

Maíra Lima Gonçalves

**Avaliação da permeação cutânea in vitro de sistemas
nanoestruturados contendo ácido kójico**

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

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara

2012

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo Cezar e Márcia,
que sempre me apoiaram, me motivaram e me possibilitaram
a realização do curso de Farmácia-Bioquímica em uma
das melhores universidades do país.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para elaboração deste trabalho.

Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pelos ensinamentos, amizade, confiança, paciência, dedicação e compreensão por todos esses anos de convivência.

Às minhas irmãs Egle Paula, Naiara e Inara, que nos momentos de exaustão me incentivavam com elogios e críticas construtivas, que me ajudaram muito na conclusão dessa etapa.

À minha família, principalmente meus tios Antônio Carlos e João Roberto que auxiliaram, nos momentos que deles precisei.

Ao meu namorado Cássio, por ser meu companheiro para todas as horas nesses 5 anos.

À Giovana Calixto que demonstrou ser uma grande amiga, que nunca se recusou a me ajudar e até mesmo se disponibilizava a me auxiliar nas análises feitas no reômetro e no texturômetro e na discussão dos meus resultados.

À Márcia Oyafuso por me auxiliar nas análise no permeador e em outros momentos de que dela precisei.

À Fernanda Kolenyak pela amizade e por sempre se disponibilizar à me ajudar de alguma forma.

À Prof. Dr. Vera Lúcia Borges Isaac por possibilitar o uso do reômetro do laboratório de cosmetologia.

À Prof. Dr. Maria Palmira Daflon Gremião por possibilitar o uso do permeador e do texturômetro.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira por possibilitar o uso do espectro de absorção UV-VIS.

À todos os outros companheiros do laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela troca de experiências.

À todos da minha turma, que se tornaram meus amigos para toda vida.

E acima de tudo à Deus.

“Não conheço nenhum fato mais animador do que a incontestável capacidade do homem de elevar sua vida pelo esforço consciente”

Henry David Thoreau

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. MATERIAIS	23
3.2. EQUIPAMENTOS	23
3.3. MÉTODOS	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. PREPARO DAS FORMULAÇÕES	35
4.1.1. DIAGRAMA DE FASES	35
4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	36

4.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	36
4.2.2. ENSAIO DE TEXTURA	39
4.2.3. ENSAIO DE BIOADESÃO	41
4.2.4. COMPORTAMENTO REOLÓGICO	42
4.3. TESTE DE ESTABILIDADE	44
4.3.1. AVALIAÇÃO VISUAL	44
4.3.2. TESTE DE CENTRÍFUGA	45
4.3.3. DETERMINAÇÃO DO pH.....	45
4.3.4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA.....	46
4.4. METADOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO.....	48
4.4.1. DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)	48
4.4.2. CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO KÓJICO EM SOLUÇÃO TAMPÃO.....	49
4.4.3. CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO KÓJICO EM METANOL	50
4.5. ENSAIO DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i>	52
4.5.1. ENSAIO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	52

5.	CONCLUSÃO	56
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

O processo de envelhecimento origina uma série de alterações na pele, dentre elas as o estresse oxidativo e as discromias. O ácido kójico tem a capacidade de atuar no tratamento do envelhecimento cutâneo em virtude de sua atividade ferro-quelante e de promover a despigmentação da pele devido inibir a tirosinase, impedindo a formação da melanina. Sistemas de liberação controlada de substâncias ativas, como os sistemas líquido-cristalinos, tem a propriedade de modular a permeação cutânea de fármacos, além de melhorar a sua ação. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema líquido cristalino constituído por água e isonmanoato de cetoestearila (óleo), e estabilizado com o tensoativo álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo ácido kójico, avaliando sua permeação cutânea *in vitro*. A partir da construção de um diagrama de fases, foram selecionadas três formulações caracterizadas microscopicamente como CLs de fase hexagonal, denominada de A (35% O, 50 % T e 15% A), B (30% O, 50 % T e 20% A) e C (20% O, 50% T e 30% A), para prosseguir com o estudo, que consistiu na incorporação do ácido kójico na concentração de 2% e a realização dos ensaios de textura, bioadesão, reologia e de permeação e retenção cutânea *in vitro*. O ensaio de textura demonstrou que a formulação B com valores intermediários de água e fase oleosa apresentou valores intermediários de dureza, compressibilidade e adesividade, ideais para aplicação tópica. O ensaio de bioadesão mostrou que com o acréscimo de água na fórmula a força bioadesiva aumentou, o que pode melhorar a fixação do produto na pele do usuário. O ensaio reológico evidenciou que há aumento da viscosidade com acréscimo de água na formulação e que os sistemas analisados tratavam-se de fluidos pseudoplásticos com tixotropia tempo dependente. De acordo com os resultados de permeação *in vitro* de ácido kójico a amostra A possibilitou a maior permeação de ácido kójico (5,2%), seguida amostra C (2,8%) e da B (2,3%). Após 12 horas a amostra B reteve mais o fármaco no estrato córneo (15,4%), seguida da amostra A (14,3%) e da C

(7,3%). Já em relação à retenção na epiderme + derme a amostra A reteve mais o fármaco (10,2 %), seguida da amostra B (6 %) e da C (2,7 %). Dessa forma, o ensaio de permeação e retenção cutânea *in vitro* mostraram que quanto maior a porcentagem de água na formulação menos o fármaco ficou retido na pele e permeou por essa, sugerindo que quanto maior a quantidade de água uma maior quantidade de fármaco fica solubilizado na formulação, interagindo menos com a pele e tendo sua permeação dificultada. Os resultados sugerem que os sistemas apresentados são viáveis para incorporação de ácido kójico, permitindo a sua liberação controlada.

ABSTRACT

The aging process causes a number of skin changes, among them oxidative stress and dyschromia. Kojic acid has the ability to act in the treatment of aging skin due to its iron-chelating activity and to promote the depigmentation due to inhibit tyrosinase preventing the formation of melanin. Controlled release systems for active substances such as liquid crystalline systems, has the property of modulating skin permeation of drugs, and improve its action. This study aims to develop and characterize a liquid crystalline system consisting of water and Isonomanoato of cetoestearila (oil), and stabilized by the surfactant cetyl alcohol ethoxylated and propoxylated containing kojic acid, evaluating its skin permeation in vitro. From the construction of a phase diagram, three formulations were selected microscopically characterized like LCs of the hexagonal phase, called A (35% O, 50% T, 15% A), B (30% O, 50% T and 20 The%) and C (20% O, 50% T and 30% A), to continue the study, which involved the incorporation of kojic acid at a concentration of 2% and testing of texture of bioadhesion, rheology and skin permeation and retention in vitro. The texture test showed that formulation B with intermediate water and oil phase showed intermediate values of hardness, compressibility and adhesion, suitable for topical application. The bioadhesion testing showed that by adding water in formula the bioadhesive strength increased, which can improve the fixing of the product on the skin of the user. The rheological test showed that there is an increase in viscosity with an increase of water in the formulation and systems analysis is treated with fluid pseudoplastic thixotropic time dependent. According to the results of in vitro permeation of kojic acid sample A resulted in the highest permeation kojic acid (5.2%), followed C sample (2.8%) and B (2.3%). After 12 hours the sample B retained more drug in stratum corneum (15.4%), followed sample A (14.3%) and C (7.3%). In relation to retention in the epidermis + dermis the sample A retained more drug in this stratum (10.2%) followed by sample B (6%) and C (2.7%). Thus, the test permeation and skin retention in vitro showed

that the greater the percentage of water in the formulation less the drug was retained in the skin and permeated by that, suggesting that the greater the amount of water greater amount of drug is solubilized in formulation, fewer interacting with skin and having its permeation hampered. The results suggest that the systems shown are viable for incorporation of kojic acid, allowing their controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido kójico	19
Figura 2. Curva típica de ensaio de textura	27
Figura 3 – Curva típica força bioadesiva em função do tempo obtida no ensaio de bioadesão. 28	
Figura 4 – Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus	33
Figura 5 – Digrama de fases. As áreas delimitadas representam: SP – separação de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT – sistema viscoso transparente; SLT – sistema líquido transparente	36
Figura 6 – Fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase hexagonal.....	37
Figura 7 – Digrama de sistemas. As áreas delimitadas representam: SP – separação de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT CE– sistema viscoso transparente campo escuro; SVT HEX – sistema viscoso transparente estrutura hexagonal; SLT CE – sistema líquido transparente campo escuro; SLT HEX – sistema líquido transparente estrutura hexagonal...	38
Figura 8. Parâmetros obtidos na análise do perfil de textura (Dureza, Compressibilidade, Adesividade e Coesividade) para as amostras A, AF, B, BF, C e CF	40
Figura 9. Curvas de fluxo e de viscosidade da amostra A com e sem ácido kójico	43
Figura 10. Curvas de fluxo e de viscosidade da amostra B com e sem ácido kójico	43
Figura 11. Curva analítica de ácido kójico em água.....	47
Figura 12. Espectro de varredura do ácido kójico	49
Figura 13 – Curva analítica de ácido kójico em solução tampão fosfato pH 7,4	50
Figura 14 - Curva analítica de ácido kójico em metanol	51
Figura 15 –Porcentagem de ácido kójico permeado a partir da amostra AF e Perfil de liberação de ácido kójico a partir da amostra AF	52

Figura 16 – Porcentagem de ácido kójico permeado a partir da amostra BF e Perfil de liberação de ácido kójico a partir da amostra BF	53
Figura 17 – Porcentagem de ácido kójico permeado a partir da amostra CF e Perfil de liberação de ácido kójico a partir da amostra CF	53
Figura 18 – Retenção no EC.....	54
Figura 19 – Retenção E + D.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações, em %, dos componentes das formulações	39
Tabela 2 – Propriedades mecânicas das formulações em estudo	39
Tabela 3 – Valores obtidos para o parâmetro de força bioadesiva das formulações em estudo.....	40
Tabela 4 – pH das amostras A, AF, B, BF, C e CF	46
Tabela 5 - Concentrações utilizadas para confecção da curva analítica de ácido kójico em água e as respectivas absorvâncias, média, desvio padrão e coeficiente de variação	47
Tabela 6 - Concentrações utilizadas para confecção da curva analítica de ácido kójico em solução tampão e as respectivas absorvâncias, média, desvio padrão e coeficiente de variação	50
Tabela 7 - Concentrações utilizadas para confecção da curva analítica de ácido kójico em metanol e as respectivas absorvâncias, média, desvio padrão e coeficiente de variação	51
Tabela 8 – Comparação da retenção no EC e na E + D do ácido kójico entre as amostras	54

LISTA DE ABREVIATURAS

A – fase aquosa;

A/O – água em óleo;

CLs – cristais líquidos;

EC – estrato córneo;

E + D – epiderme + derme;

MLP – microscopia de luz polarizada;

O – fase oleosa;

SLT – sistema líquido transparente;

SLT CE – sistema líquido transparente - campo escuro;

SLT HEX – sistema líquido transparente – fase hexagonal;

SP – separação de fases;

SVO – sistema viscoso opaco;

SVT – sistema viscoso transparente;

SVT CE – sistema viscoso transparente – campo escuro;

SVT HEX – sistema viscoso transparente – fase hexagonal;

T – tensoativo;

T/A – tensoativo em água;

T/O – tensoativo em óleo;

UV – ultravioleta;

UV-VIS – ultravioleta - visível.

1. INTRODUÇÃO

As preocupações com a velhice são tão antigas quanto a origem da humanidade, a própria história demonstra isso, ao apreciar a literatura e a pintura e estudar a religião e a medicina. Atualmente isso não é diferente, já que o envelhecimento e a incapacidade funcional consequente têm merecido muita atenção na medicina social e biológica (SAMPAIO et al, 2008).

Estando na superfície, a pele é agredida pelo meio ambiente e por fatores extrínsecos, particularmente as radiações solares, as quais têm um papel importante no envelhecimento cutâneo. Além disso, a pele está sujeita à ação de fatores intrínsecos ou cronológicos, como hormonais, genéticos, nutricionais e vasculares, os quais podem estar relacionados com as alterações no tecido conjuntivo da derme (ORIÁ et al., 2003).

O processo de envelhecimento origina uma série de alterações na pele como a sua inelasticidade, devido às alterações do colágeno e do tecido elástico, a perda da capacidade de regular as trocas aquosas e a replicação do tecido se tornar menos eficiente (HIRATA et al, 2004).

O envelhecimento também ocasiona significativa diminuição na porcentagem de colágeno total, determinada conforme a digestão de pepsina, variando aproximadamente de 25% aos 30 anos de idade para aproximadamente 10% aos 75 anos, com proporcional aumento de colágeno insolúvel. Também, há diminuição dos fibroblastos e da espessura das fibras colágenas, que se tornam mais rígidas e menos elásticas devido às alterações químicas e à diminuição dos mucopolissacarídeos (substância fundamental). As fibras reticulares apresentam alterações semelhantes às das fibras colágenas (SAMPAIO et. al, 2008).

A avaliação geral do envelhecimento cutâneo emerge, refletindo um tecido rígido inelástico e irresponsável, incapaz de se modificar em resposta ao estresse oxidativo (HIRATA et al. 2004).

Contrações musculares, estresse, doenças, trauma na pele, sol, variação acentuada de peso são alguns dos fatores que aceleram o processo de envelhecimento natural (SAUERBRONN et al., 1998). Isso porque esses fatores desencadeiam uma maior produção de radicais livres, os quais podem acelerar o processo de envelhecimento cutâneo.

O organismo humano possui eficientes mecanismos de defesa contra os radicais livres, composto por um conjunto de enzimas (superóxido dismutase, catalases e peroxidases) e de antioxidantes (vitaminas A, C e E), os quais mantêm essas espécies altamente reativas em concentrações subtóxicas (CADENAS, 1989; MARTINS, 1999). No entanto quando ocorre um desequilíbrio entre os processos de produção e destruição das espécies reativas de oxigênio induzido, por exemplo, pela ação da radiação UV e de outros fatores citados acima, estabelece-se uma condição em que o ataque oxidativo das biomoléculas é favorecido, o que pode propiciar o envelhecimento cutâneo e dano solar cutâneo, caracterizado por alterações de pigmentação (HARMAN, 1992).

Hoje em dia são utilizados inúmeros princípios ativos com o objetivo de obter rejuvenescimento da face, colo e dorso das mãos, os quais são importantes para manter a textura saudável da pele. O tratamento baseia-se no uso de substâncias regeneradoras, de ativos citoestimulantes ou de agentes anti-radicais livres.

As substâncias regeneradoras devolvem os nutrientes essenciais e reparam danos causados à pele, como os causados por enzimas colagenase e elastase. Os ativos citoestimulantes melhoram a comunicação celular, favorecendo os sistemas reguladores das atividades das células. E os agentes anti-radicais livres combatem o estresse oxidativo (ARAÚJO et al, 1995; MARTINS, 1999; PYTEL et al., 2005).

As alterações pigmentares, também denominadas de discromias, designam alterações na cor da pele, que depende de cinco tipos de pigmentos, sobretudo da melanina. As discromias

podem manifestar-se principalmente nas formas de hipocromias ou hiperchromias (BENECH, 2002).

Hiperchromias são alterações com excesso de pigmento em alguma região da pele, com destaque para as efélides, lentigos e melasmas, que podem ser originadas ou agravadas a partir da exposição solar, a qual causa um desequilíbrio das espécies reativas de oxigênio (AZULAY et al., 2006).

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

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

A melanogênese ocorre nos melanócitos, que são encontrados na camada basal da epiderme. A tirosinase, enzima que controla a melanogênese, é sintetizada na superfície do retículo endoplasmático rugoso e ativada no complexo de golgi, sendo secretada para dentro de uma vesícula, denominado de pré-melanossoma, o qual é liberado do complexo de golgi unindo-se com outra vesícula formando o melanossoma. Nos melanossomas, a tirosinase converte a tirosina em eumelanina, de cor preta ou feomelanina, de cor amarela avermelhada (NICOLETTI et al, 2002).

O ácido kójico é uma das substâncias despigmentantes mais efetivas, que inibe a síntese da melanina devido à inibição da tirosinase (ROBINS, 1991; LEE & CHOI, 1998), enzima

chave no primeiro estágio da melanogênese, catalisando a conversão da L-tirosina em L-dopaquinona, na presença de íons cobre (KHANON et al., 2000), impedindo que a L-tirosina venha a formar os pigmentos eumelanina ou feomelanina.

O ácido kójico atua também como antioxidante prevenindo a pele dos danos causados por radicais livres, devido a sua atividade ferro-quelante, já que na presença de quantidades catalíticas de ferro, espécies de oxigênio podem ser convertidas em radicais de oxigênio altamente tóxicos, como o radical hidroxila (DUNFORD, 1987; PUPPO E HALLIWELL, 1988), prejudiciais a uma variedade de materiais biológicos, tais como proteínas, lipídios, e ácidos nucleicos (BRAUGHLER et al, 1986;. DAVIES, 1987; INOUE E KAWANISHI, 1987).

O ácido kójico tem como nome químico 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona; 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirano ou 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirano. Tem massa molecular igual a 142,11 g/mol, estrutura molecular C₆H₆O₄ (C=50,71%, H=4,26%, O=45,03%) e sua fórmula estrutural está mostrada na Figura 1. Possui pKa na faixa de 7,9 - 8,03, é muito solúvel em água, etanol e acetona, e moderadamente solúvel em éter, acetato de etila, clorofórmio e piridina.

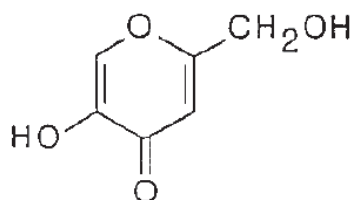


Figura 1. Fórmula estrutural do ácido kójico. (USP 2012, Vol. 3)

O ácido kójico está contido em alimentos tradicionais japoneses, como soja, molho de soja e vinho japonês, sendo continuamente produzido nesses alimentos, principalmente pelo *Aspergillus oryzae* (NIWA E AKAMATSU, 1991).

Inicialmente o ácido kójico foi utilizado como antibiótico, e posteriormente passou a ser utilizado como um agente despigmentante cutâneo e anti-rugas (NIWA AKAMATSU, 1991).

Estudos mostraram que camundongos sem pêlos que tiveram aplicação tópica de ácido kójico e exposição solar contínua, mostraram um grande impedimento da formação de rugas, hiperplasia da epiderme, fibrose da derme e aumento dos componentes da matriz extracelular na derme superior. Esses achados indicam que o ácido kójico é um agente anti-rugas típico e promove a prevenção da pele ao dano solar crônico (MITANI et al., 2000).

Cristais líquidos e outros sistemas de liberação, como as microemulsões, em relação aos veículos convencionais, como emulsões e géis, têm se mostrado superiores na liberação de fármacos por via cutânea, pois esses sistemas de liberação possuem excelentes propriedades de solubilização e atuam como potencializadores de penetração, além de serem produtos esteticamente aceitáveis, fáceis de usar e aderem-se à pele suficientemente (ROZMAN et al., 2009).

Os cristais líquidos (CLs) são denominados como fases mesomórficas (*mesos* – intermediário e *morphé* – forma) ou mesomórficas cristalinas devido a um estado intermediário na transformação térmica do estado sólido para o líquido. Esta fase intermediária apresenta propriedades características tanto de sólidos quanto de líquidos, ou seja, possui ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos (MÜLLER-GOYMANN et al., 1986).

Os CLs podem ser divididos em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. Os termotrópicos são formados pela influência da temperatura e são pouco estáveis, já os liotrópicos são misturas de compostos anfífilos em um solvente, em geral a

água. Dentre as mesofases liotrópicas, as mais importantes e comumente observadas são lamelar, hexagonal e cúbica (IBRAHIM et al., 1993).

Ao se formar a fase lamelar e/ou hexagonal, a formulação entumesce, pois a água é adsorvida entre as camadas de tensoativo, formando o domínio hidrofílico do cristal líquido. A água situada entre as lamelas apresenta características de água ligada, devido às fortes interações entre suas moléculas e os grupos polares do tensoativo. Dessa forma não permite a perda por evaporação, necessitando de maior energia, que a disponível à temperatura da superfície cutânea, para evaporar (SANTOS, 2006).

Além dos cristais líquidos promoverem a liberação controlada de substâncias ativas, incorporar princípios ativos em matrizes líquido-cristalinas ou mesmo em formulações que os contenham, faz com que as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação fiquem protegidas; além disso, tais sistemas promovem aumento da retenção de água no estrato córneo, proporcionando aumento na hidratação cutânea e apresentando muitas vantagens funcionais em produtos de uso tópico (MORAIS, 2006).

Morais (2006) verificou que cristais líquidos lamelares atuaram provavelmente como veículo de liberação lenta da cafeína e Silva (2011), por meio dos resultados de permeação cutânea de um sistema líquido cristalino constituído por óleo de copaíba (Sigma[®]), Procetyl[®](Croda[®]) e água, sugere que esses sistemas podem ser promissores na administração cutânea de fluconazol para o tratamento de dermatomicoses, pois promoveram a retenção do fármaco nas camadas da pele. Também, os testes de atividade antifúngica contra *Candida albicans* mostraram que o fluconazol interagiu melhor com o meio quando incorporado nos CLs, provavelmente devido às propriedades desse sistema de liberação ter melhorado as propriedades biofarmacotécnicas do fármaco, favorecendo a interação com sistemas biológicos.

Para a identificação de materiais líquido-cristalinos é essencial o uso da microscopia de luz polarizada (MLP). Sob um plano de luz polarizada, uma substância pode ser classificada como anisotrópica ou isotrópica. A amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente, exemplo disso são os arranjos hexagonal e lamelar, e é isotrópica se não for capaz de desviar a luz, como é o caso do arranjo cúbico, que só é observado com outras técnicas de análise, como o espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) (RESENDE, 2004; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Sob microscopia de luz polarizada, o arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica, com agregados de tensoativo organizados em cilindros formando estruturas denominadas comumente de “estrias”. Já o arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando estruturas denominadas “cruzes-de-malta” (RESENDE, 2004; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Esses sistemas líquido-cristalinos são muito encontrados em produtos farmacêuticos e cosméticos, sendo que os liotrópicos são os mais predominantes e formam-se espontaneamente em muitos tipos de sistemas emulsionados. Esses sistemas quando presente, por exemplo, na interface de uma emulsão A/O, promovem aumento na rigidez da membrana interfacial, aumentando a estabilidade da emulsão (MÜLLER-GOYMANN et al., 1986; MORAIS, 2006).

2. OBJETIVOS

Desenvolver um sistema de liberação de ácido kójico em nível nanoestrutural que otimize seu uso no tratamento da hiperpigmentação e do envelhecimento cutâneo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistemas nanoestruturados para incorporação do ácido kójico;

- Caracterizar estruturalmente os sistemas obtidos utilizando recursos como microscopia de luz polarizada, ensaios de textura e de bioadesão e reologia;
- Avaliar a estabilidade do ácido kójico no sistema obtido;
- Realizar testes de permeação e retenção cutânea *in vitro* das formulações desenvolvidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

- Ácido kójico (Chengdu Wonho);
- Cloreto de sódio (Vetec);
- Fita Scotch 3M 750 19mm x 50m;
- Fosfato de potássio monobásico (Quemis);
- Hidróxido de sódio (Quemis);
- Iseleron (Isonomanoato de cetoestearila) (MPR Indústria D);
- Metanol (J.T.Baker);
- Procetyl (Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP) AWS (Croda do Brasil).

3.2. EQUIPAMENTOS

- Analisador de textura TA-XTplus Stable Micro Systems;
- Banho de ultrassom, Unique ,Ultra Sonic Cleaner;

- Centrífuga, Sorval, modelo TC 6 Du Pont;
- Dermatômetro Nouvag TMC 300;
- Espectrofotômetro UV/Visível (Hitachi);
- Espectrofotômetro UV/visível Espectrofotômetro HP 8453;
- Peagômetro MicroNal[®] B474;
- Reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado MARS II (Haake[®]);
- Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus (Hanson Research Corporation[®]);
- Turrax Quimis[®]

3.3. MÉTODOS

3.3.1. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

Preparou-se 2 gramas de formulações compostas por água destilada, fase oleosa (Isonomanoato de cetoestearila – Iseleron SN[®]) e tensoativo (Procetyl AWS[®]) em frascos transparentes com tampa, variando-se as concentrações dos componentes, conforme descrito no item 3.3.1.1.

3.3.1.1. DIAGRAMA DE FASES

Ao tensoativo Procetyl[®] (T) foi adicionada a fase oleosa Iseleron[®] (O), e para a obtenção do diagrama de fases foram usadas as relações de T/O na faixa de 1:9 até 9:1. À essa mistura, a água foi adicionada com uma pipeta, realizando a pesagem de todos os

componentes da formulação em balança analítica. As formulações foram expostas à agitação em banho-maria, com auxílio de uma bagueta.

As transições de mistura semi-sólida para sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT), sistema viscoso opaco (SVO) ou separação de fases (SF) foram detectadas visualmente contra fundo escuro. Aos sistemas selecionados foi incorporado o ácido sójico numa concentração de 2%. O mesmo procedimento foi adotado para o sistema T/A, para titulação com a fase oleosa (O).

3.3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os sistemas selecionados foram caracterizados por estudos de microscopia de luz polarizada, ensaios de textura e de bioadesão e comportamento reológico.

3.3.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Uma pequena quantidade de formulação foi colocada, cada uma, sobre uma lâmina de vidro que foi coberta com lamínula e analisada em microscópio sob luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena. Nesse ensaio avaliou-se a homogeneidade da dispersão e a presença da área de anisotropia, indicativo da presença de cristais líquidos. A análise foi realizada a temperatura ambiente.

3.3.2.2. ENSAIO DE TEXTURA

Para análise do perfil de textura das formulações foi utilizado o analisador de textura TA-Xtplus (Stable Micro Systems. Surrey, Inglaterra).

O teste compreende dois ciclos de compressão da amostra, obtendo uma curva de força em função do tempo a partir da qual é possível extrair propriedades mecânicas, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. Sendo dureza a força máxima empregada para deformar a formulação, compressibilidade o trabalho necessário para deformar a formulação no primeiro ciclo de compressão, adesividade o trabalho necessário para superar as forças atrativas entre a sonda e a formulação para que aquela possa deixar esta, e coesão a razão entre o trabalho solicitado na segunda compressão e o trabalho solicitado na primeira compressão.

Esses parâmetros mecânicos analisam o comportamento de tensão-deformação das formulações, sendo possível prever os efeitos das tensões encontrados em condições fisiológicas das formulações (JONES, 1997; SENYIGIT, 2011), tornando-se uma ferramenta indispensável no estudo de sistemas de liberação de fármacos para a escolha da formulação mais adequada.

Para realização do teste, as formulações (15 g) foram inicialmente colocadas em tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD[®]) e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf 5810R) para eliminar eventuais bolhas de ar e tornar a sua superfície plana. Os tubos com as amostras foram fixados embaixo da sonda analítica (10 mm de diâmetro) que desceu a uma velocidade constante de 1 mm/s, e ao entrar em contato com a amostra comprimiu-a a uma velocidade constante de 0,5 mm/s até uma profundidade pré-definida (10 milímetros) e retornou para a superfície a uma velocidade de 0,5 mm/s. Após este primeiro ciclo, o aparelho repousou durante 5 segundos e a segunda compressão subsequentemente começou (Jones et al., 1996a). Todas as formulações foram analisadas em triplicata à temperatura de 32°C.

A Figura 2 apresenta o perfil de uma curva típica de ensaio de textura, podendo ser observadas as propriedades de dureza, compressibilidade, adesividade e coesão das formulações em estudo.

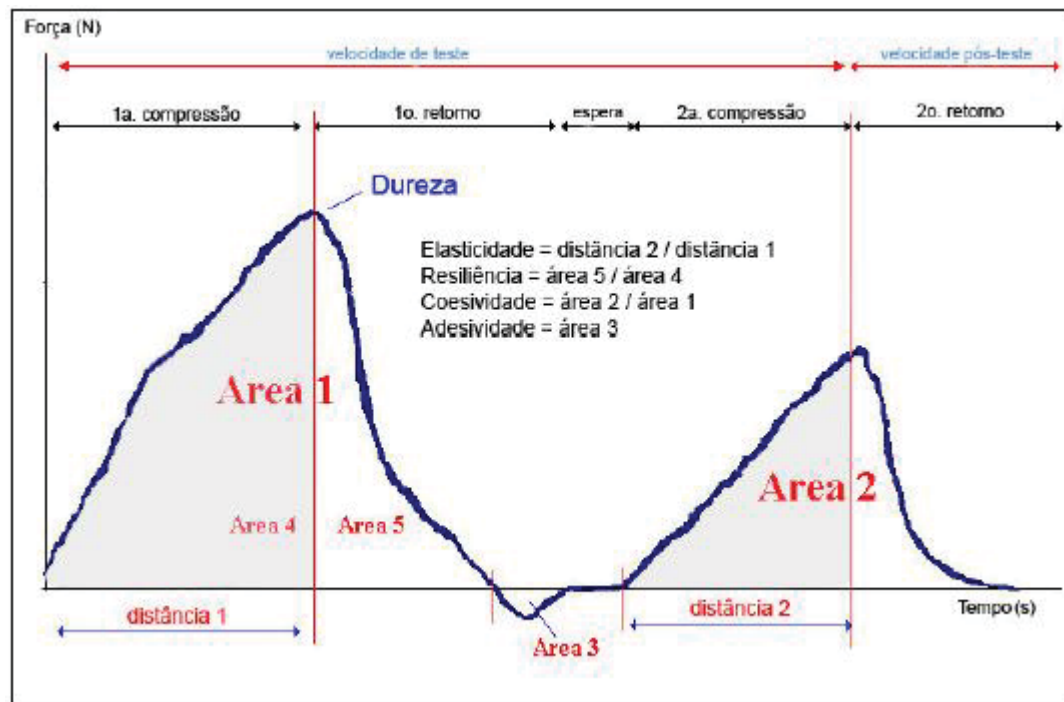


Figura 2 – Curva típica de ensaio de textura. (SANCHEZ D.B.O., 2009).

3.3.2.3. ENSAIO DE BIOADESÃO

A bioadesão das formulações foi avaliada utilizando o analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems[®]), através do teste “Hold Until Time”.

Para a análise utilizou-se como modelo experimental pele de orelha de porco doméstico comprada de um abatedouro local, previamente separada da cartilagem e do tecido adiposo e dermatomizada, com um dermatômetro (Nouvag TMC 300), em 500 μm de espessura. Antes do teste as peles foram mantidas em solução tampão fosfato 7,4 por 10 minutos e os pêlos foram aparados com uma tesoura.

Uma amostra de 7,5 g da formulação foi transferida para um tubo Falcon (BD[®]), que foi centrifugado a 3500 rpm por 3 minutos (Eppendorf 5810R) para eliminação de bolhas de ar e para superfície ficar plana. A pele foi fixada à sonda com o auxílio de anéis de borracha e o tubo Falcon foi fixado abaixo da sonda. O teste iniciou-se com a sonda descendo a uma velocidade de 1 mm/s até entrar em contato com a formulação (detectada com uma força de gatilho de 2 mN), permanecendo em contato com a formulação por 60 segundos. Então a sonda foi lentamente removida a uma velocidade de 0,5 mm/s e a força exercida pela sonda para destacar a pele da superfície da formulação foi determinada através da curva força em função do tempo, como pode ser observado na Figura 3 (KOFFI et al., 2006). Os ensaios foram realizados em triplicata.

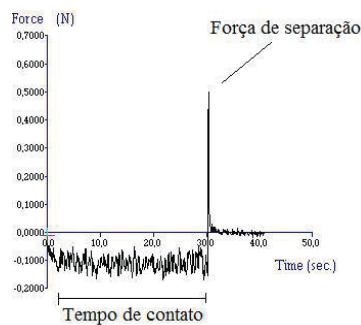


Figura 3 – Curva típica força bioadesiva em função do tempo obtida no ensaio de bioadesão. (CARVALHO F.C, 2009).

3.3.2.4. COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Os reogramas das amostras foram obtidos utilizando um reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlados MARS II (Haake[®]), no modo de fluxo, na temperatura de 25 °C com geometria cone-placa paralelas de 60 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso

(relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. As curvas ascendente e descendente de fluxo foram obtidas com um gradiente de cisalhamento partindo de 0 s^{-1} até 5000 s^{-1} . O gradiente de cisalhamento foi aumentado durante um período de 150 s, mantido no limite superior por 10 s e, então, diminuído durante um período de 150 s. A seleção de faixa de cisalhamento foi determinada de acordo com a consistência de cada formulação (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009).

3.3.3. TESTES DE ESTABILIDADE

3.3.3.1. AVALIAÇÃO VISUAL

As amostras foram observadas visualmente quanto às alterações do tipo: cor, separação de fases e homogeneidade, no período de 3 meses, na temperatura de 23 à 32 °C.

3.3.3.2. TESTE DE CENTRÍFUGA

A avaliação da estabilidade frente à centrifugação foi realizada empregando-se 5g gramas de cada amostra em estudo, as quais foram centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos.

3.3.3.3. DETERMINAÇÃO DO pH DAS FORMULAÇÕES ENVOLVIDAS NO ESTUDO

O equipamento foi calibrado com uma solução padrão de pH 7,0 e em seguida com outra solução padrão de pH 10. As medidas de pH foram realizadas em amostras diluídas em água destilada (5%) a $25,0 \pm 0,5 \text{ °C}$.

3.3.3.4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA

Para a determinação do coeficiente de partição óleo/água foi necessário preparar uma solução aquosa de ácido kójico da seguinte maneira:

Adicionou-se o ácido kójico em excesso em 20 ml de água, submetendo à agitação vigorosa por 4 horas. Após a agitação, a suspensão foi filtrada em membrana Millipore 0,22 µm e o filtrado foi analisado por espectrofotometria em 268 nm. Uma mistura de solução saturada de ácido kójico e da fase oleosa do sistema (Iseleron) foi preparada na proporção 1:1 (v/v), transferida para um funil de separação e submetida à agitação por 30 minutos.

Após a agitação, a mistura foi deixada em repouso para a separação das fases. Com o término do repouso (cerca de 20 minutos), a fase aquosa foi retirada e submetida à centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante oleoso foi retirado e a porção aquosa remanescente foi analisada por espectrofotometria.

O cálculo do coeficiente de partição foi realizado a partir da equação 1:

$$K (o/a) = \frac{C1-C2}{C2} \text{ (equação 1)}$$

na qual: C1 é a concentração de ácido kójico na fase aquosa antes da partição, e C2 é a concentração na fase aquosa depois da partição.

Foi necessário preparar uma curva analítica de ácido kójico em água para determinação da concentração do fármaco nesse solvente. Para isso, em balão volumétrico, preparou-se 50 mL de solução aquosa de concentração 100 µg de ácido kójico/mL, de forma a obter a solução estoque.

Então foram preparadas, em triplicata, soluções com diferentes concentrações de ácido kójico em balões volumétricos de 10 mL, adicionando volumes crescentes de solução estoque, com o auxílio de pipeta automática, os quais foram completados até o menisco com água destilada. Foi realizada a leitura das soluções em espectrofotômetro no comprimento de onda

268 nm. Assim foi possível elaborar um gráfico relacionando as absorvâncias em função da concentração de ácido kójico e calcular a equação da reta e o coeficiente de regressão linear.

3.3.4. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO

3.3.4.1. DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

Preparou-se uma solução tampão fosfato de ácido kójico de concentração 100 µg/mL. Em cubeta de espectrofotômetro (HP8453), foram colocados 2,0 mL tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e adicionados 400 µL de solução de ácido kójico 100 µg/mL. Após homogeneização, foi realizada a leitura espectrofotométrica na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

3.3.4.2. CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO KÓJICO EM SOLUÇÃO TAMPÃO

Para obtenção da curva analítica de ácido kójico, em balão volumétrico, preparou-se 50 mL de solução tampão fosfato de concentração 100 µg de ácido kójico/mL, de forma a obter a solução estoque.

Então foram preparadas, em triplicata, soluções com diferentes concentrações de ácido kójico em balões volumétricos de 10 mL, adicionando volumes crescentes de solução estoque, com o auxílio de pipeta automática, os quais foram completados até o menisco com solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,4. Foi realizada a leitura das soluções em espectrofotômetro no comprimento de onda 268 nm. Assim foi possível elaborar um gráfico relacionando as absorvâncias em função da concentração de ácido kójico e calcular a equação da reta e o coeficiente de regressão linear.

3.3.4.3. CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO KÓJICO EM METANOL

Para obtenção da curva analítica de ácido kójico em metanol, em balão volumétrico, foi preparado 50 mL de solução metanólica de concentração 100 µg de ácido kójico/mL, de forma a obter a solução estoque.

Em seguida, foram preparadas, em triplicata, soluções com diferentes concentrações de ácido kójico em balões volumétricos de 10 mL, adicionando volumes crescentes de solução metanólica estoque, com o auxílio de pipeta automática, os quais foram completados até o menisco com metanol. Foi realizada a leitura das soluções em espectrofotômetro no comprimento de onda 268 nm. Assim foi possível elaborar um gráfico relacionando as absorbâncias em função da concentração de ácido kójico e calcular a equação da reta e o coeficiente de regressão linear.

3.3.5. ENSAIO DE PERMEÇÃO *IN VITRO*

3.3.5.1. ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA

Conforme Sato et.al. (2007) foi utilizada como solução receptora a solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,4.

3.3.5.2. ENSAIO DE PERMEÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Para a realização deste ensaio foram utilizados peles de orelha de porco, obtidas em abatedouro logo após o abate do animal e o sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus, apresentado na Figura 4.



Figura 4 – Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus.

A assepsia das orelhas foi feita em água corrente e posteriormente a pele foi removida da cartilagem com auxílio de tesoura e bisturi. Tecidos não desejados, como o adiposo e pelos, foram retirados, e as peles foram dermatomizadas, com auxílio de um dermatômetro, na espessura de 500 μm sendo isolados somente o estrato córneo, epiderme e derme.

A solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 foi colocada no compartimento receptor, as peles foram hidratadas e recortadas em tamanho adequado para o ensaio de permeação, em seguida foram colocadas na célula de difusão com o lado da derme voltado para baixo, ficando em contato com a solução receptora e a região do estrato córneo voltada para cima. Espalharam-se uniformemente sobre toda a área da membrana 0,33 g das formulações contendo 2% de ácido kójico, sendo essa massa previamente obtida utilizando a peça de vidro unida ao anel dosador por fita adesiva que foram tarados e adicionada formulação até completar o anel dosador. O volume do meio receptor era de 7 mL e a área disponível para a difusão foi 1,77 cm^2 (PRIMO et al., 2008).

O sistema de agitação foi acionado e amostras de 2,0 mL da fase receptora foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos. Para manter a "condição sink", a cada coleta foi reposto ao sistema 2,0 mL da solução receptora. O experimento foi realizado em hexaplicata, conduzido a $32^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ e a solução receptora foi constantemente agitada a $300 \pm 0,2$ rpm.

Para o cálculo da quantidade permeada (Q), considerou-se as diluições que ocorreram após a primeira coleta, empregando-se a equação 2 descrita abaixo, segundo Aronson (1993) e Bentley (2002):

$$Q_{real, t} = C_{mensurada, t} \cdot V_r + \sum_{n=1}^{n-1} C_a \cdot V_a \text{ (equação 2)}$$

na qual: Q é a quantidade permeada acumulada, $Q_{real,t}$ é o valor real no tempo t, $C_{mensurada,t}$ é a concentração mensurada da coleta no tempo t, V_r é o volume da solução receptora da célula de difusão, C_a é a concentração da amostra removida, e V_a é o volume da amostra removida.

A quantificação de ácido kójico na solução tampão 0,2 M pH 7,4 foi realizada por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 268 nm (Hitachi), utilizando a curva analítica em solução tampão 0,2 M, pH 7,4, obtida no desenvolvimento do método analítico, para determinar a concentração de ácido kójico permeado. As peles submetidas ao estudo de permeação foram limpas com algodão embebido em água destilada e avaliadas quanto à retenção.

3.3.5.3. RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Para o ensaio de retenção no estrato córneo (EC) a pele de porco exposta à permeação foi limpa e fixadas em placa de vidro com o auxílio de fita adesiva, então foram recortados 16 pedaços de fita adesiva do tamanho da área que a pele ficou em contato com a formulação durante a permeação e esses 16 pedaços de fita (Fita Scotch 3M 750) postos em contato com a pele dobrados foram colocados em tubos de ensaio com 5 mL de metanol, exceto a primeira fita que foi descartada. Os tubos de ensaio foram então agitados em vortex por 2 minutos, colocados no ultrassom por 30 minutos, centrifugados e a solução filtrada em membrana milipore de 0,45µm.

Para o ensaio de retenção na epiderme + derme (E + D) a área de pele em contato com a formulação foi picotada e transferida para tubo de Beckman contendo 5 mL de metanol, agitada em vortex por 2 minutos e triturada com o auxílio de Turrax por 3 minutos. A suspensão de tecido ficou no ultrassom por 30 minutos e em seguida os tubos foram centrifugados. Com o uso de membrana milipore de 0,45 μm , o sobrenadante foi filtrado (ROSA et al., 2003).

Partindo da curva analítica em metanol obtida no desenvolvimento de metodologia analítica, a quantificação de ácido kójico foi realizada por espectrofotometria UV para os dois ensaios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

4.1.1. DIAGRAMA DE FASES

O diagrama de fases foi construído como descrito no item 3.3.1.1., para que em seguida cada uma das formulações fosse caracterizada visualmente, obtendo o diagrama ilustrado na Figura 5.

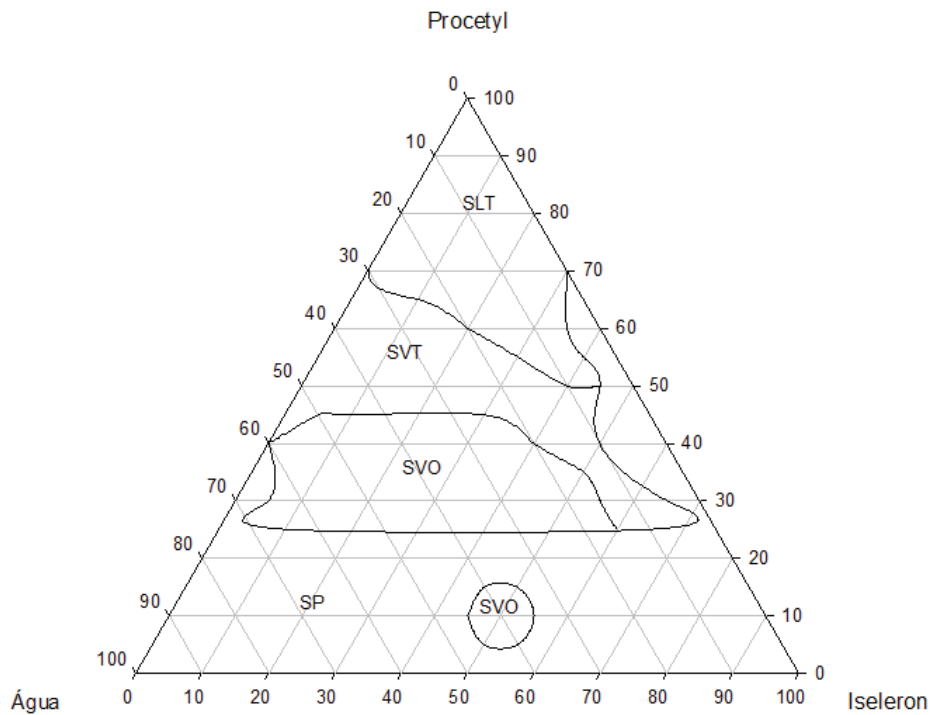


Figura 5 – Digrama de fases. As áreas delimitadas representam: SP – separação de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT – sistema viscoso transparente; SLT – sistema líquido transparente.

Através do diagrama de fases foram selecionadas os SVTs e SLTs, os quais foram analisados por MLP em busca de estruturas anisotrópicas que os caracterizassem como CLs.

Conforme a Figura 5, a formação de sistemas transparentes tem uma relação direta com a concentração de tensoativo na formulação, pois nas regiões com baixa concentração de tensoativo há a separação de fases, sendo que com pequena quantidade de tensoativo não é possível estabilizar a mistura de água e óleo. Já com o aumento da concentração de tensoativo, sistemas como os CLs são observados.

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

A análise estrutural das formulações e confirmação de que as amostras se tratavam de CLs foi realizada por MLP, sendo observadas estrias, características de fase hexagonal, as quais estão ilustradas na Figura 6, fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase hexagonal.

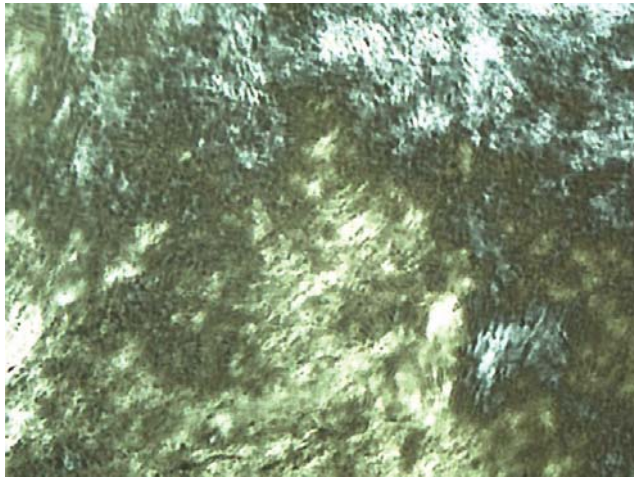


Figura 6 – Fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase hexagonal.

As lâminas foram preparadas como descrito no item 3.3.2.1, sendo obtido o diagrama de sistemas apresentados na Figura 7.

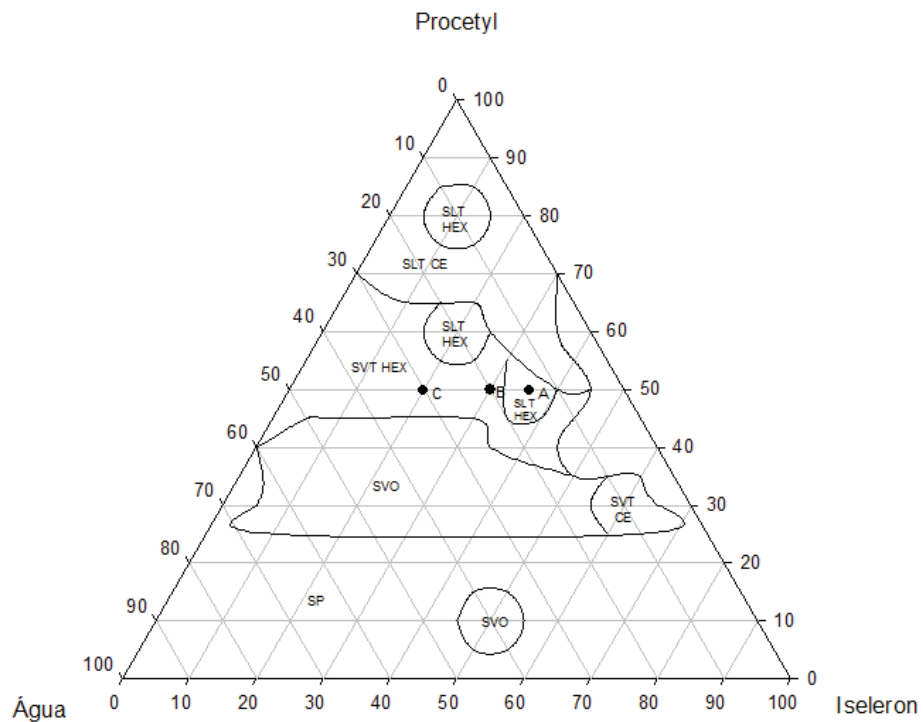


Figura 7 – Digrama de sistemas. As áreas delimitadas representam: SP – separação de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT CE– sistema viscoso transparente campo escuro; SVT HEX – sistema viscoso transparente estrutura hexagonal; SLT CE – sistema líquido transparente campo escuro; SLT HEX – sistema líquido transparente estrutura hexagonal.

A partir do diagrama de sistemas foi possível selecionar as formulações mais indicadas para incorporação do ácido kójico, as quais passariam também pelos testes de caracterização físico-química, estabilidade e desempenho na permeação do ácido kójico.

Foram selecionadas três formulações cujas concentrações dos componentes estão apresentadas na Tabela 1, concentrações, em %, dos componentes das formulações, e estão indicadas na Figura 7, digrama de sistemas. As formulações contendo ácido kójico tiveram seu nome acrescido de um F (ex.: AF, BF e CF).

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

Amostras	Fase oleosa (%)	Tensoativo (%)	Fase aquosa (%)
A	35	50	15
B	30	50	20
C	20	50	30

4.2.2. ENSAIO DE TEXTURA

As propriedades mecânicas das formulações com e sem adição de 2% de ácido kójico, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade, estão apresentadas na Tabela 2, propriedades mecânicas das formulações em estudo, e estão ilustrada na Figura 8, parâmetros obtidos na análise do perfil de textura para as amostras A, AF, B, BF, C e CF.

Tabela 2 – Propriedades mecânicas das formulações em estudo.

Amostra	Dureza	Compressibilidade (kg.s)	Adesividade (kg.s)	Coesividade
A	8,151±0,768	0,117±0,011	0,040±0,004	0,641 ±0,0358
AF	8,493±0,477	0,125±0,007	0,038±0,003	0,613±0,0513
B	20,739±1,805	0,287±0,023	0,132±0,016	0,688±0,0339
BF	27,313±1,850	0,392±0,026	0,234±0,020	0,742±0,0188
C	707,643±65,200	9,915±0,859	3,832±1,348	0,614±0,0108
CF	696,091±87,508	10,688±0,878	5,218±2,146	0,620±0,0103

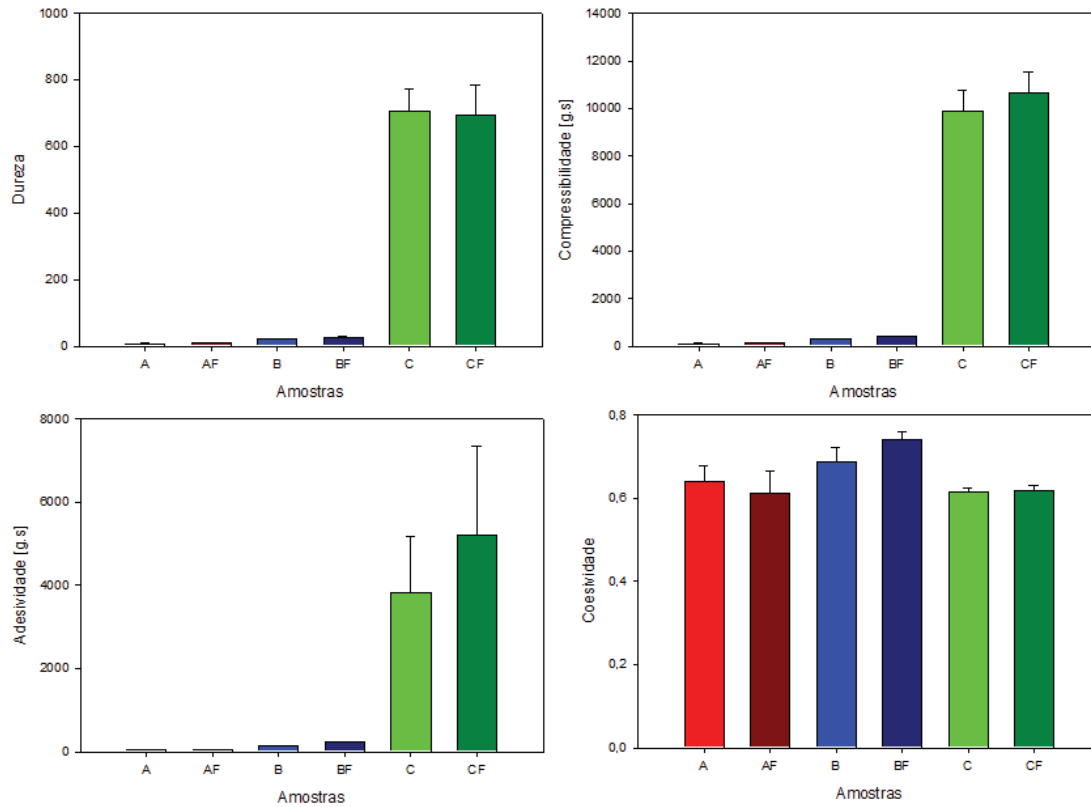


Figura 8. Parâmetros obtidos na análise do perfil de textura (Dureza, Compressibilidade, Adesividade e Coesividade) para as amostras A, AF, B, BF, C e CF.

Utilizando o teste ANOVA, as formulações A, AF, B e BF têm propriedades de dureza, compressibilidade e adesividade estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$), indicando que a incorporação do ácido kójico não influenciou significativamente ($p < 0,05$) nas propriedades mecânicas dessas formulações.

Como pode-se observar na Figura 8, as formulações C e CF apresentaram valores estatisticamente maiores de dureza, compressibilidade e adesividade ($p < 0,05$), pois a sonda penetrava na amostra C e CF, que possuíam elevada viscosidade, com aspecto de cera resfriada, tendo dificuldade de penetrar e deixar essas formulações. Nesse caso, a incorporação do ácido kójico influenciou significativamente somente a compressibilidade da formulação, sendo que a amostra CF apresentou maior resistência à compressão.

Em relação à coesão, as amostras A, AF, C e CF apresentaram valores estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) e as formulações B e BF apresentaram valores estatisticamente maiores, sendo que nesse caso a incorporação do fármaco aumentou significativamente a coesão da amostra B.

Assim, a formulação B, em relação à textura, é a mais indicada para incorporação do fármaco, pois apresentou maior coesividade, que é um parâmetro importante para produtos tópicos, já que permite um escoamento pelo frasco de armazenamento controlável pelo usuário do produto, facilitando sua administração.

4.2.3. ENSAIO DE BIOADESÃO

Os valores encontrados para o parâmetro de força bioadesiva das formulações em estudo estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores obtidos para o parâmetro de força bioadesiva das formulações em estudo.

Amostra	Força Bioadesiva (N ± DP)
A	0,043±0,002
AF	0,034±0,006
B	0,081±0,070
BF	0,047±0,002
C	0,459±0,057
CF	0,209±0,027

Com o acréscimo de água na fórmula, além das formulações apresentarem maior viscosidade, apresentaram maior força bioadesiva, o que poderia melhorar a fixação do produto na pele do usuário. Portanto as formulações A, AF, B e BF têm propriedades

bioadesivas estatisticamente iguais, indicando que a incorporação do ácido kójico não influenciou significativamente ($p < 0,05$) na força bioadesiva dessas formulações. As formulações C e CF apresentaram valores estatisticamente maiores com relação à força bioadesiva ($p < 0,05$), e nesse caso a incorporação do ácido kójico influenciou significativamente na propriedade bioadesiva com diminuição observada.

4.2.5. COMPORTAMENTO REOLÓGICO

A reologia descreve a deformação de um corpo (sólido, líquido ou gás) sob influência de tensões (SCHRAMM, 2006), sendo esse ensaio útil para avaliar sistemas nanoestruturados, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e o grau de organização dos sistemas.

O comportamento reológico das formulações com e sem ácido kójico foi avaliado pelo ensaio de escoamento utilizando-se reômetro com velocidade controlada – CR -. Obtendo-se diagramas chamados curva de fluxo, que correlacionam tensão de cisalhamento (τ) e taxa de cisalhamento (λ) (SCHRAMM, 2006); e curva de viscosidade, que correlaciona viscosidade (η) e taxa de cisalhamento (λ) (SCHRAMM, 2006). Esses diagramas estão ilustrados nas Figuras 9 e 10.

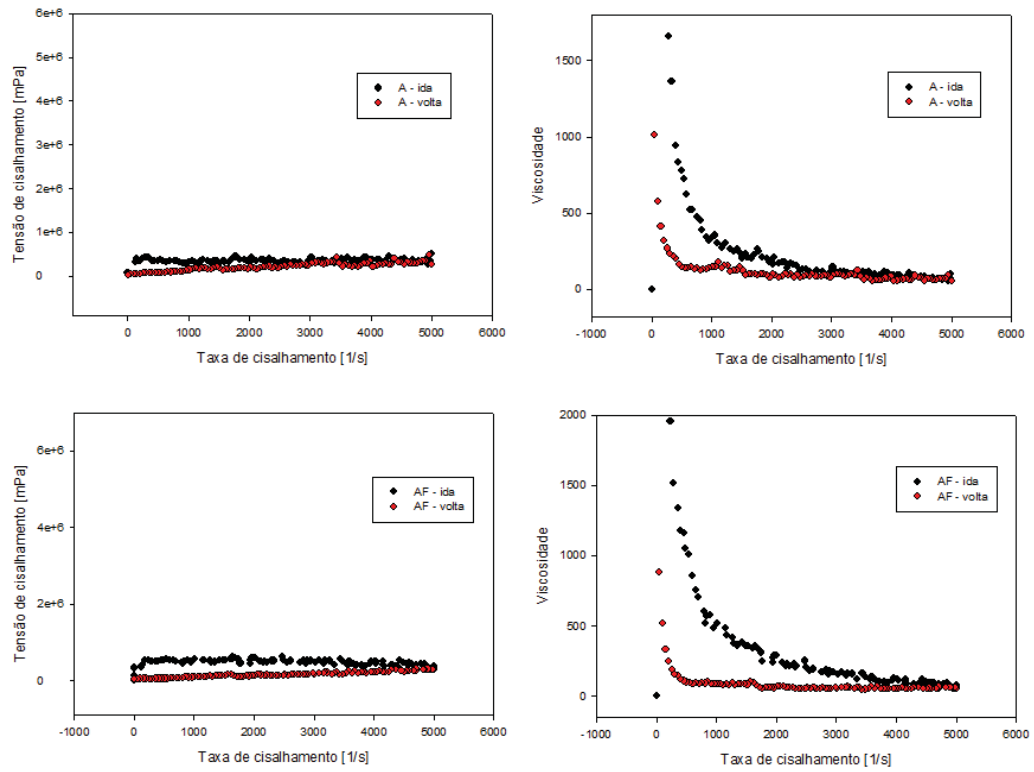


Figura 9. Curvas de fluxo e de viscosidade das amostras A com e sem ácido kójico.

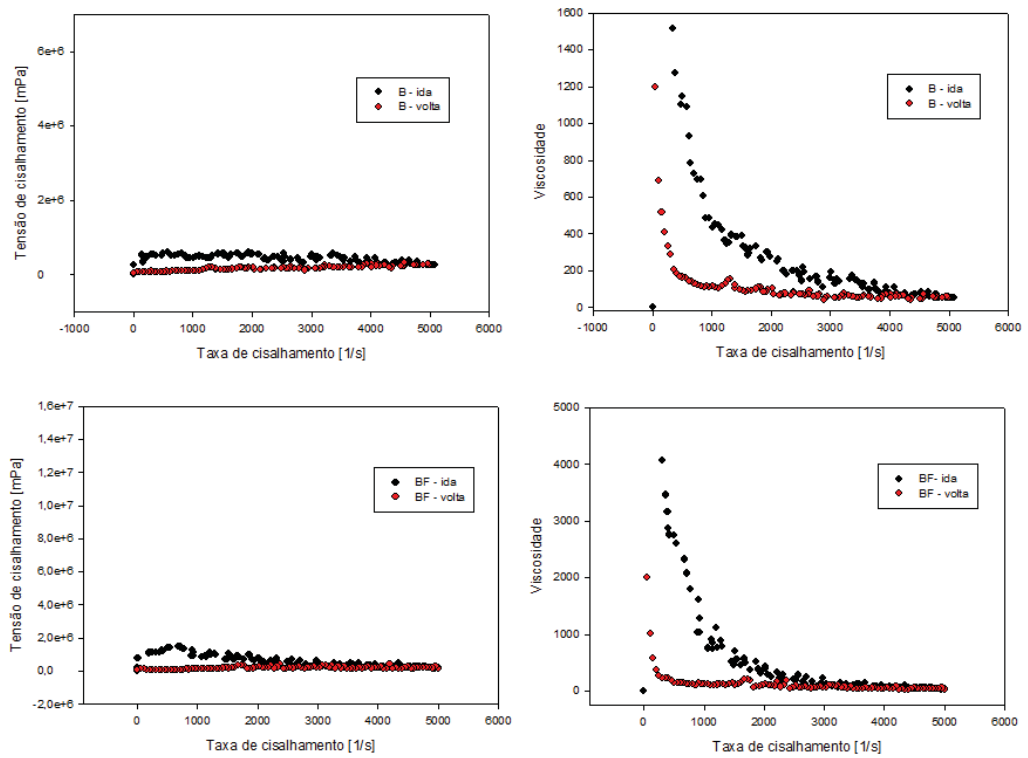


Figura 10. Curvas de fluxo e de viscosidade das amostras B com e sem ácido kójico.

É possível notar que todas as amostras apresentavam fluxo não-newtoniano, pois não apresentavam linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento comportando-se como fluídos pseudoplásticos, também porque pode-se observar que houve diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Esse fenômeno ocorre, pois há o aumento da taxa de cisalhamento a ponto de induzir a orientação das partículas excedendo o efeito do movimento Browniano, ocorrendo queda significativa da viscosidade (SCHRAMM, 2006).

Essa característica é importante para produtos de aplicação tópica, pois permite o fácil escoamento do produto para o exterior do frasco.

As curvas de viscosidade evidenciaram que a viscosidade aumenta com o acréscimo de água nas formulações, formando sistemas mais estruturados.

Todos os reogramas apresentados indicam presença de tixotropia nesses sistemas, com perfil de reconstrução tempo dependente, ou seja, com área de histerese, a qual indica a energia necessária para desestruturar a estrutura tixotrópica (SCHRAMM, 2006). A curva de viscosidade correspondente mostra que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e quando a taxa de cisalhamento é reduzida continuamente a viscosidade aumenta, mas menos do que diminuiu inicialmente, confirmando a presença de tixotropia nas amostras A, AF, B e BF.

Não foi possível realizar o ensaio de escoamento para as amostras C e CF, pois após a centrifugação dessas amostras, para eliminação de bolhas, essas ficaram com aspecto de cera de vela, impossibilitando que essas amostras fossem analisadas.

4.3. TESTES DE ESTABILIDADE

4.3.1. AVALIAÇÃO VISUAL

As amostras foram preparadas e armazenadas em frasco de vidro transparente ao abrigo da luz e na faixa de temperatura de 23 à 32 °C e passado 3 meses foram observadas alterações como: as formulações compostas por ácido kójico tanto a AF, quanto a BF e a CF tiveram alteração de cor para uma coloração amarelo escuro, as quais instantaneamente após a manipulação tinham cor amarelo bem claro.

As formulações A, AF, B e BF separaram de fase após 3 meses. Já as formulações C e CF se mantiveram homogêneas. Esse resultado sugere que haveria a necessidade de adição de algum componente nessas formulações, por exemplo um co-tensoativo, que pudesse estabilizá-las por mais tempo, possibilitando um maior tempo de validade para esses produtos.

4.3.2. TESTE DE CENTRÍFUGA

Após a centrifugação houve separação de fases da amostra A e AF, e não houve separação de fases das amostras B, BF, C e CF, permanecendo homogêneas após a centrifugação à 3000 rpm por 30 minutos, indicando que as amostras A e AF possui instabilidade físico-química e provavelmente separaria de fase em um pequeno espaço de tempo.

4.3.3. DETERMINAÇÃO DO pH

O pH das amostras A, AF, B, BF C e CF estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – pH das amostras A, AF, B, BF, C e CF.

Amostra	pH
A	7,68
AF	5,97
B	7,14
BF	5,79
C	6,83
CF	5,67

Como era esperado, as amostras acrescidas de ácido kójico apresentaram um pH menor em relação as formulações ausentes de fármaco, já que o ativo trata-se de um ácido. No entanto espera-se que as amostras, mesmo com a presença de ácido kójico, sejam bastante tolerada pela maioria das pessoas utilizando-as topicamente, já que a pele produz uma secreção com importante capacidade tamponante, que faz com que a ela tolere produtos com pH que variam de 3 a 9 (LEONARDI et al., 2002).

4.3.4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA

A curva analítica de ácido kójico em água foi realizada para análise dos resultados da determinação do coeficiente de partição óleo/água desse fármaco.

As concentrações utilizadas na curva analítica de ácido kójico em água e as respectivas absorbâncias, média, desvio padrão e desvio padrão relativo estão apresentados na Tabela 5, sendo que a curva analítica está ilustrada na Figura 11.

Tabela 5. Concentrações utilizadas para confecção da curva analítica de ácido kójico em água e as respectivas absorbâncias, média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
5	0,192	0,186	0,193	0,1903	0,004	16,627
10	0,416	0,407	0,404	0,409	0,006	1,816
15	0,609	0,609	0,609	0,609	0,0003	1,302
20	0,828	0,820	0,830	0,826	0,005	0,7793
25	1,013	1,014	1,014	1,014	0,0001	0,305
30	1,215	1,212	1,207	1,211	0,002	0,004

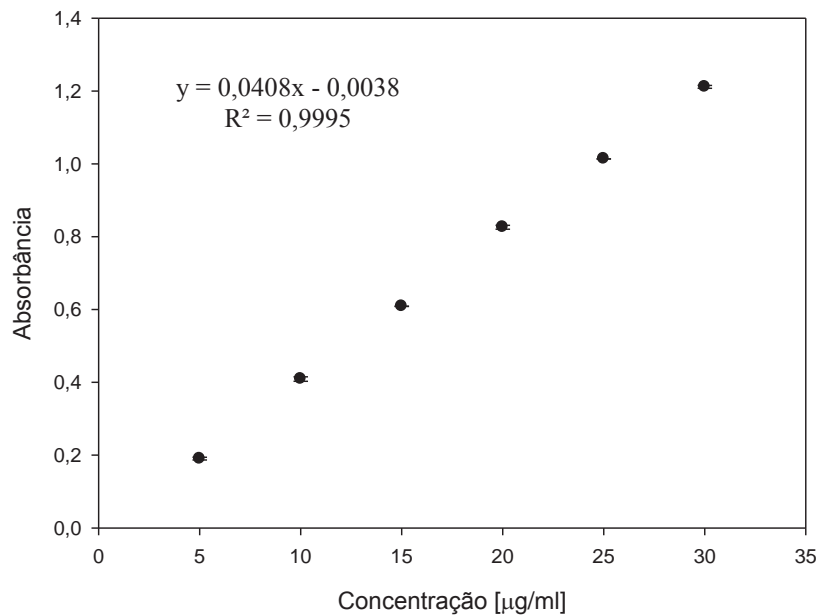


Figura 11. Curva analítica de ácido kójico em água.

O coeficiente de partição foi calculado pela equação 1:

$$K (o/a) = \frac{C1-C2}{C2} \quad \text{equação 1}$$

$$C2$$

$$K (o/a) = \frac{55,0686 - 51,4657}{51,4657}$$

$$51,4657$$

$$K (o/a) = 0,0700$$

O resultado obtido indica que o fármaco é muito pouco lipossolúvel, o que até mesmo explicado pela sua estrutura molecular, que possui grupos polares, que impedem a interação molecular entre o ácido kójico e moléculas lipossolúveis.

As principais características que determinam a absorção de um fármaco através da pele por difusão é a hidro e a lipossolubilidade, e o coeficiente de partição mede a quantidade de ativo que se difunde de um veículo líquido, semi-sólido ou sólido para uma fase adjacente (BARRY, 1987). Os veículos que conseguem aumentar a concentração do ativo no estrato córneo podem levar a um aumento da permeabilidade do mesmo (TOJO et al., 1987).

4.4. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO

4.4.1. DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

A Figura 12 ilustra o espectro de varredura do ácido kójico, podendo observar que o ácido kójico possui maior absorção no comprimento de onda igual a 268 nm.

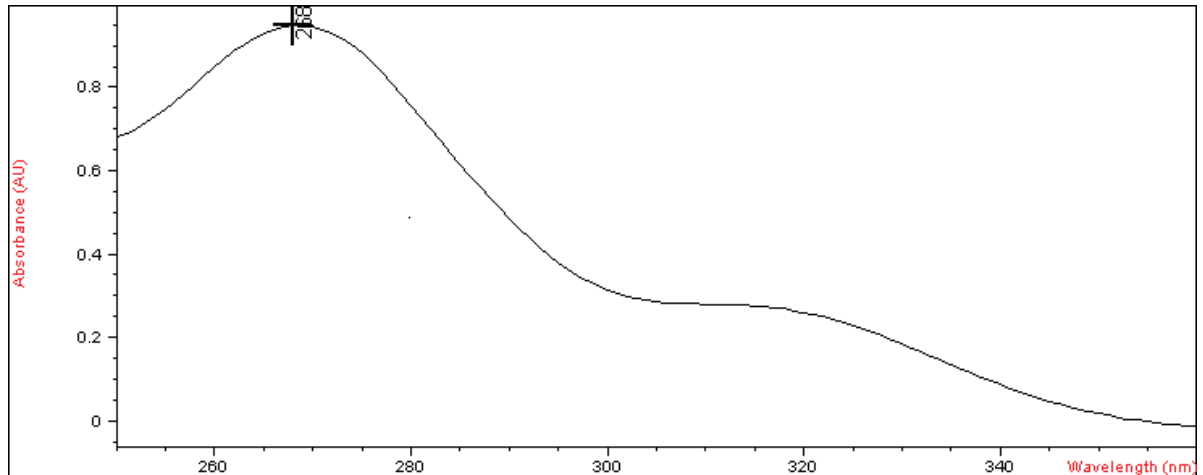


Figura 12. Espectro de varredura do ácido kójico.

4.4.2. CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO KÓJICO EM SOLUÇÃO TAMPÃO

A curva analítica de ácido kójico em solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 foi realizada para análise dos resultados de permeação cutânea, já que a solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 foi utilizada como solução receptora.

As concentrações utilizadas na curva analítica de ácido kójico em solução tampão 0,2 M pH 7,4 e as respectivas absorvâncias, média, desvio padrão e desvio padrão relativo estão apresentados na Tabela 6, sendo que a curva analítica está ilustrada na Figura 13.

Tabela 6. Concentrações utilizadas para confecção da curva analítica de ácido kójico em solução tampão e as respectivas absorbâncias, média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
5	0,100	0,121	0,140	0,120	0,020	16,627
10	0,298	0,309	0,303	0,303	0,005	1,816
15	0,491	0,489	0,501	0,494	0,006	1,302
20	0,685	0,675	0,677	0,679	0,005	0,7793
25	0,870	0,866	0,865	0,867	0,003	0,305
30	1,042	1,042	1,038	1,041	0,002	0,222

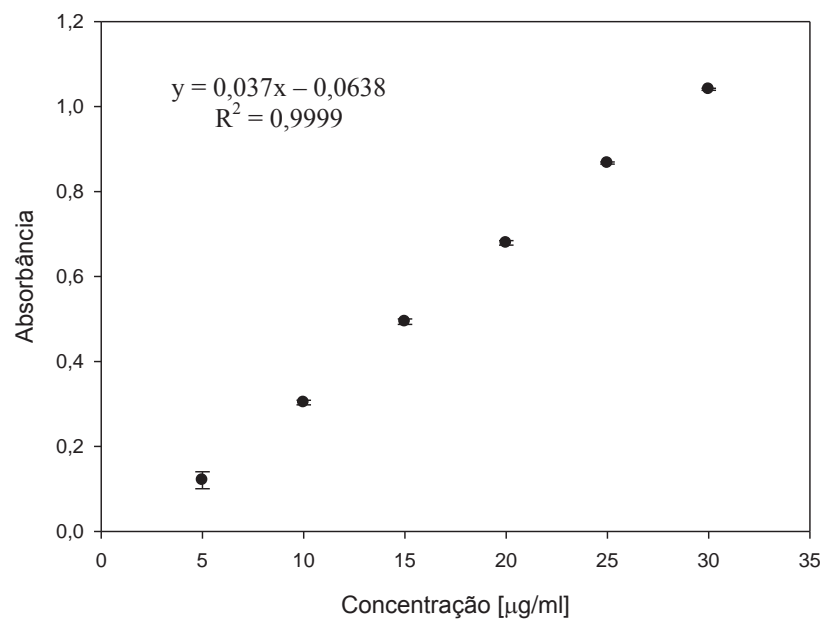


Figura 13 – Curva analítica de ácido kójico em solução tampão fosfato pH 7,4.

4.4.3. CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO KÓJICO EM METANOL

A curva analítica de ácido kójico em metanol foi realizada para análise de retenção cutâneo do fármaco, já que o ácido kójico foi extraído desses tecidos com o metanol.

As concentrações utilizadas para confecção da curva analítica de ácido kójico em metanol e as respectivas absorbâncias, média, desvio padrão e desvio padrão relativo estão na Tabela 7, sendo que a curva analítica está ilustrada na Figura 14.

Tabela 7. Concentrações utilizadas para confecção da curva analítica de ácido kójico em metanol e as respectivas absorbâncias, média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
5	0,200	0,194	0,185	0,193	0,007	3,912
10	0,474	0,469	0,466	0,470	0,004	0,860
15	0,744	0,744	0,740	0,743	0,002	0,311
20	1,016	1,016	1,005	1,012	0,006	0,627
25	1,255	1,225	1,260	1,247	0,019	1,500
30	1,374	1,500	1,498	1,457	0,072	4,952

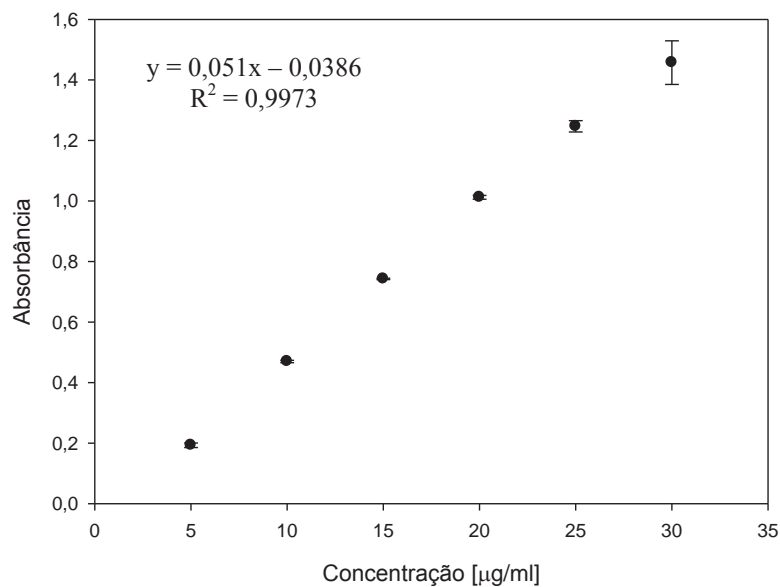


Figura 14 - Curva analítica de ácido kójico em metanol.

4.5. ENSAIO DE PERMEAÇÃO *IN VITRO*

4.5.1. ENSAIO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO *IN VITRO*

As tabelas com a porcentagem de ácido kójico permeado a partir das amostras AF, BF e CF e os gráficos com os perfis de liberação de ácido kójico a partir dessas amostras, estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17.

Tempo (h)	% Ácido Kójico permeado
0,0833	1,111 ± 0,214
0,166	1,338 ± 0,160
0,25	1,526 ± 0,198
0,333	1,747 ± 0,217
0,416	1,911 ± 0,219
0,5	2,208 ± 0,266
1	2,476 ± 0,223
2	2,737 ± 0,215
3	3,045 ± 0,219
4	3,291 ± 0,235
5	3,532 ± 0,244
6	3,813 ± 0,258
7	4,073 ± 0,238
8	4,311 ± 0,224
9	4,568 ± 0,241
10	4,807 ± 0,245
11	4,974 ± 0,251
12	5,197 ± 0,284

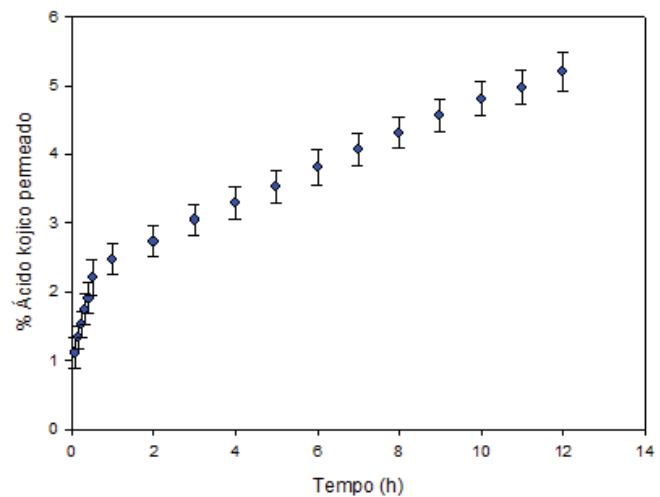


Figura 15. Porcentagem de ácido kójico permeado a partir da amostra AF e Perfil de permeação de ácido kójico a partir da amostra AF.

Tempo (h)	% Ácido Kojico permeado
0,0833	0,415 ± 0,087
0,166	0,483 ± 0,099
0,25	0,560 ± 0,061
0,333	0,621 ± 0,056
0,416	0,711 ± 0,094
0,5	0,824 ± 0,164
1	0,966 ± 0,239
2	1,069 ± 0,163
3	1,216 ± 0,176
4	1,349 ± 0,199
5	1,506 ± 0,203
6	1,609 ± 0,235
7	1,721 ± 0,269
8	1,835 ± 0,295
9	1,945 ± 0,275
10	2,060 ± 0,312
11	2,177 ± 0,319
12	2,284 ± 0,353

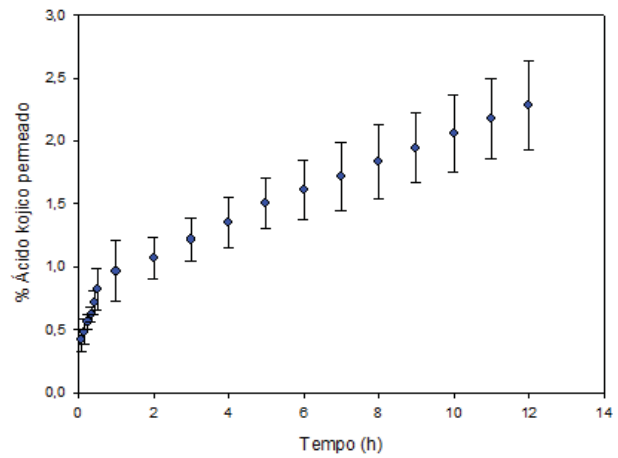


Figura 16. Porcentagem de ácido kojico permeado a partir da amostra BF e Perfil de permeação de ácido kojico a partir da amostra BF.

Tempo (h)	% Ácido Kojico permeado
0,0833	0,285 ± 0
0,166	0,391 ± 0
0,25	0,464 ± 0
0,333	0,560 ± 0,004
0,416	0,672 ± 0,076
0,5	0,753 ± 0,037
1	0,889 ± 0,093
2	1,108 ± 0,108
3	1,352 ± 0,130
4	1,500 ± 0,147
5	1,684 ± 0,175
6	1,852 ± 0,199
7	2,026 ± 0,231
8	2,160 ± 0,210
9	2,364 ± 0,261
10	2,491 ± 0,258
11	2,713 ± 0,299
12	2,853 ± 0,251

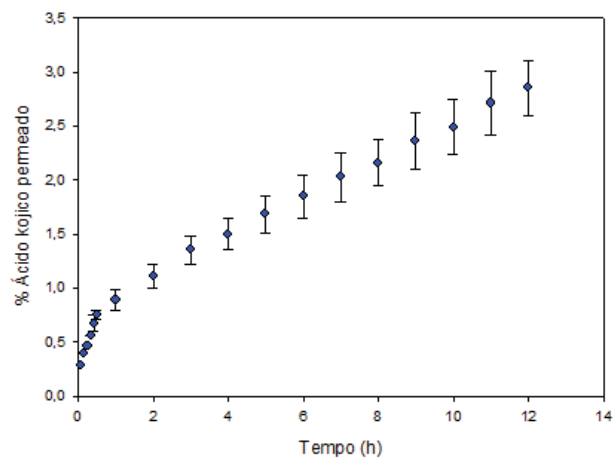


Figura 17. Porcentagem de ácido kojico permeado a partir da amostra CF e Perfil de liberação de ácido kojico a partir da amostra CF.

Os resultados de retenção do ácido kójico no EC e na E + D estão descritos na Tabela 8 e ilustrados nas Figuras 18 e 19.

Tabela 8 – Comparação da retenção no EC e na E + D do ácido kójico entre as amostras.

Amostra	Retenção EC [$\mu\text{g/ml} \pm \text{DP}$]	Retenção E + D [$\mu\text{g/ml} \pm \text{DP}$]
AF	14,267 \pm 1,487	10,239 \pm 1,696
BF	15,365 \pm 5,510	5,999 \pm 3,197
CF	7,332 \pm 3,430	2,698 \pm 0,462

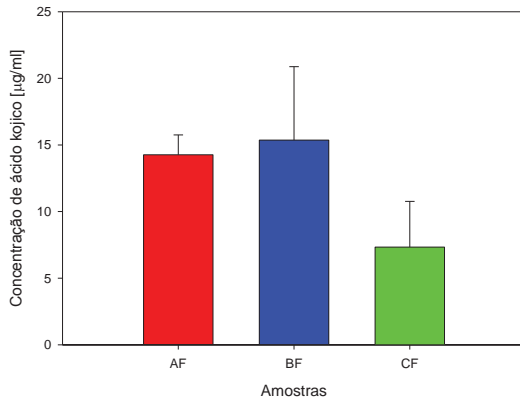


Figura 18 – Retenção no EC.

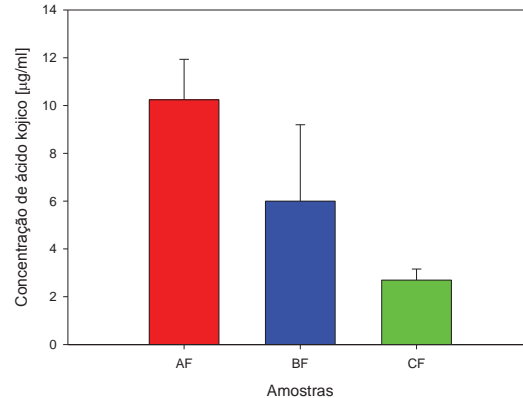


Figura 19 – Retenção na E + D.

De acordo com os resultados de permeação *in vitro* de ácido kójico a amostra AF possibilitou, significativamente ($p < 0,05$), a maior permeação de ácido kójico (5,2%), seguida amostra CF (2,8%) e da BF (2,3%), sendo que os valores de permeação de BF e de CF são estatisticamente significativos por todo o período da permeação ($p < 0,05$).

Após 12 horas a amostra BF reteve mais o fármaco no EC (15,4%), seguida da amostra AF (14,3%) e da CF (7,3%), sendo que a retenção de ácido kójico nas amostras AF e BF são

significativamente semelhantes entre si ($p < 0,05$) e estatisticamente diferentes da amostra CF. Já em relação à D + E a amostra AF reteve, significativamente mais o fármaco nesse estrato (10,2 %), seguida da amostra BF (6 %) e da CF (2,7 %), que são valores estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$).

Esse comportamento é observado, pois a amostra CF possui maior concentração de água, e como o ácido kójico trata-se de um fármaco hidrossolúvel, ele fica mais dissolvido na amostra CF do que nas demais, sendo a formulação que mais reteve o fármaco, apresentando baixa permeação e a menor retenção no EC e na E + D.

Ao contrário da amostra CF, a amostra AF é a que tem a menor porcentagem de água, solubilizando menos o fármaco, deixando-o mais “livre” para passar pelos estratos da pele e permear por essa, sendo a formulação que apresentou a maior permeação de ácido kójico e retenção no EC e na E + D.

Como a formulação BF tem valor intermediário de água, essa apresentou valor intermediário de retenção do ácido kójico no EC e na E + D.

Esses resultados demonstram que as formulações desenvolvidas conseguem modular a permeação do ácido kójico na pele, e é exatamente esse o objetivo do desenvolvimento desses sistemas, permitir que o ácido kójico fique por mais tempo na pele, que é seu local de ação, e que não seja absorvido, podendo ocorrer possíveis ações sistêmicas indesejadas.

Podem ser feitas algumas suposições sobre o mecanismo pelo qual os CLs influenciam na penetração do ácido kójico na pele. São eles: Os CLs utilizados estavam saturados com ácido kójico (2%), o que pode ser um fator responsável no aumento da penetração desse fármaco na pele, após a aplicação tópica. Além disso, as moléculas de tesoativo ou de óleo podem difundir na superfície da pele e atuarem como promotores de permeação de ácido kójico devido ao fato de perturbarem a estrutura lipídica do estrato córneo, facilitando a difusão através dessa barreira lipofílica que limita a penetração de substâncias, ou devido

aumentarem a solubilidade do fármaco na pele, ou seja, aumentarem o coeficiente de partição do fármaco entre a pele e o veículo (Vicentini et al., 2008).

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a amostra CF além de reter mais o ácido kójico, tem perfil de textura com alta dureza e coesividade, o que impede uma boa aplicação do produto e produz um sensorial pouco agradável.

A amostra AF possibilitou boa retenção do ácido kójico pela pele, mas apresentou baixos valores de dureza e viscosidade, dificultando a administração do produto.

A amostra B apresentou comportamento reológico, perfil de textura e de bioadesão adequadas para uso tópico, e seu resultado de permeação e retenção cutânea demonstraram que essa formulação contribui para modular a permeação cutânea do ácido kójico, permitindo sua liberação controlada.

Os resultados sugerem que o sistema proposto é viável para incorporação do ácido kójico, permitindo sua liberação controlada e que o sistema mais viável para a incorporação do ácido kójico é o sistema B.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.L.N., et al. Peeling químico: avaliação de ácido glicólico, ácido retinóico e ATA. Rev. Cosmiatr. Med Est., v.3, n.3, p.41-4, 1995.

ARONSON, H. Correction factor for dissolution profile calculations. J. Pharm. Sci., Washington, v. 82, n. 11, 1993.

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

BARRY, B.W. Dermatological Formulations, Percutaneous Absorption. Marcel Dekker, New York, p.95-213, 1987.

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

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

BENTLEY, M.V.L.B.; LOPEZ, R.F. V. Curso de permeação cutânea in vitro II. Módulo II. Apostila. Ribeirão Preto: FUNDEFARP, 2002.

BRAUGHLER, J.M., et al. The involvement of iron in lipid peroxidation, importance of ferric to ferrous ratios in initiation. J. Biol. Chem. 261, p.10282–10289, 1986.

BRUSCHI, M.L., et al. Semisolids systems containing própolis for the treatment of periodontal disease: *In Vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *J. Phram. Sci.*, v. 96, p. 2074 – 2089, 2007.

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

CARVALHO F.C., et al. Surfactants systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mocoadhesive properties. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 62, p. 430 – 439, 2010.

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

DAVIES, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals: I. General aspects. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 9895–9901, 1987.

DICK, I. P.; SCOTT, R. C. Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 44, p. 640-645, 1992.

DUNFORD, H.B. Free radicals in iron-containing systems. *Free Radical Biol. Med.* 3, p.405–421, 1987.

INOUE, S.; KAWANISHI, S. Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res.*, v. 47, p. 6522–6527, 1987.

FLORENCE, A.T.; ATWOOD, D. Solubility and partitioning of drugs. In: *Physicochemical principles of pharmacy*. 2.ed. London:MacMillan Press,1988. Cap.5, p.132-171.

GOMARA, F.L. et al. Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de ácido fólico. *Ars Pharm. Barcelona*, v. 45, n. 2, p. 145-153, 2004.

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

HERAI, H. et al. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. *Int. J. Pharmaceutic.*, v. 329, n. 1-2, p. 88-93, 2007.

HIGUSHI, T.; CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, v.4, p. 117-212, 1965.

HIRATA, L.L. et al. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farm. Bonaerense*. v. 23, n.3, p. 418-24, 2004.

HOSMER, J. et al. Microemulsions Containing Medium-Chain Glycerides as Transdermal Delivery Systems for Hydrophilic and Hydrophobic Drugs. *American Association of Pharmaceutical Scientists: Pharmaceutical Science Technology*, v. 10, n. 2, p. 589-596, 2009.

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

JONES, D. S. et al. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. *J. App. Pol. Sci.*, 61, 2229–2234, 1996.

JONES, D. S. et al.. Textural analysis and flow rheometry of bioadhesive, antimicrobial oral gels. *Pharm. Res.*, v. 14, p.450–457, 1997. (a)

JONES, D. S. et al. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. *Int. J. Pharm.*, 151, p.223–233, 1997. (b)

JONES, D. S. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. *J. Control. Release*, 49, p.71–79, 1997. (c)

JONES, D. S. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *J. Control. Release*, 67, p.357–368, 2000.

JONES, DS. et al. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int. J. Pharm.*, v. 372, p. 49-58, 2009.

KHANONM, F.; et al. Tyrosinase inhibitory activity of bangladeshi indigenous medicinal plants. *Biosc., Biotechnol. Biochem.*, v.69, n.9, p.1967-1969, 2000.

KOFFI, A.A.; AGNELY, F.; PONCHEL, G.; GROSSIORD, J.L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 27, p. 328-335, 2006.

LEE, K.K.; CHOI, J.D. *Areca catechu* L. Extract. II. Effects on inflammation and melanogenesis. *J. Cosmet. Sci.*, v.49, p.351-359, 1998.

LOPEZ, R.F.V. et al. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. *J. Control. Release*, v. 14, p. 65-70, 2003.

MARTINS, S.; Ativos Cosmecêuticos utilizados em dermatologia. *Racine*, n. 53, p. 64-71, 1999.

MERK INDEX, The 14° ed., p.1632 e 1726, 2006.

MITANI, H., et al. Alterations of hairless mouse skin exposed to chronic UV irradiation and its prevention by hydrocortisone. *Photochem. Photobiol.* v. 69, p. 41–46, 1999.

MORAIS, G.G.; Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). 2006. 158p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

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

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.58, n.2, p.343–356, 2004.

NICOLETTI, M. A. Hiperchromias: Aspectos Gerais e Uso de Despigmmentantes Cutâneos. *Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)* v. 14, 2002.

NIWA, Y., AKAMATSU, H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. *Inflammation* v.15, p.303–315, 1991.

OECD Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Paris: Organisation for economic cooperation and development, 2008.

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

PRIMO, F.L., et al. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of foscan / nanoemulsion (NE) applicable to PDT skin cancer treatment. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v.8, p.340-347, 2008.

PUPPO, A., HALLIWELL, B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.* 249, p.185–190, 1988.

PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; GESZTESI, J.L.; COSTA, F. Estudo *in vivo* de atividade antirradicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. *An. Bras. Dermatol.*, v.80, sup.3, p.S323-328, 2005

RESENDE, K.X. Obtenção e caracterização de sistemas microemulsionados não-iônicos e estudo da atividade antibiótica *in vitro* de eritromicina base nesse sistema. 2004. 103p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

ROBINS, A.H.; *Biological perspectives on human pigmentation*. Great British: Cambridge University Press, p.253, 1991.

ROSA, F.S., et al. *In vitro* skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *J. Control. Release*, v.89, n.2, p.261-269, 2003.

SAMPAIO S.A.P; RIVITTI E. A.; *Dermatologia* 3° Ed. 2008 Artes Médicas.

SANCHEZ D.B.O. Desempenho reológico e entálpico da massa de pão com amido resistente de milho e transglutaminase. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SANTOS, O. D. H. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética *in vivo* de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristal líquido. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SASSON, C. S. Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SATO, M. E. O. et al. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. Rev. Bras. Cienc. Farm., v. 43, n. 2, 2007.

SAUERBRONN, A.V.D.; FONSECA, A.M.; BAGNOLE, V.R.; ASSIS, J.S.; PINOTTI, J.A.; Efeitos do hipoestrogenismo e do envelhecimento sobre a pele. Rev. Ginec. e Obstet., v. 9, p. 246-251, 1998.

SCHRAMM, G. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo: Artliber, 2006.

SENYIGIT, T. et al. Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: *In vitro* and *in vivo* evaluation. Int. J. Pharmaceut., v. 403, p. 123-129, 2011.

SILVA, H. R. Sistemas Nanoestruturados Estabilizados com Álcool Cetílico Etoxilado e Propoxilado Contendo Fluconazol Potencialmente Ativo Contra Dermatômicoses. Dissertação

(Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.

TOJO,K.; TSAI,R.;TESTA,B.;CARRUPT,P.Percutaneous penetration of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. J. Pharm. Sci., Washington, v.76, n.2, p123-126, 1987.

USP, 2012 volume 3.

Viscentini F. T. M. C. et al. Quercetin in w/o microemulsion: In vivo and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. Science Direct. Eur. J. Pharm. Biopharm, v. 69, p. 948-957, 2008.