência numa relação matemática em que o coeficiente de consistência  $k$  representa uma constante de proporcionalidade entre a magnitude da taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento aplicada à amostra. Com isso, as formulações com escoamento newtoniano possuem valores muito próximos entre o coeficiente  $k$  e a viscosidade, pois para líquidos ideais a viscosidade também representa uma constante de proporcionalidade entre tensão e taxa de cisalhamento.

A transformação da lei da potência numa relação matemática de proporcionalidade explica o fato das formulações B, C e D, no tempo  $t_{1P}$ , apresentarem valores muito próximos entre o índice de consistência  $k$  determinado pela lei da potência (vide Tabela 20) e os valores de viscosidade determinados no ponto de máxima velocidade de cisalhamento aplicada à amostra (vide Tabela 21).

O desvio do comportamento newtoniano da formulação A (em ambos os tempos) e das formulações B e C (no tempo  $t_{2P}$ ) para escoamento pseudoplástico demonstrou ser o coeficiente  $k > \eta_{ap}$ , como visto nas Tabelas 20 e 21.

Como a viscosidade praticamente não varia com a taxa de cisalhamento aplicada, as formulações de comportamento newtoniano não possuem área de histerese. A Tabela 22 apresenta os valores da área de histerese calculados para as formulações com características de escoamento pseudoplástico.

**Tabela 22** – Média da triplicata de cada área de histerese calculada a partir da curva de escoamento das formulações A, B, C e D, do diagrama 1.

		<b>Área de Histerese (Pa.s)</b>	
		<b>t<sub>1P</sub></b>	<b>t<sub>2P</sub></b>
<b>Formulações</b>	<b>A</b>	6007,00	487,25
	<b>B</b>	---	57,80
	<b>C</b>	---	737,25
	<b>D</b>	---	---

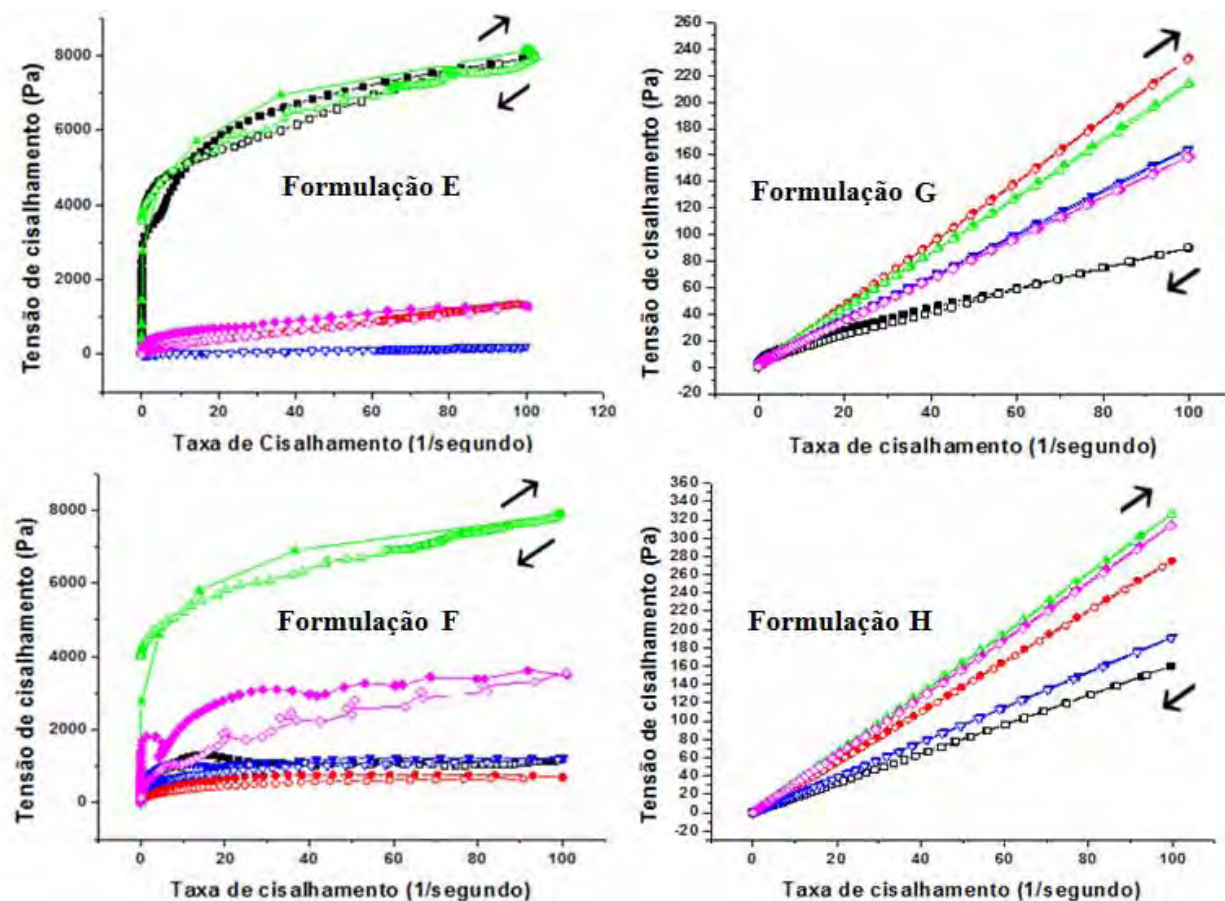
Tomando como exemplo a formulação A, as curvas ascendentes e descendentes no reograma de escoamento apresentaram perfis diferentes, obtendo-se uma área de histerese, o que caracteriza bem o fluxo tixotrópico.

A partir do estudo de fluxo das formulações estudadas, foi possível correlacionar os dados reológicos obtidos com a caracterização física macroscópica de tais formulações no diagrama de fases ternário. As formulações A e B, caracterizadas como SVT, apresentaram viscosidade superior que das formulações C e D, caracterizadas como SLT.

Embasados nesta dedução experimental de correlação entre duas técnicas de análise das formulações estudadas, Wang & Zhou (2009) também destacam a importância dos ensaios de escoamento, pois o comportamento do fluido está diretamente relacionado com o tipo e o grau de organização do sistema.

### **5.2.6.2. – Reogramas das formulações E, F, G e H, do diagrama 2**

As curvas de escoamento das formulações E, F, G e H (diagrama 2), tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ), estão representadas nos reogramas da Figura 46.



**Figura 46** – Reogramas da curva de escoamento das formulações E, F, G e H, no TEP, após 24 horas à  $25,0 \pm 2,0$  °C (—■—) e após 15 dias, armazenadas nas seguintes condições:  $5,0 \pm 2,0$  °C (—◆—),  $25,0 \pm 2,0$  °C (—♦—); ciclo  $40,0/5,0 \pm 2,0$  °C (—▲—) e  $40,0 \pm 2,0$  °C (—▼—).

Do mesmo modo como o realizado para as formulações do diagrama 1, as propriedades de fluxo das formulações E, F, G e H foram avaliadas utilizando-se o modelo matemático da lei da potência (equação 8) para determinar o índice de consistência  $k$  e o índice de escoamento  $n$ .

Os valores de  $k$  e  $n$  das quatro formulações estudadas do diagrama 2 estão apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23** – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento das formulações E, F, G e H, nos TEP.

Tempo (dias)	Formulações	Índice de consistência $k$ (Pa.s)	Índice de escoamento $n$	Coefficiente de correlação $R^2$	Tipo de escoamento
$t_{1P}$	E	2462,50	0,24	0,99	Pseudoplástico
	F	---	---	---	Pseudoplástico
	G	4,02	0,66	0,99	Pseudoplástico
	H	1,60	1,00	1,00	Newtoniano
$t_{2P}$	E (ambiente)	147,35	0,68	1,00	Pseudoplástico
	E (ciclo)	2495,00	0,28	0,98	Pseudoplástico
	E (estufa)	2,21	1,00	1,00	Newtoniano
	E (geladeira)	273,90	0,34	0,99	Pseudoplástico
	F (ambiente)	364,90	0,18	0,93	Pseudoplástico
	F (ciclo)	714,10	0,18	0,94	Pseudoplástico
	F (estufa)	742,60	0,15	0,98	Pseudoplástico
	F (geladeira)	1245,00	0,23	0,97	Pseudoplástico
	G (ambiente)	2,35	1,00	1,00	Newtoniano
	G (ciclo)	2,60	1,00	1,00	Newtoniano
	G (estufa)	2,75	1,00	1,00	Newtoniano
	G (geladeira)	2,41	0,90	1,00	Pseudoplástico
	H (ambiente)	2,75	1,00	1,00	Newtoniano
	H (ciclo)	3,36	1,00	1,00	Newtoniano
	H (estufa)	1,92	1,00	1,00	Newtoniano
	H (geladeira)	3,15	1,00	1,00	Newtoniano

Na Tabela 24 encontram-se os valores de viscosidade (Pa.s) das formulações E, F, G e H determinadas no ponto de máxima velocidade de cisalhamento ( $s^{-1}$ ).

**Tabela 24** – Média da triplicata da viscosidade aparente obtida a partir da curva de viscosidade das formulações E, F, G e H, do diagrama 2.

		Viscosidade Aparente (Pa.s)				
		$t_{1P}$	$t_{2P}$			
		Ambiente	Ambiente	Ciclo	Estufa	Geladeira
Formulações	E	77,92	13,80	77,98	2,17	12,74
	F	12,05	6,86	78,86	12,18	34,49
	G	0,90	2,34	2,14	1,65	1,59
	H	1,60	2,76	3,27	1,92	3,15

Os valores do coeficiente de correlação  $R^2 > 0,99$ , apresentados na Tabela 23 demonstram que para as quatro formulações estudadas a lei da potência foi um modelo

matemático adequado para determinar o índice de escoamento  $n$ , exceto para a formulação F devido à uma maior dispersão do conjunto de dados por sua alta viscosidade que favoreceu problemas de leitura pelo equipamento.

Como já comentado no item anterior, as formulações que apresentam comportamento de fluxo newtoniano possuem os valores de viscosidade constante, independente da velocidade de cisalhamento aplicada à amostra. Da mesma maneira, nota-se que os valores de viscosidade (Tabela 24) e do índice de consistência  $k$  (Tabela 23) de cada amostra são praticamente os mesmos, uma vez que para fluidos newtonianos a lei da potência é transformada na lei de Newton, em que a viscosidade é a constante de proporcionalidade entre tensão e taxa de cisalhamento pelo fato do coeficiente  $n = 1$ .

Com a análise dos resultados apresentados na Tabela 23, pode-se concluir que as formulações F e H mantiveram comportamentos de fluxo do tipo pseudoplástico e newtoniano, respectivamente, nos tempos  $t_{1P}$  e  $t_{2P}$ .

De acordo com as conclusões já alcançadas nos outros testes preliminares, a redução abrupta do índice de consistência  $k$  que a formulação E apresentou à  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  corrobora com a suposição da organização estrutural do sistema ter sido alterada drasticamente.

Os resultados do índice de consistência  $n$  da formulação G na Tabela 23 indicam que este sistema praticamente manteve-se constante, independente da condição de armazenamento e do tipo de escoamento apresentado pela amostra.

Os valores da área de histerese de cada formulação estudada, calculada pela área formada por diferenças na viscosidade entre a curva ascendente e descendente nos reogramas de curva de escoamento, estão apresentados na Tabela 25.

**Tabela 25** – Média da triplicata de cada área de histerese calculada a partir da curva de escoamento das formulações E, F e G, do diagrama 2.

		Área de Histerese (Pa.s)				
		$t_{1P}$	$t_{2P}$			
		Ambiente	Ambiente	Ciclo	Estufa	Geladeira
Formulações	E	7507,00	2274,00	1315,50	---	2520,00
	F	3628,00	4987,00	331,00	136,00	619,00
	G	343,50	---	---	---	356,65
	H	---	---	---	---	---

A ausência da área de histerese ocorreu na formulação H verificada pela sobreposição das curvas ascendentes e descendentes no reograma de escoamento, demonstrando que a viscosidade foi independente do gradiente de cisalhamento aplicado, o que caracteriza o fluxo newtoniano.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 23, sabe-se que a formulação F ( $n = 0,18$ ) apresentou comportamento pseudoplástico mais acentuado do que a formulação E ( $n = 0,68$ ), no tempo  $t_{2P}$  à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ . Por isso, a formulação F apresentou maior área de histerese em relação a E, pois na primeira formulação a curva ascendente da tensão de cisalhamento estava mais deslocada do que a outra da curva descendente.

### 5.3. – Validação do Método Analítico empregado para quantificação do palmitato de retinol acrescido à formulação líquido-cristalina G<sub>PR</sub>

---

A Farmacopéia Americana (USP, 2008) na Seção de Ensaio Gerais apresenta recomendações para a validação de métodos analíticos de compêndio. Métodos normalizados, como os de compêndios, já são métodos validados e não é necessário proceder ao processo completo de validação, desde que não ocorram alterações significativas dos mesmos e quando o produto em questão é o indicado na monografia. Entretanto, a conformidade dos métodos normalizados usados deve ser verificada sob condições reais de uso. É responsabilidade do analista/laboratório verificar se as características de desempenho prescritas no método normalizado podem ser obtidas (EURACHEM, 1998).

Assim, ainda que o método utilizado para a quantificação do palmitato de retinol na matriz ao qual foi incorporado seja normalizado, realizou-se a validação da metodologia analítica pela necessidade de se confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer e com as condições nas quais foi aplicado.

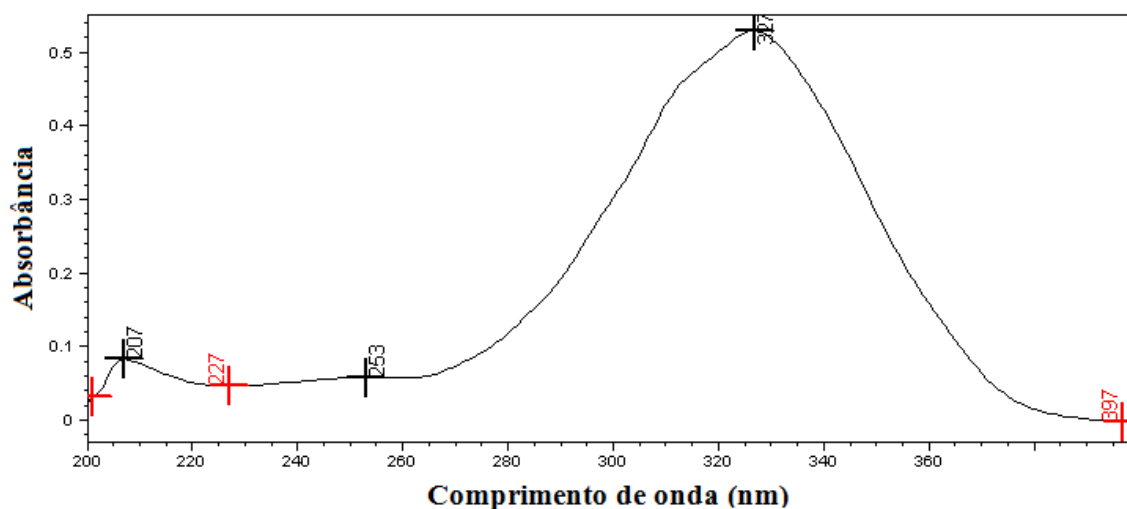
Dentro do âmbito geral de validação de métodos analíticos, o tipo de validação utilizado nesta pesquisa foi a validação no laboratório (tradução da expressão, em inglês, “*in house validation*”), na qual as etapas de validação foram feitas dentro do laboratório de trabalho para verificar se o método farmacopéico adotado está bem aplicado às reais condições de uso.

Os parâmetros analíticos utilizados nesta pesquisa para avaliar a credibilidade do método analítico estudado durante o seu uso rotineiro foram: **seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e robustez.**

### 5.3.1. – Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do palmitato de retinol (PR)

De acordo com a Farmacopéia Européia 5.0 (2005), o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ) dos ésteres do ácido retinóico, em solução de 2-propanol e pentano, está entre 325 nm e 327 nm.

Para confirmar a identidade da matéria-prima utilizada, realizou-se o espectro de varredura de uma solução de PR (matéria prima) com concentração de 10 UI/mL, conforme apresentado na Figura 47.



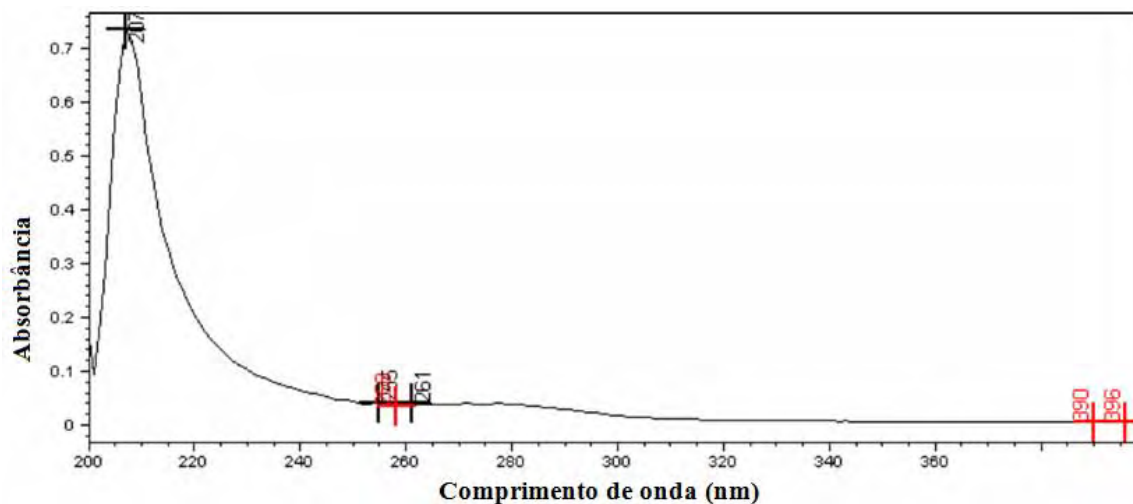
**Figura 47** – Espectro de varredura do PR em mistura de 2-propanol e pentano (95:5) para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.

A partir do espectro de varredura obtido do PR, o comprimento de onda analítico selecionado para realizar as determinações quantitativas do princípio ativo foi de 327 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ ), o que está de acordo com a informação fornecida pela Farmacopéia Européia 5.0 (2005).

O pico do PR apresentou-se bem definido e simétrico, o que permite a utilização com segurança da técnica espectrofotométrica na região de radiação eletromagnética ultravioleta para a análise quantitativa do éster de retinol.

### 5.3.2. – Seletividade

Na primeira etapa de validação determinou-se a seletividade do método analítico, como visto na Figura 48, pela avaliação do grau de interferência dos excipientes e impurezas presentes na matriz (formulação G).



**Figura 48** – Espectro de varredura dos excipientes da matriz analítica sem a substância de interesse para determinar a seletividade do método analítico espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm.

Pode-se considerar pela análise das Figuras 47 e 48 que o método analítico detecta seletivamente o palmitato de retinol entre os componentes da matriz em que está inserido.

Ribani & colaboradores explicam que a seletividade deve ser assegurada como primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental, caso contrário, a linearidade, a exatidão e a precisão estariam seriamente comprometidas.

### 5.3.3. – Determinação da Linearidade e da Faixa Linear de Trabalho do Método Analítico

O desenvolvimento de métodos quantitativos empregando a espectrofotometria de absorção é baseado na suposição de que a capacidade de absorvidade de um sistema é diretamente proporcional à concentração de soluto. Por isso, deve-se trabalhar, sempre que



possível, com concentrações que permitam que se cumpra a lei de Beer, com a finalidade de obter uma curva analítica que tenha uma relação linear entre as concentrações da substância analisada e as absorvâncias correspondentes.

A curva analítica deve ser construída com no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica, a partir de um conjunto de medições experimentais, pode ser efetuada matematicamente usando o método de regressão linear (coeficiente *a* e *b*) e cálculo do coeficiente *r* de correlação linear (RIBANI *et al.*, 2004).

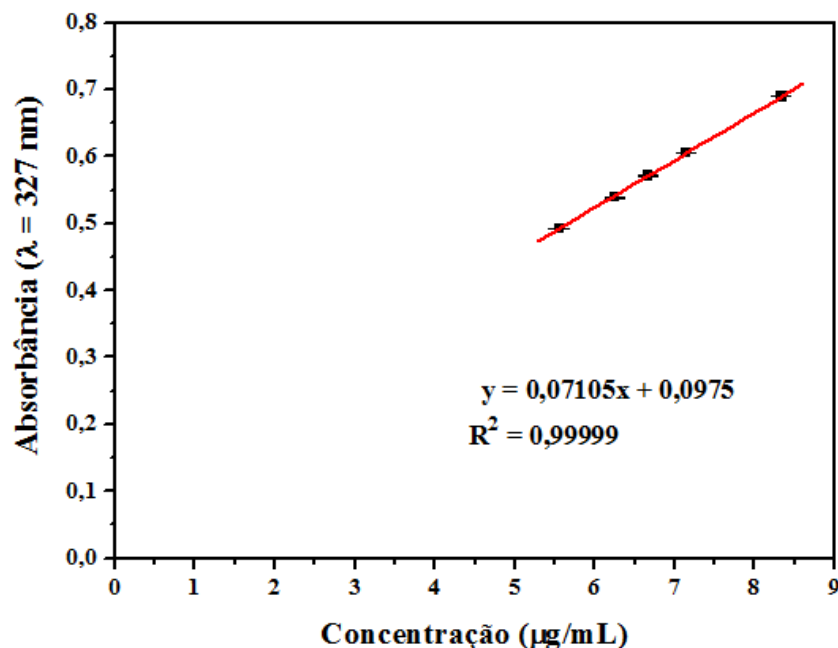
Na maior parte dos casos, o intervalo de concentrações da espécie de interesse que apresenta uma relação linear com a absorvância deve ser determinado empiricamente. No entanto, como a faixa de trabalho recomendada pela Farmacopéia Européia 5.0 (2005) é de 10 UI/mL a 15 UI/mL, construiu-se a curva analítica de **absorvância** em função da **concentração** do PR (material referência) utilizando esta faixa de concentrações.

Na Figura 49 encontra-se a curva analítica do PR (material referência) em solução de pentano e 2-propanol, a partir dos dados apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26** – Valores de absorvância do palmitato de retinol (material referência) em soluções de pentano e 2-propanol para a construção da curva analítica pelo método espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm.

Concentração (UI/mL)	Concentração (µg/mL)	Absorvância*	Absorvância Média ± Desvio Padrão	C.V. (%)
10,00	5,556	0,49271	0,49246 ± 0,0003	0,062
		0,49212		
		0,49255		
11,25	6,252	0,53973	0,53903 ± 0,0008	0,139
		0,53913		
		0,53824		
12,00	6,666	0,57069	0,57108 ± 0,0003	0,060
		0,57125		
		0,57131		
12,85	7,140	0,60538	0,60516 ± 0,0002	0,001
		0,60510		
		0,60501		
15,00	8,334	0,68971	0,6896 ± 0,0001	0,013
		0,68956		
		0,68956		

\* Valor correspondente à média de três determinações.



**Figura 49** – Curva analítica do palmitato de retinol (material referência), no intervalo de 10 UI/mL a 15 UI/mL, no comprimento de onda de 327 nm.

O coeficiente de correlação linear  $R^2$  é um parâmetro que permite estimar a qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Ribani & colaboradores (2004) comentam que um coeficiente de correlação linear maior do que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

O coeficiente de correlação linear encontrado para a curva analítica foi de 0,99999, com coeficiente de variação (CV) entre as determinações inferior a 5%, demonstrando haver uma fortíssima correlação linear entre os dados de absorbância e concentração analisados.

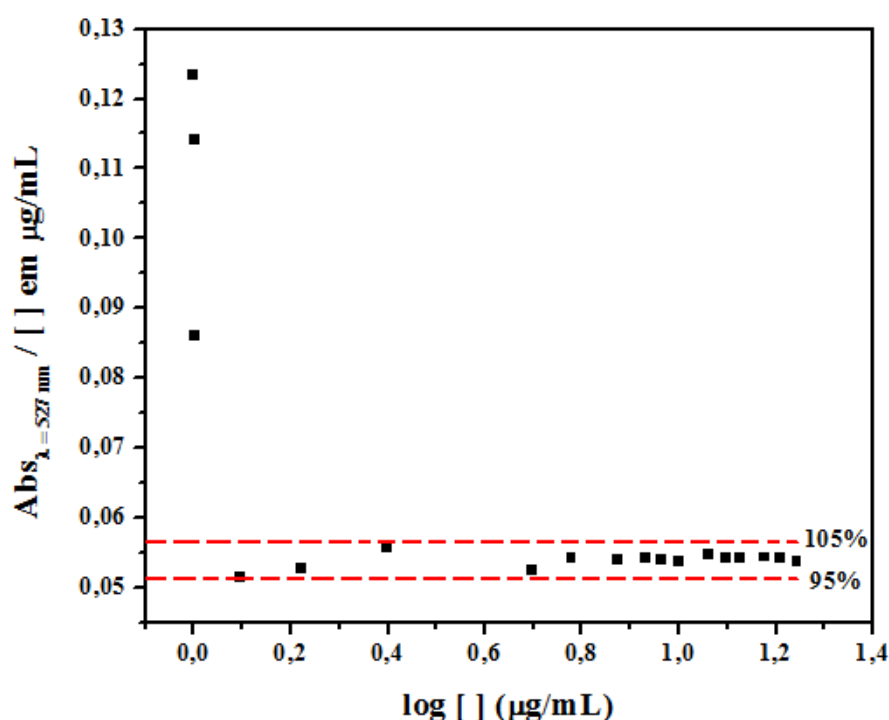
A fim de verificar se a relação linear simples descrita pela equação  $y = ax + b$  é válida num intervalo mais amplo de concentrações (< 10 UI/mL e > 15 UI/mL), construiu-se o gráfico de intervalo linear abrangendo concentrações de 0,3125 UI/mL a 17,5 UI/mL do palmitato de retinol (padrão secundário) em soluções de pentano e 2-propanol, de acordo com a Tabela 27.

O gráfico do intervalo linear de trabalho, apresentado na Figura 50, foi construído utilizando-se as respostas relativas (quociente entre absorbância média e suas respectivas concentrações) no eixo das ordenadas e a concentração em escala logarítmica no eixo das abscissas, para determinar quais pontos dessa curva estão inseridos na faixa linear de trabalho.

**Tabela 27** – Valores de absorvância do PR (matéria-referência) em solução de pentano e 2-propanol, obtidos por espectrofotometria, no comprimento de onda de 327nm, para obtenção do intervalo linear do método analítico.

Concentração (UI/mL)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log [ ]	Absorbância Média*	Abs/[ ]
0,3125	0,3125	- 0,5051	0,03860	0,123525
0,4167	0,4167	- 0,3802	0,04756	0,114139
0,625	0,625	- 0,2041	0,05378	0,086048
1,250	1,250	0,09691	0,06440	0,051522
1,667	1,667	0,22194	0,08769	0,052601
2,500	2,500	0,39794	0,13922	0,055688
5,000	5,000	0,69897	0,26225	0,052450
6,000	6,000	0,77815	0,32528	0,054213
7,500	7,500	0,87506	0,40427	0,053903
8,570	8,570	0,93298	0,46371	0,054109
9,230	9,230	0,96521	0,49705	0,053852
10,000	10,000	1,00000	0,53832	0,053832
11,538	11,538	1,06213	0,63073	0,054666
12,500	12,500	1,09691	0,67731	0,054185
13,334	13,334	1,12496	0,72117	0,054085
15,000	15,000	1,17609	0,81499	0,054333
16,150	16,150	1,20817	0,87547	0,054209
17,500	17,500	1,24304	0,93938	0,053679

\* Valor correspondente a média de três determinações.



**Figura 50** – Intervalo linear do método analítico na faixa de concentrações entre 0,3125 UI/mL a 17,5 UI/mL, no comprimento de onda de 327 nm.

O gráfico demonstrado permite determinar as concentrações da curva pertencentes à faixa linear dinâmica. Como pode ser observado na Figura 50, as linhas tracejadas em vermelho

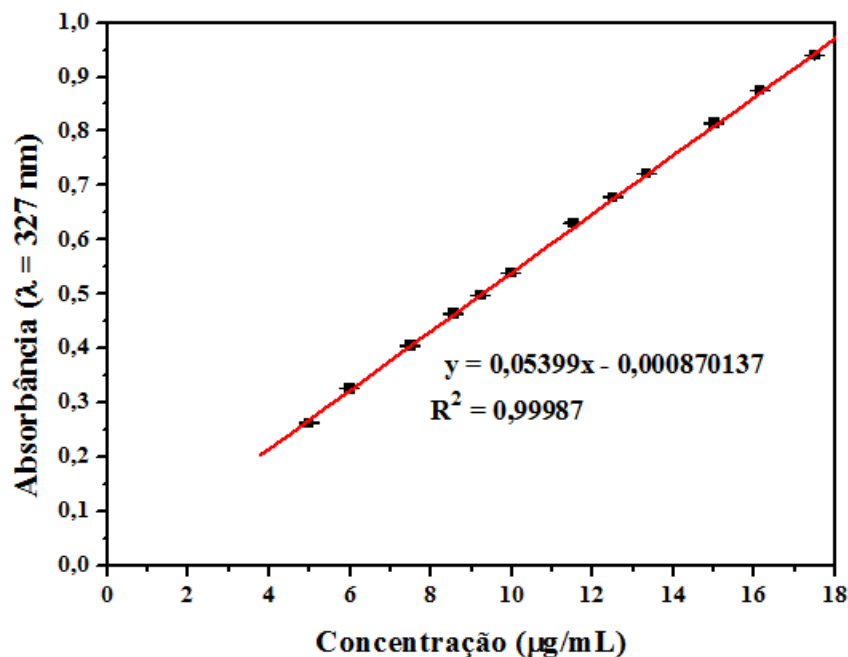
demonstram que as concentrações de 1,25 µg/mL até 17,5 µg/mL encontram-se dentro do intervalo linear dinâmico do método com uma variação de  $\pm 5\%$  em relação à este intervalo.

Para calcular os coeficientes de regressão da curva analítica do PR (padrão secundário), escolheram-se dentro do intervalo linear dinâmico do método os pontos pertencentes às concentrações entre 5,0 µg/mL e 17,5 µg/mL. A curva analítica baseada nas concentrações pertencentes ao intervalo linear dinâmico está representada na Figura 51 e os dados utilizados para a sua construção estão descritos Tabela 28.

**Tabela 28** – Valores de absorbância do palmitato de retinol (padrão secundário) em soluções de pentano e 2-propanol para a construção da curva analítica pelo método espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm.

Concentração (UI/mL)	Concentração (µg/mL)	Absorbância*	Absorbância Média $\pm$ Desvio Padrão	C.V. (%)
5,000	5,000	0,26201	0,26225 $\pm$ 0,0006	0,242
		0,26177		
		0,26297		
6,000	6,000	0,32564	0,32528 $\pm$ 0,0004	0,131
		0,32480		
		0,32540		
7,500	7,500	0,40431	0,40427 $\pm$ 0,0005	0,121
		0,40474		
		0,40376		
8,570	8,570	0,46338	0,46371 $\pm$ 0,0006	0,131
		0,46334		
		0,46441		
9,230	9,230	0,49658	0,49705 $\pm$ 0,0004	0,087
		0,49743		
		0,49715		
10,000	10,000	0,53852	0,53832 $\pm$ 0,0002	0,040
		0,53835		
		0,53810		
11,538	11,538	0,62986	0,63073 $\pm$ 0,0008	0,121
		0,63122		
		0,63112		
12,500	12,500	0,67879	0,67731 $\pm$ 0,0014	0,199
		0,67615		
		0,67698		
13,334	13,334	0,72031	0,72117 $\pm$ 0,0008	0,109
		0,72187		
		0,72132		
15,000	15,000	0,81562	0,81499 $\pm$ 0,0016	0,200
		0,81314		
		0,81622		
16,150	16,150	0,87527	0,87547 $\pm$ 0,0005	0,054
		0,87601		
		0,87514		
17,500	17,500	0,93926	0,93938 $\pm$ 0,0004	0,043
		0,93904		
		0,93983		

\* Valor correspondente à média de três determinações.



**Figura 51** – Curva analítica do palmitato de retinol (matéria prima), no intervalo de 5,0 µg/mL a 17,5 µg/mL, no comprimento de onda de 327 nm.

#### 5.3.4. – Determinação do Limite de Quantificação do Método Analítico

O gráfico de intervalo linear dinâmico do método pode ser utilizado como ferramenta para determinar o limite de quantificação do método, uma vez que o primeiro ponto pertencente a este intervalo corresponde à menor concentração em que são mantidos precisão e exatidão. Portanto, o limite de quantificação do método analítico determinado pela construção do gráfico de intervalo linear dinâmico foi de 1,25µg/mL de PR (matéria prima).

#### 5.3.5. – Determinação do Limite de Detecção do Método Analítico

O limite de detecção foi determinado experimentalmente e a concentração de PR (matéria prima) possível de ser detectada em solução de 2-propanol foi de 0,069445 µg/mL.

#### 5.3.6. – Verificação da Precisão do Método Analítico

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, sob condições definidas. Considera-se que o método analítico possui precisão se apresentar coeficiente de variação (CV)  $\leq 5\%$  (BRASIL-ANVISA, 2003).

A repetibilidade (precisão intra-corrida) foi realizada por seis determinações a 100% da concentração do teste, de acordo com os dados da Tabela 29, como recomenda a ANVISA (BRASIL-ANVISA, 2003).

**Tabela 29** – Valores de absorvância do palmitato de retinol (padrão secundário) em soluções de pentano e 2-propanol medidas pelo analista 1 para determinar a repetibilidade do método analítico por espectrofotometria, na região do UV, em 327 nm.

	Número de determinações a 100% da concentração de 12,5 µg/mL					
	1	2	3	4	5	6
<b>Absorbância Média*</b>	0,67705	0,67731	0,67497	0,67693	0,67628	0,67674
<b>Absorbância Média Total</b>	0,67655					
<b>Desvio Padrão</b>	0,0008					
<b>CV (%)</b>	0,125					

\* Valor correspondente a média de três determinações.

O CV encontrado de 0,125% entre as absorvâncias medidas para a mesma concentração teórica de 12,50 µg/mL demonstra que o método possui concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob condições de medição dentro do laboratório chamadas de repetibilidade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo.

A determinação da precisão intermediária, na qual foram analisadas seis amostras preparadas individualmente, foi avaliada por outro analista em outro dia de ensaio. A precisão intermediária corresponde à variação de resultados observados quando um ou mais fatores, tais como tempo, operador e equipamento, variam dentro do mesmo laboratório. Os dados deste ensaio estão presentes na Tabela 30.

**Tabela 30** – Valores de absorvância do palmitato de retinol (padrão secundário) em soluções de pentano e 2-propanol medidas pelo analista 2 para determinar a repetibilidade do método analítico por espectrofotometria, na região do UV, em 327 nm.

	Número de determinações a 100% da concentração de 12,5 µg/mL					
	1	2	3	4	5	6
<b>Absorbância Média*</b>	0,67453	0,67373	0,67477	0,67608	0,67640	0,67464
<b>Absorbância Média Total</b>	0,67503					
<b>Desvio Padrão</b>	0,0010					
<b>C.V. (%)</b>	0,150					

\* Valor correspondente a média de três determinações.

Do mesmo modo, o CV de 0,150% encontrado pelo segundo analista, no ensaio interdica, demonstra que o desvio está dentro do permitido, comprovando a precisão do método analítico (BRASIL-ANVISA, 2003).

### 5.3.7. – Verificação da Exatidão e da Robustez do Método Analítico

A exatidão, definida como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor aceito como verdadeiro, foi determinada após o estabelecimento da seletividade, linearidade e intervalo linear dinâmico do método analítico.

O ensaio de recuperação consistiu no processo utilizado para verificar a exatidão do método analítico. A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados do fator de recuperação do PR (padrão secundário) pela variação de dois analistas

As amostras foram preparadas segundo a Tabela 31.

**Tabela 31** – Preparo das soluções de PR (padrão secundário) para o teste de recuperação do método espectrofotométrico, na região do UV, em 327 nm.

Massa pesada da Form.G <sub>PR</sub> (mg)	Volume adicionado de pentano (mL)	Volume adicionado de 2-propanol (mL)	Concentração final* (µg/mL)
20	5	q.s.p. 20	10,0
25	5	q.s.p. 20	12,5
30	5	q.s.p. 20	15,0

\* Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

Os valores de absorvância de cada nível de concentração obtidos para a determinação do fator de recuperação estão presentes nas Tabelas 32 e 33.

**Tabela 32** – Valores de absorvância obtidos pelo analista 1 na quantificação do PR (padrão secundário) adicionado à matriz (formulação G) para determinar o fator de recuperação do método analítico, na região do UV, em 327 nm.

Concentração teórica (µg/mL)	Média (1) Abs*	Média (2) Abs*	Média (3) Abs*	Absorvância Média <sub>(total)</sub> Experimental	Absorvância Teórica**	Recuperação (%)	C.V. (%)
10,0	0,52268	0,53172	0,52975	0,52805	0,53832	98,10	0,90
12,5	0,66167	0,67571	0,66619	0,66786	0,67731	98,61	1,07
15,0	0,80984	0,80615	0,81214	0,80937	0,81499	99,31	0,37

\* Valor correspondente a média de três determinações.

\*\* Valor obtido na construção da curva analítica do PR (padrão secundário).

**Tabela 33** – Valores de absorvância obtidos pelo analista 2 na quantificação do PR (padrão secundário) adicionado à matriz (formulação G) para determinar o fator de recuperação do método analítico, na região do UV, em 327 nm.

Concentração teórica (µg/mL)	Média (1) Abs*	Média (2) Abs*	Média (3) Abs*	Absorvância Média <sub>(total)</sub> Experimental	Absorvância Teórica**	Recuperação (%)	C.V. (%)
10,0	0,52874	0,53048	0,53481	0,53134	0,53832	98,70	0,59
12,5	0,66572	0,67513	0,67847	0,67311	0,67731	99,38	0,98
15,0	0,81202	0,80075	0,81691	0,80989	0,81499	99,37	1,02

\* Valor correspondente a média de três determinações.

\*\* Valor obtido na construção da curva analítica do PR (padrão secundário).

A porcentagem de PR - padrão secundário recuperada da matriz analítica (formulação G) e passível de ser quantificada foi calculada pela equação 10, descrita no item 2.5.6. Por este cálculo, a média de recuperação do PR (padrão secundário) recuperado da matriz foi de 98,68% e de 99,15%, para os analistas 1 e 2, respectivamente. Valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL-ANVISA, 2003).

A comparação dos resultados obtidos pela mudança de analista demonstra que o método em questão pode ser considerado robusto ( $CV < 5\%$ ), pois apresentou capacidade em resistir a pequenas variações no parâmetro analítico de exatidão (BRASIL-ANVISA, 2003).

#### 5.4. – Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) da formulação líquido-cristalina G acrescida de 1% de palmitato de retinol

A avaliação de alguns parâmetros físico-químicos nos estudos de estabilidade tem provado ser muito vantajosa no desenvolvimento e na obtenção de produtos estáveis. A extrapolação dos resultados de estabilidade acelerada obtidos das amostras, em diferentes condições de armazenamento, permite prever a estabilidade para períodos de tempo prolongado de armazenamento em prateleira (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

O envelhecimento por efeito térmico é um dos métodos mais empregados para os ensaios acelerados de estabilidade da formulação (D'LEÓN, 2001), sempre, mantendo como referência, amostras na geladeira e à temperatura ambiente (ANVISA, 2004).

Tendo em vista os resultados das características físico-químicas avaliadas nos TEP, a formulação G foi escolhida como veículo do palmitato de retinol (PR) e foi submetida aos TEA. A formulação G foi designada como “G<sub>PR</sub>” após ser adicionada de 1% de PR.

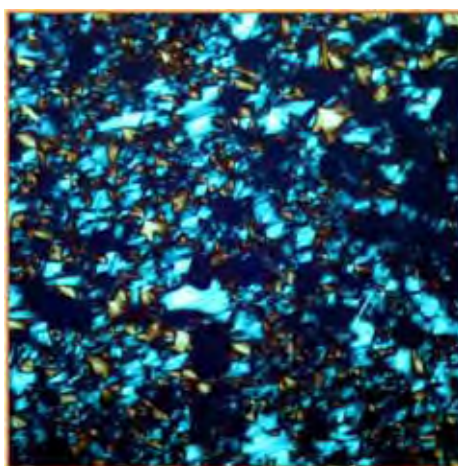


A ANVISA (2004) recomenda que os produtos devem ser armazenados em mais de uma condição de temperatura, para que se possa avaliar seu comportamento nos diversos ambientes a que se possa ser submetido. As condições de armazenamento da formulação  $G_{PR}$  contendo 1% da substância ativa compreenderam: ambiente protegida da luz ( $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ), aquecimento em estufa ( $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) e resfriamento em geladeira ( $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).

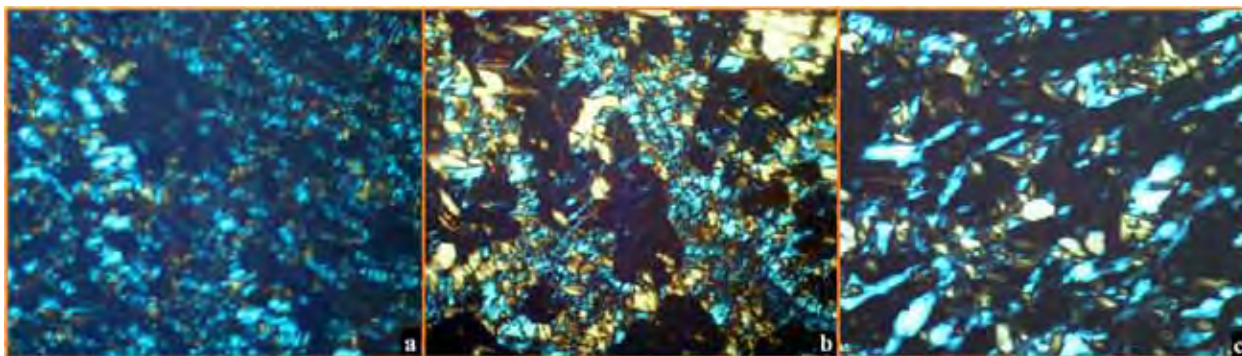
A periodicidade da avaliação das amostras pode variar conforme experiência técnica, especificações do produto, características especiais de algum componente da formulação ou sistema conservante utilizado, porém a presente pesquisa realizou as avaliações por pelo menos 90 dias, conforme indicado pela ANVISA (2004) no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Este período de avaliação foi estendido para 150 dias nas análises em microscópio de luz polarizada e nos ensaios de estabilidade química.

#### 5.4.1. – Microscopia de Luz Polarizada

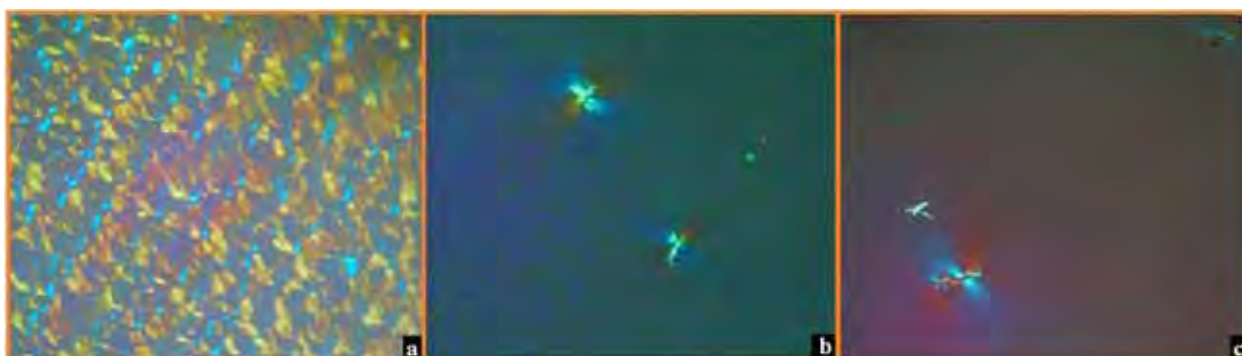
A microscopia de luz polarizada foi a técnica empregada para avaliar o arranjo de fase interna da formulação  $G_{PR}$  e acompanhar eventuais mudanças com o decorrer do tempo. As Figuras 52 a 59 exibem as fotomicrografias obtidas sob luz polarizada, da formulação  $G_{PR}$  em períodos de tempo pré-determinados, durante 150 dias de estudo do TEA.



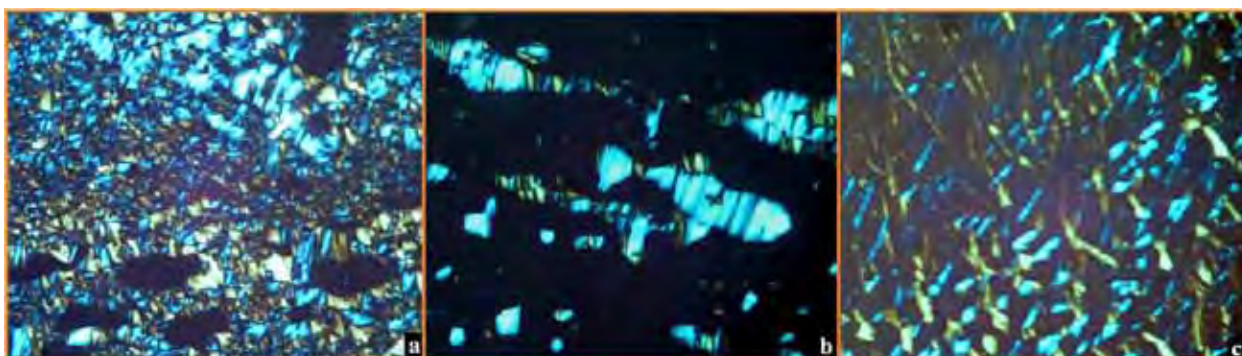
**Figura 52** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação  $G_{PR}$ , após 24 horas de manipulação mantida à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).



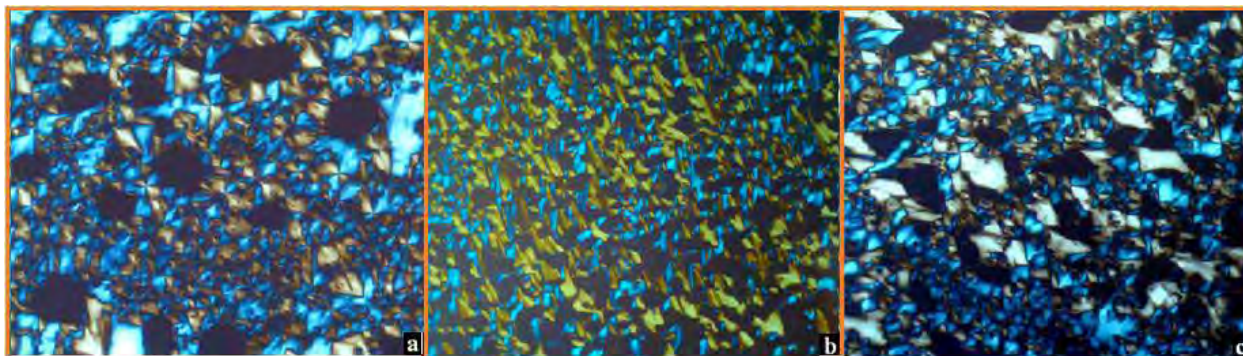
**Figura 53** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação  $G_{PR}$ , após 7 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), (b) estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e (c) geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).



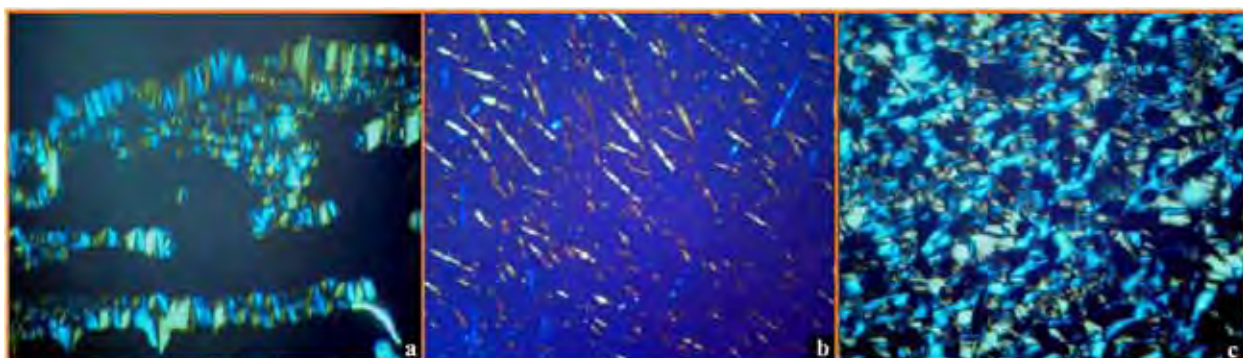
**Figura 54** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação  $G_{PR}$ , após 15 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), (b) estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e (c) geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).



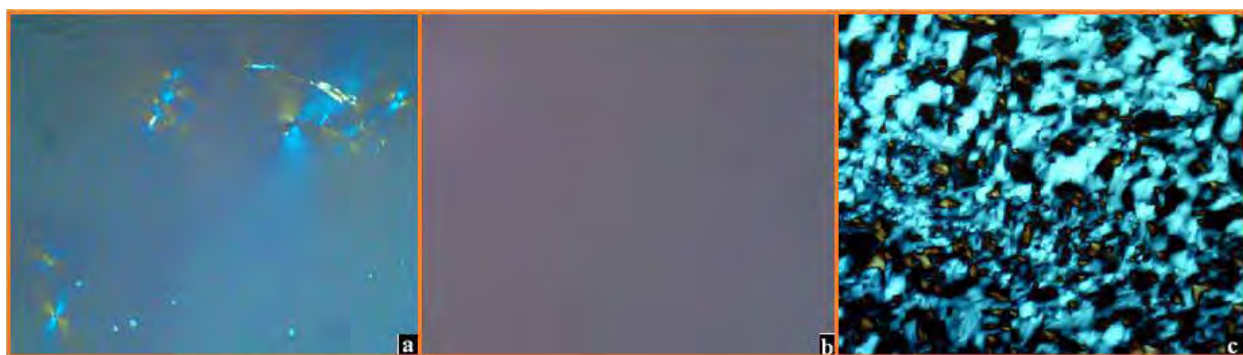
**Figura 55** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação  $G_{PR}$ , após 30 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: (a) ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), (b) estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e (c) geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).



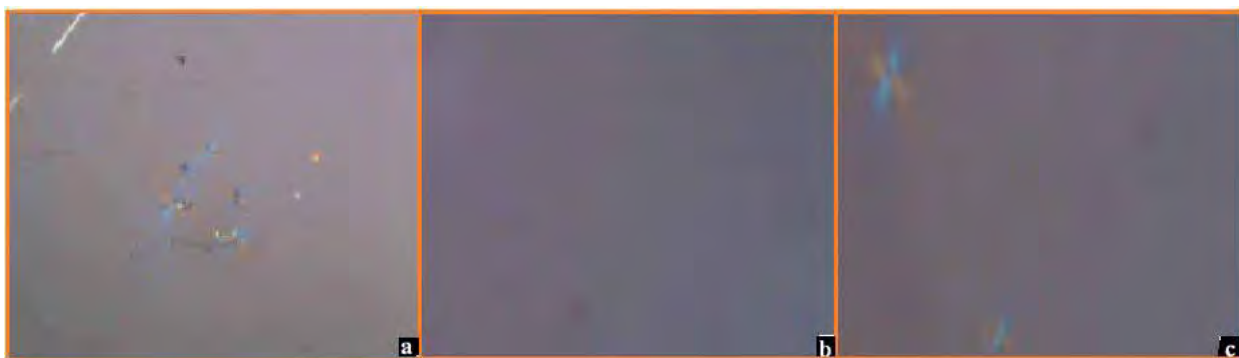
**Figura 56** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G<sub>PR</sub>, após 60 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: **(a)** ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), **(b)** estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e **(c)** geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).



**Figura 57** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G<sub>PR</sub>, após 90 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: **(a)** ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), **(b)** estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e **(c)** geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).



**Figura 58** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação G<sub>PR</sub>, após 135 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: **(a)** ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), **(b)** estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e **(c)** geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).



**Figura 59** – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada (10x) da formulação  $G_{PR}$ , após 150 dias do TEA, armazenada nas seguintes condições: **(a)** ambiente ( $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ), **(b)** estufa ( $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) e **(c)** geladeira ( $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ).

Durante os 150 dias do estudo de estabilidade acelerada, as fotomicrografias obtidas no microscópio de luz polarizada, revelaram que as amostras à  $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  mantiveram-se organizadas estruturalmente como sistema líquido cristalino de fase lamelar pela presença das cruces de malta, igualmente proposto por Schuetze & Mueller-Goymann (1992).

Comparando as fotomicrografias sob a luz polarizada da formulação G, após 24 horas de preparo, contendo ou não a substância ativa (Figuras 52 e 35, respectivamente), notou-se que a adição de palmitato de retinol à formulação G alterou a organização estrutural da mesma. Essa constatação já havia sido feita anteriormente com a análise comparativa dos diagramas ternários sem e com PR adicionado ao sistema (Figuras 23 e 25, respectivamente).

A característica predominantemente lipofílica da molécula de PR necessitou de maior quantidade de Procetyl AWS<sup>®</sup> para a formação de cristais líquidos nas formulações desenvolvidas, justificando a redução da região de SLT e ampliação da região pertencente aos SVO no diagrama de fases desenvolvido na Figura 23. Tal ocorrência justifica a ausência de formação de cristais líquidos de fase hexagonal observado na Figura 52, pois a proporção entre fase oleosa e tensoativo foi alterada acarretando o desaparecimento deste arranjo estrutural.

As fotomicrografias de luz polarizada apresentadas neste item **5.4.1**. demonstraram que a temperatura influenciou na organização estrutural da formulação  $G_{PR}$ . Nas amostras à  $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  foi possível detectar a presença de cruces de malta até 15 dias (Figura 54**b**) e nas amostras à  $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  estas estruturas foram encontradas até 90 dias após o seu preparo (Figura 57**c**).

A formação de campos escuros na análise da amostra à  $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , conforme Figuras 58 **(b)** e 59 **(b)**, indica que possivelmente os sistemas nanoestruturados deram origem a sistemas microestruturados isotrópicos.

#### 5.4.2. – Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Durante os TEP, a variação entre os valores de pH da formulação G (Tabela 15, item 5.2.3.) demonstrou que as medidas pouco variaram e que ainda manteve-se compatível com o pH fisiológico da pele dentro da faixa de valores que variou. Uma vez que o TEP indicou que não há incompatibilidades entre os ingredientes da formulação, as avaliações realizadas no TEA buscam demonstrar que a G<sub>PR</sub> manterá sua estabilidade, de modo a assegurar a eficácia terapêutica do palmitato de retinol.

A Tabela 34 apresenta os valores das medidas de pH realizadas em períodos de tempo pré-determinados, durante os 135 dias de estudo do TEA.

**Tabela 34** – Resultados da determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da formulação G<sub>PR</sub>, em tempos pré-estabelecidos, durante 135 dias de TEA.

	Tempo (dias) das determinações de pH							$\Delta$ pH
	1	7	15	30	60	90	135	
<b>Ambiente</b>	5,85	5,87	5,84	5,89	5,83	5,61	5,10	0,75
<b>Estufa</b>	5,85	5,77	5,87	5,83	5,77	5,29	5,26	0,59
<b>Geladeira</b>	5,85	5,83	5,64	5,57	5,51	5,58	5,52	0,33

A avaliação desse parâmetro demonstrou que o produto dermocosmético estudado manteve-se estável pelo período de tempo estudado, nas três condições de armazenamento.

#### 5.4.3. – Determinação da Condutividade Eletrolítica (C.E.)

Os resultados das determinações de condutividade eletrolítica ( $\mu$ S/cm) do dermocosmético estudado estão apresentados na Tabela 35.

**Tabela 35** – Resultados da determinação da condutividade eletrolítica ( $\mu$ S/cm) da formulação G<sub>PR</sub>, em tempos pré-estabelecidos, durante 135 dias de TEA.

	Tempo (dias) das determinações de C.E. em $\mu$ S/cm							C.V. (%)
	1	7	15	30	60	90	135	
<b>Ambiente</b>	5,29	4,51	4,14	3,67	3,27	2,89	2,40	26,52
<b>Estufa</b>	5,29	4,57	4,23	3,22	3,18	2,77	2,26	29,59
<b>Geladeira</b>	5,29	4,52	4,33	3,81	2,96	2,55	1,88	33,35

É possível concluir que durante os 135 dias de estudo, a formulação manteve o predomínio de lipofilia na fase contínua. Provavelmente, a queda nas medidas de condutividade eletrolítica das amostras, nas três condições de armazenamento, reflete a redução de fase aquosa nas mesmas.

Ainda que os coeficientes de variação tenham sido elevados, isso não reflete grandes alterações na composição do sistema, uma vez que os valores numéricos são baixos e pequenas variações correspondem à grandes coeficientes de variação.

#### 5.4.4. – Determinação do Índice de Refração (I.R.)

Os resultados das determinações do índice de refração do dermocosmético estão expostos na Tabela 36.

**Tabela 36** – Resultados da determinação do índice de refração da G<sub>PR</sub>, em tempos pré-estabelecidos, durante 135 dias de TEA.

	Tempo (dias) das determinações do I.R.							C.V. (%)
	1	7	15	30	60	90	135	
<b>Ambiente</b>	1,435	1,435	1,435	1,435	1,435	1,435	1,435	0
<b>Estufa</b>	1,435	1,436	1,435	1,436	1,434	1,436	1,434	0,063
<b>Geladeira</b>	1,435	1,436	1,434	1,435	1,435	1,435	1,434	0,048

Os valores do índice de refração da água, do Procetyl AWS<sup>®</sup> e do silicone DC 5329<sup>®</sup> são, respectivamente, 1,333, 1,457 e 1,432.

Quantitativamente, a formulação G é composta por 1% de palmitato de retinol, 59% de silicone DC 5329, 30% de tensoativo PPG-5-ceteth-20 e 10% de água. Os resultados demonstram que o índice de refração do dermocosmético, independente da condição de armazenamento, manteve-se muito próximo do índice de refração do seu componente majoritário, o que indica que o sistema manteve estruturalmente a identidade química dos componentes presentes.

#### 5.4.5. – Determinação do Comportamento Reológico

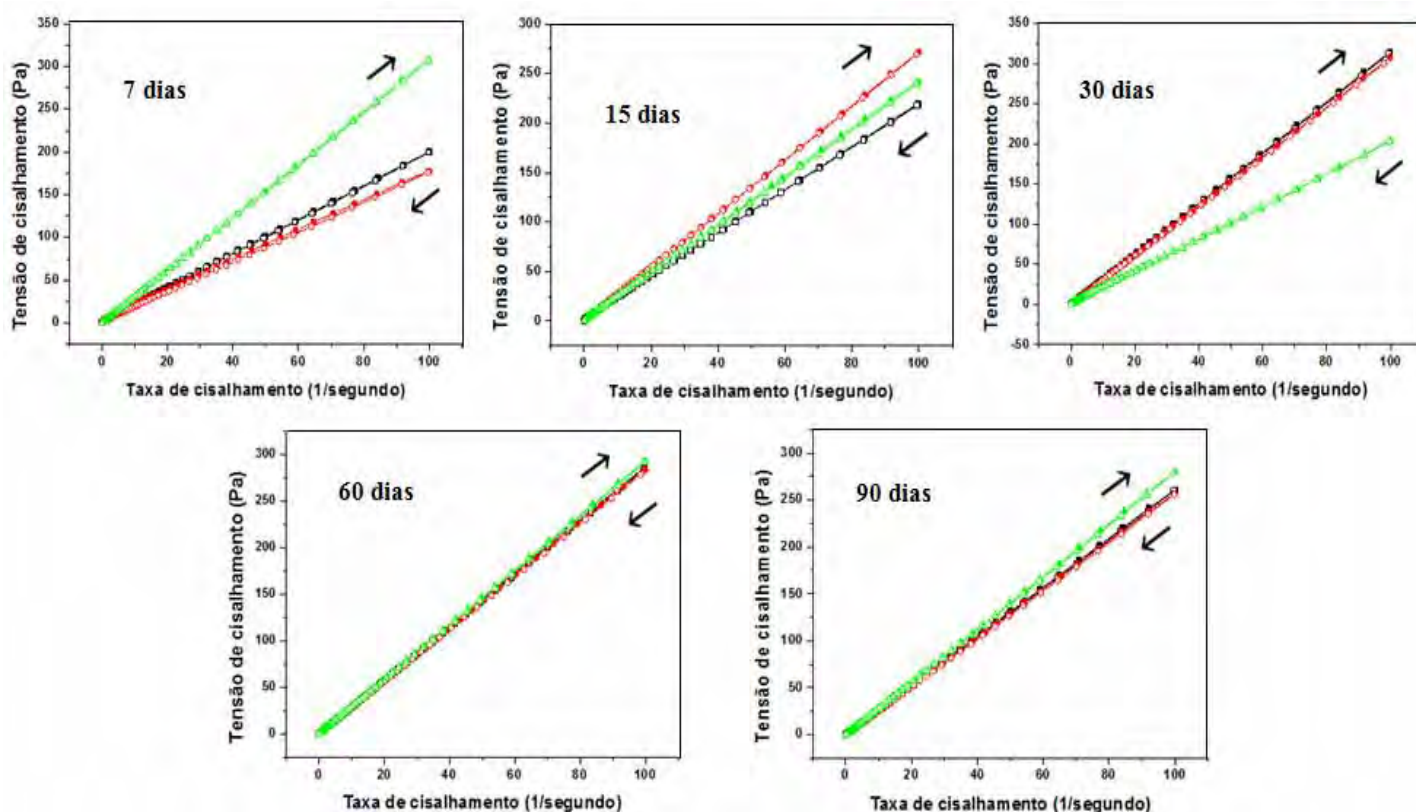
As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas no desenvolvimento de produtos para aplicação tópica. Estudos sobre reologia de formulações de uso tópico têm se tornado cada vez mais frequentes nas pesquisas realizadas pela comunidade

científica, até mesmo porque hoje nota-se que a estabilidade física de uma formulação é fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia da mesma (CÔRREA *et al.*, 2005).

Amostras da formulação  $G_{PR}$ , armazenadas à  $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  (geladeira),  $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  (ambiente) e  $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  (estufa), durante 90 dias do TEA, avaliadas em períodos de tempo pré estabelecidos, tiveram seu comportamento reológico estudado através dos seguintes ensaios: (1) medidas de tensão de cisalhamento por taxa de cisalhamento no estado estacionário; (2) medidas dinâmicas (oscilatórias) e (3) medidas de fluência e relaxação (*creep and recovery*), como apresentados a seguir.

#### 5.4.5.1. – Ensaios de Escoamento e Determinação da Viscosidade

A avaliação temporal das curvas de escoamento (em 7, 15, 30, 60 e 90 dias) da formulação  $G_{PR}$ , descritas por tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ), está representada nos reogramas da Figura 60.



**Figura 60** – Reograma da curva de escoamento da formulação  $G_{PR}$ , após 7, 15, 30, 60 e 90 dias, armazenada à:  $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  ( $\blacktriangle$ ),  $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  ( $\blacksquare$ ) e  $40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  ( $\bullet$ ).

O modelo matemático da lei da potência foi utilizado para avaliar as propriedades de escoamento da formulação  $G_{PR}$ , conforme os resultados apresentados nas Tabelas 37, 38 e 39.

**Tabela 37** – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento da formulação  $G_{PR}$ , armazenada à  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , nos TEA.

Tempo (dias)	Índice de consistência $k$ (Pa.s)	Índice de escoamento $n$	Coefficiente de correlação $R^2$	Tipo de escoamento
7	2,83	0,99	1,00	Newtoniano
15	2,33	0,99	1,00	Newtoniano
30	2,07	0,99	1,00	Newtoniano
60	2,91	1,00	1,00	Newtoniano
90	2,61	1,01	1,00	Newtoniano

**Tabela 38** – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento da  $G_{PR}$ , armazenada à  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , nos TEA.

Tempo (dias)	Índice de consistência $k$ (Pa.s)	Índice de escoamento $n$	Coefficiente de correlação $R^2$	Tipo de escoamento
7	2,49	0,95	1,00	Pseudoplástico
15	2,56	0,96	1,00	Pseudoplástico
30	3,12	1,00	1,00	Newtoniano
60	2,86	1,00	1,00	Newtoniano
90	2,56	1,00	1,00	Newtoniano

**Tabela 39** – Resultados do índice de consistência e do índice de escoamento obtidos pelo modelo matemático da lei da potência e classificação do comportamento de escoamento da formulação  $G_{PR}$ , armazenada à  $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , nos TEA.

Tempo (dias)	Índice de consistência $k$ (Pa.s)	Índice de escoamento $n$	Coefficiente de correlação $R^2$	Tipo de escoamento
7	2,71	0,91	1,00	Pseudoplástico
15	2,90	1,00	1,00	Newtoniano
30	3,05	1,00	1,00	Newtoniano
60	2,75	1,00	1,00	Newtoniano
90	2,56	1,00	1,00	Newtoniano



Nas três condições de acondicionamento das amostras e em todos os tempos testados, o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) próximo a 1,0 evidencia um ajuste ideal dos dados experimentais de tensão e taxa de cisalhamento para a determinação dos índices  $k$  e  $n$ .

A partir da análise dos resultados apresentados nas Tabelas 37, 38 e 39, nota-se que após 15 dias, o escoamento da formulação  $G_{PR}$  obedeceu a lei de Newton, independente da temperatura de armazenamento.

Os valores de viscosidade (Pa.s) das amostras foram determinados no ponto de máxima velocidade de cisalhamento ( $s^{-1}$ ) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 40.

**Tabela 40** – Média da triplicata da viscosidade aparente obtida a partir da curva de viscosidade da formulação  $G_{PR}$ , em diferentes temperaturas de armazenamento.

Tempo (dias)	Viscosidade (Pa.s)		
	5,0 ± 2,0°C	25,0 ± 2,0°C	40,0 ± 2,0°C
7	2,87	2,00	1,70
15	2,34	2,57	2,85
30	2,02	3,15	3,03
60	2,94	2,86	2,75
90	2,79	2,10	2,56

Uma vez que a formulação apresenta uma consistência capaz de ser aplicada sobre a pele, sem escorrer, a viscosidade constante neste tipo de escoamento denota que o sistema não é desestruturado pela taxa de cisalhamento aplicada

#### 5.4.5.2. – Ensaio dinâmico (oscilatório)

Os testes oscilatórios são métodos dinâmicos para determinar as propriedades viscoelásticas do produto testado em seu estado fundamental reológico sem romper a sua estrutura estática. A determinação da viscoelasticidade, por meio dos parâmetros do módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda ( $G''$ ), é uma importante medida reológica para oferecer informações sobre a aparência das amostras (LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2002).

Ao executar os testes de medida oscilatória é preciso determinar a região denominada de viscoelasticidade linear definida como a região acima de um valor de tensão em que as medidas do módulo complexo  $G^*$  independem da tensão aplicada em função de uma frequência constante (LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2002). A região de viscoelasticidade linear foi determinada

pelos testes de varredura de tensão com frequência fixa de 1,0 Hz e o valor de 0,5 Pa foi escolhido como a amplitude de tensão de cisalhamento para os testes subsequentes, uma vez que nesta tensão de cisalhamento o sistema testado encontra-se na região de viscoelasticidade linear.

O teste oscilatório de varredura de frequência foi realizado para obter informações sobre o comportamento elástico (módulo de armazenamento;  $G'$ ) e viscoso (módulo de perda;  $G''$ ) do sistema investigado (vide Tabela 41). O teste foi executado com frequências variáveis de 0,1 a 5,0 Hz mantendo constante a amplitude de tensão de cisalhamento em 0,5 Pa.

**Tabela 41** – Valores do módulo elástico e do módulo viscoso da formulação  $G_{PR}$ , em períodos de tempo pré-determinados no TEA, em diferentes temperaturas de armazenamento.

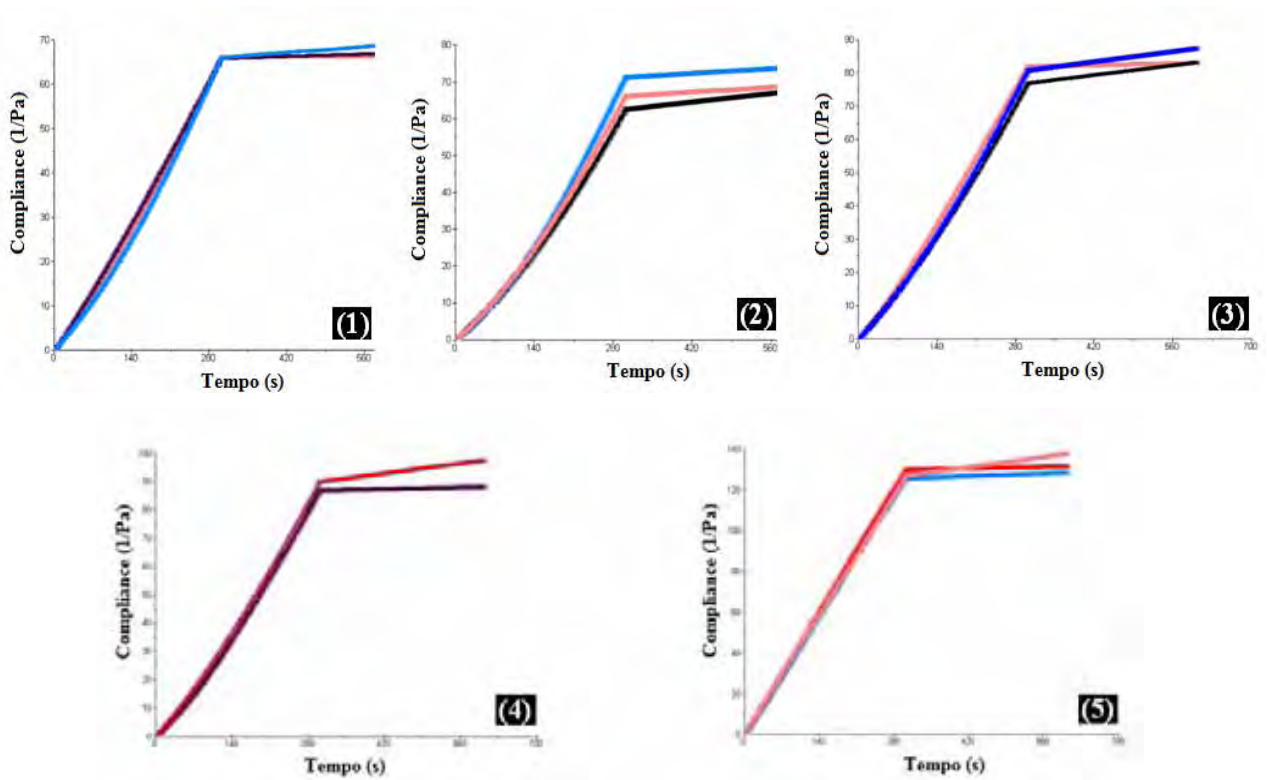
Tempo (dias)	$G'$ (módulo elástico)			$G''$ (módulo viscoso)		
	$25,0 \pm 2,0$ °C	$40,0 \pm 2,0$ °C	$5,0 \pm 2,0$ °C	$25,0 \pm 2,0$ °C	$40,0 \pm 2,0$ °C	$5,0 \pm 2,0$ °C
7	32,76	34,06	3,64	199,57	202,10	138,57
15	10,13	8,01	14,25	153,97	137,73	160,83
30	10,97	1,24	15,64	93,93	98,00	139,07
60	9,99	6,58	3,53	83,53	99,50	91,58
90	13,86	13,57	12,56	74,26	73,14	76,11

Os testes oscilatórios são realizados para estudar as propriedades viscoelásticas da amostra. Conforme os resultados apresentados na Tabela 41, o predomínio do comportamento viscoso sobre o elástico ( $G'' > G'$ ) demonstra que o escoamento do sistema estudado possui uma rede estrutural pouco consolidada, uma vez que baixos valores de  $G'$  e altos valores de  $G''$  indicam que o material possui baixa capacidade em armazenar a energia fornecida para retornar ao seu estado original, dissipando esta energia na forma de calor e apresentando recuperação pequena ou quase nula.

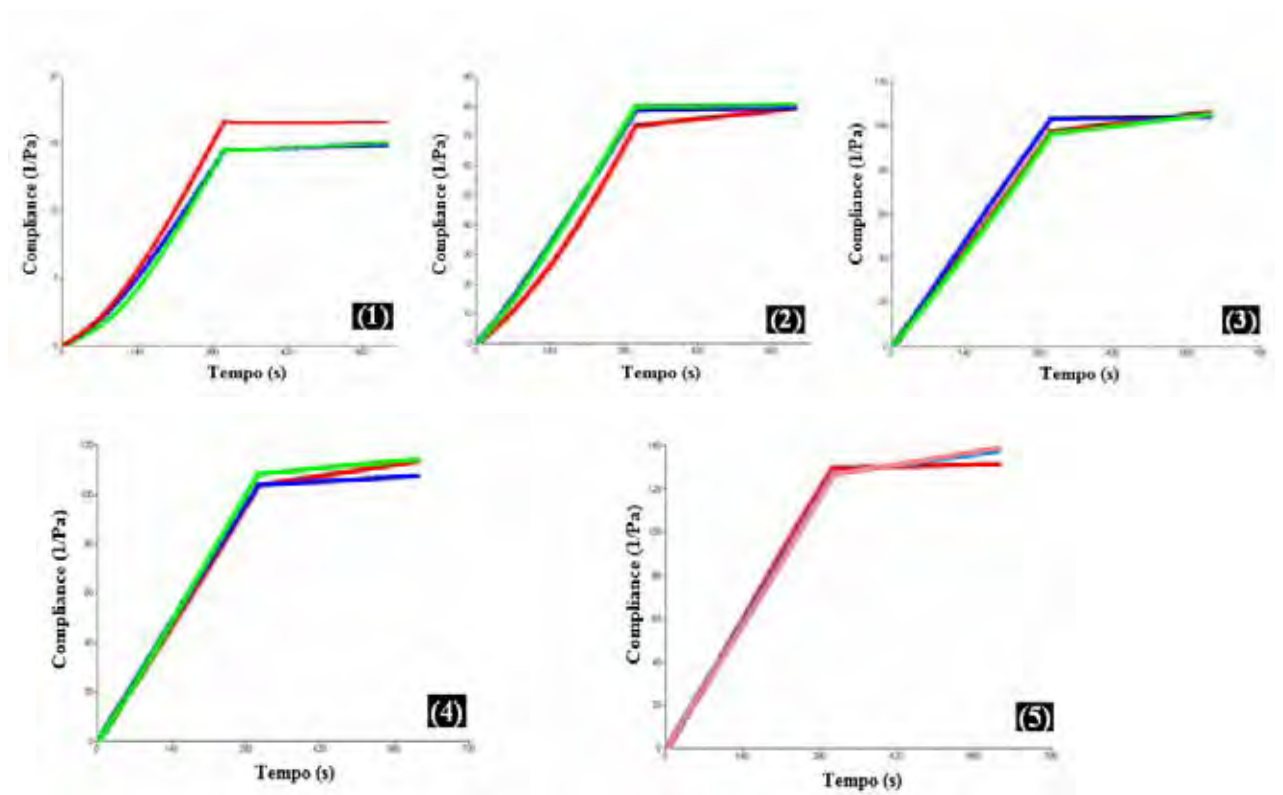
#### 5.4.5.3. – Ensaio de Fluência e Relaxação

Os ensaios de fluência e relaxação são experimentos realizados com a aplicação de uma tensão constante (creep) no sistema por um período de tempo. O inverso da tensão é chamado de compliância  $J$  ( $\text{Pa}^{-1}$ ) (TADROS, 2004).

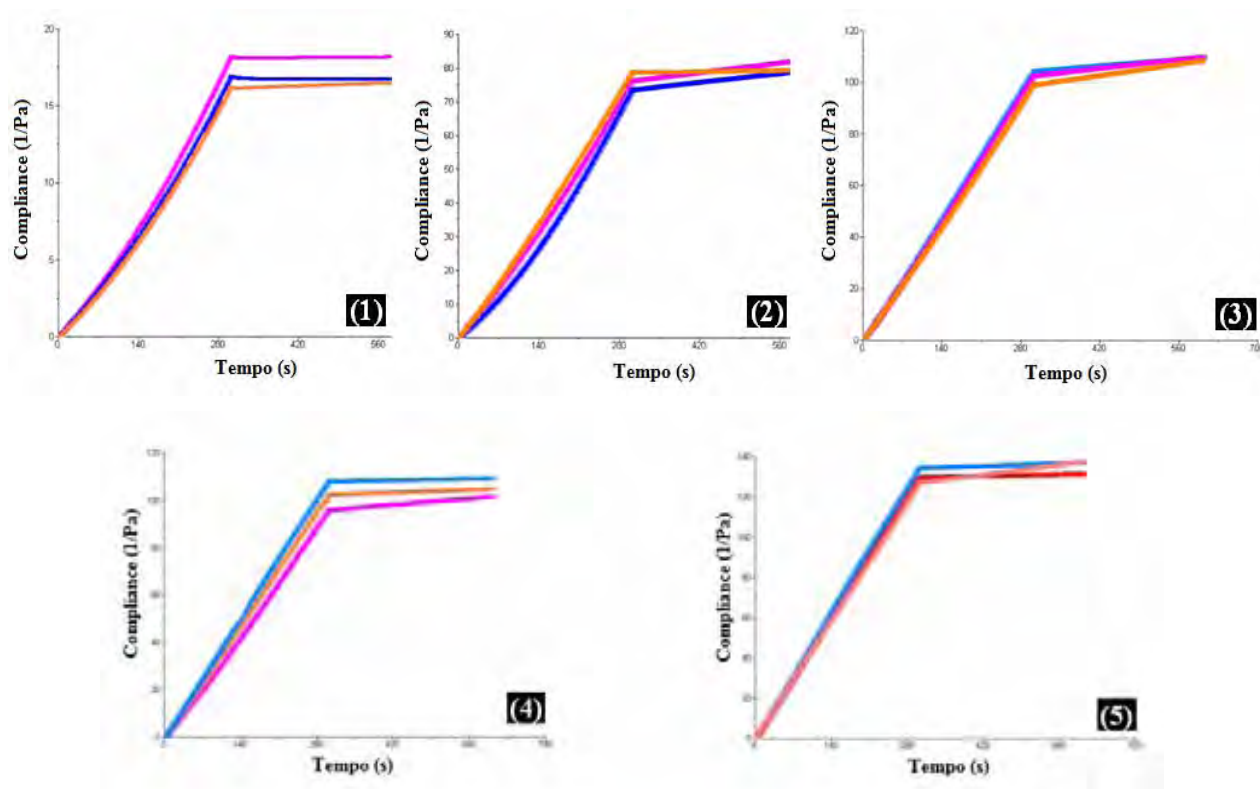
Os reogramas da formulação  $G_{PR}$ , obtidos pelos ensaios de fluência e relaxação, estão representados nas Figuras 61 a 63 para as condições de armazenamento à  $5,0 \pm 2,0$  °C,  $25,0 \pm 2,0$  °C e  $40,0 \pm 2,0$  °C, respectivamente.



**Figura 61** – Reograma das curvas de fluência e relaxação da formulação  $G_{PR}$ , armazenada à  $5,0 \pm 2,0$  °C, nos tempos: (1) 7 dias; (2) 15 dias; (3) 30 dias; (4) 60 dias; (5) 90 dias.



**Figura 62** – Reograma das curvas de fluência e relaxação da formulação  $G_{PR}$ , armazenada à  $25,0 \pm 2,0$  °C, nos tempos: (1) 7 dias; (2) 15 dias; (3) 30 dias; (4) 60 dias; (5) 90 dias.



**Figura 63** – Reograma das curvas de fluência e relaxação da formulação  $G_{PR}$ , armazenada à  $40,0 \pm 2,0$  °C, nos tempos: (1) 7 dias; (2) 15 dias; (3) 30 dias; (4) 60 dias; (5) 90 dias.

A análise das Figuras 61 a 63 demonstrou que com a aplicação de uma tensão constante de 0,5 Pa, a energia de deformação foi dissipada para o ambiente na forma de calor e as amostras não recuperaram sua posição original quando as forças externas foram removidas, apresentando perfil de fluidos Newtonianos. O aumento da compliância com o passar do tempo está relacionado com a diminuição de  $G'$  resultando na capacidade pequena ou quase nula do material de recuperar a deformação sofrida.

#### 5.4.6. – Estabilidade Química do PR

A estabilidade química do PR ( $\mu\text{g/mL}$ ) adicionado ao sistema líquido-cristalino foi monitorada no comprimento de onda de 327 nm utilizando-se o método analítico espectrofotométrico validado. Os valores de absorbância, determinados em triplicata, para as amostras mantidas na geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), foram medidos em períodos de tempo pré-determinados, como estão indicados nas Tabelas 42, 43 e 44, respectivamente.

**Tabela 42** – Valores de absorvância em comprimento de onda de 327 nm, obtidos na quantificação analítica do PR a partir de sua matriz, em períodos de tempo pré-determinados, durante os TEA ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
01	0,66167	0,67571	0,67865	$0,67201 \pm 0,0091$	1,350
07	0,65871	0,65673	0,65714	$0,65753 \pm 0,0010$	0,159
15	0,64642	0,65195	0,65291	$0,65043 \pm 0,0035$	0,538
30	0,64591	0,64596	0,64564	$0,64584 \pm 0,0002$	0,027
60	0,64388	0,64456	0,64502	$0,64449 \pm 0,0006$	0,089
90	0,63282	0,63293	0,63255	$0,63277 \pm 0,0002$	0,031
135	0,60138	0,60051	0,60103	$0,60097 \pm 0,0004$	0,073
150	0,57401	0,57580	0,57622	$0,57534 \pm 0,0012$	0,204

**Tabela 43** – Valores de absorvância em comprimento de onda de 327 nm, obtidos na quantificação analítica do PR a partir de sua matriz, em períodos de tempo pré-determinados, durante os TEA ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
01	0,66167	0,67571	0,67865	$0,67201 \pm 0,0091$	1,350
07	0,63269	0,63216	0,63265	$0,63250 \pm 0,0003$	0,046
15	0,62952	0,62922	0,62927	$0,62934 \pm 0,0002$	0,026
30	0,61908	0,61916	0,61936	$0,61920 \pm 0,0001$	0,023
60	0,61799	0,61785	0,61713	$0,61766 \pm 0,0005$	0,075
90	0,61539	0,61469	0,61465	$0,61491 \pm 0,0004$	0,067
135	0,61245	0,61252	0,61268	$0,61255 \pm 0,0001$	0,019
150	0,55401	0,55440	0,55439	$0,55427 \pm 0,0002$	0,040

**Tabela 44** – Valores de absorvância em comprimento de onda de 327 nm, obtidos na quantificação analítica do PR a partir de sua matriz, em períodos de tempo pré-determinados, durante os TEA ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
01	0,66167	0,67571	0,67865	$0,67201 \pm 0,0091$	1,350
07	0,63234	0,63264	0,63229	$0,63242 \pm 0,0002$	0,030
15	0,59267	0,59280	0,59230	$0,59259 \pm 0,0002$	0,044
30	0,55920	0,55953	0,55928	$0,55934 \pm 0,0002$	0,031
60	0,55652	0,55896	0,56076	$0,55875 \pm 0,0021$	0,381
90	0,52560	0,52595	0,52559	$0,52571 \pm 0,0002$	0,039
135	0,52026	0,51996	0,52001	$0,52007 \pm 0,0002$	0,031
150	0,39400	0,39358	0,39361	$0,39373 \pm 0,0002$	0,059

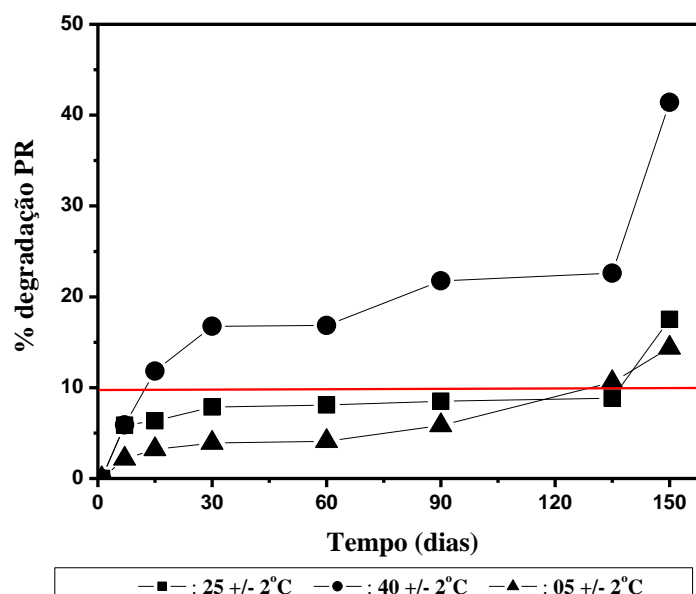
A média dos valores de absorvância determinada por medidas em triplicata, nas diferentes condições de armazenamento e em diferentes tempos, foi convertida para a correspondente concentração de PR (em  $\mu\text{g/mL}$ ), utilizando a equação de reta do intervalo linear de trabalho:  $y = 0,05399x - 0,000870137$  (Figura 51, item 5.3.3.). Os resultados encontram-se na Tabela 45.

**Tabela 45** – Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) do PR em períodos de tempo pré-determinados, nas condições de armazenamento na temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), na estufa ( $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e na geladeira ( $05,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	Geladeira ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )		Ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )		Estufa ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ )	
		%D		%D		%D
01	12,448	---	12,448	---	12,448	---
07	12,180	2,155	11,716	5,879	11,715	5,891
15	12,048	3,211	11,658	6,349	10,977	11,812
30	11,963	3,894	11,470	7,858	10,361	16,765
60	11,938	4,095	11,441	8,087	10,350	16,853
90	11,721	5,838	11,390	8,496	9,738	21,769
135	11,132	10,570	11,347	8,847	9,634	22,608
150	10,657	14,384	10,267	17,519	7,294	41,407

\* % D = porcentagem de degradação.

A Figura 64 apresenta as curvas da porcentagem de degradação do PR presente na formulação  $G_{PR}$ , em função do tempo (em dias), para as três condições de armazenamento das amostras.



**Figura 64** – Porcentagem de degradação do PR presente na formulação  $G_{PR}$  em função do tempo, nas diferentes condições de armazenamento.

Lachman; Lieberman; Kanig (2001) relatam que a validade de uma substância ativa se refere ao tempo no qual a queda da sua concentração inicial não excedeu a 10% quando mantida em determinadas condições de armazenamento, previamente estabelecidas. A partir daí, a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) do PR remanescente no sistema líquido cristalino foi acompanhada em

função do tempo, variando as condições de armazenamento, de modo a elucidar a influência da temperatura na decomposição da substância ativa de interesse.

A Farmacopéia Européia 5.0 (2005) recomenda que outros comprimentos de onda (300, 350 e 370 nm) sejam utilizados para monitorar se a presença de outras substâncias não estão interferindo na quantificação do PR.

Os resultados da relação da absorvância do PR extraído na matriz no TEA nos comprimentos de onda de 300, 350 e 370 nm com a absorvância medida no comprimento de onda de 326 nm, em diferentes condições de armazenamento, estão apresentados nas Tabelas 46 à 48.

**Tabela 46** – Relação entre os valores da média das absorvâncias no comprimento de onda de 300, 350 e 370 nm pelo valor da média de absorvância no comprimento de onda de 326nm, no TEA ( $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	$A_{300}/A_{326}$	$A_{300}/A_{326}$ < <b>0,593</b>	$A_{350}/A_{326}$	$A_{350}/A_{326}$ < <b>0,537</b>	$A_{370}/A_{326}$	$A_{370}/A_{326}$ < <b>0,142</b>
<b>1</b>	0,5864	Sim	0,5273	Sim	0,1414	Sim
<b>7</b>	0,5873	Sim	0,5347	Sim	0,1302	Sim
<b>15</b>	0,6053	Sim	0,5414	Não	0,1476	Não
<b>30</b>	0,5891	Sim	0,5343	Sim	0,1316	Sim
<b>60</b>	0,5944	Sim	0,5363	Sim	0,1376	Sim
<b>90</b>	0,5911	Sim	0,5349	Sim	0,1331	Sim
<b>135</b>	0,6172	Sim	0,5092	Sim	0,1035	Sim
<b>150</b>	0,5894	Sim	0,5318	Sim	0,1297	Sim

**Tabela 47** – Relação entre os valores da média das absorvâncias no comprimento de onda de 300, 350 e 370 nm pelo valor da média de absorvância no comprimento de onda de 326nm, no TEA ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	$A_{300}/A_{326}$	$A_{300}/A_{326}$ < <b>0,593</b>	$A_{350}/A_{326}$	$A_{350}/A_{326}$ < <b>0,537</b>	$A_{370}/A_{326}$	$A_{370}/A_{326}$ < <b>0,142</b>
<b>1</b>	0,5864	Sim	0,5273	Sim	0,1414	Sim
<b>7</b>	0,6327	Não	0,5331	Sim	0,1490	Não
<b>15</b>	0,6018	Não	0,5359	Sim	0,1394	Sim
<b>30</b>	0,5895	Sim	0,5376	Sim	0,1367	Sim
<b>60</b>	0,5902	Sim	0,5347	Sim	0,1330	Sim
<b>90</b>	0,5574	Sim	0,5194	Sim	0,1011	Sim
<b>135</b>	0,5835	Sim	0,5312	Sim	0,1259	Sim
<b>150</b>	0,5625	Sim	0,4950	Sim	0,0614	Sim

**Tabela 48** – Relação entre os valores da média das absorvâncias no comprimento de onda de 300, 350 e 370 nm pelo valor da média de absorvância no comprimento de onda de 326nm, no TEA ( $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	$A_{300}/A_{326}$	$A_{300}/A_{326}$ < <b>0,593</b>	$A_{350}/A_{326}$	$A_{350}/A_{326}$ < <b>0,537</b>	$A_{370}/A_{326}$	$A_{370}/A_{326}$ < <b>0,142</b>
<b>1</b>	0,5864	Sim	0,5273	Sim	0,1414	Sim
<b>7</b>	0,5821	Sim	0,5369	Sim	0,1357	Sim
<b>15</b>	0,5947	Sim	0,5436	Sim	0,1485	Não
<b>30</b>	0,6093	Não	0,5609	Sim	0,1775	Não
<b>60</b>	0,6258	Não	0,5627	Sim	0,1849	Não
<b>90</b>	0,6418	Não	0,5372	Sim	0,1533	Não
<b>135</b>	0,6238	Não	0,5672	Sim	0,1923	Não
<b>150</b>	0,5872	Sim	0,5385	Sim	0,1399	Sim

A análise das Tabelas 46, 47 e 48 permite concluir que as amostras armazenadas à  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  apresentaram as menores interferências na quantificação do PR em comparação com as outras duas condições de armazenamento. Sendo assim, o prazo de validade do PR no sistema nanoestruturado ao qual foi adicionado foi considerado entre 135 e 150 dias à  $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , por ser o período de tempo em que a diminuição de teor do princípio ativo foi menor do que 10% da concentração inicial na formulação estudada (de acordo com os resultados da Tabela 45).

## 5.5. – Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* do palmitato de retinol

### 5.5.1. – Determinação da atividade antioxidante *in vitro* do palmitato de retinol (PR) e do ácido retinóico (AR)

A metodologia *in vitro* utilizada para medir a atividade antioxidante do palmitato de retinol (PR) e do ácido retinóico (AR) consistiu em avaliar a capacidade das substâncias testadas em reduzir o radical livre de DPPH<sup>\*</sup> (2,2,-difênil-1-picril-hidrazila) de coloração púrpura para o composto 2,2,-difênil-1-picril-hidrazina de coloração amarela.

A redução do radical livre de DPPH no meio reacional para a formação do composto de coloração amarela trouxe conseqüente desaparecimento da absorção em 517nm, conforme os dados apresentados na Tabelas 49 e 50.



**Tabela 49** – Média dos valores de absorvância ( $\lambda = 517$  nm) obtidos pela reação de redução do radical DPPH<sup>•</sup> pelo palmitato de retinol (PR).

Número da Amostra	Solução (1:100) de PR ( $\mu\text{L}$ )	[PR] (mg/mL)	Média da Abs $\pm$ DP	% Captura de DPPH*
1	---	---	0,684 $\pm$ 0,006	---
2	20	0,22	0,684 $\pm$ 0,003	0
3	40	0,44	0,678 $\pm$ 0,003	0,877
4	60	0,67	0,670 $\pm$ 0,006	1,535
5	80	0,89	0,654 $\pm$ 0,003	4,386
6	90	1,00	0,628 $\pm$ 0,001	8,187
7	100	1,11	0,605 $\pm$ 0,006	11,550
8	120	1,33	0,555 $\pm$ 0,005	18,786
9	140	1,56	0,526 $\pm$ 0,001	23,099
10	160	1,78	0,503 $\pm$ 0,005	26,535

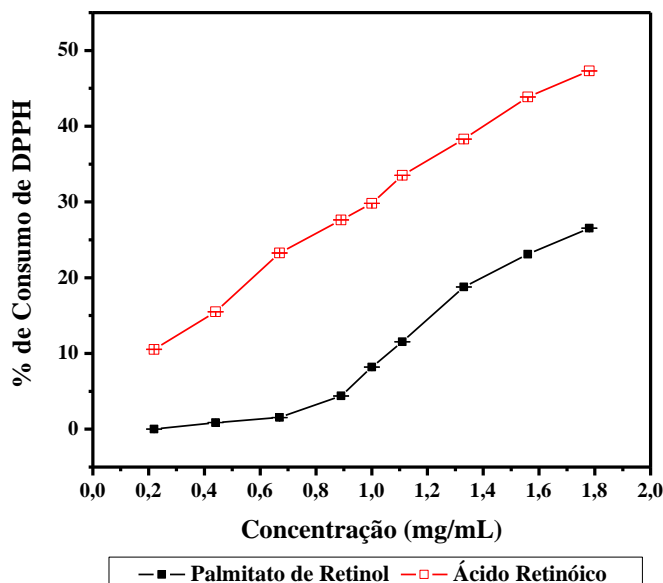
\* % captura de DPPH = % de atividade antioxidante do princípio ativo.

**Tabela 50** – Média dos valores de absorvância ( $\lambda = 517$  nm) obtidos pela reação de redução do radical DPPH<sup>•</sup> pelo ácido retinóico (AR).

Número da Amostra	Solução (1:100) de PR ( $\mu\text{L}$ )	[AR] (mg/mL)	Média da Abs $\pm$ DP	% Captura de DPPH*
1	---	---	0,684 $\pm$ 0,006	---
2	20	0,22	0,612 $\pm$ 0,018	10,526
3	40	0,44	0,578 $\pm$ 0,006	15,497
4	60	0,67	0,526 $\pm$ 0,011	23,173
5	80	0,89	0,495 $\pm$ 0,006	27,632
6	90	1,00	0,480 $\pm$ 0,006	29,825
7	100	1,11	0,448 $\pm$ 0,001	34,503
8	120	1,33	0,422 $\pm$ 0,003	38,304
9	140	1,56	0,384 $\pm$ 0,003	43,860
10	160	1,78	0,361 $\pm$ 0,007	47,295

\* % captura de DPPH = % de atividade antioxidante do princípio ativo.

Analisando-se os resultados obtidos deduz-se que o consumo de aproximadamente 23% do radical DPPH necessitou de uma concentração 2,33 vezes maior de palmitato de retinol em relação ao ácido retinóico. A Figura 65 ilustra graficamente a porcentagem de atividade antioxidante *in vitro* em função da concentração (mg/mL) dos princípios ativos testados devido à redução de DPPH.



**Figura 65** – Determinação da porcentagem de inibição do radical DPPH<sup>\*</sup> reduzido em função da concentração (mg/mL) dos princípios ativos testados.

Ainda que a atividade antioxidante do palmitato de retinol seja inferior à do ácido retinóico (como visto na Figura 65), sabe-se que a ação tópica do primeiro está relacionada com a clivagem enzimática de sua ligação éster pelas enzimas estearases da pele, convertendo-o no ácido retinóico (BOLLAG, 1983; TANG & RUSSELL, 1991; SORG *et al.*, 2006), além de sua baixa atividade irritante comparada ao seu precursor (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2007).

Como já comentado anteriormente, no item 2.2., a propriedade antioxidante dos retinóides os tornam capazes de evitarem alterações dermo-epidérmicas específicas na pele, ressaltando a importância de usá-los topicamente no combate aos danos oxidativos causados pelos radicais livres (LUPO, 2001; MAIA CAMPOS, 2006). Além disso, trazem inúmeros benefícios em nível histológico para a pele fotoenvelhecida, como: aumento na espessura da epiderme e derme, compactação do estrato córneo e maior produção de colágeno tipo I e III nas papilas dérmicas (VARANI *et al.*, 2000; JOUANDEAUD *et al.*, 2004; LEONARDI, 2004; FU *et al.*, 2007; DARLENSKI; SURBER; FLUHR, 2010; TIERNEY & HANKE, 2010).

### 5.5.2. – Determinação da atividade antioxidante *in vitro* das formulações G<sub>PR</sub> e I<sub>PR</sub> contendo 1% de palmitato de retinol

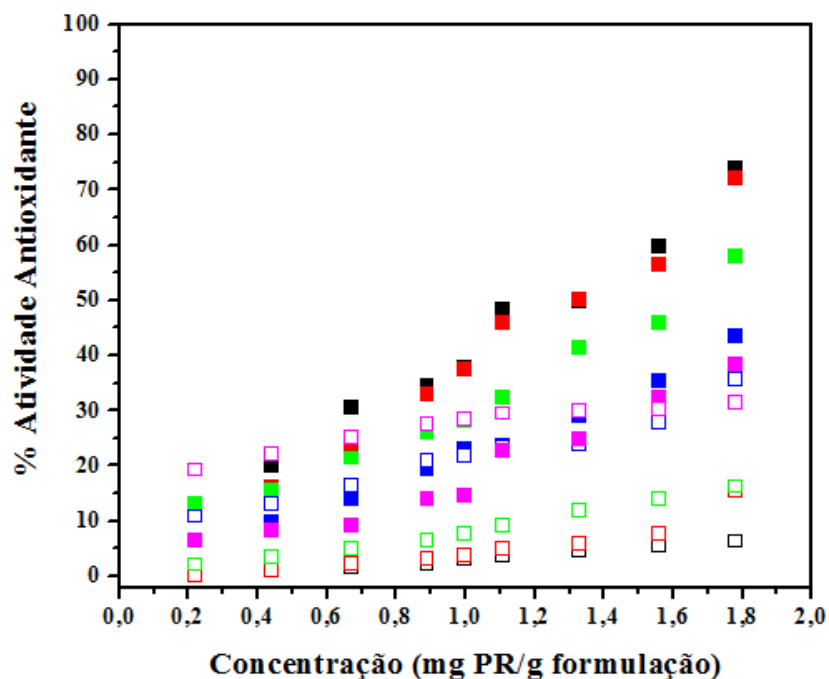
Na Tabela 51 encontram-se os resultados da atividade antioxidante *in vitro* das formulações G e I, contendo, ou não, 1% de palmitato de retinol, durante 30 dias de estudo,

avaliadas em períodos de tempo pré-estabelecidos. As amostras foram preparadas conforme composição indicada na Tabela 12, item 4.2.5.3.

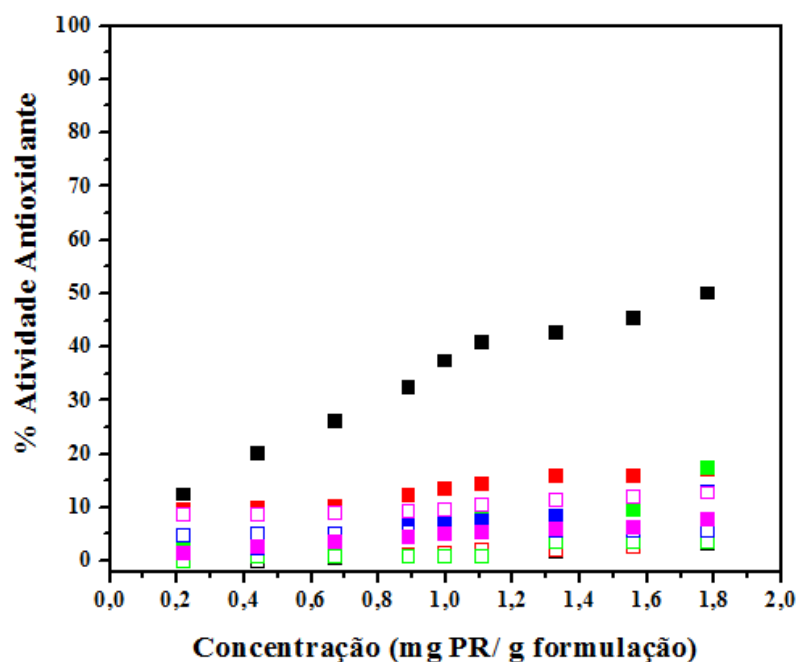
**Tabela 51** – Atividade antioxidante *in vitro* das formulações G e I, contendo, ou não, 1% de palmitato de retinol, em períodos de tempo pré-estabelecidos, durante 30 dias de avaliação.

Amostras	Formulações	Tempo				
		48 horas	7 dias	15 dias	21 dias	30 dias
1	Controle	---	---	---	---	---
	G <sub>PR</sub>	13,18%	12,47%	12,98%	6,58%	6,43%
2	G	0	0	2,05%	10,83%	19,20%
	I <sub>PR</sub>	12,36%	9,64%	3,07%	1,35%	1,32%
	I	0	0	0	4,75%	8,48%
	G <sub>PR</sub>	20,00%	16,12%	15,36%	9,65%	8,19%
3	G	0,98%	1,08%	3,51%	12,98%	22,02%
	I <sub>PR</sub>	19,95%	9,94%	3,77%	2,16%	2,63%
	I	0	0,70%	0,73%	4,90%	8,48%
	G <sub>PR</sub>	30,61%	23,51%	21,36%	14,04%	9,06%
4	G	1,67%	2,17%	4,97%	16,47%	25,14%
	I <sub>PR</sub>	25,95%	10,24%	4,04%	4,05%	3,51%
	I	0,41%	0,70%	0,73%	4,90%	8,89%
	G <sub>PR</sub>	34,46%	32,93%	25,96%	19,52%	13,89%
5	G	2,37%	3,12%	6,43%	20,92%	27,39%
	I <sub>PR</sub>	32,31%	12,31%	6,42%	6,96%	4,39%
	I	0,81%	0,98%	0,73%	5,34%	9,09%
	G <sub>PR</sub>	37,70%	37,33%	28,04%	22,95%	14,47%
6	G	3,07%	3,79%	7,60%	21,81%	28,41%
	I <sub>PR</sub>	37,33%	13,50%	7,39%	7,16%	4,97%
	I	1,08%	1,26%	0,73%	5,34%	9,50%
	G <sub>PR</sub>	48,24%	45,80%	32,27%	23,61%	22,66%
7	G	3,77%	5,01%	9,06%	23,29%	29,48%
	I <sub>PR</sub>	40,88%	14,39%	7,67%	7,30%	5,26%
	I	1,08%	1,95%	0,73%	5,64%	10,32%
	G <sub>PR</sub>	49,86%	50,14%	41,25%	29,09%	24,71%
8	G	4,60%	5,83%	11,99%	24,04%	29,96%
	I <sub>PR</sub>	42,47%	15,88%	7,67%	8,38%	5,85%
	I	1,76%	1,95%	3,51%	5,64%	11,24%
	G <sub>PR</sub>	59,80%	56,37%	45,85%	35,38%	32,43%
9	G	5,44%	7,72%	14,04%	27,89%	30,18%
	I <sub>PR</sub>	45,29%	15,88%	9,34%	11,89%	6,14%
	I	2,57%	2,51%	3,51%	5,64%	11,95%
	G <sub>PR</sub>	73,92%	72,09%	57,79%	43,49%	38,41%
10	G	6,28%	15,58%	16,23%	35,61%	31,41%
	I <sub>PR</sub>	49,94%	17,06%	17,29%	12,97%	7,75%
	I	3,12%	3,35%	3,51%	5,64%	12,67%
	G <sub>PR</sub>	73,92%	72,09%	57,79%	43,49%	38,41%

As Figura 66 e 67 comparam a porcentagem da atividade antioxidante (%AA) *in vitro* das formulações G<sub>PR</sub>/G e I<sub>PR</sub>/I, respectivamente, durante os 30 dias de estudo.



**Figura 66** – Atividade antioxidante (%) da formulação G<sub>PR</sub> (quadrados fechados) e G (quadrados abertos), durante 30 dias de estudo, nos seguintes tempos: 48h (preto); 7 dias (vermelho); 15 dias (verde); 21 dias (azul); e, 30 dias (rosa).



**Figura 67** – Atividade antioxidante (%) da formulação I<sub>PR</sub> (quadrados fechados) e I (quadrados abertos), durante 30 dias de estudo, nos seguintes tempos: 48h (preto); 7 dias (vermelho); 15 dias (verde); 21 dias (azul); e, 30 dias (rosa).

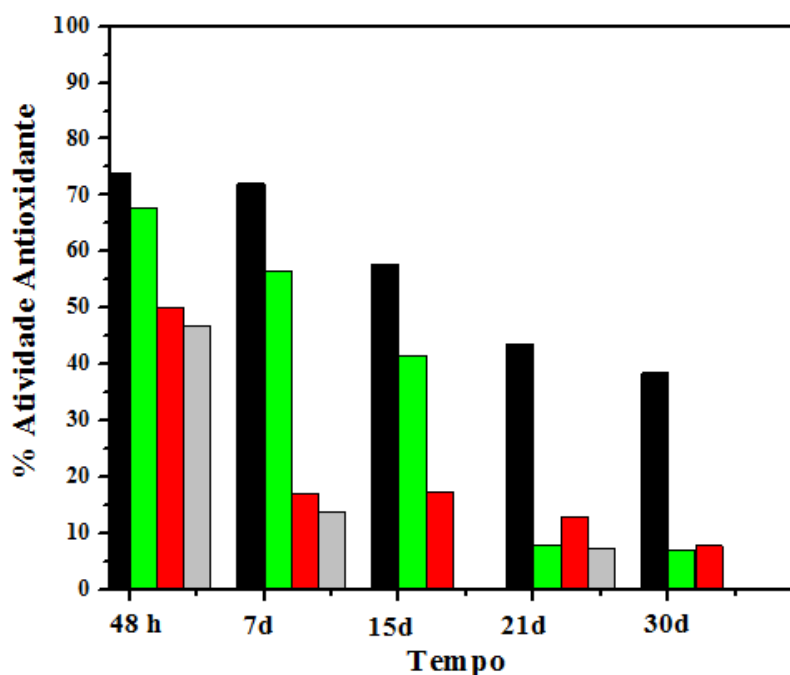
Os dados apresentados nas Figuras 66 e 67 demonstram que para ambas as formulações ocorreu diminuição da porcentagem de atividade antioxidante, com o decorrer do tempo, devido à degradação química do palmitato de retinol. Porém, com a análise das figuras mencionadas nota-se que o perfil de degradação do princípio ativo ocorreu em velocidades diferentes em cada uma das formulações analisadas, sendo menor para a formulação G<sub>PR</sub> constituída por um sistema líquido-cristalino.

A análise comparativa das Figuras 66 e 67 também permite concluir que as formulações sem a presença do princípio ativo (G e I) também apresentaram a capacidade em reduzir o radical DPPH, principalmente a partir de 21 dias, de acordo com os dados da Tabela 51.

Na pesquisa de Vicentini & colaboradores (2008), os resultados obtidos também sugerem que podem ocorrer possíveis interações entre o princípio ativo e o sistema líquido-cristalino desenvolvido pelos pesquisadores, todavia, naquele caso, a formulação inibiu ou reduziu a atividade do antioxidante (quercetina) incorporado no sistema.

De acordo com os dados da Tabela 51, após 30 dias de estudo, a formulação G apresentou 31,41% de atividade antioxidante na amostra mais concentrada (número 10), enquanto que a formulação I exibiu 12,67% de atividade antioxidante *in vitro* pelo método de redução do radical DPPH.

Verifica-se assim, que houve um sinergismo de ação entre o princípio ativo e a formulação base em reduzir o radical DPPH. Desse modo, descontou-se a contribuição das formulações bases (G e I) na redução do radical DPPH, buscando elucidar apenas a porcentagem de atividade antioxidante *in vitro* atribuída ao palmitato de retinol adicionado nestas formulações, como pode ser visto na Figura 68.



**Figura 68** – Atividade antioxidante *in vitro* das seguintes amostras: (■) formulação G<sub>PR</sub>; (■) PR adicionado à formulação G<sub>PR</sub>; (■) formulação I<sub>PR</sub>; (■) PR adicionado à formulação I<sub>PR</sub>.

A estabilidade de uma formulação está relacionada não só à estabilidade física do veículo, como também à capacidade do produto em manter a função específica para a qual é designado. Como pode ser confirmado pela análise da Figura 68, a formulação G<sub>PR</sub> demonstrou maior capacidade em conservar a propriedade antioxidante *in vitro* do palmitato de retinol do que a formulação I<sub>PR</sub>, contribuindo de melhor maneira em garantir a eficácia e a segurança de uso do produto.

## 5.6. – Estudo de Liberação *in vitro* do palmitato de retinol

---

### 5.6.1. – Estudo da solubilidade do palmitato de retinol em meios receptores

Para a seleção da solução receptora foram testados vários agentes solubilizantes para o palmitato de retinol, como: etanol, tween 20, tween 80, tween 60, adicionados em tampão fosfato (PBS) preparados em dois valores de pH (5,8 e 7,4). Para efeito de comparação com os tampões propostos, a solubilidade do PR também foi testada em 2-propanol, pois se sabe que este solvente é capaz de solubilizar a referida substância ativa.

O fator de recuperação (Fr) do palmitato de retinol obtido para cada solução receptora testada está apresentado na Tabela 52.

**Tabela 52** – Fator de recuperação (Fr) do palmitato de retinol solubilizado nas soluções receptoras testadas.

Amostras	Composição (% v/v)						Fr (%)
	Etanol	Tween20	Tween80	Tween60	PBS	2propanol	
1 <sup>(1)</sup>	10	---	---	---	*	---	0,92
2 <sup>(1)</sup>	10	4	---	---	*	---	13,18
3 <sup>(1)</sup>	10	---	4	---	*	---	15,46
4 <sup>(1)</sup>	---	4	---	---	*	---	10,96
5 <sup>(1)</sup>	---	---	4	---	*	---	21,73
6 <sup>(1)</sup>	---	---	---	---	*	---	6,72
7 <sup>(2)</sup>	10	---	---	---	*	---	1,04
8 <sup>(2)</sup>	10	4	---	---	*	---	9,85
9 <sup>(2)</sup>	10	---	4	---	*	---	19,44
10 <sup>(2)</sup>	---	4	---	---	*	---	13,30
11 <sup>(2)</sup>	---	---	4	---	*	---	29,62
12 <sup>(2)</sup>	---	---	---	---	*	---	2,77
13 <sup>(2)</sup>	---	---	---	4	*	---	34,75
14	---	---	---	---	---	*	100,00

\* Volume em q.s.p. utilização no ensaio; <sup>(1)</sup> Tampão fosfato (PBS) - pH 5,8; <sup>(2)</sup> Tampão fosfato (PBS) - pH 7,4.

Os resultados obtidos permitem concluir que o pH da solução receptora testada influenciou na capacidade de solubilização do palmitato de retinol. Nos meios testados com tampão fosfato sem a adição de agente solubilizante (amostras 6 e 12) ou adicionados de 10% de etanol e 4% de Tween 20 (amostras 2 e 8), o pH ácido apresentou-se melhor do que o pH neutro. Para as outras amostras testadas, o meio em pH 7,4 apresentou solubilização superior do que em meio ácido.

A análise da Tabela 52 também demonstra que em ambos os pH testados, a adição de etanol ao meio (amostras 1 e 7) prejudicou a capacidade de solubilização do PR pelo tampão fosfato puro (amostras 6 e 12, respectivamente), principalmente na solução receptora em pH 5,8.

Comparando a capacidade de solubilização do palmitato de retinol nos agentes solubilizantes concluiu-se que: tween 60 > tween 80 > tween 20. O equilíbrio hidrófilo-lipófilo da molécula influenciou na capacidade de solubilização do ativo, pois o tween 60 (EHL = 14,9) sendo mais lipofílico que o tween 80 (EHL = 15) e o tween 20 (EHL = 16) conseguiu recuperar maior quantidade do palmitato de retinol no meio hidrofílico testado (tampão fosfato - pH 7,4).

Porém, as soluções receptoras 1 à 13 não apresentaram fator de recuperação do palmitato de retinol satisfatório para a realização do ensaio de liberação *in vitro*.

Portanto, a amostra 14 foi escolhida como solução receptora para a realização do ensaio *in vitro*. Em trabalho anterior na literatura, Bozkir & Yüksel (1995), conseguiram resultados conclusivos avaliando a liberação *in vitro* do palmitato de retinol a partir de diferentes formulações em meio receptor constituído por 2-propanol.

### 5.6.2. – Execução do estudo de liberação *in vitro* do palmitato de retinol acrescido às formulações G<sub>PR</sub> e J<sub>PR</sub>

Partindo da média dos valores de absorbância obtidos nos períodos de tempo pré-determinados do ensaio (1, 2, 4, 8 e 12 horas), a quantidade de PR liberada ( $\mu\text{g/mL}$ ) *in vitro* das formulações G (SLT) e J (SVO) foram calculadas pela equação de reta:  $y = 0,05399x - 0,000870137$ , determinada na construção da curva analítica do PR em 2-propanol.

Com a obtenção da quantidade de PR liberada ( $\mu\text{g/mL}$ ) *in vitro* de seus veículos, calculou-se a respectiva quantidade liberada em  $\mu\text{g/cm}^2$  em função do tempo (horas). Os dados calculados estão descritos nas Tabelas 53 e 54 para as formulações G<sub>PR</sub> e J<sub>PR</sub>, respectivamente.

**Tabela 53** – Quantidade de PR liberado ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) e a correspondente percentagem de liberação, a partir da formulação G<sub>PR</sub>, em função do tempo (h),  $\lambda = 327$  nm.

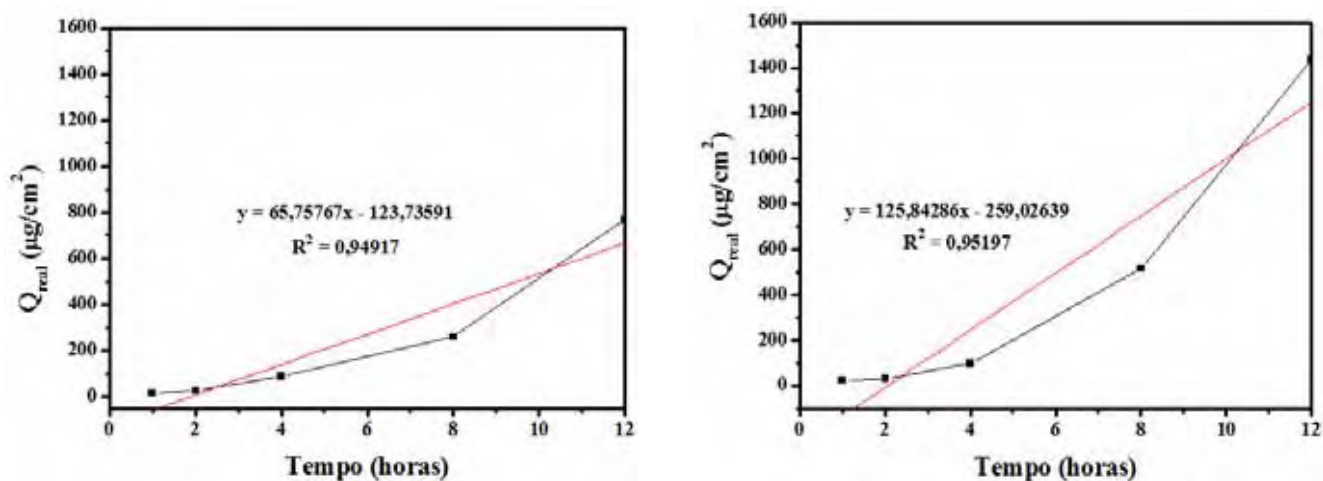
Tempo (horas)	Q <sub>real</sub> em $\mu\text{g/mL}$	CV (%)	Q <sub>real</sub> em $\mu\text{g/cm}^2$	% Liberada em $\mu\text{g/cm}^2$
1	28,3747	3,15	16,0309	1,0517
2	46,1113	2,74	26,0516	1,7091
4	151,7890	5,22	85,7565	5,6260
8	460,5474	1,44	260,1963	17,0700
12	1360,6735	0,62	768,7421	50,4328

**Tabela 54** – Quantidade de PR liberado ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) e a correspondente percentagem de liberação a partir da formulação J<sub>PR</sub>, em função do tempo (h),  $\lambda = 327$  nm.

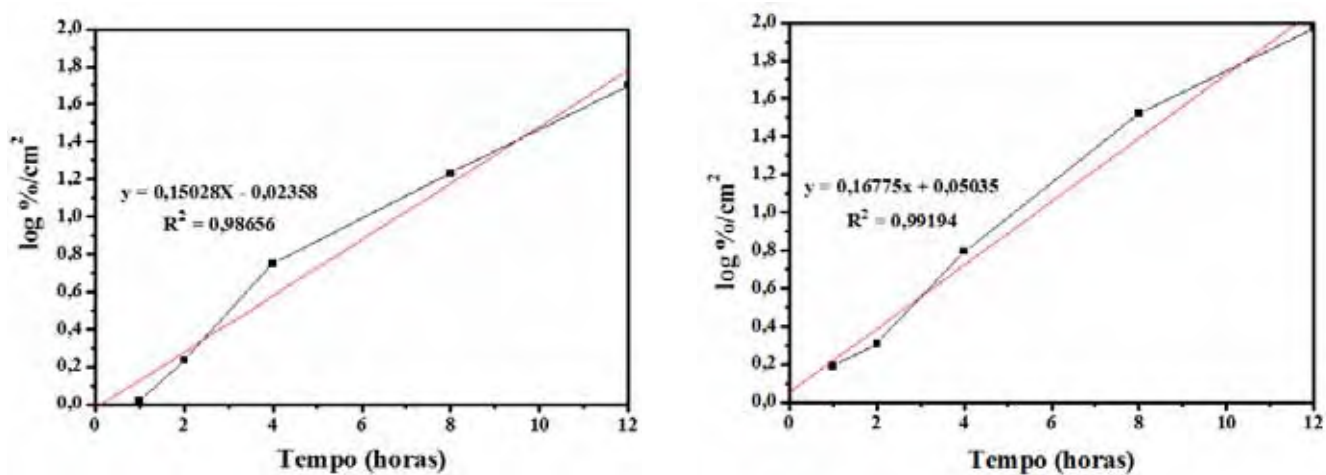
Tempo (horas)	Q <sub>real</sub> em $\mu\text{g/mL}$	CV (%)	Q <sub>real</sub> em $\mu\text{g/cm}^2$	% Liberada em $\mu\text{g/cm}^2$
1	42,2786	4,1	23,8862	1,5447
2	55,6679	4,55	31,4508	2,0339
4	170,0501	3,63	96,0735	6,2130
8	912,1504	1,02	515,3392	33,3266
12	2541,4998	0,76	1435,8756	92,8570



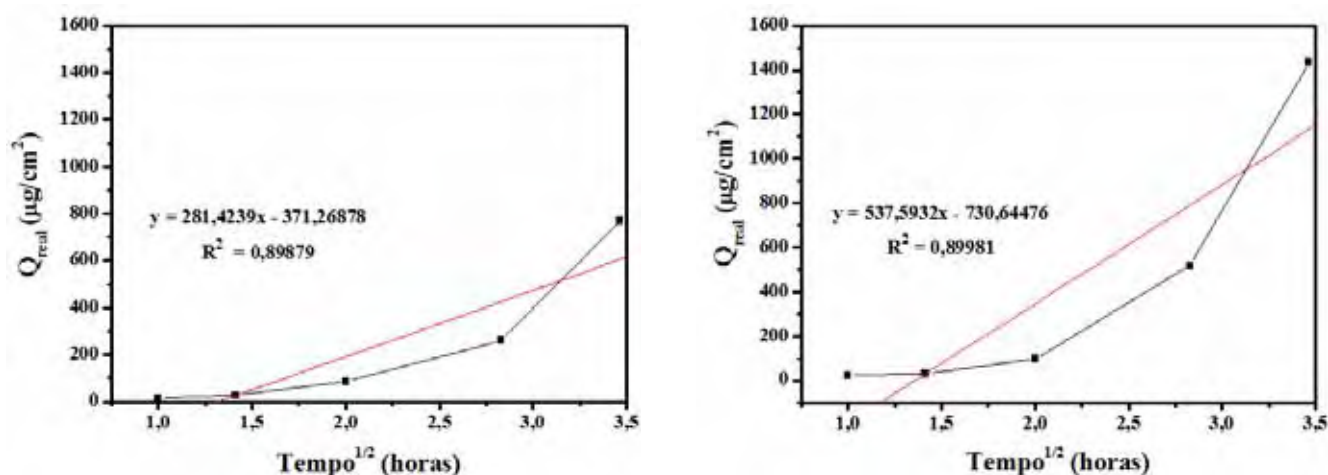
As Figuras 69 a 71 exibem o perfil de liberação das duas formulações em estudo de acordo com modelos matemáticos de cinética de ordem zero, primeira ordem e pseudoprimeira ordem (ou Higuchi), respectivamente.



**Figura 69** – Perfil de liberação *in vitro* das formulações G<sub>PR</sub> (à esquerda) e J<sub>PR</sub> (à direita), de acordo com o modelo matemático de cinética de ordem zero.



**Figura 70** – Perfil de liberação *in vitro* das formulações G<sub>PR</sub> (à esquerda) e J<sub>PR</sub> (à direita), de acordo com o modelo matemático de cinética de primeira ordem.



**Figura 71** – Perfil de liberação *in vitro* das formulações G<sub>PR</sub> (à esquerda) e J<sub>PR</sub> (à direita), de acordo com o modelo matemático de cinética de pseudoprimeira ordem.

A análise do coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) das curvas de liberação *in vitro* foram utilizadas para determinar a ordem de reação. Os resultados estão apresentados na Tabela 55.

**Tabela 55** – Determinação da ordem de reação da liberação *in vitro* do PR a partir das formulações G<sub>PR</sub> e J<sub>PR</sub> (diagrama 2) utilizando o parâmetro de coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ).

Formulação	Ordem de Liberação			
	Ordem zero	Primeira ordem	Ordem de Higuchi	Ordem da reação
<b>G</b>	0,94917	0,98656	0,89879	Primeira ordem
<b>J</b>	0,95197	0,99194	0,89981	Primeira ordem

Em ambas as formulações, os resultados apresentados na Tabela 55 apontam que a liberação *in vitro* do PR foi controlada pelas reações de primeira ordem. Como comentam Lachman; Lieberman & Kanig (2001), este dado indica que a cinética de liberação é dependente da concentração.

Schuller & Romanowski (1998) destacam a importância em elucidar mecanismos de obtenção, estabilidade e perfil de liberação dos princípios ativos para que os produtos cosméticos desenvolvidos tenham o seu uso viabilizado e constantemente aprimorado.

No desenvolvimento de sistemas micro ou nanoestruturados que visem à liberação prolongada da substância ativa, a constante **k** da velocidade de liberação é um parâmetro importante a ser considerado.

A constante da velocidade de liberação *in vitro* do PR para o meio receptor, a partir das formulações  $G_{PR}$  e  $J_{PR}$ , foi determinada pela equação 14, descrita no item 4.2.6.2. Os resultados estão apresentados na Tabela 56.

**Tabela 56** – Constante da velocidade  $k$  de liberação do PR a partir das formulações envolvidas no estudo.

Formulações	Constante da velocidade - $k$ ( $\mu\text{g/mL/h}$ )
G	121,118
J	227,202

Os resultados da Tabela 56 demonstram que a constante  $k$  da formulação G é praticamente a metade da constante  $k$  da outra formulação avaliada. O menor valor da constante  $k$  de liberação *in vitro* para a formulação  $G_{PR}$  demonstra sua capacidade de modular a liberação do palmitato de retinol por um tempo mais prolongado em relação à formulação  $J_{PR}$ .

Provavelmente, essa diferença significativa entre os valores da constante  $k$  das duas formulações deve-se a diferença da estrutura interna formada em cada uma delas, onde a substância ativa pode ser incorporada. A formulação  $J_{PR}$  é uma emulsão viscosa, enquanto que as propriedades anisotrópicas identificadas pela birrefringência óptica da formulação  $G_{PR}$  indicam que a mesma é um sistema nanoestruturado de fase lamelar.

Tyle (1989) explica que a estrutura multilamelar dos cristais líquidos ao redor das gotículas reduz efetivamente o transporte interfacial das gotículas do ativo para a fase líquida dispersa e por isso auxilia no processo de liberação sustentada (liberação modificada) da substância ativa a partir dessa matriz.

Dentre as novas possibilidades para o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada de fármacos, Makai & colaboradores (2003a) expressam especial interesse na obtenção de sistemas líquido cristalinos liotrópicos lamelares em consequência do aumento da estabilidade física dos sistemas coloidais e de sua estrutura semelhante com a da pele (por isso, são considerados biocompatíveis). Avaliando a liberação *in vitro* de dois fármacos, Makai & pesquisadores (2003b) asseguram que o sistema líquido cristalino lamelar contendo glicerol foi adequado não só para a incorporação de um fármaco pouco solúvel em água (tenoxicam), mas foi suficiente para alcançar uma liberação prolongada de um fármaco muito solúvel em água (cloridrato de efedrina).

## 5.7. – Estudo da Bioadesão *in vitro*

---

Guo & colaboradores (2010) comentam que as propriedades bioadesivas, biodegradáveis e não tóxicas das mesofases contribuem para sua aplicação como sistemas de liberação modificada para princípios ativos de uso tópico. A ação local ou sistêmica da substância ativa pode ser potencializada pelo desenvolvimento de sistemas bioadesivos, pois estes sistemas permanecem em contato íntimo com o tecido de absorção, liberando o agente terapêutico no local de ação, com conseqüente aumento da biodisponibilidade.

Irons & Robinson (2003) explicam que a bioadesão é um processo que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa ocorre o contato entre o material adesivo e o substrato biológico, sendo extremamente importante para o sucesso desta etapa que exista uma similaridade das propriedades físico-químicas entre adesivo e substrato. Subseqüentemente, ocorre a formação de ligações eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio, permitindo o bioadesivo se fixar na superfície do substrato.

Uma abordagem amplamente utilizada para explicar as propriedades bioadesivas de sistemas dérmicos e transdérmicos é baseada na crença de que forças inter-atômicas ou inter-moleculares 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.

Os testes reológicos foram realizados em associação com o método de medição da força de ruptura à tração, para que as duas metodologias em conjunto pudessem oferecer maiores informação a respeito do caráter bioadesivo das formulações ( $A_{PR}$ ,  $E_{PR}$ ,  $F_{PR}$ ,  $G_{PR}$ ,  $K_{PR}$  e  $L_{PR}$ ) e dos géis poliméricos (CMCNa, C940 e 934P) desenvolvidos nesta pesquisa.

Fez-se a comparação das propriedades de bioadesão *in vitro* das seis formulações desenvolvidas com os géis preparados, pois segundo Florence & Attwood (2003) os derivados da celulose e do ácido poli-acrílico são matérias primas que possuem excelente desempenho bioadesivo reconhecido na literatura.

A presença de grupos carboxila no derivado celulósico e nos carbômeros, assim como o elevado peso molecular do silicone e de outros polímeros são propriedades químicas que segundo Réus & colaboradores (2009) favorecem o desenvolvimento de sistemas bioadesivos.

### 5.7.1. – Avaliação da Bioadesão *in vitro* pelo Método de Força de Ruptura à Tração

As características bioquímicas da pele dos mamíferos não pode ser considerada a mesma entre as espécies pertencentes à 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.

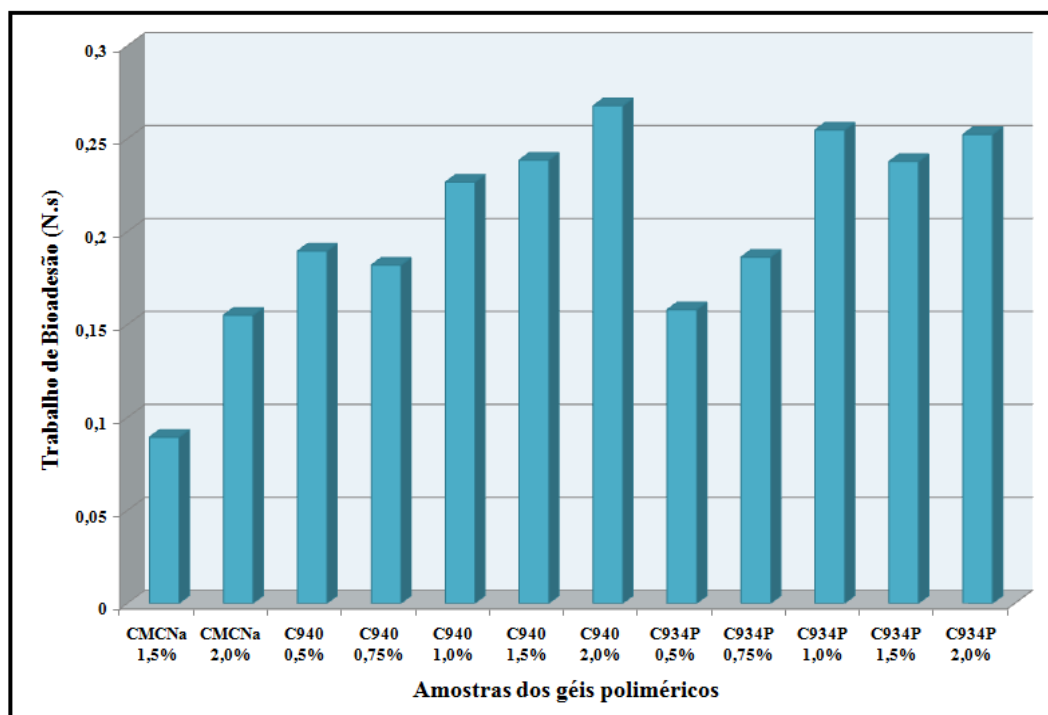
Em pesquisas que a pele tenha algum significado que necessite ser observado na resposta do experimento, como foi o caso de Challapalli & Stinchcom (2002), é muito importante que a viabilidade celular seja mantida nos estudos de modelo *in vitro* para simular as condições *in vivo*. Por esse motivo, as peles dermatomizadas de suínos foram hidratadas e permaneceram até o seu uso em tampão Hank's com solução salina balanceada - pH 7,4.

As médias das medidas realizadas em sextuplicata para determinar o trabalho de bioadesão (N.s) e o pico de força máxima para destaque (N), *n vitro*, da pele de suínos com a formulação estão apresentadas na Tabela 57.

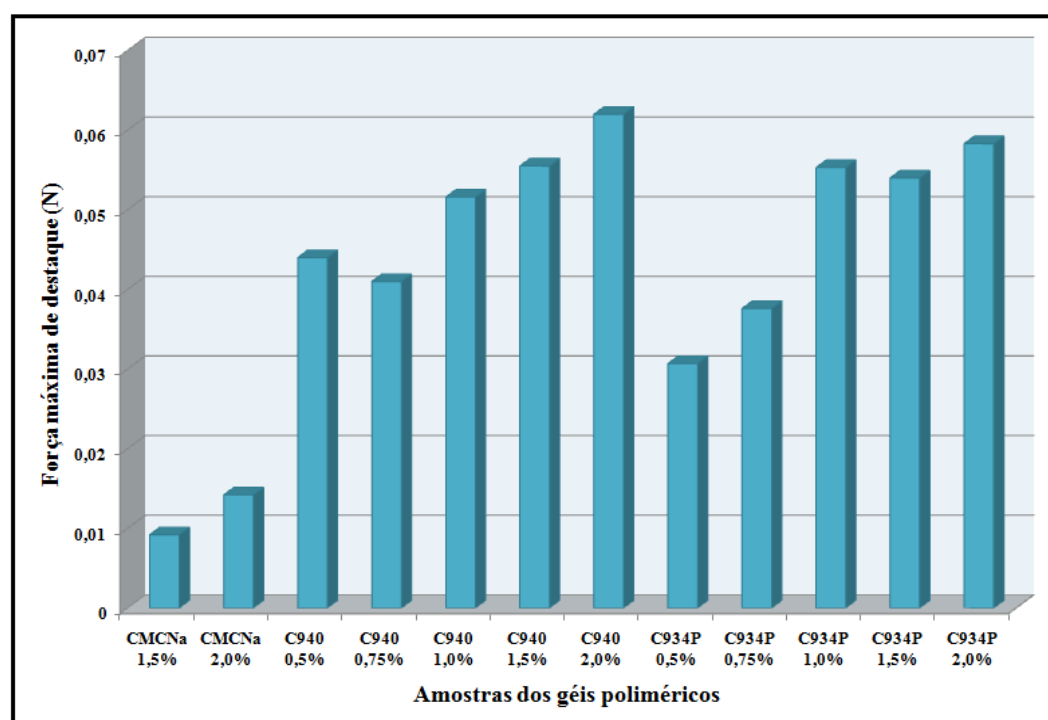
**Tabela 57** – Trabalho de bioadesão *in vitro* (N.s) e força máxima (N) necessária para o destaque do substrato biológico das amostras analisadas.

Amostras	Bioadesão (N.s) ± DP	Força Máxima (N) ± DP
CMCNa - 1,5%	0,0894 ± 0,005	0,0093 ± 0,006
CMCNa - 2,0%	0,1550 ± 0,003	0,0142 ± 0,006
C940 - 0,5%	0,1895 ± 0,010	0,0440 ± 0,004
C940 - 0,75%	0,1820 ± 0,009	0,0410 ± 0,003
C940 - 1,0%	0,2266 ± 0,015	0,0516 ± 0,002
C940 - 1,5%	0,2385 ± 0,006	0,0555 ± 0,003
C940 - 2,0%	0,2677 ± 0,013	0,0620 ± 0,002
C934P - 0,5%	0,1580 ± 0,014	0,0307 ± 0,005
C934P - 0,75%	0,1863 ± 0,002	0,0376 ± 0,004
C934P - 1,0%	0,2547 ± 0,027	0,0553 ± 0,005
C934P - 1,5%	0,2377 ± 0,006	0,0540 ± 0,003
C934P - 2,0%	0,2523 ± 0,014	0,0583 ± 0,002
Form. A <sub>PR</sub>	0,0231 ± 0,010	0,0095 ± 0,006
Form. E <sub>PR</sub>	0,1540 ± 0,010	0,0120 ± 0,002
Form. F <sub>PR</sub>	2,4297 ± 0,283	0,8772 ± 0,181
Form. G <sub>PR</sub>	0,0703 ± 0,009	0,0077 ± 0,006
Form. K <sub>PR</sub>	3,5540 ± 0,277	1,0670 ± 0,167
Form. L <sub>PR</sub>	2,1337 ± 0,225	0,4613 ± 0,031

Nas Figuras 72 e 73, respectivamente, são apresentadas análises comparativas dos parâmetros avaliados no analisador de textura, para as amostras preparadas dos géis poliméricos.



**Figura 72** – Comparação dos valores do trabalho de bioadesão *in vitro* (N.s) medidos em analisador de textura para as amostras dos géis poliméricos.



**Figura 73** – Comparação dos valores da força máxima (N) necessária para o destaque entre a sonda do analisador de textura e as amostras dos géis poliméricos.

As Figuras 72 e 73 demonstram que há uma relação diretamente proporcional entre o trabalho de adesão (N.s) e a força máxima necessária para a remoção da pele de suínos dermatomizada (N) da amostra analisada.

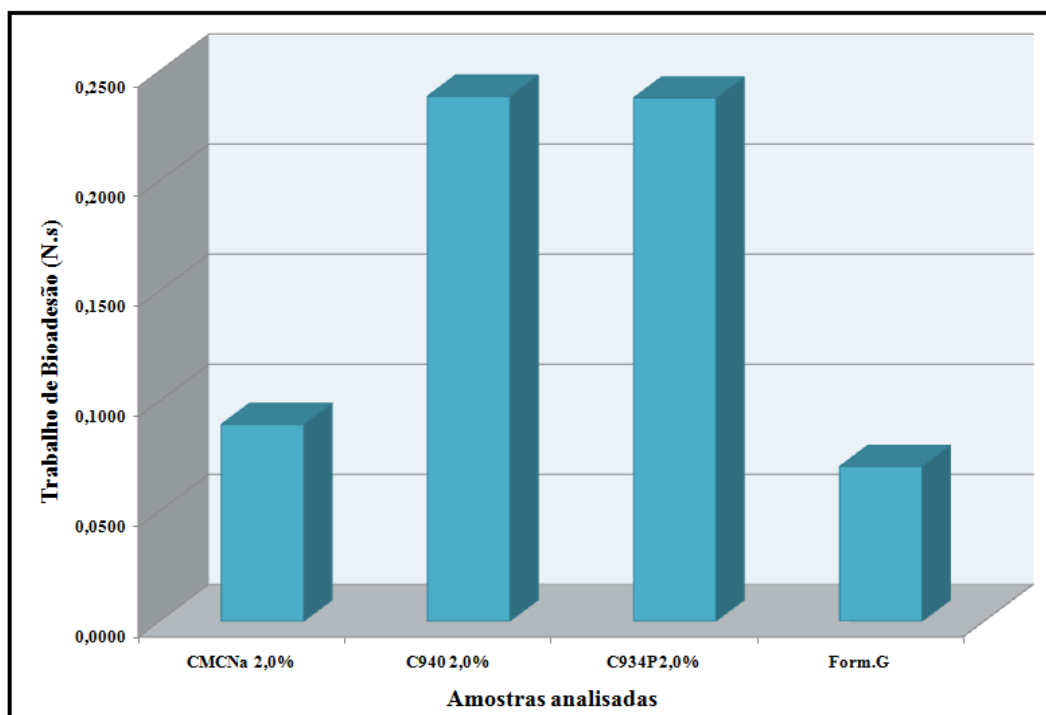
A avaliação dos dados representados graficamente na Figura 72 permite concluir que a capacidade de bioadesão dos géis de CMCNa é inferior à apresentada pelos polímeros carboxivinílicos, sendo que estes últimos possuem propriedades bioadesivas bem próximas entre si. Irons & Robinson (2003) explicam que a CMCNa necessita de um peso molecular mínimo para apresentar bioadesão, sendo possivelmente esta a causa para a menor capacidade bioadesiva *in vitro* dos géis contendo o polímero em questão.

A interpretação da Figura 72 também possibilitou concluir que à medida que a concentração do polímero aumentou na composição do gel, ocorreu aumento da capacidade bioadesiva *in vitro* da amostra analisada. Na realização de estudos reológicos, Martin & Banker (1964) já constataram que o aumento na concentração das macromoléculas poliméricas influencia diretamente em ganho na viscosidade, o que implica em aumento da capacidade bioadesiva *in vitro*, como pode-se correlacionar os dados experimentais apresentados na Figura 72 com a Tabela 58 (no item **5.7.2.**).

A partir da correlação desses dados, infere-se que a viscosidade e a viscoelasticidade são parâmetros indiretamente avaliados neste estudo, pois quanto maior a viscosidade de uma formulação (predomínio do módulo elástico,  $G'$ ), maior será sua adesão com a superfície biológica, por isso, será necessário a aplicação de uma força maior para romper a ligação entre o substrato biológico e o material bioadesivo avaliado.

Seguindo este mesmo conceito, Callens & pesquisadores (2003) também apontam que a reologia oscilatória é uma técnica não destrutiva, a qual mede, simultaneamente, tanto a viscosidade como o comportamento viscoelástico e pode ser usada para determinar a bio/mucoadesão *in vitro* entre o sistema bioadesivo e a pele.

Na Figura 74, compara-se a média da sextuplicata do trabalho de bioadesão *in vitro* da formulação G<sub>PR</sub> com a concentração testada de 1,5% em cada um dos polímeros.

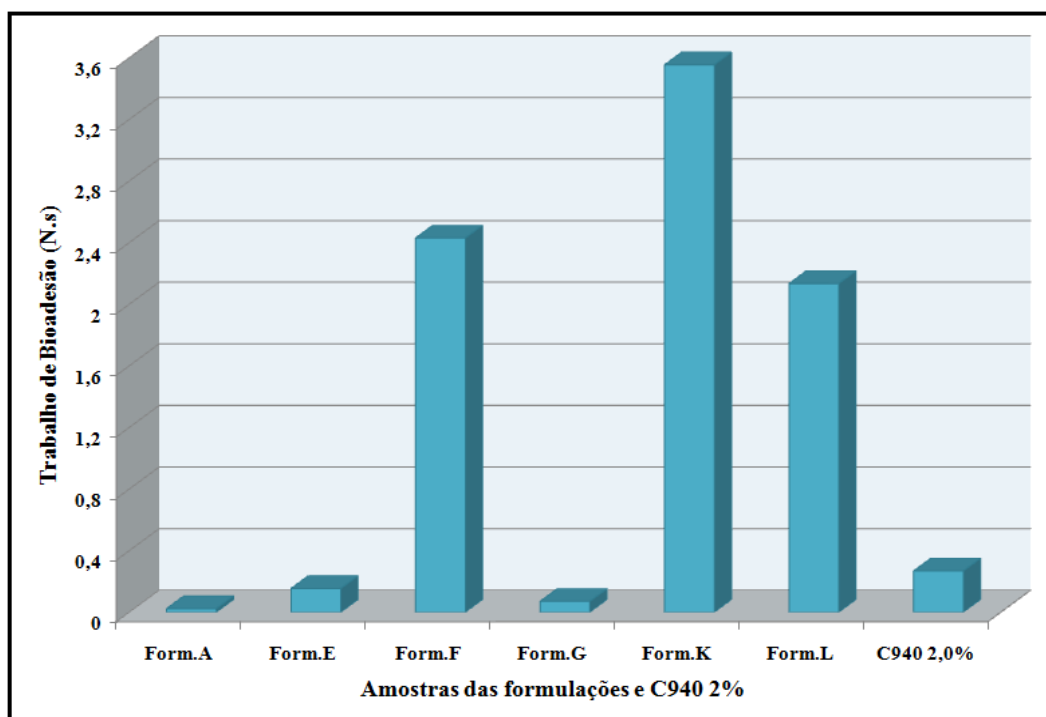


**Figura 74** – Comparação dos valores do trabalho de bioadesão *in vitro* (N.s) medidos em analisador de textura entre as formulação G<sub>PR</sub> e os géis poliméricos na concentração de 1,5%.

Com os resultados apresentados na Figura 74, pode-se inferir que a formulação G<sub>PR</sub> possui uma boa fixação na pele por possui bioadesão *in vitro* comparável à do gel de CMCNa – 1,5% e acredita-se ainda que tal formulação tenha um sensorial agradável, sem transmitir pegajosidade, pois demonstrou propriedades bioadesivas inferior à dos géis poliméricos carboxivinílicos, os quais apresentam alta fixação na pele e um aspecto pegajoso em função de possuírem um aumento do seu módulo elástico, como será discutido no próximo item.

Nas Figuras 75 e 76, compara-se a média da sextuplicata de medidas da formulações estudadas com a do gel de C940 2%, por este ter demonstrado maior desempenho nos parâmetros avaliados em comparação com as amostras analisadas dos outros géis poliméricos.





**Figura 75** – Comparação dos valores do trabalho de bioadesão *in vitro* (N.s) medidos em analisador de textura entre as formulações e o gel de C940 2%.

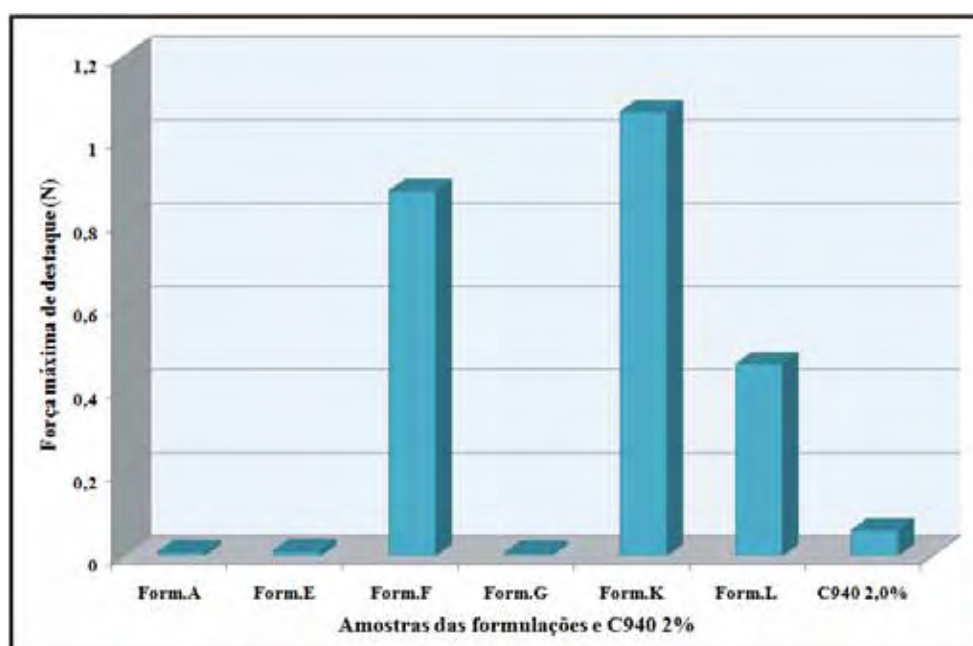
Na Figura 75, a análise comparativa do trabalho de bioadesão das formulações A (diagrama 1) e E (diagrama 2), demonstra que o silicone DC 5329<sup>®</sup> tem maior poder de fixação ao substrato biológico do que o silicone DC 5330<sup>®</sup>. A referida figura também demonstra que as formulações do diagrama 2 apresentaram propriedades bioadesivas seguindo a seguinte ordem crescente:  $G_{PR} < E_{PR} < L_{PR} < F_{PR} < K_{PR}$ .

De modo semelhante como comentando para as formulações dos géis sobre a influência da viscosidade no aumento da bioadesão *in vitro*, notou-se visualmente que as formulações mais viscosas apresentaram maior trabalho de bioadesão, como foi o caso de  $L_{PR}$ ,  $F_{PR}$  e  $K_{PR}$ , sugerindo que concentrações acima de 45% de água e menores do que 25% de silicone DC 5329<sup>®</sup> (exemplo, formulação  $E_{PR}$ ) tenham uma redução da viscosidade e com isso, menor trabalho de bioadesão. Esse resultado condiz com os dados experimentais obtidos anteriormente no teste de estabilidade preliminar das formulações do diagrama 2 (item 5.2.6.2.), em que na Tabela 23 já se apontava que a formulação F possuía maior índice de consistência do que a formulação E.

Também pode-se sugerir que a redução da concentração de água (< 35%) e o aumento do silicone (> 35%) impactam de modo mais significativo na redução da bioadesão, como foi o caso da formulação  $G_{PR}$ . E, da mesma maneira, os testes de estabilidade preliminar também demonstravam que a formulação G possuía índice de consistência bem inferior ao da formulação E (Tabela 23, item 5.2.6.2.).

Seguindo uma avaliação quantitativa dos componentes presentes nas formulações  $K_{PR}$ ,  $F_{PR}$  e  $L_{PR}$ , as quais apresentaram trabalho de bioadesão superior ao do gel C940-2% (Figura 74), sabe-se que há uma diminuição do conteúdo de água, nesta ordem apresentada. Essa avaliação indica que quanto maior o conteúdo de água no sistema líquido cristalino, como é o caso da formulação  $K_{PR}$ , os polímeros encontram-se parcialmente mais hidratados e na etapa de contato, segundo Carvalho & colaboradores (2010), podem ser adsorvidos ao substrato biológico por causa da atração pelo conteúdo de água na superfície. Assim o mecanismo responsável pela bioadesão após o contato entre as superfícies bioadesivo/pele demonstrou ser a formação de pontes de hidrogênio.

No caso das formulações  $E_{PR}$  e  $G_{PR}$ , a teoria da adsorção não foi o mecanismo responsável pelo processo de bioadesão ao substrato biológico utilizado. Acredita-se, nesse caso, que as moléculas do sistema estejam ligadas apenas por interações físicas, como será elucidado mais conclusivamente na avaliação da bioadesão por medidas reológicas no item seguinte.



**Figura 76** – Comparação dos valores da força máxima (N) necessária para o destaque entre a sonda do analisador de textura e as amostras analisadas.

Conforme já constatado anteriormente, há uma relação diretamente proporcional entre o trabalho de bioadesão *in vitro* (N.s) das amostras analisadas (Figuras 72 e 75) com a força máxima (N) necessária para o destaque da sonda do equipamento contendo a pele do modelo animal utilizado (Figuras 73 e 76).

### 5.7.2. – Avaliação da Bioadesão por Medidas Reológicas Oscilatórias

As medidas de varredura de tensão foram realizadas para determinar a máxima amplitude de tensão para cada amostra, e em seguida, as medidas de viscoelasticidade foram feitas na região linear.

A viscosidade complexa ( $\eta^*$ ), o módulo elástico ( $G'$ ), o módulo viscoso ( $G''$ ) e o ângulo de fase ( $\delta$ ) foram usados como medidas do comportamento reológico oscilatório. A média dos dados obtidos em triplicata estão apresentadas nas Tabelas 58 e 59.

**Tabela 58** – Viscosidade complexa (Pa.s) das amostras analisadas.

<b>Amostras</b>	<b>Viscosidade (Pa.s) <math>\pm</math> DP</b>
CMCNa - 1,5%	2,619 $\pm$ 0,081
CMCNa - 2,0%	2,861 $\pm$ 0,082
C940 - 0,5%	1,559 $\pm$ 0,257
C940 - 0,75%	1,529 $\pm$ 0,737
C940 - 1,0%	1,614 $\pm$ 0,180
C940 - 1,5%	1,774 $\pm$ 0,156
C940 - 2,0%	1,832 $\pm$ 0,140
C934P - 0,5%	1,705 $\pm$ 0,078
C934P - 0,75%	2,030 $\pm$ 0,117
C934P - 1,0%	2,144 $\pm$ 0,127
C934P - 1,5%	2,152 $\pm$ 0,132
C934P 2,0%	2,184 $\pm$ 0,109
Form. A <sub>PR</sub>	4,086 $\pm$ 0,128
Form. E <sub>PR</sub>	2,415 $\pm$ 0,146
Form. F <sub>PR</sub>	221,933 $\pm$ 0,219
Form. G <sub>PR</sub>	0,234 $\pm$ 0,137
Form. K <sub>PR</sub>	295,683 $\pm$ 0,348
Form. L <sub>PR</sub>	156,439 $\pm$ 0,241

Os carbômeros são polímeros sintéticos de alto peso molecular do ácido acrílico em ligação cruzada com alil-éter de sacarose ou alil-éter de pentaeritritol (MARTINDALE, 1996), contendo uma alta proporção (56-68%) de grupos carboxílicos, por isso, suas soluções aquosas são acídicas e necessitam serem neutralizadas para que atinjam sua máxima viscosidade na faixa de pH ideal (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007) devido à conversão dos grupos ácidos da cadeia polimérica em sua forma de sal (LEONARDI, 2004).

Assim, o aumento da concentração do polímero, acarreta maior viscosidade do gel formado, e é diretamente proporcional ao aumento da bioadesão *in vitro* das amostras analisadas, de acordo com a correlação dos resultados experimentais apresentados nas Tabelas 57 e 58.

Dentre as amostras de géis poliméricos analisadas, os dados da Tabela 58 também apontam que àqueles contendo CMCNa apresentaram maiores valores de viscosidade (Pa.s) do que os outros géis contendo carbômeros na mesma concentração, no entanto, demonstraram menor trabalho de bioadesão *in vitro* do que as outras amostras (conforme dados da Tabela 57). Provavelmente o reduzido trabalho de bioadesão *in vitro* do gel de CMCNa foi menor na pele de suínos devido as diferenças do módulo elástico entre os géis de mesma concentração formados por polímeros diferentes, como será avaliado adiante com os resultados de varredura de frequência.

A relevância das medidas reológicas oscilatórias é de uma importância considerável em relação as tendências observadas no teste de bioadesão *in vitro*, pois a magnitude dos módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) é uma indicação qualitativa da estrutura do sistema. De posse deste conceito, Hägerström & Edsman (2001) escolheram duas concentrações para avaliarem a mucoadesão de polímeros do ácido poli-acrílico (carbopol 907 e carbopol 934P), uma delas baseou-se na concentração usual de tais polímeros (2% p/p) e a outra esteve focada na concentração em que tais polímeros possuem o mesmo módulo elástico em 1 Hz (isto é, 7,4% p/p e 0,75% p/p, respectivamente).

A reduzida bioadesão do polímero de CMCNa detectada nesta pesquisa também já foi relatada na literatura. Kelly & colaboradores (2004) verificaram que a presença de CMCNa aumentou a viscosidade aparente do produto ao qual foi adicionado e o produto demonstrou adesão na cavidade oral. Entretanto, os testes de fricção na cavidade bucal realizados por Olsson & Axéll (1991) indicaram que este polímero não é resistente, pois a duração de ação ainda é muita curta (aproximadamente 15 minutos).

No ensaio reológico oscilatório, os valores apresentados na Tabela 59 são em função de duas frequências diferentes (5,0 e 10,0 Hz) para indicar se há dependência da frequência em cada amostra testada.

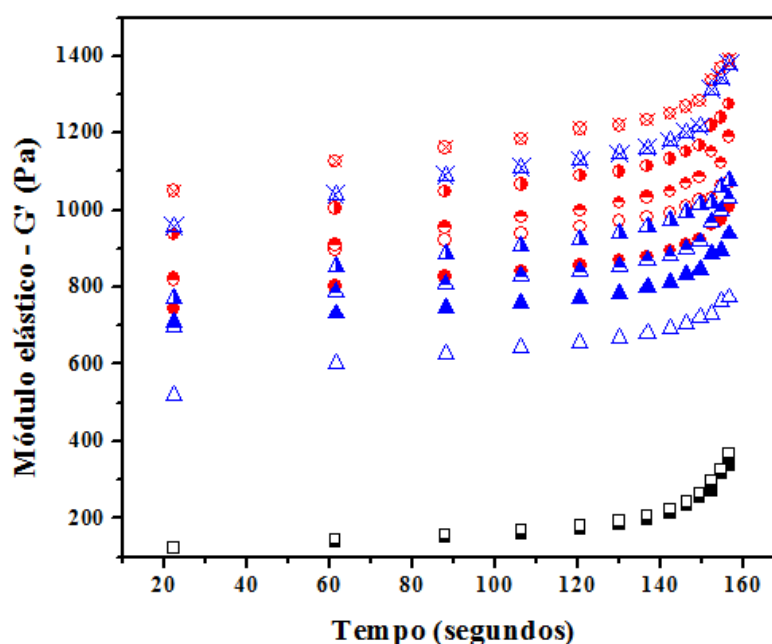
**Tabela 59** – Estudo do comportamento reológico das amostras avaliadas por determinação do módulos  $G'$  e  $G''$  e do ângulo de fase ( $\delta$ ).

Amostras	Frequência (Hz)	$G'$ (Pa) $\pm$ DP	$G''$ (Pa) $\pm$ DP	$\tan \delta$	$\delta$ (°)
CMCNa - 1,5%	5,0	270,67 ( $\pm$ 15,65)	120,97 ( $\pm$ 4,87)	0,4469	24,08
	10,0	337,10 ( $\pm$ 19,33)	164,57 ( $\pm$ 5,07)	0,4882	26,02
CMCNa - 2,0%	5,0	299,73 ( $\pm$ 14,85)	131,57 ( $\pm$ 4,03)	0,4390	23,70
	10,0	369,83 ( $\pm$ 16,37)	179,77 ( $\pm$ 5,12)	0,4861	25,93
C940 - 0,5%	5,0	963,90 ( $\pm$ 102,15)	74,04 ( $\pm$ 1,77)	0,0768	4,39
	10,0	1009,77 ( $\pm$ 94,89)	97,92 ( $\pm$ 16,12)	0,0969	5,53
C940 - 0,75%	5,0	1032,33 ( $\pm$ 27,43)	73,36 ( $\pm$ 3,25)	0,0711	4,07
	10,0	1071,33 ( $\pm$ 29,30)	96,05 ( $\pm$ 4,64)	0,0896	5,12
C940 - 1,0%	5,0	1152,33 ( $\pm$ 41,30)	83,14 ( $\pm$ 1,86)	0,0721	4,12
	10,0	1191,00 ( $\pm$ 47,69)	104,90 ( $\pm$ 5,46)	0,0881	5,03
C940 - 1,5%	5,0	1218,67 ( $\pm$ 57,71)	78,44 ( $\pm$ 9,46)	0,0644	3,68
	10,0	1275,67 ( $\pm$ 56,72)	89,45 ( $\pm$ 20,12)	0,0701	4,00
C940 - 2,0%	5,0	1337,67 ( $\pm$ 80,16)	90,29 ( $\pm$ 7,53)	0,0675	3,86
	10,0	1388,33 ( $\pm$ 82,05)	93,38 ( $\pm$ 22)	0,0673	3,85
C934P - 0,5%	5,0	886,23 ( $\pm$ 51,56)	98,04 ( $\pm$ 8,44)	0,1107	6,32
	10,0	938,60 ( $\pm$ 50,51)	127,57 ( $\pm$ 7,31)	0,1360	7,74
C934P - 0,75%	5,0	731,70 ( $\pm$ 26,82)	78,56 ( $\pm$ 3,57)	0,1074	6,13
	10,0	773,97 ( $\pm$ 29,55)	102,67 ( $\pm$ 7,77)	0,1327	7,56
C934P - 1,0%	5,0	970,83 ( $\pm$ 71,89)	96,54 ( $\pm$ 12,30)	0,0994	5,67
	10,0	1031,67 ( $\pm$ 70,73)	125,67 ( $\pm$ 7,96)	0,1218	6,94
C934P - 1,5%	5,0	1019,60 ( $\pm$ 29,38)	97,65 ( $\pm$ 3,88)	0,0958	5,47
	10,0	1077,00 ( $\pm$ 27,71)	123,87 ( $\pm$ 9,83)	0,1150	6,56
C934P 2,0%	5,0	1312,00 ( $\pm$ 58,40)	113,27 ( $\pm$ 6,28)	0,0863	4,93
	10,0	1379,67 ( $\pm$ 61,24)	130,93 ( $\pm$ 6,86)	0,0949	5,42
Form. APR	5,0	3,88 ( $\pm$ 0,30)	113,45 ( $\pm$ 13,79)	29,24	88,04
	10,0	6,83 ( $\pm$ 1,89)	232,65 ( $\pm$ 34,01)	34,06	88,32
Form. EPR	5,0	9,12 ( $\pm$ 1,26)	84,74 ( $\pm$ 4,02)	9,29	83,86
	10,0	27,21 ( $\pm$ 4,86)	151,75 ( $\pm$ 0,35)	5,58	79,84
Form. FPR	5,0	24203,33 ( $\pm$ 1115,09)	6978,00 ( $\pm$ 366,73)	0,2883	16,08
	10,0	26630,00 ( $\pm$ 1663,27)	9149,33 ( $\pm$ 541,88)	0,3436	18,96
Form. GPR	5,0	0,846 ( $\pm$ 0,17)	5,94 ( $\pm$ 0,93)	7,02	81,89
	10,0	8,55 ( $\pm$ 1,69)	14,68 ( $\pm$ 2,38)	1,72	59,83
Form. KPR	5,0	26815,67 ( $\pm$ 1083,67)	8082,25 ( $\pm$ 415,21)	0,3014	16,77
	10,0	28288,33 ( $\pm$ 1518,36)	10079,13 ( $\pm$ 566,88)	0,3563	19,61
Form. LPR	5,0	21642,15 ( $\pm$ 989,24)	5953,76 ( $\pm$ 286,56)	0,2751	15,38
	10,0	23892,03 ( $\pm$ 1064,06)	7279,90 ( $\pm$ 405,82)	0,3047	16,95

Em termos reológicos, Hägerström & Edsman (2001) comentam que o gel tem sido definido como tendo  $G'$  independente da frequência por ser consideravelmente maior do que  $G''$  em um grande intervalo de frequência, resultando em um pequeno ângulo de fase  $\delta$  ( $\tan \delta = G''/G'$ ). Por outro lado, para soluções poliméricas concentradas,  $G'$ ,  $G''$  e o ângulo de fase são dependentes da frequência. Daí a importância em determinar as medidas oscilatórias em duas frequências distintas.

Os valores de  $G'$  consideravelmente maior do que  $G''$  independente da frequência aplicada, conforme indicam os dados da Tabela 59, demonstram que nas amostras dos três polímeros analisados os mesmos organizaram-se em redes tridimensionais, havendo a formação de gel.

O gráfico apresentado na Figura 77 demonstra a evolução temporal do módulo de armazenamento  $G'$ , determinado no ensaio de varredura de frequência, pois com este parâmetro é possível observar o aumento das propriedades elásticas dos sistemas géis estudados.



**Figura 77** – Evolução temporal de  $G'$  para as amostras analisadas dos géis poliméricos: CMCNa-1,5% (■), CMCNa-2,0% (□), C940-0,5% (●), C940-0,75% (○), C940-1,0% (⊕), C940-1,5% (⊙), C940-2,0% (⊗), C934P-0,5% (▲), C934P-0,75% (△), C934P-1,0% (▴), C934P-1,5% (▵), C934P-2,0% (⊗).

Dentre todos os sistemas géis estudados, a Figura 77 demonstrou que o gel C940-2% apresentou maior predomínio da componente elástica no seu sistema em relação aos outros

sistemas avaliados, o que refletiu em maior capacidade de fixação *in vitro* à pele do modelo animal utilizado, como já constatado na Figura 72.

No caso dos géis de CMCNa, ainda que a viscosidade tenha sido superior aos polímeros derivados do ácido acrílico (conforme Tabela 58), comprova-se que a avaliação do módulo de armazenamento traduz respostas mais conclusivas com respeito às propriedades de adesividade, pois os resultados apresentados na Figura 77 estão de acordo com àqueles obtidos no equipamento analisador de textura.

Segundo Ceulemans; Vinckier & Ludwig (2002)  $G' \gg G''$ , sugere-se que o sistema está interligado quimicamente, como foi o caso dos géis derivados do ácido acrílico e das formulações  $F_{PR}$ ,  $K_{PR}$  e  $L_{PR}$ ; se  $G' > G''$  o sistema está estruturado por ligações secundárias, tais como, nos géis derivado da celulose; e, se  $G' \leq G''$ , diz-se que as moléculas do sistema estão ligadas apenas por interações físicas, como ocorreu nas formulações  $A_{PR}$ ,  $E_{PR}$  e  $G_{PR}$ .

Correlacionando-se os resultados de bioadesão *in vitro* (Tabela 57) com os dados reológicos oscilatórios (Tabela 59), verifica-se que o predomínio do módulo viscoso ( $G''$ ) nas formulações  $A_{PR}$ ,  $E_{PR}$  e  $G_{PR}$  resultaram em bioadesão *in vitro* inferior ao gel C940-2% devido a organização estrutural de tais sistemas que não favoreceu a adesividade das mesmas ( $\delta > 45^\circ \text{C}$ ).

## ***VI. – Conclusões***

---



## VI. – CONCLUSÕES

---

Diante dos resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- A formulação G (60% DC 5329<sup>®</sup>/ 30% Procetyl AWS<sup>®</sup>/ 10% água) atingiu o objetivo da presente pesquisa em desenvolver um sistema nanoestruturado à base de silicone, como caracterizado nas fotomicrografias em microscópio de luz polarizada.
- Os estudos de estabilidade desta formulação demonstraram que a mesma possui compatibilidade com o pH fisiológico da pele e mantém suas propriedades físico-químicas e estruturais por um tempo maior às demais formulações.
- As técnicas de liberação e de determinação da atividade antioxidante *in vitro* demonstraram que a liberação prolongada e a maximização da estabilidade do palmitato de retinol foram alcançadas.
- O método analítico validado demonstrou-se adequado em determinar o prazo de validade da substância ativa na formulação G.
- O estudo da bioadesão *in vitro* pela avaliação em conjunto com as técnicas de reologia oscilatória e método de força de ruptura à tração em texturômetro permitiram discutir os mecanismos responsáveis pela capacidade de fixação das formulações estudadas na pele.

***VII. – Referências  
Bibliográficas***

---

## VII. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALENIUS, H.; ROBERTS, D.W.; TOKURA, Y.; LAUERMA, A.; PATLEWICZ, G.; ROBERTS, M.S. Skin, drug and chemical reactions. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v.5, n.2, p.e211-e220, 2008.

ALLEN JUNIOR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed S.A., 2005. 775p.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e Aplicações na área Cosmético-Farmacêutica. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português) v.15, n.3, p.96-100, 2003.

ANDREWS, G.P.; LAVERTY, T.P.; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.71, p.505-518, 2009.

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.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos - Uma Abordagem sobre os Ensaios Físicos e Químicos**, Brasília, DF, 2007. 127p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries Temáticas. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, Brasília, DF, v.1, 2004. 52p.

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **JAOCs**, v.75, n.2, p.199-211, 1998.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-Química Biológica**. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 597p.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. 2ª edição. Amsterdam: Elsevier, 1991. 199p.

BAUMANN, L. **Cosmetic dermatology**. New York: McGraw-Hill, 2002. 226p.

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

BENEVENUTO, C.G.; SALA DI MATTEO, M.A.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; GASPAR, L.R. Influence of the photostabilizer in the photoprotective effects of a formulation containing UV-filters and vitamin A. **Photochemistry and Photobiology**, v.86, n.6, p.1390-1396, 2010.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACHOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci**, v.65, n.18-19, p.1865-1874, 1999.

BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M. Using microemulsion for drug delivery. **Pharm. Technol.**, v.3, p.46-54, 1987.

BOLLAG, W. Vitamin A and retinoids: from nutrition to pharmacotherapy in dermatology and oncology. **Lancet**, v.16, p.860-863, 1983.

BOZKIR, A.; YÜKSEL, A. Effects of different ointment bases and penetration enhancers on the in-vitro release of vitamin A palmitate. **Acta Pharmaceutica Turcica**, v.37, n.4, p.94-99, 1995.

BRASIL-ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 2003.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2007, v.1.

BROMBERG, L. TEMCHENKO, M.; ALAKHOV, V.; HATTON, T.A. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels. **International Journal of Pharmaceutics**, v.282, n.1-2, p.45-60, 2004.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.14, n.2, p.54-57, 2002.

BURDUCEA, G. Lyotropic liquid crystals. I.-specific structures. **Romanian Reports in Physics**, v.56, n.1, p.66-86, 2004.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J.P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 55, p. 323-328, 2003.

CALVO, P.; ALONSO, M.J.; VILA-JATO, J.L.; ROBINSON, J.R. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.48, n.11, p.1147-1152, 1996.

CARAFÀ, M.; MARIANECCI, C.; SALVATORELLI, M.; DI MARZIO, L.; CERRETO, F.; LUCANIA, G.; SANTUCCI, E. Formulations of retinyl palmitate included in solid lipid nanoparticles: Characterization and influence on light-induced vitamin degradation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.18, n.2, p.119-124, 2008.

CARLOTTI, M.E.; ROSSATTO, V.; GALLARATE, M.; TROTTA, M.; DEBERNARDI, F. Vitamin A palmitate photostability and stability over time. **Journal of Cosmetic Science**, v.55, n.3, p.233-252, 2004.

CARVALHO, F.C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

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

CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The use of xantan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, p. 1117-1127, 2002.

CHALLAPALLI, P.V.N.; STINCHCOMB, A.L. In vitro experiment optimization for measuring tetrahydrocannabinol skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, n.2, p.329-339, 2002.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1036-1040, 2009.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCALART, J. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long-versus medium-chain glycerides. **Int. J. of Pharm.**, v.158, p.57-68, 1997.

CÔRREA, N.M.; CAMARGO JUNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, n.1, p.73-78, 2005.

DARLENSKI, R.; SURBER, C.; FLUHR, J.W. Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence based practical approach. **British Journal of Dermatology**, v.163, n.6, p.1157-1165, 2010.

DI MAMBRO, V.M.; MARQUELE, F.D.; FONSECA, M.J.V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.17, n.4, p.74-78, 2005.

D'LEÓN, L.F.P. Estudos de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.13, n.4, p.54-61, 2001.

DOW CORNING. <http://www.dowcorning.com>, 2010.

DRAELOS, Z.D. Overview: cosmetics and the art of adornment. **Dermatologic Therapy**, v.14, n.3, p.175-177, 2001.

DRAELOS, Z.D. Cosmeceuticals: undefined, unclassified, and unregulated. **Clinics in Dermatology**, v.27, p.431-434, 2009.

EURACHEM Working Group. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 1998.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5<sup>a</sup>.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4<sup>a</sup>. ed. Editora Andrei: São Paulo, 1988.

FERGUSON, J.; DOVER, J.S. **Photodermatology**. London: Manson Publishing, 2006. 160p.

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

FERREIRA, H.; LÚCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. **Química**, v.99, p.39-51, 2005.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3<sup>a</sup> edição. Edusp: São Paulo, 2003. 732p.

FORMARIZ, T.P.; COCENZA URBAN, M.C.; da SILVA-JÚNIOR, A.A.; DAFLON GREMIÃO, M.P.; de OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras.Cienc. Farm.**, v.41, n.3, p.301-313, 2005.

FOX, C. Skin care and treatment. **Cosmet. Toilet.**, v.110, n.5, p.63-93, 1995.

FRIBERG, S.E.; HILTON, M.L.; GOLDSMITH, L.B. Emulsion are not only two liquids. **Cosmet. Toilet.**, v.102, n.2, p.87-96, 1987.

FU, P.P.; XIA, Q.; BOUDREAU, M.D.; HOWARD, P.C.; TOLLESON, W.H.; WAMER, W.G. Physiological role of retinyl palmitate in the skin. **Vitamins and Hormones**, v.75, p.223-256, 2007.

FUTORYAN, T.; GILCHREST, B.A. Retinoids and the skin. **Nutrition Reviews**, v.52, n.9, p.299-310, 1994.

GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **Int. J. Pharm.**, v.212, p.73-80, 2001.

GOODWIN, J.W. The microstructure and the rheology of surfactant and related systems. In: TADROS, T.F. **Surfactants**. London: Academic Press Inc., 1984. p.133-151.

GOLDSTEIN, M. Recuperação do DNA e fotoenvelhecimento. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.20, n.1, p.48-51, 2008.

GUDAS, L.J.; SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B.; GOODMAN, D.S. **The retinoids: biology, chemistry and medicine**. New York: Raven Press, p.443-520, 1994.

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.

HÄGERSTRÖM, H; EDSMAN, K. Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.1589-1599, 2001.

HÄGERSTRÖM, H. **Polymer gels as pharmaceutical dosage forms: rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery**. Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. n.293, 76p.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Fd Chem Toxic**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de Cosmetologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. 353p.

HILL, R.M. Siloxane surfactants. In: HILL, R.M. **Silicone surfactants**. New York: Marcel Dekker, 1999. p.1-48.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p.299-332.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2010.

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.

JAHN, K.; KRAUSE, A.; JANICH, M.; NEUBERT, R.H.H. Colloidal drug carrier systems. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I. **Topical absorption of dermatological products**. New York: Marcel Dekker, 2002. p.483-493.

JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties **J. Controlled Release**, v.66, n.2-3, p.115-126, 2000.

JOUANDEAUD, M.; BORDES, S.; SOULIE, C.; CLOSS, B. The influence of oligosacharides on skin aging: an alternative to retinoids. **Cosmet. Toilet.**, v.119, n.6, p.67-76, 2004.

KANG, S. The mechanism of action of topical retinoids. **Cutis**, v.75, suppl.2, p.10-13, 2005.

KELLY, H.M.; DEASY, P.B.; BUSQUET, M.; TORRANCE, A.A. Bioadhesive, rheological, lubricant and other aspects of an oral gel formulation intended for the treatment of xerostomia. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, p.391-406, 2004.

KLIGMAN, A.M. Cosmecêuticos: a terceira categoria. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.14, n.4, p.72-76, 2002.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, p.149-157, 2000.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.45, n.1, p.89-121, 2000.

LENAERS, C.; BOUDIER, D.; BARRUCHE, V.; CLOSS, B. Nova abordagem para proteção do DNA. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.19, n.5, p.54-59, 2007.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: MedFarma, 2004. 234p.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H.; MÄDER, K. Semisolid SLN<sup>TM</sup> dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.53, p.155-160, 2002.

LUPO, M.D. Antioxidants and vitamins in cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v.19, n.4, p.467-473, 2001.

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.

MAGDASSI, S. Delivery systems in cosmetics. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.**, v.123-124, p.671-679, 1997.



MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Vitaminas em cosméticos. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.18, n.6, p.52-62, 2006.

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; EROS, I.; DÉKÁNY, I. Preparation and structural determination of lyotropic lamellar liquid crystalline system with pharmaceutical importance. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, v.73, n.2, p.71-76, 2003a.

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; NÉMETH, Zs; PÁLINKÁS, J.; EROS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **International Journal of Pharmaceutics**, v.256, n.1-2, p.95-107, 2003b.

MANSUR, C.A.V. Proteção cosmética originada das profundezas do oceano. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.15, n.4, p.68-72, 2003.

MARTIN, A.N.; BANKER, G.S. Rheology. **Adv. Pharm. Sci**, v.1, p.1-85, 1964.

MARTINDALE - The extra Pharmacopoeia. 31<sup>th</sup> ed. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 1996.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.47, n.2-3, p.165-196, 2001.

MEHTA, S.K.; KAUR, G.; BHASIN, K.K.; MEHTA, N. Microemulsion systems as potential drug delivery vehicles: Recent developments. In: SONGJUN LI. **Current focus on colloids and surfaces**. India: Transworld research network, 2009. p.39-55.

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.

MILÃO, D.; KNORST, M.T.; RICHTER, W.; GUTERRES, S.S. Hidrofilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v.58, n.5, p.325-329, 2003.

MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHYNSKY, J.; LÖBENBERG, R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDS: In vitro release and in vivo skin penetration. **J. Pharm. Pharmaceutical Sci**, v.6, p.238-245, 2003.

MUZZALUPO, R.; TAVANO, L.; TROMBINO, S.; CASSANO, R.; PICCI, N. Lyotropic liquid crystals for topical delivery system. In: SONGJUN LI. **Current focus on colloids and surfaces**. India: Transworld research network, 2009. p.285-302.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.58, n.2, p.343-356, 2004.

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.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 299p.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems - I. Characterization of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, p.231-239, 1998.

OECD. Environment Directorate, Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. **Guidance for the conduct of skin absorption studies**, n.28, 2004. Series on testing and assessment.

OLIVEIRA, J.M. Fundamentos dos radicais livres. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.14, n.2, p.40-45, 2002.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n.1., p.131-138, 2004a.

OLIVEIRA, D.A.G.C.; DUTRA, E.A.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Protetores solares, radiações e pele. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.16, n.2, p.68-72, 2004b.

OLIVEIRA, A.G.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V; EGITO, E.S.T. Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications. In: SONGJUN LI. **Current focus on colloids and surfaces**. India: Transworld research network, 2009. p.57-84.

OLSSON, H.; AXÉLL, T. Objective and subjective efficacy of saliva substitutes containing mucin and carboxymethylcellulose. **Scand. J. Dent. Res.**, v.99, p.316-319, 1991.

PAPAGEORGIOU, S.; VARVARESOU, A.; HATZIANTONIOU, S.; TSIRIVAS, E.; DEMETZOS, C.; PAPAIOANNOU, G. Photostability of retinoids: the influence of container. **Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics**, v.21, n.1, p.49-53, 2007.

PASQUALI, R.C.; BREGNI, C.; SERRAO, R. Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v.37, n.2, p.38-53, 2006.

PASQUALI, R.C.; BREGNI, C.; SERRAO, R. Estructura de las principales fases líquido-cristalinas liotrópicas. **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.3, p.453-457, 2005.

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.

PATEL, R.; PATEL, T.N. Liquid crystals and their application in the field of drug delivery. In: FANUN, M. *Colloids in Drug Delivery*. USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. p.311-336.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.C.; CHIVOT, M. *Estética-cosmética - Cosmetologia - Biologia Geral - Biologia da Pele*. São Paulo: Andrei, 1998. 507p.

PIIRMA, I. *Polymeric surfactants*. New York: Marcel Dekker, 1992. 289p.

PREVIDELLO, B.A.F.; CARVALHO, F.R.; TESSARO, A.L.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N. O pK<sub>a</sub> de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. *Química Nova*, vol.29, n.3, p.600-606, 2006.

PUIZINA-IVIĆ, N. Skin aging. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, v.17, n.2, p.47-54, 2008.

RAMOS, G.I.C.; PÉREZ, D.A. Antioxidants in dermatology. *Dermatologia Cosmética, Médica y Cirúrgica*, v.8, n.4, p.p.272-277, 2010.

REETH, I.V. Silicones – a key ingredient in cosmetic and toiletry formulations. In: BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. New York: Informa Healthcare, 2009. p.371-380.

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.

REÚS, M.; CARMIGNAN, F.; SENNA, E.L.; CAMPOS, A.M. Nanopartículas poliméricas na administração tópica ocular de fármacos. *Lat. Am. J. Pharm.*, v.28, n.1, p. 125-132, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROENIGK, H.H. Treatment of the aging face. *Dermatologic Clinics*, v.13, n.2, p.245-261, 1995.

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.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. *Int. J. Pharm.*, v.175, p.85-94, 1998.

SANTOS, H. Emulsões Cosméticas. São Paulo **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.22, n.4, p.68-72, 2010

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.43, n.2, p.195-203, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHMANN, A.R. Caracterização físico-química e estabilidade de sistemas nanoestruturados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H. Permeability of skin. **Physiological Reviews**, v.51, n.4, p.702-747, 1971.

SCHRAMM, L.L. **Surfactants: fundamentals and applications in the petroleum industry.** New York: Cambridge University Press, 2000. 621p.

SCHUETZE, W.; MUELLER-GOYMANN, C.C. Mutual interactions between nonionic surfactants and gelatin – investigations in cubic liquid crystalline systems and micellar systems. **Colloid Polym Sci**, v.269, p.85-90, 1992.

SCHULLER, R.; ROMANOWSKI, P. Understanding emulsions. **Cosmet Toilet.**, v.113, n.9, p.39-44, 1998.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.43, n.2, p.153-166, 2007.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.S.; WILLIAMS, R.L. Importance of *in vitro* release measurement in topical dermatological dosage forms. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I. **Topical absorption of dermatological products.** New York: Marcel Dekker, 2002. p.283-297.

SHAHIWALA, A.; MISRA, A. Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide. **J. Pharm Pharmaceutics Sci**, v.5, n.3, p.220-225, 2002.

SHIM, J.; KANG, H.S.; PARK, W-S.; HAN, S-H.; KIM, J.; CHANG, I-S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **J. Controlled Release**, v.97, n.3, p.477-484, 2004.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.; SHAH, V. Guidelines for dissolution / *in vitro* release testing of novel / special dosage forms. **Dissolution Technologies**, p.6-15, 2003.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, v.324, n.2-4, p.107-269, 2000.

SINGH,S.; SINGH, R.P. *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. **Food Reviews International**, v.24, p.392-415, 2008.

SNELDERS, H.A. Are liquid crystals living organisms? **Gewina**, v.20, n.3, p.129-142, 1997.

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.

SORG, O.; ANTILLE, E.; KAYA, G.; SAURAT, J-H. Retinoids in cosmeceuticals. **Dermatology Therapy**, v.18, p.289-296, 2006.

SORG, O.; KUENZLI, S.; KAYA, G. Proposed mechanisms of action for retinoid derivatives in the treatment os skin ageing. **J. Cosmet Dermatol**, v.4, p.237-244, 2005.

SORG, O.; TRAN, C.; CARRAUX, P.; GRAND, D.; HÜGIN, A.; DIDIERJEAN, L.; SAURAT, J-H. Spectral properties of topical retinoids prevent DNA damage and apoptosis after acute UV-B exposure in hairless mice. **Photochemistry and Photobiology**, v.81, n.4, p.p.830-836, 2005.

SORG, O.; TRAN, C.; SAURAT, J-H. Cutaneous vitamins A and E in the context of ultraviolet or chemically induced oxidative stress. **Skin Pharmacol**, v.14, p.363-372, 2001.

SOTIRO, K.R. **Estudo da estabilidade química, física e liberação *in vitro* da eritromicina veiculada em sistemas líquido-cristalinos para tratamento da *acne vulgaris***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

STRATIGOS, A.J.; KATSAMBAS, A.D. The role of topical retinoids in the treatment of photoaging. **Drugs**, v.65, p.1061-1172, 2005.

SURMAN, L.L.; BARBOSA, L.M.Q.; SIQUEIRA, S.D.V.S.; SILVA, K.G.H.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Potencialidades de veículos microemulsionados para fotoprotetores físicos. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, n.1, p.133-140, 2009.

TADROS, T.F. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p.227-258, 2004.

TADROS, T.F. **Colloids in cosmetics and personal care**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. v.4, 321p.

TAGAMI, H. Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. **Arch Dermatol Res**, v.300, suppl.1, p.S1-S6, 2008.

TANG, G.; RUSSELL, R.M. Formation of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid from all-trans-retinyl palmitate in humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.2, n.4, p.210-213, 1991.

TESORIERE, L.; D'ARPA, D.; RE, R.; LIVREA, M.A. Antioxidant reactions of all-*trans* retinol in phospholipid bilayers: effect of oxygen partial pressure, radical fluxes and retinol concentration. **Arch Biochem Biophys**, v.343, p.13-18, 1997.

TIERNEY, E.P.; HANKE, C.W. Recent advances in combination treatments for photoaging: Review of the literature. **Dermatologic Surgery**, v.36, n.6, p.829-840, 2010.

TYLE, P. Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH publishers, 1989, p.125-162.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug Disc.*, London, v.4, p.145-160, 2005.

TOSCANO, C.; CAMPOS, R.; BICA, A.; FARINHA, A.R. Desenvolvimento e validação de um sistema de avaliação da liberação *in vitro* do peróxido de benzoíla veiculado em géis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, n.3, p.341-346, 2001.

TSUCHIYA, M.; SCITA, G.; FREISLEBEN, H.-J.; KAGAN, V.E.; PACKER, L. Antioxidant radicals scavenging activity of carotenoids and retinoids compared to alpha-tocopherol. **Meth Enzymol**, v.213: p.460-472, 1992.

TZAPHLIDOU, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. **Micron**, v.35, n.3. p.173-177, 2004.

UNITED States Pharmacopoeia. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2008.

VAHLQUIST, A. What are natural retinoids? **Dermatology**, v.199, suppl.1, p.3-11, 1999.

VARANI, J.; WARNER, R.L.; GHARAEI-KERMANI, M.; PHAN, S.H.; KANG, S.; CHUNG, J.H.; WANG, Z.Q.; DATTA, S.C.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.114, p.480-486, 2000.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **Int. J. Pharm.**, v.258, n.1-2, p.141-151, 2003.

VICENTINI, F.T.M.C.; CASAGRANDE, R.; VERRI-Jr., W.A.; GEORGETTI, S.R.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Quercetin in lyotropic liquid crystalline

formulations: physical, chemical and functional stability. **AAPS Pharm Sci The**, v.9, n.2, p.591-596, 2008.

WANG, Z.; ZHOU, W. Lamellar liquid crystals of Brij 97 aqueous solutions containing different additives. **J. Solution Chem.**, v.38, p.659-668, 2009.

WANG, Y.; FAN, Q.; SONG, Y.; MICHNIAK, B. Effects of fatty acids and iontophoresis on the delivery of midodrine hydrochloride and the structure of human skin. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.10, p.1612-1618, 2003.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.56, p.603-618, 2004.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clin. Pharmacokinet**, v.40, n.2, p.77-84, 2001.

ZUSSMAN, J.; AHDOUT, J.; KIM, J. Vitamins and photoaging: Do scientific data support their use? *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.63, p.507-525, 2010.