

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Avaliação da segurança e estudo da permeação e retenção cutânea de géis
de ácido hialurônico**

PAULA CRESSONI MARTINI

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Avaliação da segurança e estudo da permeação e retenção cutânea de géis
de ácido hialurônico**

PAULA CRESSONI MARTINI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara - SP

2011

Ficha Catalográfica

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

Martini, Paula Cressoni
M386a Avaliação da segurança e estudo da permeação e retenção cutânea de
géis de ácido hialurônico / Paula Cressoni Martini. – Araraquara, 2011
89 f.

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

Orientador: Vera Lúcia Borges Isaac

Co-orientador: Marcos Antonio Corrêa

1. Hialurônico. 2. Citotoxicidade. 3. Toxicidade dérmica. 4. Permeação.
I. Isaac, Vera Lúcia Borges, orient. II. Corrêa, Marcos Antonio, co-orient.
III. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Este trabalho só se tornou possível pela colaboração de algumas pessoas a quem eu gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos

Aos meus pais, Ise e Antonio, pela confiança em mim depositadas, por acreditarem que eu seria capaz e pelo amor incondicional.

À minhas irmãs, Fabiana e Elisa, por estarmos juntas nos momentos difíceis e pelo incentivo.

À meu namorado, Ronaldo, pela paciência, compreensão e carinho que teve comigo em todos estes anos que estamos juntos, mas principalmente nestes dois anos de realização deste trabalho.

Dedico este trabalho à Deus, pela força e pela oportunidade de realizar mais um sonho.

“Ainda que eu fale a língua dos homens e a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria. Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda a ciência se não tiver amor, nada serei”

(1-Coríntios, 13)

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac**, minha orientadora, pela dedicação a este trabalho, por acreditar em mim e no meu trabalho e principalmente pela sua amizade.

Ao **Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa**, meu co-orientador, pelos preciosos conhecimentos transmitidos, por ter abraçado este trabalho com entusiasmo e pela amizade.

A minha querida amiga **Bruna**, pela valiosa ajuda durante estes anos do mestrado.

À **Termofrio** de São Carlos - SP pela doação dos ácidos hialurônicos.

À **Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli** por ceder seu laboratório para os ensaios com culturas celulares.

À **Profa. Dra. Luisa L. Villa** (Instituto Ludwig) e **Profa. Dra. Ana Paula de M. Loureiro** (Universidade de São Paulo - USP) pela doação das células HaCaT e HepG2.

Aos **professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas** por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos meus **amigos da Unesp**: Ana Paula, Carol, Daniele, Danila, Eliete, Fernanda, Flávia Ribeiro, Gabriela, Giovani, Guilherme, Ilza, Jemima, José Ricardo, Letícia, Natália e Paula por toda a amizade, risadas, ajudas e companheirismo.

As minhas amigas de trabalho, Cristina Franzini, Daniele Michelin, Fernanda Flores, Fernanda Gaspi, Lusiane Malafatti, Rosana Catisti que mesmo nos meus momentos de stress estavam prontas a me ajudar e me escutar.

OBRIGADA A TODOS QUE DIRETA OU INDIRETAMENTE AJUDARAM POR MAIS ESTA CONQUISTA!!!

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 Pele | 18 |
| i. Estrutura da pele | 19 |
| 2.1.1.1 Epiderme | 19 |
| 2.1.1.2 Derme | 20 |
| 2.1.1.3 Hipoderme | 20 |
| 2.2. Envelhecimento | 21 |
| 2.3. Ácido hialurônico | 22 |
| 2.4. Permeação cutânea | 25 |
| 2.4.1 Fatores que influenciam a permeação cutânea | 27 |
| 2.5. Segurança de cosméticos | 27 |
| 2.5.1 Controle de qualidade microbiológico | 28 |
| 2.5.2 Testes de toxicidade em cosméticos | 30 |
| 2.5.2.1 Testes <i>in vivo</i> | 30 |
| 2.5.2.1.1 Testes de toxicidade aguda dérmica | 31 |
| 2.5.2.2 Testes <i>in vitro</i> | 31 |
| 2.5.2.2.1 Citotoxicidade pelo método MTT | 31 |
| 2.6 Reologia | 32 |
| 2.6.1 Reologia de polímeros | 33 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 Material | 38 |
| 4.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes | 38 |
| 4.1.2 Equipamentos | 39 |
| 4.1.3 Acessórios e vidrarias | 40 |
| 4.1.3 Material biológico | 41 |
| 4.2 MÉTODOS | 41 |
| 4.2.1 Preparo de géis de ácido hialurônico | 41 |
| 4.2.2 Controle de qualidade microbiológico | 42 |
| 4.2.3 Avaliação da toxicidade dérmica aguda | 44 |
| 4.2.4 Avaliação da atividade citotóxica pelo método MTT | 47 |
| 4.2.5 Reologia | 49 |
| 4.2.6 Estudo da liberação, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> | 49 |
| 4.2.6.1 Escolha da solução receptora | 49 |
| 4.2.6.2 Método de quantificação | 50 |
| 4.2.6.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> | 50 |
| 4.2.6.4 Estudo da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> | 52 |
| 4.2.6.5 Estudo da retenção do estrato córneo <i>in vitro</i> | 53 |
| 4.2.6.6 Estudo da retenção da epiderme e derme <i>in vitro</i> | 53 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 5.1 Preparo de géis de ácido hialurônico | 55 |
| 5.2 Controle de qualidade microbiológico | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3 Avaliação da toxicidade dérmica aguda | 57 |
| 5.4 Avaliação da atividade citotóxica pelo método MTT | 60 |
| 5.5 Comportamento reológico | 62 |
| 5.5.1 Curvas de fluxo | 62 |
| 5.5.2 Limite de escoamento | 64 |
| 5.5.3 Varredura de tensão | 65 |
| 5.5.4 Varredura de frequência | 66 |
| 5.5.5 Fluência e relaxação | 68 |
| 5.6 Estudo da liberação, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> | 69 |
| 5.6.1 Escolha da solução receptora | 69 |
| 5.6.2 Método de quantificação | 69 |
| 5.6.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> | 71 |
| 5.6.4 Estudo da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> | 74 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 76 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |

LISTAS DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1: Imagem da pele humana e subdivisões morfológicas (estrato córneo, epiderme e derme) | 19 |
| Figura 2: Estrutura do ácido hialurônico (ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina). | 23 |
| Figura 3: Vias de penetração do fármaco através do estrato córneo | 26 |
| Figura 4: Célula de difusão do tipo Franz utilizada em testes <i>in vitro</i> de permeação cutânea | 51 |
| Figura 5: Fotografia sistema de difusão do tipo Franz formado por 6 células | 51 |
| Figura 6: Pele do porco sendo preparada para ser utilizada no teste de permeação cutânea | 52 |
| Figura 7: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação de água destilada após 72 horas | 58 |
| Figura 8: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 1 após 72 horas | 58 |
| Figura 9: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 2 após 72 horas | 58 |
| Figura 10: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 3 após 72 horas | 59 |
| Figura 11: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 4 após 72 horas | 59 |
| Figura 12: Curvas de viabilidade celular realizada para os ácidos hialurônicos com massas moleculares de 5 kDa, 11 kDa e 39 kDa utilizando a linhagem HepG2..... | 61 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 13: Curva de viabilidade celular realizada para o ácido hialurônico com massas molecular de 5 kDa, 11 kDa e 39 kDa utilizando a linhagem HaCaT | 61 |
| Figura 19: Curvas de fluxo dos quatro géis de ácido hialurônico | 63 |
| Figura 20: a) Limite de escoamento dos quatro géis de ácido hialurônico, b) Limite de escoamento dos quatro géis de ácido hialurônico em menor escala..... | 65 |
| Figura 21: Varredura de tensão dos quatro géis de ácido hialurônico | 66 |
| Figura 22: a) Varredura de frequência dos quatro géis de ácido hialurônico, b) Varredura de frequência dos quatro géis de ácido hialurônico em menor escala..... | 67 |
| Figura 23: Fluência e relaxação dos quatro géis de ácido hialurônico | 68 |
| Figura 24: Curva analítica do ácido hialurônico usando como solvente o tampão fosfato | 70 |
| Figura 25: Curva analítica do ácido hialurônico usando como solvente a mistura metanol:água | 70 |
| Figura 26: Modelo de cinética de liberação de zero ordem..... | 73 |
| Figura 27: Modelo de cinética de liberação de primeira ordem..... | 73 |
| Figura 28: Modelo de cinética de liberação com aplicação da equação de Higuchi..... | 74 |

LISTAS DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1: Formulação desenvolvida com quatro AH de massas moleculares diferentes | 42 |
| Tabela 2: Características organolépticas dos quatro géis de ácido hialurônico preparados. | 55 |
| Tabela 3: Resultado do controle de qualidade microbiológico dos quatro géis de AH com diferentes massas moleculares | 57 |
| Tabela 4: Valores de tixotropia para os géis de AH | 64 |
| Tabela 5: Valores de compliança (J) e percentagem de recuperação apresentados pelos géis no teste de fluência e relaxação..... | 69 |
| Tabela 6: Valores e percentagens das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) liberadas de AH dos géis.. | 72 |
| Tabela 7: Valores de AH retido no estrato córneo e na epiderme/derme para os géis de AH | 75 |

RESUMO

RESUMO

O aumento da expectativa de vida tem provocado grande demanda por produtos que auxiliem na prevenção do envelhecimento da pele. O ácido hialurônico (AH) está sendo muito utilizado em formulações antienvelhecimento por se acreditar que ele possa atenuar os efeitos que o tempo produz na pele. Porém, para o desenvolvimento de um cosmético, é necessário avaliar o risco potencial dos ingredientes que compõem a formulação, que devem estar em concentração que apresente margem de segurança adequada, sendo importante a realização de teste de absorção, estudo do potencial de risco irritativo e testes de mutagenicidade. O objetivo deste estudo foi desenvolver um gel de ácido hialurônico com alta massa molecular e incorporar ácido hialurônico de massas moleculares menores, realizar o controle microbiológico dos géis, avaliar a toxicidade dérmica aguda e a citotoxicidade, determinar o comportamento reológico das formulações, analisar seu perfil de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*. Foi preparado como gel base, a mistura de água e AH de alta massa molecular e, posteriormente, neste gel formado foram incorporados os AHs de menores massas moleculares. O controle de qualidade microbiológico foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), a avaliação da toxicidade dérmica aguda foi realizada utilizando-se 25 ratos wistar, que foram divididos em 5 grupos com 5 animais em que cada grupo recebeu a aplicação de um dos géis para posterior análise dos resultados. Para a avaliação da citotoxicidade utilizou-se o método colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) descrito por MOSMANN, utilizando-se linhagens celulares de HepG2 (*Human Epidermoide Cancer Cells*) e HaCaT. As amostras tiveram seu comportamento reológico avaliado em reômetro HAAKE. O estudo de liberação, permeação e retenção cutânea foram realizados utilizando células de Franz modificadas. As amostras tiveram o controle microbiológico analisado e apresentaram crescimento de bactérias, fungos e leveduras inferior a 10 UFC/g e ausência de patógenos, valores dentro do recomendado pela Farmacopeia Brasileira. O resultado da toxicidade dérmica provou que os géis não apresentaram irritação dérmica, podendo ser considerados seguros, pois os animais não apresentaram qualquer tipo

de reação eritematosa ou edemosa. Para os resultados do MTT não houve diferenças significativas entre os valores dos grupos teste e do controle negativo ($p < 0,05$), indicando ausência de atividade citotóxica para as linhagens celulares HepG2 e HaCaT com os ácidos hialurônicos com massas moleculares de 5 kDa, 11 kDa e 39 kDa, o que mostrou a segurança do ativo. Os géis apresentaram comportamento reológico viscoelástico, não-Newtoniano e pseudoplástico. Por não apresentarem tixotropia, este produto apresenta dificuldade na espalhabilidade, sendo adequado para incorporação em formulações de aplicações em áreas pequenas do corpo, como a face. O estudo da permeação cutânea *in vitro* dos géis evidenciou o não favorecimento da passagem do ácido hialurônico para a fase receptora, que ficou retido no estrato córneo, epiderme e derme. Para uma formulação antienvhecimento estes resultados são favoráveis, uma vez que se deseja que o ativo não penetre na circulação sanguínea e sim fique retido. A massa molecular do ácido hialurônico interferiu na retenção do ativo, sendo que quanto menor a massa molecular maior a quantidade de ativo retido. Portanto, de acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos, o ácido hialurônico não apresentou irritação dérmica e citotoxicidade, podendo ser considerado seguro para incorporação em formulações cosméticas e, também, apresentou resultados satisfatórios para o estudo de retenção cutânea, ficando retido na pele, podendo colaborar no controle da hidratação da derme e no tônus da pele.

Palavras chave: ácido hialurônico, citotoxicidade, toxicidade dérmica, permeação e retenção cutânea.

ABSTRACT

ABSTRACT

Increased life expectancy has caused a great demand for products that help in the prevention of skin aging. Hyaluronic acid is being used in anti-aging formulations because it is expected that it can decrease the effects of time in the skin. However, for the development of a cosmetic it is necessary to evaluate the potential risk of the ingredients in the formulation that should be with adequate concentration to provide a margin of safety, being important to carry out absorption test, studies of the potential risk of irritating the skin and mutagenicity tests. The aim of this study was to develop a gel of hyaluronic acid with high molecular weight and incorporate hyaluronic acid with small molecular weights in it, analyze the microbiological control of the gels, evaluate the acute dermal toxicity and cytotoxicity, determine rheological characteristics, analyze the release profile, skin permeation and retention *in vitro*. It was prepared like gel base, the mixture of water and AH of high molecular weight, and after was incorporate AH of smaller molecular weight. The quality control microbiological was accomplished in agreement with Brazilian Pharmacopoeia (2010), the evaluate the acute dermal toxicity was made with 25 rat wistar, that were divided in 5 groups with 5 animals in each group received the application from one of the gels for subsequent analyzes of the results. For the evaluation of the cytotoxicity was used the method colorimeter 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) described by MOSMANN (1983), being used cellular lineages of HepG2 (Human Epidermoide Câncer Cells) and HaCaT. The samples had its behavior rheological characteristics. The analyze the release profile, skin permeation and retention were accomplished using cells of Franz modified. The microbiological was in agreement with the specifications of Brazilian Pharmacopoeia (2010). The result of dermal toxicity proved that the gels caused no skin irritation and can be considered safe. The results of MTT showed no cytotoxicity to the HepG2 and HaCaT cells. The gels are non-Newtonian fluids with yield stress being classified as viscoelastic and pseudoplastic. Due to non-thixotropic behavior this product shows a certain difficulty in spread on the skin and is suitable for incorporation into formulations to be applied in small areas of the body, such as, the face. The study of *in vitro* skin permeation of the gels showed that the hyaluronic acid was not able to permeate the skin, however, it was observed that the active was retained in the stratum corneum, dermis and epidermis. These results are favorable to a cosmetic product since it is desirable that the active do not permeates the skin, and do not reach the bloodstream, but it should be retained on it, as was observed. The molecular weight of hyaluronic acid interfered in active retention, the hyaluronic acid with small molecular weight had amount bigger of the active retained than the hyaluronic acid with big molecular weight. Therefore, in accordance with the proposed objectives and the results can be verified that the

Abstract

methodology used in this study proved to be adequate and acceptable, hyaluronic acid is not cytotoxicity and does not cause skin irritation, so it can be considered safe for incorporation into cosmetic formulations. The active also showed satisfactory results for the study of cutaneous retention, remaining retained in the skin and, probably, it could collaborate in controlling the hydration of the dermis and skin tone.

Keywords: hyaluronic acid, cytotoxicity, dermal toxicity, skin permeation and retention.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo que deve ser vivido com qualidade. Hoje, um grande número de pessoas chega aos 80 anos e conforme aumenta a expectativa de vida, aumenta a preocupação com o envelhecimento da pele, o que leva os indivíduos a procurarem produtos que possam diminuir os efeitos do tempo (SOUZA & ANTUNES JUNIOR, 2009).

O ácido hialurônico (AH) tem sido muito utilizado em formulações antienvelhecimento por se acreditar que ele atenua os efeitos que o tempo possa produzir à pele (CHONG et al., 2005).

Por ser constituinte de tecido conectivo da matriz extracelular de animais, o AH liga-se à água, promovendo a elasticidade e tonicidade dos tecidos, fornecendo suplemento viscoelástico para a matriz extracelular do tecido conectivo (LAURENT et al., 1992; MANNA et al., 1999).

Apesar de não desejável, constituintes de uma formulação podem provocar eventos adversos, sendo necessárias avaliações do risco potencial dos componentes que a compõem. A determinação do potencial tóxico é o primeiro passo na análise de risco de um produto e consiste de uma série de estudos de toxicidade. A avaliação de segurança deve preceder a colocação do cosmético no mercado, uma vez que é de livre acesso ao consumidor (ROMANOWSKI & SCHUELLER, 1996; BRASIL, 2003).

Um cosmético precisa apresentar segurança ao usuário, que pode ser estabelecida quando os componentes da formulação estão em concentração que apresente margem de

segurança adequada, sendo importante a realização de teste de absorção, que permite estimar a margem de segurança, estudo do potencial de risco irritativo e testes de mutagenicidade (BRASIL, 2003).

Para o estudo de permeação cutânea, a epiderme, camada da pele que é formada pela camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (estrato córneo), sendo o estrato córneo uma das principais barreiras à penetração de compostos ativos (BARRY, 1983).

Por apresentar unidades de dissacarídeos repetidos, N-acetilglicosamina (GlcNac) e ácido D-glicurônico (GlcUA), o AH pode ser encontrado em diferentes massas moleculares. É estimado que o número de repetições de dissacarídeos possa atingir de 10.000 a 30.000 unidades e, se cada dissacarídeo pesar aproximadamente 400 daltons, o ácido hialurônico pode atingir massas molares de 10^5 a 10^7 Da (LEE & SPICER, 2000; CHONG et al., 2005). Assim, são necessários estudos de liberação, permeação e retenção cutânea com as diferentes massas moleculares de AH para o preparo de formas de aplicação tópica.

O teste de liberação *in vitro* é importante para o desenvolvimento de produtos e, apesar de inicialmente ter sido desenvolvido para formas farmacêuticas sólidas, vem sendo aplicado também para formas não sólidas, como géis. O teste de liberação *in vitro* apresenta relevância no controle de qualidade, é útil para identificar variáveis críticas na produção, escolher entre diferentes formulações, otimizá-las e fazer avaliações de risco (ELIAS & FRIEND, 1975).

Para estudos de permeação e retenção cutânea, a pele humana é frequentemente substituída, devido à pouca disponibilidade deste tipo de material, pela pele de animais de experimentação (SCHMOOK et al., 2001). Estudos mostram que a pele de porco é o modelo mais satisfatório para substituição da pele humana. No Brasil, é o modelo de membrana mais

utilizado devido à disponibilidade e, também, por ser subproduto da indústria alimentícia (RIGG & BARRY, 1990; SCHMOOK et al., 2001).

Ensaio *in vitro* de permeação e retenção cutânea são importantes estudos de administração tópica, objetivando a caracterização do perfil de permeação e retenção do ativo durante o desenvolvimento de uma formulação (BARRY, 1983).

A permeação do composto ativo contido em um produto cosmético deve transpor alguns obstáculos como, por exemplo, o estrato córneo. Porém, em se tratando de preparações cosméticas se deseja que o composto ativo não permeie a circulação sistêmica, mas sim fique retido na pele, sendo necessários testes de retenção cutânea para comprovar sua eficácia antienvhecimento (PRISTA et al., 1995; LEONARDI et al., 2004).

Os fatos citados e a preocupação estética visando uma aparência jovem têm motivado demasiadamente a pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações cosméticas que precisam apresentar segurança (BARATA, 2003).

O AH, por ser um constituinte da matriz extracelular, tem como função manter a elasticidade, hidratação, sustentação e estrutura da pele. Com o aumento da idade a quantidade de AH diminui, contribuindo para o aparecimento de rugas, assim o AH representa um componente importante de produtos tópicos para prevenir o envelhecimento (MANNA et al., 1999). Portanto, o presente trabalho realizou estudos com AH de diferentes massas moleculares, para avaliar a segurança e permeação cutânea, uma vez que, existem no mercado produtos a base de AH sem identificação da massa molecular.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1. Pele

A pele, órgão de revestimento e envoltório do corpo, delimita o meio interno e externo do corpo. Apresenta área total de 2.500 cm² (no nascimento) a 18.000 – 25.000 cm² (no adulto), formando o maior órgão do organismo humano que atinge 16% do peso corporal (HARRIS, 2003).

Um importante indicador funcional da pele é o pH, que se apresenta entre 4,6 – 5,8. O pH levemente ácido da superfície cutânea é devido à produção de ácido lático, que contribui para ação bactericida e fungicida, e as secreções cutâneas apresentam capacidade tamponante (LEONARDI et al., 2004).

A pele é complexa, formada por diferentes estruturas (Figura 1). É constituída por uma porção epitelial, a epiderme, e uma porção conjuntiva, a derme, abaixo da qual se encontra a hipoderme ou tecido subcutâneo, que não faz parte da pele, apenas serve de união com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

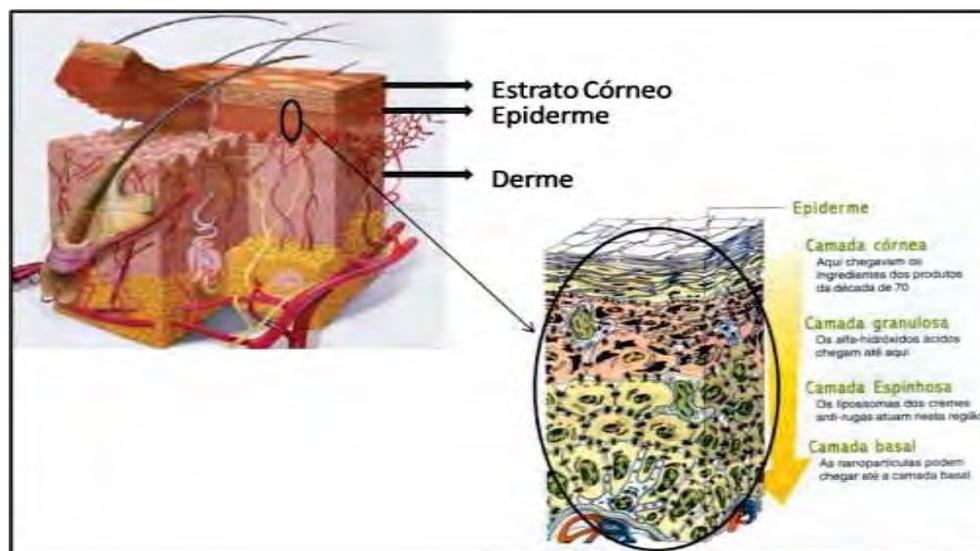


Figura 1: Ilustração da pele humana e subdivisões morfológicas (estrato córneo, epiderme e derme)

Fonte: PRAÇA, 2010

2.1.1 Estrutura da pele

2.1.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa, compacta e impermeável, apresenta poros dos folículos pilossebáceos originários da derme e apêndices da epiderme, não contém rede vascular, sendo nutrida pela permeação de nutrientes oriundos da derme por capilaridade (HARRIS, 2003).

Possui espessura de 0,07 a 0,12 mm, com espessamento nas palmas das mãos e plantas dos pés. É constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que apresenta quatro populações de células, os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (GARTNER & HIATT, 2003), sendo os queratinócitos as células mais

Paula Cressoni Martini

abundantes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Pela citomorfose devido à migração da camada basal para a epiderme, podem ser identificadas cinco regiões morfológicas distintas: camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa, camada basal e camada lúcida (GARTNER & HIATT, 2003, LEONARDI et al., 2004).

Sua principal função é ser barreira protetora do meio externo, impedindo a entrada de substâncias ao organismo e retendo o conteúdo interno (água, eletrólitos e nutrientes). Também produz queratina, responsável pela impermeabilidade cutânea (HARRIS, 2003).

2.1.1.2 Derme

A derme, camada intermediária, localiza-se abaixo da epiderme, possui espessura que varia de acordo com a região observada. É constituída por tecido conjuntivo, fibras de colágenos, fibras elásticas, substâncias amorfas, vasos, nervos, músculo eretor do pelo e anexos cutâneos. Possui duas camadas distintas: a papilar, superficial, e a reticular, mais profunda (BENY, 2000; CORAZZA, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Apresenta células residentes (fibroblastos, macrófagos, histiócitos e mastócitos) e migratórias (leucócitos e plasmócitos), elementos extracelulares (substâncias intersticial e fibrosa), e os anexos cutâneos: glândula sebácea, folículo piloso e músculos, sendo que as glândulas sudoríparas e sebáceas constituem uma das melhores vias de penetração para os medicamentos (PRISTA et al., 1992, PRISTA et al., 1995, PEYREFITTE et al., 1998).

2.1.1.3 Hipoderme

A hipoderme, camada mais profunda, de espessura variável (SAMPAIO & RIVITTI, 2001), é formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É constituída de tecido conectivo gorduroso, chamado tecido adiposo, que

Paula Cressoni Martini

é servido por nervos e vasos sanguíneos. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia. Dependendo da região e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo que, quando desenvolvido, constitui o pânículo adiposo, que modela o corpo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Este tecido está envolvido na regulação da temperatura e termo isolamento, provisão de energia, proteção, suporte e depósito nutricional (HARRIS, 2003).

2.2. Envelhecimento

O organismo humano passa pelas fases do crescimento e desenvolvimento, desde sua concepção até a morte. Como todos os órgãos, a pele envelhece e mudanças ocorridas são de fácil percepção visual (PEYREFITTE et al., 1998).

O envelhecimento tem sido definido pelo acúmulo de modificações moleculares no organismo, pode ser provocado por fatores intrínsecos e extrínsecos (GIACOMONI, 2007).

O envelhecimento causado por fatores intrínsecos ou naturais se inicia por volta dos 35 anos: a pele vai se tornando pálida, fina, frágil e inelástica; sua resposta imunológica é diminuída, assim como a termorregulação, sudorese, cicatrização de feridas, renovação epitelial, espessura dérmica e capacidade metabólica. Ocorre a perda de vasos sanguíneos, colágeno, gorduras, fibras elásticas, diminuição da densidade do folículo piloso e ductos glandulares, fatores que ocasionam o aparecimento de rugas. Os tratamentos tópicos não podem evitar o envelhecimento intrínseco, mas podem reduzir e até retardar seus efeitos, com produtos cosméticos (SOUZA & ANTUNES JUNIOR, 2009).

O envelhecimento extrínseco consiste na exposição da pele a agressões como a radiação ultravioleta, aos produtos químicos, ao tabagismo, a poluição e ao calor. Estes agentes são causadores de modificações moleculares e induzem alterações das propriedades morfológicas e biofísicas da pele. Suas consequências são a degeneração das fibras elásticas (elastose), atrofia da derme com perda de colágeno, pigmentação irregular (hiperpigmentação), ressecamento, telangiectasias (vasos capilares), rugas profundas, mudanças na textura da pele e formação de comedões (BEITNER, 2003; SOUZA & ANTUNES JUNIOR, 2009).

O envelhecimento intrínseco é intensificado pelo envelhecimento extrínseco, o que provoca características diferentes em áreas da pele expostas à radiação ultravioleta, sendo o sol o principal fator de degradação da pele (ENJELKE et al., 1997; JENKINS, 2002).

A senescência é um fator de preocupação, uma vez que nos os últimos cem anos, a população brasileira idosa dobrou, passando de 4% em 1900 para 9% no ano de 2000. Assim, conforme aumenta a expectativa de vida aumenta-se a preocupação com o envelhecimento. Por este motivo, produtos que reduzem os efeitos do tempo têm sido, cada vez mais procurados, tais como o ácido hialurônico (SOUZA & ANTUNES JUNIOR, 2009).

2.3. Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) pertence à classe dos glicosaminoglicanos, devido às suas similaridades estruturais. É um polissacarídeo linear longo de alta massa molecular e consiste de unidades de dissacarídeos repetidos, constituídos por unidades alternadas de N-acetilglicosamina (GlcNac) e ácido D-glicurônico (GlcUA), unidas por ligações do tipo (1-3) e (1-4), como mostra a Figura 2, os glicosaminoglicanos, são carregados negativamente. Porém,

diferenciam-se dos glicosaminoglicanos por não serem sulfatados e sim carboxilados, não estando ligados covalentemente à proteína e não são limitados a tecidos animais (ARMSTRONG et al., 1997; CHONG et al., 2005). A Figura 2 representa a estrutura do AH.

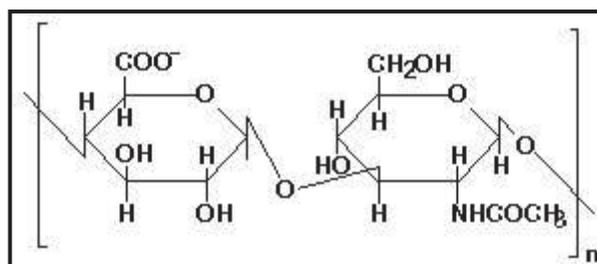


Figura 2: Estrutura do ácido hialurônico (ácido D-glicurônico e N-acetil-glicosamina).

É estimado que o número de repetições de dissacarídeos possa atingir de 10.000 a 30.000 unidades e, sendo que cada dissacarídeo pesa aproximadamente 400 daltons, o ácido hialurônico pode atingir massas molares de 10^5 a 10^7 Da (KOBAYASHI et al., 1994).

A enzima hialuronato sintase é responsável pela síntese de AH no interior da membrana plasmática como um polímero linear (YAMADA & KAWASAKI, 2005).

Estudos mostram que o AH é uma estrutura enovelada, com um pouco de polidispersidade e rigidez; é altamente hidrofílica, forma soluções muito viscosas mesmo em baixas concentrações, o que pode levar à formação de géis (KOBAYASHI et al., 1994; HARDINGHAM, 2004).

Este ácido, quando em solução, tem capacidade de absorver água, o que limita sua flexibilidade. Isso ocorre devido à estrutura helicoidal, mantida por pontes de hidrogênio entre as moléculas do solvente e os grupos carboxila e N-acetil (CHONG & BLANK, 1998).

Devido a esta estrutura, pequenas moléculas como água, eletrólitos e nutrientes podem se difundir, enquanto moléculas grandes, como as proteínas, são excluídas pelo tamanho do

raio hidrodinâmico que apresenta em solução, e a presença de cargas negativas contribuem para que o ácido hialurônico crie um ambiente altamente hidratado (MESA et al., 2002).

Isto significa que pequenas moléculas são atraídas, formando uma capa ao redor do polímero, mas na presença de água, move-se integralmente e a proteína não consegue ultrapassar esta capa. O raio hidrodinâmico pode ser medido no espalhamento de luz (MESA et al., 2002).

Como é encontrado em tecido animal, sua extração pode ocorrer pelo fluído sinovial, pele, tendões, corpo vítreo dos olhos, cordão umbilical e crista de galo. Porém, o produto precisará passar por processo de purificação para retirada de mucopolissacarídeos e proteínas e redução de sua massa molecular. Para minimizar o problema de purificação, desenvolveu-se a produção de AH por via fermentativa, em geral usando micro-organismos do gênero *Streptococcus* sob condições controláveis (BERTOLAMI et al., 1992; MANNA et al., 1999).

Constituinte de tecido conectivo da matriz extracelular de animais, o AH liga-se à água promovendo elasticidade, tonicidade dos tecidos, hidratação da derme e do tônus da pele e, preserva as fibras de colágeno das células. Ajuda, também, a proteger os tecidos subcutâneos por evitar a difusão de certas substâncias (toxinas e bactérias). As propriedades lubrificantes do ácido hialurônico promovem uma suavidade e maciez na aparência da pele (ARMSTRONG et al., 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Por ser não-imunogênico, aplica-se dermatologicamente no aumento de tecidos moles, fornecendo suplemento viscoelástico para a matriz extracelular do tecido conectivo, o que acarreta melhora em problemas de pele como rugas e cicatrizes (MANNA et al., 1999).

O AH serve, ainda, como lubrificante, amortecedor e protetor para as células nos fluídos das articulações. Representa 10% do peso vítreo do olho (KIM et al., 1996).

Existem estudos com outras propriedades associadas ao AH, que sugerem atuação como sistema de liberação controlada de fármacos e antígenos para imunoterapia, liberação de agentes quimioterápicos, aplicações em lentes de contato, copolímero com propriedades antitrombóticas (AEBISCHER et al., 2001, XU et al., 2008).

Atualmente, é uma das substâncias mais utilizadas na dermatologia e medicina estética, pois, com o envelhecimento, ocorre diminuição do nível de ácido hialurônico na pele, levando a seu ressecamento, o que pode ocasionar a formação de rugas. Portanto, o AH previne a desidratação cutânea, proporcionando maciez e elasticidade a pele (BERTOLAMI et al., 1992; SOUZA & ANTUNES JUNIOR, 2009).

Porém, estudos apontam que o ácido hialurônico não penetra na pele (em camadas mais profundas), mas forma uma película superficial, não oleosa, que ajuda a manter a hidratação (BATISTUZZO et al., 2000).

2.4. Permeação cutânea

Durante as últimas décadas foram realizados trabalhos no sentido de esclarecer a permeabilidade cutânea nas camadas da pele. Para ocorrer a permeação, as substâncias contidas num produto cosmético devem transpor alguns obstáculos como, por exemplo, a camada mais superficial da epiderme, o estrato córneo. Depois de atravessá-lo, não há outra barreira à difusão nas camadas seguintes, se a molécula não for retida ou metabolizada no caminho (PRISTA et al., 1995; LEONARDI & CAMPOS, 1997).

Para sofrer partição e se difundir passivamente pela interface veículo/estrato córneo, o ativo precisa ser previamente solubilizado (ANSEL et al., 2000).

A permeação cutânea pode ocorrer através de três vias, conforme mostra a Figura 3.

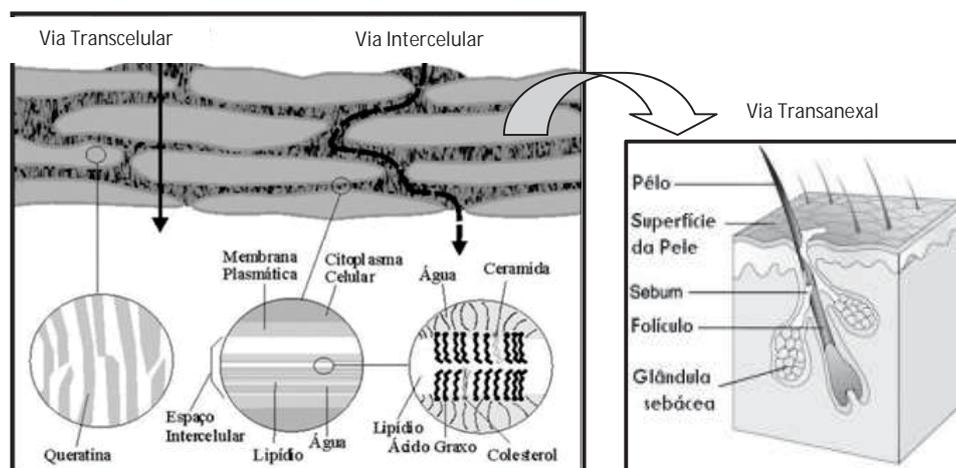


Figura 3: Vias de penetração de compostos ativos através do estrato córneo.

Fonte: adaptado de MARTINS & VEIGA, 2002

- Via transcelular ou por difusão através das células: penetração ocorre através dos corneócitos e matriz intercelular;
- Via intercelular ou por difusão entre células: penetração ocorre entre os corneócitos e pela matriz lipídica;
- Via transanexal ou por difusão através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, e anexos pilosebáceos (ANSEL et al., 2000).

O estudo da permeação cutânea tornou-se essencial para a seleção da formulação, avaliando a permeação do composto ativo e pode ser realizado por técnicas *in vitro* (SASSON, 2006).

2.4.1 Fatores que influenciam a permeação cutânea

O mecanismo de permeação dos compostos ativos é muito complexo, dependendo de fatores diferentes. A permeabilidade pode sofrer alterações se a integridade da pele estiver

Paula Cressoni Martini

alterada, dependendo da quantidade de folículos pilosos, espessura da queratina, grau de hidratação e local de aplicação (BARATA, 2003). A natureza das substâncias, como viscosidade, tamanho das partículas, solubilidade, também podem causar alterações na permeabilidade (LEONARDI et al., 2004). Assim como, o veículo e o excipiente podem interferir na permeabilidade da formulação através do pH e solubilidade que devem ser compatível com o composto ativo, pela liberação do ativo do veículo, e lipossolubilidade (BARATA, 2003).

2.5. Segurança de Cosméticos

Segundo a legislação vigente, cosméticos, produtos de higiene e perfumes são definidos como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, usadas externamente nas diversas partes do corpo, com o objetivo de limpar, perfumar, alterar aparência e/ou corrigir odores e/ou manter em bom estado (BRASIL, 2000).

Apesar de não desejável, podem ocorrer eventos adversas aos cosméticos, sendo necessárias avaliações do risco potencial que resulta do conhecimento dos ingredientes que compõem a formulação. Assim, a avaliação de segurança de cosmético, a probabilidade que um produto não provoque risco de lesão em condições de uso previsíveis, precede a colocação do produto cosmético no mercado (BRASIL, 2003).

Devido à existência de numerosas formulações, as preparações a serem desenvolvidas precisam se destacar como, por exemplo, pela segurança, biocompatibilidade e funcionalidade, sendo importante a realização de testes que comprovem a segurança do produto, que deve estar livre de dano (SPARACIO, 1996).

Dano é o prejuízo à saúde em função de uma substância, o risco é a probabilidade da ocorrência de dano. Portanto, entende-se por segurança de cosméticos a probabilidade que um produto não provoque risco de lesão, ou seja, não provoque danos em condições de uso previsíveis (BRASIL, 2003).

Os riscos dos cosméticos são avaliados por diferentes abordagens, como condições de uso (aplicação regular e prolongada, aplicação ocasional, ou aplicação regular por tempo limitado) e área de contato (específica e limitada, extensa, mucosas, área dos olhos e cabelo). Porém, é preciso entender que não existe segurança total em nenhuma substância química (ROMANOWSKI & SCHUELLER, 1996; BRASIL, 2003).

Devido à ausência de risco e, dadas as dificuldades para estabelecer conceitos de uso previsível, durante o preparo do produto é preciso reduzir os possíveis danos ao usuário, ou seja: formular o produto com ingredientes referenciados (que constam em Compêndios e Legislação); deixar margem de segurança entre o nível de risco e o de uso do produto; informar o usuário de maneira clara, evitando o uso indevido do produto; e seguir as Boas Práticas de Fabricação e Controle (BRASIL, 2003).

2.5.1 Controle de qualidade microbiológico

Os cosméticos pertencem ao grupo dos produtos não estéreis, os quais se admite, desde que limitada, a presença de carga microbiana, tendo em vista as características de sua utilização (PINTO et al., 2010). A avaliação da qualidade microbiológica de cosméticos consiste na determinação da carga microbiana viável e na comprovação da ausência de microorganismos patogênicos, considerados de risco para o usuário (OHARA, 2001; F. Bras., 2010).

O controle de qualidade microbiana de produtos não estéreis, inclui produtos de uso tópico, assegura que a carga microbiana presente no produto, seja no aspecto qualitativo ou quantitativo, não comprometa a qualidade final ou a segurança do usuário. Cargas microbianas elevadas podem comprometer a estabilidade do produto, podendo causar perda da eficácia terapêutica por degradação do princípio ativo ou por alterações de parâmetros físicos fundamental para atividade. Enquanto que, para a segurança do consumidor, micro-organismos saprófitos presentes podem se portar como agentes infecciosos oportunistas e a presença de cepas reconhecidamente patogênicas representam potencial de risco de aquisição de quadro clínico infeccioso (PINTO et al., 2010).

Cada vez mais há necessidade em manter a qualidade dos produtos, os micro-organismos estão distribuídos na natureza, crescem na presença de umidade e nutrientes, e são dispersos através do ar e vetores, como os seres humanos e animais (HERNANDEZ, 1993; EGUCHI, 2001).

Proteger os produtos da contaminação por bactérias, fungos e leveduras desde a fase do seu desenvolvimento até o uso pelo consumidor, chegando ao final do prazo de validade, é uma tarefa que requer bastante empenho (SIQUEIRA, 2004).

Medicamentos e cosméticos necessitam de um controle rígido em seu preparo e manipulação, por serem altamente suscetíveis à contaminação microbiana. Produtos contaminados sofrem alterações, tornando-se ineficazes pela perda de suas propriedades e, comprometem a segurança do usuário final (EGUCHI, 2001; PINTO et. al., 2010).

Portanto, o controle de qualidade microbiológico é um teste de extrema importância a ser realizado em cosméticos, uma vez que a qualidade microbiológica das formulações é fator primordial para se alcançar eficiência e segurança do produto (BRASIL, 2004).

2.5.2 Testes de Toxicidade em Cosméticos

Uma das responsabilidades dos formuladores é assegurar que o cosmético seja seguro nas condições normais ou previsíveis de uso. A determinação do potencial tóxico é o primeiro passo na análise de risco de um produto e consiste de uma série de estudos de toxicidade. Assim, é importante compreender o funcionamento dos testes de segurança (LACHAPELLE, 1994; ROMANOWSKI et al., 1996).

Existem alguns métodos para avaliar a segurança dos cosméticos que podem ser realizadas *in vivo*, com animais, enquanto testes que adotam novas alternativas, sem utilização de animais, são os testes *in vitro* (BAKER & BRUNER, 1997).

2.5.2.1 Testes *in vivo*

Testes *in vivo* investigam o potencial toxicológico do produto quando aplicado em um animal por uma via de exposição que pode ser oral, inalatória ou tópica (BRASIL, 2004).

Não se deve realizar um ensaio *in vivo* na existência de método científico *in vitro* válido, satisfatório, razoável e disponível para obtenção do resultado desejado (BAKER & BRUNER, 1997).

2.5.2.1.1 Testes de toxicidade aguda dérmica

A toxicidade aguda dérmica é aquela produzida por dose única e excessiva de um produto aplicado sobre a pele. Os efeitos da toxicidade dérmica podem causar lesões na pele, sensibilizações (dérmicas), efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (BRASIL, 2003).

Para realizar os testes utilizam-se cobaias, divididas em dois grupos, sendo um grupo tratado com placebo e o outro grupo tratado com o produto em teste. Aplica-se o produto no dorso do animal, uma única vez. Em seguida, oclui-se o local com uma gaze e, após 4 horas retira-se o produto. Procede-se a graduação da lesão (eritema e edema), após a aplicação, seguindo a escala de Draize. Se não forem observadas lesões, a substância pode ser considerada não tóxica (BAKER & BRUNER, 1997; BRASIL, 2003).

2.5.2.2 Testes *in vitro*

Na década de 80, iniciou-se a pesquisa por desenvolvimento de modelos experimentais alternativos para a área cosmética, que se baseiam em métodos *in vitro* que utilizam culturas celulares (de pele, de tumores e fibroblastos) ou modelos matemáticos e em seres humanos. Ensaio de citotoxicidade são usados para estudos de toxicidade *in vitro* (BAKER & BRUNER, 1997; BRASIL, 2003).

2.5.2.2.1 Citotoxicidade pelo método MTT

Ensaio de citotoxicidade são amplamente usados para estudos *in vitro*. O MTT ou 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide é um ensaio de viabilidade celular para determinar a toxicidade após exposição a determinadas substâncias, mas é limitado, uma vez que o MTT pode ser reduzido por alguns reagentes (TULLY et al, 2000; FOTAKIS & TIMBRELL, 2005).

A citotoxicidade é avaliada através da coloração com o corante MTT. O MTT é convertido em um formazan insolúvel e roxo por clivagem do anel de tetrazólio por succinato desidrogenase dentro da mitocôndria. O produto formado é impermeável à membrana celular e

irá se acumular nas células saudáveis (MOSSMANN, 1983). A quantidade dos cristais formados pode ser determinado por espectrofotometria e serve como uma estimativa para o número de mitocôndrias, conseguindo calcular o número de células vivas na amostra. Assim, observa-se a porcentagem de morte celular e a IC_{50} , concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular (DENIZOT & LANG, 1986).

2.6. Reologia

O termo reologia vem do grego *rheos* que significa escoamento e *logos* que significa conhecimento, portanto é o estudo do escoamento ou deformação do produto e fluidez dos materiais quando submetido a uma tensão (LACHMAN et al., 2001; CHIEN, 2005).

As análises reológicas são importantes para cosméticos e produtos farmacêuticos desde sua elaboração, desenvolvimento e avaliação. Devem ser consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico (AULTON, 2005; CORREA et al., 2005).

Os modelos reológicos podem ser denominados de Newtonianos e os não Newtonianos. O fluxo não Newtoniano é caracterizado pelas formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, que são representados por três tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante (ANSEL et al., 2000).

Durante o desenvolvimento de um produto, o comportamento reológico irá caracterizar a facilidade com que o material sairá do frasco ou manterá a forma no frasco, ou como será o comportamento ao aplicar o produto sobre a pele e se o produto manterá suas propriedades durante o prazo de validade (LACHMAN et al., 2001), sendo propriedades a serem

consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001).

Estudos com o comportamento reológico de formulações de uso tópico estão cada vez mais frequentes em pesquisas, devido à estabilidade física de uma formulação ser fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia (CORREA et. al., 2005).

2.6.1 Reologia de polímeros

Polímeros são materiais constituídos de moléculas longas de alta massa molecular compostas por muitas unidades de repetição denominadas “meros”. A elevada massa molecular das macromoléculas faz com que adquiram várias conformações, o que leva ao emaranhado e não emaranhado entre elas (CANEVAROLO JR., 2002; ANSEL et al., 2007).

Em um estado sem tensões, as cadeias poliméricas estarão em uma conformação aleatória ou enovelada. Quando há a aplicação de uma tensão, o polímero é deformado ocorre o alinhamento das cadeias que ficam mais retilíneas, e o sistema se torna mais ordenado. Retirada a tensão, a cadeia do polímero tende a retornar ao seu estado de equilíbrio termodinâmico voltando a ficar emaranhada (NAVARRO, 1997; LUCAS et al., 2001).

O emaranhado é um processo dinâmico, pois as macromoléculas estão em contínuo movimento. O tempo de relaxamento do material após a aplicação de uma tensão ou deformação é determinado pela intensidade e duração dos emaranhados, uma vez que as macromoléculas sempre tenderão voltar ao seu estado de equilíbrio (CALLISTER, 2002).

Desse modo, ensaios oscilatórios são de fundamental importância no estudo do comportamento reológico de polímeros (CANEVAROLO JR, 2002).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver géis de ácido hialurônico com diferentes massas moleculares, realizar o controle microbiológico das formulações, além de avaliar a segurança, determinar suas características reológicas, assim como analisar seu perfil de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente estudo teve por objetivos:

- Desenvolver um gel de ácido hialurônico com alta massa molecular e incorporar ácidos hialurônicos com massas moleculares menores (5 kDa, 11 kDa e 39 kDa);
- Realizar o controle de qualidade microbiológico dos quatro géis de ácido hialurônico com diferentes massas moleculares e determinar o número total de micro-organismos e pesquisa de patógenos, como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar a segurança dos géis de ácido hialurônico de diferentes massas moleculares desenvolvidos através do teste de toxicidade dérmica aguda;
- Avaliar a segurança pela determinação da citotoxicidade do ácido hialurônico com diferentes massas moleculares, em cultura de células HepG2 (competente em metabolizar compostos xenobióticos) e queratinócitos (incompetente em metabolizar compostos xenobióticos), utilizando o ensaio de MTT;

- Analisar os parâmetros reológicos dos géis de ácido hialurônico com diferentes massas moleculares;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do ácido hialurônico, empregando modelo de membrana sintético;
- Avaliar a permeação e retenção cutânea *in vitro* do ácido hialurônico, empregando modelo de membrana animal (pele de orelha de porco).

MATERIAL E MÉTODOS

Paula Cressoni Martini

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 MATÉRIAS PRIMAS, REAGENTES E SOLVENTES

- ✓ 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, SIGMA[®]),
- ✓ ácido glicurônico (SIGMA[®]),
- ✓ ácido hialurônico MM 5 kDa, 11kDa, 39 kDa e superior a 39 kDa (Mapric[®]) que foram cedidos pela empresa Termofrio de São Carlos-SP
- ✓ ácido sulfúrico (EABRA[®]),
- ✓ ágar bismuto sulfito (HIMEDIA[®]),
- ✓ ágar cetrimida (HIMEDIA[®]),
- ✓ ágar Mac Conkey (DIFCO[®]),
- ✓ ágar nutriente (HIMED[®]),
- ✓ ágar Sabouraud (ACUMEDIA[®]),
- ✓ ágar verde brilhante (ACUMEDIA[®]),
- ✓ ágar Vogel Johnson (ACUMEDIA[®]),
- ✓ ágar XLD (HIMEDIA[®]),
- ✓ álcool isopropílico (Merck[®]),
- ✓ antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL) (Sigma[®]),
- ✓ aqua (água destilada),
- ✓ caldo caseína-soja (OXOID[®]),
- ✓ caldo lactosado (MERCK[®]),

- ✓ caldo selenito cistina (ACUMEDIA[®]),
- ✓ caldo tetrionato (OXOID[®]),
- ✓ carbazol (SIGMA[®]),
- ✓ dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich[®]),
- ✓ membrana de 0,45 µm de poro (Millipore),
- ✓ etanol (Merck, Chemis),
- ✓ fita adesiva (Scotch - 3M[®]),
- ✓ hidróxido de sódio (NaOH),
- ✓ meio de cultura MEM (Cultilab[®]),
- ✓ membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm (Sigma-Aldrich[®]),
- ✓ metanol (Merck, Chemis),
- ✓ PBS (phosphate buffer saline),
- ✓ soro fetal bovino (Cultilab[®]),
- ✓ tampão fosfato pH 7,4,
- ✓ tetraborato dissódico (VETEC[®]),
- ✓ tripsina (Gibco[®]).

4.1.2 EQUIPAMENTOS

- ✓ agitador (Minishaker JK, MS1),
- ✓ agitador de tubos (Phoenix AP56),
- ✓ autoclave vertical (Phoenix, AV 5C),
- ✓ balança analítica (Bel Engineering)
- ✓ balança analítica (Gehaka[®]),

- ✓ banho de ultrassom (Unique Ultrasonic Clear) (QUIMIS, Q-335D),
- ✓ câmara de fluxo laminar (VECO[®]),
- ✓ centrífuga (Eppendorf 5810 R),
- ✓ contador de colônias (Phoenix[®]),
- ✓ equipamento de permeação Microette (Hanson Research),
- ✓ espectrofotômetro no UV/VIS,
- ✓ estufa de ar circulante (Marconi[®]),
- ✓ estufa de CO₂ (Shel Lab),
- ✓ estufa para cultura bacteriológica (Fanem-Orion[®]),
- ✓ estufa para cultura bacteriológica (Quimis[®]),
- ✓ leitor de placas (Bio-rad Model 550),
- ✓ peagômetro digital (Quimis[®]),
- ✓ pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL (Eppendorf[®]),
- ✓ reômetro (Haake RS-1), sensor do tipo cone-placa (C35/2°Ti).

4.1.3 ACESSÓRIOS E VIDRARIAS

- ✓ balão volumétrico,
- ✓ bico de bunsen,
- ✓ bisturi,
- ✓ câmaras de Neubauer,
- ✓ garrafas de cultura celular de 25 e 75 cm² (TPP),

- ✓ lâminas de microscopia,
- ✓ lamínulas de microscopia,
- ✓ placas de 96 poços para cultura celular (estéreis) (TPP),
- ✓ tesoura,
- ✓ tubos de 15 mL estéreis (TPP).

4.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ células HepG2 e HaCaT que foram cedidas pela Professora Dra Luisa L. Villa (Instituto Ludwig) e Professora Dra Ana Paula de M. Loureiro (Universidade de São Paulo),
- ✓ membrana biológica (pele de orelha de porco dermatomizada 500 µm), adquiridas do Frigorífico Olho D'água da cidade de Ipuã no estado de São Paulo.
- ✓ ratos wistar fêmeas, com peso de aproximadamente 160 g, fornecidos pelo Biotério do Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, mantidos à temperatura de aproximadamente 20° C com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo de géis de ácido hialurônico

Foi preparado como gel base, a mistura de água e AH de alta massa molecular, sendo pesado primeiramente o ácido hialurônico e a água destilada adicionada aos poucos, com agitação constante até que todo o AH fosse solubilizado. Após completa solubilização e

formação do gel, foi incorporado um dos AH de menores massas moleculares. Os produtos desenvolvidos estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Formulações desenvolvidas com quatro AH de massas moleculares diferentes.

| MM do AH | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3 | Gel 4 |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| 5 kDa | 3% | - | - | - |
| 11 kDa | - | 3% | - | - |
| 39 kDa | - | - | 3% | - |
| Alta MM | 3% | 3% | 3% | 3% |
| Água destilada qsp | 100% | 100% | 100% | 100% |

Legenda: MM – massa molecular, AH – ácido hialurônico.

Os géis tiveram as características organolépticas avaliadas para a verificação do estado em que se encontravam as amostras. Para a avaliação macroscópica observou-se a cor, odor e aspecto, assim como alterações como precipitação e turvação (BRASIL, 2004).

O pH foi verificado através da dispersão da amostra em água recém-destillada na proporção de 1:10 em temperatura ambiente, utilizando-se peagômetro digital para os quatro géis preparados (DAVIS, 1977).

4.2.2 Controle de qualidade microbiológico

Para a pesquisa de micro-organismos viáveis foram transferidos 1 g do gel para 9 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 (1:10). A mistura foi homogeneizada. Foram pipetados 1 mL da amostra e colocados em placas de Petri. O meio de cultura estéril, cerca de 20 mL, foi vertido, fundido e resfriado a temperatura compatível com a fisiologia celular (45-48° C) sobre

a amostra, que foi homogeneizada com movimentos em 8 ou S e esperada a solidificação em temperatura ambiente. A técnica foi realizada em triplicata. Para bactérias, foi usado o meio de cultura ágar nutriente e para fungos e leveduras foi utilizado o meio de cultura ágar Sabouraud.

As placas foram incubadas em estufa a 35° C por 2 dias para a pesquisa de bactérias e a 25° C por 7 dias para a pesquisa de fungos e leveduras. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias e calculado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/g), abrangendo o crescimento em superfície, em profundidade e no interior do gel (F. Bras., 2010).

Para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*, foi transferido 1 g da amostra para o caldo de enriquecimento que foi incubado a 35° C durante 24 a 48 h. Após incubação, foram transferidos 1 mL do caldo para tubo com caldo tetrionato, tubo com caldo selenito cistina e placa com o meio Mac Conkey e incubados em estufa a 35° C por 24 a 48 h. Após incubação, a amostra foi semeada do caldo tetrionato e do caldo selenito cistina para 3 tubos com ágar verde brilhante, 3 placas com ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e 3 placas com ágar bismuto sulfito que foram incubados a 35° C por 24 h. Observou-se o crescimento e as características das colônias (F. Bras., 2010; PINTO et al., 2010).

Para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, 1 g da amostra foi transferido para o caldo caseína-soja e incubado em estufa a 35° C por 24 horas. Após este período, as amostras foram semeadas no ágar Vogel Johnson e sal de manitol, para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e no ágar cetrimida, para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, as placas foram incubadas a 35° C por 24 horas. Após este período observou-se o crescimento de colônias (F. Bras., 2010; PINTO et al., 2010).

O controle de qualidade microbiológico foi realizado com os géis preparados sete dias antes da análise, para garantir a confiabilidade do resultado. O método realizado foi o *pour plate* por proporcionar crescimento de micro-organismos aeróbios e anaeróbios.

4.2.3 Avaliação da toxicidade dérmica aguda

O teste de avaliação da toxicidade dérmica aguda desenvolvido neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico do Centro Universitário Hermínio Ometto - Uniararas, protocolo nº 077/2010 (anexo 1).

Os animais utilizados foram ratos wistar fêmeas, idade ao redor de 40 dias, com peso aproximado de 160 g. Os animais foram adaptados ao biotério de experimentação por 5 dias antes do início dos ensaios biológicos. O manuseio dos animais foi realizado dentro dos princípios éticos, zelando para que não sofressem dores ou vivenciassem angústia durante o período experimental (OECD, 2002). Os animais foram mantidos em livre acesso à alimentação e à água, ambiente com temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade monitorada e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

O teste de avaliação da toxicidade dérmica aguda foi realizado baseado no Guia de Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2003a), que consistiu na aplicação única do produto testado, para avaliar se as diferentes massas moleculares do ácido hialurônico, assim como sua elevada concentração pudessem apresentar riscos irritativos e alergênicos.

Foram utilizados 25 animais, nos quais se realizou a tricotomia, por depilação manual do dorso, para aplicação dos géis 24 horas antes do ensaio. Os animais foram divididos em 5 grupos com 5 indivíduos cada, sendo que o grupo 1 recebeu aplicação tópica de água destilada

como base, o grupo 2 recebeu aplicação tópica do gel de ácido hialurônico de alta massa molecular, o grupo 3 recebeu aplicação tópica do gel de ácido hialurônico de alta massa molecular com ácido hialurônico de massa molecular 5 kDa, o grupo 4 recebeu aplicação tópica do gel de ácido hialurônico de alta massa molecular com ácido hialurônico de massa molecular 11 kDa e o grupo 5 recebeu aplicação tópica do gel de ácido hialurônico de alta massa molecular com ácido hialurônico de massa molecular 39 kDa.

Uma dose de 0,5 g das amostras foi aplicada sobre a pele tricomizada do animal, em uma área pré determinada de 3 cm². Após a aplicação das amostras, foi colocado sobre o local uma gaze oclusiva (compressa de gaze presa por fita crepe) que foi mantido por 4 horas. Ao final do período de exposição, a gaze foi retirada e a região lavada com água destilada, para eliminar os resíduos da amostra testada, de modo a não alterar a resposta existente ou a integridade da epiderme (BRASIL, 2003a).

A observação dos sintomas de irritação cutânea (edema e eritema) nos animais e anotação das respostas foi efetuada após sessenta minutos, 24 e 72 horas após retirar as compressas. Um período de observação mais longo (7 dias após a aplicação da amostra) foi realizado para verificar o caráter reversível ou irreversível da resposta.

As lesões foram classificadas de acordo com o sistema empregado pelo *Federal Hazardous Substances Act of the USA*, criado por DRAIZE et al. (1944).

Valores de graduações foram atribuídos às respostas obtidas no teste de irritação primária da pele. O Quadro 1 atribui pontuação para cada tipo de resposta observada (PINTO et al., 2010)

Quadro 1: Valores atribuídos às respostas obtidas no teste de toxicidade dérmica aguda

| Respostas da pele | Valor |
|--|--------------|
| Formação de Eritema e Escaras | |
| Sem eritema | 0 |
| Eritema muito leve | 1 |
| Eritema bem definido | 2 |
| Eritema moderado a severo | 3 |
| Severo eritema (vermelho beterraba) e leve formação de escara (injúrias em profundidade) | 4 |
| Formação de Edema | |
| Sem edema | 0 |
| Edema muito leve (pouco perceptível) | 1 |
| Edema leve (bordas de área bem definidas, elevação bem definida) | 2 |
| Edema moderado (elevação de \cong 1 mm) | 3 |
| Edema severo (elevação > 1mm ao redor da área exposta) | 4 |

Fonte: PINTO et al., 2010

De acordo com o valor obtido, as substâncias são classificadas de acordo com o Quadro 2 (PINTO et al., 2010):

Quadro 2: Avaliação do índice de irritação

| $\Sigma/8$ = Índice de irritação | Avaliação |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 0,000 | Sem irritação |
| 0,04 – 0,99 | Irritação pouco perceptível |
| 1,00 – 1,99 | Irritação leve |
| 2,00 – 2,99 | Irritação branda |
| 3,00 – 5,99 | Irritação moderada |
| 6,00 – 8,00 | Irritação severa |

Fonte: PINTO et al., 2010

4.2.4 Avaliação da atividade citotóxica pelo método MTT

Para o experimento, foram utilizadas linhagens celulares de HepG2 (hepatoma humano com capacidade de metabolização de xenobióticos), e HaCaT (queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes) que foram cultivadas e mantidas em meio de cultura MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL contendo estreptomicina 250 mg/mL e 1% de L-glutamina 200 mM), e deixadas em estufa a 37° C contendo 5% CO₂. A monitoração do crescimento celular foi realizada com auxílio de microscópio invertido (MORGAN, 1998).

Para o processo de quantificação foram colocados em eppendorf 10 µL de células (HepG2 ou HaCaT) e 90 µL de líquido de Lazarus, corante utilizado para facilitar a contagem das células. Retirou-se então uma alíquota de 10 µL, colocada na câmara de Neubauer para a sua quantificação. Foram plaqueadas, então, 1x10⁶ células de linhagens tumorais e

queratinócitos em microplacas de 96 poços para cada linhagem. Após plaqueamento, foram incubadas por 24 h em estufa a 37° C contendo 5% CO₂.

Ao fim da incubação de 24 h, dividiu-se a placa para que fosse possível colocar 12 poços com controle negativo, 12 poços com controle positivo e no restante dos poços fossem colocados diferentes concentrações da amostra. Usou-se como controle negativo o meio de cultura MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL contendo estreptomicina 250 mg/mL e 1% de L-glutamina 200 mM). Para o controle positivo usou-se uma solução a 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), pois esta substância é sabidamente tóxica para as células (YU & QUINN, 1998). As linhagens foram tratadas com concentrações decrescentes da amostra (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 mg/mL). Após o tratamento, as placas foram incubadas por 24 h em estufa a 37° C contendo 5% CO₂.

Para a avaliação da citotoxicidade, utilizou-se o método colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) descrito por MOSMANN (1983).

Após o período de incubação, adicionaram-se aos poços de cultivo celular, 100 µL de MTT na concentração de 1 mg/mL que foram incubadas por mais 3 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C.

Após este período, acrescentou-se álcool isopropílico e as placas foram agitadas durante 5 minutos. Em seguida, a absorvância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a 560 nm. A absorvância obtida das células controle, não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os experimentos foram realizados em triplicatas e a análise estatística foi feita pelo teste ANOVA (BRASIL, 2004).

4.2.5 Reologia

As amostras tiveram seu comportamento reológico avaliado em reômetro HAAKE modelo RHEOSTRESS RS-1 utilizando o sensor do tipo cone-placa (C35/2 °Ti) e os dados analisados pelo *software* Rheowin 3.5 (RIBEIRO et al., 2004; ISAAC et al., 2008).

Os géis foram submetidos à análise do comportamento reológico completo, no qual foram determinadas as propriedades de fluxo, a tixotropia e a área de histerese, 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, na temperatura de 32° C (RIBEIRO et al., 2004; ISAAC et al., 2008).

A rampa de tensão com limite de escoamento foi analisada usando uma tensão de cisalhamento de 0,0-10 Pa, por 300 segundos, com dados a cada segundo, a 32° C e a varredura de tensão foi realizada mantendo a frequência constante (1Hz) e tensão variando de 0 a 50 Pa, a 32° C.

Para a varredura de frequência, foi mantida a tensão constante (0,5 Pa) e a frequência variando de 0,1 a 100 Hz, a 32° C. A fluência e relaxação (ou *Creep and recovery*), foram analisadas com tensão de fluência de 1 Pa por 100 segundos e relaxação por mais 100 segundos a 32° C (RIBEIRO et al., 2004; ISAAC et al., 2008).

4.2.6 Estudo da liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

4.2.6.1 Escolha da solução receptora

O AH foi solubilizado em diferentes solventes e sistemas solventes para escolha do melhor solubilizante, que constituiria a solução receptora. Para isso, foram usados a água, o tampão fosfato pH 7,2, o metanol puro e o metanol a 50%.

A solução receptora escolhida foi o tampão fosfato pH 7,2 preparada segundo a Farmacopeia Brasileira (2010). O pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio a 1 N.

4.2.6.2 Método de quantificação

O método de quantificação do ácido hialurônico foi realizado segundo a Farmacopeia Portuguesa (2000). As amostras foram preparadas, reagidas com carbazol e medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm.

A linearidade do método foi realizada, utilizando-se seis concentrações diferentes: 65, 52, 39, 26, 13 e 6,5 µg/mL. Segundo a legislação vigente, linearidade é a capacidade do método analítico, de comprovar que o resultado obtido é diretamente proporcional à concentração do analito, dentro de um intervalo específico, sendo determinada a análise de no mínimo 5 concentrações diferentes e o coeficiente de correlação seja igual ou maior que 0,99 (BRASIL, 2003b).

Foram elaboradas curvas analíticas utilizando como diluente o tampão fosfato e a mistura a 50% de metanol:água. Para garantir a linearidade do método repetiu-se 7 vezes a metodologia para cada diluente utilizado.

4.2.6.3 Estudo de liberação *in vitro*

Para o estudo de liberação, foram utilizadas células de Franz modificadas, com uso de equipamento com seis células de difusão, como ilustram as Figuras 4 e 5.

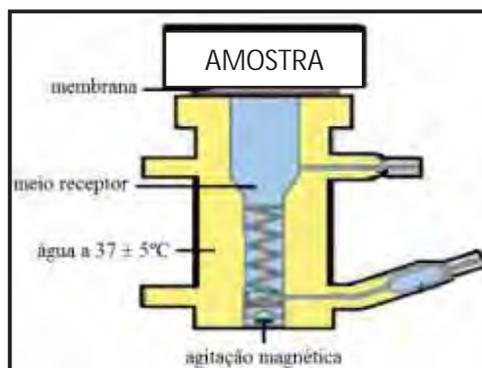


Figura 4: Célula de difusão do tipo Franz utilizada em testes *in vitro* de permeação cutânea (modificado de www.hansonresearch.com).



Figura 5: Fotografia do sistema de difusão do tipo Franz formado por seis células

A solução receptora foi mantida a 37° C com banho termostatizado de água circulante e constante agitação a 300 rpm. As membranas sintéticas de celulose foram previamente tratadas com água destilada fervida para depois serem colocadas sobre a célula de difusão, mantendo-as em contato com o meio receptor e aproximadamente 200 mg de amostras do gel foram adicionadas (SHAH et al., 1999).

O teste foi realizado em quadruplicata para os géis utilizados neste estudo. O meio receptor foi coletado após 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas e tiveram as concentrações determinadas.

4.2.6.4 Estudo da permeação e retenção cutânea *in vitro*

Foram usadas membranas biológicas obtidas da região externa da pele da orelha de porcos, jovens e albinos, logo após o abate.

As orelhas foram selecionadas (descartou-se as partes com lesões, aranhões e manchas), lavadas (retirado o excesso de água com papel absorvente), cortado o excesso de pelos, dissecadas (com pinça e bisturi) e posteriormente dermatomizadas com espessura de aproximadamente 500 μm (SCCP, 2006), como ilustra a Figura 6.



Figura 6: Pele do porco sendo preparada para ser utilizada no teste de permeação cutânea.

As peles dermatomizadas foram acondicionadas em filme plástico, papel alumínio e mantidas em congelador até o momento do uso, não ultrapassando um período de 30 dias (BILLICH et al., 2004).

Para o estudo da permeação, o sistema de difusão utilizado, assim como as condições, foram as mesmas do teste de liberação. Os fragmentos da pele de porco dermatomizados foram colocados sobre as células de difusão, com a epiderme voltada para o compartimento doador e a derme em contato com a solução receptora, tendo o cuidado para não formar bolhas, e colocou-se 200 mg do gel sobre o estrato córneo. O meio receptor foi coletado após 2, 4 e 8 horas e a concentração determinada. O experimento foi realizado em quadruplicata (SCCP, 2006).

4.2.6.5 Estudo da retenção no estrato córneo *in vitro*

Após a permeação cutânea, as peles foram retiradas da célula de difusão, o excesso de gel foi removido com água destilada, e secou-se com papel absorvente. As peles foram, então, submetidas ao procedimento de *tape stripping*.

Fixou-se a pele em suporte de isopor para que a área de exposição fosse submetida à extração do estrato córneo, em que 12 fitas adesivas foram pressionadas e puxadas sobre a pele, a primeira fita foi desprezada para retirar o excesso do produto e as fitas restantes foram transferidas para tubos contendo 2 mL de metanol e 2 mL de água destilada. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e após foram sonicados por 15 minutos em banho de ultrassom para rompimento das células (HADGRAFT, 2004).

Determinou-se a concentração de AH no sobrenadante. O experimento foi realizado em quaduplicata.

4.2.6.6 Estudo da retenção da epiderme e derme *in vitro*

Após a retirada do estrato córneo, a área da pele exposta à permeação foi delimitada, recortada e picada com bisturi e tesoura. Os fragmentos foram recolhidos em tubos contendo 2 mL de metanol e 2 mL de água destilada e, então, submetidos à sonicação por 30 minutos em banho de ultrassom, para rompimento das células (HADGRAFT, 2004).

Determinou-se a concentração de AH no sobrenadante que foi retido na derme e epiderme. O experimento foi realizado em quaduplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo dos géis de ácido hialurônico

O AH, quando em solução aquosa, tem capacidade de intumescimento, característica de substâncias poliméricas. Assim, a mistura do ácido hialurônico de alta massa molecular e a água, como era esperado, resultou na formação do gel base. Nesta mistura, foram incorporados, individualmente outros três ácidos hialurônicos com massas moleculares menores, obtendo-se Gel 1 (pela incorporação de AH de 5 kDa), Gel 2 (pela incorporação de AH de 11 kDa) e Gel 3 (pela incorporação de AH de 39 kDa), sem que apresentasse mudanças aparentes à formulação.

A interação entre as moléculas de água e o grupo carboxila e N-acetila conferiram ao polímero a capacidade de retenção de água e certa rigidez, limitando sua flexibilidade (HARDINGHAM, 2004). As características organolépticas dos géis estão na Tabela 2.

Tabela 2: Características organolépticas dos quatro géis preparados.

| | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3 | Gel 4 |
|-----------|---|---|---|---|
| pH | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 |
| Coloração | Amarelado | Amarelado | Incolor | Incolor |
| Odor | Inodoro | Inodoro | Inodoro | Inodoro |
| Aparência | Gel sem evidências de contaminação após 7 dias. | Gel sem evidências de contaminação após 7 dias. | Gel sem evidências de contaminação após 7 dias. | Gel sem evidências de contaminação após 7 dias. |

Os géis preparados apresentaram pH 6,5, não sendo preciso sua correção, pois os valores estão compatíveis com o pH cutâneo, podendo estar entre 5,5 e 6,5.

5.2 Controle de qualidade microbiológico

Foram considerados dois aspectos para a definição de limites microbianos, quanto à segurança para o usuário e quanto à tolerância quantitativa da carga microbiana saprofítica, para manter a integridade do produto (PINTO et al., 2010).

Segundo as recomendações oficiais de limite de contaminação microbiana para produtos cosméticos, como géis, as amostras encontraram-se dentro dos parâmetros preconizados para cosméticos do tipo II, sendo aprovado para o controle microbiológico (F. Bras., 2010; BRASIL, 1999).

A Tabela 3 apresenta os resultados da avaliação microbiológica dos quatro géis estudados e, como pode ser observados todos estão dentro dos limites preconizados pela literatura para a contagem de micro-organismos viáveis e para a pesquisa de patógenos (F. Bras., 2010).

Tabela 3: Resultado do controle de qualidade microbiológico dos quatro géis de AH com diferentes massas moleculares

| Micro-organismos | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3 | Gel 4 | Recomendado* |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|------------------|
| Bactéria (UFC/g) | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | <10 ³ |
| Fungos/ Leveduras (UFC/g) | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | <10 ² |
| <i>Salmonella</i> sp. | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| <i>Escherichia coli</i> | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| <i>P.aeruginosa</i> | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| <i>S. aureus</i> | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |

*Recomendado pela F. Bras., 2010.

5.3 Avaliação da toxicidade dérmica aguda

Uma das responsabilidades dos formuladores é assegurar que o cosmético seja seguro nas condições normais ou previsíveis de uso. A avaliação de segurança precede a colocação do produto cosmético no mercado (BAKER & BRUNER, 1997; BRASIL, 2003).

Durante o teste de toxicidade em cosméticos é importante observar a formação de edema, eritema e escaras (PINTO et al., 2010). Neste caso, os valores de graduações foram atribuídos às respostas obtidas no teste de irritação primária da pele (PINTO et al., 2010).

Os valores obtidos foram iguais a zero, pois nenhum dos animais tratados, tanto no grupo tratado apenas com água destilada, quanto nos grupos tratados com ácido hialurônico com diferentes massas moleculares apresentaram sinal de eritema e/ou edema no local da aplicação, como pode ser observado nas Figuras 7 a 11.

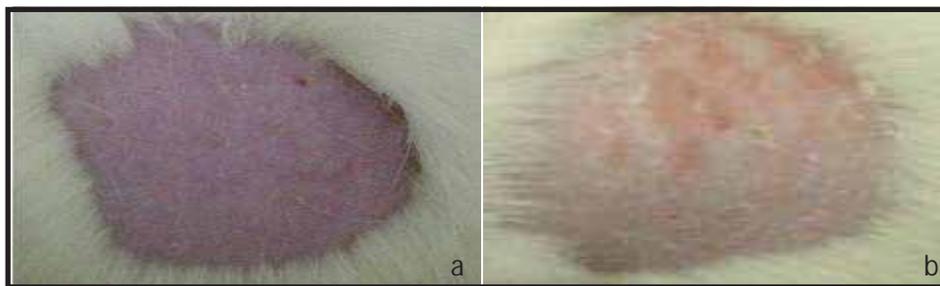


Figura 7: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação de água destilada após 72 horas

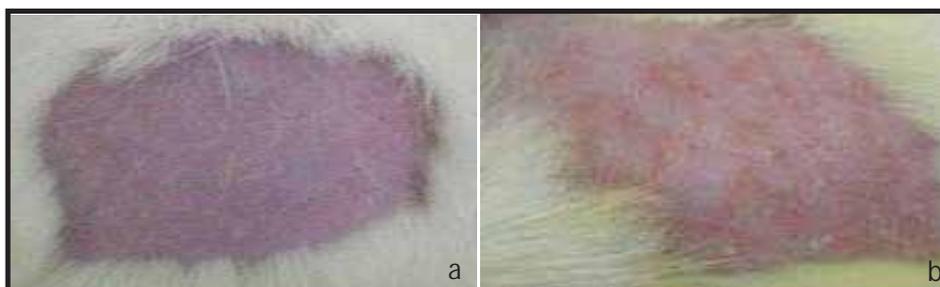


Figura 8: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 1 após 72 horas



Figura 9: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 2 após 72 horas



Figura 10: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 3 após 72 horas

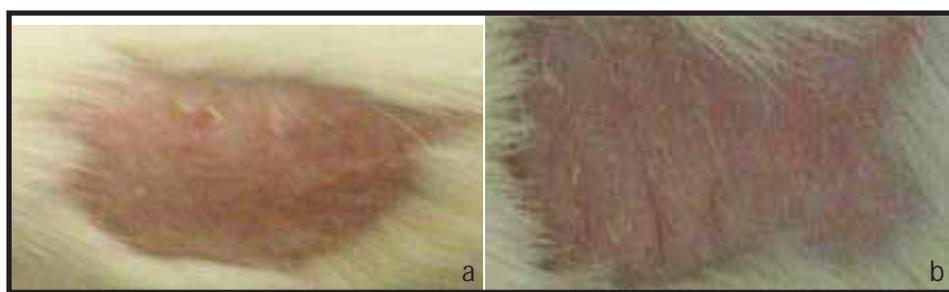


Figura 11: a) Dorso do rato após a depilação manual e b) dorso do rato que recebeu aplicação do Gel 4 após 72 horas

A pele dos animais permaneceram íntegras após 60 minutos, 24 horas, 72 horas e 7 dias das aplicações e análises. Após estes períodos nenhum dos animais possuía qualquer tipo de reação eritematosa ou edematosa, o que significa que as amostras não possuem efeito irritante tardio. Dessa forma, os géis de ácido hialurônico não apresentaram irritação dérmica, sendo considerados seguros, e podendo ser aplicados até mesmo em área sensível, como a face.

O teste de aplicação tópica única é importante para se ter informações a respeito do produto, conseguindo detectar irritantes fortes e moderados em que uma única aplicação é suficiente para causar uma resposta (PINTO et al., 2010).

5.4 Avaliação da atividade citotóxica pelo método MTT

A avaliação da citotoxicidade pode ser usada para prever a toxicidade em humanos e para seleção dos produtos químicos (SCHEERS et al., 2001).

Para o teste foi utilizado o método colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) descrito por MOSMANN (1983), que consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente viáveis.

A medida da citotoxicidade do ácido hialurônico com diferentes massas moleculares (5 kDa, 11 kDa e 39 kDa) foi realizada pela viabilidade celular calculada em relação ao controle de células, correspondente a 100%. A Figura 12 representa as curvas de viabilidade celular realizadas utilizando a linhagem HepG2 e a Figura 13 representa as curvas de viabilidade celular realizadas utilizando a linhagem HaCaT.

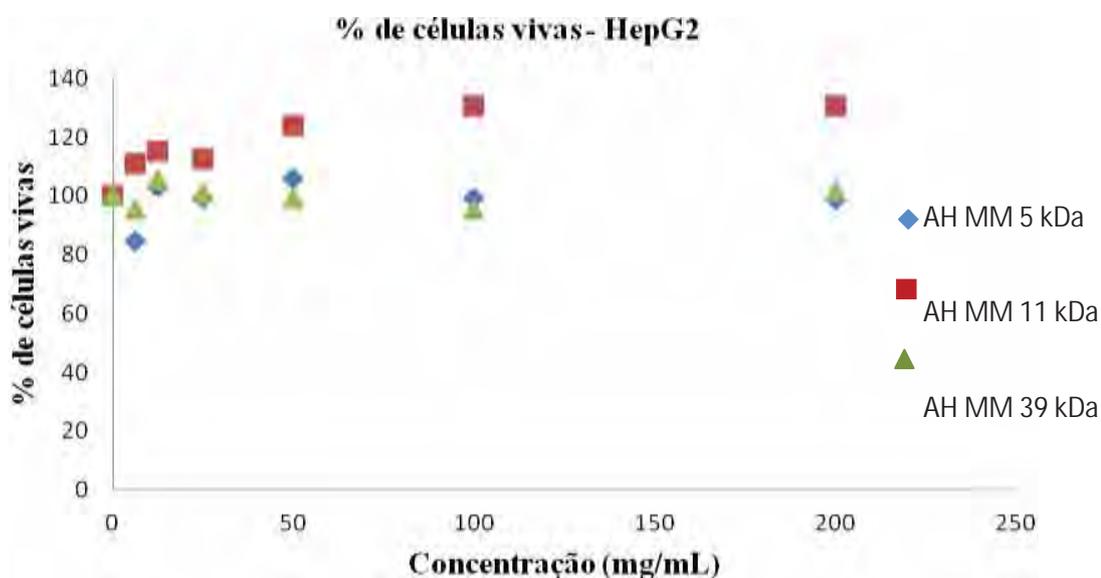


Figura 12: Curvas de viabilidade celular realizada para os ácidos hialurônicos com massas moleculares de 5 kDa, 11 kDa e 39 kDa utilizando a linhagem HepG2.

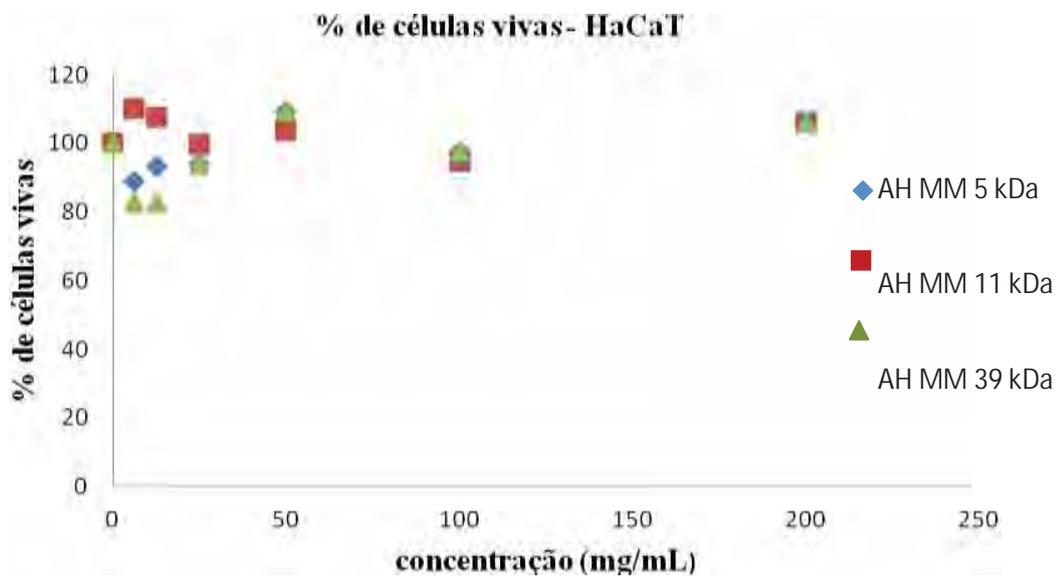


Figura 13: Curva de viabilidade celular realizada para o ácido hialurônico com massas molecular de 5 kDa, 11 kDa e 39 kDa utilizando a linhagem HaCaT.

Os poços contendo controle negativo e os poços contendo as diferentes concentrações da amostra foram levados para leitura em leitor de placas e suas absorvâncias foram comparadas. Após leitura e comparação dos valores das absorvâncias dos poços teste e dos poços controle foi evidenciado que não houve diferenças significativas entre os valores dos grupos teste e do controle negativo ($p < 0,05$), indicando ausência de atividade citotóxica para as linhagens celulares HepG2 e HaCaT nas doses testadas.

Este resultado mostra a segurança do ativo para utilização em cosméticos, uma vez que a avaliação da citotoxicidade pode ser utilizada como uma forma preliminar de estudar a toxicidade do ativo para o ser humano. A ausência de toxicidade do ativo pode ser devido ao fato de que o AH é um dos principais glicosaminoglicanos da derme.

5.5 Comportamento reológico

Para a determinação do comportamento reológico foram plotadas as médias dos valores obtidos, em triplicata, para todas as curvas e reogramas.

5.5.1 Curvas de fluxo

As curvas de fluxo para as amostras analisadas neste trabalho são apresentadas pela Figura 19. Os quatro géis de ácido hialurônico apresentaram comportamento não-Newtoniano. De acordo com a Lei de Newton, não-Newtoniano é todo fluído cuja relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento não é constante, considerando a temperatura e a pressão constante (SCHRAMM, 2006).

O valor de cedência representa a mínima tensão necessária para que o produto esorra ou flua. Assim, pode-se afirmar que os géis 2, 3 e 4 apresentaram uma pequena resistência para iniciar o fluxo, mas ao atingir a tensão de 0,5 Pa, os produtos fluem. Do ponto de vista prático, durante o espalhamento do produto na pele, eles podem apresentar pequena dificuldade na extrusão e na espalhabilidade até que seja atingido o valor de cedência.

Os géis apresentaram comportamento anti-tixotrópico, pois foi possível verificar a presença de área de histerese entre as curvas de subida ($0-100\text{ s}^{-1}$) e descida ($100-0\text{ s}^{-1}$), sendo que os valores de tensão de cisalhamento exibidos pelos géis na curva de descida foram superiores ao da curva de subida (SCHRAMM, 2006).

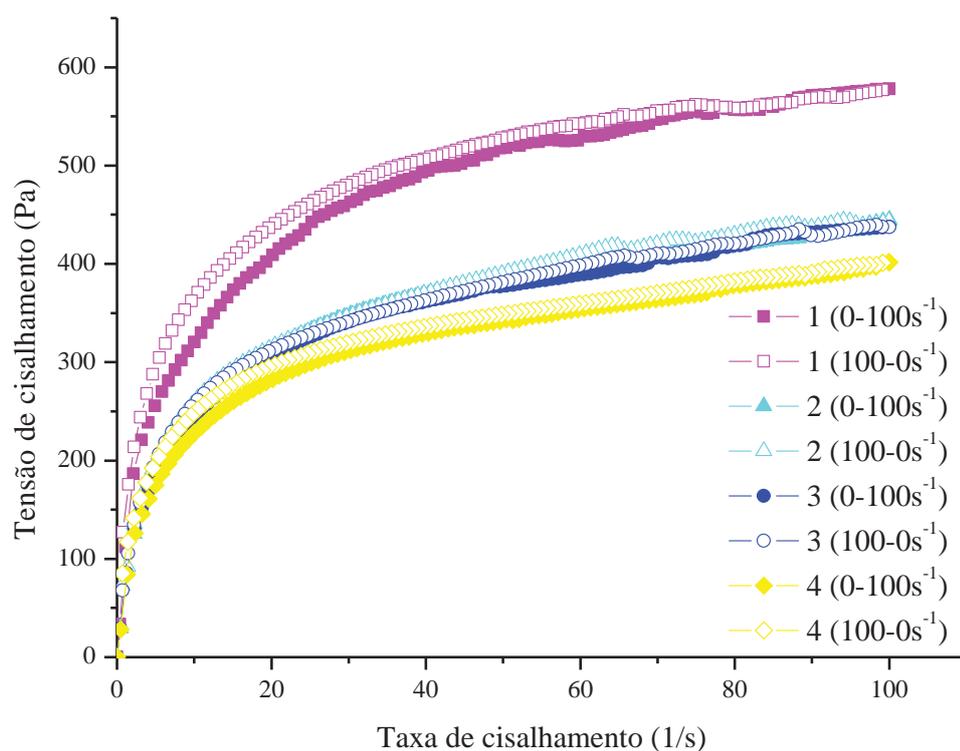


Figura 19: Curvas de fluxo dos quatro géis de ácido hialurônico.

A tabela 4 mostra os valores de tixotropia, esses valores representam o tempo que o sistema permanece desorganizado após o cisalhamento. Esse tempo parece estar relacionado com a liberação do ativo.

Tabela 4: Valores de tixotropia para os géis de AH

| Géis | Valores de tixotropia |
|-------------|------------------------------|
| 1 | -2086,5 |
| 2 | -823,5 |
| 3 | -966,0 |
| 4 | -721,9 |

5.5.2 Limite de escoamento

O ensaio para avaliação do limite de escoamento permite a avaliação do *yield stress*, ou seja, a tensão necessária para que a amostra comece a fluir. Neste caso, observa-se pela Figura 20 que todos os géis necessitam de tensão próximo a 0,05 Pa para que comecem a se deformar. Entretanto, o gel 1 que, de acordo com as curvas de fluxo, foi o que apresentou maior viscosidade, foi a formulação que sofreu menor deformação em comparação as outras.

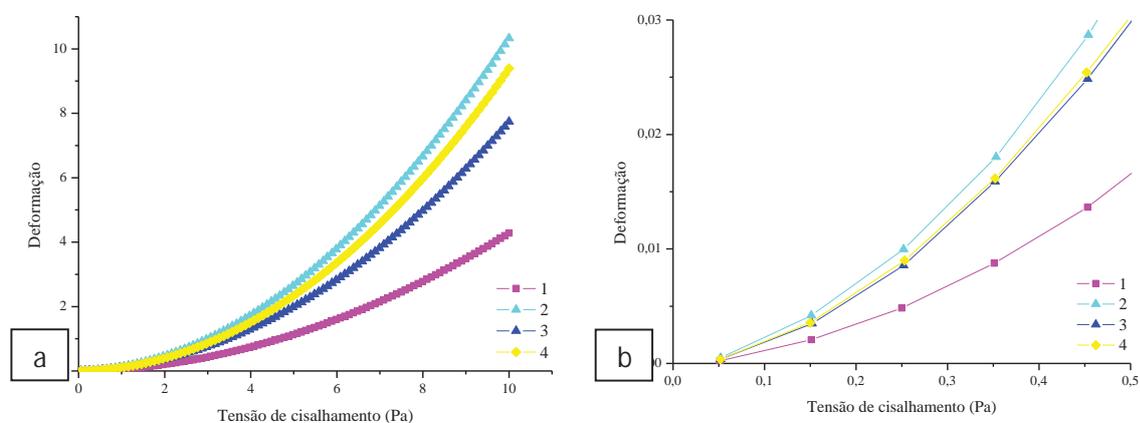


Figura 20: a) Limite de escoamento dos quatro géis de ácido hialurônico, b) Limite de escoamento dos quatro géis de ácido hialurônico em menor escala.

5.5.3 Varredura de tensão

A varredura de tensão é um ensaio preliminar que permite avaliar a faixa de tensão em que a amostra está em condição de análise adequada, ou seja, que não sofre deformações em sua estrutura, apresentando seu comportamento real (BARRY & WARBURTON, 1968).

Pela Figura 21 observou-se que esta formulação apresenta um comportamento linear na faixa de tensão variando entre 0,1 e 10 Pa. Portanto, nas análises posteriores a este ensaio que foram efetuadas, a tensão escolhida para os estudos foi de 1 Pa, ou seja, valor de tensão dentro da faixa linear de viscoelasticidade.

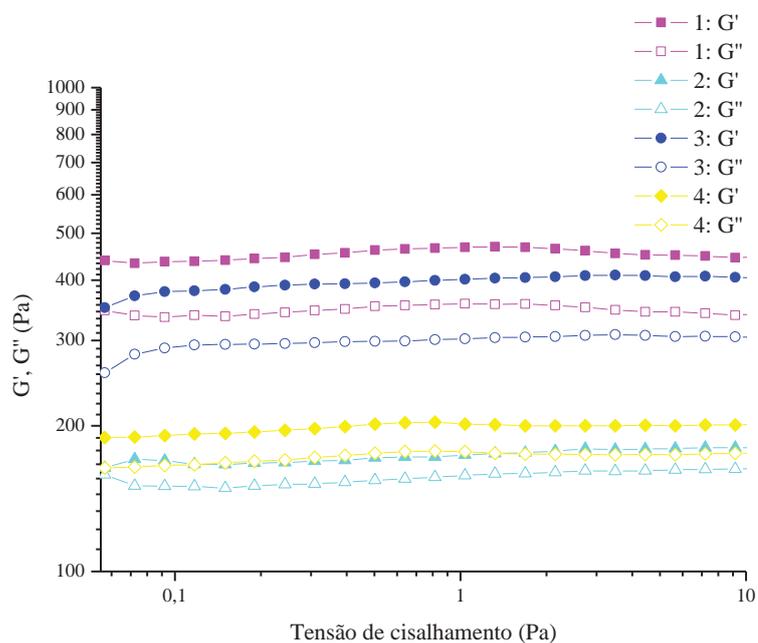


Figura 21: Varredura de tensão dos quatro géis de ácido hialurônico.

5.5.4 Varredura de frequência

No ensaio de varredura de frequência, conforme ilustra a Figura 22, as amostras apresentaram valores de G' maiores que G'' , com exceção do Gel 1, entretanto, com o aumento do cisalhamento ocorreu uma inversão na característica desta formulação, tornando-se mais elástica do que viscosa, uma vez que G' torna-se maior que G'' , como as outras.

Como G' é maior que G'' , pode-se afirmar que as formulações são estáveis, pois apresentaram módulo elástico (ou de armazenamento) maior que o módulo viscoso (ou de perda) como pode ser observado na Figura 22.

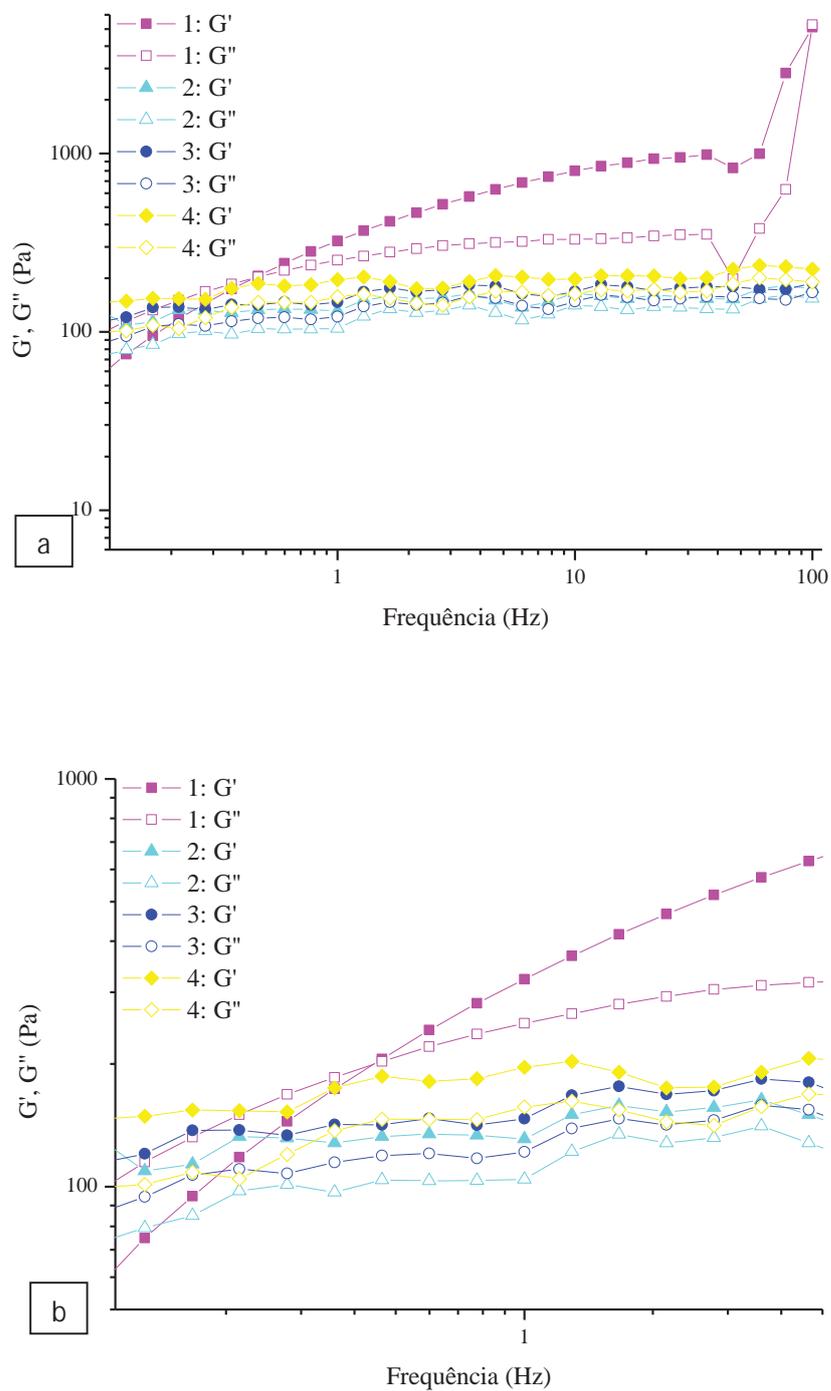


Figura 22: a) Varredura de frequência dos quatro géis de ácido hialurônico, b) Varredura de frequência dos quatro géis de ácido hialurônico em menor escala.

5.5.5 Fluência e relaxação

No ensaio de fluência e relaxação, Figura 23, os géis apresentaram comportamento viscoelástico, sendo descrito pelo modelo matemático de formulações com apenas uma unidade viscoelástica, isso significa que esta formulação quando cessado o cisalhamento tem mais facilidade de recuperação, o que é comprovado pela ausência anti-tixotropia nas curvas de fluxo dos géis. A pequena recuperação observada na relaxação deste teste é devido à pequena diferença entre os valores dos módulos elásticos e viscosos destas formulações, que apesar de serem mais elásticas apresentam módulos viscosos com valores muito semelhantes, conforme Tabela 5.

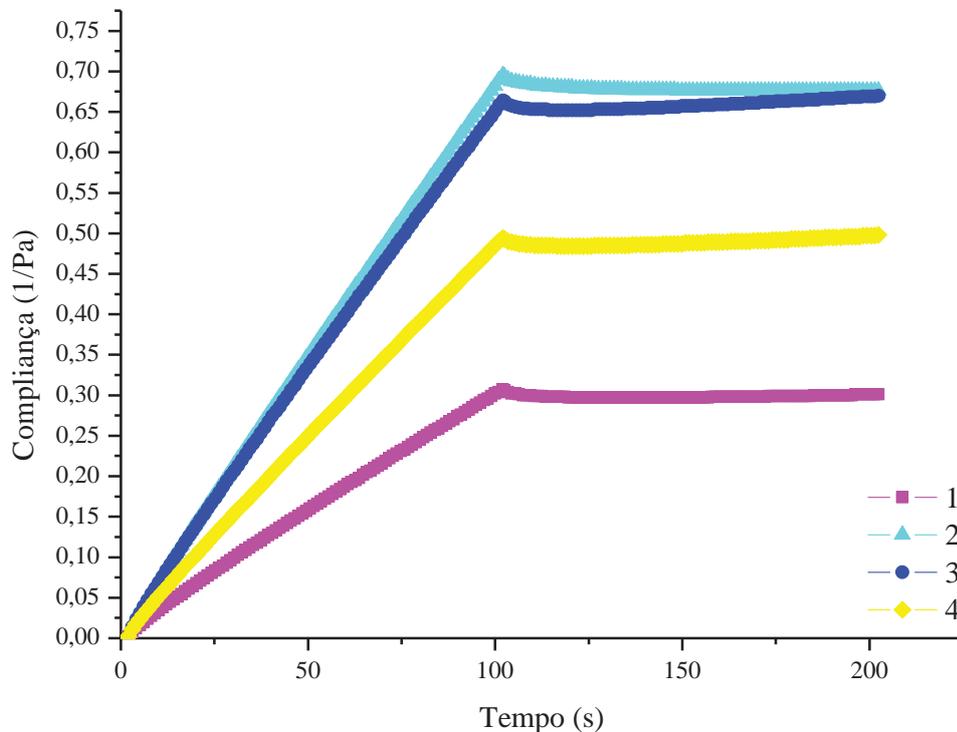


Figura 23: Fluência e relaxação dos quatro géis de ácido hialurônico.

Tabela 5: Valores de compliança (J) e porcentagem de recuperação apresentados pelos géis no teste de fluência e relaxação.

| Gel | J em 100 s | J em 200 s | % de recuperação |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | 0,313 | 0,310 | 99,04 |
| 2 | 0,653 | 0,647 | 99,08 |
| 3 | 0,679 | 0,677 | 99,7 |
| 4 | 0,491 | 0,489 | 99,6 |

5.6 Estudo da liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

5.6.1 Escolha da solução receptora

Para o estudo da liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* foi necessário realizar testes prévios de solubilidade do ácido hialurônico para a escolha da solução receptora.

O ácido hialurônico mostrou-se solúvel no tampão fosfato, sendo, portanto, a solução receptora de escolha. Para o preparo do tampão os sais foram solubilizados em água destilada e o pH foi ajustado para 7,4 (F. Bras., 2010).

5.6.2 Método de quantificação

O método clássico para a quantificação do ácido hialurônico é por colometria pelo método do carbazol (F. Portuguesa, 2000). Para os ensaios de liberação e de permeação cutânea, elaborou-se curva analítica do AH em tampão pH 7,2 e para o ensaio de retenção no estrato córneo e epiderme e derme, elaborou-se a curva analítica em metanol:água (1:1).

A quantificação do ácido hialurônico mostrou linearidade na faixa de concentração utilizada de: 65, 52, 39, 26, 13 e 6,5 µg/mL. A Figura 24 representa a curva analítica de ácido

hialurônico usando como solvente o tampão fosfato que apresentou equação da reta $y = 0,006x - 0,002$ e coeficiente de correlação de 0,998.

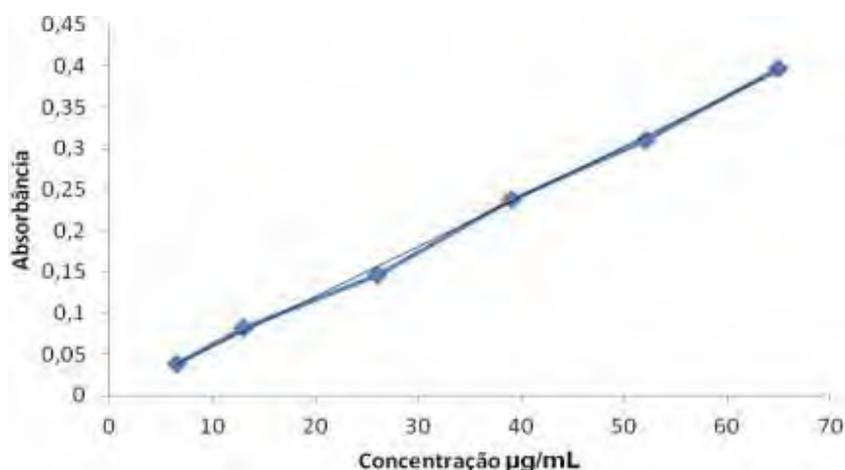


Figura 24: Curva analítica do ácido hialurônico usando como solvente o tampão fosfato

A Figura 25 mostra a curva analítica de ácido hialurônico usando como solvente a mistura metanol:água (1:1) que apresentou equação da reta $y = 0,008x - 0,000$ e coeficiente de correlação de 0,999.

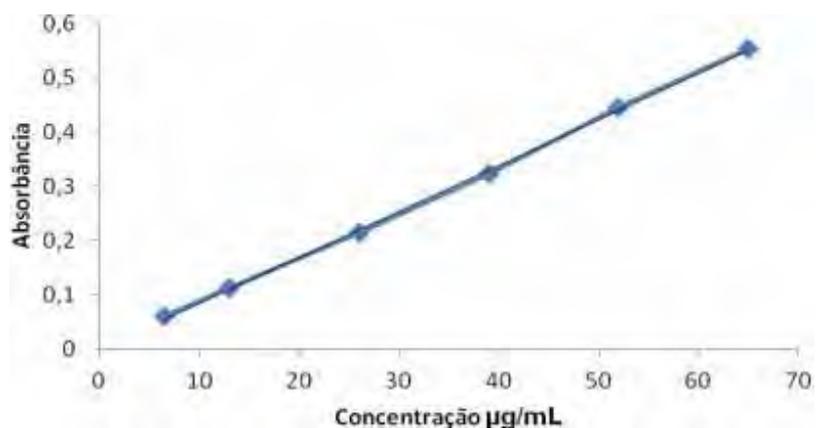


Figura 25: Curva analítica do ácido hialurônico usando como solvente a mistura metanol:água (1:1)

5.6.3 Estudo de liberação *in vitro*

O sistema de difusão utilizado constou de seis células de difusão, que consistem de um compartimento doador, onde se adiciona a formulação, e um compartimento receptor, onde se coleta a solução receptora a ser analisada.

O produto foi colocado sobre a membrana sintética de celulose e a passagem do ácido hialurônico, pela membrana para o compartimento receptor, foi monitorado pela análise da amostra do líquido receptor coletado nos diferentes tempos. Os quatro géis foram analisados, nos tempos 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas.

O gel contendo apenas ácido hialurônico com alta massa molecular não foi identificado no líquido receptor AH em nenhum dos tempos. Portanto, os valores encontrados de liberação de AH para os géis 1, 2 e 3 serão considerados como liberados apenas os AH de menores massas moleculares.

Para os géis 1, 2 e 3 foi possível identificar no líquido receptor a presença de AH. A quantificação do AH nos géis 1, 2 e 3 pode ser observada na Tabela 6 que descreve as concentrações liberadas nos seis tempos analisados.

Tabela 6: Valores e porcentagens das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) liberadas de AH dos géis

| Tempo da análise (horas) | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3 |
|--------------------------------|---|---|---|
| | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) % liberada | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) % liberada | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) % liberada |
| 1 | 1,38 | 6,0 | 13,83 |
| | 0,129 | 0,561 | 1,299 |
| 2 | 3,16 | 11,5 | 30,27 |
| | 0,295 | 1,075 | 2,829 |
| 4 | 5,33 | 25,75 | 52,5 |
| | 0,498 | 2,406 | 4,906 |
| 6 | 8,5 | 40,58 | 89,97 |
| | 0,794 | 3,792 | 8,408 |
| 8 | 18,5 | 57,67 | 120,77 |
| | 1,729 | 5,389 | 11,287 |
| 12 | 20,5 | 59,38 | 139,67 |
| | 1,916 | 5,549 | 13,053 |

O gráfico de quantidade de composto ativo no meio receptor em função do tempo fornece o perfil de liberação e o fluxo de passagem do ativo para a solução receptora é representado pela inclinação da curva, ou seja, pelo coeficiente angular da equação (SHAH et al., 1989).

A avaliação do modelo cinético de liberação mais adequado foi realizada a partir de três gráficos. A Figura 26 representa o modelo de cinética de **zero ordem**, em que a dissolução ocorre em velocidade constante, sendo independente da concentração do composto ativo, utilizando a concentração em função do tempo. A Figura 27 representa o modelo de cinética de **primeira ordem**, através da relação logarítmica da porcentagem de ativo retido em

função do tempo. A Figura 28 representa a **aplicação da equação de Higuchi**, que relaciona a quantidade de substâncias liberadas em função da raiz quadrada do tempo.

As Figuras 26 a 28 apresentam a comparação de cinéticas de liberação, com a intenção de verificar o modelo cinético de liberação dos diferentes sistemas e qual foi o mais adequado.

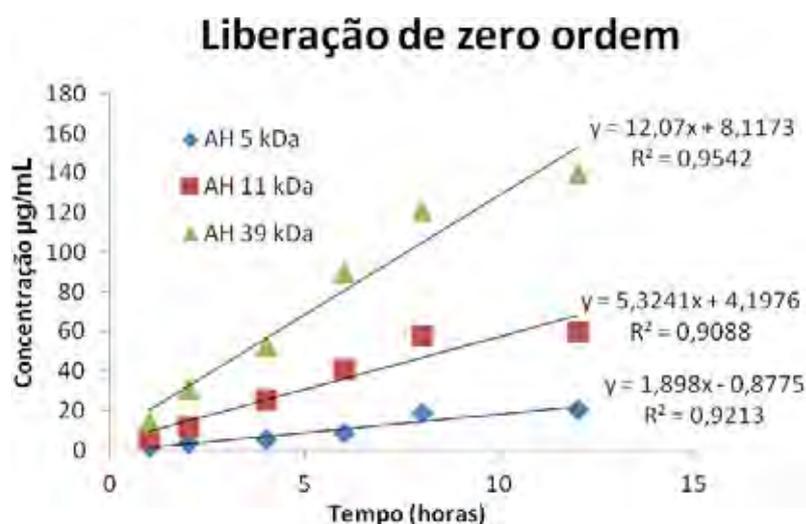


Figura 26: Modelo de cinética de liberação de zero ordem

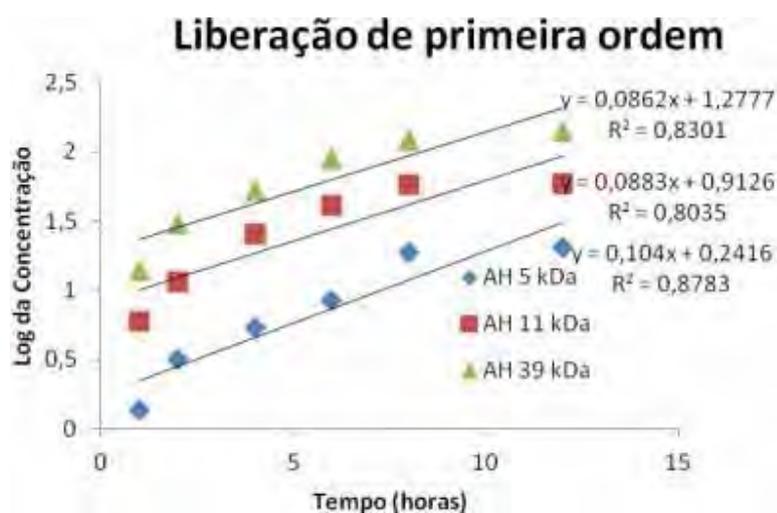


Figura 27: Modelo de cinética de liberação de primeira ordem



Figura 28: Modelo de cinética de liberação com aplicação da equação de Higuchi

Pode-se observar que o modelo cinético de liberação mais adequado para o gel 1 foi o de zero ordem. Este modelo sugere que a velocidade de liberação ocorre em uma velocidade constante, sendo independente da concentração do ativo.

O modelo cinético de liberação mais adequado para o gel 2 e 3 foi o de Higuchi, que descreve a difusão de substâncias contidas nos sistemas matriciais, relacionando a quantidade de substância liberada com a raiz quadrada do tempo.

Um ponto que pode estar exercendo influencia e deve ser futuramente investigado é a possível modificação na estrutura dos géis, em função da mistura de AH.

5.6.4 Estudo da permeação e retenção cutânea *in vitro*

A pele de orelha de porco foi selecionada para esta pesquisa por ser de fácil aquisição, histologicamente e bioquimicamente semelhante à pele humana, e com características de permeabilidade cutâneas semelhantes (ANDEGA et al., 2001).

O teste de permeação cutânea permite avaliar a quantidade de ativo que permeou a pele, podendo ser absorvido na corrente sanguínea. O estudo foi realizado para os quatro géis e nenhum teve a capacidade de permear a pele do porco. Este resultado era esperado devido ao alto peso molecular do AH, sendo a principal resistência à passagem de compostos através da pele ser causada pela estrutura compacta do estrato córneo. Em produtos dermatológicos é desejável que o fármaco administrado tenha pequeno fluxo e, alta retentividade nas membranas (ARMSTRONG et al., 1997; HANDGRAFT, 2004).

A camada córnea que ficou exposta à permeação sofreu o processo de *tape-stripping* para verificar o quanto do ativo ficou retido no estrato córneo e a pele restante (epiderme sem estrato córneo e derme) foi cortada em pedaços bem pequenos e submetida à extração do ativo retido, com o uso de solvente adequado. Os valores encontrados estão na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de AH retido no estrato córneo e na epiderme/derme para os géis de AH

| Tempo (h) | 2 | | | | 4 | | | | 8 | | | |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Gel | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| REC (µg/mL) | 7,33 | 6,33 | 2,83 | 2,75 | 10,3 | 7,50 | 6,33 | 5,37 | 12,6 | 9,16 | 7,83 | 6,375 |
| RDE (µg/mL) | 0 | 0 | 0 | 0 | 5,33 | 4,87 | 3,37 | 2,50 | 6,75 | 6,33 | 5,75 | 4,375 |

Legenda: REC - retido estrato córneo, RDE – retido derme e epiderme.

Para uma formulação antienvhecimento os resultados são favoráveis, uma vez que em formulações dermatológicas não se deseja que o ativo atinja a circulação sanguínea, embora seja importante que penetre além da superfície da pele, ou seja, atinja o estrato córneo, a epiderme e a derme.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos pode-se verificar que a metodologia empregada neste estudo mostrou-se adequada e de fácil execução.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que a mistura do ácido hialurônico e a água, como era esperado, resultou na formação de gel consistente, sendo possível o desenvolvimento do gel de AH de alta massa molecular, incorporado de AH de menores massas moleculares.

As amostras analisadas microbiologicamente encontram-se dentro do limite permitido para a contagem de micro-organismos viáveis e ausentes para a pesquisa de patógenos.

O resultado da determinação do potencial tóxico provou que os géis de ácido hialurônico não apresentaram irritação dérmica, podendo ser considerados seguros. Os resultados do MTT indicaram ausência de atividade citotóxica para as linhagens celulares HepG2 e HaCaT nas doses testadas, não sendo evidenciadas diferenças significativas entre os valores dos grupos teste e do controle negativo. Estes resultados são promissores e permitem que o produto seja aprovado em testes de segurança.

Os géis analisados apresentaram comportamento reológico viscoelástico, não-Newtoniano, plástico e comportamento anti-tixotrópico, pois foi possível verificar a presença de área de histerese.

O estudo da permeação cutânea *in vitro* dos géis evidenciou o não favorecimento da passagem do ácido hialurônico para a fase receptora, porém, verificou-se a retenção no estrato córneo, derme e epiderme. Para uma formulação antienvelhecimento, estes resultados são favoráveis, uma vez que não se deseja que o fármaco penetre na circulação sanguínea e sim fique retido no estrato córneo, na epiderme e derme.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-YOUSIF, A.O.; SMITH, K.A.; GETSIOS, S.; GREEN, K.J.; VAN DROSS, R.T.; PELLING, J.C. Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures. **Cancer Res.**, v.68, n.8, p. 3057-3065, 2008.

AEBISCHER, P.; GODDARD, M.; MOLDAUER, J. G.; MULHAUSER, P. J.; RATHBUN, A. M.; SANBERG, P. R.; VASCONCELLOS, A. V.; WARNER, N.F. Implantable Therapy System and Methods. United States Patent n. 6,179,826. January 30, 2001.

ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **Journal of Controlled Release**, v.77, n. 1, p.17-25, 2001.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 7 ed., São Paulo: Editorial Premier, 2007, p. 398-400.

ARMSTRONG, D. C., COONEY, M. J., JOHNS, M. R. Growth and Amino Acid Requirements of Hyaluronic Acid Producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.47, p.309-312, 1997.

Associação Brasileira de Cosmetologia – ABC. **Guia ABC de Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed., Porto Alegre: Artemed, 2005, 677p.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JUNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; AREAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rotina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, 2008.

- BAKER, F.W.; BRUNER, L.H. Alternatives to animal experiments: expectations and limitations. **Elsevier Science B.V.**, 1997.
- BARATA, E. A. F. A. **Cosmetologia princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 2003. p.7.
- BARRY, B.W. **Dermatological Formulations: Percutaneous absorption**. London: Marcel Dekker, INC, 1983, p.1-233, 351-407.
- BARRY, B.W. Rheology of dermatologicals vehicles. In: **Dermatologicals Formulations**. New York: Marcel Dekker, 1993, p. 351-439.
- BATISTUZZO, J.A.O.; ETO, Y.; ITAYA, M. **Formulário Médico Farmacêutico** São Paulo, Tecnopress, 2000.
- BEITNER, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. **Br. J. Dermatol.**, v. 149, n. 4, 2003, p. 841-849.
- BENY, M. G. Fisiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.12, p.44-50, mar/abr, 2000.
- BERTOLAMI, C.N.; BERG, S.; MESSADI, D.V. Binding and internalization of hyaluronate by human cutaneous fibroblasts. **Matrix**, v.11, p. 11-21, 1992.
- BILLICH, A; ASCHAUER, H.; ASZÓDI, A.; STUETZ, A. Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 29-35, 2004.
- BRASIL, Resolução RE nº 481. Brasília: Parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, 1999.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2000) Resolução-RDC 79. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF.

BRASIL, **Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos, 2003a**. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>. Acessado em: nov/2010.

BRASIL, Resolução RE nº 899. Brasília: Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, 2003b.

BRASIL, **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional, v. 1, p. 12-19, 26, 27, 2004.

CALLISTER, W. D. Jr. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**, Rio de Janeiro, LTC, 2002.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo, Artliber, 2002.

CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; MORAES, J.D.D.; ZAMBON, A.P.L.B.; CORREA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Estabilidade preliminar de emulsões contendo fase oleosa a base de karité, verificação da formação de cristais líquidos com a adição de Behenyl alcohol, poliglyceryl-10 pentastearate, sodium stearoyl lactylate e avaliação da sua influência na estabilidade da formulação. 23º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, Associação Brasileira de Cosmetologia, São Paulo, 2009.

CHIARI, B.G.; CEFALI, L.C.; ZAMBON, A.P.L.B.; MORAES, J.D.D.; CORREA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Formação de Cristais líquidos e caracterização reológica de formulações cosméticas. 23º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, Associação Brasileira de Cosmetologia, São Paulo, 2009.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2º ed, New York: Marcel Dekker, 2001, p. 300-375.

CHONG, B.F., BLANK, L. **Metabolic engineering of hyaluronic acid production**. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998.

- CHONG, B.F.; BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n.4, p. 341-351, 2005.
- CHORILLI, M.; SCARPA, M.V.; LEONARDI, G.R.; FRANCO, Y.O. Toxicologia dos Cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n.1, 2006, p. 144-154.
- CLEMEDSON, C.; EKWALL, B. Overview of the final MEIC results. I. The in vitro–in vitro evaluation. **Toxicol. In Vitro** v. 13, p. 657–663, 1999.
- CORAZZA, S. **Beleza Inteligente**. São Paulo: Masdra, 2001. p. 18-33; 28-40
- CORREA, N.M.; CAMARGO-JUNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrófilos. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.
- DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotion. In: **Newburguer’s manual of cosmetic analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, Senzel, AJ, 1977. p.32.
- DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J.; PONZIO, R. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.
- DENIZOT, F., LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **J. Immunol. Methods**, v. 89, p. 271-274, 1986.
- DRAELOS, Z.D. **Cosméticos em dermatologia**. Ed. Revinter, Rio de Janeiro, p. 56-58, 1999.
- DRAIZE, J.H., WOODARD, G., CALVERY, H. Methods for the study of irritation and toxicity of substance applied topically to the skin and mucous membrane. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 82, p. 377-390, 1944.
- ELIAS, P.M.; FRIEND, D.S. The permeability barrier in mammalian epidermis. **J. Cell Biol.**, v.65, p. 180-191, 1975.

- EGUCHI, S.Y. Controle Microbiológico em Cosméticos. **Revista Racine**, v. 64, n. 14, p. 14-20, 2001.
- EL-MEGRAB, N.A.; EL-NAHAS, H.M.; GEHAN, F.B. Formulation and evaluation of meloxicam gels for topical administration. **Saudi Pharm J.** v. 14, p. 155-162, 2006.
- ENJELKE, M.; JENSEN, J.M.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; PROKSCH, E. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. **Br. J. Dermatol.** v. 137, p. 219-225, 1997
- Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA. v. 1, 2010, p. 204-214, 507.
- FARMACOPÉIA Portuguesa, Lisboa: Imprensa Nacional de Lisboa, 4 ed. Sup. 2000, p.265-268.
- FERREIRA, A.O. **Guia prático de farmácia magistral**. 2 ed. Juiz de Fora: Pharmabooks, 2002. p. 56-60, 37-38.
- FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir. Bras.**, v.20, supl.2, p. 28-34, 2005.
- FOTAKIS, G., TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Elsevier Science**, 2006.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.265-271.
- GIACOMONI, P.U. Understanding reactive oxygen species. **Cosmetics & Toiletries**, v. 122, n. 5, p. 12-15, 2007.
- HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. **Chemistry and biology of hyaluronan**. Oxford: Elsevier, 2004. p.1-19.

- HARRIS, M. I. N. C. **Pele, estrutura, propriedades e envelhecimento**. São Paulo: Senac, 2003. p. 7-18
- HERNANDEZ, J.N. Conservação e microbiologia de produtos manipulados. **Revista Anfarmag**, n.10, p.6-7, 1996.
- ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORREA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 1, p, 81-96, 2008.
- JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mech. Ag. Develop.**, v. 123, n. 7, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.359-370.
- KIM, J.; YOO, S.; OH, D.; KWEON, Y.; PARK, D.; LEE, C.; GIL, G. Selection of a *Streptococcus* equi mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.440-445, 1996.
- KOBAYASHI, Y.; OKAMOTO, A.; NISHINARI, K. Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. **Biorheology**, v. 31, p. 235-244, 1994.
- LACHAPELLE, J.M. Toxicidade orgânica e geral. In: Prunieras, M. **“Manual de Cosmetologia Dermatológica”** 2. ed., São Paulo: Andrei, p. 325-56, 1994.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v. 2.
- LAURENT, T.C.; LAURENT, V.B.; FRASER, J.R. The structure and function of hyaluronan: an overview. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 74, n. 7, 1992.
- LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **Int. J. Pharm. Compounding**, v. 3, n. 4, p.154-156, 2001.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, sept/oct, 2002.

LEONARDI, G. R.; KUREBAYASHI, A. K; MATHEUS, L. G. M. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004. p. 14-25.

LIVNY, O.; KAPLAN, I.; REIFEN, R.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. Oral cancer cells differ from normal oral epithelial cells in tissue like organization and in response to lycopene treatment: an organotypic cell culture study. **Nutr. Câncer**, v.47, n.2, p.195-209, 2003.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**, Rio de Janeiro, e-papers, 2001.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; RICCI, G.; SILVA, G.M.; SANTOS, E.B.; LOPES, R.A.; SEMPRINI, M. Histopathological, morphometric and stereologic studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid. **J. Cosmet. Sci.**, v. 50, p, 1-12, 1999

MANNA, F.; DENTINI, M.; DESIDERI, P. Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (hylaform from rooster combs and restylane from streptococcus) used for soft tissue augmentation. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 13, p. 183-192, 1999.

MARONA, H.R.N. Princípios éticos na experimentação animal. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.24, n.2, p.97-105, 2003.

MARTINS, M.R.F.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MESA, F.L.; ANEIROS, J.; CABRERA, A. Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. **Histol Histopathol**, v. 17, p. 747-753, 2002.

MOHAMMED, A.; YASMIN, S.; ASGAR, A. Matrix type transdermal drug delivery systems of metoprolol tartrate. **Acta Pharm.** v. 53, p. 119-125, 2003.

MORGAN, D.M. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. **Polyamine protocols**, v.79, p. 179-184, 1998.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.** p. 65, 55–63, 1983.

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de Reologia de Polímeros**, Caxias do Sul, Educ, 1997.

OECD-EUROPEAN COMISSION, Health & Consumer Protection Directorate-General. **Guidance Document on Dermal Absorption**. 27 November, 2002.

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, OECD series on testing and assessment. n. 28, 2004.

OGRODOWSKI, C.S. **Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: estudo da fermentação de caracterização do produto**. 2006. 103p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. (Tese de Doutorado).

OHARA, M.T. Avaliação microbiológica por semeadura em profundidade. **Revista Cosmetics & Toiletries**, v.13, p.68, 2001.

PELLET, M. A.; ROBERTS, M. S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape stripping. **International Journal of Pharmaceutics** v. 151, p. 91-98, 1997.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia Geral e Biologia da Pele**. São Paulo: Andrei, 1998. p.10, 395, 412.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

PRAÇA, F.S.G. **Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2010. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

PRISTA, L. N.; BAHIA, M. F. G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1992. v.1, p.15-24

PRISTA, N. L.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v.1, p.43-44, 93-103.

RIBEIRO, H. M.; MORAIS, J. A.; ECCLESTON, G. M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **Intern J Cosmet Sci**; v. 26, n.2, p.47-59, 2004.

RIEGER, M. Teste de estabilidade para microemulsões. **Cosmet. Toiletries**, v. 8, p. 47-55, 2000.

RIGG, P. C.; BARRY, B. W. Shed snake skin and hairless mouse skin as a model membrane for human skin during permeation studies. **J. Invest. Dermatol.** Baltimore, v. 92, n. 2, p. 235-240, 1990.

ROMANOWSKI, P; R SCHUELLER. **Cosmet. Toiletries**, v. 111, p. 79-86, 1996.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Artes médicas, 2001.

SASSON, C.S. Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol. Curitiba: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba.

SCARANO, F.R. Perspectives on biodiversity science in Brazil, Piracicaba, **Scientia Agricola**, v.64, n.4, 2007.

SCCP/0970/20006 Basic Criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. March 2006.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria**: Fundamentos teóricos e práticos. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006. p. 21-22.

SCHEERS, M.E.; EKWALL, B.A.; DIERICKX, J.P. In vitro long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on HepG2 cells and comparison with acute human toxicity data. **Toxicol. In Vitro**, v.15, p. 153–161, 2001.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.215, n.1/2, p.51-56, 2001.

SHAH, P. V.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v 4, n.3, p.377-385, 1999.

SIQUEIRA, V.L. Estratégias de proteção microbiológica de cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 16, p. 100-104 , 2004.

SOUZA, V.M.; ANTUNES JUNIOR, D. **Ativos Dermatológicos**: Guia de ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos. São Paulo: Tecnopress, 2009. v. 1-4, p. 53-55.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.1, n. 108-109, p. 227-258, 2004.

TULLY, B.D.; COLLINS, J.B.; OVERSTREET, J.D.; SMITH, S.C.; DINSE, E.G.; MUMTAZ, M.M.; CHAPIN, E.R. Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 168, p. 68-71, 2000.

United States Pharmacopeia. 26th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convection, 2003.

USP 31. The United States Pharmacopeia. 31th. Ed. Rockville, The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

XU, D.; FINKEL, T. A role for mitochondria as potential regulators of cellular life span. **Bioch. Bioph. Res. Com.**, v. 294, p. 245-248, 2002.

YAMADA, T.; KAWASAKI, T. Microbial Synthesis of Hyaluronan and Chitin: New Approaches. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 99, p. 521-528 , 2005 .

YU, Z.W.; QUINN, P.J. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide. Informa Healthcare., v.15, n.2, p. 59, 1998.