



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

DESENVOLVIMENTO DE COSMÉTICO CONTENDO
ÁCIDO ALFA-LIPÓICO PARA A PREVENÇÃO DE
ALTERAÇÕES DA PELE E DO ENVELHECIMENTO
CUTÂNEO.

JEMIMA DANIELA DIAS MORAES

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2011

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

**DESENVOLVIMENTO DE COSMÉTICO CONTENDO
ÁCIDO ALFA-LIPÓICO PARA A PREVENÇÃO DE
ALTERAÇÕES DA PELE E DO ENVELHECIMENTO
CUTÂNEO.**

JEMIMA DANIELA DIAS MORAES

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 a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2011

Ficha Catalográfica

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

M827d Moraes, Jemima Daniela Dias
Desenvolvimento de cosmético contendo ácido alfa-lipóico para a prevenção de alterações da pele e do envelhecimento cutâneo / Jemima Daniela Dias Moraes. – Araraquara, 2011
180 f.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Vera Lucia Borges Isaac
1. Ácido alfa-lipóico. 2. Estabilidade. 3. Cultura de células. 4. Aplicação tópica. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Epígrafe

*"É uma lei da vida humana, tão certa como a da gravidade: para vivermos plenamente, precisamos aprender a **USAR** as coisas e a **AMAR** as pessoas... Nunca **AMAR** as coisas nem **USAR AS PESSOAS!**"... "A felicidade não está no fim da jornada, e sim em cada curva do caminho que percorremos para encontrá-la"... Devemos ter em mente que somos livres para amar...para correr atrás de nossos sonhos... Sem com isto esquecermos, de quem esta ao nosso lado... A vida é bela, depende de cada um saber aproveitá-la da melhor forma possível... Amando... Respeitando... Sendo livre para pensar sonhar e agir "...*

Fênix Faustine.

*"Existem coisas melhores **ADIANTE** do que qualquer outra que **DEIXAMOS** para **TRÁS**".*

C. S. Lewis

Dedicatória

“E sabemos que TODAS as coisas CONTRIBUEM juntamente para o BEM daqueles que AMAM A DEUS, daqueles que são chamados segundo o seu PROPÓSITO”. (Romanos 8:28).

Dedico o meu mestrado primeiro a **Deus** o Senhor e Salvador da minha vida, Ele é a razão da minha existência.... Ele me deu forças e nunca me desamparou nos momentos mais difíceis desta caminhada, me ajudando a agir com sabedoria, conhecimento, equilíbrio, respeito e amor com todas as pessoas que Ele permitiu que estivessem na minha vida neste período.

Dedico aos meus pais maravilhosos e amados **Irene e Asarias** e aos meus queridos e lindos irmãos **Enéias e Ludmila**, muito obrigada pelo apoio e incentivo que me deram em todo tempo que estive aqui em Araraquara realizando este trabalho.

Dedico aos meus queridos e amados avós maternos **Jerenita e Dionízio** e avós paternos **Maria e Francisco** pelo apoio, carinho e cuidado, e ainda agradeço pelas orações que fizeram e sei que ainda fazem por mim.

Dedico ainda aos meus queridos e amados **tios** (Carlos, Antônio Carlos, Nerildo, Alexandre, Ari, Celso, Ananias, Misael, Gilberto e Jabes), **tias** (Marília, Romilda, Miriã, Nilce, Ivonete, Maria de Fátima, Ester, Rubenita e Huda), **primos e primas** (Érika, Jesaias, Erick Vinícius, Nickson, Patrick, Nicolas, Natan (“in memorian”), Fernanda, Vitória, Isabela, Oséias, Dayse, Miquéias, Lucas, Daniel, Gisele, Elisangela, Adson, Samuel, Sara, Hermes, Ana Quésia, Tatiane, Alexandre, Cássia, Damares, Lucas, Dayse, Wesley, Priscila, Daniel e Ederson) que estavam torcendo por mim em todo tempo que estive em Araraquara realizando meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Deus obrigada pela sua graça sobre a minha vida e por ter me permitido viver tudo isso!

A todos os meus familiares que estavam torcendo por mim, e ainda a todos os meus amigos da minha linda cidade São José dos Campos - SP e de outras cidades também...

Aos queridos amigos da Primeira Igreja Batista de São José dos Campos - SP a qual eu faço parte, muito obrigada pela amizade verdadeira, pela torcida e orações de vocês.

Agradeço também as minhas lindas amigas de república Paula ("Mi"), Thais ("Tatá") e Renata ("Rê"), obrigada pela amizade e companhia de vocês.

Aos meus colegas do laboratório de cosmetologia e de outros laboratórios; à Bruna Chiari ("cabeça" você me ajudou muito durante o mestrado e nunca me esquecerei da sua ajuda e amizade sincera), à Letícia, à Silvine, à Paula Martini, à Juliana, à Hannah, à Marina, à Nathália, à Carol, à Joceana, à Josi, ao Giovane, à Lú, ao Guilherme, à Hanako, à Dani, à Gi, ao Zé Ricardo, à Ana Paula, à Flávia Ribeiro, à Eliete, à Bruna, à Cris, à Geisy, à Leiliane, à Aline, ao Rogério, à Gisela... muito obrigada pelos momentos de aprendizagem constante e pela amizade solidificada, ao longo deste trabalho, que, certamente se eternizará.

E em especial quero agradecer a minha grande amiga Paula Lacerda por tudo que fez por mim e por ser uma pessoa muito especial que Deus colocou na minha vida, compartilhamos e vivemos muitas coisas juntas que nunca iremos esquecer.

Agradeço aos técnicos de laboratório, Matheus, Osmar, Lú, Fátima e Eduardo (Dudu) que me ajudaram em todas as vezes que precisei, principalmente com a doação de reagentes, empréstimos de vidrarias e outros materiais...

As secretarias Claudia, Laura e Sônia da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, por toda ajuda e atenção.

A prof^a Dr^a. Leila Aparecida Chiavacci pela ajuda nos testes de SAXS realizados neste trabalho.

Agradeço a Prof^a Dr^a. Chung Man Chin pela aquisição do ácido alfa-lipóico, professora muito obrigada pela sua disposição em ajudar.

A prof^a Dr^a. Regina Maria Barretto Cicarelli por permitir a utilização do laboratório o qual coordena para os ensaios de citotoxicidade realizados neste trabalho, professora você contribuiu muito para que este trabalho fosse finalizado. Muito obrigada!

Ao querido Prof^o. Dr. José Paschoal Batistuti, uma pessoa iluminada, que me ajudou muito na validação do método analítico para a quantificação do ácido alfa-lipóico e na compra do material de referência do ácido alfa-lipóico, e em muitas outras coisas me ajudou... Paschoal muito obrigada por tudo! Só Deus para retribuir a você tudo que fez por mim. Você faz parte de grande parte deste trabalho, serei sempre grata.

Ao querido por todos e por mim também prof^o. Dr. Marcos Antonio Corrêa, muito obrigada pela pessoa maravilhosa que você é e pela grande dedicação em tudo o que você faz, por isso muitas pessoas a sua volta são beneficiadas de alguma maneira.... Muito obrigada porque me ajudou muito no meu mestrado, principalmente pela idéia dada por ele de se trabalhar com o ácido alfa-lipóico. Marcos muito obrigada também por participar da minha banca de qualificação e defesa.

Ao prof^o. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho pelo interesse que mostrou em participar da minha banca de defesa, professor muito obrigada!

E por fim a minha querida orientadora Prof^a Dr. Vera Lucia Isaac, muito obrigada pela disposição que mostrou em me orientar desde a primeira vez em que fiz contato com você, pela atenção, carinho, ajuda sempre que precisei, compreensão e pela sua amizade que espero de coração durar para sempre...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	20
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
CAPÍTULO 1 – VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ALFA-LIPÓICO POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	25
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
1.2. Validação de metodologia analítica.....	25
1.3. Seletividade e Especificidade.....	27
1.4. Linearidade e faixa linear de trabalho.....	27
1.5. Precisão.....	28
1.6. Limite de Detecção.....	28
1.7. Limite de Quantificação.....	29
1.8. Exatidão.....	29
1.9. Robustez.....	29
2.0. Objetivo.....	30
3.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Material.....	30

3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Absortividade máxima do ácido Alfa – lipóico por espectrofotometria no UV/VIS.....	30
3.2.2. Obtenção da curva analítica do material de referência do ácido Alfa – lipóico.....	31
3.2.3. Precisão.....	31
3.2.4. Exatidão.....	31
3.2.5. Robustez.....	31
3.2.6. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	32
3.2.7. Seletividade.....	32
3.3. Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Identificação do ácido Alfa - lipóico por espectrofotometria no UV.....	32
4.2. Obtenção da curva analítica.....	33
4.3. Determinação do teor real de ácido Alfa – lipóico presente na matéria – prima adquirida a partir dos valores de concentração do material de referência.....	35
4.4. Precisão.....	36
4.5. Exatidão.....	38
4.6. Robustez.....	40
4.7. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	40
4.8. Seletividade.....	41
5. Conclusão parcial.....	41

CAPITULO 2 – DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS	42
EMULSÕES CONTENDO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO.....	
6. REVISÃO DA LITERATURA.....	42
6.1. Cosméticos.....	42
6.2. Envelhecimento cutâneo.....	43
6.3. Ácido Alfa- Lipóico e atividade antioxidante.....	48
6.4. Ácido alfa- lipóico além da perspectiva cosmética.....	50
6.5. Emulsões cosméticas e estudo de estabilidade.....	52
6.5.1 Estudo reológico de Emulsões.....	53
6.5.2. Cristais líquidos.....	56
6.5.3. Microscopia de luz polarizada.....	59
6.5.4. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	60
7. Objetivo.....	63
8. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
8.1. Material.....	63
8.2. MÉTODOS.....	64
8.2.1. Desenvolvimeto da emulsão.....	64
8.2.2. Teste de centrifugação.....	65
8.2.3. Estudo de estabilidade.....	66
8.2.4. Avaliação macroscópica.....	66
8.2.5. Determinação do valor de Ph.....	67

8.2.6. Determinação da viscosidade.....	67
8.2.7. Doseamento do ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão por espectrofotometria.....	67
8.2.8. Determinação do comportamento reológico.....	68
8.2.9. Microscopia de luz polarizada.....	68
8.2.10. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	69
8.3. Análise estatística.....	69
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
9.1. Desenvolvimento da emulsão.....	69
9.2. Teste de centrifugação.....	70
9.3. Teste de estabilidade.....	70
9.3.1 Teste de estabilidade preliminar das formulações.....	70
9.3.1.1 Avaliação macroscópica.....	71
9.3.1.2. Determinação do valor de pH.....	75
9.3.1.3. Determinação da viscosidade.....	79
9.3.2. Teste de estabilidade acelerada das emulsões.....	86
9.3.2.1 Avaliação macroscópica.....	87
9.3.2.2. Determinação do valor de pH.....	91
9.3.2.3. Determinação da viscosidade.....	94
9.3.2.4. Doseamento do ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão A 1 e B 1 por espectrofotometria.....	103
9.4. Determinação do comportamento reológico.....	105

9.4.1. Curva de fluxo.....	105
9.4.2. Limite de escoamento.....	109
9.4.3. Varredura de tensão.....	111
9.4.4. Varredura de frequência.....	113
9.4.5. Fluência e Relaxação.....	115
9.5. Microscopia de luz polarizada.....	118
9.6. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	119
10. Conclusão Parcial.....	121
 CAPÍTULO III - ESTUDO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA	
<i>IN VITRO</i> E TESTES DE CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO ALFA – LIPÓICO EM	
CULTURA DE CÉLULAS.....	122
11. REVISÃO DE LITERATURA.....	122
11.1. Pele.....	122
11.2. Estruturas da pele e suas funções.....	124
11.2.1. A epiderme.....	124
11.2.2. A Derme.....	125
11.2.3. A hipoderme.....	126
11.2.4. Anexos da pele.....	126
11.3. A pele como meio de liberação de ativos.....	127
11.4. Vantagens e desvantagens da via de absorção transdérmica.....	128
11.5. Estrato Córneo como uma barreira.....	128

11.6. O sebo produzido pela pele.....	129
11.7. Absorção de formulações tópicas.....	129
11.8. Vias de transporte através do estrato córneo.....	130
11.8.1. Via Transcelular.....	130
11.8.2. Via intercelular.....	131
11.9. Determinação da liberação de sistemas emulsionados e absorção através da pele por técnicas <i>in vitro</i>	132
11.9.1. Tipos de pele utilizados nos ensaios de permeação <i>in vitro</i>	136
11.9.2. Ensaios de toxicidade <i>in vitro</i>	137
11.9.3. Cultura de células.....	138
11.10.3.1. Ensaio <i>in vitro</i> utilizando cultura de células.....	139
12. OBJETIVO.....	141
13. MATERIAL E MÉTODOS.....	141
13.1. Material, acessórios e equipamentos.....	141
13.2. Métodos.....	141
13.2.1. Teste de liberação.....	142
13.2.2. Teste de permeação cutânea.....	143
13.2.3. Teste de retenção no estrato córneo.....	144
13.2.4. Teste de retenção na epiderme/derme.....	145
13.3. Teste de toxicidade <i>in vitro</i>	145
13.3.1. Culturas Celulares - HepG2 e HaCaT.....	145

13.3.2. Ensaio de Citotoxicidade (MTT).....	145
14. Resultados e Discussão.....	147
14.1. Teste de liberação.....	147
14.2. Teste de permeação cutânea, retenção no estrato córneo e retenção na epiderme/derme.....	153
14.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	159
15. Conclusão parcial.....	161
16. Conclusão final.....	161
17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	162

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Identificação do material referência certificado do ácido Alfa – lipóico obtido por espectrofotometria na região do UV.....	33
Figura 2. Identificação da matéria prima do ácido Alfa – lipóico obtido por espectrofotometria na região do UV.....	33
Figura 3. Curva analítica do material de referência certificado do ácido Alfa - lipóico nas concentrações de 0,0991, 0,1982, 0,3964, 0,5946, 0,7928, 0,991, 1,1892 e 1,3874 mg/mL obtida por espectrofotometria UV.....	34
Figura 4. Demonstração da faixa linear de trabalho do material de referência certificado do ácido alfa-lipóico.....	34
Figura 5. Curva analítica da matéria - prima do ácido Alfa – lipóico padronizada nas concentrações de 0,0251, 0,17396, 0,34881, 0,53538, 0,73834, 0,95121, 1,15338 e 1,36594 mg/mL obtida por espectrofotometria UV.....	35
Figura 6. Linearidade da curva analítica do ácido alfa-lipóico.....	36
Figura 7. Formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o transporte de elétrons na mitocôndria. O superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio(H_2O_2) e radicais hidroxil (OH) são formados como resultado da sucessiva transferência de elétrons isolados.....	46
Figura 8. Radiação UVA e UVA penetrando na pele.....	47
Figura 9. Representação da molécula do ácido alfa-lipóico em sua forma oxidada e reduzida.....	50
Figura 10. Representação de um fluxo entre duas placas paralelas F – FORÇA APLICADA. A – ÁREA em que é aplicada a força. H – ALTURA. N – DESLOCAMENTO DO FLUXO.....	54
Figura 11. Comportamento de fluxo de um fluido.....	55
Figura 12. Curvas de fluxo para fluidos dependentes do tempo.....	56
Figura 13. Representação do cristal líquido na fase lamelar.....	58
Figura 14. Representação do cristal líquido na fase hexagonal.....	58
Figura 15. Representação do cristal líquido na fase cúbica.....	59
Figura 16. Diagrama esquemático de SAXS.....	62
Figura 17. Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A foi analisada durante a estabilidade preliminar.....	75

Figura 18. Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A 1 foi analisada durante a estabilidade preliminar.....	75
Figura 19. Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão B 1 foi analisada durante a estabilidade preliminar.....	76
Figura 20. Gráfico das medias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão A foi submetida durante a estabilidade preliminar.....	80
Figura 21. Gráfico das medias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão A 1 foi submetida durante a estabilidade preliminar.....	80
Figura 22. Gráfico das medias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão B 1 foi submetida durante a estabilidade preliminar.....	81
Figura 23. Reograma das viscosidades da formulação A mantida a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	82
Figura 24. Reograma das viscosidades da formulação A mantida a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	82
Figura 25. Reograma das viscosidades da formulação A mantida a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	83
Figura 26. Reograma das viscosidades da formulação A mantida ao ciclo nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	83
Figura 27. Reograma das viscosidades da formulação A mantida a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	83
Figura 28. Reograma das viscosidades da formulação A mantida à luz indireta nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	83
Figura 29. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	84
Figura 30. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	84
Figura 31. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	84
Figura 32. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida ao ciclo nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	84
Figura 33. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	85
Figura 34. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida à luz indireta nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	85

Figura 35. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	85
Figura 36. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)	85
Figura 37. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)	86
Figura 38. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida ao ciclo nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	86
Figura 39. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	86
Figura 40. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida à luz indireta nos dias1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	86
Figura 41. Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A foi analisada durante a estabilidade acelerada.....	91
Figura 42. Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A 1 foi analisada durante a estabilidade acelerada.....	92
Figura 43. Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão B 1 foi analisada durante a estabilidade acelerada.....	92
Figura 44. Gráfico das medias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão A foi analisada durante a estabilidade acelerada.....	95
Figura 45. Gráfico das medias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão A 1 foi analisada durante a estabilidade acelerada.....	95
Figura 46. Gráfico das medias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão B 1 foi analisada durante a estabilidade acelerada.....	96
Figura 47. Reograma das viscosidades da formulação A mantida a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	99
Figura 48. Reograma das viscosidades da formulação A mantida a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	99
Figura 49. Reograma das viscosidades da formulação A mantida a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	99

Figura 50. Reograma das viscosidades da formulação A mantida ao ciclo nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	99
Figura 51. Reograma das viscosidades da Formulação A mantida a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	100
Figura 52. Reograma das viscosidades da Formulação A mantida a luz nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	100
Figura 53. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	100
Figura 54. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	100
Figura 55. Reograma das viscosidades da formulação A 1 mantida a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	101
Figura 56. Reograma das viscosidades da Formulação A 1 mantida ao ciclo nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	101
Figura 57. Reograma das viscosidades da Formulação A 1 mantida a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	101
Figura 58. Reograma das viscosidades da Formulação A 1 mantida a luz nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	101
Figura 59. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	102
Figura 60. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	102
Figura 61. Reograma das viscosidades da formulação B 1 mantida a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	102

Figura 62. Reograma das viscosidades da Formulação B 1 mantida ao ciclo nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	102
Figura 63. Reograma das viscosidades da Formulação B 1 mantida a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	103
Figura 64. Reograma das viscosidades da Formulação B 1 mantida a luz nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom).....	103
Figura 65. Gráfico do doseamento do ácido alfa-lipóico na emulsão A 1 realizado pelo período de 90 dias de análise.....	104
Figura 66. Gráfico do doseamento do ácido alfa-lipóico na emulsão B 1 realizado pelo período de 90 dias de análise.....	104
Figura 67. Reograma da curva de fluxo da emulsão A (triplicata).....	107
Figura 68. Reograma da curva de fluxo da emulsão A 1 (triplicata).....	107
Figura 69. Reograma da curva de fluxo da emulsão B 1 (triplicata).....	108
Figura 70. Reograma do limite de escoamento da emulsão A (triplicata).....	110
Figura 71. Reograma do limite de escoamento da emulsão A 1 (triplicata).....	110
Figura 72. Reograma do limite de escoamento da emulsão B 1 (triplicata).....	111
Figura 73. Reograma da varredura de tensão da emulsão A (G' verde, G'' azul, η^* rosa) (triplicata).....	112
Figura 74. Reograma da varredura de tensão da emulsão A 1 (G' verde, G'' azul, η^* rosa) (triplicata).....	112
Figura 75. Reograma da varredura de tensão da emulsão B 1 (G' verde, G'' azul, η^* rosa) (triplicata).....	113
Figura 76. Reograma da varredura de frequência da emulsão A (triplicata).....	114
Figura 77. Reograma da varredura de frequência da emulsão A 1 (triplicata).....	114
Figura 78. Reograma da varredura de frequência da emulsão B 1 (triplicata).....	115
Figura 79. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão A (triplicata).....	116
Figura 80. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão A 1 (triplicata).....	116
Figura 81. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão B 1 (triplicata).....	117
Figura 82. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão A 1 (azul) e B 1 (vermelho) (triplicata).....	117
Figura 83. fotomicrografia da emulsão A.....	118
Figura 84. fotomicrografia da emulsão A 1.....	118

Figura 85. fotomicrografia da emulsão B.....	119
Figura 86. fotomicrografia da emulsão B 1.....	119
Figura 87. Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão A.....	120
Figura 88. Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão A 1.....	120
Figura 89. Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão B.....	120
Figura 90. Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão B 1.....	121
Figura 91. Estrutura da pele.....	123
Figura 92. Ilustração esquemática demonstrando diferentes maneiras de penetração de fármacos no estrato córneo.....	130
Figura 93. Representação esquemática que traduz a curva de liberação <i>in vitro</i> de substâncias ativas que obedecem à cinética de zero ordem.....	133
Figura 94. Representação esquemática que traduz a curva de liberação <i>in vitro</i> de substâncias ativas que obedecem à cinética de primeira ordem.....	133
Figura 95. Representação esquemática que traduz a curva de liberação <i>in vitro</i> de substâncias ativas que obedecem a cinética de pseudoprimeira ordem (lei de Higuchi).....	134
Figura 96. Célula de difusão do tipo Franz empregada nos estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	134
Figura 97. Fotografia do sistema de difusão composto de seis células do tipo Franz, conforme o equipamento utilizado (HANSON RESEARCH FLOWSCIENCE-POLYSCIENCE).....	135
Figura 98. Pele de orelha de porco dessecada.....	144
Figura 99. Pele de orelha preparada para dermatomização.....	144
Figura 100. Pele de orelha de porco dermatomizada e cortada no tamanho adequado para a realização do ensaio de permeação cutânea.....	144
Figura 101. Varredura espectrofotométrica de 200 a 400 nm para a identificação do pico correspondente ao ácido alfa lipóico em solução tampão contendo 1% de Polissorbato 80.....	147
Figura 102. Curva analítica do ácido alfa – lipóico padrão secundário, $r = 0,99975$ e equação da reta $y = - 0,0076 + 0,596x$	148
Figura 103. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de zero ordem.....	150
Figura 104. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de primeira ordem.....	150

Figura 105. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de pseudoprimeira ordem.....	151
Figura 106. Configurações macromoleculares dos polímeros hidrofílicos durante o processo de dissolução do ativo nos sistemas matriciais	152
Figura 107. Determinação do perfil de permeação <i>in vitro</i> das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de zero ordem.....	155
Figura 108. Determinação do perfil de permeação <i>in vitro</i> das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de primeira ordem.....	156
Figura 109. Determinação do perfil de permeação <i>in vitro</i> das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de pseudoprimeira ordem.....	156
Figura 110. Varredura espectrofotométrica de 200 a 400 nm para a identificação do pico correspondente ao ácido alfa lipóico em metanol (PA).....	158
Figura 111. Curva analítica do ácido alfa-lipóico padrão secundário $r = 0,99855$, equação da reta $y = 0,07021 + 0,65282x$	158
Figura 112. Relação da concentração de ácido alfa – lipóico e a percentagem de células vivas $P < 0,05$ os valores são estatisticamente diferentes entre si.....	160

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro I. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	26
Tabela I. Valores obtidos no ensaio de precisão intradia do material de referência do ácido alfa – lipóico.....	38
Tabela II. Valores obtidos no ensaio de precisão interdia do material de referência do ácido Alfa – lipóico.....	39
Tabela III. Preparo das soluções para o teste de recuperação.....	40
Tabela IV. Valores obtidos no ensaio de recuperação do ácido alfa – lipóico.....	40
Tabela V. Valores obtidos no ensaio de Robustez do ácido Alfa – lipóico.....	41
Tabela VI. Composição percentual das formulações A, A 1, B e B 1.....	65
Tabela VII. Critérios de avaliação de parâmetros organolépticos da emulsão cosmética.....	67
Tabela VIII. Avaliação macroscópica da emulsão A durante a estabilidade preliminar.....	72
Tabela IX. Avaliação macroscópica da emulsão A 1 durante a estabilidade preliminar.....	73
Tabela X. Avaliação macroscópica da emulsão B 1 durante a estabilidade preliminar.....	74
Tabela XI. Valores de pH da emulsão A, durante a estabilidade preliminar.....	77
Tabela XII. Valores de pH da emulsão A 1, durante a estabilidade preliminar.....	78
Tabela XIII. Valores de pH da emulsão B 1, durante a estabilidade preliminar.....	79
Tabela XIV. Valores de viscosidade (Pa.s) da emulsão A, durante a estabilidade Preliminar.....	81
Tabela XV. Avaliação macroscópica da emulsão A durante a estabilidade acelerada.....	88
Tabela XVI. Avaliação macroscópica da emulsão A 1 durante a estabilidade acelerada.....	89
Tabela XVII. Avaliação macroscópica da emulsão B 1 durante a estabilidade acelerada.....	90
Tabela XVIII. Valores de pH da emulsão A, durante a estabilidade preliminar.....	93
Tabela XIX. Valores de pH da emulsão A 1, durante a estabilidade preliminar.....	93
Tabela XX. Valores de pH da emulsão B 1, durante a estabilidade preliminar.....	94
Tabela XXI. Valores de viscosidade (Pa.s) da emulsão A, durante a estabilidade acelerada.....	97
Tabela XXII. Doseamento do ácido alfa-lipóico na emulsão A 1 realizado pelo período de 90 dias de análise quando submetido as condições de estresse.....	105

Tabela XXIII. Doseamento do ácido alfa-lipóico na emulsão B 1 realizado pelo período de 90 dias de análise quando submetido as condições de estresse.....	105
Tabela XXIV. Valores da área de histerese das emulsões.....	108
Tabela XXV. Parâmetros matemáticos que descrevem cada emulsão pelo modelo de Herschel Bulkley's.....	109
Tabela XXVI. Quantidade de ácido alfa-lipóico liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e a correspondente porcentagem de liberação em função do tempo (horas).....	148
Tabela XXVII. Determinação da ordem de reação da liberação <i>in vitro</i> do ácido alfa-lipóico a partir das formulações A 1 e B 1 (utilizando o parâmetro de coeficiente de correlação linear (R^2)).....	151
Tabela XXVIII. Constante da velocidade k de liberação do ácido alfa-lipóico a partir das formulações envolvidas no estudo.....	153
Tabela XXIX. Quantidade de ácido alfa-lipóico permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e a correspondente porcentagem de permeação em função do tempo (horas).....	154
Tabela XXX. Determinação da ordem de reação da permeação <i>in vitro</i> do ácido alfa-lipóico a partir das formulações A 1 e B 1 (utilizando o parâmetro de coeficiente de correlação linear (R^2)).....	157
Tabela XXXI: Constante da velocidade k de liberação do ácido alfa-lipóico a partir das formulações envolvidas no estudo.....	157
Tabela XXXII. Valores das concentrações em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ácido alfa - lipóico retido no estrato córneo e na epiderme/derme.....	159
Tabela XXXIII. Percentagem de células HepG2 e HaCat vivas.....	160

RESUMO

Diversos antioxidantes demonstram considerável efeito na prevenção do câncer por reduzir o estresse oxidativo causado por uma ampla variedade de ataques: biológicos, químicos e físicos, dentre os quais a radiação solar ultravioleta (UV) é o estresse físico ambiental descrito entre os mais freqüentes ataques que ocorrem sobre a pele, o qual está associado no desenvolvimento na maioria das doenças, incluindo o câncer. Vários componentes da dieta podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com fármacos convencionais para prevenir doenças. Ainda, a busca por metodologias alternativas à experimentação com animais para o teste de eficácia de formas cosméticas de uso tópico é devido à pressão pública existente neste sentido, introduzida principalmente pela Comunidade Européia (93/95/EC). O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade do ácido alfa-lipóico em cultura de células, além do estudo de estabilidade de emulsões O/A e seu comportamento reológico. Para isto, foram utilizadas culturas de células como modelo experimental, na tentativa de desenvolver um método alternativo à experimentação com animais que poderá ser utilizado pela indústria cosmética. Foram utilizadas culturas de células HepG2 (metabolizadoras de xenobióticos) e cultura de células HaCaT (queratinócitos).

Palavras-chave: ácido alfa-lipóico, estabilidade, reologia, cultura de células, aplicação tópica.

ABSTRACT

Several antioxidants show significant effect in preventing cancer by reducing oxidative stress caused by a wide variety of attacks: biological, chemical and physical agents, amongst which the sun's ultraviolet (UV) is the most physical stress environment described among the most frequent attacks that occur on the skin, which is associated with development in most diseases, including cancer. Several dietary components can be used alone or in combination with conventional drugs to prevent disease. Still, the search for alternative methods to animal testing to test the efficacy of topical cosmetic forms is due to public pressure that exists in this sense, introduced mainly by the European Union (93/95/EC). This study aims to assess the activity of alpha-lipoic acid in cultured cells, in addition to studying the stability of O / W emulsions and their rheological behavior. For this, cell cultures are used as experimental models in an attempt to develop an alternative method to animal testing that may be used by the cosmetics industry. Will be used HepG2 cell cultures (xenobiotic metabolizing) and cell culture of HaCaT (keratinocytes).

Keywords: alpha-lipoic acid, stability, rheology, cell culture, topical application.

INTRODUÇÃO

A pele é exposta a uma ampla variedade de ataques: biológicos, químicos e físicos. A radiação solar ultravioleta (UV) é o estresse físico ambiental mais descrito entre os mais frequentes ataques que ocorrem sobre a pele. A radiação UV que ataca a pele exposta é limitada à UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). A extensão dos efeitos biológicos da radiação UV solar sobre a pele são determinadas pela dose e duração da radiação; a área da pele exposta e a predisposição genética de cada indivíduo. Embora a radiação UVB atinja a epiderme e a derme superior, UVA é a radiação mais penetrante que alcança a derme. As respostas biológicas podem ser agudas, tais como: inflamação, queimaduras solares, prurido e crônicas, tais como: fotoenvelhecimento, imunossupressão e fotocarcinogênese (SALIOU et al., 1999).

Nos queratinócitos, a radiação UV está diretamente envolvida nos danos ao DNA das células, por exemplo, a formação de dímeros de pirimidina implicando na fotocarcinogênese. Adicionalmente, a radiação UV induz a produção de espécies redutoras de oxigênio reativo (EROs), que são responsáveis pelos danos foto-oxidativos em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (DEVARY et al., 1993).

Uma das maiores causas do envelhecimento cutâneo é a desorganização do mecanismo de defesa antioxidante das células, provocando alterações na pele, resultado das condições causadas por esse desequilíbrio e que são consequências de danos à estrutura nela presentes, como lipídios, proteínas e DNA. Pode ser estimado que cerca de 80% dos sinais visíveis causados no envelhecimento são provocados pelos raios ultravioleta e pelos radicais livres formados devido à exposição solar (BUCHLI, 2002). Os danos ao DNA das células causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de metagênese e carcinogênese (POULSEN et al., 1998).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) quando em condições normais são mantidas dentro de um limite seguro, através de sistemas de purificação do próprio organismo. Ao contrário de células normais, células cancerígenas sobrevivem em níveis elevados de EROs. Esse aumento de EROs também contribui para a proliferação de células cancerígenas e supressão de apoptose dessas células (KAMATA, H. & HIRATA, H., 1999). Estudos realizados por FRUEHAUF, J.P. & MEYSKENS JR., 2007; demonstram que até mesmo doses exógenas baixas de EROs podem promover a proliferação de células cancerígenas.

Os radicais livres são inevitavelmente coproduzidos em algumas reações biológicas e exercem papel fisiológico importante. No entanto, essas espécies reativas têm sido descritas como fatores que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos relacionados com a continuidade e as complicações de diversos estados patológicos (ROCHA et al., 2007). As células cancerígenas absorvem antioxidantes de maneira adversa das células normais. Células saudáveis consomem apenas a quantidade necessária de antioxidantes e nutrientes de apoio. Células cancerígenas, por outro lado, continuam a absorver antioxidantes e nutrientes de apoio

de maneira desordenada. Essa ingestão desordenada de antioxidantes as torna, na verdade, mais vulneráveis à morte. Os antioxidantes não somente ajudam na batalha contra as células cancerígenas, como contribuem para a defesa das células saudáveis frente aos efeitos nocivos da radiação (STRAND, 2004).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. São referidos como as substâncias que têm por característica diminuir ou bloquear as reações de oxidação induzidas pelos radicais livres. Naturalmente, nosso organismo possui substâncias que têm por objetivo estabelecer um equilíbrio harmônico entre a presença das moléculas oxidantes e as antioxidantes na pele. Esta última, por sua área extensa e função protetora do organismo ao meio, fica muito exposta ao ataque radicalar, sendo a defesa antioxidante constantemente requisitada. Desta forma é um preocupação da cosmetologia, oferecer aos consumidores produtos cosméticos que previnam e atenuem o envelhecimento cutâneo através da ação eficaz e segura de substâncias antioxidantes neles contidas (MAGALHÃES, 2000).

CAPITULO 1 – VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ALFA-LIPÓICO POR ESPECTROFOTOMETRIA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.2. Validação de método analítico

Existem vários conceitos empregados para validação de métodos e pode ser dito que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras. Algumas definições podem ser transcritas:

- A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).
- Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM WORKING GROUP, 1998).
- Validação é a confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional (ISO/IEC 17025, 1999).
- A validação de métodos assegura sua credibilidade durante seu uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que os métodos realizam aquilo para o qual são indicados para fazer (USP, 2003).
- Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado (WHO, 1992).

Alguns artigos e revisões têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos (HUBER, 1998; LEITE, 2002; INMETRO, 2007), os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação.

Em geral um método analítico deve apresentar especificidade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão que se adéquem a análise.

Os métodos analíticos podem ser de quatro tipos (BRASIL, 2003a; USP, 2008):

- Categoria I – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
- Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
- Categoria III – Testes de desempenho (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
- Categoria IV – Testes de identificação.

Para cada tipo de metodologia analítica desenvolvida (categoria), um conjunto de testes é exigido, como pode se visto no quadro I.

Quadro I: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetitividade					
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003a.

Os parâmetros a serem ensaiados são discutidos a seguir:

1.3. Seletividade

O mesmo significado tem sido frequentemente utilizado para o termo especificidade (MASSART, 1994; SWARTZ *et al.*, 1998; ANVISA, 2003; SHABIR, 2003; USP, 2003). Esta situação gera confusão desnecessária e pode ser evitada utilizando somente o termo seletividade, como sugerido pela IUPAC (VESSMAN *et al.*, 2001).

Um método que produz resposta para um único analito pode ser chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo (HUBER, 1998; BRUCE *et al.*, 1998). Desde que poucos métodos respondem a apenas um analito, o termo seletividade é mais apropriado (INMETRO, 2007).

Apenas depois de assegurada a seletividade do método, os demais parâmetros analíticos devem ser analisados. A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método. Ela deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente.

A seletividade de um método é a sua capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como: outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, além de outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes. A seletividade do método garante que o pico cromatográfico seja exclusivamente do composto de interesse (NATA, 1997; USP, 2003).

Às vezes, quando não se dispõe de impurezas – padrões ou de referência, faz-se necessário expor, de modo intencional, todos os componentes e a matriz a condições extremas: calor, ácido, base, oxidação, radiação UV/Visível, luz fluorescente, para determinar possíveis produtos de degradação (SHABIR, 2003).

1.4. Linearidade e faixa linear de trabalho

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2007). A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \text{ (equação I)}$$

Onde:

Jemima Daniela Dias Moraes

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando $x = 0$.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático (INMETRO, 2007)

A faixa linear de trabalho corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade do método. A faixa de trabalho é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica e é, normalmente, expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão (SWARTZ & KRULL, 1998).

1.5. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos, de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (THOMPSON *et al.*, 2002). A precisão é expressa pelo desvio observado entre os resultados ou o desvio dos resultados em relação à sua média.

Tal desvio pode ser expresso através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores dentro da qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar certo valor de uma variável contínua. É uma expressão que estabelece que a média verdadeira esteja à determinada distância do valor médio experimental.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). As duas formas mais comuns de expressar a precisão de um método analítico são por meio da reprodutibilidade e a repetitividade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão (INMETRO, 2007).

1.6. Limite de Detecção

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (INMETRO, 2007).

1.7. Limite de Quantificação

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

Para determinar os valores de LD e LQ, são realizados os cálculos conforme as Equações III e IV (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

$$\text{Equação III: } LD = DP \times 3 / IC$$

$$\text{Equação IV: } LQ = DP \times 10 / IC$$

Em que: **DP** = desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = inclinação da curva analítica.

1.8. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor verdadeiro dos resultados individuais ou um resultado individual encontrados em um determinado ensaio e um valor de referencia aceito como verdadeiro (THOMPSON *et al.*, 2002). É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (ISO, 1993).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em baixos níveis de concentração. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com características da pesquisa. RIBANI, 2004, estabelece um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração, por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (2003).

Qualquer que seja o processo utilizado para avaliar a exatidão, ela será expressa pela média ($\bar{x}$).

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

- Materiais de referência;
- Comparação de métodos;
- Ensaios de recuperação;
- Adição de analito.

1.9. Robustez

De acordo com a ANVISA (2003) e o INMETRO (2007), a robustez de um método mede a sensibilidade que apresenta face às pequenas variações (temperatura do ambiente, marca de solvente utilizada, pH). Um método é robusto quando ele não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (HEYDEN, 1994).

Na verificação da robustez do método para uma única modificação deliberada, é possível aplicar o teste t (student) (BARROS NETO *et al.*, 2001; MILLER & MILLER, 1988) emparelhado e comparar com o valor sem a modificação. Se não houver uma diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% por exemplo, é possível dizer que este parâmetro não afeta o método, apresentando robustez para esta modificação (INMETRO, 2007).

Para determinar a robustez de um método para várias modificações, o INMETRO (2007) recomenda o teste de Youden. É um teste que permite não só avaliar se uma pequena e deliberada modificação no método pode refletir em uma diferença estatisticamente significativa como, também, ordenar se uma ou a combinação das influências podem causar diferenças significativas nos resultados finais.

2.0. Objetivo

Validação do método analítico para quantificação do ácido alfa-lipóico.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Material: Material de referência certificado ácido alfa-lipóico (USP Rockville, MD LOT F01018) e matéria prima ácido alfa - lipóico (DEG®).

Solventes: etanol PA (Synth), ácido clorídrico PA (Synth), etanol PA (Merck), ácido clorídrico PA (Hexis), água destilada.

Acessórios: espátula de metal, funil de vidro, balão de fundo redondo, béqueres, tubos de ensaio, balões de diluição, pipetas graduadas e pipetador manual.

Equipamentos: balança analítica (GEHAKA, BG 2000), agitador magnético (MARCONI, MA 085), espectrofotômetro (UV-VIS, Hewlett Packard® KAIK-XA-modelo 8453), cubeta de quartzo e capela de exaustão.

3.2. Métodos

3.2.1. Identificação do ácido alfa – lipóico por espectrofotometria no UV/VIS

As amostras de ácido alfa-lipóico material de referência e a matéria prima foram analisados pela leitura de absorbância a 334 nm utilizando etanol PA e HCl a 0,01 N como branco.

3.2.2. Obtenção da curva analítica do material de referência do ácido alfa - lipóico

A curva analítica foi obtida utilizando as concentrações teóricas de 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, e 1,4 mg /mL do material de referência do ácido alfa - lipóico e as absorbâncias representativas das concentrações foram determinadas por espectrofotometria a 334 nm. Os ensaios foram realizados sete vezes.

3.2.3. Precisão

O teste de precisão foi realizado pelo ensaio de repetitividade intradia e interdia, ou seja, repetições ao longo do mesmo dia e em dias consecutivos, respectivamente. Para isso foram analisadas sete amostras, de concentração teórica conhecida de 1,0 mg/mL do material de referência do ácido alfa – lipóico no mesmo dia e durante dois dias consecutivos (INMETRO, 2007).

3.2.4. Exatidão

Foram transferidos para três balões volumétricos de 10 mL denominados de X₁, X₂, X₃, a quantia de 100,00 mg de uma das emulsões formuladas, sendo que a escolhida foi a emulsão B 1. Em seguida, foram adicionados 2,0, 10,0 e 12,0 mg de material de referência do ácido alfa – lipóico nos balões e o volume de cada balão foi completado para 10 mL com etanol PA e solução de HCl a 0,01 N, sendo obtidas concentrações teóricas de 0,2, 1,0 e 1,2 mg/mL do material de referência. Estas soluções foram colocadas em tubos falcon e levadas a centrifuga, onde foram centrifugadas a 900 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi analisado e as concentrações determinadas, para avaliar a recuperação do ácido alfa – lipóico adicionado. A média das percentagens de recuperação foi determinada e comparada com a legislação (INMETRO, 2007). A percentagem de ácido alfa - lipóico recuperado (R%) foi calculada Utilizando a Equação II.

$$\text{Equação II: } \%R = [(C_f - C_a) / C_r] \times 100$$

Em que: **C_f** = Concentração da solução contendo emulsão O/A adicionada de material de referência (mg/mL)

C_a = Concentração da solução de material de referência presente na emulsão O/A (mg/mL)

C_r = Concentração ou volume teórico da quantidade de material de referência do ácido alfa - lipóico adicionado (mL).

3.2.5. Robustez

Para este ensaio foi preparada uma solução estoque com material de referência de ácido alfa-lipóico, onde foram exatamente pesados 100 mg de ácido e solubilizados em 50 mL de etanol PA resultando em uma solução estoque de concentração teórica final de 2 mg/mL. Desta solução estoque foi retirada uma alíquota de 5 mL, colocada em um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com etanol PA e solução de HCl a 0,01 N, resultando em uma solução de concentração teórica igual a 1,0 mg/mL.

Para este ensaio foram feitas modificações da marca do solvente e HCl (marca Synth – marca Hexys) utilizado para fazer as soluções, mudança na temperatura do ambiente (20 °C – 23 °C) durante o preparo das soluções e mudança do pH das soluções de análise (6,5 – 6,0).

3.2.6. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram preparadas soluções com baixas concentrações do material de referência do ácido Alfa – lipóico e analisadas por espectrofotometria UV em 334 nm para determinar os valores das absorbâncias e obtenção das curvas analíticas.

Para a determinação do LD e LQ foram preparadas soluções com baixas concentrações do material de referência do ácido alfa – lipóico onde foram submetidas à leitura das absorbâncias no espectrofotômetro UV para a determinação das absorbâncias, com consequentemente obtenção das curvas analíticas.

Para determinar os valores de LD e LQ, foram realizados os cálculos conforme as Equações III e IV (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

$$\text{Equação III: LD} = \text{DP} \times 3 / \text{IC}$$

$$\text{Equação IV: LQ} = \text{DP} \times 10 / \text{IC}$$

Em que: **DP** = desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = inclinação da curva analítica.

3.2.7. Seletividade

Para determinar a seletividade, foram comparados os perfis espectrofotométricos da matéria prima de ácido alfa – lipóico com o material de referência certificado, para evidenciar a existência de impurezas presentes na matéria prima utilizada (BRASIL, 2003; CASEDEY, 2009).

3.3. Análise estatística

As análises estatísticas realizadas de variância (ANOVA) e regressão linear foram feitas utilizando o programa ORIGIN 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação do ácido alfa - lipóico por espectrofotometria no UV

Foi realizada uma varredura espectrofotométrica na região do UV com o material de referência padrão USP e da matéria prima para a identificação do pico correspondente ao ácido alfa-lipóico. Foram constatados tanto para o material de referência certificado quanto para a matéria - prima picos no comprimento de onda de 334 nm, resultado semelhante ao descrito por SEGALL *et al.*, (2004), (figuras 1 e 2).

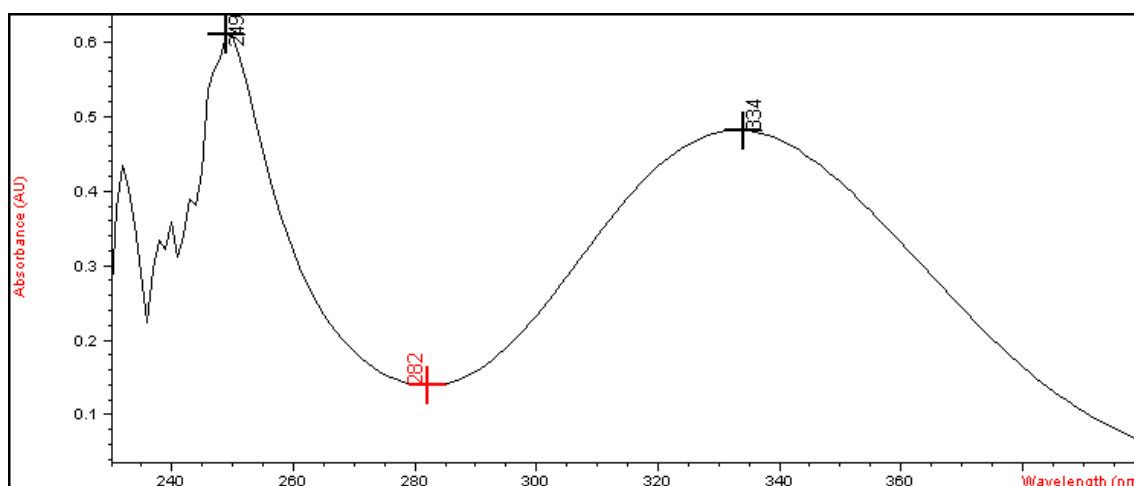


Figura 1. Identificação do material referência certificado do ácido alfa – lipóico obtido por espectrofotometria na região do UV.

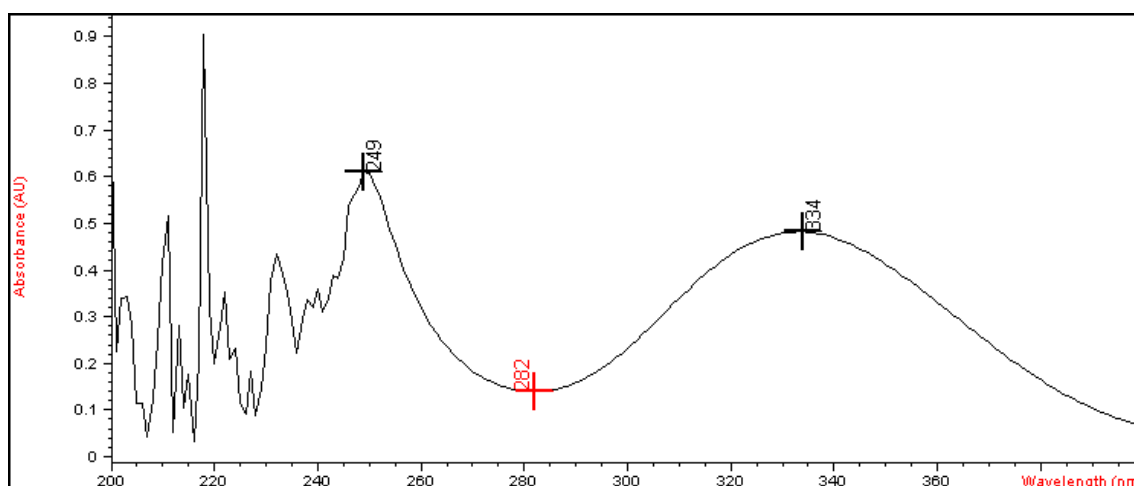


Figura 2. Identificação da matéria prima do ácido alfa – lipóico obtido por espectrofotometria na região do UV.

4.2. Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida pela preparação das concentrações crescentes do material de referência certificado realizada em triplicata sendo que a absorbância de cada concentração

foi obtida sete vezes. Com a obtenção das médias dos valores das absorbâncias representada pela Figura 1 e 2, foi determinada a curva e a equação da reta representada pela Equação V, com um valor de coeficiente de correlação igual a $r = 0,99928$.

Equação V: $y = - 0,01283 + 0,69284x$

O material de referência certificado do ácido alfa – lipóico adquirido possui 99,1% de pureza, portanto foi feita a conversão dos valores das concentrações teóricas sendo eles 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 e 1,4 mg/mL para os valores de concentrações reais, sendo eles 0,0991, 0,1982, 0,24775, 0,2973, 0,3964, 0,5946, 0,7928, 0,991, 1,1892 e 1,3874 mg/mL, (figuras 3 e 4).

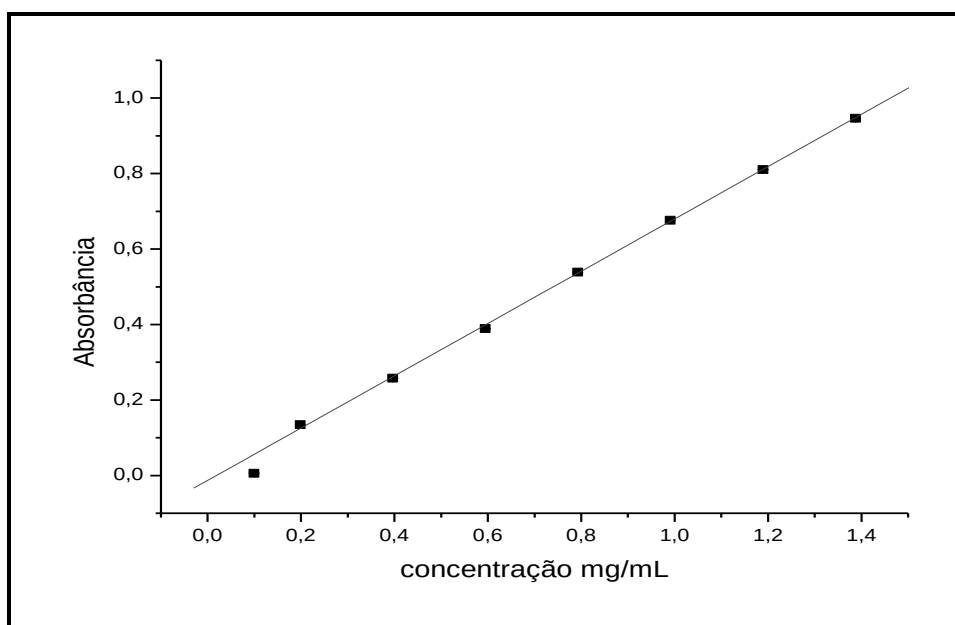
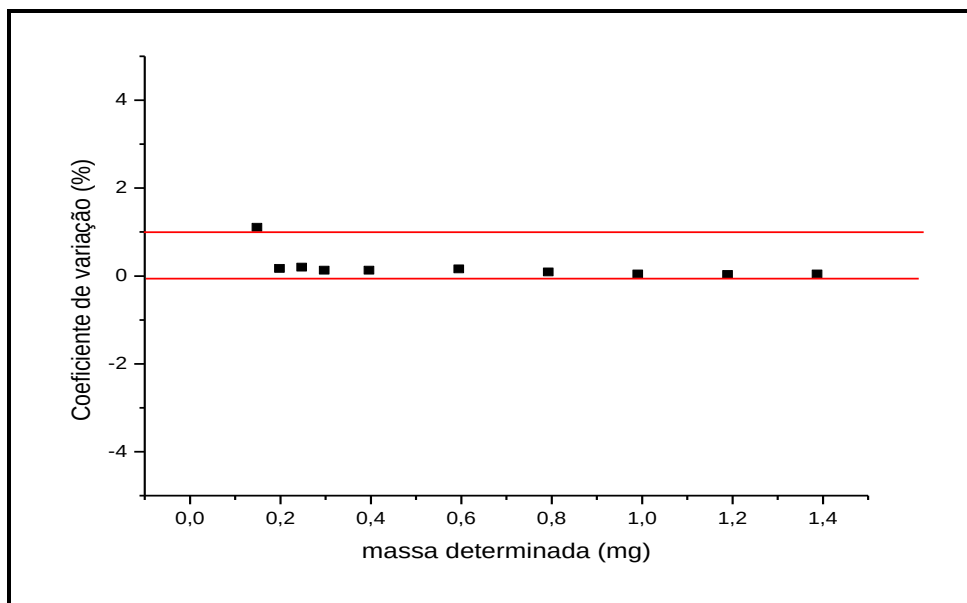


Figura 3. Curva analítica do material de referência certificado do ácido alfa - lipóico nas concentrações de 0,0991, 0,1982, 0,3964, 0,5946, 0,7928, 0,991, 1,1892 e 1,3874 mg/mL obtida por espectrofotometria UV.



*Coeficiente de variação (CV) menor que 5%

Figura 4. Demonstração da faixa linear de trabalho do material de referência certificado do ácido alfa-lipóico.

4.3. Determinação do teor real de ácido alfa – lipóico presente na matéria – prima adquirida a partir dos valores de concentração do material de referência

Para a determinação do teor real de ácido alfa – lipóico presente na matéria prima foram construídas sete curvas analíticas com a matéria prima. Foram calculadas as médias dos valores de absorbância de cada concentração das sete curvas analíticas, os valores das médias de absorbância de cada concentração foi substituída pelo y na equação da reta obtida do material de referência ($y = -0,01283 + 0,69284x$), tendo sido obtidos os valores reais de teor de ácido alfa – lipóico na matéria prima adquirida que a partir daí foi padronizada como um padrão secundário do ácido alfa – lipóico. A partir desses resultados foi construída uma única curva analítica com valores reais de concentração da matéria prima padronizada como padrão secundário.

A curva analítica da matéria prima (figura 5) foi obtida pela preparação das concentrações crescentes da matéria prima realizada sete vezes sendo que a absorbância de cada concentração foi lida também sete vezes. Foi determinada a curva e a equação da reta representada pela Equação VI, com um valor de coeficiente de correlação igual a $r = 1$.

Equação VI: $y = -0,01283 + 0,69287x$

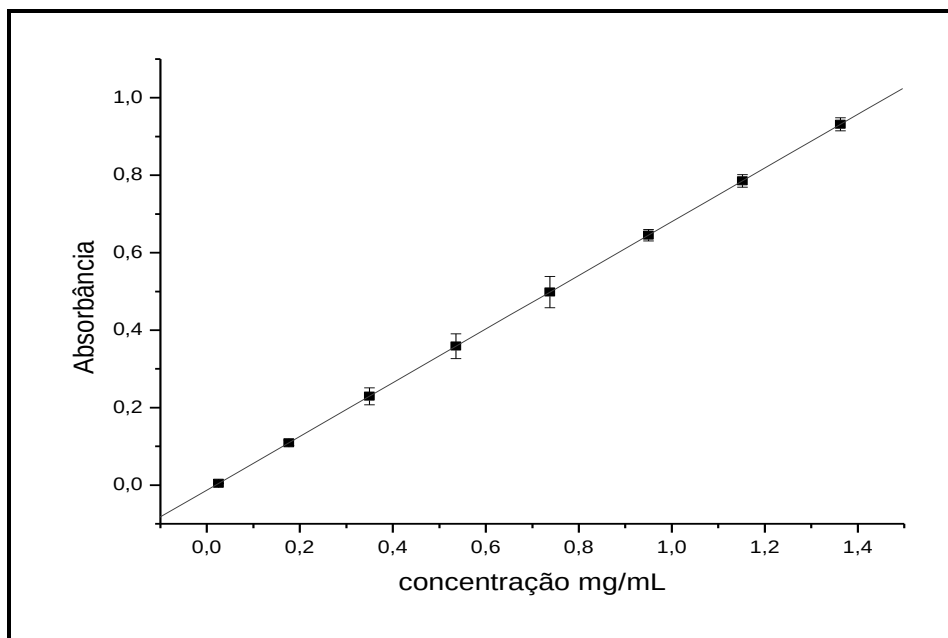


Figura 5. Curva analítica da matéria - prima do ácido alfa – lipóico padronizada nas concentrações de 0,0251, 0,17396, 0,34881, 0,53538, 0,73834, 0,95121, 1,15338 e 1,36594 mg/mL obtida por espectrofotometria UV.

O valor do coeficiente angular da reta obtida pela matéria prima é igual a 0,69287 muito próximo ao valor do coeficiente angular do material de referência certificado, que foi igual a 0,69284. Pela comparação desses valores e em resultados de ensaios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, pode ser sugerido que a matéria prima possui um teor muito semelhante ao material de referência certificado.

A partir dos valores teóricos e reais de concentração da matéria prima, foi construído um novo gráfico mostrando a massa teórica pesada contra massa real determinada de ácido alfa – lipóico.

Os valores das massas reais determinadas foram subtraídos dos valores das massas teóricas pesadas pela equação $(y - y_0)$, onde y = massa determinada e y_0 é a massa teórica adicionada. Os valores de massa teórica pesados foram 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, e 1,4 mg e os valores de massa real determinada foram 0,0251, 0,17396, 0,34881, 0,53538, 0,73834, 0,95121, 1,15338 e 1,36594 mg. Os valores obtidos mostram a diferença entre a massa teórica pesada e a massa real determinada. Quando a diferença entre os valores não é expressiva é possível também constatar a linearidade do método, mostrando que os valores encontrados estão muito próximos entre si, como é mostrado no gráfico da figura 6.

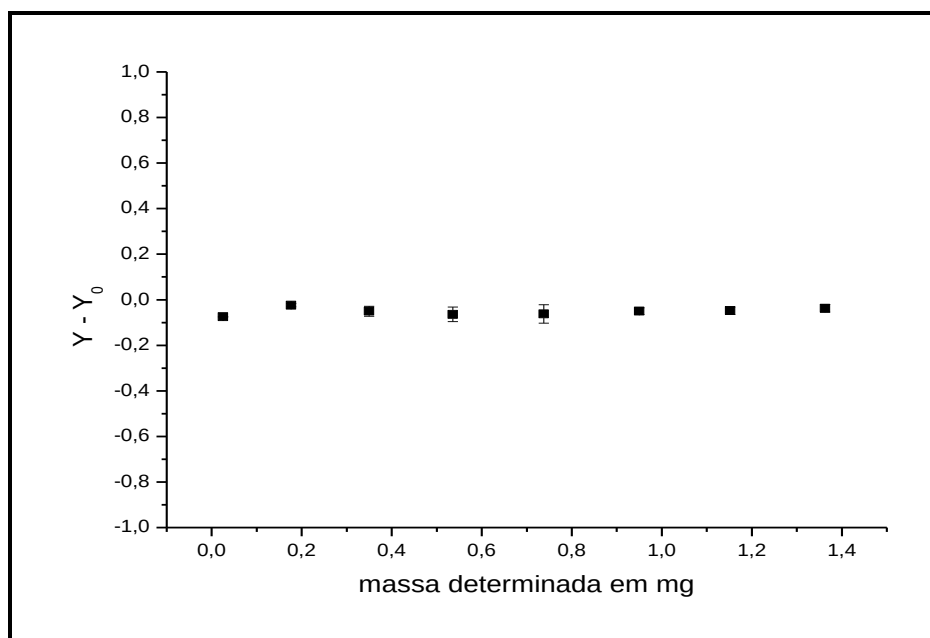


Figura 6: Linearidade da curva analítica do ácido alfa-lipóico.

4.4. Precisão

Os valores das absorbâncias obtidas por espectrofotometria na região do UV do material de referência do ácido alfa – lipóico estão expressos nas Tabelas I (ensaio intradia) e II (ensaio interdia), juntamente com os valores do coeficiente de variação dos ensaios, intradia e interdia. Foram obtidos valores dos coeficientes de variação inferiores a 5%, que é o limite permitido para produtos farmacêuticos (INMETRO, 2007), comprovando, assim, que o método analisado é preciso.

Tabela I. Valores obtidos no ensaio de precisão intradia do material de referência certificado do ácido alfa – lipóico

Valores de absorbância em duplicatas	Média dos valores de absorbância	DP*	DP total	CV**(%)	CV** total (%)
0, 67566; 0, 67652	0, 67609	0, 000608		0, 089945	
0, 67665; 0, 67584	0, 676245	0, 000573		0, 084697	
0, 67649; 0, 67741	0, 67695	0, 000651	0, 000518	0, 096098	0, 076609
0, 67716; 0, 67692	0, 67704	0, 00017		0, 025066	
0, 67589; 0, 67528	0, 675585	0, 000431		0, 063846	
0, 67608; 0, 67651	0, 676295	0, 000304		0, 044959	

DP* = desvio padrão / CV** = coeficiente de variação

Tabela II. Valores obtidos no ensaio de precisão interdia do material de referência certificado do ácido alfa – lipóico

Valores de absorbância em duplicatas dia 1	Valores de absorbância em duplicatas dia 2	Média dos valores de absorbância	DP*	DP total	CV**(%)	CV** total (%)
0, 67368;	0, 670487;	0, 671727	0, 002161		0, 321749	
0, 67283	0, 66991					
0, 67241;	0, 67102;	0, 672165	0, 001669		0, 248268	
0, 67428	0, 67095					
0, 67236;	0, 67203;	0, 672388	0, 000986		0, 146703	
0, 67381	0, 67135					0, 270763
0, 67288;	0, 66897;	0, 67078	0, 002242		0, 334167	
0, 67185	0, 66942					
0, 67360	0, 67021;	0, 671465	0, 001669		0, 248527	
0, 67169	0, 67036					
0, 67235	0, 66892;	0, 670868	0, 002181		0, 325165	
0, 67247	0, 66973					

DP* = desvio padrão / CV** = coeficiente de variação.

4.5. Exatidão

O ensaio realizado para determinar a exatidão do método foi o de recuperação (tabelas III e IV). Depois da adição das massas teóricas de material de referência do ácido alfa – lipóico (2,0, 10,0 e 12,0 mg) nos balões volumétricos de 10 mL contendo em cada 500 mg da emulsão O/A classificada como B 1, os volumes nos balões foram completados com etanol PA e solução de HCl a 0,01N, resultando nas concentrações teóricas de ácido alfa – lipóico de 0,2; 1,0 e 1,2 mg/mL encontradas nos balões X₁, X₂ e X₃ respectivamente, de acordo com a Tabela IV.

Tabela III. Preparo das soluções para o teste de recuperação

Balões	Concentração teórica de material de referência na emulsão O/A (mg/mL)	Concentração teórica do material de referência adicionado (Cr) (mg/mL)	Concentração final (Cf) (mg/mL)
X ₁	0,2	0,2	0,37
X ₂	0,2	1,0	1,15
X ₃	0,2	1,2	1,38

A percentagem de material de referência recuperado (R%) foi calculada de acordo com a Equação VII, sendo que o valor de (Ca) usado na equação foi calculado tendo sido obtido o valor de 0,18 mg/mL. Os valores obtidos no teste de recuperação estão apresentados na Tabela V.

$$\text{Equação VII: } \%R = [(Cf - Ca)/Cr] \times 100$$

Tabela IV. Valores obtidos no ensaio de recuperação do ácido alfa - lipóico

Balões	Concentração teórica do material de referência (Cr) (mg/mL)	Concentração final (Cf) (mg/mL)	% de ácido alfa – lipóico recuperado (R%)	Média (R%)	Coeficiente de variação (R%)
X ₁	0,2	0,37	95,00		
X ₂	1,0	1,15	97,00	97,33	2,59
X ₃	1,2	1,38	100,00		

Para uma metodologia ser considerada exata, a ANVISA (2003) permite que os resultados obtidos a partir da equação da exatidão tenham uma flutuação de 5% em relação à

média teórica, ou seja, de 95 a 105%. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois a média das recuperações foi de 97,33%; portanto, todas as concentrações analisadas estão de acordo com as normas estabelecidas pelo INMETRO, 2007.

4.6. Robustez

Os valores do teste de robustez estão expressos na Tabela V, obtidas quando realizadas pequenas alterações nas condições de análise.

Tabela V. Valores obtidos no ensaio de Robustez do ácido alfa – lipóico.

Alterações	Valores de absorbância correspondente a concentração de 1,0 mg/mL de ácido alfa-lipóico	CV %	CV % total
Mudança na marca do etanol PA	0, 65189; 0, 64823; 0, 64821 0, 64782; 0, 65041; 0, 64758	0, 17	
Mudança na marca do HCl PA	0, 65241; 0, 65187; 0, 65232 0, 65066; 0, 65123; 0, 65047	0, 13	0, 15
Mudança na temperatura do ambiente durante o preparo das soluções	0, 64925; 0, 64965; 0, 64863 0, 64826; 0, 65087; 0, 65014	0, 15	
Mudança do pH da solução	0, 65127; 0, 65233; 0, 65171 0, 65082; 0, 65212; 0, 64952	0, 16	

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos por pequenas variações nos métodos de análise. Os valores obtidos estão dentro do especificado (BRASIL, 2003a)

4.7. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através das Equações III e IV respectivamente, e os valores encontrados foram LD de 0,003 mg/mL e LQ de 0,099 mg/mL. Estes valores apresentam as menores concentrações possíveis de serem detectadas e quantificadas pelo método desenvolvido.

4.8. Seletividade

Os resultados obtidos com a matéria prima foram muito semelhantes ao do material de referência do ácido alfa - lipóico, portanto o método foi considerado exato, evidenciando que a matéria prima não possui impurezas ou outros compostos capazes de interferir na identificação da substância de interesse.

5. Conclusão parcial

Através dos parâmetros adotados para a validação do método analítico para a identificação e quantificação do ácido alfa-lipóico, é possível concluir que o método validado mostrou-se linear na faixa de 0,15 a 1,4 mg/mL, preciso, exato, robusto e seletivo segundo as normas e exigências estabelecidas pelo INMETRO.

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES CONTENDO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO

6. REVISÃO DA LITERATURA

6.1. Cosméticos & Cultura

O uso de produtos cosméticos teve origem nas antigas civilizações, com o intuito de atender aos conceitos culturais da época. A literatura faz referências à maquiagem destinada para cobrir a face, os lábios e a área dos olhos, uma das primeiras a ser utilizada, pois olhos grandes e vistosos era sinal de beleza (BALSAM & SANGARIN, 1972). A prática da cosmetologia já foi usada pelos antigos Egípcios que fizeram do mel, óleos vegetais e essenciais, argilas, ervas e sais, seus produtos para cosméticos. Compartilharam com os Egípcios, os Romanos e os Gregos, que acrescentaram algumas substâncias não convencionais e tóxicas para a pele como os sais de chumbo e mercúrio (WITKOWSKI & PARISH, 2001).

A palavra cosmético vem do grego Kosmein, relativo a adorno, prática ou habilidade em adornar. A agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 211, de 14 de julho de 2005, define produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes como sendo preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-lo, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2005).

Para o *Food and Drug Administration* (FDA) cosméticos são produtos que, quando aplicados no corpo humano, limpam, embelezam, promovem atratividade ou modificam a aparência da pele e cabelos ou do corpo, sem afetar a sua estrutura ou função. Produtos identificados como cosméticos, mas que tratam ou previnem doenças ou, ainda, que afetam a estrutura ou função da pele humana são considerados como drogas, e devem seguir a legislação de medicamentos. Esses produtos, conhecidos como *Over the Counter* (OTC), integram alguns produtos considerados cosméticos na Europa e Brasil. O termo “*Over the Counter*” significa “sobre o balcão”, e se refere a produtos considerados medicamentosos que podem ser comercializados sem a necessidade de prescrição médica (ANVISA, 2003).

No Brasil e em outros países é comum, quando um produto cosmético altera de alguma maneira a funcionalidade da pele, é denominado de cosmecêutico, termo criado por Kligman há cerca de 30 anos, e que consiste na mistura das palavras cosmético e farmacêutico (*cosme* + *cêutico*). Todavia, o produto final é, primariamente, um cosmético, mas com promessa de benefícios como um produto farmacêutico. O cosmecêutico tem mecanismo de ação conhecido e eficácia comprovada. Apesar da palavra ser frequentemente empregada, não

existe legalmente a categoria de produtos cosmecêuticos para a legislação cosmética do Brasil, bem como para outros países, como os Estados Unidos, por exemplo, onde o FDA enquadra os produtos tópicos em medicamentos, cosméticos ou “Over the Counter” (RIBEIRO, 2010)

A Cosmetologia pode ser definida como sendo uma ciência que estuda os cosméticos, desde a concepção de conceitos até a aplicação dos produtos elaborados. Entre estes dois extremos pode ser encontrada a pesquisa de novas matérias primas, tecnologias, desenvolvimento de formulações, produção, comercialização, controle de qualidade, toxicologia, eficácia de produtos e matérias primas e legislação, junto aos órgãos sanitários, de empresas, produtos e processos. É uma atividade multidisciplinar envolvendo conhecimentos de física, química, biologia e algumas áreas humanísticas. A cosmetologia trabalha com a beleza, correção, preservação, fantasia e sonho. Mistura o real com o imaginário. Não tem finalidade curativa ou de tratamento, pois não é medicamento, mas sim de prevenção e melhora de alterações inestéticas na pele e cabelos (RIBEIRO, 2010).

6.2. Envelhecimento cutâneo

A pele é um órgão complexo no qual interação celular e molecular reguladas de modo preciso governam muitas das agressões provindas do meio ambiente. É constituída por vários tipos de células interdependentes responsáveis pela manutenção da sua estrutura normal (HIRATA, SATO & SANTOS, 2004)

Com o envelhecimento cronológico cutâneo, ocorre a modificação do material genético, alterações protéicas e a proliferação celular decresce. Conseqüentemente, o tecido perde a elasticidade, a capacidade de regular as trocas aquosas e a replicação do tecido se torna menos eficiente. Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de radicais livres que aceleram esse fenômeno de envelhecimento (HIRATA, SATO & SANTOS, 2004; RIEGER, 2007)

O processo de envelhecimento é um dos mais complexos fenômenos biológicos que se conhece. Inevitavelmente, todos os organismos sofrem deterioração progressiva em suas funções e, com o decorrer do tempo, aumento concomitante na incapacidade para superar desafios e estresse. Sob o conhecimento atual, é difícil definir precisamente a natureza bioquímica destes processos, mas as hipóteses modernas mais inequívocas associadas ao envelhecimento e a processos patogênicos celulares estão ligadas à gênese e atuação dos radicais livres, inter-relacionados a outros mecanismos de lesão cutânea, com a ocorrência de ligações cruzadas em fibras da matriz dérmica extracelular (GARCIA, 1996; RIEGER, 2007).

Uma das primeiras áreas de interesse e conhecimento científico atuais, a teoria do envelhecimento devido aos radicais livres, foi notabilizada como a de maior credibilidade dentre todas as teorias já apresentadas. Em paralelo a formação dita endógena, não existe dúvida de que a exposição da pele a situações que levem ao aumento da formação de radicais livres altera os mecanismos e acelera o declínio das funções fisiológicas e o envelhecimento,

originando precocemente os sinais das alterações funcionais e estruturais da pele. Em adição a fatores intrínsecos, o envelhecimento é acelerado por alterações degenerativas devidas a exposição da pele a condições que levam ao aumento de radicais livres, como as radiações actínicas (fotoenvelhecimento). As bases da programação genética da longevidade celular ainda não se encontram bem esclarecidas e, concomitantemente à introdução de várias etiologias ao processo de envelhecimento, há um consenso crescente e um acúmulo de evidências bioquímicas de que os efeitos deletérios da geração de radicais livres – associados aos processos metabólicos celulares – sejam os principais responsáveis pelas alterações e deterioração fisiológica nos processos homeostáticos de regulação, essenciais para a manutenção das funções celulares adequadas (GARCIA, 1996; WALTER & MAIBACH, 2008; DI MAMBRO et al., 2005).

Os radicais livres são espécies químicas constituídas de um átomo ou associação de átomos, possuindo um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. Essa situação implica em alta instabilidade energética e cinética, e para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. A formação de radicais livres conduz ao estresse oxidativo, processos no qual será iniciada uma cadeia de reações, originando alterações em proteínas extracelulares e a modificações celulares. O maior dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica que, em última instância, leva à morte celular. Para evitar esse processo de depleção celular, a pele possui seu próprio mecanismo de defesa tais como: enzimas, vitaminas e agentes quelantes de íons metálicos. Entretanto, a capacidade protetora desse mecanismo diminui com o envelhecimento, então, compostos exógenos como enzimas, antioxidantes e compostos fenólicos reforçam a proteção natural pela limitação das reações oxidativas (HIRATA, SATO & SANTOS, 2004; DI MAMBRO et al., 2005).

Dois grupos de teorias tentam explicar o complexo processo do envelhecimento. O primeiro grupo inclui as teorias que postulam um determinado programa genético e cronológico para a gradual mudança no fenótipo. O segundo grupo assume a exposição repetitiva às influências danosas, as quais são a explicação para as mudanças que levam ao envelhecimento (PODDA & KOLLMANN, 2001; HIRATA, SATO & SANTOS, 2004)

O envelhecimento cronológico (intrínseco) afeta a pele de maneira similar a outros órgãos. Devido a deficiências durante a replicação do DNA, os telômeros continuamente perdem parte de suas sequências, e pode ser suposto que esta perda seja um fator de limitação para a capacidade replicativa celular, e um mecanismo de contagem, o relógio interno do envelhecimento (VIGLIOGLIA & RUBIN, 1997; JENKINS, 2002). Porém, as principais mudanças na pele, relacionadas ao envelhecimento, são as alterações da matriz e mudanças no padrão da expressão dos fibroblastos que, na derme, permanecem em fase estacionária por um longo período de tempo e somente precisam proliferar quando existe estimulação, não ocorrendo o encurtamento dos telômeros. Os fatores derivados dos fibroblastos são essenciais

para o normal crescimento e diferenciação dos queratinócitos, sendo, estes sim, afetados pela perda telomérica (WLASCHEK et al., 2001).

Sobrepondo a esse processo inato, o envelhecimento extrínseco está relacionado a danos ambientais, principalmente à indução por raios ultravioleta no tecido conectivo dérmico da pele por exposição solar crônica (fotoenvelhecimento), o qual é responsável por 90% das mudanças que ocorrem na pele (ZOUBOULIS & BOSCHNAKOW, 2001; WLASCHEK et al., 2001; JENKINS, 2002).

Há evidências que esses processos de envelhecimento, intrínseco e extrínseco, possuem mecanismos biológicos, bioquímicos e moleculares, em parte sobrepostos. Mudanças celulares como alterações quali e quantitativas das proteínas da matriz extracelular estão envolvidas, resultando na perda da capacidade de retração e do poder tensor com a formação de rugas, aumento da fragilidade e diminuição da cicatrização de feridas. As desordens pigmentares aparecem, a pele perde a firmeza e as suas propriedades mecânicas; células cutâneas se proliferam na epiderme dando aparência irregular, há menos colágeno e fibras elásticas, resultando na diminuição da elasticidade da pele; os fibroblastos e os queratinócitos se reproduzem mais lentamente, a atividade do fibroblasto é diminuída, com síntese lenta de colágeno, o qual sofre ligação cruzada pela glicose no fenômeno da glicação (HIRATA, SATO & SANTOS, 2004)

A teoria de que o **envelhecimento é resultado de danos causados por radicais livres** é creditada a Denham Harman que, em 1956, baseou-se na observação de que a irradiação em seres vivos levava à indução da formação de radicais livres, os quais diminuam o tempo de vida desses seres e produziam mudanças semelhantes ao envelhecimento (WICKENS, 2001). De acordo com esta teoria, o lento desenvolvimento de danos celulares irreversíveis leva ao envelhecimento. Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de radicais livres aceleram o fenômeno do envelhecimento por danos ao DNA e por atuarem na desidrogenação, hidroxilação e na glicação protéica. A última reação envolve a perda das funções biológicas de proteínas, como o colágeno e proteoglicanas, que resultam em alterações da estrutura da membrana celular e aumento da flacidez da pele (JAY et al., 1998).

A fonte desses radicais livres pode ser endógena, associada a reações metabólicas (reação de oxidação na mitocôndria, fagocitose durante o processo de inflamação, ativação do metabolismo do ácido araquidônico) e exógena (devido à radiação ultravioleta –em especial o Ultra Violeta do tipo A (UVA) que reage com fotossensibilizadores e com cromóforos da pele como a melanina), com fatores ambientais – pesticidas, poluição, fumaça de cigarro, medicamentos antitumorais e estilos de vida não saudáveis (DATNER, 1999; HIRATA, SATO & SANTOS, 2004).

A principal fonte de radicais livres em sistemas biológicos é a molécula de oxigênio que, no entanto, é fundamental para o metabolismo celular e para a produção de energia.

Sendo assim, a mais abundante fonte endógena geradora são as mitocôndrias (que usam cerca de 90% do O_2 oxigênio usado pelo corpo humano) onde o oxigênio é reduzido em etapas sequenciais para produzir água; ou seja, ele participa da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, onde é reduzido pela citocromo oxidase em água e o NADH é oxidado a NAD^+ , para que haja a produção de ATP. Para a completa redução de uma molécula de oxigênio em duas moléculas de água, quatro elétrons são transportados dentro da membrana mitocondrial interna. Entretanto, 1 a 2% desses elétrons são perdidos durante o transporte, levando a formação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, subsequentemente, a outras numerosas espécies reativas de oxigênio (ERO) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH) (Figura 7).

Em concentrações apropriadamente elevadas, as EROs têm a capacidade de oxidar e danificar componentes celulares, enquanto que em concentrações medianas agem como mediadores e como moléculas de mediação de transdução, exercendo o papel de reguladores celulares (XU & FINKEL, 2002; HIRATA, SATO & SANTOS, 2004).

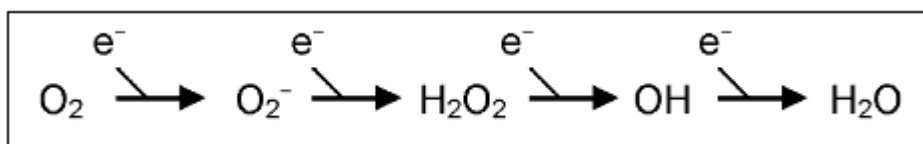


Figura 7: Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o transporte de elétrons na mitocôndria. O superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil ($OH^{\cdot}$) são formados como resultado da sucessiva transferência de elétrons isolados.

Dentre as várias fontes exógenas de radicais livres, o fotoenvelhecimento é a mais importante causa do envelhecimento, especialmente pela luz ultravioleta, que produz radicais livres (DI MAMBRO et al., 2005). As radiações ultravioleta A e B são componentes essenciais da luz solar que geram severo estresse oxidativo nas células cutâneas via interação com cromóforos intracelulares e fotossensibilizadores, resultando em danos genéticos transitórios e permanentes e na ativação de atalhos de sinais citoplasmáticos de transdução relacionados ao crescimento, diferenciação, senescência replicativa e degradação do tecido conectivo.

O fotossensibilizador excitado reage com o oxigênio, resultando na geração de ERO e oxigênio singleto (O_2^1). Estes podem também ser produzidos por neutrófilos que estão em número aumentado na pele fotodanificada e contribuem para o estado pró-oxidante geral (WLASCHEK et al., 2001). A atividade dos radicais livres também mostra a capacidade de oxidar e fazer ligações cruzadas com proteínas.

Em particular, os resíduos aminoácidos protéicos são altamente susceptíveis ao ataque oxidativo. O DNA é altamente susceptível ao ataque por radicais livres. A reação de um radical oxigênio com o DNA pode retirar uma base ou causar uma quebra na dupla fita, o qual possui potencial para produzir um evento prejudicial ou até mesmo letal. Lesões oxidativas no DNA

não se acumulam com a idade e parecem ser uma importante contribuição para o processo de envelhecimento (WICKENS, 2001).

Na figura 8, é possível observar a intensidade de penetração das radiações UVA e UVB através da pele.

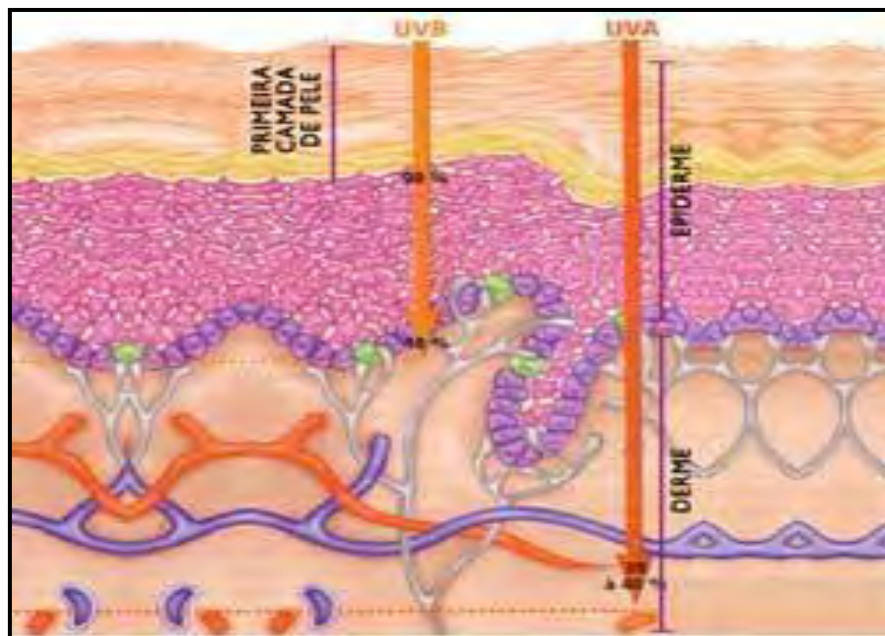


Figura 8: Radiação UVA e UVB penetrando na pele

(fonte: <http://www.annapegova.com.br/gp.aspx?id=103&Ba=pegotan-fps-60>)

Os raios ultravioleta correspondem a 5% da luz solar terrestre e representam uma pequena parte do espectro eletromagnético. Outras regiões desse espectro incluem: microondas, ondas de rádio, radiação infravermelha, luz visível, raios-x e radiação gama (DIFFEY, 2002). O comprimento de onda de cada tipo de radiação é o que define suas características.

Os raios ultravioleta são divididos em: UVA: 400-320 nanômetros (nm), UVB: 320-290nm, UVC: 290- 200nm (DUARTE et al., 2006).

Tanto UVB como UVA agem sobre os queratinócitos. A partir da absorção da luz UV pelos nucleotídeos, há formação de fotoprodutos do DNA, sobretudo as bases pirimidínicas. Começam, então, as reações fotoquímicas que levam às alterações bioquímicas nos tecidos, como a indução da atividade de algumas enzimas, secreção de citocinas e reparo de estruturas. Isso vai depender do comprimento de onda da luz utilizada. As moléculas que absorvem a luz na pele são chamadas de cromóforos (HÖNIGSMANN, 2001). O cromóforo mais importante é a melanina que absorve tanto UVA como UVB. O DNA é o mais importante cromóforo para resposta fotobiológica na escala UVB. Triptofano, 7-deidrocolesterol, ácido urocânico, piridolina (colágeno) e desmosina (elastina) também são cromóforos para UVB. Co-fatores NAD e FAD são cromóforos para UVA.

As principais respostas induzidas pela radiação ultravioleta sobre a pele (DUARTE et al., 2006) são :

a) Efeito antiinflamatório / imunossupressor

a) Alterando a produção de citocinas como Interleucina 10 (IL-10), Interferon-gama (INF-g.) interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α).

b) Indução na produção de prostaglandina E pelos queratinócitos, levando à diminuição da expressão molecular na superfície das células apresentadoras de antígeno e, por consequência, diminuindo a ativação dos leucotrienos (LT).

c) Ação nos receptores de superfície dos queratinócitos e nas células apresentadoras de antígeno, alterando a liberação das moléculas de adesão (ICAM-1).

b) Efeito antiproliferativo

a) UVB e UVA levam à formação de fotoprodutos de DNA, acarretando redução da síntese de DNA e, em consequência, diminuição da proliferação celular.

b) Outro mecanismo pelo qual UVB e UVA têm ação antiproliferativa é a indução de apoptose dos queratinócitos.

6.3. Ácido alfa-lipóico e atividade antioxidante

Ao longo da última década pesquisas têm demonstrado uma crescente importância do ácido alfa-lipóico (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid) como sendo um potente antioxidante, eficiente no combate aos radicais livres. O ácido alfa-lipóico (ALA) é um composto sulfidrílico naturalmente encontrado em praticamente todas as espécies vegetais e animais, em células procariontes e eucariontes (TEICHERT et al., 2005). No corpo humano ele está vinculado com resíduos de lisina e atua como cofator em diferentes multicomplexos enzimáticos (BIEWENGA, HAENEN & BAST, 1997).

O ácido alfa-lipóico é sintetizado nas mitocôndrias das células (MORIKAWA, YASUNO & WADA, 2001) e covalentemente ligado através de resíduos de lisil a complexos de ácido alfa - ceto desidrogenase. O ALA ligado é um cofator da enzima e, juntamente com o ácido dihidrolipóico (DHHLA), seu derivado através de redução, serve como um par carregador de elétrons a partir do substrato da enzima ao NADp. Apesar do fato de que normalmente há pouco ou nenhum ácido alfa-lipóico livre em tecidos (HERMANN et al., 1996). Foi proposto como um antioxidante para aplicação tópica para proteger a pele contra os raios ultravioleta, incluindo proteção contra fotoenvelhecimento e câncer de pele (PODDA et al., 2001) Encontrado em todas as células do organismo, o ácido alfa – lipóico possui elevado poder antioxidante, sendo capaz de potencializar os efeitos antioxidantes de outras vitaminas, como o ácido ascórbico.

O ácido alfa – lipóico apresenta características hidro e lipossolúveis, influenciando o metabolismo celular na eliminação de resíduos tóxicos. Auxilia na recuperação de lesões, na

absorção de nutrientes, na quelação de metais de transição e na inibição da ativação do fator NFκ-B (*Nuclear Factor Kappa Beta*) que induz à produção de citocinas e a quimiotaxia, inibindo a resposta inflamatória. Ainda, impede e/ou reverte as reações entre o colágeno e a glicose (MAGALHÃES., 2000). ALA tem provado ser um composto antioxidante singular, muito poderoso no combate aos radicais livres (PACKER, WITT & TRITSCHLER, 1995). Este ácido ou a sua forma reduzida, ácido dihidrolipóico (DHHLA), podem capturar diversos EROs, incluindo radicais superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, radicais peroxila e o oxigênio singlete (PACKER, WITT & TRITSCHLER, 1995).

Estudo *in vitro* (PERRICONE, 1998) mostrou que o ALA é o antiinflamatório e antioxidante protetor das células mais potente já descoberto. Em um trabalho desenvolvido por PODDA *et al.*, 1998, usando 3% de ALA em uma base de lecitina, mostrou que reduziu um eritema induzido por exposição a UVB duas vezes mais rápido do que a pele tratada com a base de lecitina sem o ALA.

Outro trabalho desenvolvido por (BIEWENGA, HAENEN & BAST, 1997) mostrou que houve a absorção do ALA pela pele em um teste *in vivo* utilizando ratos sem pêlo, sendo que a absorção foi constante durante 30 minutos e atingindo uma concentração máxima em 2 horas. Nos estudos de PODDA e colaboradores, em 1998, o ácido alfa-lipóico foi aplicado na pele e sua penetração foi observada. Após 30 minutos de sua aplicação, uma quantidade apreciável de ALA marcado com C₁₄ foi observada na gordura subcutânea. Portanto, ele atravessa toda a epiderme, derme e a gordura subcutânea em 30 minutos e os níveis continuam a aumentar durante as 4 horas seguintes. O pico de concentração ocorre perto das glândulas sebáceas, indicando que o ALA é tanto hidrofílico como lipofílico. Ao contrario de outros antioxidantes, ALA é facilmente absorvido e transportado através das membranas celulares. Por isso, é amplamente utilizado na prevenção de várias doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo e é administrado diariamente como suplementos de dieta antienvhecimento, diabetes e doenças cardiovasculares (KOFUJI *et al.*, 2008).

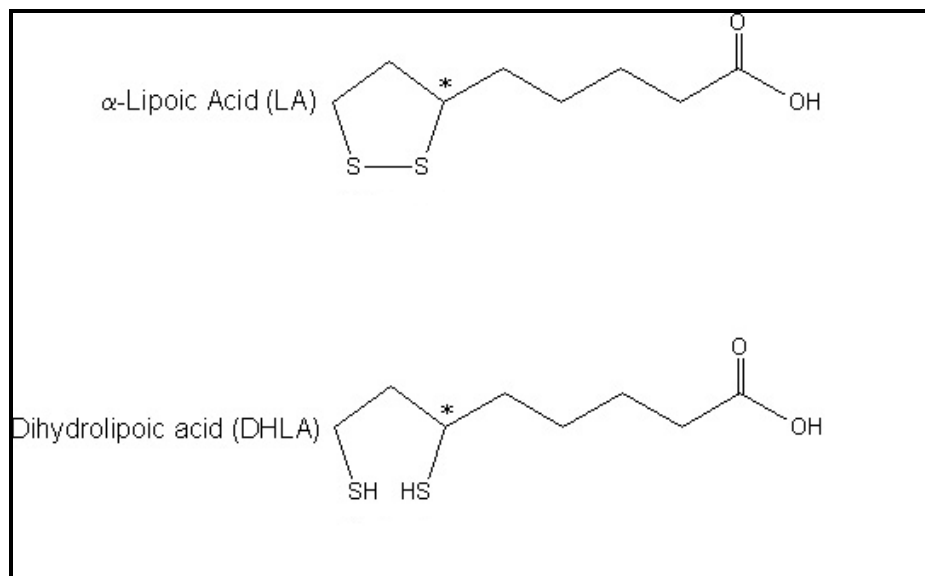


Figura 9: Representação da molécula do ácido alfa-lipóico em sua forma oxidada e reduzida (fonte: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/la/lastructure.html>)

6.4. Ácido alfa-lipóico além da perspectiva cosmética

Em 1951, o ácido alfa-lipóico atraiu o interesse de cientistas que se especializaram em elucidar as funções das vitaminas do complexo B, por causa de sua ação como uma coenzima essencial. Uma coenzima é uma substância que combina com uma proteína para formar uma enzima completa. Uma enzima é uma proteína que acelera reações que ocorrem no corpo (PACKER *et al*, 1995).

A maioria das coenzimas humanas são produzidas a partir de algumas vitaminas do complexo B, o ácido alfa-lipóico parecia ser um membro do complexo vitamínico B, parecia estar destinado a se tornar a primeira vitamina lipossolúvel do complexo B. Mas, o ácido alfa-lipóico não é uma vitamina; porque o corpo pode prover o suficiente para prevenir uma deficiência reconhecida (embora não suficiente para realizar todas as suas funções), Como uma coenzima, o ácido alfa-lipóico tem uma vantagem sobre as vitaminas. Recentes descobertas sobre a função do ácido alfa-lipóico sugerem que ele é um catalisador com alta atividade biológica necessária para a oxidação de carboidratos e ácidos graxos que leva à geração de ATP.

Um catalisador é um elemento ou composto que facilita uma reação que não poderiam ocorrer de forma significativa sem a sua ajuda. As enzimas são catalisadores que o corpo necessita para realizar os milhares de reações bioquímicas no corpo, necessário para controlar o processo da vida. A geração de ATP é crítica para o organismo. A energia pode ser armazenada de várias formas, física e quimicamente. O corpo armazena energia em ATP e libera quando necessário. Foi percebido bastante cedo que o ácido alfa-lipóico também serviu como um antioxidante biológico, quando os pesquisadores descobriram que prevenia o escorbuto em animais com deficiência de vitamina C e, em 1988 ele começou a emergir como um antioxidante universal, com muitas propriedades. Por fim, foi observado que o ácido lipóico

entrou em conjunto com a glutatona que protege os componentes celulares contra a peroxidação lipídica. Isto foi descoberto por A. Bast e Haenen G em 1988. Lester Packer, da Universidade da Califórnia, em Berkeley é pioneiro na pesquisa sobre o ácido alfa-lipóico como antioxidante. Em 1991, ele descobriu que o ácido alfa-lipóico é uma parte importante de uma rede de antioxidantes que incluem a vitamina C, vitamina E e a glutatona. Em 1993, Packer e colaboradores descobriram que o ácido alfa-lipóico também tinha funções de proteger um fator chave em nível nuclear que está envolvido na expressão e regulação dos genes. Assim, como todos os antioxidantes metabólicos, o ácido alfa-lipóico é multifuncional. É essencial para a produção de energia e, desde que disponível o suficiente no corpo, ele pode agir como um poderoso antioxidante (PACKER *et al.*, 1995; WHOLE, 1996).

Os cientistas ainda hoje se interessam muito em conhecer ainda mais sobre o ácido alfa-lipóico, o componente chave para a produção de energia nos músculos e um importante antioxidante (SNELL *et al.*, 1937).

O ácido alfa-lipóico direciona as calorias para produção de energia. A energia produzida não está disponível apenas para movimentar o músculo esquelético, mas para tudo o que precisamos fazer. Quando nós melhoramos a nossa eficiência na produção de energia, podemos melhorar a nossa capacidade de executar tarefas. O ácido alfa-lipóico normaliza os níveis de açúcar no sangue, pois o açúcar em altos níveis pode danificar os componentes cruciais do organismo. Este dano leva ao envelhecimento precoce, doenças cardíacas e os efeitos adversos da diabetes. Apesar de existirem centenas de estudos há mais de quarenta anos revelando como o ácido alfa-lipóico potencializa o metabolismo, a motivação por novas descobertas sobre esse nutriente pode ser visto em muitos estudos recentes que focalizam como melhora do físico, combate aos radicais livres, protege o nosso material genético, retarda o envelhecimento, ajuda a proteger contra doenças cardíacas, câncer e muitas outras doenças (SNELL *et al.*, 1937).

Ambos os diabéticos insulino dependentes e não-insulino dependente devem saber que o ácido alfa-lipóico tem sido usado por quase trinta anos na Europa para tratar a neuropatia diabética, ajudar a regular o açúcar no sangue e prevenir a retinopatia diabética e cardiopatias. O ácido alfa-lipóico não só protege o sistema nervoso, mas pode estar envolvido também na regeneração de nervos. Também está sendo estudado no tratamento das doenças de Parkinson e Alzheimer. O ácido alfa-lipóico também tem sido usado há décadas para proteger o fígado e desintoxicar o corpo de poluentes como os metais pesados. Um dos estudos mais interessantes é que o ácido alfa-lipóico parece ajudar a retardar a progressão da infecção pelo HIV. Isso não é importante apenas para as pessoas HIV - positivo, mas para todos, como o tratamento da AIDS acrescenta bilhões de dólares para os custos de saúde (PACKER *et al.*, 1995).

O ácido alfa-lipóico é também um nutriente antioxidante condicionalmente essencial. Condicionalmente essencial significa simplesmente que é essencial à vida. A função antioxidante do ácido alfa-lipóico é de grande importância, uma vez que os nutrientes

antioxidantes ajudam a proteger o organismo contra os danos que podem ser causadas por doenças cardíacas, câncer, envelhecimento e outras doenças. Esse dano é causado por subprodutos indesejáveis do metabolismo. Ele nos protege contra os efeitos nocivos dos subprodutos do metabolismo. O ácido alfa-lipóico tanto interage com seus parceiros antioxidantes; vitamina E e vitamina C, quanto ajuda a conservá-los. Quando o corpo é deficiente em ácido alfa-lipóico, os outros antioxidantes não trabalham em conjunto. O ácido alfa-lipóico também protege o fígado e desintoxica os tecidos de metais pesados como ferro e cobre, e os metais tóxicos cádmio, chumbo e mercúrio. É surpreendente que um único nutriente tenha tantas funções. O ácido alfa-lipóico é um antioxidante universal que direta e indiretamente ajuda a proteger todos os componentes do corpo dos danos do estresse oxidativo. (PACKER *et al*, 1995; WHOLE, 1996; SNELL *et al*, 1937; GUIRARD *et al*, 1946; REED *et al*, 1951 e REED. L. J, 1974).

6.5. Sistemas emulsionados e estudo de estabilidade

Emulsões são preparações cosméticas obtidas pela dispersão de duas fases imiscíveis ou praticamente imiscíveis. De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, estes sistemas são classificados em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (PINHO & STORPIRTIS, 1998).

Os principais elementos são os que compõem a fase aquosa, fase oleosa e emulsificantes, podendo ainda ser incorporados compostos com finalidades específicas (SILVA & SOARES, 1996). Do ponto de vista médico/cosmético o produto deverá ser não irritante, não se degradar, ser compatível com princípios ativos e aditivos especiais (CARMINI & JORGE, 1989); portanto, em síntese, as emulsões deverão ter estabilidade, que é a capacidade que o produto tem num determinado período de tempo, do início ao final de sua vida útil, e numa embalagem determinada, de manter as mesmas propriedades e características que tinha no momento em que finalizou a sua fabricação através de um procedimento padronizado (D'LEÓN, 2001).

Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto. As alterações podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração) e intrínsecas, relacionadas à natureza das formulações e, sobretudo, à interação de seus componentes entre si e ou com o material de acondicionamento (D'LEÓN, 2001).

O estudo da estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (Brasil, 2004). Para os testes de estabilidade, as condições de armazenagem mais comuns são: temperatura (elevada, do ambiente e baixa),

exposição à luz e ciclos de congelamento e de descongelamento. A temperatura ambiente deverá ser monitorada, sendo aceita variação de até ± 2 °C e as temperaturas elevadas devem obedecer aos limites mais freqüentemente praticados, em estufas a 37, 40, 45 e 50 °C, sendo aceita variação de até ± 2 °C. Os limites de temperaturas baixas mais utilizados são em geladeira a 5 °C e em freezer de -5 a -10 °C (ISAAC et al., 2008a).

Para avaliar a estabilidade de produtos cosméticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, segundo o Guia de estabilidade de produtos cosméticos realizado em 2004 (BRASIL, 2004), preconiza alguns testes:

1. Ensaios organolépticos: aspecto, cor, odor e sabor.
2. Ensaios físico-químicos: potencial hidrogeniônico (pH), materiais voláteis, teor de água, viscosidade, comportamento reológico, análise da distribuição do tamanho de partículas, centrifugação, densidade, granulometria, condutividade elétrica, espectrofotometria e cromatografia.

6.5.1 Estudo reológico de sistemas emulsionados

O primeiro uso da palavra reologia foi feito por Eugene C. Bingham em 1928 que a descreveu através de trabalhos de Heráclitus, grego pré-socrático 500 a.C. que dizia: *tudo flui* (REINER, 1964). A resistência à fluidez dos sistemas emulsionados é provavelmente uma das mais importantes propriedades, tanto do ponto de vista prático como teórico. Considerações práticas aparecem do fato que uma emulsão comercial só pode ser comercializada a uma viscosidade específica (BECHER, 1972). Isaac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de fluxo de um líquido ideal ao relacionar o gradiente de deformação (taxa de cisalhamento) como diretamente proporcional à força (tensão de cisalhamento) aplicada, sendo a proporcionalidade dada por uma constante intrinsecamente dependente da natureza do fluido.

Essa constante é o coeficiente de viscosidade, que representa o atrito mecânico entre as camadas (Equação VIII). A tensão de cisalhamento é uma força aplicada tangencialmente em uma área, sendo a interface entre a placa superior e o líquido abaixo, gerando um fluxo na camada líquida. A velocidade do fluxo pode ser mantida com uma força constante controlada pela resistência interna do líquido, a viscosidade (SCHRAMM, 2006). A tensão de cisalhamento provoca um fluxo, cuja velocidade máxima se encontra na camada superior do líquido e diminui atravessando o corpo (Figura 10).

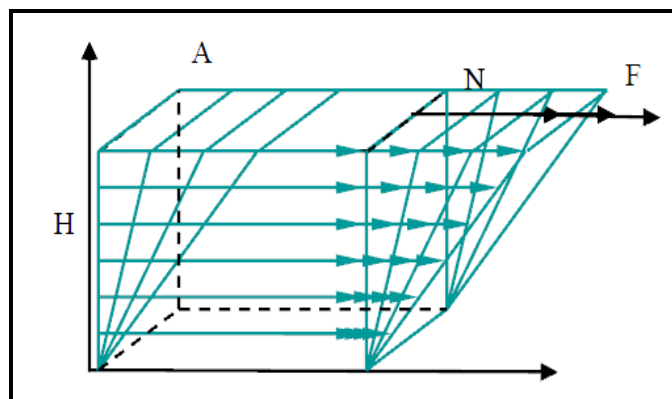


Figura 10: Representação de um fluxo entre duas placas paralelas

F – força aplicada. A – área em que é aplicada a força. H – altura. N – deslocamento do fluxo, (SCHRAMM, 2006).

$$\tau = \eta \cdot \gamma \quad \text{Equação VIII (LEI DE NEWTON)}$$

Onde: τ = tensão de cisalhamento (Pa); γ = taxa de cisalhamento (s^{-1}); η = viscosidade (Pa.s)

Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos e não newtonianos. Os newtonianos são aqueles em que a viscosidade não é afetada por mudanças da taxa de cisalhamento. Para um fluido newtoniano ideal, a tensão de cisalhamento é uma função linear da taxa de cisalhamento e a constante de proporcionalidade para esta relação η é chamada de viscosidade Newtoniana. No fluido Newtoniano somente ocorrem efeitos de atrito mecânico e o nível energético dessas interações está próxima do nível energético para ruptura e formação de pontes de hidrogênio em um líquido (SCHRAMM, 2006).

Para um fluido Newtoniano o valor da viscosidade caracteriza o fluido e esse valor não varia com a tensão aplicada (STEFFE, 1996). Líquidos simples (como a água), soluções de baixa massa molecular, dispersões diluídas e soluções poliméricas diluídas apresentam um comportamento newtoniano (SHARMA, MULVANEY & RIZVI. 2000).

Todos os outros fluidos que não apresentam esse comportamento são chamados de não newtonianos. Os não newtonianos podem ainda ser divididos, por exemplo, em pseudoplásticos, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e sua estrutura é recuperada quando a taxa de cisalhamento retorna a zero; dilatante, em que a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento; e pseudoplástico com tensão inicial (materiais plásticos ou de Bingham) onde o valor de cedência é caracterizado pela tensão de cisalhamento mínima necessária para produzir o escoamento. (Figura 11).

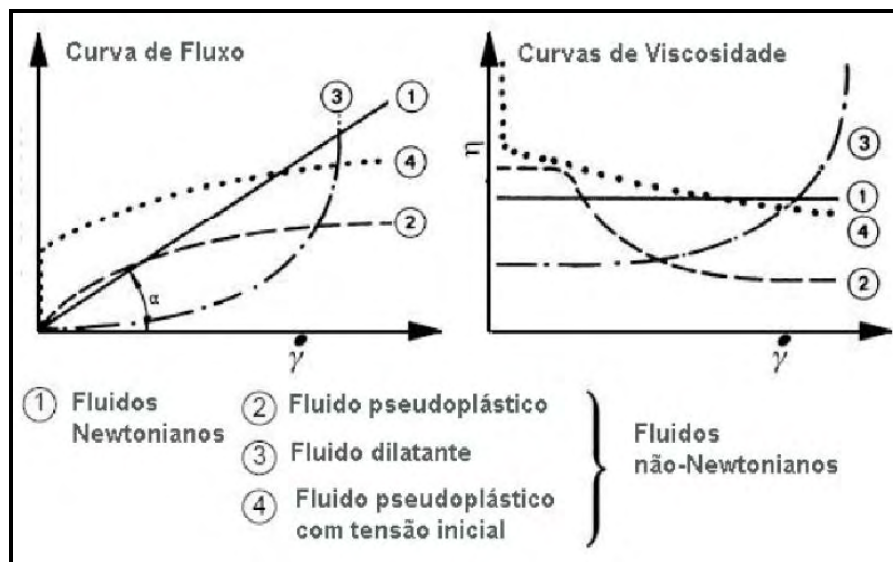


Figura 11: Comportamento de fluxo de um fluido, (SHARMA, MULVANEY & RIZVI, 2000).

Um material não newtoniano não tem relação proporcional direta entre a taxa e tensão de cisalhamento. O início do escoamento pode ocorrer ou não, só após certa pressão mínima exercida (valor de cedência) e a velocidade de cisalhamento não aumenta proporcionalmente com a elevação da tensão ou agitação que cria o escoamento. Em geral a viscosidade de um líquido diminui com o aumento da temperatura, sendo que emulsões, cremes, dispersões, géis e loções apresentam comportamento não newtoniano (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001).

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

A tixotropia pode ser representada quantitativamente pela área de histerese entre as curvas ascendentes e descendentes de um gráfico que representa a relação velocidade de cisalhamento/tensão (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

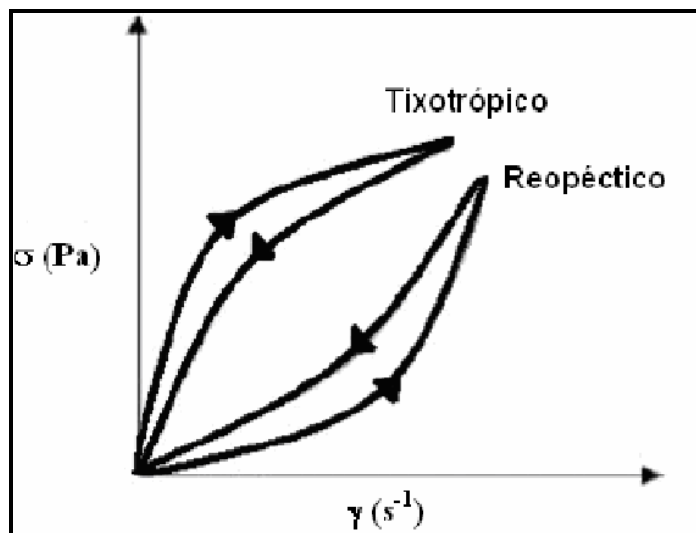


Figura 12: Curvas de fluxo para fluidos dependentes do tempo, (SHARMA, MULVANEY & RIZVI. 2000).

Na reologia de cosméticos, podem ser avaliadas propriedades de escoamento e deformação do produto sob a ação de forças, para que se possa descrever as relações entre as tensões e deformações, através das leis constitutivas ou de comportamento de fluxo (CORREA, 2005; ALMEIDA & BAHIA, 2003).

O estudo do comportamento reológico também faz parte do processo de desenvolvimento. É muito útil na determinação de propriedades que devem ser consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico, e portanto, de cosméticos. A determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de instabilidade física, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, formulações teste e produtos finais. Características sensoriais e performance do produto são frequentemente relacionados às suas propriedades reológicas, principalmente às propriedades de fluxo, que determinam a consistência e espalhabilidade fácil e sem escoamento excessivo do produto (BARRY, 1993; MASSON, 2005).

A caracterização reológica completa de um sistema pode, então, ser útil desde o desenvolvimento de produto cosmético até a determinação do prazo de validade, incluindo a relação direta com testes sensoriais, que auxiliam verificar a aceitação do consumidor (BARRY, 1993). Na avaliação de novas formulações, é importante que se faça a caracterização reológica, pois são propriedades relevantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico.

6.5.2. Cristais líquidos

Os cristais líquidos são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu a existência de um estado intermediário da matéria entre sólido e líquido. Em 1922, G. Friedel

usou o termo estado mesomórfico (mesos = intermediário, morphé = forma) e, portanto, a partir de então, os cristais líquidos são também denominados como fases mesomórficas, mesomórficas cristalina ou para-cristalinas, apresentando propriedades e características de sólidos e líquidos (FERRARI, 2003; TYLE, 1989).

Esta fase intermediária possui ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos, portanto esta mesofase possui propriedades mecânicas típicas do estado líquido, fluidez e tensão de superfície, mas certa ordem molecular e dessa forma constitui uma fase fluida ordenada ou cristal líquido. A mesofase cristal líquido exhibe ainda propriedades ópticas típicas do estado cristalino, anisotropia (direção óptica) e birrefringência (BEVAQUA et al., 1991; NESSEEM, 2001).

Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos, enquanto cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura (HYDE, 2001).

A classe liotrópica depende da concentração de um material, um solvente que tenha papel ativo e crítico na estrutura destes cristais líquidos e não simplesmente um veículo para as moléculas de tensoativos; ao contrário, é mais propriamente integrante da estrutura cristalina líquida (BEVAQUA et al., 1991).

A classe termotrópica dos cristais líquidos é formada pela influência da temperatura do sistema e são poucos estáveis. São substâncias orgânicas com estrutura molecular simbolizada pelos ésteres colestéricos (TYLE, 1989). Os termotrópicos são classificados em nemáticos ou esméticos. Os nemáticos têm estruturas como linhas quando observado no microscópio, e as moléculas mantêm arranjo paralelo ou aproximadamente paralelo. A estrutura dos esméticos é estratificada, com as moléculas arranjadas em camadas e seus eixos longos dispostos paralelos uns aos outros (TYLE, 1989).

Alguns tensoativos catiônicos e não-iônicos são capazes de formar fases anisotrópicas quando são tratados com solventes, e em particular com água. Destas, as fases mais importantes e comumente observadas são as fases lamelar (neat phase), hexagonal (middle phase) e cúbica (cubic phase) (TYLE, 1989).

A fase lamelar (designada L_α) é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. As cadeias hidrocarbônicas encontram-se no estado líquido e as bicamadas anfífilas estão separadas por camadas de água. Na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Na fase H_I (fase normal), as moléculas do tensoativo se agrupam em micelas cilíndricas circulares, com água preenchendo o volume entre os cilindros, enquanto que na fase H_{II} (fase reversa), os cilindros contêm canais de água circundado pelas cabeças polares do tensoativo e a porção oleosa localizada ao redor dos cilindros. Fases cúbicas liotrópicas apresentam estruturas mais

complexas e são visualizadas com maior dificuldade quando comparada com as outras fases. Há dois tipos de fase cúbica, a primeira é a cúbica bicontínua (V_I) que consiste no domínio contínuo de água dividindo-se em duas bicamadas contínuas de tensoativo; a segunda é a cúbica micelar (I_I) que consiste em micelas de tensoativo arranjadas em forma cúbica e separadas por uma fase aquosa contínua. (FERRARI et al., 2003; BRINON et al., 1999).

Nas figuras 13, 14 e 15 observa-se os diferentes tipos de formas obtidas de mesofases líquido cristalinas liotrópicas.

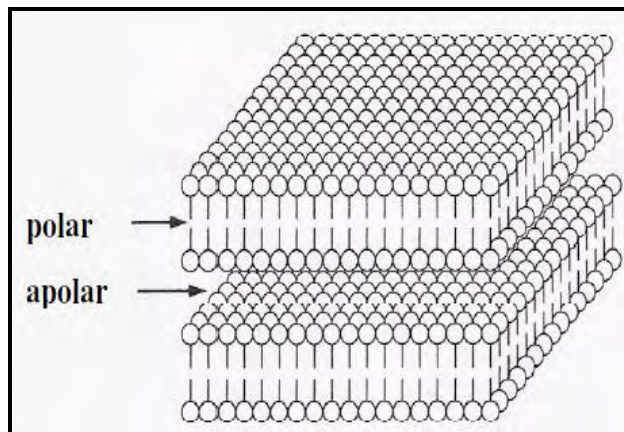


Figura 13: Representação do cristal líquido na fase lamelar (LOCHHEAD, 1994; TYLE, 1989)

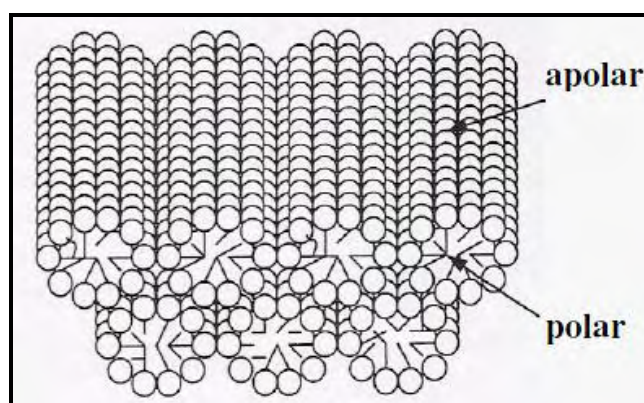


Figura 14: Representação do cristal líquido na fase hexagonal (LOCHHEAD, 1994; TYLE, 1989)

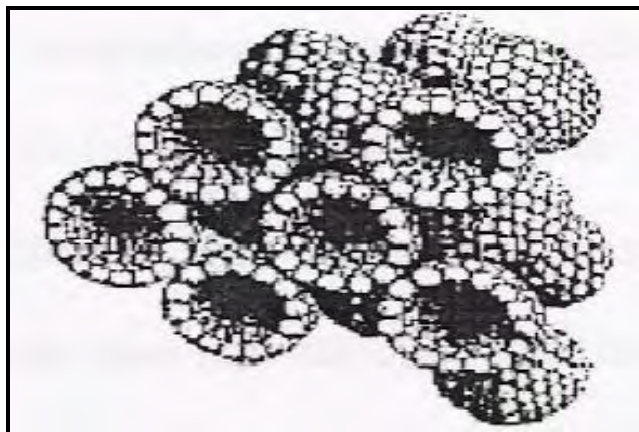


Figura 15: Representação do cristal líquido na fase cúbica (LOCHHEAD, 1994; TYLE, 1989)

Dentre os tipos de cristais encontrados nos produtos cosméticos, os liotrópicos são os mais predominantes e formam-se espontaneamente em muitos tipos de sistemas emulsionados. Quando presentes, por exemplo, na interface de uma emulsão A/O, aumentam a estabilidade da emulsão, pois promovem aumento na rigidez da membrana interfacial. A utilização de cristais líquidos em cosméticos apresenta vantagens funcionais relacionadas ao fato de estabilizarem emulsões; promoverem liberação controlada de ativo; incorporação de ativos em matrizes cristalinas líquidas ou mesmo em formulações que os contenham, pois os cristais líquidos protegem as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação; promovem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (FERRARI et al., 2003; BEVACQUA et al., 1991).

6.5.3. Microscopia de luz polarizada

Dentre as várias técnicas físico-químicas usadas para identificar as fases mesomórficas, tais como difração de raios X, reologia, ressonância magnética nuclear e calorimetria, a mais amplamente usada é a microscopia de luz polarizada (TYLE, 1989).

O microscópio de luz polarizada, também conhecido como microscópio petrográfico, utiliza luz polarizada (produzida por uma lâmina Polaroid – polarizador), sendo que este tipo de luz é denominado de luz polarizada plana (PPL). Para determinadas propriedades, é empregado um segundo tipo de lâmina chamada analisador, representado como luz polarizada cruzada (XPL). Este microscópio é projetado para observar e fotografar estruturas que são principalmente visíveis devido ao seu caráter óptico anisotrópico. Com a finalidade dessa tarefa, o microscópio deve ser equipado com um polarizador posicionado no trajeto da luz, antes do material analisado e um analisador (um segundo polarizador) localizado no caminho óptico entre a abertura traseira da objetiva e os tubos de observação ou o ponto da câmera. O contraste da imagem é originado da interação da luz plano-polarizada com a substância birrefringente para produzir dois componentes individuais da onda, sendo cada um polarizado em planos mutuamente perpendiculares (DAVIDSON & ABRAMOWITZ, 2003).

A microscopia de luz polarizada é uma técnica muito usada para a verificação de estruturas internas de um sistema e está fundamentada em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar. A luz polarizada também é muito utilizada por geólogos e mineralogistas para o estudo das características naturais de rochas e minerais e na indústria para a caracterização de materiais cerâmicos. A técnica é também empregada no estudo de transição de fase e texturas exibidas por cristais líquidos (DAVIDSON & ABRAMOWITZ, 2003)

Através do microscópio com luz polarizada podem ser observados dois tipos de arranjos internos, o hexagonal e o lamelar. O arranjo cúbico se apresenta isotrópico, somente sendo detectado com outras técnicas de análise, como a difração de raios X a baixo ângulo (DAVIDSON & ABRAMOWITZ, 2003)

O arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica, que distingue facilmente do lamelar, quando observado ao microscópio de luz polarizada. Os agregados de tensoativo estão organizados em cilindros, que podem se empacotar formando uma fase fluida bidimensional. Já o arranjo lamelar pode ser com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando espécies de ondas e estruturas denominadas “cruzes-de-malta” que são observadas ao microscópio com luz polarizada (FERRARI et al., 2003).

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

A técnica de espalhabilidade de raios x a baixo ângulo (SAXS) fornece informações sobre tamanho, forma, quantidade e arranjo dos objetos espalhadores da amostra. Em um sistema diluído, onde as partículas estão isoladas umas das outras e não há interação entre elas, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ das diferentes partículas. Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e estão em intensa interação entre si e o espalhamento medido refletirá sua geometria e o arranjo entre elas; portanto, se as partículas estão correlacionadas, $S(q)$ caracteriza o arranjo e contém todas as informações sobre as interações entre as partículas.

Ao irradiar uma amostra bifásica numa plaqueta relativamente fina, com um feixe de luz monocromático (luz visível, raios-x, nêutrons, elétrons), pode ser observado o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. O espalhamento de raios X ocorre devido às heterogeneidades na densidade eletrônica das estruturas do sistema. Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada $I(q)$ é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta partícula, em que q é o vetor de espalhamento (NIELSEN et al., 1993).

É possível observar diferentes regiões na curva de intensidade do feixe espalhado em função do vetor de espalhamento q , as quais são exploradas na técnica de SAXS, como a região de Porod para altos valores de q , e para valores em baixos limites de q é a região de Guinier. Nessas regiões é onde ocorre o espalhamento de raios X a baixo ângulo, que fornece

informações a respeito da morfologia e mecanismos de agregação estrutural (CHIAVACCI, 1996).

Num sistema diluído, em que as partículas são isoladas uma das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ das diferentes partículas. A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que para n partículas distribuídas ao acaso, o valor da intensidade pode ser calculado como:

$$I(q) \propto \sum_n P_n(q) \quad (\text{equação IX})$$

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

$$I(q) = N \cdot P_{(q)} \cdot S_{(q)} \quad (\text{equação X})$$

Entretanto $S(q)$ pode assumir formas muito variadas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras e será difícil separar as contribuições de $P(q)$ e $S(q)$. De modo geral, quando a curva de espalhamento apresenta um máximo de espalhamento a baixos ângulos, pode relacioná-la com a presença de correlações entre as posições dos centros espalhadores. É possível deduzir uma distância média d , entre duas gotículas ou planos vizinhos, a partir do valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima ($q_{\max}$), empregando a relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\max}} \quad (\text{equação XI})$$

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

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

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

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

A figura 16 apresenta um exemplo de curva de espalhamento obtida a partir de medidas de SAXS, onde é possível observar diferentes regiões. A região de Porod (altos valores de q) fornece informações sobre a superfície das partículas. A região de Guinier fornece informações sobre o tamanho das partículas maiores ou agregados e a região de q intermediária a respeito da existência e da natureza de estruturas fractais. Na região de Bragg, ocorre o fenômeno de difração dos raios X (BRINKER & SCHERER, 1990).

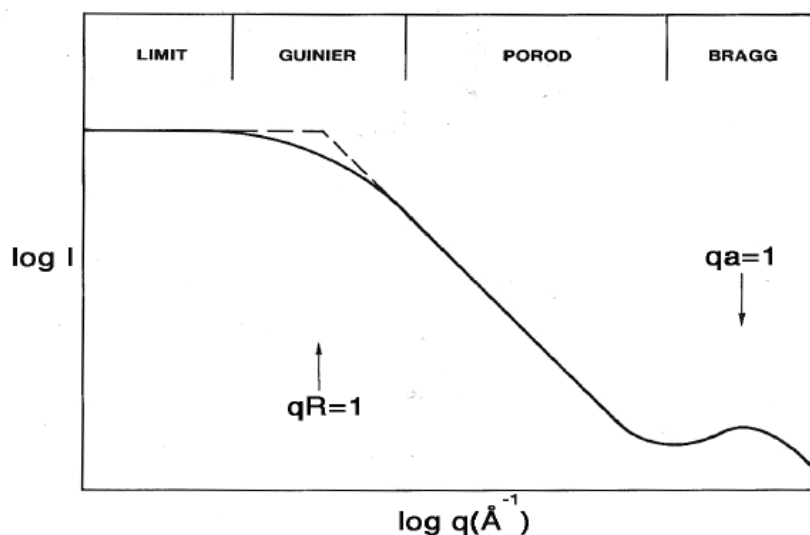


Figura 16: Diagrama esquemático de SAXS (BRINKER & SCHERER, 1990)

A intensidade do espalhamento produzida por amostras contendo múltiplos (n) níveis estruturais pode ser descrito por uma equação semi-empírica proposta por BEAUCAGE (1995), que descreve a tendência assintótica das regiões de Guinier e Porod e leva em consideração os efeitos da correlação:

$$I(q) = \sum_{i=1}^n G_i e^{\frac{-q^2 R_{gi}^2}{3}} + B_i e^{\frac{-q^2 R_{gi}^2 (i-1)}{3}} \left[\frac{\left[\text{erf} \left(q R_{gi} / \sqrt{6} \right) \right]^3}{q} \right]^{P_i} S_i(q)$$

(equação XIII)

Onde R_g é o raio de giro do objeto espalhador e os parâmetros G , B e P dependem da densidade eletrônica, tamanho e forma dos objetos, respectivamente.

A função de estrutura $S(q)$ para nano-objetos esféricos, onde a correlação resulta da interação entre esferas duras é dada por :

$$S(q) = 1 / (1 + k \theta) \quad (\text{equação XIV})$$

Sendo $k = SV/V_0$, o fator de empacotamento ou compacidade, onde V é o volume médio disponível para cada esfera e V_0 é o volume médio efetivamente ocupado por cada esfera. O fator θ depende da distância média de correlação entre esferas (d), sendo: $\theta = 3[\text{sen}(qd) - qd\cos(qd)] / (qd)^3$.

O interesse na utilização da técnica de SAXS na caracterização de sistemas é explicado pelo fato de existir a possibilidade de exploração dos dados na determinação do tamanho médio e da distância entre os objetos espalhadores, como gotículas e micelas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados. Oferece a vantagem de caracterizar materiais que tem distância entre objetos espalhadores além do limite de trabalho da difração de raios-x (GLATTER, 1982; LECOMTE, 1988).

É uma técnica que permite caracterizar partículas entre 10 e 1000 Å. Assim sendo, permite caracterizar uma grande variedade de amostras como vidros, colóides e proteínas (WILLIAMS et al., 1993)

7. Objetivo

Desenvolver uma emulsão cosmética contendo ácido alfa-lipóico e avaliar sua estabilidade e peculiaridades através da realização dos ensaios de centrifugação, testes preliminares e acelerados de estabilidade físico química, microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e comportamento reológico completo.

8. MATERIAL E METODOS

8.1. Material, acessórios e equipamentos

Material: Behenyl Álcool, Poliglyceril-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate (Nikkomulse 41 (Nikkol)), Caprylic Capric Triglyceride (triglicérides do ácido cáprico/caprílico), Octyl Stearate (estearato de octila), Dibutyl Adipate (adipato de dibutila), Isopropyl Myristate (miristato de isopropila), Propylene Glycol (propilenoglicol), Carbomer (Carbopol), EDTA (EDTA), Methylparaben (metilparabeno), Propylparaben (propilparabeno), Triethanolamine (trietanolamina), BHT (butilhidroxitolueno), Sodium Metabisulfite (metabissulfito de sódio), Aqua (água), Lipoic Acid (ácido alfa-lipóico), Cetareth-20 (álcool cetoestearílico etoxilado 20OE),

Cetearyl Álcool (álcool cetoestearílico), Dimethicone Copoliol (fluido de silicone), Cetil Palmitate (palmitato de cetila), PEG-75 lanolin (lanolina etoxilada) e etanol PA.

Acessórios: Béqueres, bastões de vidro, espátulas, termômetro, fonte de aquecimento, tubos para centrífuga tipo falcon, pipetas, provetas, balões de diluição, lamínulas, laminas para microscopia, grades para tubos, cubeta de quartzo, embalagens de plástico e pisseta.

Equipamentos: balança analítica (Gehaka, BG 2000), peagômetro digital (MARCONI), reômetro (Haake RS-1), centrífuga (Fanem-Baby), freezer (Eletrolux Prosdocimo, double D44), microscópio luz polarizada (Carl Zeiss – Axioskop - 40), estufa de secagem e esterilização (Famen, 315 SE), espectrofotômetro (UV-VIS, Hewlett Packard® KAIK-XA-modelo 8453) e SAXS do laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), cuja linha é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda (λ) de 1.608 Å , uma câmara de ionização e um detector vertical localizado a 776 mm das amostras.

8.2. MÉTODOS

8.2.1. Desenvolvimento da emulsão

Foram propostas quatro emulsões (A, A 1, B e B 1). As emulsões do tipo O/A foram preparadas de acordo com técnica usual de preparação de emulsões. Foi aquecida a fase aquosa até $75 \pm 2^\circ \text{C}$ e a fase oleosa com os componentes oleosos da formulação até a fusão. A fase aquosa foi transferida sobre a oleosa e a agitação foi realizada até o resfriamento.

Tabela VI. Composição percentual das formulações A, A 1, B e B 1.

International Nomenclature	Nomenclatura	%	%	%	%
Cosmetics Ingredients (INCI)	(português)	A	A 1	B	B 1
Behenyl Álcool, Poliglyceril-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	nikkomulse 41 (Nikkol)	4	4	-	-
Caprylic Capric Triglyceride	triglicérides do ácido cáprico/caprílico	2	2	-	-
Octyl Stearate	estearato de octila	1	1	-	-
Dibutyl Adipate	adipato de dibutila	4	4	-	-
Propylene Glycol	propilenoglicol	4	4	3	3
Carbomer 940	polímero carboxivinílico (dispersão a 2%)	50	50	-	-
EDTA	EDTA	0,1	0,1	-	-
Methylparaben	metilparabeno	0,18	0,18	0,18	0,18
Propylparaben	propilparabeno	0,02	0,02	0,02	0,02
Sodium Metabisulfite	metabissulfito de sódio	0,15	0,15	-	-
Triethanolamine q.s.p pH 6	trietanolamina				
BHT	butilhidroxitolueno	0,1	0,1	0,05	0,05
Ceteareth-20	álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE	-	-	3	3
Cetearyl Alcohol	álcool cetoestearílico	-	-	3	3
Dimethicone Copoliol	fluido de silicone	-	-	1	1
Cetil Palmitate	palmitato de cetila	-	-	3	3
Isopropyl Myristate	miristato de isopropila	-	-	4	4
PEG-75 lanolin 50%	lanolina etoxilada	-	-	2	2
Aqua q.s.p	água	100	100	100	100
Lipoic Acid	ácido alfa-lipóico	-	2	-	2

O ácido alfa-lipóico na concentração de 2% (matéria prima) foi primeiro solubilizado separadamente no propilenoglicol utilizado na emulsão e essa solução foi vertida na emulsão logo após seu preparo, até a homogeneização total e resfriamento da emulsão.

8.2.2. Teste de centrifugação

Para o teste de estabilidade à centrifugação, alíquotas de aproximadamente 5 g da amostra foram pesados e acondicionados em tubo de centrífuga graduado. As amostras foram submetidas à centrifugação na velocidade de 3000 rpm. O procedimento foi realizado em 3 ciclos de 30 minutos (BRASIL, 2004). Após cada ciclo, foi avaliado visualmente qualquer sinal de instabilidade da amostra.

8.2.3. Estudo de estabilidade

A definição do estudo de estabilidade foi baseada nas recomendações constantes no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, descrito pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária e ISAAC *et al.* (2008a).

As preparações foram estocadas em geladeira a $(5 \pm 2^\circ \text{C})$, em temperatura ambiente $(27 \pm 2^\circ \text{C})$, exposta à luz indireta, em estufa termostatzada a $(45 \pm 2^\circ \text{C})$ e em freezer a $(-5 \pm 2^\circ \text{C})$. Além destas condições, as emulsões também foram submetidas à avaliação macroscópica e do pH, durante 15 dias consecutivos (teste de estabilidade preliminar). Os testes de viscosidade foram realizados no dia 1 para a amostra estocada em temperatura ambiente $(27 \pm 2^\circ \text{C})$ e nos dias 7 e 15 para todas as amostras. Para a realização dos ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram submetidas a condições extremas de temperaturas, alternando 24 horas em temperaturas elevadas $(45 \pm 2^\circ \text{C})$ e 24 horas em temperaturas baixas $(-5 \pm 2^\circ \text{C})$, durante 15 dias seguidos.

Para a realização do teste de estabilidade acelerada, os ensaios (avaliação macroscópica, do pH e da viscosidade) foram realizados nos intervalos de 1, 7, 15, 30, 45, 60, e 90 dias de análise. A variação dos resultados não deve ser maior que 10% (BRASIL, 2004), para a emulsão ser considerada estável.

O teste de estabilidade foi realizado para as formulações base A e para as formulações contendo ácido alfa-lipóico A1 e B1. A emulsão base B foi preparada, mas não foi submetida aos testes tanto preliminar quanto acelerado e nem aos ensaios reológicos realizados neste trabalho, pois estes estudos foram realizados por ISAAC, 1998, que constatou que a emulsão apresentou estabilidade frente aos testes aos quais foi submetida.

8.2.4. Avaliação macroscópica

Durante a avaliação macroscópica foram observadas características como cor, odor e aparência das emulsões. Também foi avaliada a existência ou não de separação das fases das amostras.

Segundo o Guia de estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os seguintes critérios podem ser considerados:

- **aspecto:** o produto deve manter-se íntegro durante todo o teste, mantendo seu aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos em que pequenas alterações são aceitáveis.
- **cor e odor:** devem permanecer estáveis por, no mínimo, 15 dias à luz solar. Pequenas alterações são aceitáveis em temperaturas elevadas.

Tabela VII. Critérios de avaliação de parâmetros organolépticos da emulsão cosmética

aspecto	N - normal sem alteração
	L - levemente ou ligeiramente modificado
	M – modificado
	I - intensamente modificado
cor	N - normal sem alteração
	L - levemente ou ligeiramente modificado
	M – modificado
	I - intensamente modificado
odor	N - normal sem alteração
	L - levemente ou ligeiramente modificado
	M – modificado
	I - intensamente modificado

Fonte: BRASIL, 2004

8.2.5. Determinação do valor de pH

Para a determinação do valor de pH, foi preparada uma dispersão aquosa a 10% (p/p) das amostras em água recém destilada, submetida a avaliação em peagômetro digital. O eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa (DAVIS, 1977). O valor compatível com o pH cutâneo, entre 5,5 e 6,5 foi usado como critério no teste de estabilidade e a variação dos resultados não deve ser maior que 10% (ISAAC, 2008).

8.2.6. Determinação da viscosidade

O teste para determinar a viscosidade das emulsões submetidas às condições de estresse foi realizado pelo ensaio reológico de curva de fluxo, tendo como parâmetros uma faixa de taxa de cisalhamento de 0-100 s⁻¹ para a curva de subida no período de 120 segundos e de 100-0 s⁻¹ para a curva de descida também por 120 segundos. O reograma foi avaliado quanto á viscosidade (Pa.s) em relação à taxa de cisalhamento. O teste foi realizado a 32° C e em triplicata e de acordo com MORAES et al., 2010, a variação dos resultados não deve ser maior que 10% (ISAAC, 2008).

8.2.7. Doseamento do ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão por espectrofotometria

O doseamento do ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão desenvolvida foi realizado coletando alíquotas de 0,5 g do cosmético nas cinco condições de estresse em que foi submetido (geladeira a 5 ± 2° C, em temperatura ambiente a 27 ± 2° C, exposta à luz indireta e em estufa termostatzada a 45 ± 2° C e em freezer a -5 ± 2° C, dissolvidos em etanol PA e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, atingindo uma concentração final de 1,0 mg/mL. Essa solução foi transferida do balão volumétrico para tubos de centrifuga de 10 mL e

centrifugada a 3000 rpm durante dois minutos. O sobrenadante foi recolhido e analisado em espectrofotômetro UV-VIS, Hewlett Packard® KAIKAK-XA-modelo 8453 no comprimento de onda de 334 nm adaptando a metodologia descrita por SEGALL et al., 2004.

8.2.8. Determinação do comportamento reológico

As amostras tiveram seu comportamento reológico avaliado através de mensurações estáticas e dinâmicas em reômetro utilizando um sensor cone/placa (C35/20 Ti) e os dados analisados pelo software Rheowin 3.5.

Foi determinado o comportamento reológico das emulsões, realizando os ensaios de curva de fluxo utilizando para isso uma faixa de taxa de cisalhamento de 0 a 100 Pa/s⁻¹ para a rampa de subida durante 120 segundos e de 100 a 0 Pa/s⁻¹ para a rampa de descida durante 120 segundos. Foi determinada em qual tensão de cisalhamento a amostra apresentou limite de escoamento, ou seja, sofreu deformação, através do teste de rampa de tensão com limite de escoamento com uma faixa de tensão de 0 a 10 Pa durante 120 segundos (MORAES et al., 2010).

Os ensaios reológicos de varredura de tensão e varredura de frequência foram realizados para analisar a viscosidade dinâmica (η^*) e o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') da amostra.

Para o teste de varredura de tensão, foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 Hz. O teste de varredura de frequência foi realizado utilizando uma faixa de frequência de 0,01 a 10 Hz a uma tensão de 1 Pa para as emulsões A e A 1 e 0,5 Pa para a emulsão B 1 (MORAES et al., 2010). Deste modo, foram determinados o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'').

O ensaio de fluência e relaxação foi realizado para determinar a viscoelasticidade da amostra utilizando, para isso, tensão de cisalhamento de 1 Pa para as emulsões A e A 1 e 0,5 Pa para a emulsão B 1 durante 300 segundos para fluência e 300 segundos para a relaxação. Todos os ensaios foram realizados a $32 \pm 0,5^\circ$ C e utilizando cerca de 1 g de amostra para cada teste. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (RIBEIRO, 2004).

8.2.9. Microscopia de luz polarizada

Uma quantidade de amostra referente às formulações A, A 1, B e B 1 foi colocada de modo que se formasse uma camada muito fina sobre as lâminas de vidro as quais foram cobertas com uma lamínula. Em seguida as formulações foram analisadas no microscópio de luz polarizada (Carl Zeiss – Axioskop - 40), para ser avaliada a presença de anisotropia ou isotropia.

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

A técnica de SAXS foi utilizada para a obtenção de informações mais precisas sobre a forma estrutural das emulsões A, A 1, B e B 1 estudadas neste trabalho.

O ensaio de SAXS foi realizado no laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP. A linha é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda (λ) de 1.608 Å, uma câmara de ionização, um detector vertical localizado a 776 mm da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento.

O interesse na utilização da técnica de SAXS na caracterização de sistemas emulsionados é explicado pelo fato de existir a possibilidade de exploração dos dados na determinação do tamanho médio e da distância entre os objetos espalhadores, como gotículas e micelas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados. Oferece a vantagem de caracterizar materiais que tem distância entre objetos espalhadores além do limite de trabalho da difração de raios X.

Assim sendo, da curva de espalhamento de raios X, é possível obter informações sobre o tamanho, a forma, a quantidade e o arranjo dos objetos espalhadores (KLEIN, 2007)

8.3. Análise estatística

Foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) no programa Microsoft Excel, versão 2009.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Desenvolvimento da emulsão

Foram desenvolvidas emulsões O/A. As emulsões A (emulsão base sem ácido alfa-lipóico) e A1 (contendo 2% de ácido alfa-lipóico).

Na emulsão A e A1 foi utilizada dispersão a 2% de Carbomer (polímero carboxivinílico), considerado excelente espessante hidrofílico, que pode ser empregado no preparo de emulsões de fase externa aquosa (O/A), uma vez que contribuem para o aumento da viscosidade do sistema e, portanto, proporcionam a estabilidade da emulsão. Este espessante também pode modificar as características reológicas das formulações (CORRÊA, 2010).

9.2. Teste de centrifugação

O procedimento de centrifugação é eficaz na determinação da instabilidade dos produtos emulsificados, já que a simulação de aumento da força de gravidade pode promover separação de componentes de diferentes densidades, com nas fases óleo e água. Diversos valores de rotação e tempo de centrifugação são citados na literatura (SILVA, 1996), entretanto, o uso da ultracentrifugação não é recomendado. Velocidades de rotação

moderadas entre 2000 e 5000 rpm, durante curto período são muito úteis para verificar o comportamento das gotículas emulsionadas frente à força da gravidade (RIEGER, 1996).

As emulsões A, A1 e B1 após serem submetidas à centrifugação por três ciclos de 900 g durante 30 minutos em cada ciclo, não apresentaram instabilidade, caracterizada pela separação das fases, mesmo após 24 horas da manipulação; por isso, foram escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho.

9.3. Teste de estabilidade

A determinação da estabilidade de emulsões nem sempre pode ser avaliada através de métodos rápidos e sensíveis. Assim, é necessário que se acelere a instabilidade submetendo o produto às condições de estresse como calor, exposição à luz, variação térmica, entre outros (MONTAGNER & CORRÊA, 2004).

Uma vez estabelecidas as características do produto e as especificações que precisam ser mantidas, devem ser realizados testes de controle de qualidade. Existem muitos testes importantes de estabilidade que são empregados em formulações (ANSEL et al., 2000), sendo alguns deles: o teste químico – onde cada ingrediente ativo deve reter a sua integridade química e potência indicadas na embalagem, dentro de certos limites especificados; e o teste físico – é a propriedade que os produtos apresentam de reter de forma inalterada as características físicas que apresentam após a sua fabricação. Dentre as características físicas a não separação das fases é fundamental, pois se isto ocorrer todas as demais especificações de uma emulsão serão afetadas (SANCTIS, 1999). Aspectos como cor, odor, textura, consistência, sensação de tato e comportamento reológico são também consideradas propriedades físicas.

O teste de estabilidade foi realizado nas emulsões A, A1 e B1, pois não apresentaram separação de fases quando submetidas ao teste de centrifugação.

9.3.1 Teste de estabilidade preliminar das formulações

Para uma formulação ser considerada estável, deve manter suas características, que são avaliadas periodicamente, durante o tempo de estudo da estabilidade preliminar, realizando testes já estabelecidos (BRASIL, 2004).

9.3.1.1. Avaliação macroscópica

Para este teste foram construídas tabelas com parâmetros como cor, aspecto e odor que foram avaliados nas emulsões A, A1 e B1, durante o teste de estabilidade preliminar nas diferentes condições às quais as emulsões foram submetidas, (tabelas VIII, IX e X).

Neste teste a emulsão base A permaneceu estável em todos os critérios avaliados, a emulsão A 1 não apresentou mudanças quando foram avaliados aspecto e cor, mas em relação ao odor, sofreu alteração progressiva no decorrer dos dias.

A emulsão B 1 permaneceu estável em todos os critérios avaliados durante a estabilidade preliminar.

Tabela VIII. Avaliação macroscópica da emulsão A durante a estabilidade preliminar.

Tempo (dias)	Ambiente			Ciclo			Estufa			Freezer			Geladeira			Luz		
	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor
01	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
02	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
03	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
04	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
05	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
06	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
07	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
08	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
09	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N – normal / L - levemente ou ligeiramente modificado / M – modificado / I – intensamente modificado

Tabela IX. Avaliação macroscópica da emulsão **A 1** durante a estabilidade preliminar.

Tempo (dias)	Ambiente			Ciclo			Estufa			Freezer			Geladeira			Luz		
	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor
01	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L
02	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L
03	N	N	L	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L
04	N	N	L	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
05	N	N	L	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
06	N	N	L	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
07	N	N	L	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
08	N	N	L	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
09	N	N	L	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
10	N	N	L	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
11	N	N	L	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
12	N	N	M	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
13	N	N	M	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
14	N	N	M	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
15	N	N	M	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M

N – normal / **L**- levemente ou ligeiramente modificado / **M** – modificado / **I** – intensamente modificado

Tabela X. Avaliação macroscópica da emulsão B 1 durante a estabilidade preliminar.

Tempo (dias)	Ambiente			Ciclo			Estufa			Freezer			Geladeira			Luz		
	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor	Asp.	Cor	Odor
01	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
02	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
03	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
04	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
05	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
06	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
07	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
08	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
09	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N – normal / L- levemente ou ligeiramente modificado / M – modificado / I – intensamente modificado

9.3.1.2. Determinação do valor de pH

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam os gráficos construídos com os valores de pH das formulações A, A1 e B 1 durante 15 dias. A estabilidade pode ser confirmada nas Tabelas XI, XII e XIII que mostram os valores dos desvios padrão e variância das medias de valores de pH.

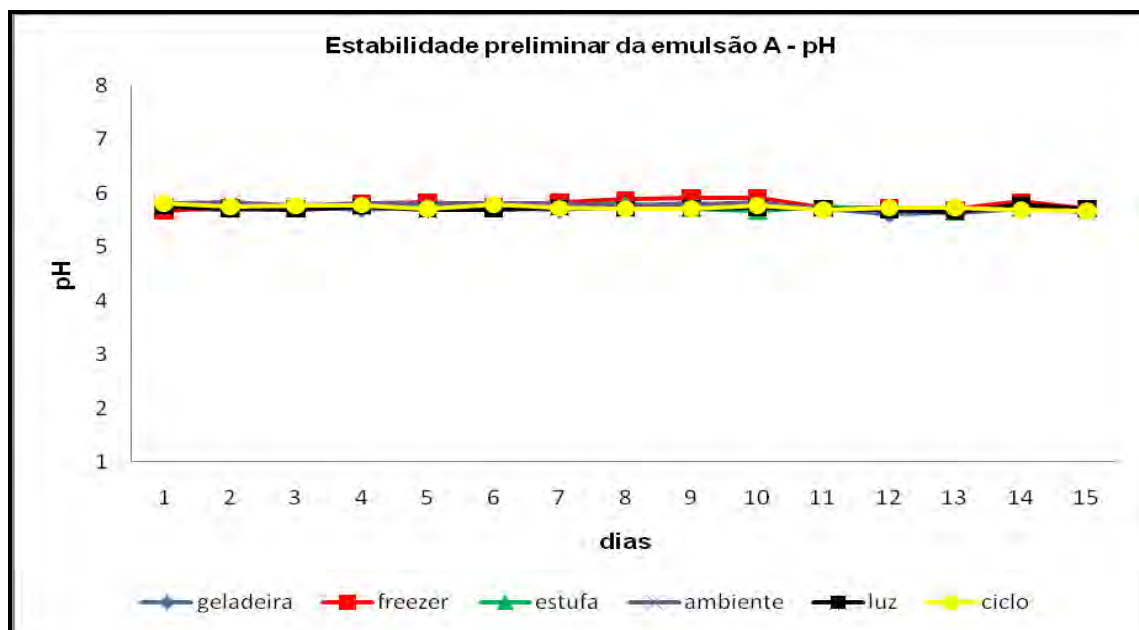


Figura 17: Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A foi submetida durante a estabilidade preliminar.

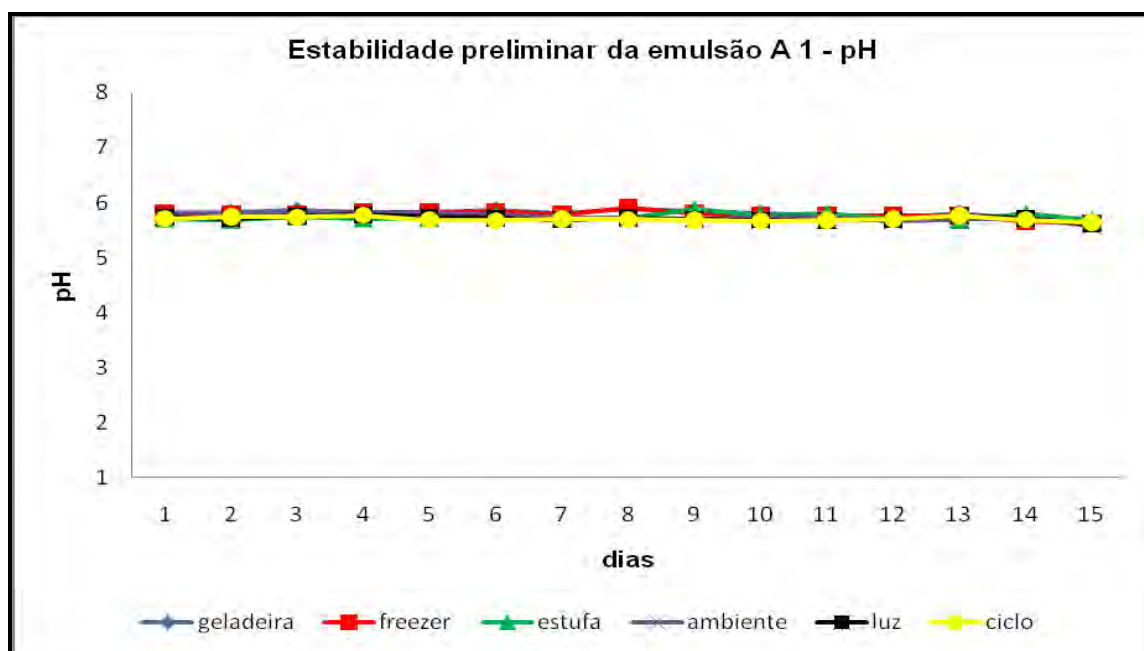


Figura 18: Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A 1 foi submetida durante a estabilidade preliminar.

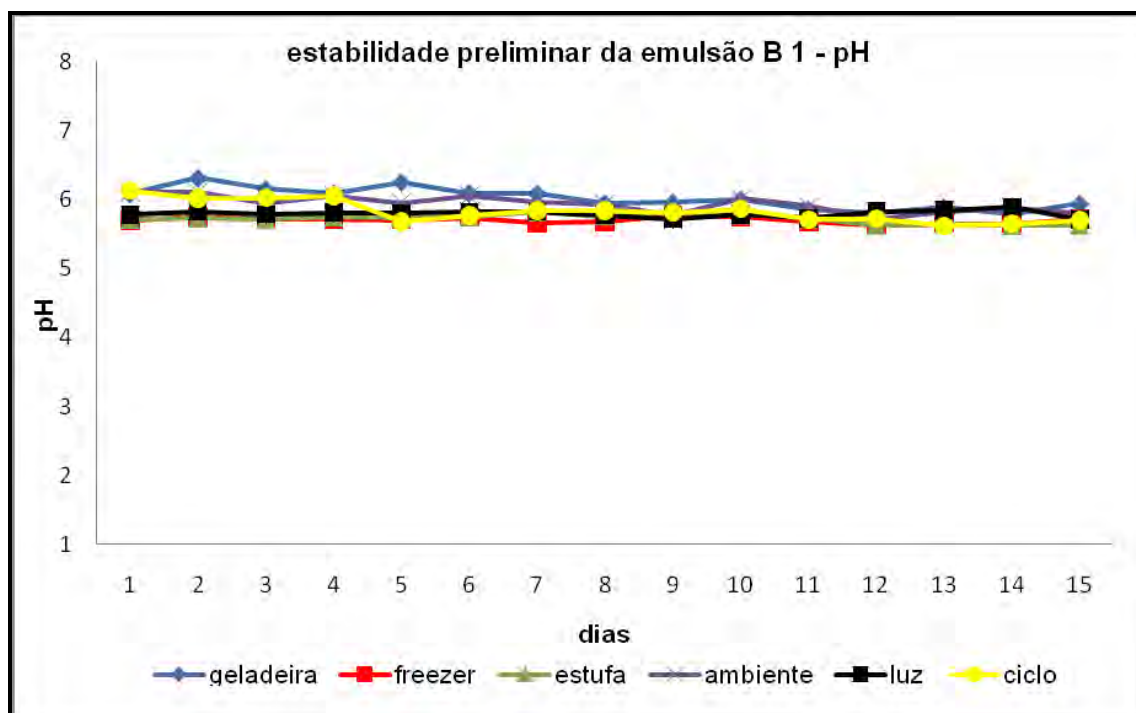


Figura 19: Gráfico das medias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão B 1 foi submetida durante a estabilidade preliminar.

À medida que as emulsões se tornam instáveis, suas características físico químicas variam. Para verificar tais variações é possível determinar, por exemplo, o valor médio do pH, entre outros (ANVISA, 2004).

Qualquer componente presente na formulação pode alterar sua estabilidade, sendo estes considerados fatores intrínsecos. As incompatibilidades físicas e químicas, incluindo, pH, reações de oxi-redução e hidrólise, interação entre os componentes da formulação e com o material de embalagem são consideradas fatores intrínsecos.

As formulações A, A 1 e B 1 (tabela XI, XII e XIII) apresentaram valor médio de pH compatível ao pH cutâneo (5,5 – 6,5). Em todas as condições foram observados desvio padrão inferiores a 0,70 nas medias dos valores de pH medido diariamente, ou seja, uma variação não significativa, mostrando a estabilidade da emulsão quanto a este fator intrínseco avaliado (BRASIL, 2004).

Tabela XI. Valores de pH da emulsão **A**, durante a estabilidade preliminar

Dia	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz	DP	VAR
1	5,8	5,81	5,79	5,68	5,72	5,75	0,053	0,003
2	5,82	5,75	5,74	5,74	5,68	5,71	0,049	0,002
3	5,78	5,78	5,77	5,72	5,76	6,44	0,277	0,076
4	5,81	5,78	5,77	5,82	5,7	5,75	0,043	0,002
5	5,82	5,71	5,76	5,84	5,74	5,69	0,057	0,003
6	5,81	5,79	5,73	5,76	5,73	5,7	0,043	0,002
7	5,81	5,72	5,76	5,84	5,68	5,73	0,058	0,006
8	5,77	5,71	5,80	5,88	5,76	5,71	0,066	0,007
9	5,79	5,71	5,72	5,91	5,81	5,72	0,079	0,001
10	5,82	5,77	5,67	5,92	5,74	5,77	0,085	0,002
11	5,70	5,69	5,75	5,72	5,70	5,72	0,021	0,001
12	5,68	5,73	5,71	5,73	5,61	5,68	0,046	0,004
13	5,64	5,73	5,65	5,70	5,65	5,65	0,035	0,001
14	5,70	5,69	5,72	5,84	5,79	5,79	0,061	0,248
15	5,65	5,67	5,71	5,71	5,67	5,71	0,027	0,004
DP	0,055	0,079	0,042	0,066	0,188	0,043	-	-
VAR	0,003	0,006	0,018	0,004	0,035	0,002	-	-

* Média de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

Tabela XII. Valores de pH da emulsão **A 1**, durante a estabilidade preliminar

dia	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz	DP	VAR
1	5,82	5,71	5,71	5,80	5,80	5,75	0,049	0,002
2	5,81	5,74	5,69	5,78	5,83	5,7	0,057	0,003
3	5,79	5,74	5,74	5,79	5,86	5,76	0,046	0,002
4	5,82	5,77	5,71	5,82	5,83	5,78	0,044	0,002
5	5,82	5,69	5,72	5,83	5,83	5,74	0,063	0,004
6	5,79	5,68	5,78	5,84	5,86	5,72	0,070	0,005
7	5,75	5,71	5,73	5,79	6,04	5,69	0,129	0,017
8	5,70	5,69	5,73	5,91	5,88	5,73	0,095	0,009
9	5,71	5,69	5,89	5,8	5,85	5,7	0,085	0,007
10	5,72	5,67	5,77	5,77	5,81	5,68	0,056	0,003
11	5,74	5,69	5,80	5,77	5,76	5,68	0,049	0,002
12	5,67	5,71	5,71	5,77	5,72	5,69	0,035	0,002
13	5,69	5,76	5,68	5,76	5,81	5,76	0,049	0,001
14	5,70	5,69	5,80	5,66	5,69	5,72	0,049	0,002
15	5,58	5,65	5,68	5,63	5,66	5,61	0,035	0,002
DP	0,067	0,035	0,057	0,067	0,088	0,043		
VAR	0,004	0,001	0,003	0,005	0,007	0,002		

* Média de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

Tabela XIII. Valores de pH da emulsão **B 1**, durante a estabilidade preliminar

dia	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz	DP	VAR
1	6,10	6,13	5,71	5,69	6,09	5,78	0,209	0,043
2	6,11	6,01	5,73	5,75	6,31	6,01	0,229	0,052
3	5,95	6,02	5,71	5,72	5,02	6,02	0,358	0,128
4	6,06	6,05	5,74	5,71	6,09	5,81	0,174	0,030
5	5,95	5,68	5,73	5,70	6,25	5,79	0,218	0,047
6	6,05	5,77	5,75	5,74	6,09	5,82	0,161	0,025
7	5,96	5,84	5,81	5,66	6,09	5,82	0,146	0,021
8	5,93	5,83	5,76	5,68	5,95	5,77	0,105	0,011
9	5,77	5,81	5,82	5,77	5,96	5,72	0,082	0,007
10	6,01	5,86	5,78	5,75	6,00	5,78	0,115	0,013
11	5,9	5,71	5,72	5,68	6,09	5,72	0,090	0,008
12	5,72	5,72	5,63	5,63	5,81	5,82	0,084	0,007
13	5,83	5,62	5,64	5,65	5,88	5,84	0,119	0,014
14	5,88	5,65	5,62	5,65	5,78	5,89	0,123	0,015
15	5,81	5,69	5,63	5,71	5,94	5,71	0,109	0,012
DP	0,296	0,042	0,064	0,119	0,049	0,160	-	-
VAR	0,088	0,002	0,004	0,014	0,002	0,026	-	-

* Média de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

9.3.1.3. Determinação da viscosidade

A viscosidade é um termo comumente conhecido que descreve as propriedades de escoamento de um fluido, ou seja, o atrito das camadas internas dentro do fluido que impõe resistência a fluir (SCHRAMM, 2006).

Nas figuras 20, 21, 22 e na tabela XIV pode ser observado que a viscosidade da emulsão base A permaneceu praticamente sem alterações durante todos os tempos que foi avaliada, A emulsão A 1 apresentou uma perda de viscosidade significativa em todos os tempos e condições em relação à emulsão A, ou seja, o ácido alfa-lipóico pode ter contribuído para a perda significativa de viscosidade da emulsão A 1 devido a presença de carbopol que sofreu uma queda brusca de viscosidade na presença do ácido. A emulsão B 1 apresentou valores de viscosidade ainda mais inferiores em relação a emulsão A e A 1, o que era esperado pois a formulação B 1 apresentou aspecto menos viscoso após ser formulada em relação às outras formulações.

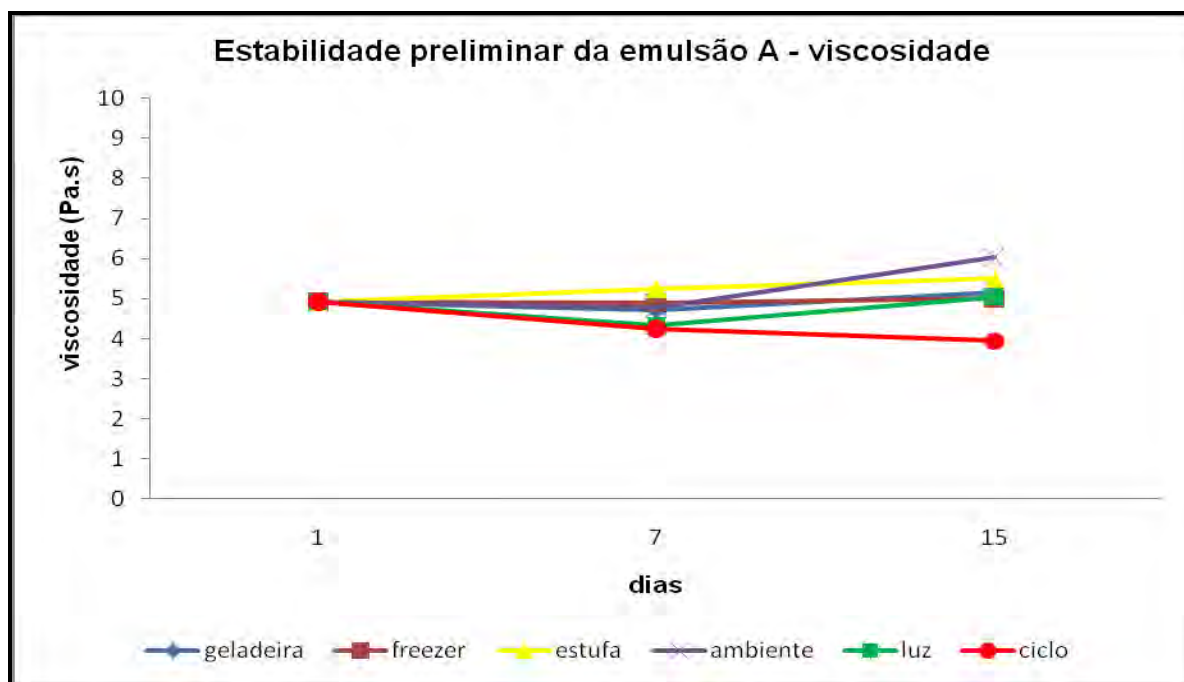


Figura 20. Gráfico das medias dos valores de viscosidade (Pa.s) nas condições em que a emulsão A foi submetida durante a estabilidade preliminar.

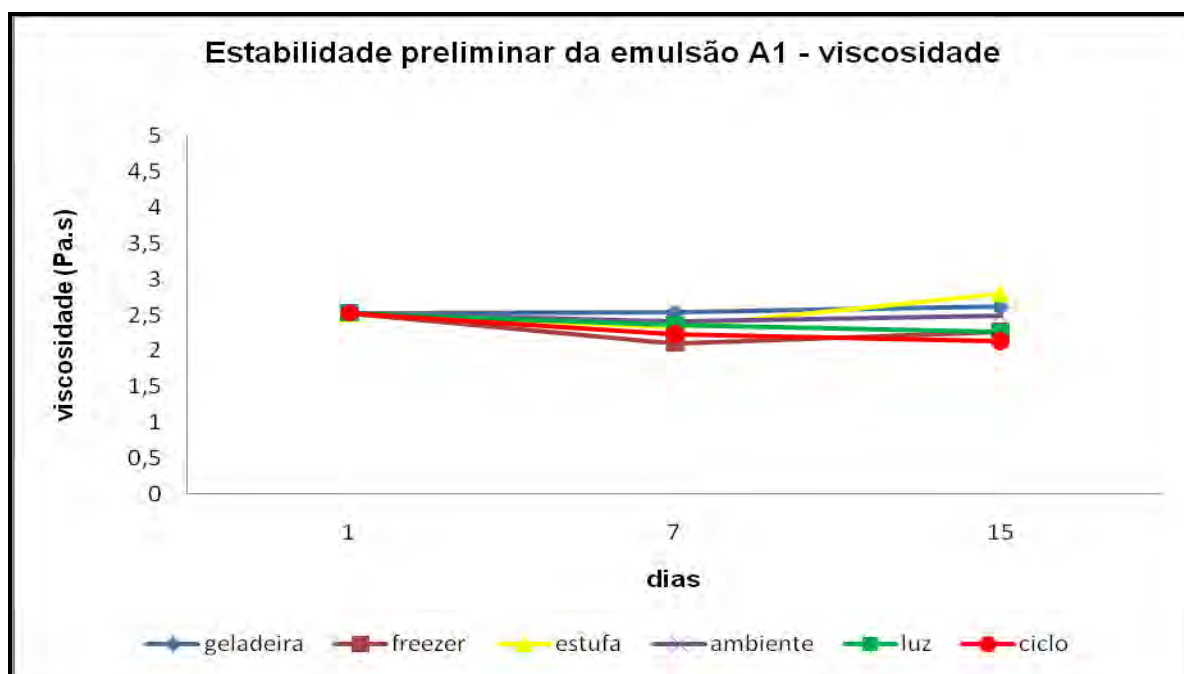


Figura 21. Gráfico das medias dos valores de viscosidade (Pa.s) nas condições em que a emulsão A 1 foi submetida durante a estabilidade preliminar.

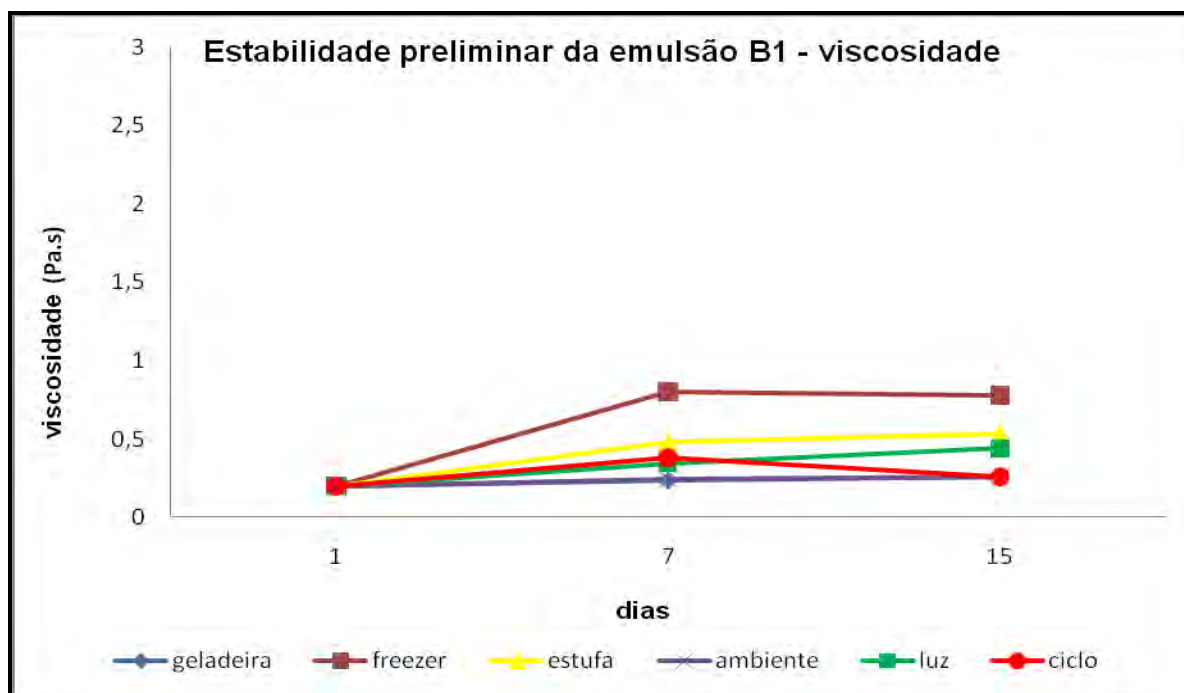


Figura 22. Gráfico das medias dos valores de viscosidade (Pa.s) nas condições em que a emulsão B 1 foi submetida durante a estabilidade preliminar.

Tabela XIV. Valores de viscosidade (Pa.s) das emulsões A, A1 e B1 durante a estabilidade preliminar

emulsão	dias	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	Luz
A	1	4,92	4,92	4,92	4,92	4,92	4,92
	7	4,77	4,25	5,25	4,88	4,71	4,32
	15	4,74	3,95	5,49	4,99	5,15	5,05
A 1	1	2,53	2,53	2,53	2,53	2,53	2,53
	7	2,53	2,11	2,33	2,40	2,36	2,23
	15	2,62	2,27	2,81	2,49	2,26	2,14
B 1	1	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
	7	0,24	0,79	0,48	0,15	0,34	0,38
	15	0,26	0,78	0,53	0,26	0,44	0,26

* Media de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

A viscosidade determinada neste estudo pode ser denominada como viscosidade aparente máxima (figuras 23 a 40), pois os valores de viscosidade apresentados foram obtidos quando a emulsão foi submetida a máxima taxa de cisalhamento (95 ± 5 1/s), ou seja, a maior deformação, com o objetivo de determinar a viscosidade da emulsão próxima ao maior nível de estresse aplicado. Por apresentar comportamento não-Newtoniano, a emulsão analisada apresentou diminuição do valor de viscosidade com o aumento da tensão aplicada.

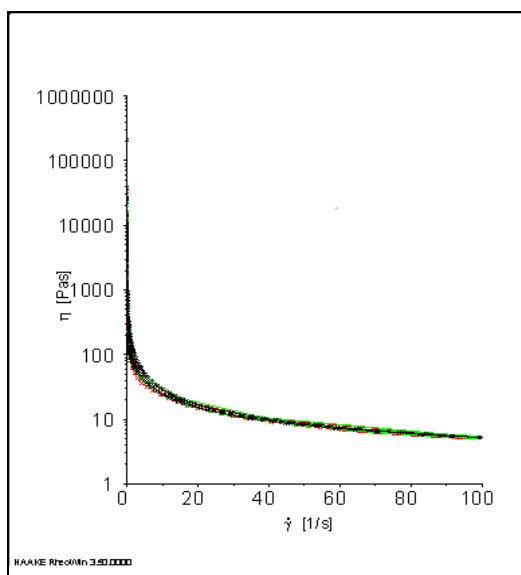


Figura 23. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

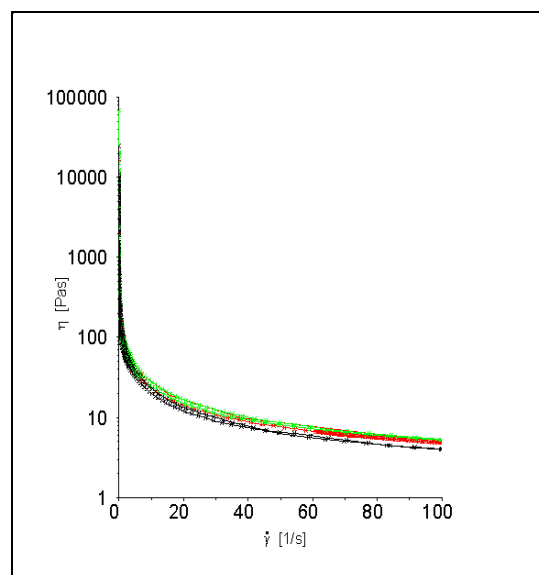


Figura 24. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

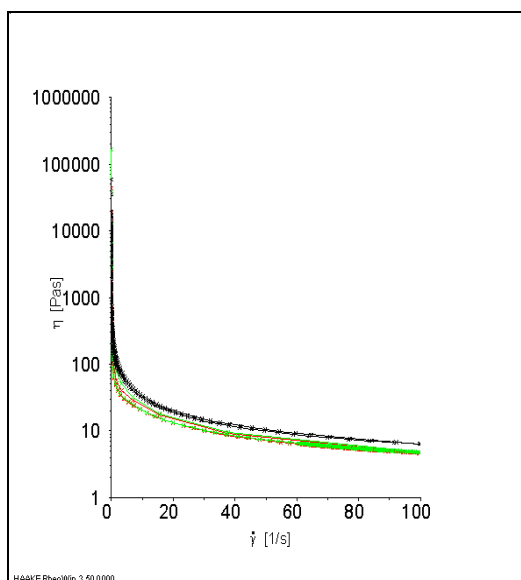


Figura 25. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

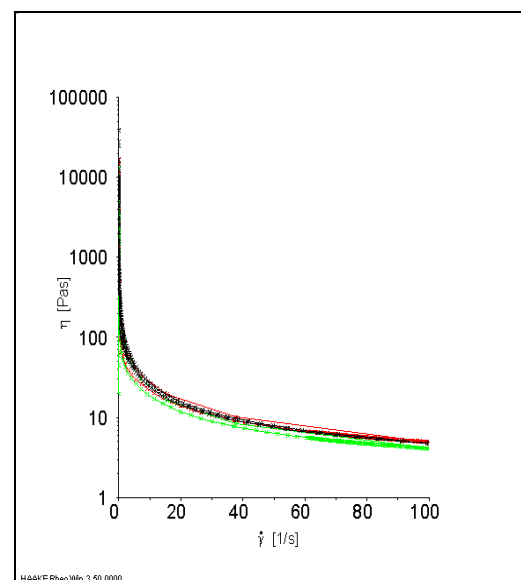


Figura 26. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida ao ciclo nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

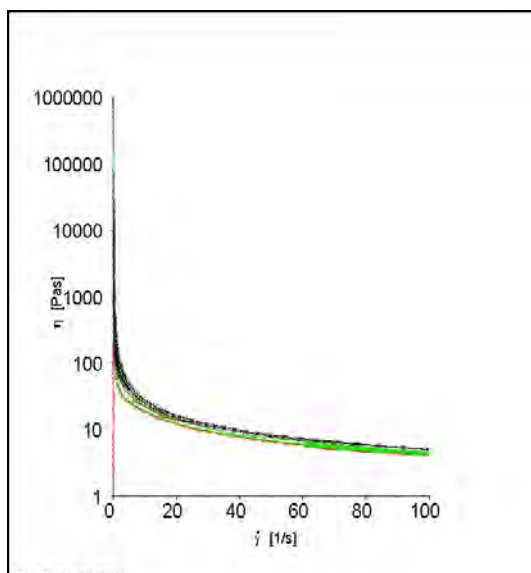


Figura 27. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

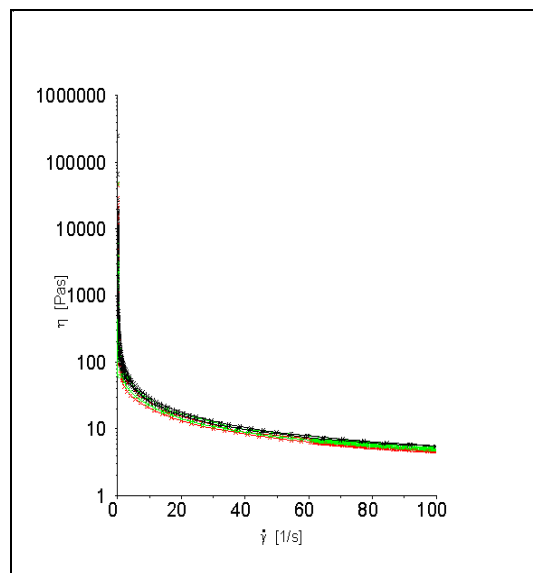


Figura 28. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida à luz indireta nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

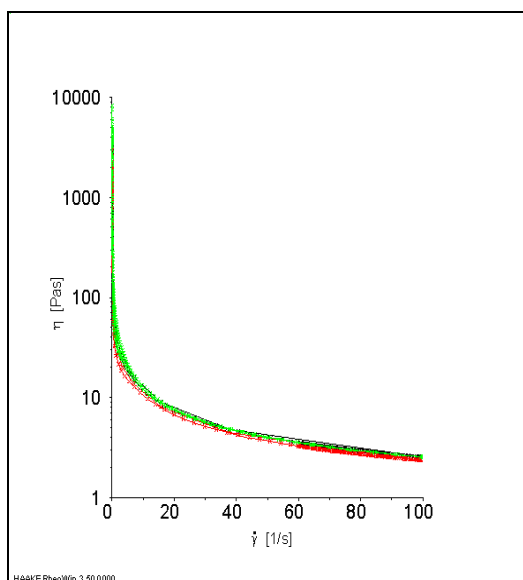


Figura 29. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

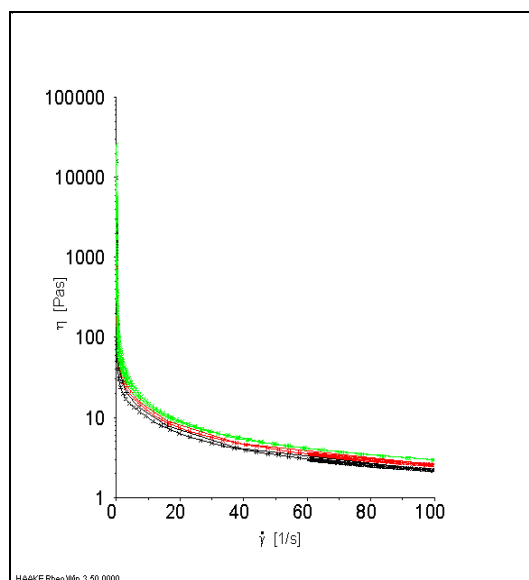


Figura 30. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

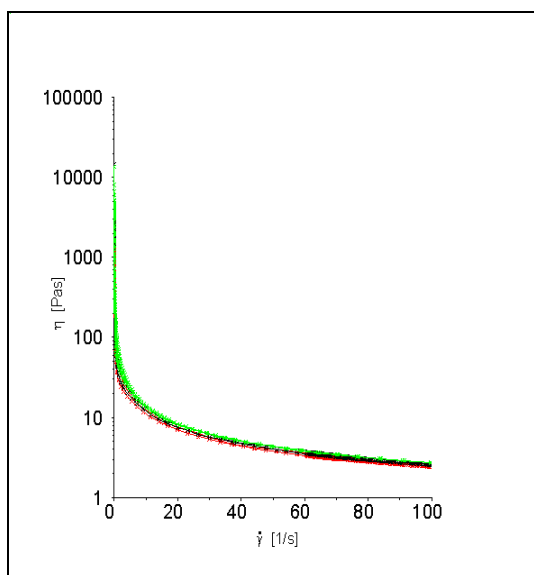


Figura 31. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

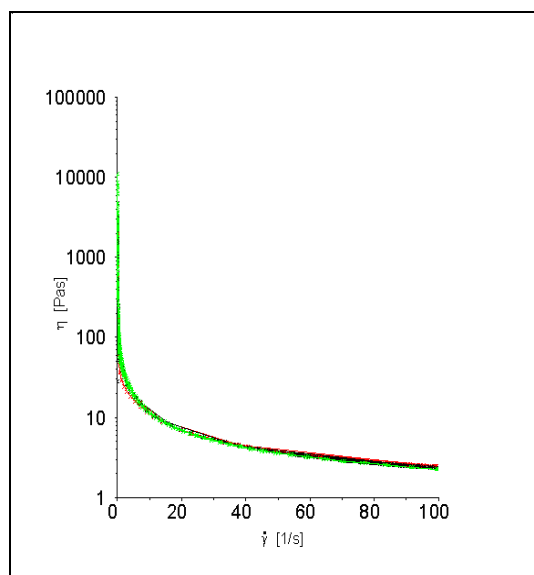


Figura 32. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida ao ciclo nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

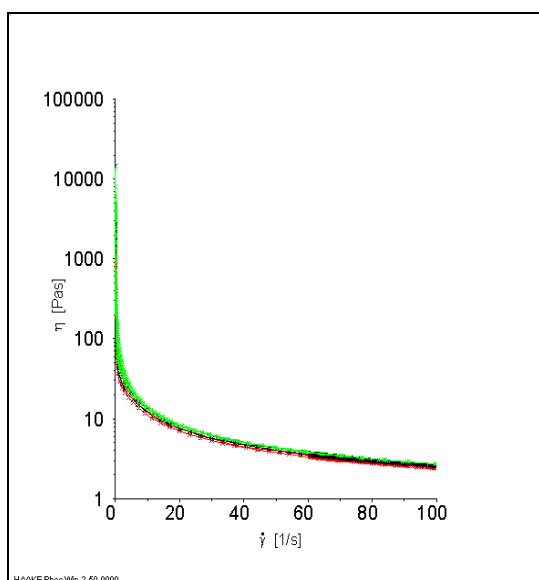


Figura 33. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

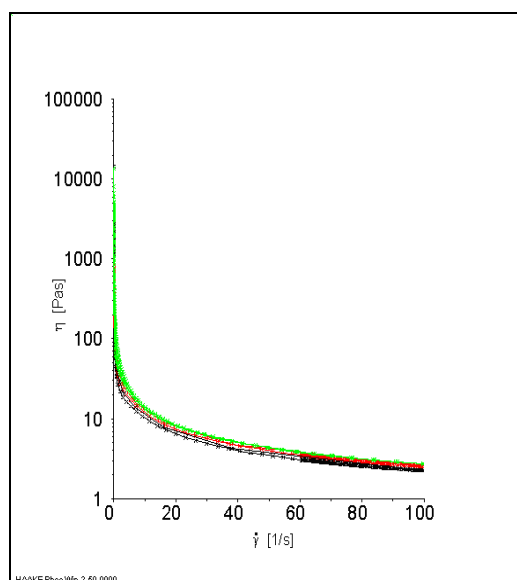


Figura 34. Reograma das viscosidades da formulação **A 1** mantida à luz indireta nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

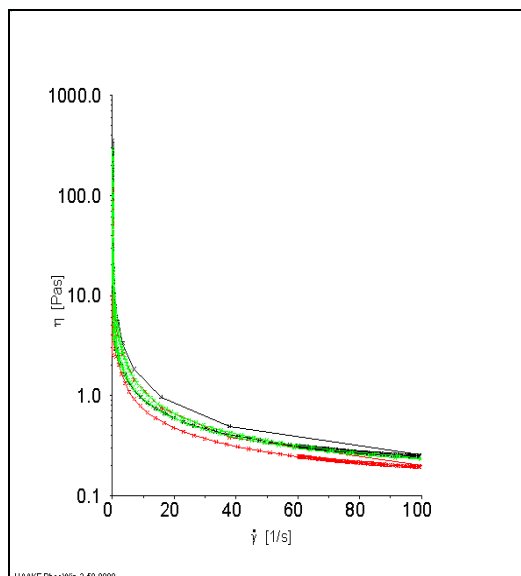


Figura 35. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

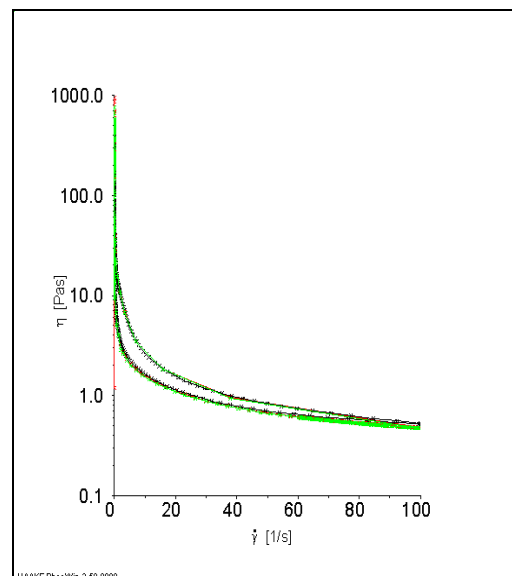


Figura 36. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

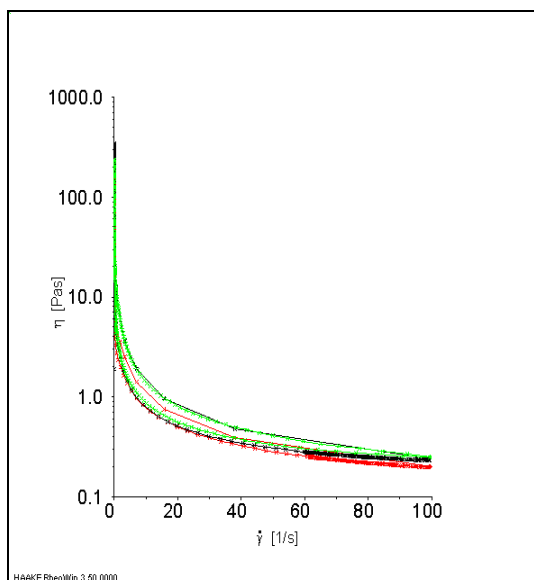


Figura 37. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

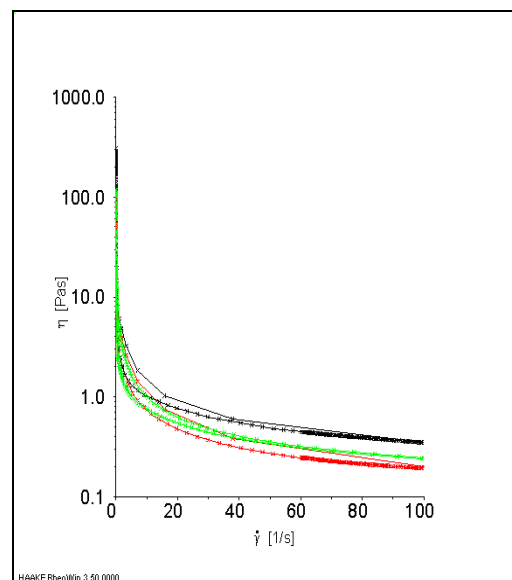


Figura 38. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida ao ciclo nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

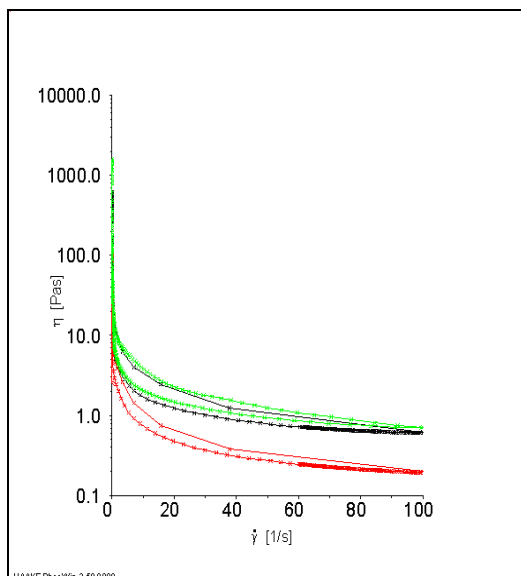


Figura 39. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

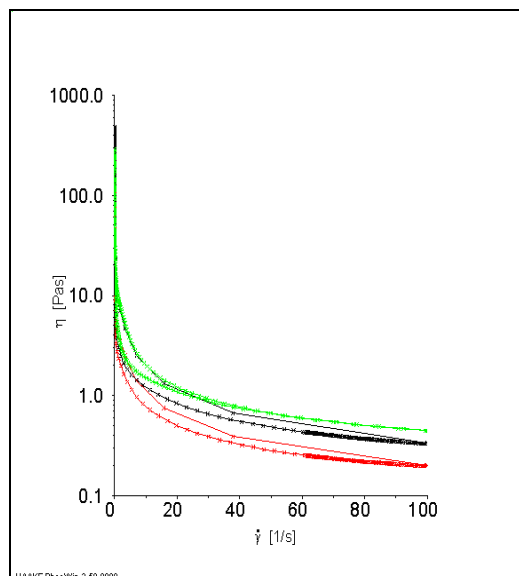


Figura 40. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida à luz indireta nos dias 1 (preto), 7 (vermelho) e 15 (verde)

9.3.2. Teste de estabilidade acelerada das emulsões

O teste de estabilidade acelerada foi realizado após o teste de estabilidade preliminar e indicado para avaliar as características das emulsões durante 90 dias quando submetidas às condições de estresse. Foram avaliados os parâmetros: avaliação macroscópica e determinação dos valores de pH e viscosidade.

9.3.2.1. Avaliação macroscópica

Para este teste foram construídas tabelas com critérios como cor, aspecto e odor que foram avaliados nas emulsões A, A1 e B1 (tabelas XV, XVI e XVII), durante o teste de estabilidade acelerada nas diferentes condições às quais as emulsões foram submetidas.

Neste teste, a emulsão base A permaneceu estável em todos os critérios avaliados, a emulsão A 1 apresentou mudanças em seu aspecto nas condições de ciclo congelamento/descongelamento, estufa e geladeira, no que diz respeito à formação de pequenos grumos dispersos na emulsão. No aspecto odor, sofreu alteração progressiva e intensa em quase todas as condições de estresse durante o período de análise.

A emulsão B 1 permaneceu estável, na maioria dos critérios avaliados, durante a estabilidade acelerada, com exceção do critério aspecto avaliado na condição de estufa onde apresentou ligeira modificação, no que diz respeito a formação de alguns grumos isolados e dispersos na emulsão.

Tabela XV: Avaliação macroscópica da emulsão **A** durante a estabilidade acelerada.

Ambiente			Ciclo			Estufa			Freezer			Geladeira			Luz			
Tempo (dias)	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N – normal / **L** - levemente ou ligeiramente modificado / **M** – modificado / **I** – intensamente modificado

Tabela XVI: Avaliação macroscópica da emulsão A 1 durante a estabilidade acelerada.

Ambiente			Ciclo			Estufa			Freezer			Geladeira			Luz		
asp. cor odor			asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor
Tempo (dias)	01	N	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	L
	07	N	N	N	L	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	M
	15	N	N	N	M	N	N	I	N	N	N	N	N	L	N	N	M
	30	N	N	N	I	L	N	I	N	N	N	L	N	L	N	N	I
	45	N	N	N	I	L	N	I	N	N	N	L	N	M	N	N	I
	60	N	N	N	I	L	N	I	N	N	N	L	N	M	N	N	I
	90	N	N	N	I	L	N	I	N	N	N	L	N	M	N	N	I

N – normal / L- levemente ou ligeiramente modificado / M – modificado / I – intensamente modificado

Tabela XVII: Avaliação macroscópica da emulsão **B 1** durante a estabilidade acelerada.

Ambiente				Ciclo			Estufa			Freezer			Geladeira			Luz		
Tempo (dias)	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor	asp.	cor	odor
	01	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	07	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	30	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	45	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L
	60	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L
	90	N	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L

N – normal / **L**- levemente ou ligeiramente modificado / **M** – modificado / **I** – intensamente modificado

9.3.2.2. Determinação do valor de pH

As figuras 41, 42 e 43 apresentam os gráficos construídos com os valores de pH das formulações A, A1 e B 1 durante o período da estabilidade acelerada. A estabilidade pode ser confirmada nas Tabelas XVIII, XIX e XX que mostra os valores dos desvios padrão e variância das medias dos valores de pH.

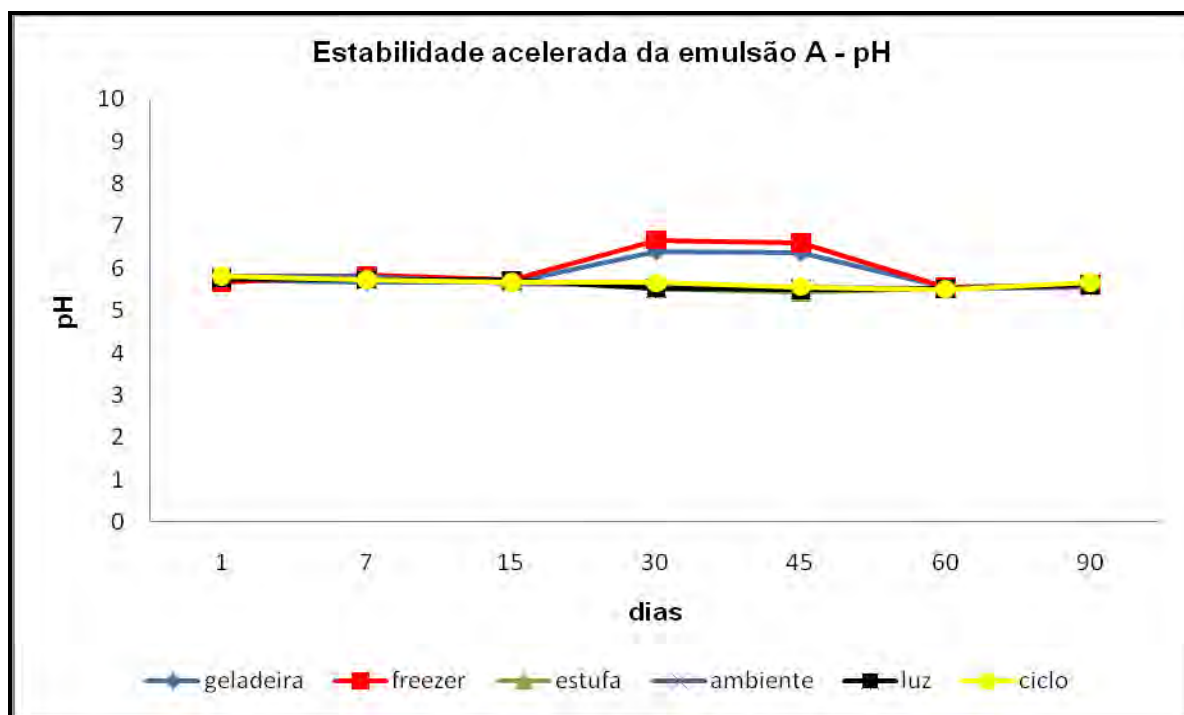


Figura 41: Gráfico das médias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A foi submetida durante a estabilidade acelerada.

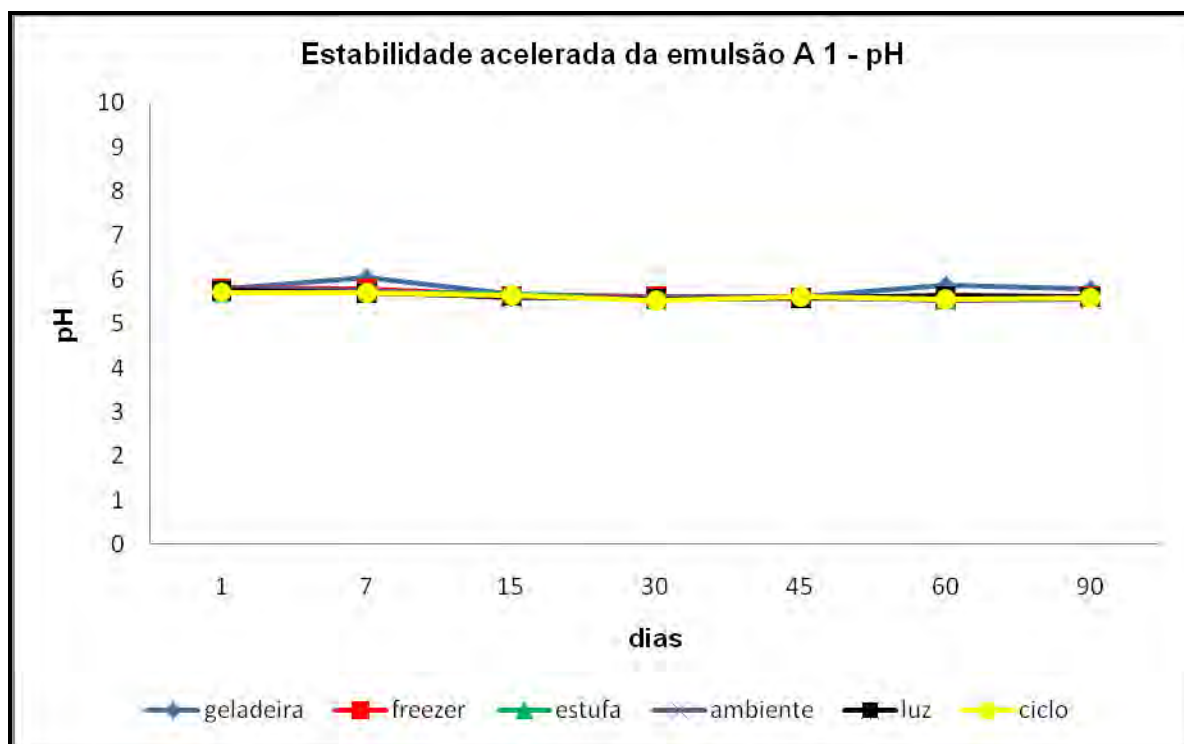


Figura 42: Gráfico das médias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão A 1 foi submetida durante a estabilidade acelerada

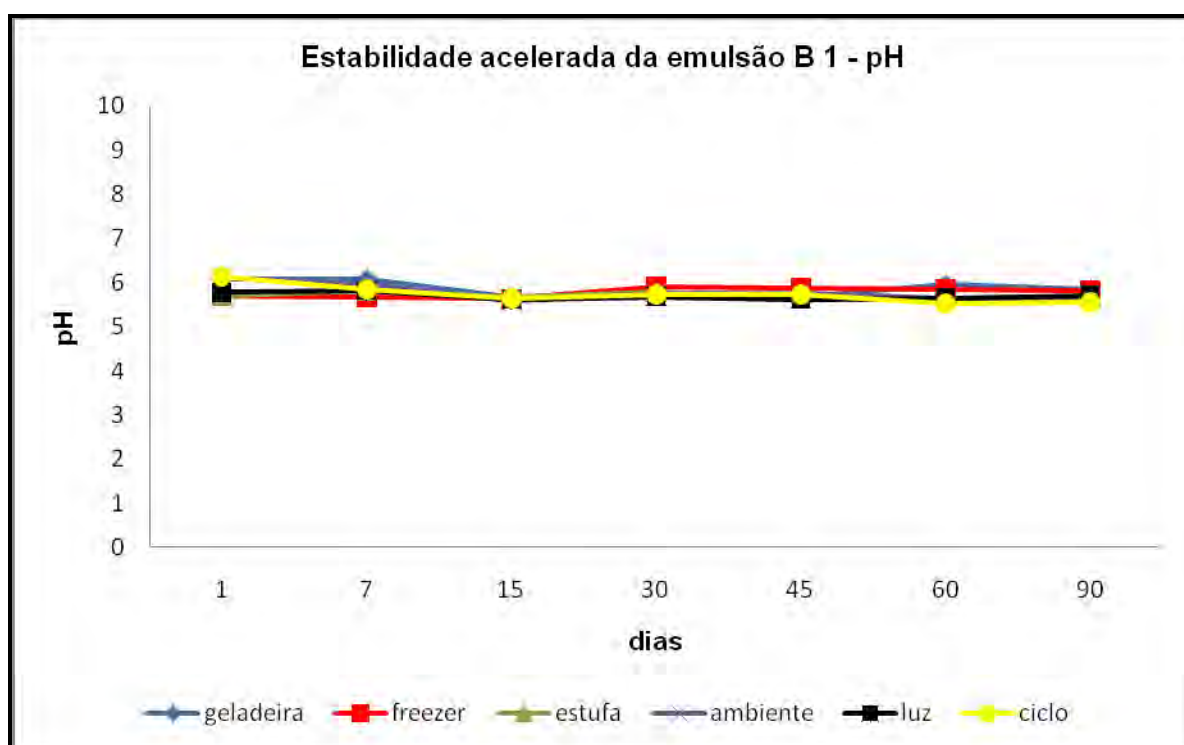


Figura 43: Gráfico das médias dos valores de pH nas condições de estresse em que a emulsão B 1 foi submetida durante a estabilidade acelerada

Tabela XVIII. Valores de pH da emulsão **A**, durante a estabilidade acelerada

Dia	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz	DP	VAR
1	5,8	5,81	5,79	5,68	5,72	5,75	0,053	0,003
7	5,81	5,72	5,76	5,84	5,68	5,73	0,058	0,006
15	5,65	5,67	5,71	5,71	5,67	5,71	0,027	0,004
30	5,62	5,66	5,54	6,67	6,4	5,53	0,498	0,248
45	5,54	5,57	5,44	6,60	6,38	5,49	0,513	0,263
60	5,51	5,52	5,53	5,56	5,53	5,52	0,022	0,001
90	5,55	5,67	5,63	5,63	5,58	5,61	0,042	0,002
DP	0,123	0,098	0,132	0,473	0,369	0,111	-	-
VAR	0,015	0,009	0,017	0,224	0,136	0,012	-	-

* Media de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

Tabela XIX. Valores de pH da emulsão **A 1**, durante a estabilidade acelerada

Dia	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz	DP	VAR
1	5,82	5,71	5,71	5,80	5,80	5,75	0,049	0,002
7	5,75	5,71	5,73	5,79	6,04	5,69	0,129	0,017
15	5,58	5,65	5,68	5,63	5,66	5,61	0,035	0,002
30	5,62	5,53	5,55	5,63	5,62	5,57	0,042	0,002
45	5,58	5,61	5,58	5,58	5,61	5,58	0,014	0,001
60	5,63	5,56	5,54	5,56	5,87	5,63	0,130	0,017
90	5,61	5,59	5,62	5,61	5,78	5,61	0,082	0,007
DP	0,064	0,070	0,075	0,099	0,154	0,064	-	-
VAR	0,004	0,005	0,006	0,009	0,024	0,004	-	-

* Media de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

Tabela XX. Valores de pH da emulsão **B 1**, durante a estabilidade acelerada

Dia	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz	DP	VAR
1	6,1	6,13	5,71	5,69	6,09	5,78	0,209	0,044
7	5,96	5,84	5,81	5,66	6,09	5,82	0,146	0,021
15	5,81	5,69	5,63	5,71	5,94	5,71	0,109	0,012
30	5,77	5,73	5,79	5,91	5,77	5,68	0,076	0,006
45	5,76	5,73	5,65	5,88	5,68	5,63	0,090	0,008
60	5,65	5,53	5,65	5,86	5,97	5,65	0,162	0,026
90	5,66	5,55	5,64	5,83	5,86	5,71	0,117	0,014
DP	0,162	0,201	0,075	0,099	0,153	0,067	-	-
VAR	0,026	0,040	0,006	0,009	0,024	0,004	-	-

* Média de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

No período de estudo da estabilidade acelerada, as formulações A, A 1 e B 1 apresentaram valor médio de pH compatível ao pH cutâneo (5,5 – 6,5). Todas as condições apresentaram coeficiente de variação menor que 10% nas médias dos valores de pH medidos, ou seja, uma variação não significativa, mostrando a estabilidade da emulsão quanto a este fator intrínseco avaliado (BRASIL, 2004).

9.3.2.3. Determinação da viscosidade

Nas figuras 44, 45 e 46 e na tabela XXI pode ser observado que a viscosidade da emulsão base A permaneceu praticamente sem alterações durante todos os tempos de análise, A emulsão A 1 apresentou uma perda de viscosidade significativa em todos os tempos e condições em relação a emulsão A, mas em relação a ela mesma não apresentou variações significativas nos valores de viscosidade medidos no período da estabilidade acelerada ou seja o ácido alfa-lipóico pode ter contribuído para a perda significativa de viscosidade da emulsão A 1, mas a dispersão a 2% do polímero Carbopol utilizado na emulsão fez com que a mesma permanecesse sem alterações significativas nos valores de viscosidade, o que confirma a afirmativa de CORRÊA 2010, de que o Carbopol auxilia na estabilização de sistemas emulsionados.

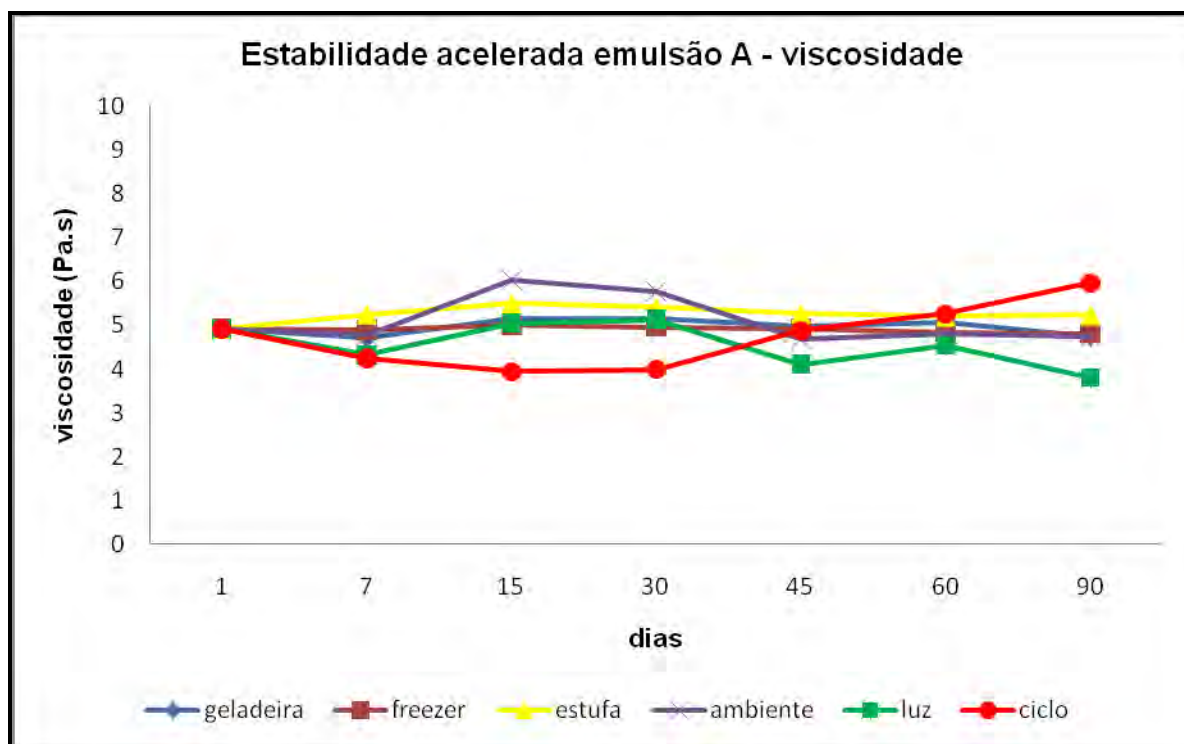


Figura 44. Gráfico das médias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão A foi submetida durante a estabilidade acelerada.

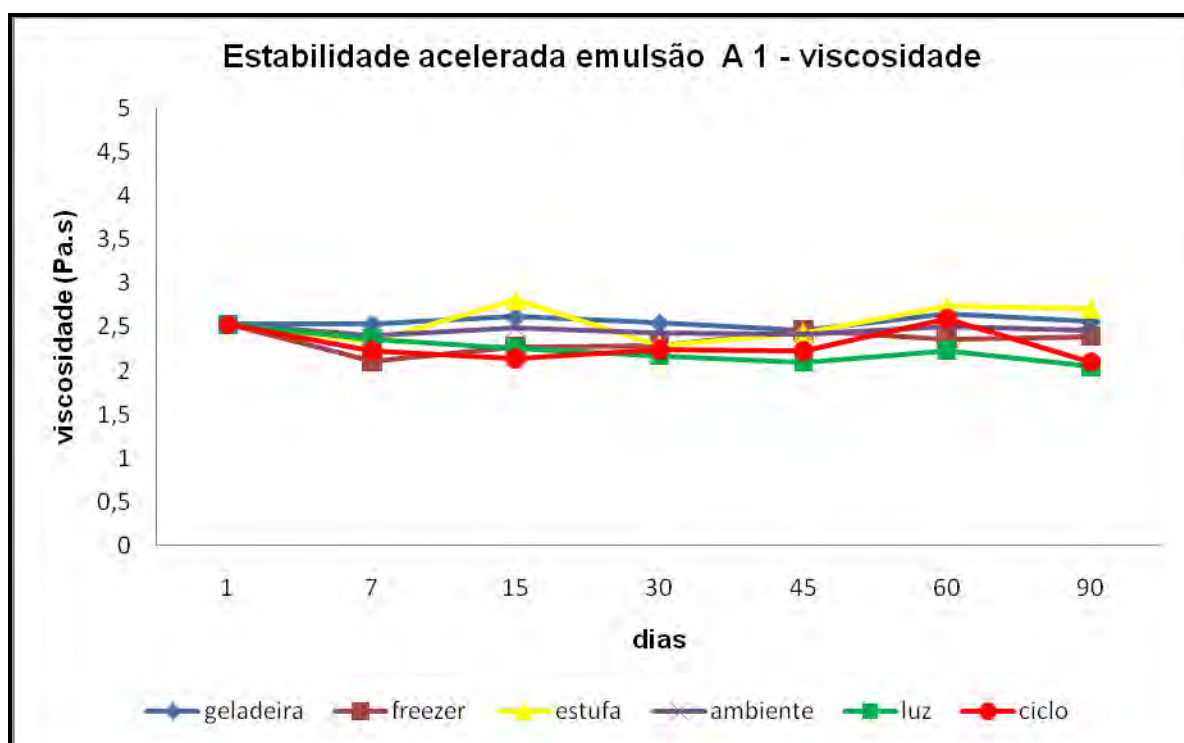


Figura 45. Gráfico das médias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão A 1 foi submetida durante a estabilidade acelerada.

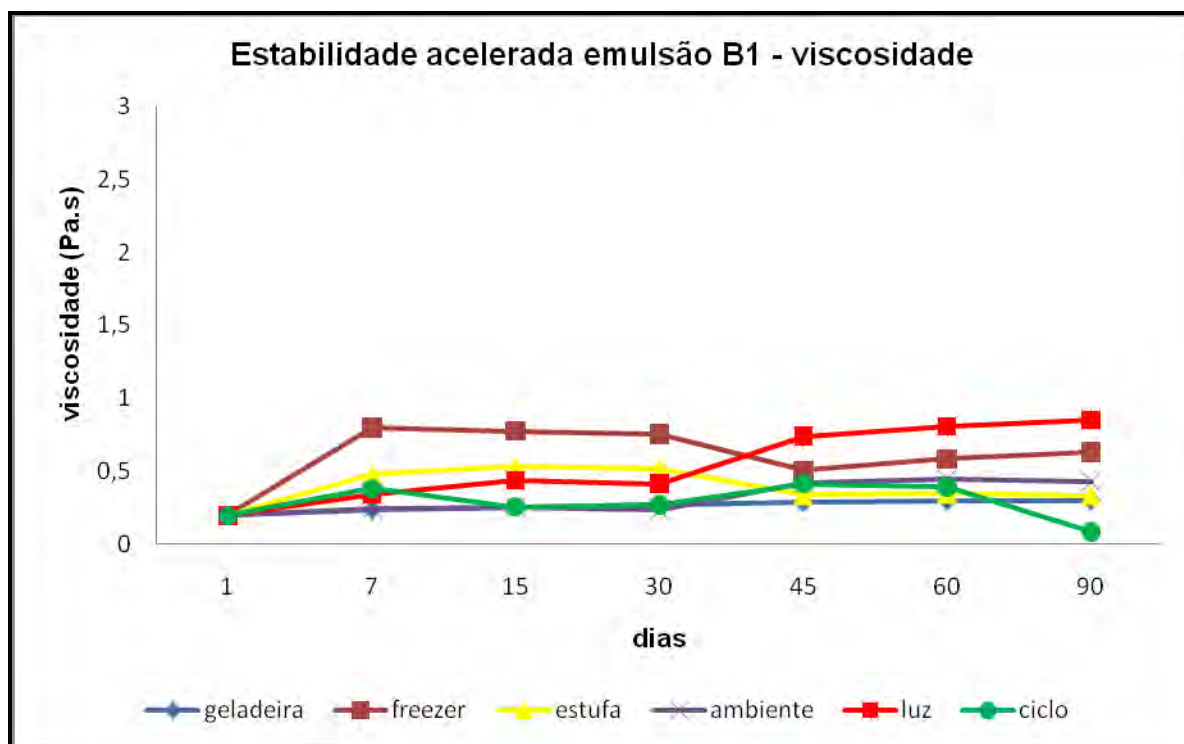


Figura 46. Gráfico das médias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão B 1 foi submetida durante a estabilidade acelerada.

Tabela XXI. Valores de viscosidade (Pa.s) da emulsão A, A 1 e B 1 durante a estabilidade acelerada

emulsão	dias	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	Luz
A	1	4,92	4,92	4,92	4,92	4,92	4,92
	7	4,77	4,25	5,25	4,88	4,71	4,32
	15	4,74	3,95	5,49	4,99	5,15	5,05
	30	4,77	4,99	5,41	5,15	5,15	5,14
	45	4,67	4,88	5,26	4,92	4,97	4,91
	60	5,03	5,03	5,23	4,85	5,1	4,54
	90	5,01	5,01	5,23	4,81	4,94	3,81
A 1	1	2,53	2,53	2,53	2,53	2,53	2,53
	7	2,53	2,11	2,33	2,40	2,36	2,23
	15	2,62	2,27	2,81	2,49	2,26	2,14
	30	2,43	2,24	2,29	2,29	2,54	2,17
	45	2,42	2,23	3,58	2,46	2,46	2,1
	60	2,49	2,59	2,73	2,36	2,65	2,23
	90	2,46	3,05	2,71	2,39	2,56	2,04
B 1	1	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
	7	0,24	0,79	0,48	0,15	0,34	0,38
	15	0,26	0,78	0,53	0,26	0,44	0,26
	30	0,27	0,27	0,51	0,76	0,27	0,42
	45	0,29	0,42	0,34	0,51	0,29	0,74
	60	0,3	0,39	0,35	0,3	0,3	0,81
	90	0,30	0,08	0,34	0,30	0,30	0,85

* Média de três leituras.

A viscosidade determinada neste estudo pode ser denominada como viscosidade aparente máxima (figuras 47 a 64), pois os valores de viscosidade apresentados foram obtidos quando a emulsão foi submetida a máxima taxa de cisalhamento (95 ± 5 1/s), ou seja, a maior deformação, com o objetivo de determinar a viscosidade da emulsão próxima ao maior nível de estresse aplicado. Por apresentar comportamento não-Newtoniano, a emulsão analisada apresentou diminuição do valor de viscosidade com o aumento da tensão aplicada.

Diferentes trabalhos têm demonstrado a preferência pelos polímeros como alternativa para a melhor estabilização dos sistemas emulsionados, devido à sua conformação, mecanismos de estabilização, boa compatibilidade com a pele, e também, pela baixa concentração de uso (EXEROWA, et al., 2007; TADROS, 2006; SIMOVIC et al., 1999) Em um trabalho desenvolvido por LIMA et al., (2008) o Carbopol foi utilizado na composição de

emulsões do tipo O/A auxiliando na estabilização dos sistemas emulsionados. Outros polímeros também exercem o mesmo papel do Carbopol na estabilização de sistemas emulsionados, como por exemplo o Pemulen TR1[®], um polímero do ácido acrílico modificado (C10-C30) por cadeias longas de alquil acrilato, e o mecanismo de estabilização da emulsão por essa classe é chamado de estabilização eletroestérica (HEMKER, 1990; LOCHEAD et al., 1986).

Na presença da fase oleosa, as cadeias hidrofóbicas alquil migram para a superfície das partículas de óleo, formando interações hidrofóbicas (SIMOVIC et al., 1999). Ao mesmo tempo, a longa cadeia hidrofílica, hidratada e carregada negativamente, forma uma rede de microgéis ao redor das partículas de óleo dispersas, prevenindo a coalescência (BEMECKER et al., 1992). Outra vantagem desse polímero é a possibilidade de ser disperso, tanto na fase oleosa (método indireto), quanto na fase aquosa (método direto) das emulsões (PEMULEN, 1999).

A emulsão B 1 apresentou valores de viscosidade mais inferiores em relação à emulsão A e A 1 durante todo o período da estabilidade acelerada, sendo a formulação que sofreu maiores variações nos valores de viscosidade. Isso pode ser justificado principalmente pela ausência de um polímero que poderia garantir uma maior estabilidade à emulsão B 1.

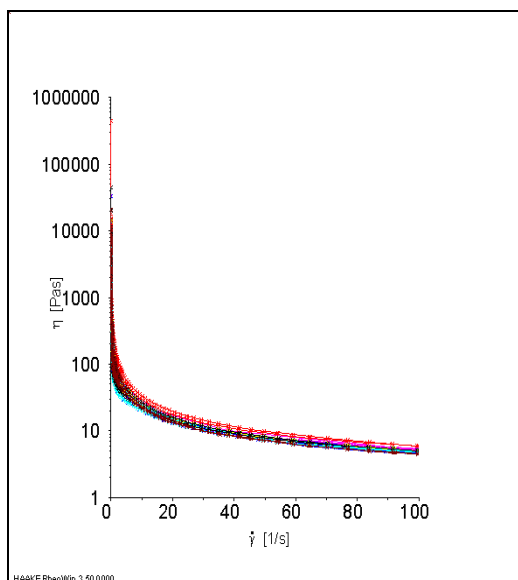


Figura 47. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

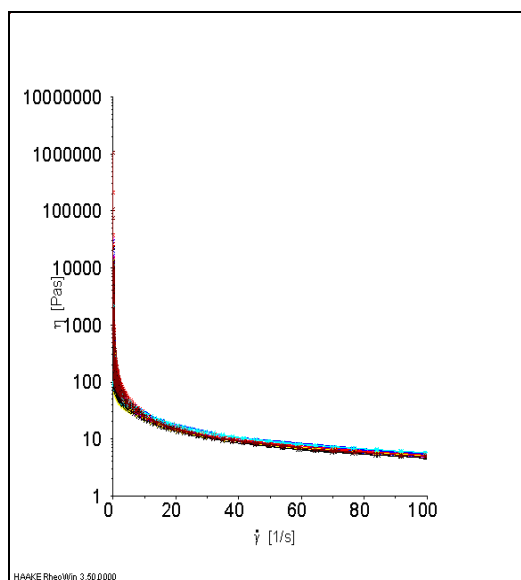


Figura 48. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

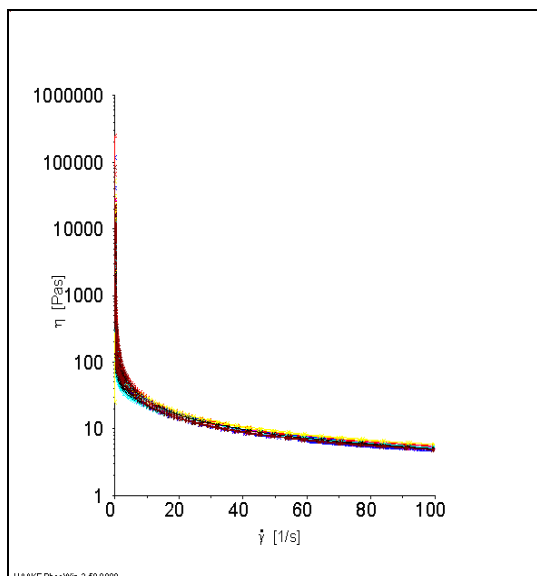


Figura 49. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

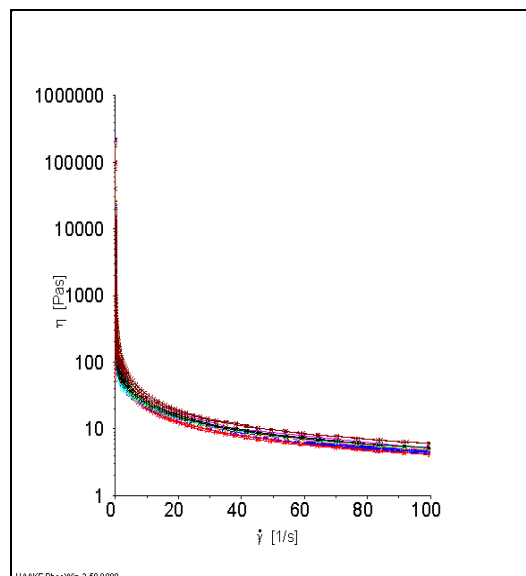


Figura 50. Reograma da viscosidade da formulação **A** mantida ao ciclo nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

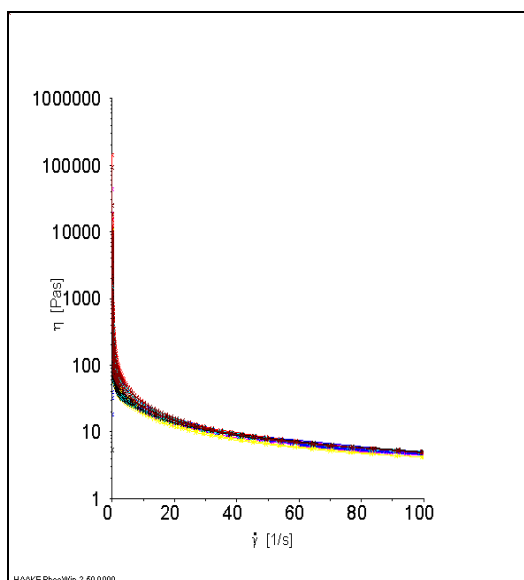


Figura 51. Reograma da viscosidade da Formulação **A** mantida a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

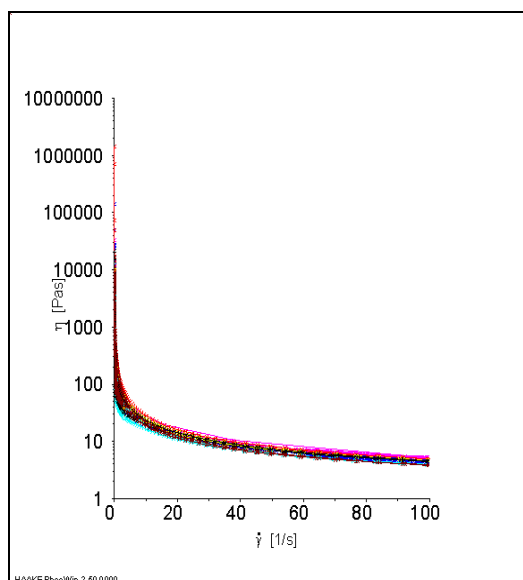


Figura 52. Reograma da viscosidade da Formulação **A** mantida a luz nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

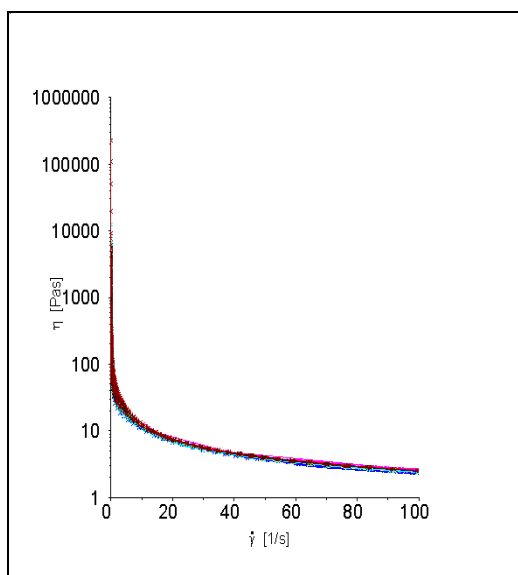


Figura 53. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

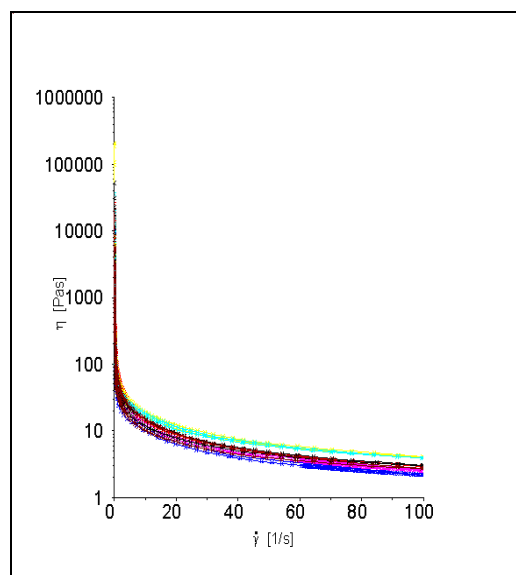


Figura 54. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

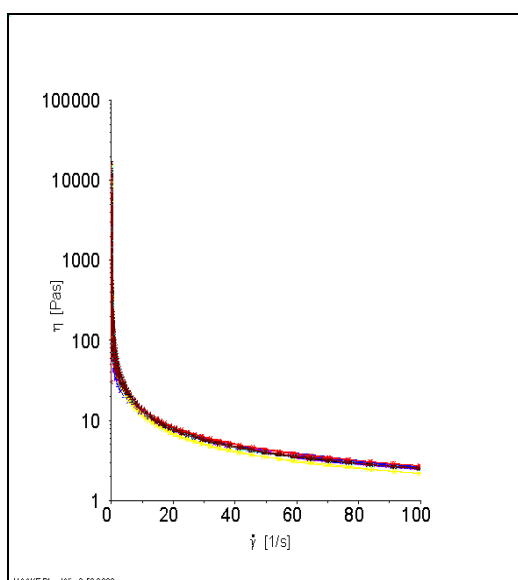


Figura 55. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

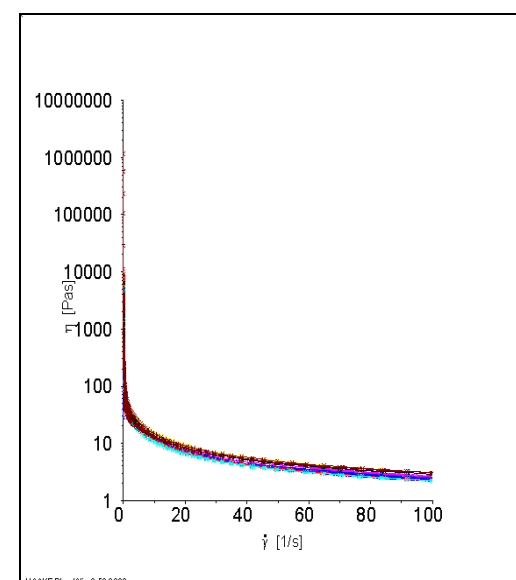


Figura 56. Reograma da viscosidade da formulação **A 1** mantida ao ciclo nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

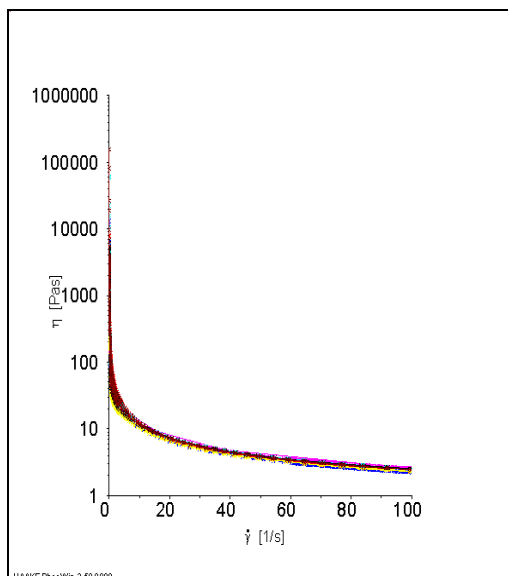


Figura 57. Reograma da viscosidade da Formulação **A 1** mantida a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

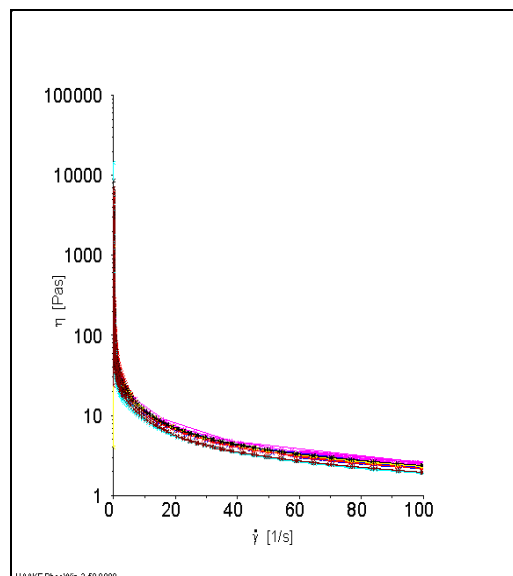


Figura 58. Reograma da viscosidade da Formulação **A 1** mantida a luz nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

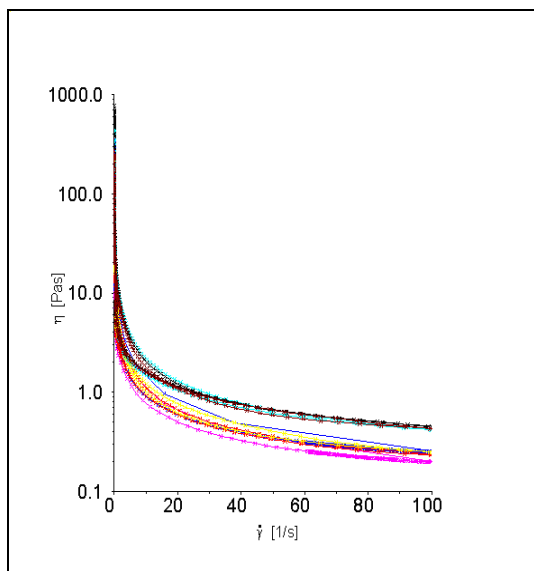


Figura 59. Reograma da viscosidade da Formulação **B 1** mantida a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

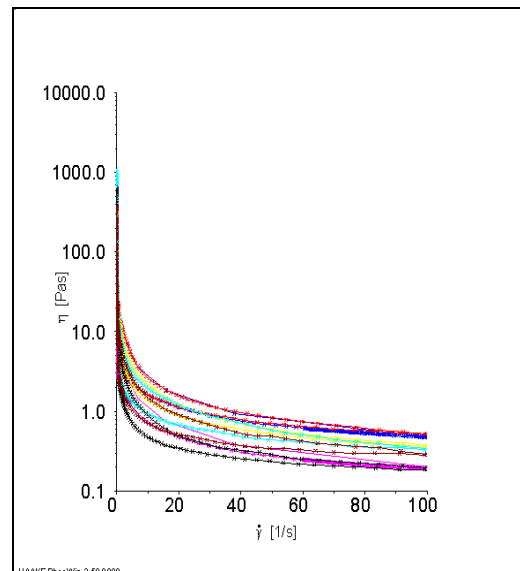


Figura 60. Reograma da viscosidade da Formulação **B 1** mantida a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

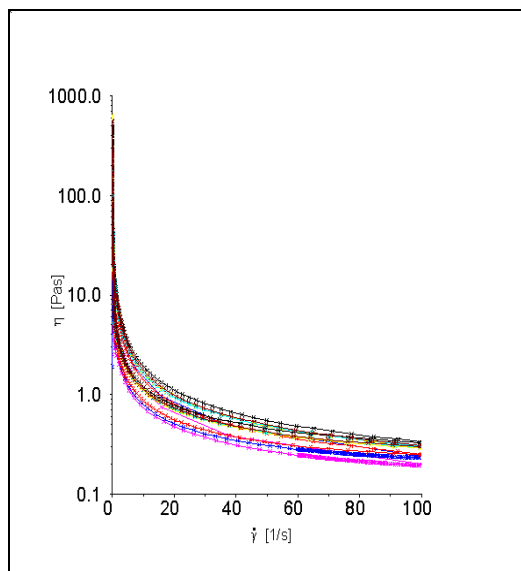


Figura 61. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

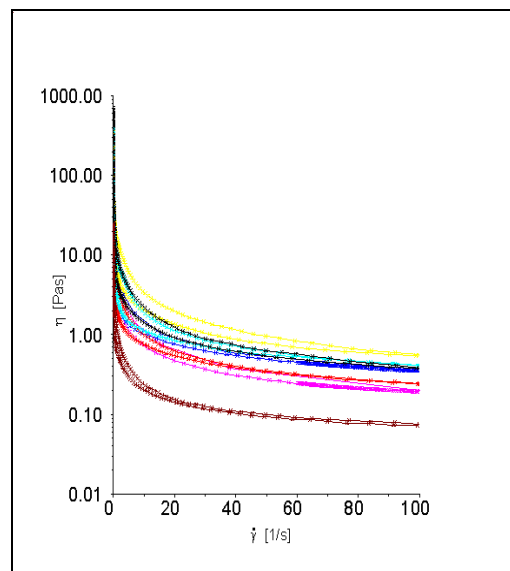


Figura 62. Reograma da viscosidade da formulação **B 1** mantida ao ciclo nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

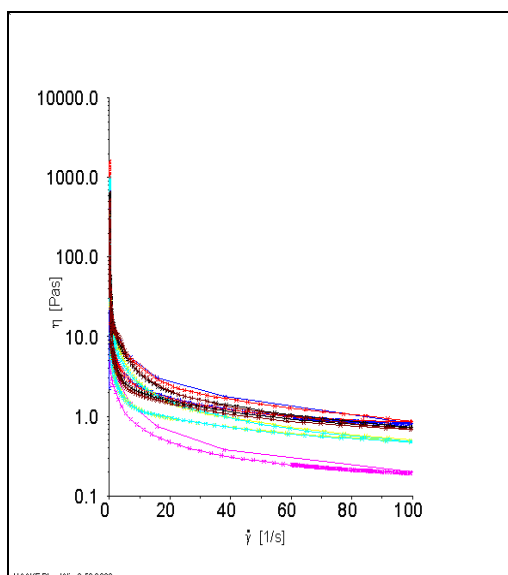


Figura 63. Reograma da viscosidade da Formulação **B 1** mantida a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

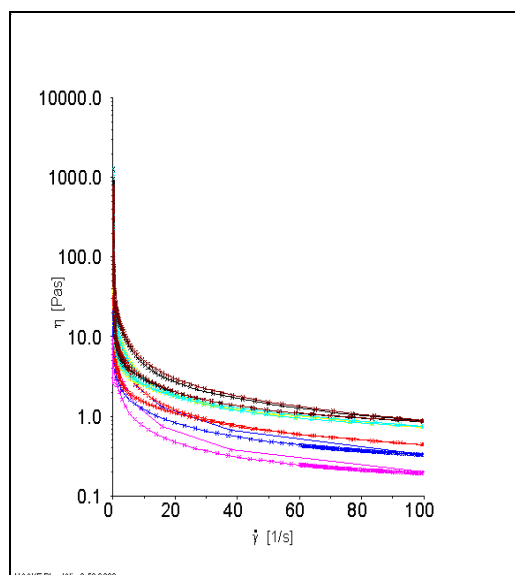


Figura 64. Reograma das viscosidades da Formulação **B 1** mantida a luz nos dias 1 (rosa), 7 (azul), 15 (vermelho), 30 (amarelo), 45 (azul claro), 60 (preto) e 90 (marrom)

9.3.2.4. Doseamento do ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão A 1 e B 1 por espectrofotometria

O doseamento do ácido alfa-lipóico nas emulsões A 1 e B 1 foi realizado com o objetivo de avaliar a estabilidade do produto final, ou seja, quantificar sua concentração na formulação

por espectrofotometria, nos dias 1, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de análise quando submetido às condições de estresse. Foi observado que, quando submetido à luz indireta, estufa ($45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ao ciclo de congelamento/descongelamento, a concentração de ácido alfa-lipóico tanto da emulsão A 1 quanto B 1 diminuiu significativamente, com variação maior que 10% após o 15º dia de análise (Figuras 65 e 66). A concentração ácido alfa-lipóico incorporado às emulsões foi calculada utilizando a Equação V obtida através da curva analítica do material de referência do ácido apresentada no item 4.2. do Capítulo 1 deste trabalho.

Equação V: $y = -0,01283 + 0,69284x$

Com os resultados obtidos neste ensaio (tabelas XXII e XXIII) foi possível afirmar que o ácido alfa-lipóico foi degradado em um curto prazo de tempo em condições de temperatura elevada (45°C) e luz indireta. Portanto, para que o cosmético tenha uma vida útil maior é recomendado o acondicionamento em local apropriado na ausência de luz, calor e variações bruscas de temperatura.

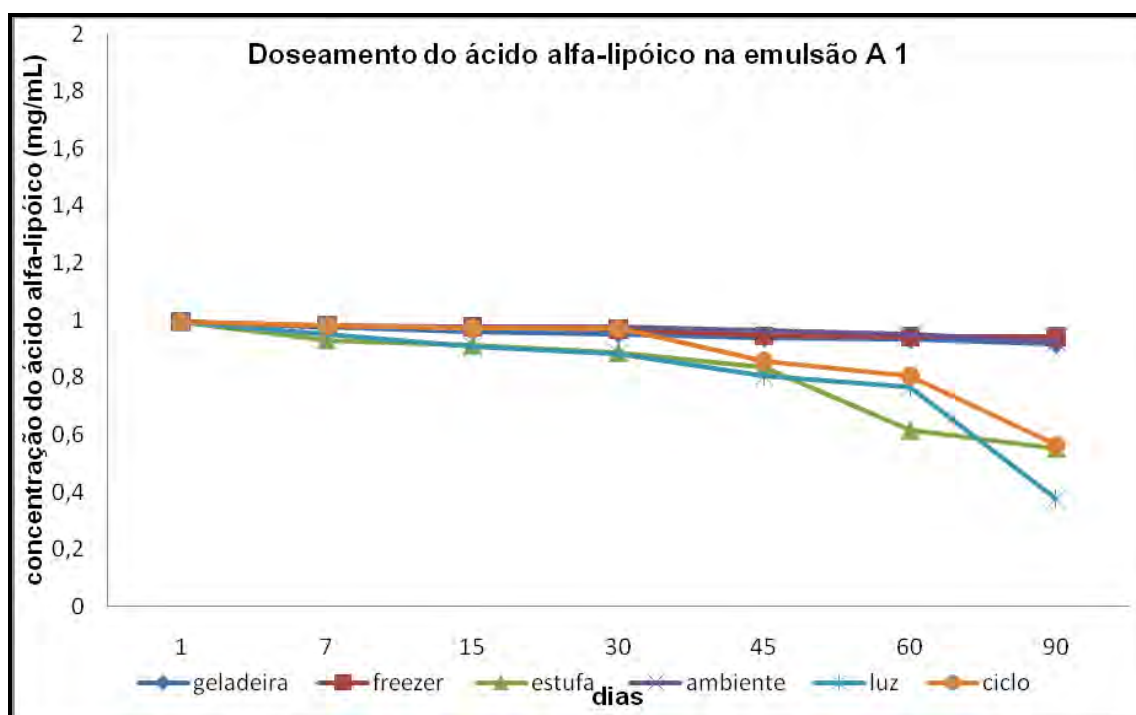


Figura 65. Gráfico do doseamento do ácido alfa-lipóico na emulsão A 1 realizado pelo período de 90 dias de análise

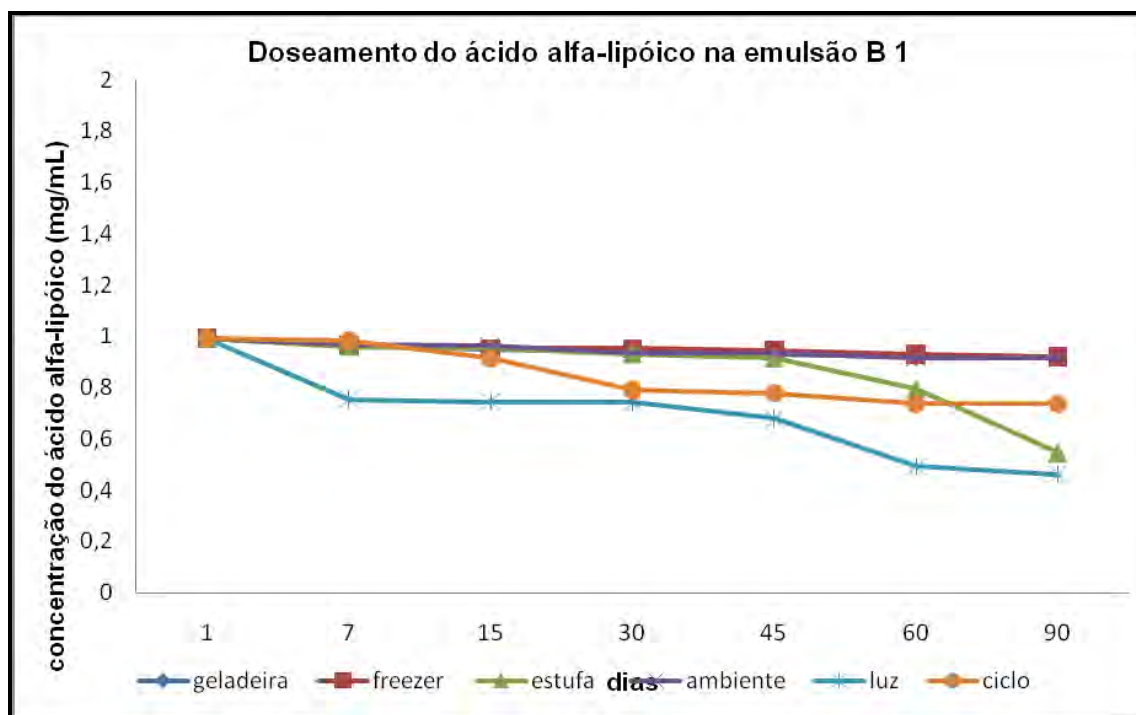


Figura 66. Gráfico do doseamento do ácido alfa-lipóico na emulsão B 1 realizado pelo período de 90 dias de análise

Tabela XXII. Concentração do ácido alfa-lipóico na emulsão A 1 realizado pelo período de 90 dias quando submetida às condições de análise.

dias	Concentração do ácido alfa-lipóico na emulsão A 1 em (mg/mL)					
	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz
1	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
7	0,97	0,98	0,96	0,96	0,96	0,75
15	0,96	0,91	0,95	0,95	0,95	0,74
30	0,94	0,78	0,93	0,95	0,93	0,74
45	0,93	0,77	0,91	0,94	0,93	0,67
60	0,91	0,74	0,79	0,91	0,91	0,49
90	0,92	0,73	0,54	0,92	0,91	0,46

* Media de três leituras.

Tabela XXIII. Concentração do ácido alfa-lipóico na emulsão B 1 realizado pelo período de 90 dias quando submetido as condições de análise.

dias	Concentração do ácido alfa-lipóico na emulsão B 1 em (mg/mL)					
	ambiente	ciclo	estufa	freezer	geladeira	luz
1	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
7	0,98	0,97	0,93	0,98	0,97	0,95
15	0,97	0,97	0,91	0,97	0,96	0,91
30	0,97	0,97	0,88	0,96	0,95	0,88
45	0,96	0,85	0,83	0,94	0,93	0,80
60	0,94	0,80	0,61	0,94	0,93	0,76
90	0,92	0,56	0,55	0,93	0,91	0,37

* Media de três leituras.

9.4. Determinação do comportamento reológico

9.4.1. Curva de fluxo

A importância das análises reológicas foi baseada na capacidade de avaliar a estabilidade físico química da emulsão provendo dados pertinentes à estrutura do produto e de acompanhar as modificações decorrentes dos processos de instabilidade (TADROS, 2004).

Mudanças nas propriedades reológicas de cremes representam importantes alertas precoces de instabilidade do produto (KORHONEN, 2001). O objetivo deste estudo foi examinar a influência do tempo e as condições de armazenamento sobre as propriedades reológicas de uma emulsão cosmética.

Foi possível observar através do teste de curva de fluxo, representado nas Figuras 67 a 69 que as emulsões apresentaram característica não-Newtonianas, ou seja, as amostras sofreram deformação quando submetidas à tensão de cisalhamento, não apresentando, portanto, viscosidade constante. Essa característica, ou seja, a não proporcionalidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento é típica de um comportamento não-Newtoniano (SCHRAMM, 2006). As emulsões A 1 e B 1 foram caracterizadas como tixotrópicas, pois apresentaram diminuição da viscosidade com o cisalhamento e valor da área de histerese evidenciado na tabela XXIV.

As propriedades de fluxo influenciam cada etapa do processo de desenvolvimento, tais como mistura, envase e retirada do produto da embalagem, além de definir o seu comportamento *in vivo* (sensorial) (LEE, 2009).

A mudança tempo-dependente na viscosidade permite que as formulações exibam flexibilidade reológica, a qual subsequentemente afeta o perfil de liberação de drogas, por exemplo, em formulações farmacêuticas. Portanto, é essencial delinear as propriedades de

fluxo e seus fatores de influência na eficácia de formulações tixotrópicas, especialmente emulsões, colóides e géis (LEE, 2009).

O comportamento tempo-dependente é devido à ruptura de fortes interações formadas durante prolongado repouso entre as partículas sólidas. Outros mecanismos podem ser responsáveis pela tixotropia, como a desorganização de cada uma das partículas em materiais granulares, a deformação e desorganização individual das gotículas mudando da forma esférica para elíptica, a orientação das cadeias poliméricas ao longo do campo de velocidade, bem como a sua ruptura (ALEXANDROU et al., 2009).

A tixotropia descreve o comportamento de substâncias que mudam do estado gel de alta viscosidade para o estado sol de viscosidade muito baixa, como resultado de um alto cisalhamento por um período de tempo relativamente longo. Um importante critério da tixotropia é o processo reversível de reespessamento da substância quando deixada em repouso. O tixotropismo pode ser atribuído à presença de ligações de hidrogênio entre as micelas coloidais e que, uma vez rompidas pela agitação, voltam a se formar no sistema em repouso (SHARMA, 2000).

Quanto mais tixotrópica a amostra maior sua deformação, possibilitando maior espalhabilidade do produto quando aplicado na pele, e o inverso é verdadeiro. Após a aplicação, a emulsão com caráter tixotrópico recupera sua viscosidade, o que evita que o produto escorra. Além disso, o produto tixotropico tende a ter maior vida de prateleira, pois durante o armazenamento, apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (CEFALI, 2009).

As emulsões A (emulsão base sem ácido alfa-lipóico) e A1 (contendo 2% de ácido alfa-lipóico) apresentaram pequena área de histerese frente a ensaio reológico preliminar de curva de fluxo que foi aplicado. A emulsão B1 (contendo 2% de ácido alfa-lipóico) apresentou grande área de histerese quando submetida a ensaios preliminares de curva de fluxo. O objetivo de terem sido empregadas emulsões com características reológicas diferentes foi estudar e comparar o comportamento de liberação e permeação do ácido alfa-lipóico veiculado em emulsões com características reológicas diferentes. Os resultados obtidos no ensaio de liberação e permeação apresentados no capítulo 3 deste trabalho mostram que as características reológicas de ambas as emulsões foi um dos fatores que influenciaram na liberação e permeação do ácido alfa-lipóico.

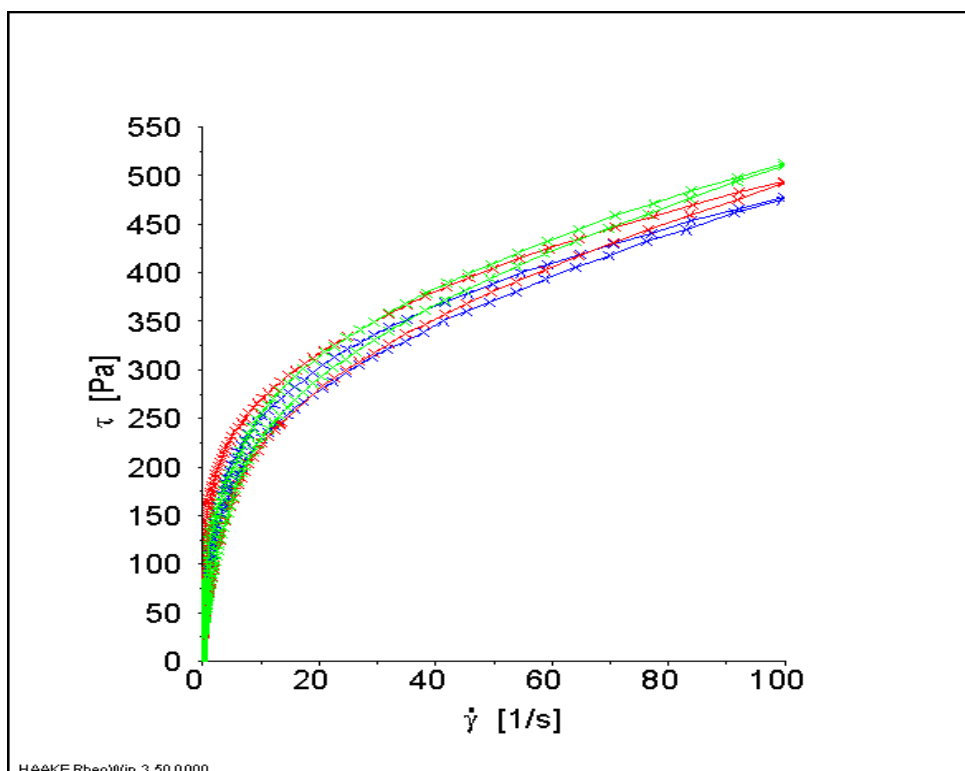


Figura 67. Reograma da curva de fluxo da emulsão A (triplicata).

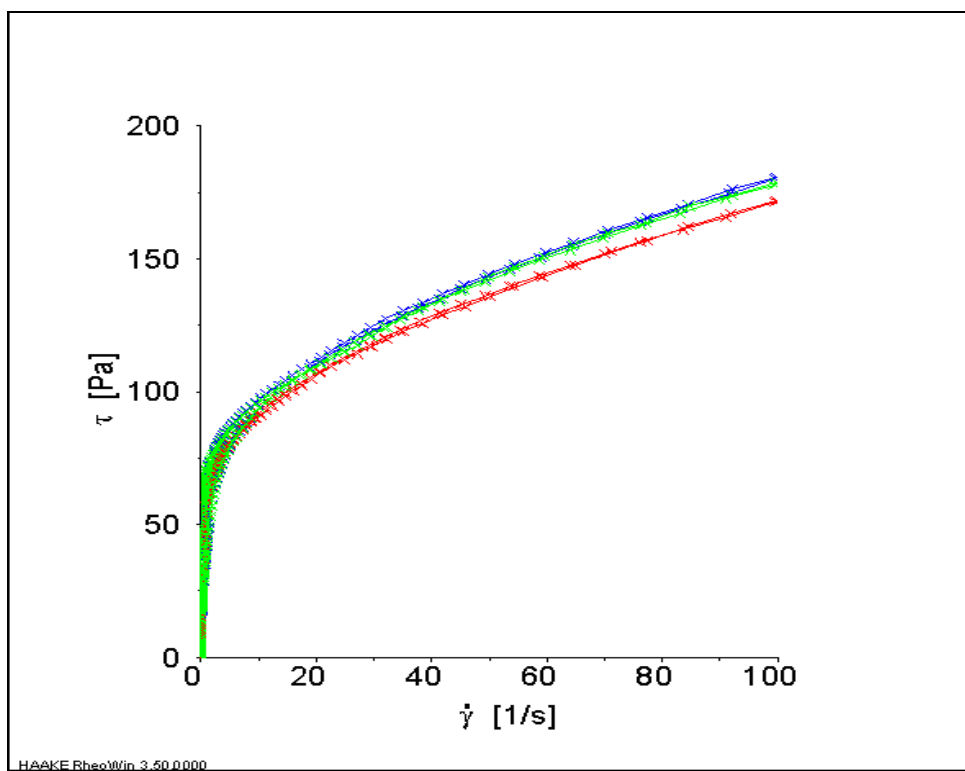


Figura 68. Reograma da curva de fluxo da emulsão A 1 (triplicata).

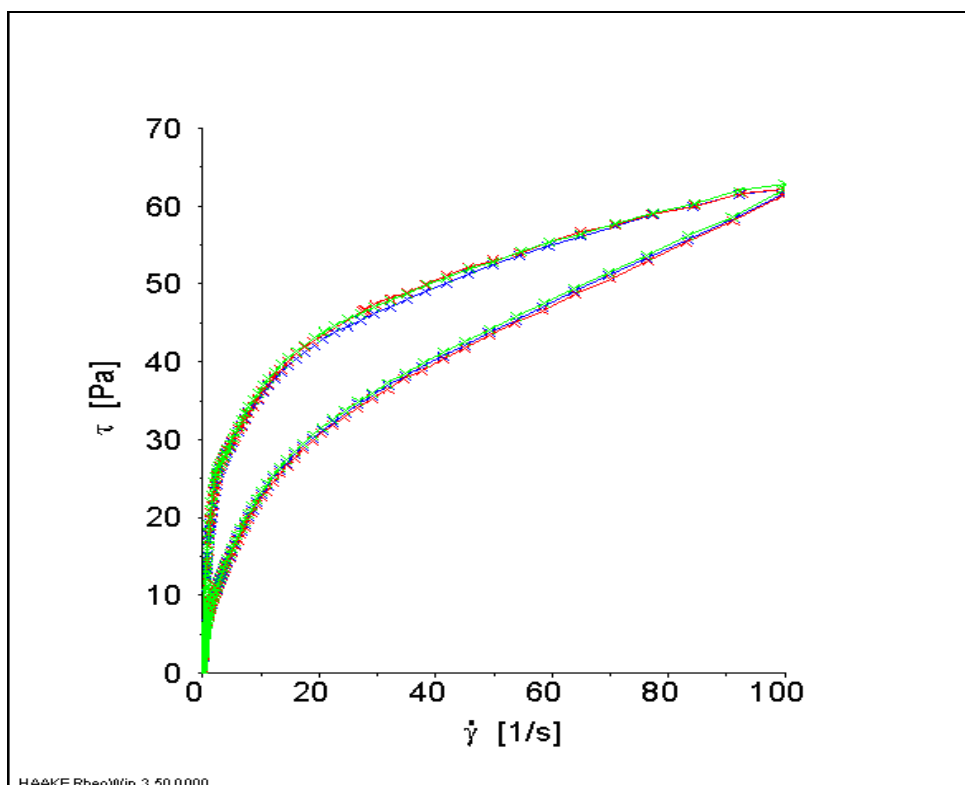


Figura 69. Reograma da curva de fluxo da emulsão B 1 (triplicata).

Tabela XXIV. Valores da área de histerese das emulsões

amostras	área de histerese (Pa/s)
A	563,9
A 1	106,6
B 1	1617,5

* Media de três leituras. Coeficiente de variação (CV) menor que 10%

A modelagem do comportamento reológico de fluidos provê meios para representar uma larga quantidade de dados reológicos em termos de uma simples expressão matemática. Muitas formas de equações são possíveis, no entanto, um modelo geral que se aplique a todas as situações não existe.

As curvas de escoamento foram ajustadas pelo modelo reológico de Herschel Bulkley. Esse modelo de ajuste foi escolhido por representar a equação geral dos fluidos não newtonianos (STEFFE, 1996) e por contemplar o valor de limite de escoamento, presente na emulsão cosmética estudada. Segundo SCHARAMM (2006), o ajuste de curvas reológicas permite definir as faixas de tolerância em torno dos coeficientes padrão de regressão ao invés de comparar curvas padrões com um fluxo em particular e, dessa forma, é possível definir se o material testado está dentro ou fora das especificações

Conforme o modelo de Herschel Bulkley foram obtidos os parâmetros reológicos de limite de escoamento (τ_0), índice de comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) e

estatístico de coeficiente de correlação (r). O coeficiente de correlação foi superior a 0,99 para todas as curvas ajustadas, o que mostrou a adequabilidade do modelo utilizado. O índice de correlação mede a proporção da variação total da média explicada pela regressão. Os dados reológicos ajustados com o modelo de Herschel-Bulkley estão apresentados na tabela XXV

Todas as emulsões foram descritas pelo modelo de Herschel Bulkley's, como apresentado na equação XVI e os valores matemáticos para cada emulsão estão expressos na tabela XXV

$$\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n \text{ (equação XVI)}$$

Tabela XXV. Parâmetros matemáticos que descrevem cada emulsão pelo modelo de Herschel Bulkley's

Emulsões	τ_0 (Pa)	K	n	r
A	-3,66	119,7	0,306	0,99
A 1	-18,18	82,57	0,171	0,99
B 1	-3,973	21,45	0,251	0,99

* Media de três leituras.

É possível dizer também que as emulsões cosméticas exibiram comportamento tixotrópico, devido aos valores do índice de comportamento de fluxo (n) terem sido menores que um (n<1).

A tensão de cisalhamento inicial (τ_0) requerida para que as emulsões comecem a fluir foi significamente baixa (apresentando valores negativos); portanto, as emulsões fluem com bastante facilidade, provavelmente por apresentarem baixos valores de viscosidade, que representa a resistência ao fluxo.

9.4.2. Limite de escoamento

A idéia de limite de escoamento é que existe uma tensão limite abaixo da qual uma amostra se comporta como um sólido: a tensão deforma a amostra e essa deformação desaparece uma vez retirada a tensão. Acima do limite de escoamento a amostra realmente começa a fluir, levando a uma deformação ilimitada. A tensão é relacionada com a taxa de deformação, sendo a viscosidade o fator de correlação (SCHRAMM, 2006). Alguns exemplos de materiais que exibem limite de escoamento são produtos alimentícios (maionese, ketchup), cosméticos (maquiagem, gel de cabelo, espumas de barbear, cremes), pastas, emulsões, géis poliméricos, suspensões, tintas, fluidos de perfuração de petróleo, argilas entre outros (ALEXANDROU et al., 2009).

Segundo ALEXANDROU et al., 2009 o limite de escoamento e os efeitos de tixotropia estão intimamente ligados e um não pode ser estudado sem os efeitos do outro, prova disto é

que as emulsões A e A 1 que apresentaram menores valores de área de histerese, também apresentaram visivelmente uma resistência maior ao fluxo conforme pode ser visto nas figuras (70 a 72), ou seja elas apresentaram menor desempenho de fluxo quando comparadas com a emulsão B 1.

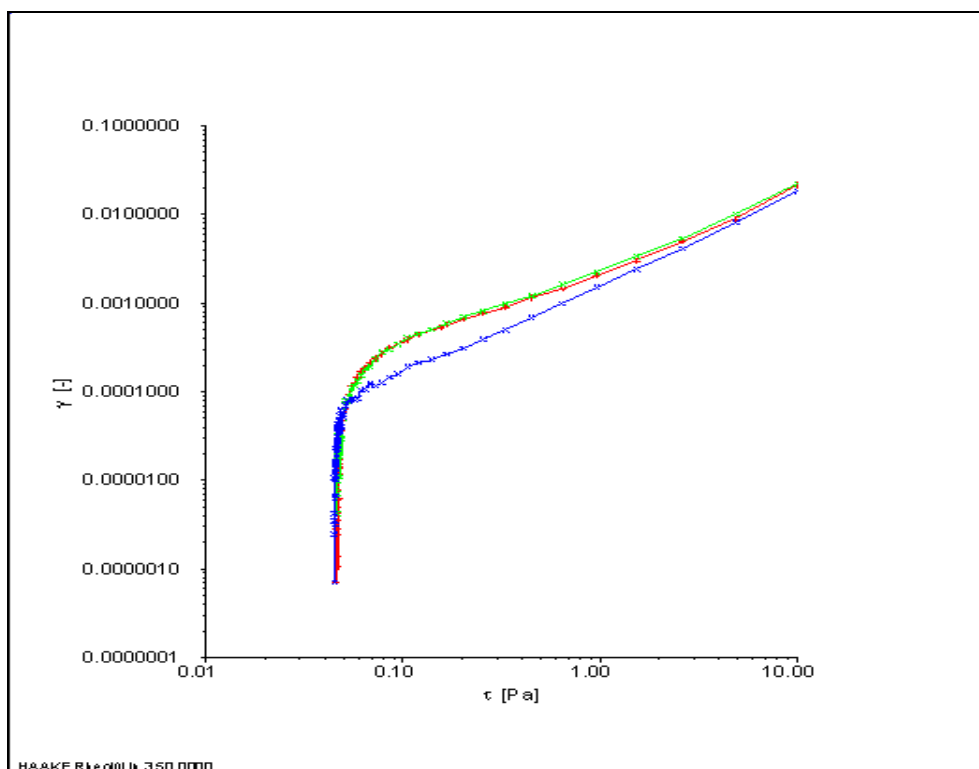


Figura 70. Reograma do limite de escoamento da emulsão A (triplicata).

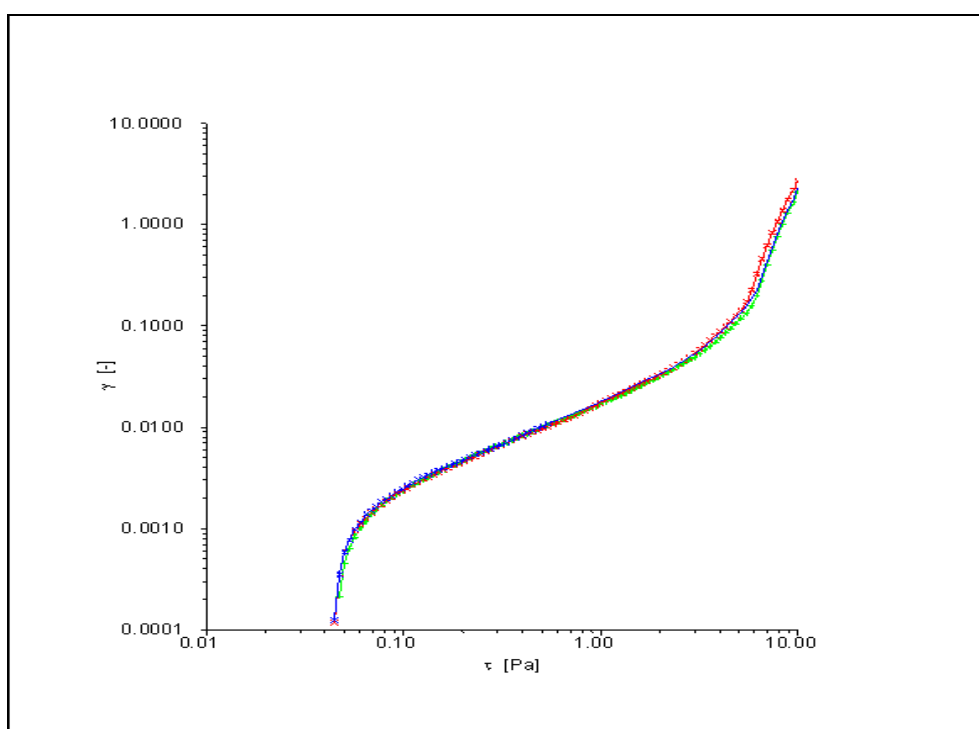


Figura 71. Reograma do limite de escoamento da emulsão A 1 (triplicata).

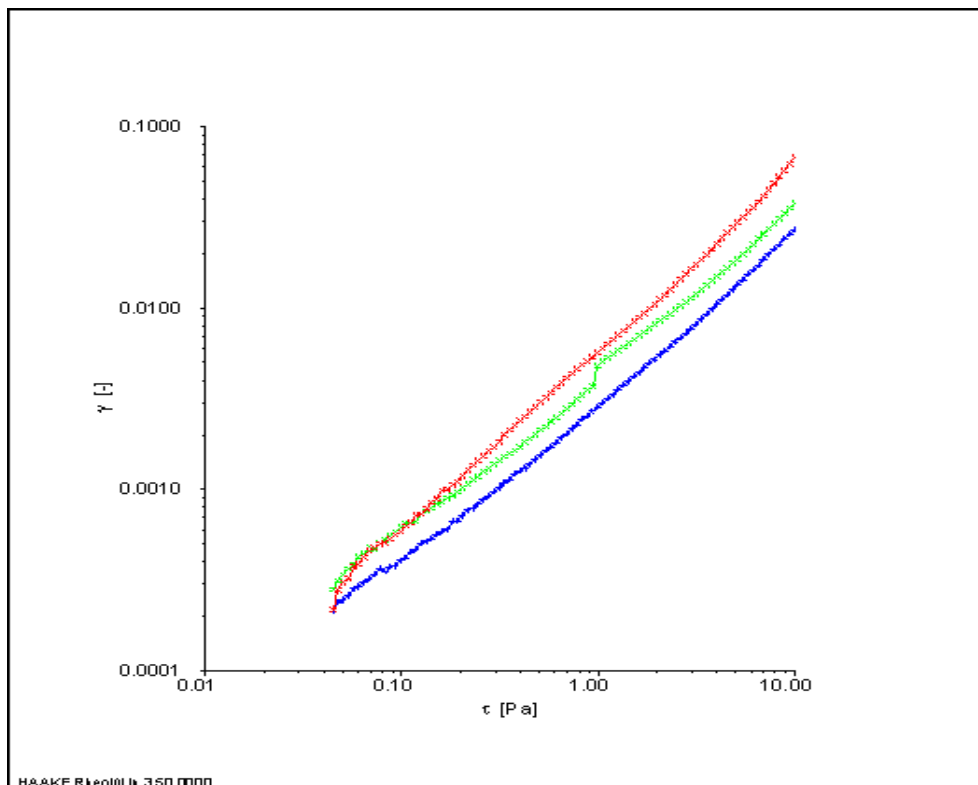


Figura 72. Reograma do limite de escoamento da emulsão B 1 (triplicata).

9.4.3. Varredura de tensão

A varredura de tensão (figuras 73 a 75) foi realizada a fim de se encontrar a faixa de viscoelasticidade linear, ou seja, a faixa na qual os módulos elástico e viscoso, permanecem lineares. Em seguida, foi realizada a varredura de frequência, com a aplicação de uma tensão definida pelo teste anterior. A tensão de cisalhamento fixada foi de 1 Pa para as emulsões A e A 1 e 0,5 Pa para a emulsão B 1.

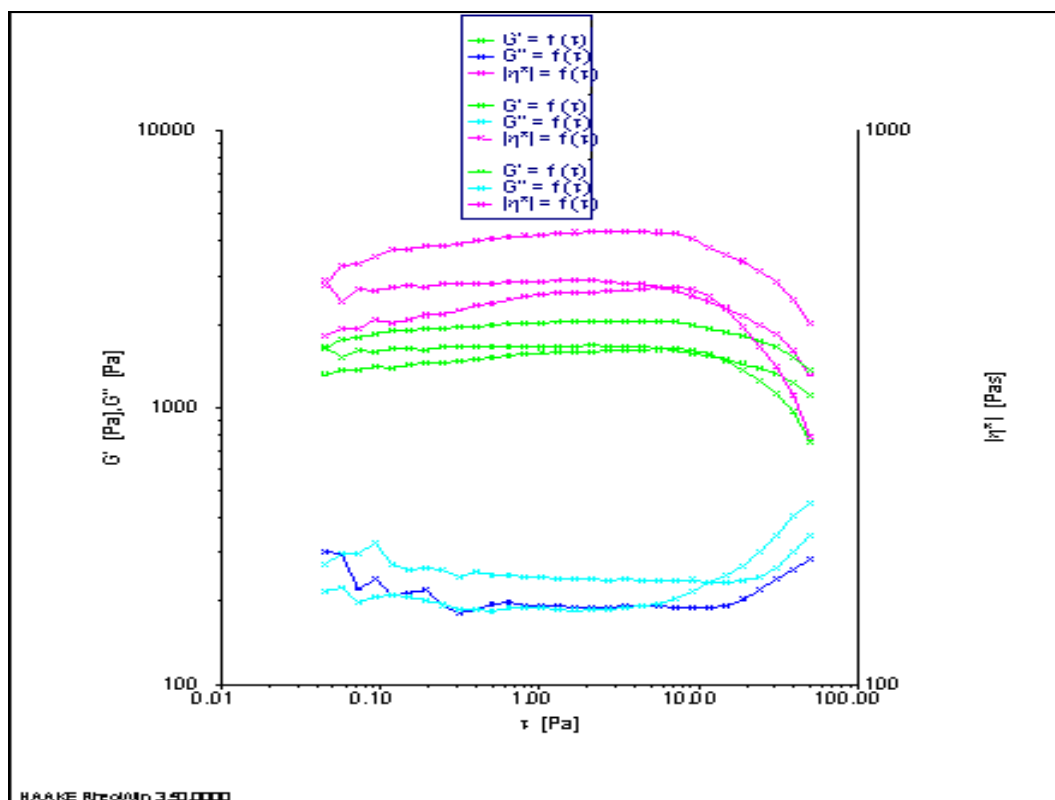


Figura 73. Reograma da varredura de tensão da emulsão A (G' verde, G'' azul, η^* rosa) (triplicata).

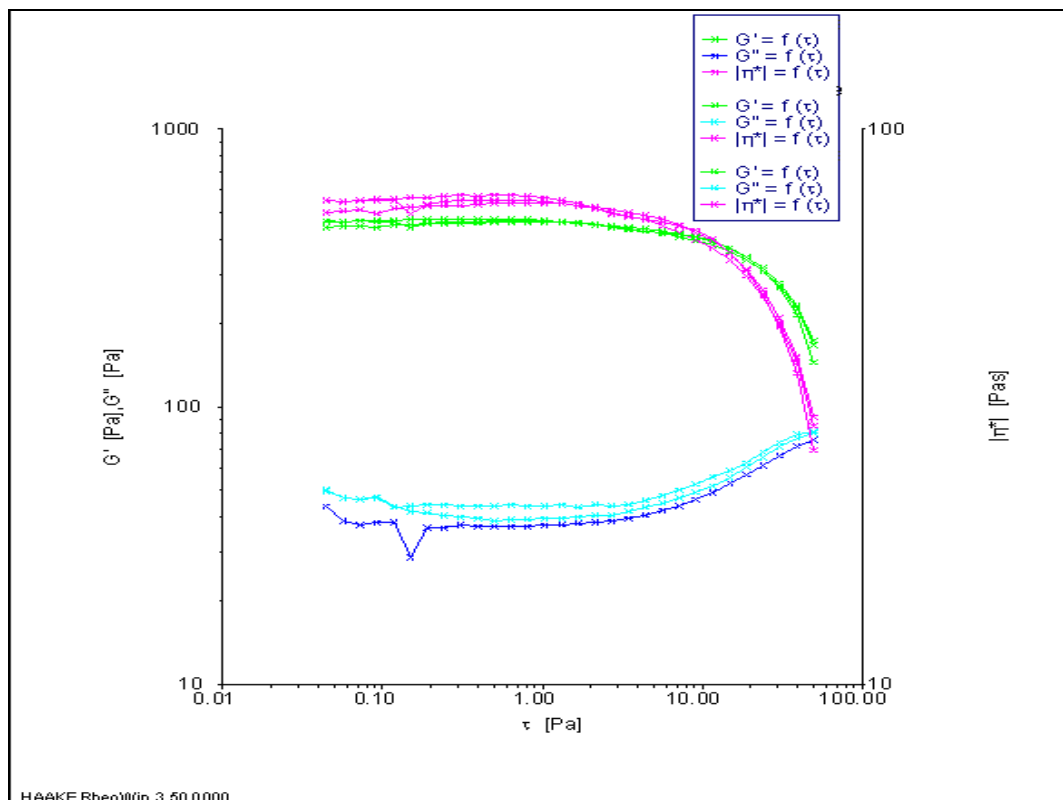


Figura 74. Reograma da varredura de tensão da emulsão A 1 (G' verde, G'' azul, η^* rosa) (triplicata).

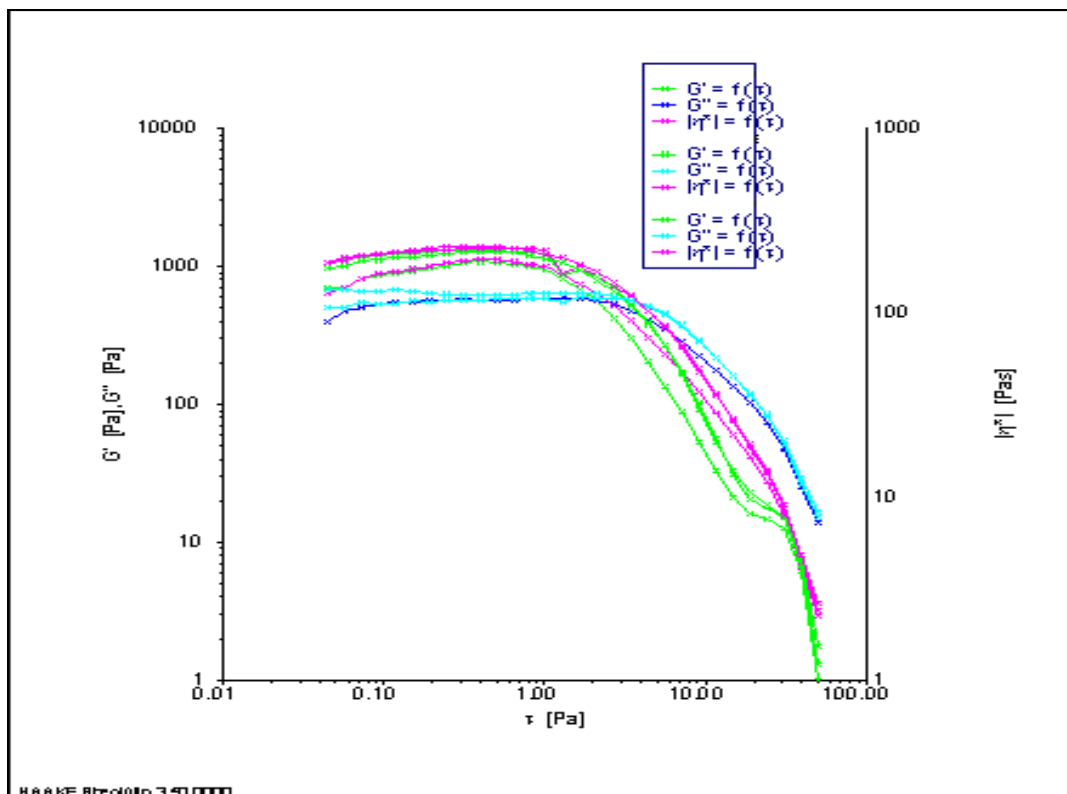


Figura 75. Reograma da varredura de tensão da emulsão B 1 (G' verde, G'' azul, η^* rosa) (triplicata).

A varredura de tensão precede os testes de viscoelasticidade, sendo possível determinar a que valores de tensão de cisalhamento, dentro de uma faixa de linearidade, a amostra não sofre destruição. Foi observado que na faixa de 0 a 5 Pa, as amostras A e A 1 não sofreram destruição, já a amostra B 1 não sofreu destruição na faixa de 0 a 1,0 Pa ou seja, os valores de G' (verde), G'' (azul) e viscosidade η^* (rosa) permaneceram na faixa da viscoelasticidade linear na tensão de cisalhamento aplicada, podendo assim este valor ser utilizado nos testes de varredura de frequência e fluência e relaxação.

9.4.4. Varredura de frequência

A varredura de frequência (figuras 76 a 78) determina os valores de G' (módulo de estocagem) e G'' (módulo de perda) das formulações. Quando os valores de G' são superiores a G'' é possível dizer que a formulação apresenta uma característica estruturada.

Quando o material viscoelástico apresenta módulo de armazenamento ou elástico superior ao módulo viscoso ou de perda, a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste e pode ser recuperada mais tarde, como ocorre em geral em sistemas emulsionados O/A (CEFALI, 2009).

A varredura de frequência mostrou que na faixa estabelecida (1 a 10 Hz) praticamente não há variação dos módulos elástico e viscoso. Além disso, foi possível observar um

comportamento bem estruturado para toda a faixa de frequência aplicada, já que os valores de G' (módulo de armazenamento) são superiores aos valores de G'' (módulo de perda).

No reograma da emulsão B 1, (figura 78) também é mostrado que os valores de G' e G'' se cruzam, um fator chamado *crossover* com valor de 416,8 Pa. Este ponto determina a mudança de comportamento da formulação, evidenciando que durante o cisalhamento houve alteração do comportamento.

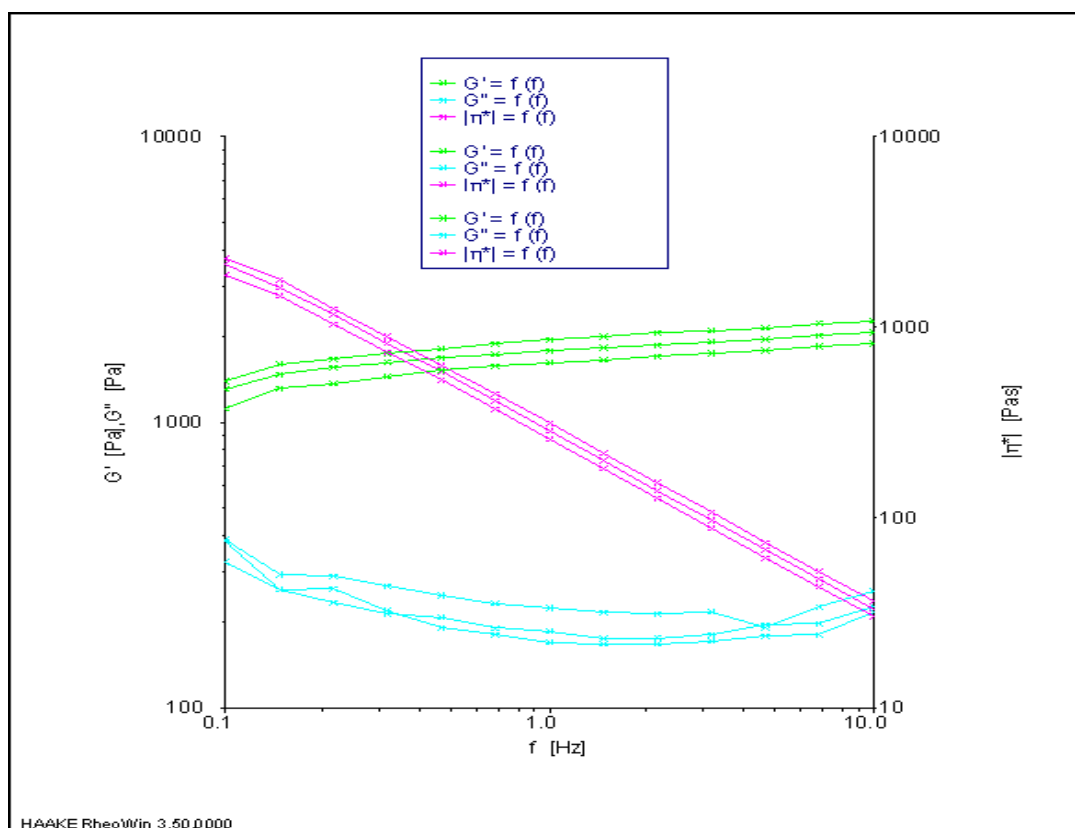


Figura 76. Reograma da varredura de frequência da emulsão A (triplicata).

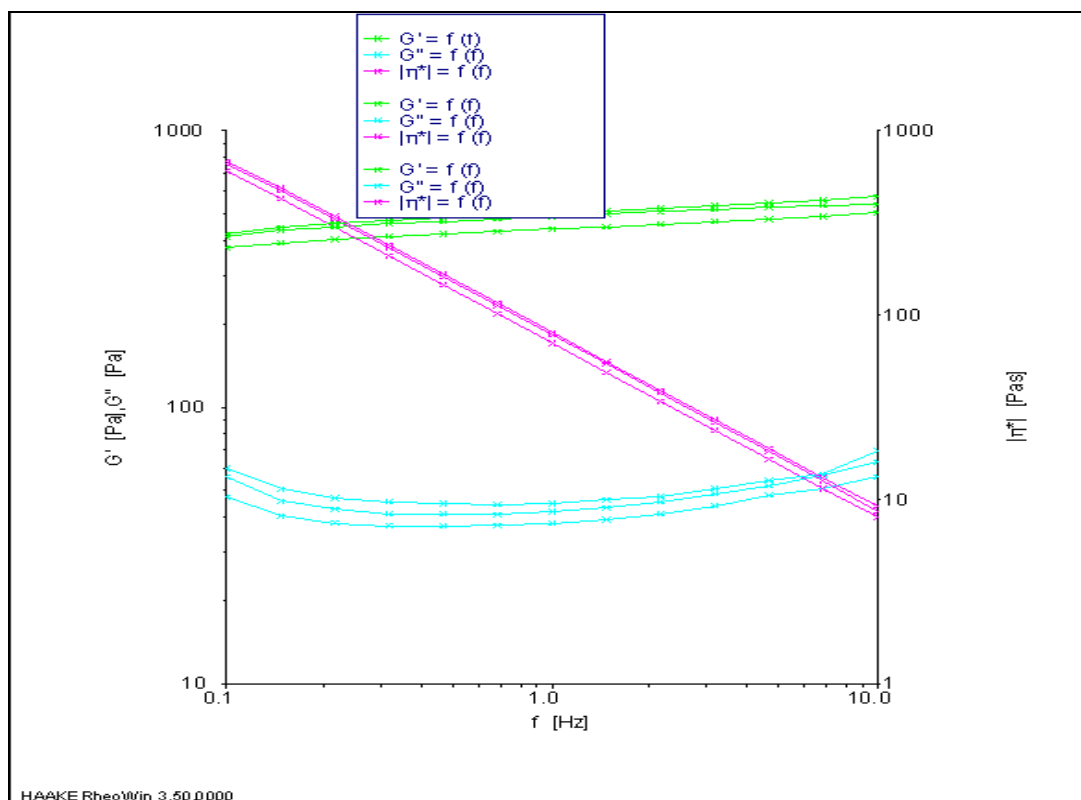


Figura 77. Reograma da varredura de frequência da emulsão A 1 (triplicata).

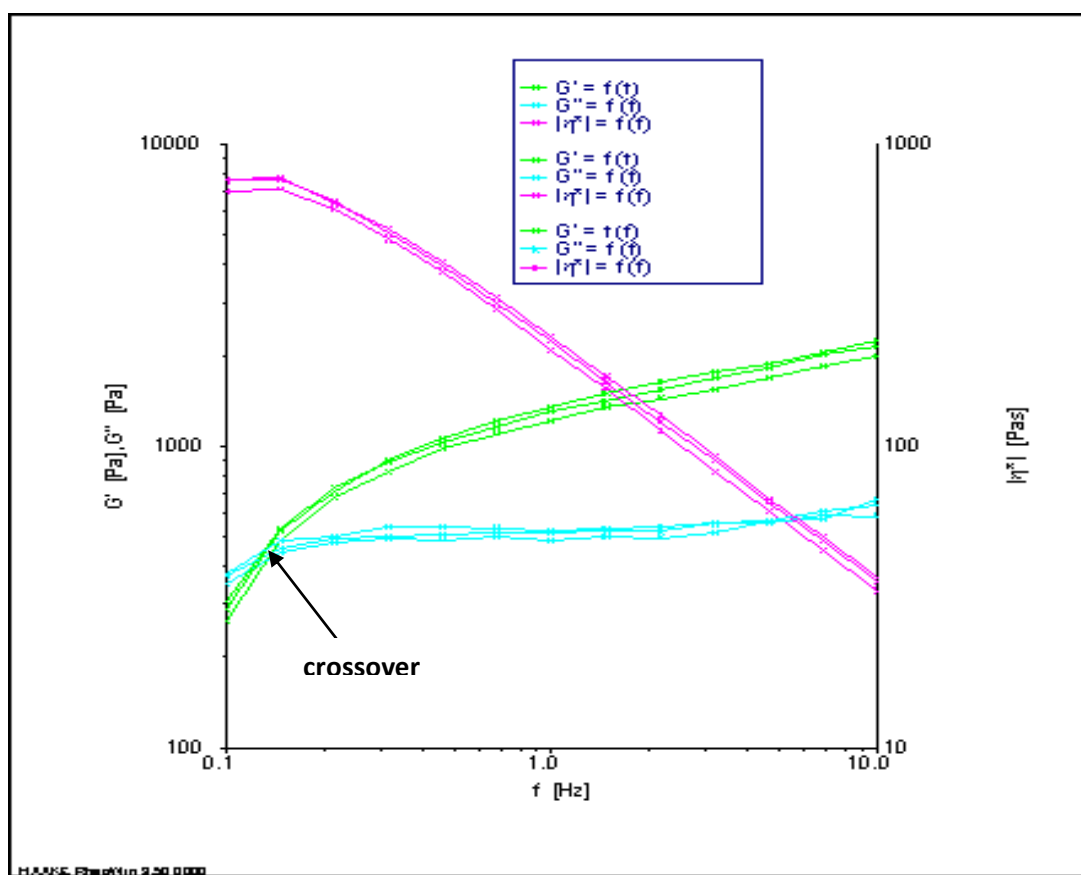


Figura 78. Reograma da varredura de frequência da emulsão B 1 (triplicata).

9.4.5. Fluência e Relaxação

O teste de fluência e relaxação (figuras 79 a 82) determina a viscoelasticidade das amostras, viscosidade e elasticidade são portanto, duas possibilidades de resposta dos materiais à tensão a que são submetidos, sendo que é importante a recuperação de sua estrutura elástica quando esta tensão cessa, facilitando, assim, o espalhamento durante a aplicação tópica.

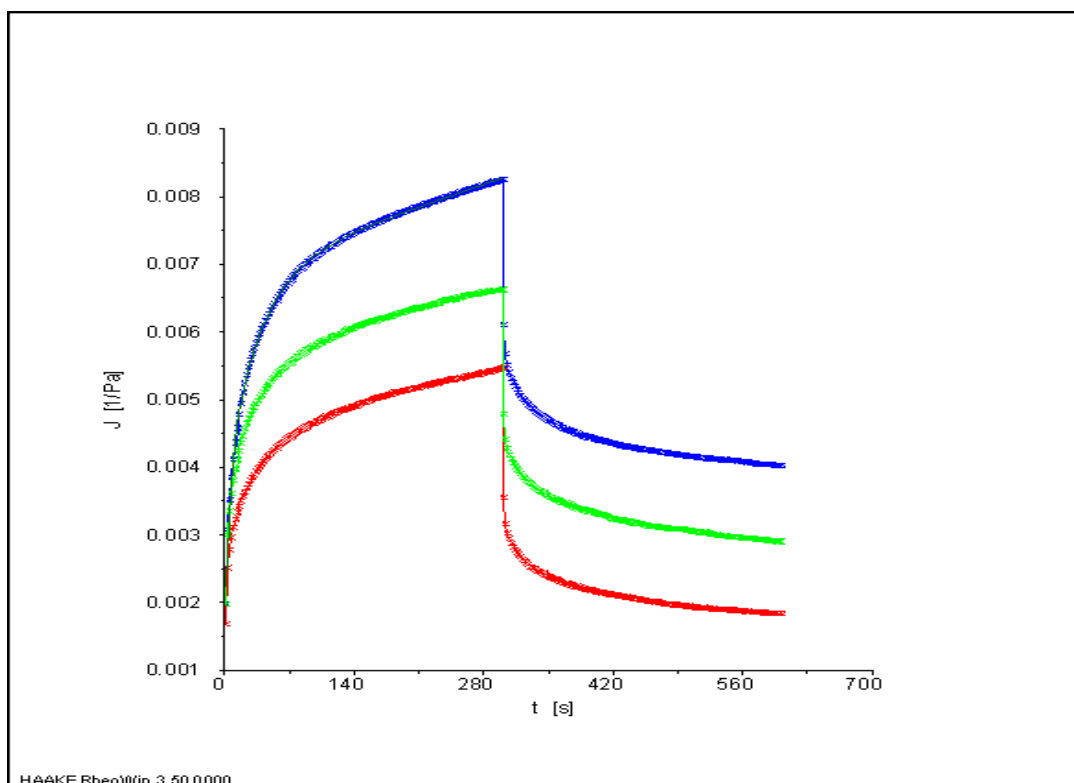


Figura 79. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão A (triplicata).

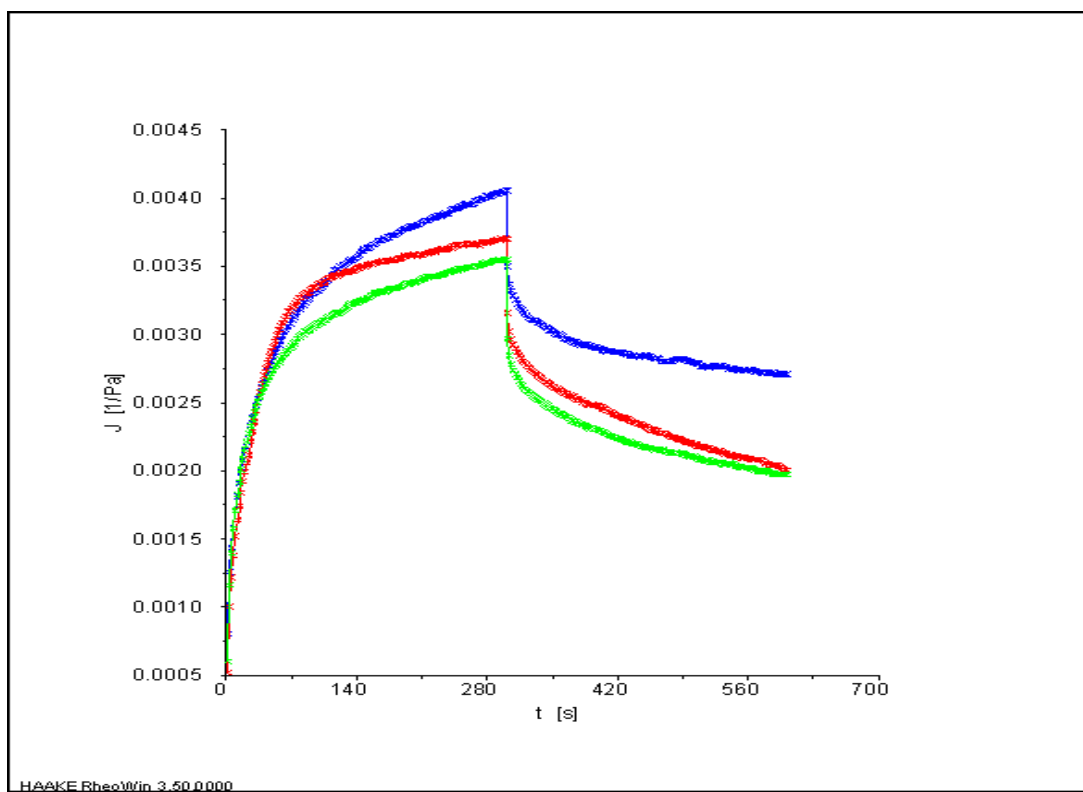


Figura 80. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão A 1 (triplicata).

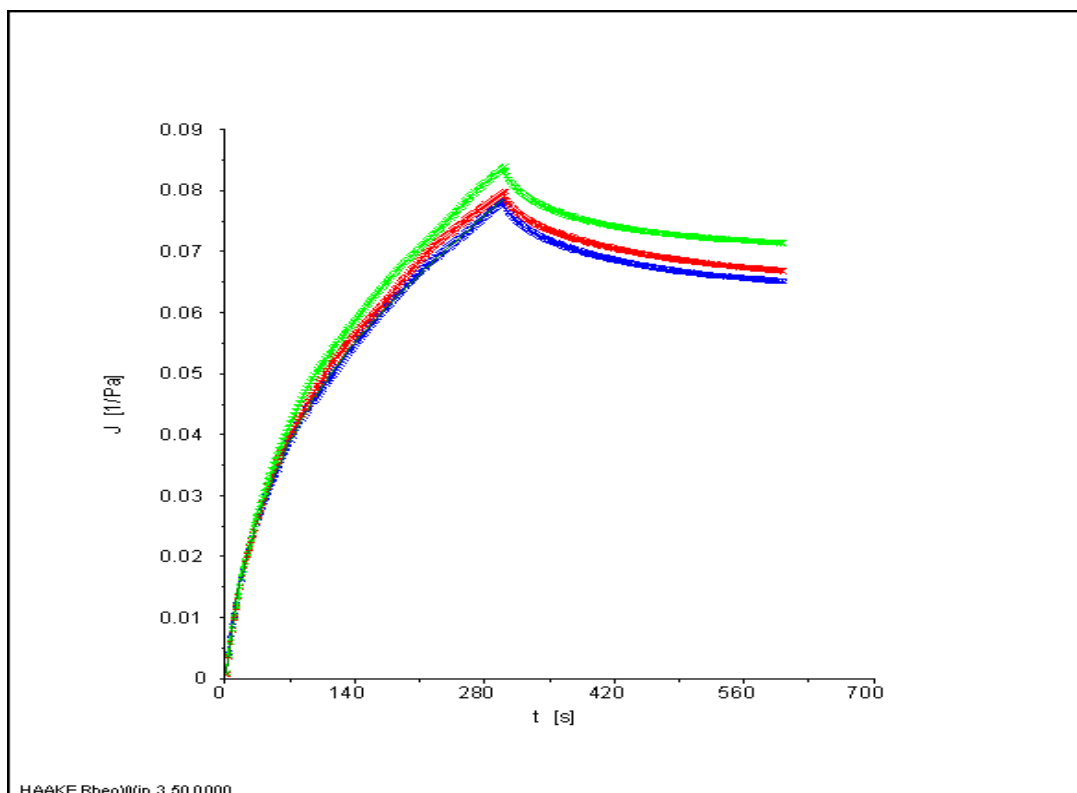


Figura 81. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão B 1 (triplicata).

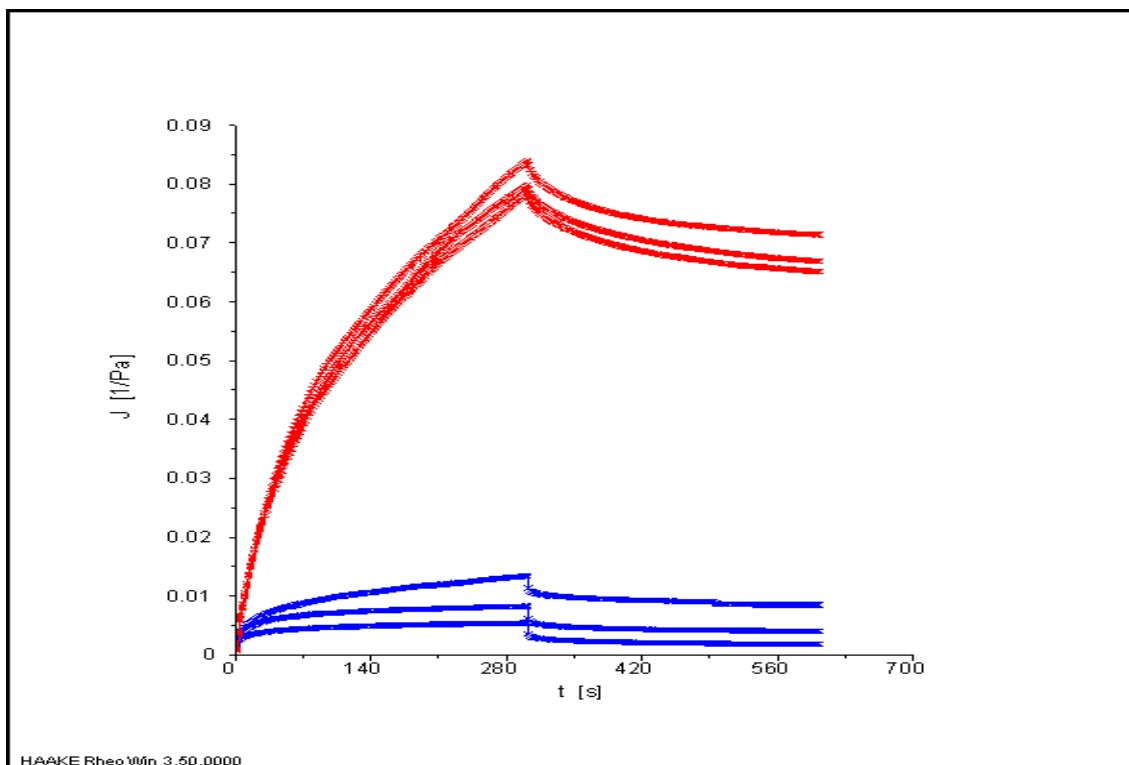


Figura 82. Reograma da curva de fluência e relaxação da emulsão A 1 (azul) e B 1 (vermelho) (triplicata).

Foi observado nos reogramas representados pelas Figuras 79 a 82, que as emulsões A e A 1 foram resistentes à tensão para começar a fluir e não apresentaram uma grande deformação em relação a emulsão B 1, que flui com maior facilidade e consequentemente apresenta maior deformação. Em ambas as emulsões ocorreu a recuperação da parte elástica, sendo que essa recuperação fica mais evidente na emulsão A. Essa resposta é bastante comum em sistemas poliméricos. Já na emulsão B 1, figura 81, a recuperação foi praticamente insignificante quando comparada com as emulsões A e A 1.

9.5. Microscopia de luz polarizada

As análises microscópicas foram realizadas 24 horas após a manipulação das emulsões, sendo que os resultados podem ser observados nas figuras 83 a 86.

Foi possível observar, sob microscopia de luz polarizada, áreas anisotrópicas indicando presença de fases líquido-cristalinas do tipo lamelar.

A fase lamelar, ao se formar, apresenta um estado intumescido pelo fato da água ser adsorvida entre as camadas de tensoativo, formando o domínio hidrofílico do cristal líquido. A água situada entre as lamelas se ligam, devido às fortes interações entre suas moléculas e os grupos polares dos tensoativos. Isto não permite a perda de água por evaporação, necessitando de maior energia que a disponível à temperatura da superfície cutânea para evaporar (CHORILLI et al., 2009).

A proporção correta entre fase oleosa/tensioativo/fase aquosa é de extrema importância para a formação de sistemas líquido-cristalinos lamelares, uma vez que a interação óleo/tensioativo/água proporciona a formação de cristais líquidos ao redor dos glóbulos, aumentando a estabilidade das emulsões no sentido de que previnem a união das gotículas e coalescência (TYLE, 1989).

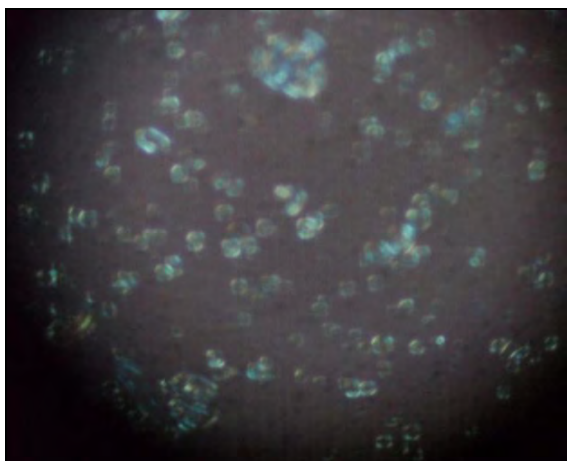


Figura 83: Fotomicrografia da emulsão A

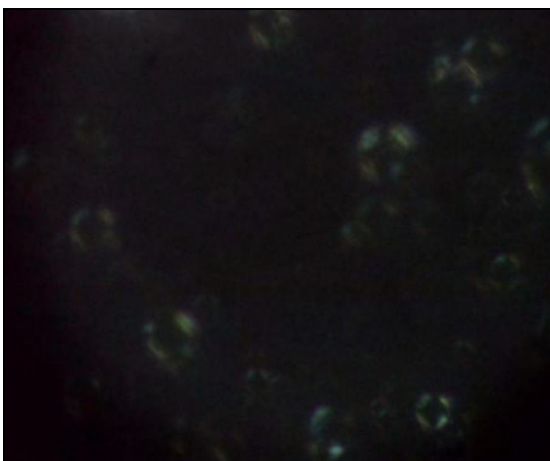


Figura 84: Fotomicrografia da emulsão A 1

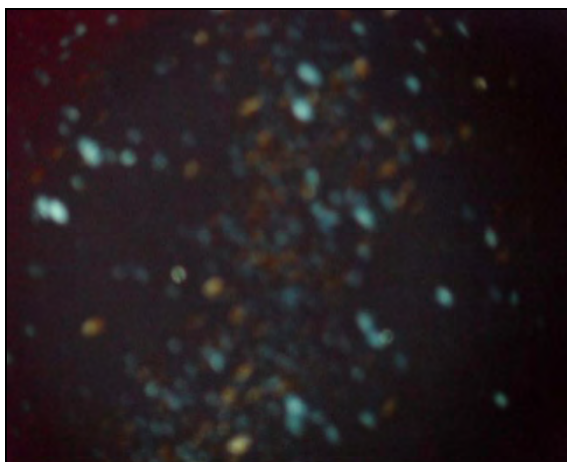


Figura 85: Fotomicrografia da emulsão B

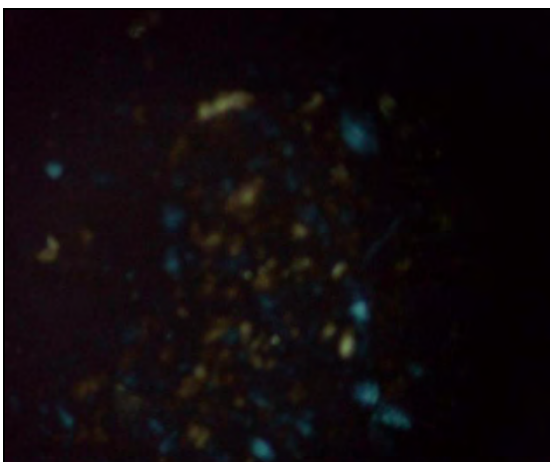


Figura 86: Fotomicrografia da emulsão B 1

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

As curvas de SAXS para sistemas líquido cristalinos (figuras 87 a 90) exibem picos, cujo número e razão entre as distâncias de correlação permitem determinar o tipo de arranjo que os átomos formam na matriz (OTTO et al., 2010)

Através da razão entre as distâncias é possível definir o tipo de arranjo, mesofases ordenadas como fase lamelar, as quais são compostas por micelas planares ou lamelas com solvente entre elas, representadas por dois picos, cuja razão entre as distâncias deve ser 2 (OTTO et al., 2010).

É possível uma distância média d , entre partículas vizinhas (ou dois planos paralelos) a partir do valor de posição máximo ($q_{\max}$), empregando a relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\max}}$$

Os resultados das medidas de SAXS estão coerentes com os resultados obtidos por microscopia óptica de luz polarizada, identificando fase lamelar para todas as emulsões estudadas sendo elas A, A 1, B e B 1.

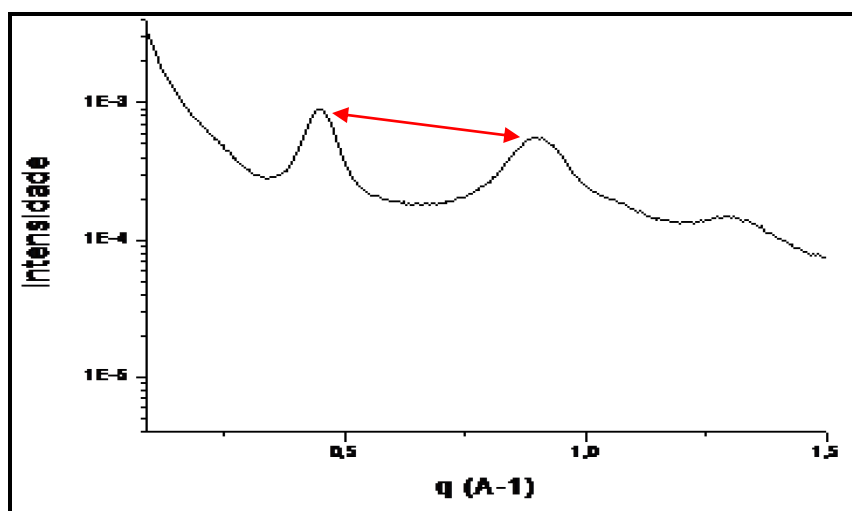


Figura 87: Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão A

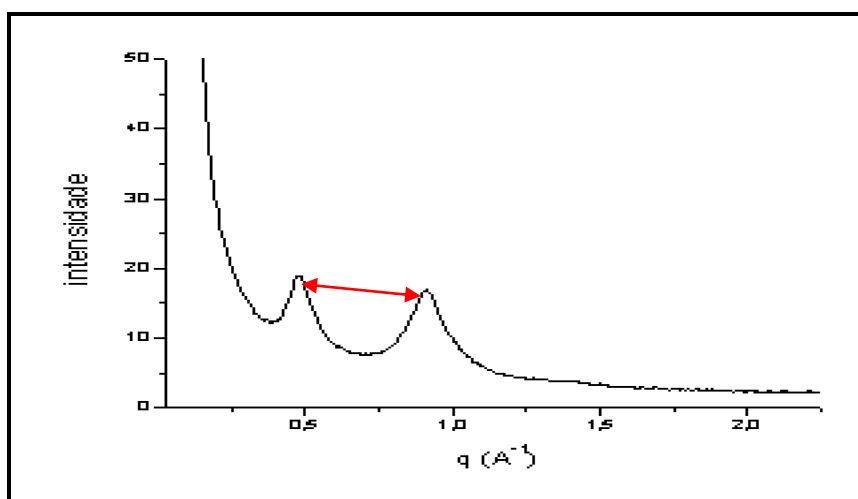


Figura 88: Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão A 1

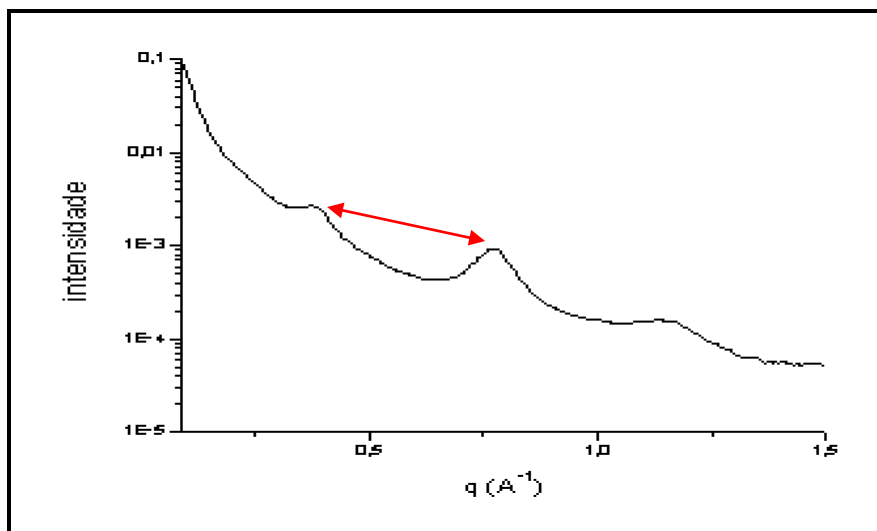


Figura 89: Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão B

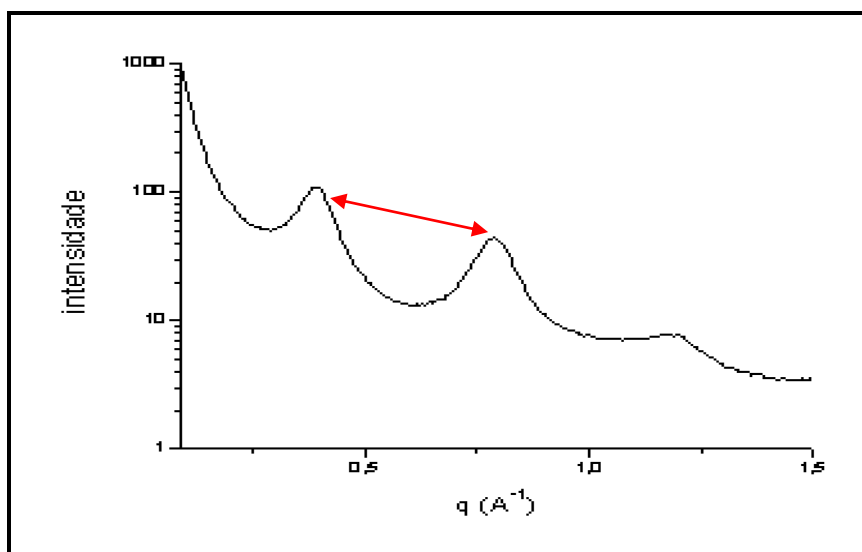


Figura 90: Gráfico resultante do ensaio de SAXS da emulsão B 1

10. Conclusão Parcial

As emulsões apresentaram características reológicas desejáveis para um produto cosmético de aplicação tópica, principalmente por apresentarem uma fácil espalhabilidade, uma característica importante atribuída ao cosmético para uma melhor aceitação pelo consumidor. Ficou comprovada a presença de estruturas líquidos cristalinas nas emulsões, o que atribui uma maior estabilidade às emulsões propostas.

Através dos resultados de estabilidade foi possível concluir que a formulação A 1 não se mostrou estável em todos os requisitos avaliados nos testes de estabilidade, pois o odor da emulsão foi modificado intensamente ao longo do tempo de realização dos ensaios durante o estudo da estabilidade acelerada, ou seja, provavelmente houve incompatibilidade do ácido

alfa-lipóico com os outros componentes da emulsão, uma vez que na emulsão A não foi observado alterações no odor. A emulsão B 1 permaneceu estável na maioria dos requisitos analisados, sendo assim foi eleita a melhor formulação para a incorporação do ácido alfa-lipóico.

CAPÍTULO 3 - ESTUDO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* E TESTES DE CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO ALFA – LIPÓICO EM CULTURA DE CÉLULAS

11. REVISÃO DE LITERATURA

11.1. Pele

A pele é o maior órgão do corpo, sendo responsável por mais de 10% da massa corporal e possibilita o corpo interagir mais intimamente com o ambiente. A pele é composta por quatro camadas: a camada córnea (epiderme inviolável) e as restantes camadas da epiderme (epiderme viável), derme e subcutâneo. Há também diversos apêndices associados: folículos pilosos, dutos de suor, glândulas apócrinas e as unhas. Muitas das funções da pele podem ser classificadas como essenciais para a sobrevivência da maior parte dos mamíferos e dos seres humanos em um ambiente relativamente hostil. Num contexto geral, essas funções podem ser classificadas como de proteção, manutenção da homeostase ou perceber mudanças do ambiente. A importância do seu papel protetor e homeostática da pele é ilustrada em um contexto por sua propriedade de barreira. Isto permite a sobrevivência dos seres humanos em um ambiente de temperatura variável, teor de água (umidade e banhos) e a presença de riscos ambientais, tais como produtos químicos, bactérias, alérgenos, fungos e radiação. A pele é um órgão importante para a manutenção da homeostase do corpo, especialmente em termos de sua composição, regulação de calor, controle da pressão sanguínea e funções excretoras (WALTERS, 2002).

A pele é um órgão sensorial importante em termos de influências ambientais, como calor, pressão, dor, alérgeno e a entrada de microorganismos. Finalmente, a pele é um órgão que está em um estado contínuo de regeneração e de reparação. Para cumprir cada uma dessas funções, a pele deve ser resistente, robusta e flexível, com uma comunicação eficaz entre cada um dos seus componentes intrínsecos (WALTERS, 2002).

Tem sido argumentado que a taxa metabólica basal de animais diferentes em tamanho deve ser dimensionado para a superfície do corpo para manter uma temperatura constante através do controle da termorregulação da pele (NEVILL, 1994).

Muitas substâncias são aplicadas sobre a pele, deliberadamente ou acidentalmente, quer com resultados benéficos ou prejudiciais. O uso de produtos tópicos era evidente nos tempos antigos, e há relatos dos benefícios sistêmicos de agentes anti – infecciosos e hormonais de uso tópico em 1940. A tecnologia moderna transdérmica foi introduzida no final de 1970. Os principais interesses na avaliação de absorção cutânea são a aplicação de compostos para a pele (a) para efeitos locais em dermatologia (por exemplo, corticóides para dermatites), (b) para o transporte através da pele de efeitos sistêmicos (por exemplo, adesivos

de nicotina para fumantes), (c) para efeitos de superfície (por exemplo, protetores solares, cosméticos e anti-infecciosos), (d) para atingir tecidos mais profundos (por exemplo, anti-inflamatórios não-esferoidais [AINEs] para inflamação muscular) e (e) não desejados de absorção (por exemplo, solventes no local de trabalho, produtos químicos agrícolas, ou alérgenos) (WALTERS, 2002).

A pele se tornou popular como um local potencial para a entrada sistêmica de fármacos, isso foi pensado para (a) evitar os problemas de esvaziamento do estômago, os efeitos do pH e da desativação de enzimas associadas com a passagem gastrointestinal, (b) para evitar o metabolismo de primeira passagem hepática e (c) para permitir o controle da dosagem, como exemplificado pelo término da absorção do fármaco através da remoção do dispositivo contendo o fármaco. Na prática, a passagem de fármacos através da pele está associada com várias dificuldades, tais como (a) a variabilidade da absorção percutânea devido ao local da aplicação, doença, idade e diferenças entre etnias, (b) do efeito do metabolismo de primeira passagem da pele, (c) a capacidade de reserva da pele, (d) irritação e toxicidade causadas por produtos de uso tópico, (e) e heterogeneidade da pele; (f) definição inadequada dos critérios de bioequivalência e (g) uma compreensão incompleta das tecnologias que podem ser utilizadas para facilitar ou retardar a absorção percutânea. No entanto, a liberação controlada de fármacos através da pele continua a ser de interesse, com o desenvolvimento de novas tecnologias (WALTERS, 2002; ROBERT & IRVIN, 1971).

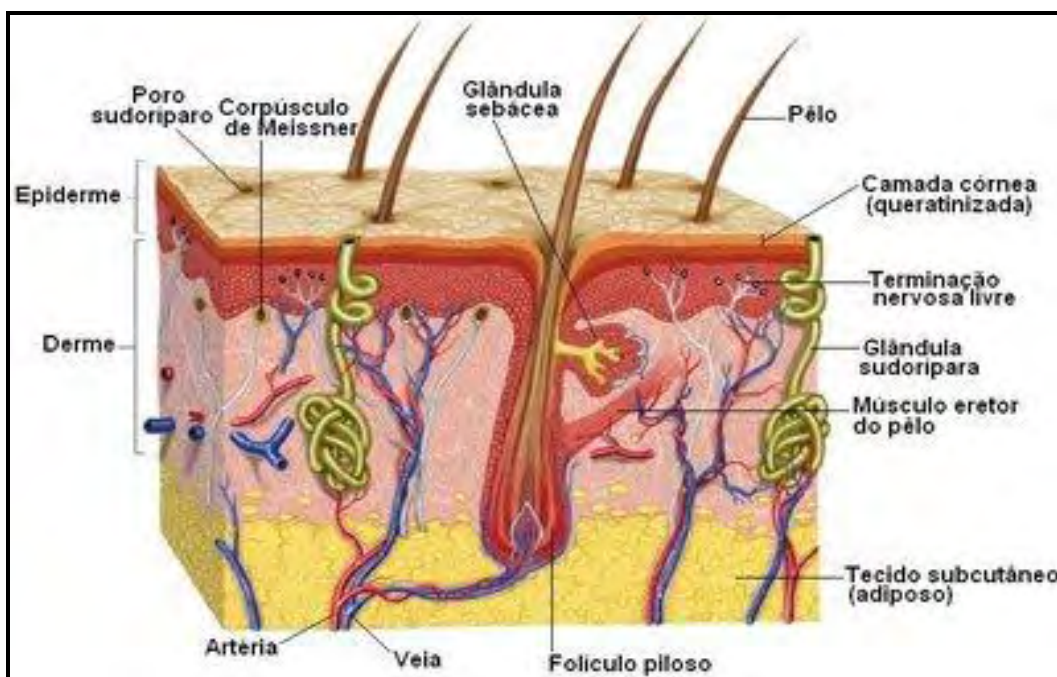


Figura 91: Estrutura da pele (fonte: <http://irmasgg.blogspot.com/2010/08/importancia-da-pele.html>).

11.2. Estruturas da pele e suas funções

11.2.1. A epiderme

A principal função da epiderme é a formação do estrato córneo, a camada heterogênea mais externa da epiderme e possui aproximadamente de 10 – 20 μm de espessura. Esta camada mais externa da epiderme apresenta células achatadas na forma hexagonal e sobrepostas, e essas células conhecidas também como corneificadas ficam embebidas na matriz extracelular lipídica. Cada célula é de aproximadamente 40 μm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. A espessura, no entanto, varia, pode ser de uma ordem de magnitude maior em algumas áreas como as palmas das mãos e solas dos pés, áreas do corpo associadas com a interação direta e substancial física freqüente com o meio ambiente físico. Não surpreendentemente, a absorção de algumas substâncias, tais como salicilato de metila, é mais lenta nestas regiões do que através da pele de outras partes do corpo (WALTERS, 2002).

O estrato córneo tem propriedades de barreira e isso pode ser em parte relacionada à sua alta densidade (1,4 g/cm³, no estado seco), sua superfície de pequena área permite a passagem de substâncias (que é agora reconhecido que a maioria das substâncias permeiam a pele através de regiões intercelulares do estrato córneo com uma largura inferior a 0,1 μm). Cada célula do estrato córneo é composto principalmente de queratina insolúvel (~ 70%) e lipídios (~ 20%), contribuindo com cerca de 5% do peso do estrato córneo.

A região intercelular consiste principalmente de lipídios e desmossomos os quais promovem a coesão dos corneócitos. A função de barreira é facilitada pela descamação contínua da camada córnea ocorrendo uma vez a cada 2 ou 3 semanas. Assim, os agentes muito lipofílicos, tais como protetores solares, podem ser menos absorvidos pelo organismo uma vez aplicados sobre a pele. O estrato córneo também funciona como uma barreira para evitar a perda dos componentes internos do corpo, especialmente perda de água, para o ambiente externo. Pode ser estimado que a eficácia desta barreira é de tal forma que a perda de água de perspiração é limitada a 0,5 $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{h}^{-1}$, ou seja, 250 mL de água por dia para um adulto normal. Transtornos da epitelização, como a psoríase, leva a uma descamação mais rápida da pele, podendo ser em torno de 2 ou 4 dias, com inadequada formação do estrato córneo e consequentemente inadequada função de barreira (BENY, 2000).

As células do estrato córneo são originadas na epiderme viável e sofrem muitas alterações morfológicas antes da descamação. Assim, a epiderme é constituída por várias camadas de células em diferentes níveis de diferenciação. As células da epiderme são originadas na lâmina basal entre a derme e epiderme viável. Nessa camada há melanócitos, células de Langherans, as células de Merckel, e dois grandes tipos de queratinócitos: primeiro o funcionamento como células-tronco com capacidade de se dividir e produzir novas células, o segundo para servir de suporte para a epiderme da membrana basal (BENY, 2000; MORGANTI *et al.*, 2001)

11.2.2. A derme

A derme é um componente crítico do corpo, não só fornece os sistemas de apoio nutricional, imunológico, e outros para a epiderme, através de uma fina camada papilar adjacente à epiderme, como também desempenha um papel de temperatura, pressão e regulação da dor. O principal componente estrutural da derme é referido como grossa camada reticular. A derme possui cerca de 0,1 - 0,5 cm de espessura e é constituída por 70% de fibras colágenas, fornecendo um andaime de suporte e amortecimento, e do tecido conjuntivo elástico, proporcionando elasticidade, em uma matriz de mucopolissacarídeos. Em geral, a derme tem uma população de células esparsas. As principais células presentes são os fibroblastos, que produzem os componentes do tecido conjuntivo de colágeno, laminina, fibronectina e vitronectina e mastócitos, que estão envolvidas nas respostas imunes e inflamatórias, e melanócitos envolvidos na produção do pigmento melanina (WALTERS, 2002).

Junto da derme é encontrada uma extensa rede vascular, que prevê a nutrição da pele, reparo e respostas imunes e, para o resto do corpo, a troca de calor, a resposta imune e regulação térmica. A taxa de fluxo de sangue para a pele é de cerca de $0,05 \text{ mL min}^{-1} \text{ cc}^{-3}$, os vasos sanguíneos da pele derivam do tecido subcutâneo, com uma rede arterial suprindo a camada papilar, os folículos pilosos, o suor e as glândulas apócrinas, a região subcutânea, bem como a própria derme. Estas artérias suprem as arteríolas, os capilares, vênulas e, dali, para as veias (WALTERS, 2002).

As mudanças no fluxo de sangue são mais evidentes na pele em relação a diversas respostas fisiológicas e incluem efeitos psicológicos, tais como levar um “susto” (“pele torna-se pálida”) e ficar envergonhado (“corar”); efeitos da temperatura e as respostas fisiológicas ao exercício físico, hemorragia e ao consumo de álcool.

O sistema linfático é um componente importante da pele na regulação de sua pressão intersticial, na mobilização de mecanismos de defesa, e na eliminação de resíduos. Ele existe como uma malha densa e lisa nas camadas papilares da derme e se estende até as regiões mais profundas da derme. CROSS & ROBERTS (1993) mostraram que, enquanto o fluxo sanguíneo determina o afastamento de pequenos solutos, tais como água e lidocaína, o fluxo linfático é um importante determinante na remoção de grandes solutos da derme. Também estão presentes na derme diferentes tipos de fibras nervosas suprindo as necessidades da pele, como a percepção de pressão, dor e temperatura. (BENY, 2000; MORGANTI *et al.*, 2001).

11.2.3. A hipoderme

É a camada mais profunda da pele chamada também tecido subcutâneo ou hipoderme. A hipoderme atua como um isolante térmico, um amortecedor de choque, e uma região de armazenamento de energia. Esta camada é uma rede de células de gordura disposta em lóbulos e ligados à derme através da interligação de colágeno e elastina. Bem como as células de gordura (possivelmente 50% da gordura do corpo), as outras células principais na hipoderme são fibroblastos e macrófagos. Uma das funções principais da hipoderme é levar o sistema vascular e neural para a pele.

Também serve como uma âncora para a pele se ligar com o músculo subjacente. Os fibroblastos e adipócitos podem ser estimulados pelo acúmulo de líquido intersticial e do sistema linfático dentro da pele e do tecido subcutâneo (WALTERS, 2002; BENY, 2000; MORGANTI *et al.*, 2001; SZUBA & ROCKSON, 1997).

11.2.4. Anexos da pele

Existem quatro anexos da pele: os folículos pilosos associados com as glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas écrinas, as glândulas sudoríparas apócrinas e as unhas. Cada apêndice tem uma função diferente. Os folículos pilosos são distribuídos por toda a superfície cutânea, com exceção das solas dos pés, palmas das mãos e dos lábios. A musculatura lisa junto aos pêlos eretores atribui o folículo para a derme e permite que o cabelo fique em “pé” em resposta ao medo. Cada folículo está associado a uma glândula sebácea, que varia de tamanho entre 200-2000 μm de diâmetro. O sebo secretado por esta glândula, consistindo de triglicérides, ácidos graxos livres e ceras protege e lubrifica a pele, bem como a manutenção de um pH de cerca de 5,0. A área fracionada é ligeiramente superior a 1 / 1000 do total da superfície da pele. Também as glândulas sudoríparas e glândulas apócrinas, respondem por cerca de dois - terços e um - terço de todas as glândulas, respectivamente. As glândulas écrinas são estruturas epidérmicas simples, como se fossem tubos enrolados decorrentes de uma “bola” enrolada, de aproximadamente 100 μm de diâmetro, localizados na derme profunda. Ela segrega uma solução diluída de sal com um pH de cerca de 5,0, sendo esta secreção estimulada pela mudança de temperatura corporal, tais como o exercício físico e ambiente de alta temperatura, bem como o estresse emocional através do sistema nervoso autônomo (simpático). Estas glândulas têm uma superfície total de cerca de 1 / 10000 da superfície total do corpo. As glândulas apócrinas são limitadas a regiões específicas do corpo e também parecem tubos enrolados. Estas glândulas são cerca de dez vezes o tamanho dos ductos écrinos e permanecem emparelhadas com os folículos pilosos.

A unha sob muitos aspectos pode ser considerada como vestigial em humanos. No entanto, algumas funções de proteção podem ser atribuídas. Certamente a composição da placa ungueal, as camadas de células queratinizadas achatadas e densas, mas um pouco elástica, vai proporcionar certa proteção da falange terminal altamente sensível. As células da

lâmina ungueal originários da matriz ungueal e distalmente crescem a uma taxa de cerca de 0,1 mm / dia.

No processo de queratinização as células sofrem mudanças semelhantes às vividas pelas células epidérmicas que formam o estrato córneo. Isto não é surpreendente porque a matriz ungueal da membrana basal apresenta muitas similaridades bioquímicas da membrana basal da epiderme. Assim, a expressão das integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ na matriz da unha e na membrana basal é indicativo de um tecido altamente proliferativo. A estrutura das camadas queratinizadas é muito coesa, mas, ao contrário do estrato córneo, não ocorre a esfoliação de células. Dado que é uma estrutura epitelial cornificada, a composição química da placa ungueal não é singular, e existem muitas semelhanças com a do cabelo (BANDEN *et al.*, 1973; GNIADZKA *et al.*, 1998). Assim, os principais componentes são proteínas de queratina altamente dobráveis (que contêm muitas ligações dissulfeto), com pequena quantidade de lipídios (0,1 - 1,0%), este último provavelmente localizadas nos espaços intracelulares. O principal componente da lâmina ungueal é a água, que está normalmente presente em uma concentração de 7-12%.

A lâmina ungueal é composta por duas camadas principais (a camada intermediária e dorsal), com, eventualmente, uma terceira camada adjacente ao leito ungueal. A lâmina ungueal dorsal é mais resistente e mais fina do que a placa intermédia, o que sugere que existam diferenças na composição química das duas camadas, que sugerem ainda que os medicamentos aplicados possuam diferentes tendências de separação entre as camadas. Este último é um aspecto particularmente importante para o tratamento tópico de infecções fúngicas das unhas (onicomicoses) e os mecanismos para aumentar a solubilidade e difusividade de drogas dentro dessas camadas (KOBAYASHI *et al.*, 1999).

11.3. A pele como meio de liberação de ativos

A absorção percutânea de produtos farmacêuticos pode ser tanto local ou sistêmica. A liberação do ativo é um processo desejável e pode ser alcançada pela combinação de propriedades adequadas para a absorção de ativos pela pele com quantidade apropriada de dosagem e forma farmacêutica (por exemplo, adesivos medicamentosos, géis, cremes e pomadas). Substâncias terapêuticas têm sido aplicadas sobre a pele por muitos séculos (WALTERS, 2002) e, na verdade, muitos fármacos sob a forma de extratos vegetais ou animais têm sido aplicadas para o alívio ou uma variedade de distúrbios locais. Nos últimos anos, a absorção, sistêmica através da via transdérmica tem levado ao desenvolvimento e comercialização bem sucedida de vários medicamentos em forma de adesivos medicamentosos (por exemplo, escopolamina, nitroglicerina, clonidina, estradiol, testosterona, timolol, fentanil e nicotina). O número de compostos para aplicação transdérmica está aumentando e está sendo selecionado como um potencial no mercado farmacêutico (MORGANTI *et al.*, 2001)

Outro tópico de grande interesse na atualidade é o novo contexto em que a pele se insere: a sua estreita relação com o sistema nervoso. A pele apresenta alto grau de especificidade para reconhecer e integrar sinais, possuindo receptores para neurotransmissores iguais aos do sistema nervoso central. O uso de substâncias como óleos essenciais, fitoendorfinas, peptídeos sintéticos, fito-hormônio e produtos biotecnológicos têm sido usados em formulações tópicas com a finalidade de manter a pele saudável e com um bom aspecto, com base em ações de níveis neuronais e endócrinos, visando a sensação de bem estar (SLOMINSKI, 2008; NAMJOSHI et al., 2007). Os exemplos descritos anteriormente demonstram as grandes possibilidades de atuação de substâncias ativas na pele, salientando as variedades de produtos que podem ser estudadas na dermatologia e na cosmética dermatológica.

11.4. Vantagens e desvantagens da via de absorção transdérmica

Em contraste com a tradicional via oral, o metabolismo de primeira passagem é minimizado, o que muitas vezes pode limitar a tolerância e eficácia de muitos fármacos por via oral e parenteral. Além disso, alguns fármacos degradam no meio ácido do estômago, e outros fármacos, tais como AINEs, podem causar hemorragia ou irritação gastrointestinal. A mistura de medicamentos com alimentos no estômago, e os impulsos estomacais, muitas vezes erradicam a liberação do fármaco para o intestino levando a uma variabilidade no perfil da concentração plasmática. A via transdérmica oferece um controle maior da dosagem do fármaco, método não invasivo e de liberação controlada, com a vantagem adicional de ser capaz de cessar a absorção em caso de superdose ou de outros problemas. Além disso, a adesão do paciente pode ser melhorada por causa da frequência reduzida de administração de medicamentos e o trauma associado à terapia parenteral.

Tal como acontece com as outras vias de administração de fármacos, a administração através da pele também está associada com várias desvantagens, o principal inconveniente é que nem todos os compostos são adequados; as variações nas taxas de permeação pode ocorrer entre pessoas, raças diferentes, e entre os idosos e os jovens. Além disso, a pele doente bem como a extensão da doença também pode afetar as taxas de permeabilidade (ROBERTS & WALTERS, 1998). A enzima metabólica na pele também pode representar um problema e alguns fármacos são quase completamente metabolizadas antes que eles atinjam a vasculatura cutânea. Outro problema que pode surgir, por vezes esquecido, é que alguns fármacos podem sofrer partição por bactérias que vivem na superfície da pele antes da penetração através do estrato córneo (HOTCHKISS, 1998).

11.5. Estrato Córneo como uma barreira

A barreira do estrato córneo é agora reconhecida como o grande avanço limitante do processo de difusão de um fármaco para permear toda a pele. No entanto, como apontado por SCHEUPLEIN & BLANK (1986), outros componentes da pele podem contribuir para a barreira de resistência, especialmente para as substâncias lipofílicas. SCOTT et al., (1986) mostraram

que a permeabilidade da água in vivo e in vitro aumentou após leves alterações superficiais na epiderme. SCHAEFER et al., (1977) mostraram que na pele psoriática, as concentrações do fármaco (triamcinolone acetonide) na epiderme e derme eram da ordem de 3 a 10 vezes maior do que na pele normal. Um aumento semelhante foi observado quando o SC foi removido por decapagem antes da aplicação da droga.

O transporte através do SC é basicamente um processo passivo e, assim, as propriedades físico-químicas de um permeante são um importante determinante da sua capacidade de difusão através dessa membrana. Existem três vias consideradas e conhecidas pelas quais os compostos podem difundir através do SC: transcelular, intercelular e através dos anexos da pele (transapêndices). Uma vez que um composto é transportado através da epiderme, o mesmo pode ser carregado pelo sangue presente na derme e ser transportado para os tecidos mais profundos da pele. Portanto, devido à estrutura da pele, as propriedades físico- químicas desejadas para um permeante são dependentes da via percorrida por este para atravessar o SC (WALTERS, 2002).

11.6. O sebo produzido pela pele

A superfície da pele é o primeiro ponto de contacto para uma formulação aplicada topicamente. Sob circunstâncias normais, este é coberto por uma camada irregular e descontínua de 0,4 a 10 μm de sebo, suor, bactérias e células mortas. A presença desta camada é considerada como um efeito insignificante sobre a absorção percutânea, no sentido de permitir que materiais polares e apolares penetrem na pele. Além disso, nenhuma correlação foi encontrada entre o estado de hidratação da SC com o da remoção da camada de sebo retirada com solventes e a quantidade total de lipídios seborréicos ou sua composição.

Assim, a contribuição desse material endógeno sobre a superfície da pele, para o processo de transporte de substâncias através da pele é efetivamente desconsiderado. Como afirmado anteriormente, a pele é uma barreira importante para a penetração de compostos indesejáveis e uma via potencial de penetração de fármacos. Portanto é importante compreender como as moléculas atravessam a pele e como esses processos podem ser influenciados para melhorar a permeação (WALTERS, 2002; BENY, 2000).

11.7. Absorção de formulações tópicas

A maioria dos fármacos aplicados na pele possui ação nas camadas mais profundas da pele, portanto necessitam permear o estrato córneo para chegar ao seu local de ação. Considerando a constituição e o efeito protetor do estrato córneo, vários fármacos podem apresentar dificuldades em atravessar essa barreira e atingir seu sítio de ação (Barry, 2004).

As maneiras gerais para os fármacos alcançarem a epiderme viável são: via transepidérmica ou via transapêndices. Pela via transepidérmica, o fármaco pode percorrer dois caminhos: a via transcelular e a via intercelular. Por meio da via transcelular o fármaco

passa pelas estruturas lipídicas do estrato córneo (membrana celular) e pelo citoplasma dos queratinócitos, encontrando estruturas lipofílicas e hidrofílicas, o que lhe dificulta a permeação.

A via mais comum de permeação é a via intercelular, em que o fármaco passa pela matriz extracelular, de características hidrofílicas, conforme a ilustração da Figura 92 (TROMMER, 2006).

O fármaco pode atingir a epiderme viável passando pelos apêndices (glândulas e folículos pilosos). No entanto, a absorção por essa via não é significativa já que essas estruturas ocupam uma pequena parte de toda a superfície da pele (TROMMER, 2006).

Diversas propriedades podem interferir na absorção de fármacos na pele. As características da molécula do fármaco (FORTENBACH & MAIBACH, 2008) as condições biológicas da pele e a composição do veículo usado (OTTO *et al.*, 2009; GWAK & CHUN, 2002) para a incorporação da substância ativa alteram significativamente a penetração, afetando a biodisponibilidade do fármaco. Dentre os principais fatores podemos destacar: dose, estado da pele, como o comprometimento da função barreira, sítios regionais da pele, idade, hidratação, composição do veículo e características do fármaco. Considerando que a passagem do fármaco pela barreira da pele é feita por difusão, a concentração do fármaco presente na formulação interfere significativamente na velocidade de permeação. A situação ideal é que seja utilizada uma formulação saturada, permitindo que o fármaco seja liberado mais facilmente da formulação (BARRY, 2005).

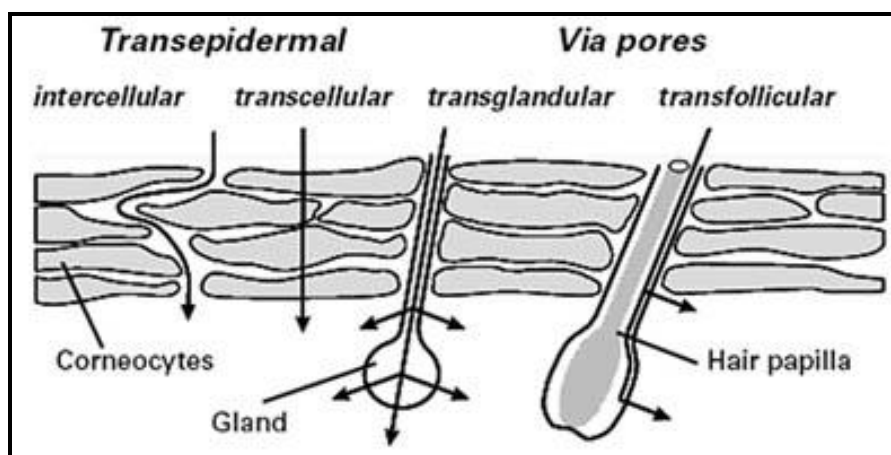


Figura 92: Ilustração esquemática demonstrando diferentes maneiras de penetração de fármacos no estrato córneo. Extraído de: TROMMER, 2006.

11.8. Vias de transporte através do estrato córneo

11.8.1. Via Transcelular

Originalmente os mecanismos de difusão transcelular dominavam sobre o intercelular e transapêndices durante a passagem de substâncias através do SC. No entanto a via transcelular envolveria a separação da molécula da droga entre os compartimentos lipofílicos e

hidrofílicos, incluindo a quase impenetrável matriz extracelular formado por corneócitos, queratina e queratohialina. SCHEUPLEIN & BLANK (1986) sugeriu ainda que substâncias polares e apolares permeiem o estrato córneo por mecanismos diferentes. As substâncias polares se difundem através de uma via de alta energia envolvendo água imobilizada próxima a superfície externa de filamentos de queratina. Em contrapartida, as substâncias lipossolúveis se difundem através de vias apolares (intersticial), via lipídica. ROBERTS *et al.*, (1978) sugeriu que todos os solutos são transportados através de uma via lipídica, sendo este transporte melhorado em alguns casos pelo efeito da água imobilizada na camada da epiderme viável, como evidenciado por um decréscimo da energia de ativação para permeação. SCHEUPLEIN & BLANK (1986) também reconheceram que a derme contribuiu para a resistência de substâncias mais lipofílica. As evidências experimentais sugerem que o transporte através da SC é pela via intercelular.

11.8.2. Via intercelular

Os espaços intercelulares do estrato córneo foram descartados inicialmente como uma via de difusão potencialmente significativa devido ao pequeno volume que ocupam. Entretanto, a estrutura física dos lipídeos intercelulares é um fator significativo nas propriedades de barreira da pele. Estudos de SQUIER, 1973; ELIAS & FRIEND, (1975) forneceram evidências de que os lipídios intercelulares, e não a proteína corneócito, foi a principal barreira de permeabilidade da epiderme. CHANDRASEKARAN & SHAW, (1975) também concluiu que a barreira lipídica é dominante. Prova teórica, apresentada por ALBERY & HADGRAFT (1979), sugeriu que o caminho tortuoso de difusão intercelular em torno de queratinócitos foi a via preferencial de penetração através do estrato córneo, ao invés de difusão através das células queratinizadas (via transcelular). No entanto, é possível reconhecer que, apesar de considerações teóricas a favor desta via, existem dificuldades na elaboração de estudos de difusão adequados, para confirmar que esta rota é a via predominante (BUNGUE *et al.*, 1999).

A maioria das evidências da existência da via de transporte intercelular lipídica vem da estrutura microscópica da organização da bicamada lipídica, uma vez observada a localização histológica das substâncias presentes nestas bicamadas após aplicação tópica e os efeitos da deslipidização das bicamadas por solventes adequados. Estudos histoquímicos demonstraram que os espaços intracelulares do SC são desprovidos de lipídios (WALTERS, 2002) e que por causa de lipídios presentes em outras regiões é altamente apolar, não há estrutura adequada para formar uma matriz lipídica de difusão em torno dos filamentos de queratina intracelular. As evidências experimentais utilizando precipitação dos compostos aplicados percutaneamente levaram a visualização da permeação através de via intercelular.

As lamelas lipídicas no SC desempenham um papel fundamental na função de barreira da pele. Os lipídeos mais importantes são as ceramidas, o colesterol e ácidos graxos livres (BOUWSTRA *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 1992). Na realidade, a composição lipídica e disposição é muito mais complexa. Por exemplo, os lipídios presentes na epiderme poderiam ser

classificados como fosfolipídios, mono-hexosil ceramidas, ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, colesterol sulfato, triglicérides e ácidos graxos (WERTZ, 1992). Além disso, pelo menos seis subclasses de ceramidas, têm sido descritos em experimentos com SC de suínos (BOUWSTRA *et al.*, 1998; BOUWSTRA *et al.*, 1999)

11.9. Determinação da liberação de sistemas emulsionados e absorção através da pele por técnicas *in vitro*

Os métodos de absorção percutânea *in vitro* tem sido amplamente utilizado para quantificar a liberação de ativos de sistemas emulsionados e a absorção de compostos que entram em contacto com a pele. Avaliações de segurança de produtos químicos tóxicos frequentemente dependem de estudos *in vitro* para os dados de permeação em humanos. Os dados em animais devem ser utilizados com cautela para estimar a absorção em humanos devido à diferença nas propriedades de barreira da pele humana e animal.

A compreensão de como as moléculas da substância ativa passam pelas membranas sintéticas leva ao entendimento dos fatores que influenciam na liberação da substância ativa, a partir de sua matriz. Esta compreensão pode ser elucidada por tratamento matemático dos dados obtidos (AULTON, 2005). Por sua vez, após seleção de um modelo matemático adequado, é permitido a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: zero ordem, primeira ordem, Hixon- Crowell, Higushi, quadrático, Weibull, entre outros (POLLI, 1996; O'HARA *et al.*, 1998).

Modelos que se fundamentam em estudos da cinética de dissolução possibilitam conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação, uma vez que permitem conhecer: a velocidade do processo; a quantidade máxima dissolvida e pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução (O'HARA *et al.*, 1998; POLLI *et al.*, 1996; MOORE & FLANNER, 1996).

Em um processo de zero ordem, é possível relacionar a quantidade de massa m difundida acumulada que passa por unidade de área pela membrana em função do tempo, como demonstra a Figura 93. O estado estacionário (*steady-state*) é alcançado quando o gráfico se torna linear e a extrapolação da porção linear até o eixo do tempo, ou seja, para $m = 0$, têm se o valor de *lag time* L (AULTON, 2005).

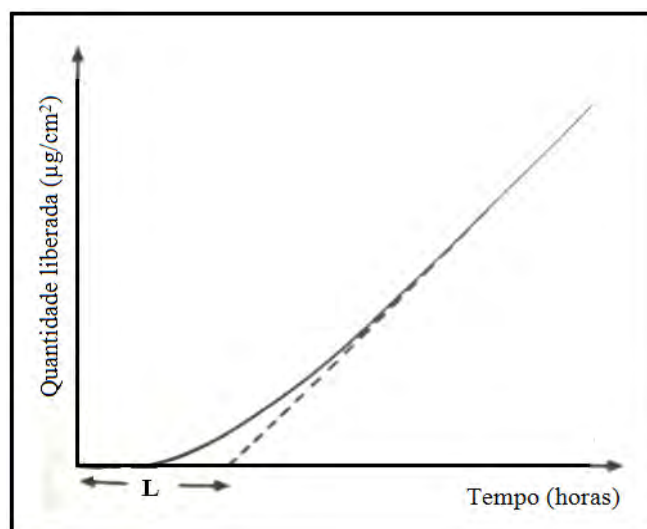


Figura 93 – Representação esquemática que traduz a curva de liberação *in vitro* de substâncias ativas que obedecem à cinética de zero ordem.

O tipo de ativo, a sua forma polimórfica, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica podem influenciar a cinética de liberação. (MANADAS, PINA & VEIGA., 2002).

Nos casos em que o veículo funciona como um mecanismo controlador da velocidade de cedência, a liberação da substância ativa do veículo é a etapa limitante para sua posterior ação terapêutica no local de ação. A Figura 94 demonstra o exemplo de liberação de uma substância que segue cinética de primeira ordem e a Figura 95 exhibe o comportamento de substâncias que possuem cinética de liberação de pseudoprimeira ordem ou que atendem a equação de Higuchi, isto é, a quantidade liberada é proporcional à raiz quadrada do tempo (AULTON, 2005).

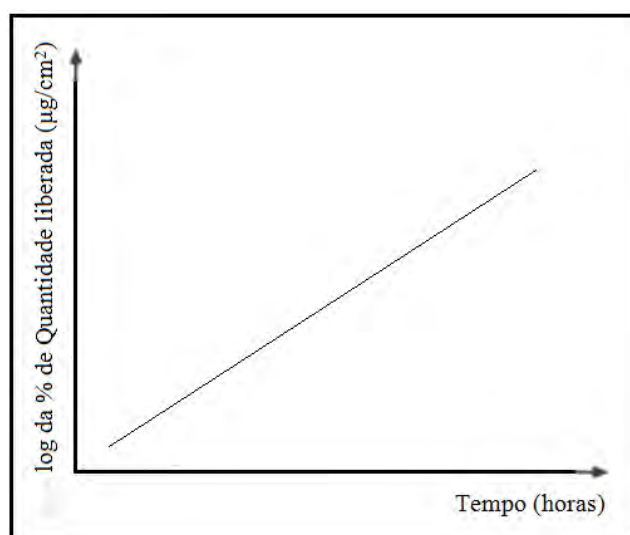


Figura 94 – Representação esquemática que traduz a curva de liberação *in vitro* de substâncias ativas que obedecem à cinética de primeira ordem.

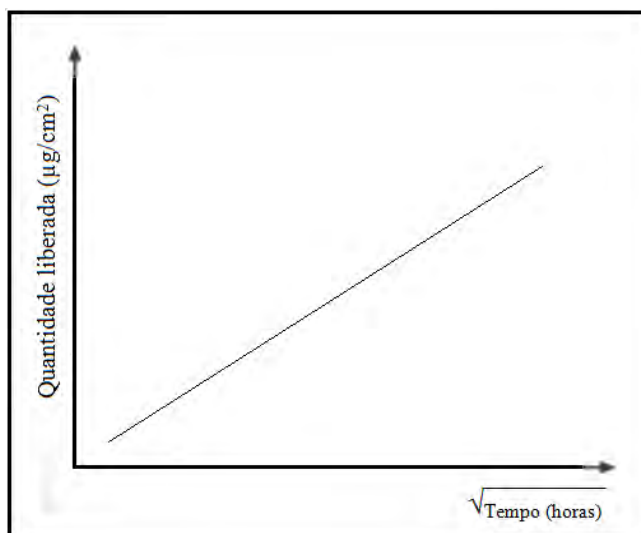


Figura 95 – Representação esquemática que traduz a curva de liberação *in vitro* de substâncias ativas que obedecem a cinética de pseudoprimeira ordem (lei de Higuchi).

O sistema *in vitro*, permite o isolamento da pele para que o metabolismo do órgão possa ser distinguido do metabolismo sistêmico. Os testes de permeação cutânea podem ser realizados por técnicas *in vitro*. Entre os métodos mais empregados pode ser destacado o que utiliza as células do tipo Franz, que está demonstrada na Figura 96.

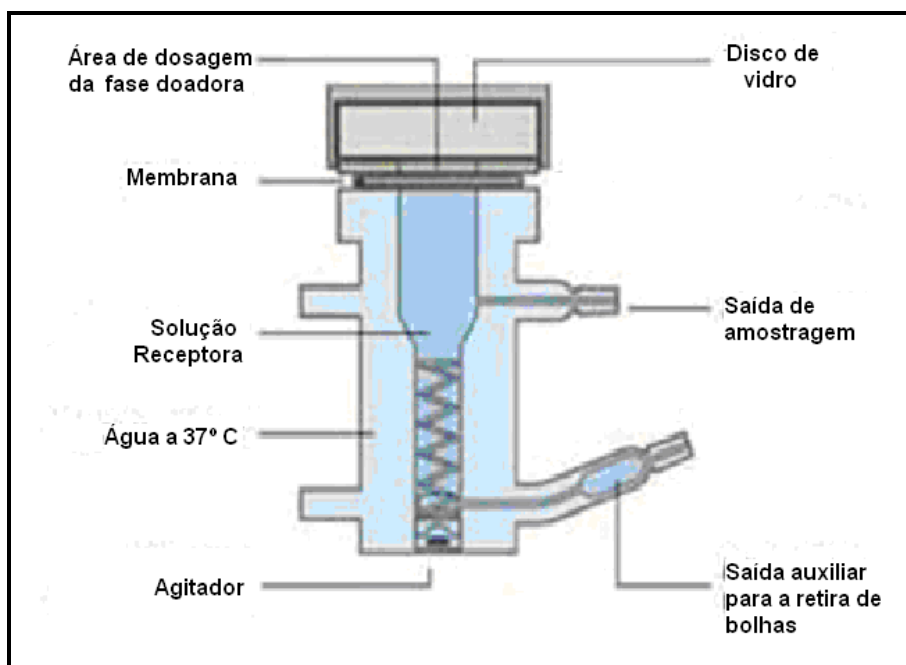


Figura 96. Célula de difusão do tipo Franz empregada nos estudos de permeação cutânea *in vitro* (BARRY, 1983; SASSON, 2006)

O sistema de difusão utilizando as células do tipo Franz pode ser formado por 6 células um número capaz de avaliar a permeação, compostas basicamente de compartimento doador, onde o produto testado é depositado, compartimento receptor, contendo solução na qual o ativo será difundido e a membrana que tem papel de barreira na absorção (FRANZ, 1975),

como o equipamento utilizado para a realização deste trabalho (HANSON RESEARCH FLOWSCIENCE-POLYSCIENCE), conforme pode ser visualizado na Figura 97.

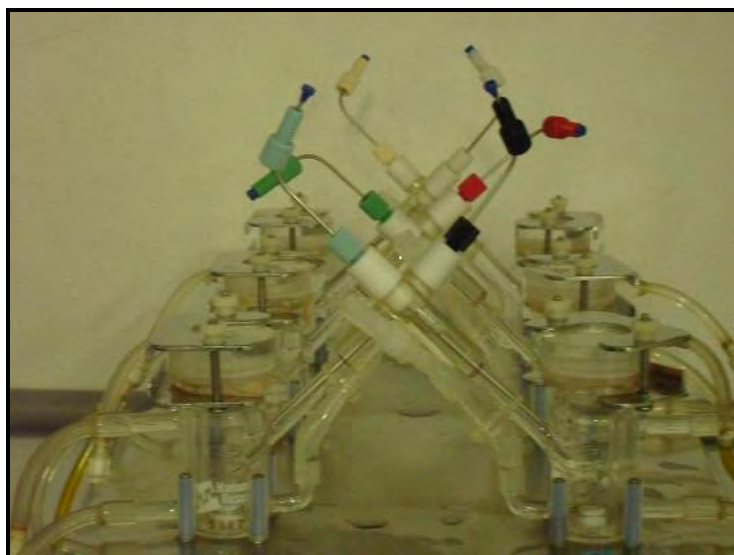


Figura 97. Fotografia do sistema de difusão composto de seis células do tipo Franz, conforme o equipamento utilizado (HANSON RESEARCH FLOWSCIENCE-POLYSCIENCE)

A maioria dos projetos de célula estática são baseadas em publicações por Franz em meados dos anos 1970 (FRANZ, 1975, 1978). Também foram utilizados nos testes iniciais em comparações para métodos *in vitro* - *in vivo*. Também é interessante notar que as informações podem ser obtidas através de outras membranas de pele, mas os resultados devem ser tratados com cautela. Membranas de vários modelos foram utilizadas, incluindo o acetato de celulose (BARRY E EL EINI, 1976) e zeólitas (DYER et al., 1979). É evidente que a maioria das informações sobre os mecanismos de penetração foi obtida em estudos de permeação *in vitro* e de 1940 a 1980 há um vasto conjunto de dados.

Ao longo das décadas, a atenção tem sido dada à penetração de água e é interessante que essa pequena molécula polar tenha uma profunda influência sobre as propriedades de barreira da pele. É um intensificador, como a pele hidratada é, em geral, mais permeável do que a pele não-hidratada, mas até hoje o mecanismo exato de ação não é claro. Várias publicações analisaram a permeação da água, sendo exemplos BENTLEY and GRICE (1967), BLANK (1952, 1953), BURCH & WINSOR (1946), DELONG et al. (1954), IDSON (1973); SCHEUPLEIN & MORGAN (1967).

Estudos tem demonstrado que as condições experimentais no projeto de teste *in vitro*, podem influenciar o valor preditivo do ativo *in vivo*. Vários estudos têm mostrado que as células estáticas fornecem resultados comparáveis para as taxas de absorção da pele para uma série de ativos permeantes, e ambos os tipos de células de difusão são consideradas aplicáveis (JAKASA & KEZIC, 2008)

Durante um estudo comparativo multicêntrico de absorção cutânea *in vitro* do ácido benzóico, cafeína e testosterona não existiu relação consistente entre o tipo de célula de difusão e a absorção dos compostos testados (VAN DE SANDT *et al.*, 2004). Em um outro estudo multicêntrico com a intenção de investigar a variação inter-e intra-laboratorial de medidas de difusão de células *in vitro* usando uma membrana padrão de silicone, constataram que não houve um padrão consistente de diferenças entre as células estáticas (CHILCOTT *et al.*, 2005).

Um dos pré-requisitos para um fluido receptor apropriado é uma solubilidade adequada da substância de ensaio no fluido receptor. Além disso, o fluido receptor não deve alterar as propriedades de barreira da membrana da pele. Para os compostos solúveis em água, o fluido receptor mais utilizado é a solução salina; compostos lipofílicos requerem o uso de um fluido receptor que mais se assemelha as propriedades lipofílicas de sangue. Para melhorar a solubilidade de compostos lipofílicos, solubilizantes, tais como albumina de soro bovino (BSA), solventes ou surfactantes podem ser adicionados ao fluido receptor (DELANGE *et al.*, 1994). No entanto, a adição de solventes orgânicos e surfactantes podem levar a alterações na pele (SARTORELLI *et al.*, 2000). Embora a natureza do fluido receptor pareça ter mais efeito sobre ativos lipofílicos, alguns estudos mostram que a existência de BSA (albumina sérica bovina) no fluido receptor pode influenciar significativamente ativos hidrofílicos (WILKINSON & WILLIAMS, 2002).

11.9.1. Tipos de pele utilizados nos ensaios de permeação *in vitro*

Os testes *in vitro* são realizados utilizando pele humana ou animal. As membranas da pele humana são geralmente preparadas a partir de mama e de pele abdominal, enquanto que para a obtenção de pele de animais, os locais mais utilizados são o flanco e parte traseira (rato) ou o flanco e orelha (de porco) (JAKASA & KEZIC, 2008). É de extrema importância que durante o preparo da pele não leve ao dano da barreira cutânea, o que pode ser enganosamente superestimada a absorção. A integridade da amostra de pele deve ser determinada antes dos experimentos de permeação, através da medição de uma substância marcadora como utilizando um traçador radioativo, a água tritiada ou por determinação da perda de água transepidérmica ou resistência elétrica transcutânea.

Diferentes tipos de amostras de pele podem ser usadas em sistemas *in vitro*: pele de espessura total, que integra o estrato córneo, epiderme viável e derme; pele dermatomizada (espessura parcial) em que a derme profunda foi removida e membranas epidérmicas, incluindo a epiderme viável e estrato córneo. Várias orientações especificam o intervalo de espessura da pele que podem ser utilizados e afirmam que a espessura da pele deve ser medida e reportado nos resultados.

Estudos têm demonstrado que o tipo do tecido da pele é o maior contribuinte para a relativa e elevada variabilidade observada nos testes *in vitro* (KASTING *et al.*, 1994). Geralmente é reconhecido que a absorção de compostos lipofílicos no fluido receptor é reduzido significativamente através da pele de espessura total em comparação com a pele de

espessura parcial por causa da resistência de difusão da derme para ativos hidrofílicos quando comparados com ativos lipofílicos. A influência da espessura da pele (espessura total da pele versus dermatomizada) foi investigada utilizando compostos químicos com diferentes coeficientes de partição octanol-água (P), incluindo a cafeína ($\log_P -0,01$), testosterona ($\log_P 3,3$), propoxur ($\log_P 1,5$) e butoxietanol ($\log_P 0,83$) (WILKINSON et al., 2006).

A espessura da pele pouco influenciou a absorção hidrofílica do ácido benzóico e da cafeína. Já a taxa de absorção máxima de testosterona e butoxietanol foi drasticamente reduzida através da pele de espessura total, em comparação com a pele dermatomizada. As taxas de redução da absorção através da pele de espessura total para o butoxietanol altamente hidrofílico foram surpreendentes, mostrando uma relação mais complexa entre a espessura da pele, lipofilicidade, e princípio ativo (PA). O efeito da espessura da pele para compostos hidrofílicos também foi encontrado para o etoxietanol ($\log_P -0,32$). A redução da absorção de compostos químicos lipofílicos por meio de pele de espessura total foi também relatada por CNUBBEN et al., 2002, que descobriu que a permeação de α -fenilfenol ($\log_P 3,28$) através da pele humana e de rato, de espessura total foi muito menor do que a permeação através apenas da epiderme. No caso de mais hidrofílico como o propoxur ($\log_P 1,56$), a dose absorvida e fluxo máximo ficaram em boa concordância com os dados *in vivo* quando a pele de espessura total foi utilizada. Os exemplos acima demonstram que a espessura da pele desempenha um papel importante na absorção *in vitro*, e isso tem de ser considerada não apenas na avaliação de risco, mas também quando se usa esses dados para o desenvolvimento de relações quantitativas de estrutura-atividade (JAKASA & KEZIC, 2008).

11.9.2. Ensaios de toxicidade *in vitro*

A necessidade da realização de ensaios utilizando animais tem sido seriamente questionada por camadas poderosas da sociedade, seja no âmbito político, social, ético ou científico. Os grupos que argumentam a favor da abolição da experimentação animal têm encontrado um suporte significativo na Europa e Estados Unidos, e suas idéias têm se expandido por todo o mundo. Diante desse cenário, é possível dizer que diversos setores da indústria e mesmo os órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade estão sob crescente pressão para substituir ensaios *in vivo* por métodos alternativos que não utilizem animais (EUN & SUH, 2000).

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de produtos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso humano e depois de comprovada a sua não

toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório.

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto.

Assim sendo, justifica-se o incentivo e preocupação de estudar modelos experimentais *in vitro* que possam avaliar quantitativa e qualitativamente os efeitos dos produtos sobre a pele ou na região dos olhos, no sentido de serem obtidas formulações seguras.

11.9.3. Cultura de células

A primeira tentativa para realizar o cultivo celular de tecidos foi iniciada no século XIX, quando em 1907 o pesquisador Ross Harrison implantou pequenos fragmentos de tubo neural de rã em coágulos de linfa da mesma espécie e observou ao microscópio a migração de fibras nervosas. Em 1912, o pesquisador Aléxis Carrel, observou que quando o plasma era coagulado, era um excelente suporte para fragmentos de tecidos, mas não continha as substâncias necessárias para o crescimento e que, com a adição de extratos de embriões ou de tecidos era possível a proliferação celular. Como Carrel conhecia muito bem as técnicas de assepsia, ele conseguiu manter por 34 anos uma linhagem de fibroblastos de galinha (RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983).

Infelizmente, estas técnicas assépticas, desencorajavam muitos pesquisadores que acreditavam que culturas de células eram muito difíceis e sofisticadas (RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983; FRESHNEY, 1987)

Por volta dos anos 40, teve início o desenvolvimento dos meios líquidos e a descoberta dos antibióticos o que facilitou e muito os experimentos com cultura de células, o que deu início neste momento, a base de diversas pesquisas. A primeira linhagem celular infinita isolada a partir de tecido subcutâneo de camundongo, recebeu o nome de linhagem L. Desta linhagem, em 1948, por técnicas de clonagem ocorreu o isolamento de uma nova linhagem denominada NCTC clone 929, até hoje utilizada nos estudos de toxicidade (RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983; FRESHNEY, 1987).

A primeira linhagem celular humana, denominada HeLa, originada de carcinoma de cérvix uterino (CASTRO, 1978; PAUL, 1975; RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983) foi isolada no início da década de 50. As linhagens, até então, iniciavam pela técnica de cultura de tecidos, os quais eram removidos dos organismos vivos, em condições estéreis e incubados em ambiente apropriados para sua manutenção e/ou crescimento. Ao contrario da cultura de órgãos, não havia a preocupação de manter a sua arquitetura (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987).

Por volta de 1952, Dulbeco e Moscona introduziram o uso da tripsina, usada para dissociar as células dos tecidos e com isso obter réplicas da culturas idênticas, impulsionando

os estudos sobre formulações de meios quimicamente definidos e o crescimento das células sobre o vidro (CASTRO, 1978). O termo cultura de células surge com esta inovação na metodologia e significa cultivo de células dispersas de um tecido ou órgão por ação física ou química. Estas células, após serem semeadas em recipientes apropriados, formam uma monocamada celular utilizada como substrato nos mais variados estudos (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987).

O isolamento de várias linhagens celulares, de origem humana e animal, dos mais variados tecidos e órgãos, bem como a descoberta de que a adição de glicerina nas culturas possibilitava o seu congelamento, preservando suas características e viabilidade, permitiu que alguns bancos de células fossem montados, facilitando o desenvolvimento de muitas pesquisas (CASTRO, 1978).

Na década de 60 foi fundado o American Culture Collection (ATCC), que atualmente fornece linhagens certificadas e elabora manuais de controle de qualidade, onde todos os cuidados para caracterização e manutenção de uma linhagem celular são descritos. Estes procedimentos podem ser adotados por todos os laboratórios que utilizam as células na pesquisa e no diagnóstico (CRUZ, 2003).

Desde então, as técnicas de culturas celulares são amplamente empregadas, pois são econômicas, relativamente fáceis de serem mantidas e requerem pouco espaço físico. Podem ser utilizadas para preparar antígenos, anticorpos monoclonais, produzir vacinas, no isolamento de microrganismos, particularmente muitos vírus e ainda na avaliação da toxicidade dos mais variados produtos incluindo os cosméticos (CRUZ, 2003).

11.10.3.1. Ensaio *in vitro* utilizando cultura de células

Devido aos grandes questionamentos quanto ao uso de animais de laboratório, na avaliação de riscos dos produtos de uso humano na década de 60 foram iniciados estudos de metodologias que utilizaram tecidos e células vivas de mamíferos, organismos inferiores e substratos inertes (CRUZ, 2003). Estes estudos têm por finalidade principal obter metodologias rápidas, baratas, de fácil execução e reprodutibilidade que podiam ser padronizadas e validadas, situação imprescindível para que os métodos *in vitro* alcançassem a aceitação científica internacional.

Em 1965 ROSENBLUTH et al., (1965) sugeriu as primeiras metodologias descritas para avaliação *in vitro*, propondo o teste da biocompatibilidade para avaliar plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. Neste ensaio os materiais eram colocados diretamente sobre uma monocamada de células de mamíferos e após 24 horas estas células eram observadas para verificar se havia ou não a presença de algum efeito tóxico.

No mesmo ano, GUESS et al., (1965) descreveram o método de difusão em ágar, onde a monocamada celular era sobreposta por uma camada de ágar e os materiais a serem

testados eram colocados sobre esta camada evitando, assim, os problemas apresentados quando colocados diretamente em contato com a monocamada celular.

COMBIER & CASTELLI (1992) compararam o teste de irritação ocular de Draize e o método de difusão em Agar utilizado como alternativo. Algumas modificações no protocolo original do método *in vitro* foram introduzidas, a lise em relação à toxicidade foi definida por um método planimétrico, onde o tamanho da área das células mortas é desenhado em papel, que após ser pesado pode fornecer quatro classificações diferentes. Neste estudo, os resultados foram agrupados em duas classes, designadas como não irritante e irritante e a correlação observada entre os dois métodos foi de 86% de concordância. O método de difusão em ágar, segundo os autores, pode ser incluído na bateria de testes para avaliar o potencial de irritação dos produtos cosméticos.

A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parâmetros empregados e dentre os mais citados na literatura encontramos o brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT) e o vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride). O MTT é um sal amarelo solúvel, metabolizado pela enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria, que se transforma em um produto azul insolúvel. O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade/morbidade da célula ou a perda da permeação da membrana inibe a incorporação destes corantes (HARBELL et al., 1997).

No início da década de 80, MOSMANN (1983), BORENFREUD & PUERNER (1984) descreveram outra técnica para quantidades elevadas de amostras. Nesta técnica, as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por metodologia colorimétrica, utilizando a redução do MTT ou a incorporação do vermelho neutro, os quais são quantificados por espectrofotometria. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50% de morte celular. Desde então, vários estudos comparando o uso do vermelho neutro com o MTT ou estudos utilizando um destes corantes têm sido realizados para a determinação do índice médio de citotoxicidade de muitas substâncias (CRUZ, 2003).

Em 1998 os pesquisadores CHIBA, KAWAKAMI & TOHYMA 1998, realizaram um estudo, no qual analisaram a viabilidade e o crescimento celular, na mesma célula, usando simultaneamente vermelho neutro, MTT e cristal violeta. O método pode ser útil na avaliação da citotoxicidade de substâncias mediadas por diferentes mecanismos, levando a diferentes respostas e, ainda, o uso de vários tipos de avaliação evitaria resultados duvidosos. Estudos comparando simultaneamente a viabilidade e o crescimento celular utilizando os corantes vermelho neutro e o *amino black* respectivamente, mostraram boa correlação com a combinação dos dois métodos no mesmo ensaio, resultando em informações tanto sobre a viabilidade como sobre o número de células (CIAPETTI et al., 1996).

Outros vários modelos de ensaio *in vitro* foram desenvolvidos no intuito de encontrar um protocolo que substituísse o ensaio *in vivo*, dentre eles os chamados organotípicos, que empregam órgãos isolados do animal, mantidos por curto período de tempo *in vitro* preservando suas funções fisiológicas e bioquímicas. Os mais conhecidos são ensaios com olho isolado de coelho (IRE), olho isolado de galinha (CEET), opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP) e cristalino bovino. Todos estes métodos foram elaborados com o propósito de selecionar e avaliar o potencial irritante de várias substâncias, antes de serem aplicadas no método tradicional de irritação ocular de Draize (CHAMBERLAIN et al., 1997).

12. OBJETIVO

Avaliar a liberação, permeação e retenção cutânea do ácido alfa – lipóico e o estudo da toxicidade *in vitro*.

13. MATERIAL E MÉTODOS

13.1. Material, acessórios e equipamentos

Material: membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose (nitrato 70-80% e acetato), com tamanho de poro de 0,45 µm, Pele de orelha de porco dermatomizada 500 µm, tampão fosfato pH 7,4, polisorbato 80 (Polysorbate 80), fita adesiva (3M), metanol (PA), ácido alfa-lipóico material referência, ácido alfa-lipóico (matéria prima), células de hepatoma humano (HepG₂), células de queratinócitos imortalizados de pele (HaCaT), meio de cultura DMEM (Sigma), soro fetal bovino (Cultilab), antibióticos (penicilina e estreptomicina), tripsina, álcool isopropílico (PA), PBS (tampão), MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), etanol 70%, propilenoglicol (synth), água Milli-Q, solução de HCL 0,1 N, solução de NaOH 0,1 N.

Acessórios: bécker, bastão de vidro, espátulas, tubos de ensaio, estante para tubos de ensaio, pinça, pipeta de Pasteur, fita adesiva (3M, Scotch 550), papel de filtro qualitativo, balões de diluição, pipeta graduada, micropipetas, pipetas multicanal, placas para ELISA de 96 poços, garrafas de cultivo celular, tubos falcon estéreis de 15 e 50 mL, luz UV, luvas cirúrgicas descartáveis e frascos de vidro estéreis.

Equipamentos: balança analítica (Gehaka, BG 2000), Célula de difusão do tipo Franz (Hanson Research Flowscience-Polyscience), agitador (Minishaker JK, MS1), banho de ultrassom (QUIMIS, Q-335D), espectrofotômetro de UV/VIS (UV-VIS, Hewlett Packard® KAIK-XA-modelo 8453), centrífuga (Eppendorf S 810 R), estufa de CO₂ para cultura (Shel Lab), leitor de placas (Bio-Rad, modelo 550), fluxo laminar (VECO), pHmetro (MARCONI), microscópio óptico (Olympus CK 2), agitador de tubos (Phoenix AP56) e microondas (Eletrolux)

13.2. Métodos

Permeação cutânea

A permeação de substâncias ativas na pele depende de dois passos consecutivos: liberação dessa substância pelo veículo e penetração cutânea. As substâncias ativas incorporadas em veículos inadequados podem penetrar pouco ou quase nada na pele. Baseado neste fato, é possível considerar que estudos prévios são necessários sobre a liberação do ativo para a realização do teste de permeação cutânea. Para determinar a liberação ou cedência do ácido alfa-lipóico das emulsões O/A, o teste de permeação propriamente dito e os testes de retenção no estrato córneo e na epiderme/derme (ALENCASTRE *et al.*, 2006; BENTLEY, 1994; RIEGER, 1996).

13.2.1. Teste de liberação

Para este teste, as membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose (nitrato 70-80% e acetato), com tamanho de poro de 0,45 µm foram colocadas sobre as células de difusão em contato com o meio receptor (7 mL de tampão fosfato pH = 7,4, contendo 1% de polissorbato 80 (polysorbate 80)). Sobre as membranas, foram adicionados 250 mg (dose infinita) das emulsões A 1 e B 1 contendo ácido alfa-lipóico. Os experimentos foram conduzidos a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$ e a solução receptora constantemente agitada a 300 rotações por minuto (rpm). O meio receptor foi coletado após 2, 4 e 8 horas e a concentração de ácido alfa-lipóico foi determinada por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 334 nm. Este experimento foi realizado seis vezes utilizando as emulsões base A e B como branco.

Para a elaboração da curva analítica para a quantificação da concentração em mg/mL do ácido alfa lipóico nos testes de liberação e permeação foi preparada uma solução estoque com 200 mg de ácido alfa-lipóico padrão secundário (matéria prima) em 100 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 1% de polissorbato 80 (tween 80), tendo sido obtida uma concentração da solução estoque de 2 mg/mL. A partir desta solução estoque, prepararam-se diluições obtendo as concentrações reais: 0,17396, 0,34881, 0,53538, 0,73834, 0,95121, 1,15338 e 1,36594 mg/mL. O coeficiente de regressão linear e a equação da reta foram determinados.

A quantidade em µg/mL de ácido alfa-lipóico liberado para o meio foi determinado através da seguinte equação:

$$Q_{\text{real}}(t) = C_{\text{calculada}}(t) \cdot V_r + \sum^{n-1} C_a \cdot V_a \text{ (equação XVII)}$$

Em que,

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

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

V_r = volume da solução da célula receptora da célula de difusão (mL);

Ca = concentração da amostra removida;

Va = volume de amostra removido;

A quantidade liberada em µg/mL de ácido alfa-lipóico calculada pela equação XVII foi dividida pela área de exposição para liberação, obtendo-se a quantidade liberada da substância ativa em µg/cm².

A partir das curvas de liberação do ácido alfa-lipóico *in vitro*, a constante de velocidade da liberação da substância ativa para cada formulação foi calculada pela equação XVIII, descrita abaixo:

$$k = \Delta[] / \Delta t \quad (\text{equação XVIII})$$

Em que,

Δ[] = variação da concentração de ácido alfa-lipóico em µg/mL entre o tempo final e o inicial;

Δt = variação entre tempo final e o inicial.

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

13.2.2. Teste de permeação cutânea

Para a realização do teste de permeação cutânea, foi utilizada pele de orelha de porco (figuras 98 e 99), obtida do Frigorífico Olho D'água da cidade de Ipuã no estado de São Paulo. As orelhas inteiras e com pelo foram limpas e dermatomizadas imediatamente após a aquisição (Figura 100). As peles foram mantidas em temperatura a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ e, após 24 horas, foram utilizadas para a realização do teste.

A pele de orelha de porco dermatomizada foi colocada sobre as células de difusão com a derme em contato com o meio receptor (7 mL de tampão fosfato pH = 7,4, contendo 1% de polisorbato (polysorbate 80)). No estrato córneo foram exatamente pesados e adicionados 270 mg da emulsão A 1 e exatos 265 mg da emulsão B 1 contendo ácido alfa-lipóico. Os experimentos foram conduzidos a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$ e a solução receptora constantemente agitada a 300 rotações por minuto (rpm). O meio receptor foi coletado após 2, 4 e 8 horas respectivamente e a concentração de ácido alfa-lipóico foi determinada através de espectrofotometria UV. Este experimento foi realizado seis vezes e foram utilizadas como branco, as emulsões base A e B.

A quantidade em µg/mL de ácido alfa-lipóico permeado para o meio foi determinado através da equação XVII, descrita no item 13.2.1 deste capítulo.

A quantidade permeada em $\mu\text{g/mL}$ de ácido alfa-lipóico calculada pela equação XVII foi dividida pela área de exposição para permeação, obtendo-se a quantidade permeada da substância ativa em $\mu\text{g/cm}^2$.

A partir das curvas de permeação do ácido alfa-lipóico *in vitro*, a constante de velocidade da permeação da substância ativa para cada formulação foi calculada pela equação XVIII, descrita no item 13.2.1 deste capítulo.

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



Figura 98. Pele de orelha de porco dessecada



Figura 99. Pele de orelha preparada para dermatomização



Figura 100. Pele de orelha de porco dermatomizada e cortada no tamanho adequado para a realização do ensaio de permeação cutânea.

A quantidade em $\mu\text{g/mL}$ de ácido alfa-lipóico permeado para o meio foi determinado através da equação XVII já descrita no item 13.2.1

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

13.2.3. Teste de retenção no estrato córneo

No final de cada experimento, as peles foram removidas das células de difusão e o excesso de formulação presente nas peles foi removido com água destilada e secas com papel absorvente. As peles foram fixadas em superfície plana, a área de retenção para a remoção do estrato córneo foi delimitada e o estrato córneo foi removido através do método de *tape stripping*, que consiste em 12 batidas com fitas adesivas sobre a pele fixada. A primeira fita foi descartada para retirar o excesso da formulação sobre a pele e as 11 fitas restantes foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 mL de metanol (PA) e agitados em agitador por 1 minuto. Em seguida, os tubos foram sonicados por 15 minutos em banho de ultrassom. O sobrenadante foi analisado por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 333 nm adaptando a metodologia descrita por (CASAGRANDE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

13.2.4. Teste de retenção na epiderme/derme

Para a realização deste teste, todas as peles sem o estrato córneo foram cortadas com tesoura e transferidas para tubos Falcon contendo 4 mL de metanol e foram sonicados durante 30 minutos. A solução final foi analisada para quantificação do ácido alfa-lipóico retido nas camadas de epiderme e derme por espectrofotometria UV (CASAGRANDE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

Para a elaboração da curva analítica para a quantificação do ácido alfa lipóico no teste de retenção estrato córneo e epiderme/derme foi preparada uma solução estoque com 200 mg de ácido alfa-lipóico padrão secundário (matéria prima) em 100 mL de metanol (PA) obtida uma concentração estoque de 2 mg/mL. A partir desta solução estoque, foram preparadas diluições nas concentrações reais de: 0,17396, 0,34881, 0,53538, 0,73834, 0,95121, 1,15338 e 1,36594 mg/mL. O coeficiente de regressão linear, e a equação da reta foram determinados.

13.3. Teste de toxicidade *in vitro*

13.3.1. Culturas Celulares - HepG2 e HaCaT

As células HepG2, doadas pela (prof^a Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro da FCF-USP, São Paulo) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Cultilab) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos, neutralizada a tripsina com DMEM com soro e semeadas em frascos de 25 cm². As células foram então semeadas em placas de 96 poços e a densidade celular para os ensaios de citotoxicidade (MTT) foi de $1,0 \times 10^6$ células.

Foram também cultivadas as células HaCaT doadas pela Dr^a Luiza Villa do Instituto Ludwig, São Paulo que são queratinócitos imortalizados de pele, as quais foram cultivadas em DMEM de acordo com o protocolo acima descrito.

13.3.2. Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

O método de MTT, utilizado para a avaliação de citotoxicidade tem, como princípio, a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimethyl- 2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma), formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e 100 µl de uma solução de 5 mg/mL de MTT em PBS foram adicionados em cada poço, as células na microplaca foram incubadas a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (3 a 5 horas). Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µl de álcool isopropílico absoluto (PA) foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540 nm, foi realizada em leitor de placas (Bio-Rad, modelo 550). A porcentagem de células vivas foi calculada, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG et al., 2004.

Para as diferentes linhagens foram determinadas as concentrações de ácido alfa-lipóico capaz de proteger as células contra a morte celular, uma vez que essas células foram tratadas com propilenoglicol a 2% que promove morte celular.

O interesse de se fazer um prévio estudo da capacidade do ácido alfa – lipóico em prevenir a morte celular causada pelo propilenoglicol foi despertado depois de conhecido pela literatura científica que o propilenoglicol é um álcool orgânico, presente em uma grande quantidade de produtos que entram em contato com a pele humana e que pode causar problemas sérios de irritação na pele. Medicamentos de aplicação tópica dermatológicos, cosméticos, material de limpeza e de proteção são exemplos de categorias de insumos consumidos no mundo industrializado que contêm propilenoglicol em sua composição. Em princípio considerados como seguro, esta associado, todavia a relatos de caso em dermatite de contato de todos os níveis de severidade, o que encoraja sua melhor caracterização epidemiológica, clínica, diagnóstica e terapêutica (ZESCH, 1983).

É considerado uma substância de baixa a média irritabilidade e um alérgeno de contato fraco (ZESCH, 1983). Algumas classes de medicamentos tópicos que o contém em grande frequência são corticosteróides e antifúngicos. Em algumas concentrações, o propilenoglicol propriamente dito tem ação queratolítica e antimicrobiana. Sua concentração em produtos dermatológicos é determinada segundo o nível de profundidade no estrato córneo o qual se deseja que o princípio ativo alcance (WAHLBERG & NILSSON, 1984). ANGELINI et al., 1981 testaram o propilenoglicol a 20% em água em 400 pacientes com diagnóstico de dermatite de contacto eczematosa, adotando os seguintes critérios para atribuição de mecanismo etiopatogênico alérgico às reações observadas: 1) história de contato prolongado com medicamento tópico contendo propilenoglicol, 2) extensão da reação para

além dos limites da área de aplicação, 3) persistência da reação por vários dias, associadamente a prurido local, 4) reprodução da mesma reação com concentrações menores e 5) melhora com a interrupção do uso do propilenoglicol. Observaram uma taxa de 1,5% de reações indicativas de dermatites de contato aguda (DCA). Citam como demais taxas de positividade descritas por outros autores: 3,8% e 4,8%.

Os ensaios de citotoxicidade foram avaliados em 24 h de tratamento para a determinação, respectivamente, do efeito dose-resposta e tempo-resposta em células metabolicamente competentes (HepG2) e células metabolicamente incompetentes (queratinócitos). Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em, no mínimo, 3 experimentos independentes.

14. Resultados e Discussão:

14.1. Teste de liberação

As amostras coletadas durante os tempos de 2, 4 e 8 horas foram analisadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 334 nm para ser determinada a quantidade do ácido alfa-lipóico liberado durante estes tempos estabelecidos.

Neste experimento foi possível constatar que o ácido alfa-lipóico presente na formulação A 1 teve um perfil de liberação diferenciado da formulação B 1. Essas formulações tiveram como principal diferença o perfil reológico que foi determinado durante os testes reológicos. Assim, os resultados sugerem que o perfil de liberação foi influenciado pela característica reológica de cada sistema.

A escolha de um sistema adequado para incorporação de fármacos é de fundamental importância para a estabilidade, para a disponibilidade no local de aplicação e, consequentemente, para a obtenção dos efeitos esperados. O veículo tem influência na liberação, permeação e retenção do fármaco, tendo um papel dominante na terapia tópica (FLORENSE & ATWOOD, 2003)

As emulsões são os veículos mais usuais de sistemas de liberação em produtos de uso tópico. Por meio destas, é possível veicular ampla gama de substâncias que são liberadas de maneira rápida e conveniente (SCHUELLER, ROMANOWSKI, 2000).

Valor do pico de identificação do ácido alfa – lipóico em solução tampão pH 7,4 contendo 1% de polissorbato 80

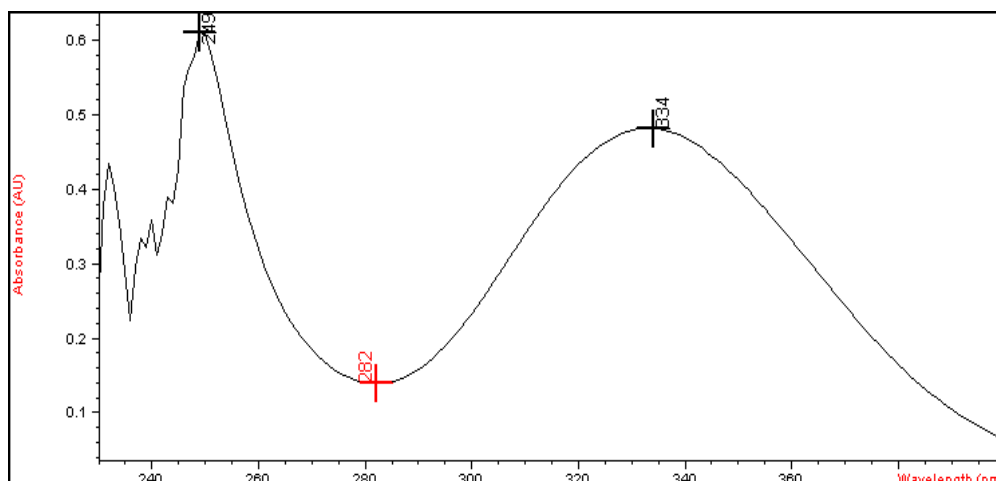


Figura 101. Varredura espectrofotométrica de 200 a 400 nm para a identificação do pico correspondente ao ácido alfa lipóico em solução tampão contendo 1% de polissorbato 80

Curva analítica do ácido alfa - lipóico utilizando como solvente solução tampão fosfato pH 7,4 com 1% de polissorbato 80.

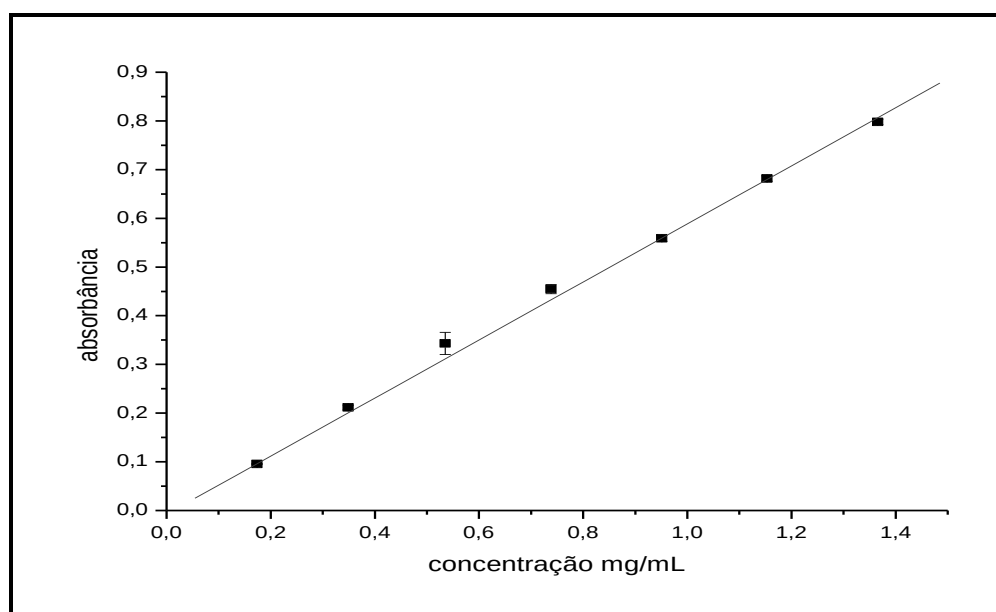


Figura 102. Curva analítica do ácido alfa – lipóico padrão secundário, $r = 0,99975$ e equação da reta $y = - 0,0076 + 0,596x$.

Na Tabela XXVI encontram-se os valores da quantidade liberada *in vitro* do ácido alfa-lipóico em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), a partir das formulações A 1 e B 1 respectivamente, acrescidas de 2% de ácido alfa-lipóico.

Tabela XXVI – Quantidade de ácido alfa-lipóico liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e a correspondente porcentagem de liberação em função do tempo (horas).

Emulsão A 1	Tempo (horas)	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	*DP	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% liberada em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Log da % liberada
	2	0	0	0	0	0
	4	292,42	0,042	165,21	3,06	0,49
	8	366,13	0,007	206,85	3,83	0,58
Emulsão B 1	Tempo (horas)	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	*DP	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% liberada em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Log da % liberada
	2	343,35	0,012	193,98	3,66	0,56
	4	386,67	0,008	218,46	4,12	0,61
	8	537,27	0,010	303,54	5,73	0,76

* Média de seis leituras. Desvio padrão menor que 5%

É possível observar que a liberação da formulação B 1 foi mais significativa em todos os tempos do que a emulsão A 1, tanto que nas primeiras 2 horas de experimento já havia sido liberado uma quantidade considerável do ácido alfa-lipóico por cm^2 . Na emulsão A 1, a liberação do ácido alfa – lipóico não pode ser quantificada em 2 horas, considerando-se seu valor como zero.

Através da análise dos resultados obtidos, é possível dizer que o perfil reológico de ambas as emulsões pode ter interferido de maneira significativa no perfil da liberação do ácido alfa – lipóico pelo veículo. Resultado semelhante foi observado por BRUSCHI, et al., 2007 para formulações contendo Carbopol 934P acrescidas de extrato de própolis. Os autores observaram que o aumento da concentração do polímero resultou em aumento da viscosidade estática do sistema, o que interferiu no perfil da liberação da substância ativa, o mesmo foi observado neste trabalho, pois a emulsão A 1 contendo dispersão de carbopol a 2% apresentou um perfil de liberação diferenciada da emulsão B 1 que não apresenta em sua fórmula o polímero.

Em um trabalho de revisão, BARRY, 1983 citou alguns estudos científicos, criticando a falta de correlação entre a viscosidade de uma preparação e a sua liberação, pois, segundo o autor, as características reológicas de um produto podem afetar a liberação da substância ativa. Apesar de ser importante a determinação das propriedades reológicas de um semi-sólido, como o gel, estudos raramente correlacionam parâmetros como viscosidade com dados de liberação (BARRY, 1983).

BARRY, 1983 correlacionou valores de viscosidade plástica com a difusão de princípios ativos para um gel de ágar e verificou que os parâmetros reológicos analisados foram inversamente proporcionais à taxa de liberação. Em estudo feito por MARRIOTT (1996) a absorção de

agentes ativos pela pele diminuiu com o aumento da viscosidade do veículo, verificando uma relação inversa entre viscosidade e absorção do ativo.

As Figuras 103 a 105 exibem o perfil de liberação das duas formulações em estudo de acordo com modelos matemáticos de cinética de ordem zero, primeira ordem e pseudoprimeira ordem (ou Higuchi), respectivamente.

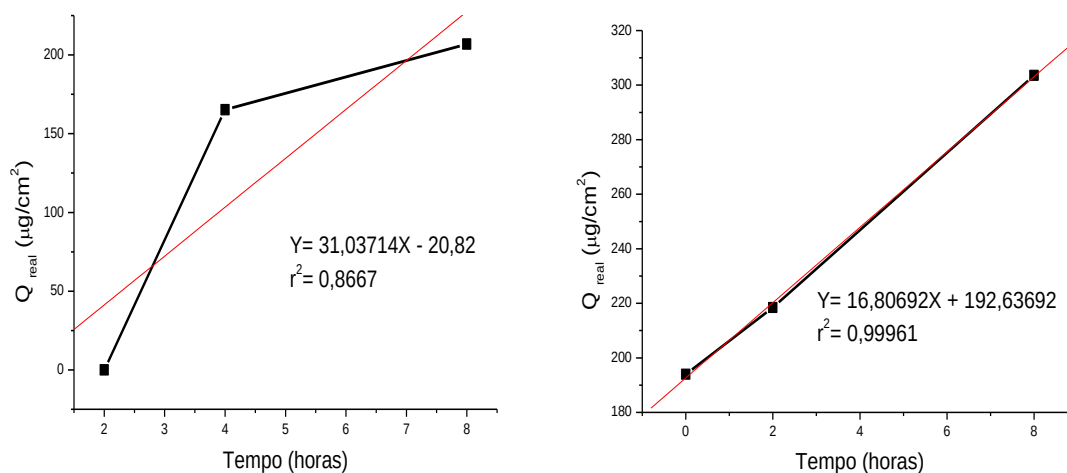


Figura 103. Determinação do perfil de liberação *in vitro* das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de zero ordem.

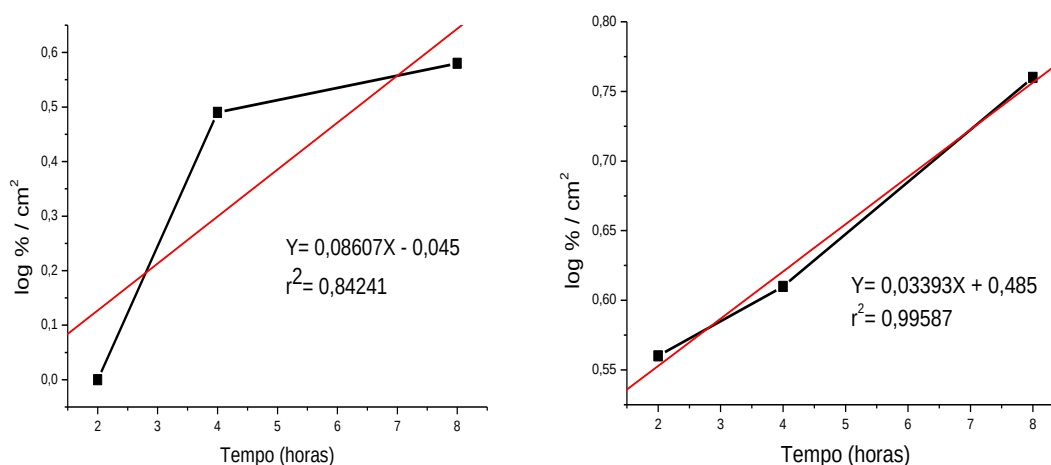


Figura 104. Determinação do perfil de liberação *in vitro* das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de primeira ordem.

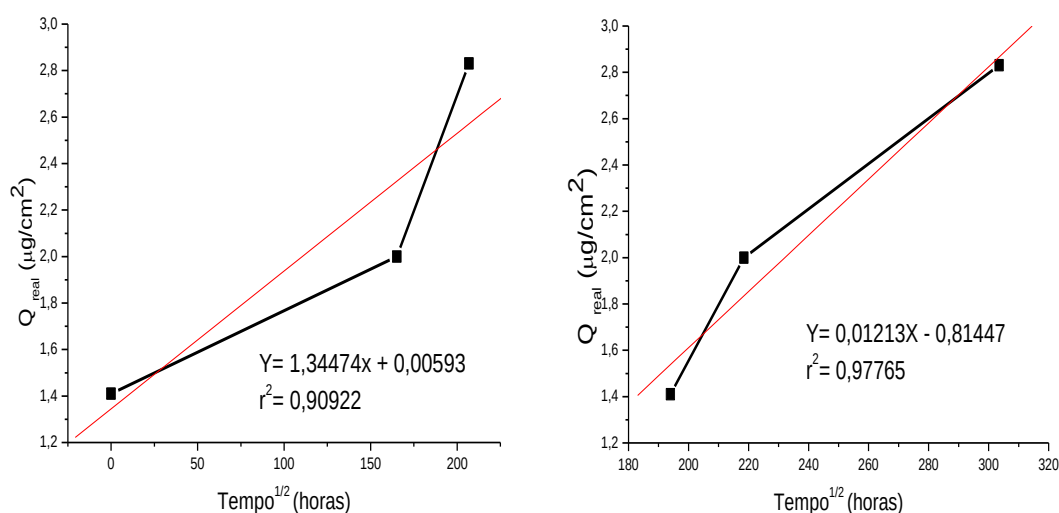


Figura 105. Determinação do perfil de liberação *in vitro* das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de pseudoprimeira ordem.

A análise do coeficiente de correlação linear (R^2) das curvas de liberação *in vitro* foram utilizadas para determinar a ordem de reação. Os resultados estão apresentados na Tabela XXVII.

Tabela XXVII – Determinação da ordem de reação da liberação *in vitro* do ácido alfa-lipóico a partir das formulações A 1 e B 1 (utilizando o parâmetro de coeficiente de correlação linear (R^2)).

formulação	Ordem da Liberação			
	Zero ordem	Primeira ordem	Ordem de Higuchi	Ordem da reação
A 1	0,8667	0,84241	0,90922	Higuchi
B 1	0,99961	0,99587	0,97765	Zero ordem

Para a emulsão A 1 os valores demonstraram liberação de acordo com o modelo de Higuchi, uma vez que este se adapta melhor a sistemas de liberação controlada, indicando que a liberação do ácido alfa-lipóico foi controlada por difusão. A aplicação da equação de Higuchi, que descreve a difusão de substâncias contidas nos sistemas matriciais, relacionando a quantidade de substância liberada com a raiz quadrada do tempo (MONTEIRO et al., 2007)

Os resultados obtidos para a emulsão A 1 são condizentes com a literatura, uma vez que a presença de polímeros em formulações retarda e controla a liberação do ácido alfa-lipóico. Em um trabalho de revisão desenvolvido por LOPES, LOBO & COSTA., 2005, é discutido que a presença de polímeros hidrossolúveis e principalmente o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) retarda a liberação de ativos em sistemas emulsionados. Em um outro trabalho desenvolvido por MONTEIRO et al., 2007 é comprovado que em relação à

liberação da quercetina, as formulações que contêm respectivamente, 30, 50 e 64 mg de HPMC apresentaram 88,82%, 75,43% e 49,16% de ativo liberado após 8 h de experimento, demonstrando que o aumento da proporção HPMC/fármaco retardou a liberação da quercetina.

Em relação à mudança na estrutura da camada de gel, as cadeias poliméricas passam pelos três tipos diferentes de rearranjos espaciais representados na difusão do ativo é obviamente afetada pelo tipo de configuração molecular (LOPES, LOBO & COSTA., 2005).

Antes de iniciar a dissolução (quando o polímero está em quantidade superior ao fármaco), predominam as interações polímero – polímero e ocorre o primeiro tipo de configuração, em que as cadeias poliméricas estão compactadas e completamente integradas umas nas outras, – trata-se do tipo concentrado ou compactado, designado por “swollen rubbery layer” (Figura 106 A). Nesta fase o ativo encontra-se também aprisionado entre estas cadeias poliméricas, sendo mais lenta a sua liberação. O início da etapa de dissolução na camada limite de difusão conduz ao segundo tipo de rearranjo espacial, designado por semi-diluído (Figura 106 B). Este tipo corresponde à camada limite de difusão, situado na parte externa da interface camada de gel/solvente. A concentração do solvente na matriz aumenta progressivamente e verifica-se diluição das cadeias poliméricas em virtude do aumento das interações água-polímero. Nesta camada limite, ainda existem alguns pontos de interação entre as cadeias poliméricas e as partículas do ativo circulem entre elas (LOPES, LOBO & COSTA., 2005).

Finalmente, o polímero assume a terceira configuração macromolecular, designada por tipo diluído (Figura 106 C). Nesta configuração, as cadeias poliméricas estão completamente separadas umas das outras e dispersas no líquido de dissolução, perfeitamente individualizadas e movendo – se livremente com movimentos Brownianos. Neste momento, completa-se a liberação do ativo restante ainda contido no interior da matriz para o líquido de dissolução (LOPES, LOBO & COSTA., 2005).

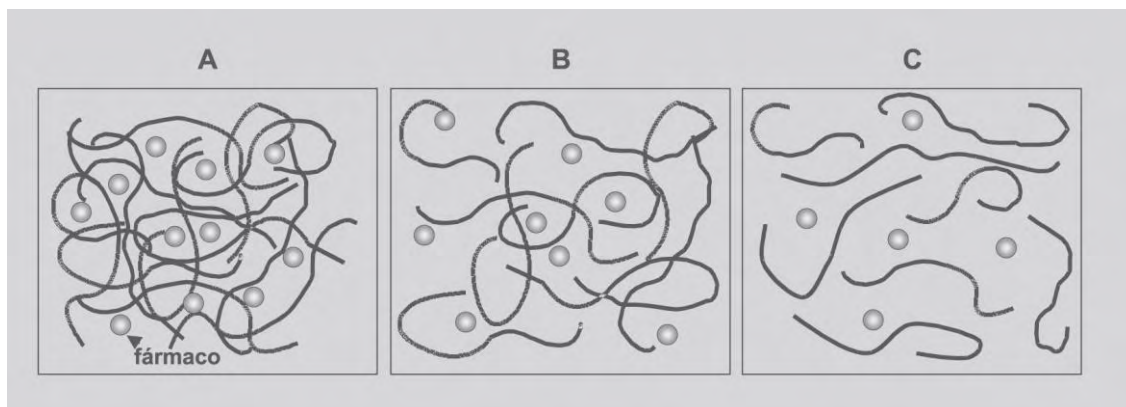


Figura 106. Configurações macromoleculares dos polímeros hidrofílicos durante o processo de dissolução do ativo nos sistemas matriciais (LOPES, LOBO & COSTA., 2005).

Para a emulsão B 1 o modelo matemático mais adequado foi de zero ordem, onde a dissolução ocorre a uma velocidade constante, sendo independente da concentração do ativo (MONTEIRO et al., 2007). Neste caso é possível dizer que a liberação do ácido alfa-lipóico na emulsão B 1 aconteceu obedecendo uma constante de proporcionalidade. Os sistemas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de ácido alfa-lipóico por unidade de tempo, o qual é o modelo ideal para os sistemas de liberação controlada e prolongada.

A constante da velocidade de liberação do ácido alfa-lipóico para o meio receptor, a partir das formulações A 1 e B 1, foi determinada pela equação XVIII descrita no item 13.2.1 Os resultados estão apresentados na Tabela XXVIII.

Tabela XXVIII – Constante da velocidade k de liberação do ácido alfa-lipóico a partir das formulações envolvidas no estudo.

Formulações	Constante da velocidade k (µg/mL/h)
A 1	61,02
B 1	32,32

14.2. Teste de permeação cutânea, retenção no estrato córneo e retenção na epiderme/derme do ácido alfa-lipóico.

O ensaio de permeação cutânea realizado neste trabalho foi feito em três etapas: o teste de permeação cutânea, que avaliou e quantificou a concentração de ácido alfa – lipóico permeado, podendo ser absorvido pela corrente sanguínea; o teste de retenção no estrato córneo, verificando a retenção do ácido alfa-lipóico na região mais externa da pele, protegendo-a assim apenas superficialmente; e o teste de retenção epiderme/derme, avaliando se o ácido alfa-lipóico ficou retido nesta região e com isso, podendo agir nas camadas mais profundas da pele.

As técnicas de permeação cutânea *in vitro* são técnicas comumente empregadas, pois permitem estudar os parâmetros que influenciam desde a liberação do ativo do veículo para superfície cutânea até sua difusão nas camadas mais intimas da pele, de maneira prática e sem a interferência de fatores biológicos. Além disso, é vantajoso quantificar a penetração de ativos entre os tecidos da pele e a distribuição sistêmica dos mesmos para prover um melhor entendimento do potencial de toxicidade de certos ativos. As metodologias de permeação *in vitro* nos dá um indicativo do que poderá eventualmente ocorrer *in vivo*, sendo uma ótima ferramenta para seleção de formulações, mas justamente por não estarem presentes as funções metabólicas normais do organismo humano, os resultados obtidos fornecem apenas um direcionamento para a pesquisa de novos produtos cosméticos que veiculam ativos que exercem alguma função na pele (SASSON, 2006)

A hidro e a lipossolubilidade de um ativo são as duas principais características que determinam sua absorção através da pele por difusão. O coeficiente de partilha mede a quantidade de ativo que se difunde de um veículo líquido, semi-sólido ou sólido para uma fase

adjacente com a finalidade de se estabelecer o equilíbrio entre elas (BARRY, 1987). Os veículos que conseguem aumentar a partilha do ativo no estrato córneo podem levar a um aumento da permeabilidade do mesmo (TOJO *et al.*, 1987). Quando a membrana promove resistência à difusão, ou seja, é o passo limitante no processo de permeação, os valores do coeficiente de partilha são relevantes.

Neste teste, as alíquotas da solução receptora obtida do teste de permeação foram coletadas após os tempos de 2, 4 e 8 horas e analisadas por espectrofotometria UV para determinar a concentração de ácido permeado através da pele da orelha de porco; para a quantificação do ácido permeado foi utilizada a mesma curva analítica construída para quantificar a quantidade de ácido liberado, pois ambos os experimentos utilizaram como sistema solvente para o ácido alfa – lipóico o tampão fosfato pH 7,4 com 1 % de polissorbato 80. Já para a quantificação do ácido que ficou retido no estrato córneo e epiderme/derme foi utilizada a curva analítica, já citada em materiais e métodos, a qual utilizou o metanol (PA) como solvente para o ácido alfa-lipóico.

Tabela XXIX – Quantidade de ácido alfa-lipóico permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e a correspondente porcentagem de permeação em função do tempo (horas).

Emulsão A 1	Tempo (horas)	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	*DP	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% permeada em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Log da % permeada
	2	0	0	0	0	0
	4	215,54	0,008	121,77	2,26	0,35
	8	226,61	0,009	139,33	2,58	0,41
Emulsão B 1	Tempo (horas)	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	*DP	Q_{real} em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% permeada em ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Log da % permeada
	2	241,89	0,019	136,66	2,57	0,41
	4	248,53	0,014	140,41	2,65	0,42
	8	381,00	0,011	215,25	4,06	0,61

Os resultados obtidos mostram (Tabela XXIX) que o ácido alfa - lipóico incorporado na emulsão A 1 demorou mais tempo para permear a pele de porco, porém houve maior retenção na epiderme/derme em relação a emulsão B 1. Este resultado é favorável, pois a maior parte das reações oxidativas ocasionadas pela radiação UV ocorrem na epiderme viável e na derme, e uma vez que o ácido alfa – lipóico possui atividade antioxidante, pode agir nesta região no

sequestro de radicais livres. O ácido incorporado na emulsão B 1 permeou a pele de porco em 2 horas, porem apresentou menor retenção na epiderme/derme em relação a emulsão A 1.

O ácido alfa –lipóico possui características hidro e lipossolúveis, o que pode favorecer a permeação através da pele, ainda mais em associação com um veículo que também facilite essa permeação. Com isso ele pode atingir a corrente sanguínea e agir nas camadas mais internas da pele influenciando o metabolismo celular na eliminação de resíduos tóxicos. Auxilia na recuperação de lesões, na absorção de nutrientes, na quelação de metais de transição e na inibição da ativação do fator NFκ-B (*Nuclear Factor Kappa Beta*), que induz à produção de citocinas e a quimiotaxia, inibindo a resposta inflamatória. Em adição, ainda impede e/ou reverte às reações entre o colágeno e a glicose (MAGALHÃES, 2000).

As Figuras 107 a 109 exibem o perfil de permeação das duas formulações em estudo de acordo com modelos matemáticos de cinética de zero ordem, primeira ordem e pseudoprimeira ordem (ou Higuchi), respectivamente.

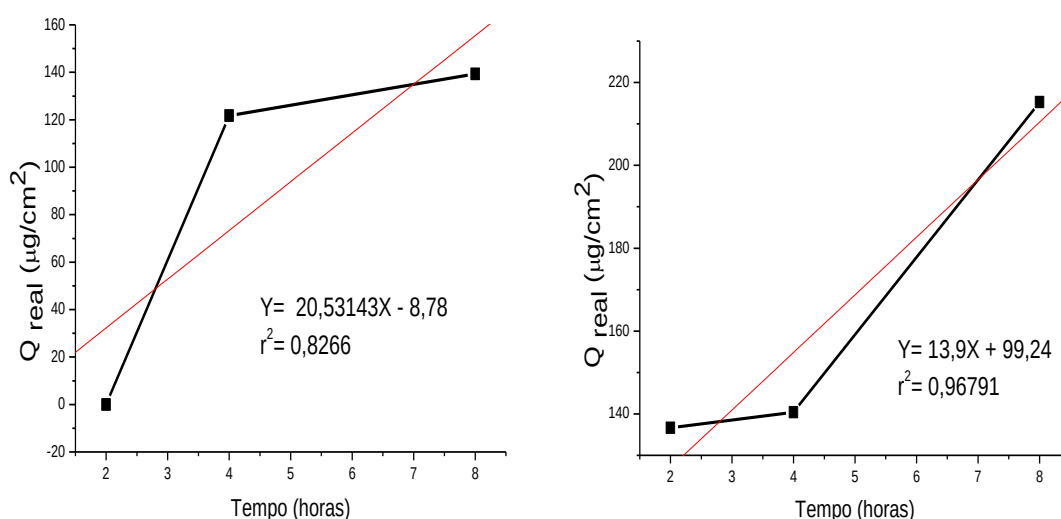


Figura 107. Determinação do perfil de permeação *in vitro* das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de zero ordem.

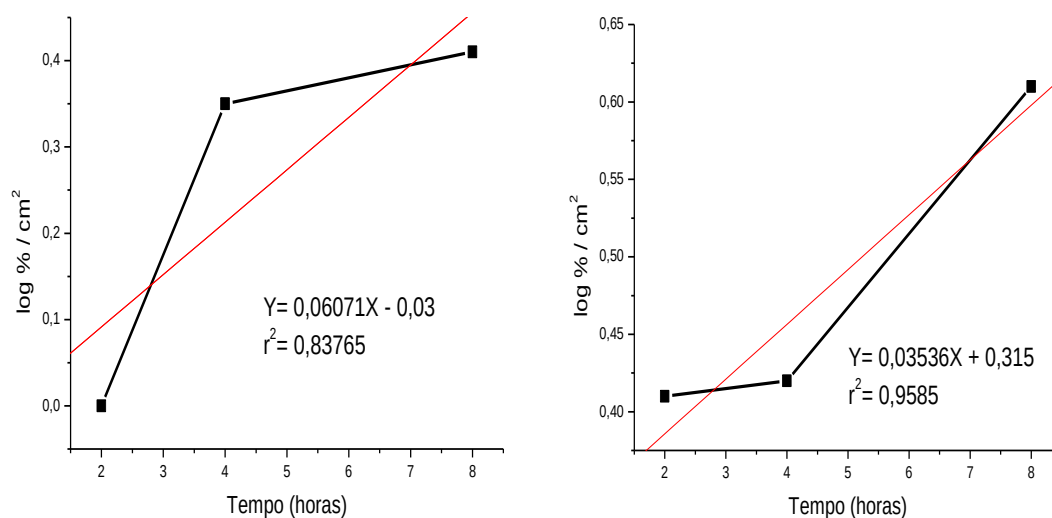


Figura 108. Determinação do perfil de permeação *in vitro* das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de primeira ordem.

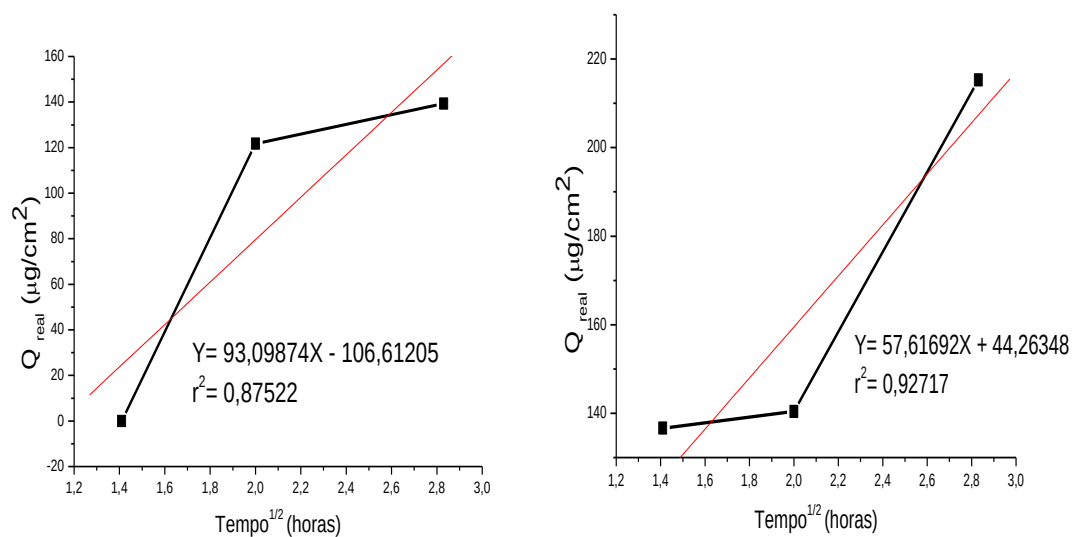


Figura 109. Determinação do perfil de permeação *in vitro* das formulações A 1 (à esquerda) e B 1 (à direita) estudadas, de acordo com o modelo matemático de cinética de pseudoprimeira ordem.

A análise do coeficiente de correlação linear (r^2) das curvas de permeação *in vitro* foram utilizadas para determinar a ordem de reação. Os resultados estão apresentados na Tabela XXX.

Tabela XXX – Determinação da ordem de reação da permeação *in vitro* do ácido alfa-lipóico a partir das formulações A 1 e B 1 (utilizando o parâmetro de coeficiente de correlação linear (R^2)).

formulação	Ordem da permeação			
	Zero ordem	Primeira ordem	Ordem de Higuchi	Ordem da reação
A 1	0,8266	0,83765	0,89	Higuchi
B 1	0,96791	0,9585	0,92717	Zero ordem

Os valores da permeação foram diretamente condizentes com os valores da liberação, uma vez que para a emulsão A 1 os valores demonstraram a permeação de acordo com o modelo de Higuchi, indicando que a liberação do fármaco foi de forma retardada e controlada por difusão uma vez que este se adapta melhor a sistemas controlados, assim como já descrito na liberação.

Para a emulsão B 1 o modelo matemático mais adequado foi de zero ordem, onde a dissolução ocorre a uma velocidade constante, sendo independente da concentração do fármaco. Neste caso pode-se dizer que a permeação do ácido alfa-lipóico na emulsão B 1 acontece obedecendo uma constante de proporcionalidade, o qual é o modelo ideal para as formas farmacêuticas de perfil controlado e prolongado, como já descrito na liberação.

A constante da velocidade de permeação do ácido alfa-lipóico para o meio receptor, a partir das formulações A 1 e B 1, foi determinada pela equação XVIII descrita no item **13.2.1** Os resultados estão apresentados na Tabela XXXI.

Tabela XXXI – Constante da velocidade k de liberação do ácido alfa-lipóico a partir das formulações envolvidas no estudo.

Formulações	Constante da velocidade k ($\mu\text{g/mL/h}$)
A 1	37,77
B 1	23,19

Valor do pico de identificação do ácido alfa – lipóico em metanol (PA)

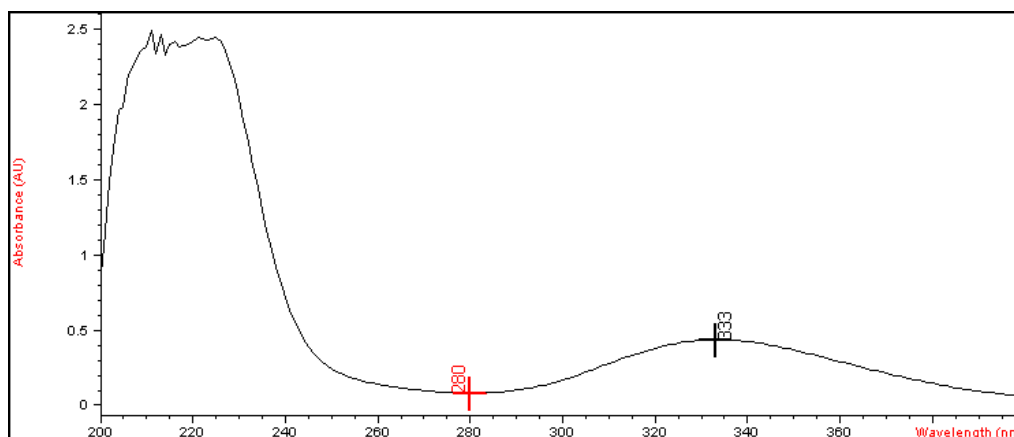


Figura 110. Varredura espectrofotométrica de 200 a 400 nm para a identificação do pico correspondente ao ácido alfa- lipóico em metanol (PA).

Curva analítica do ácido alfa - lipóico utilizando como solvente metanol (PA)

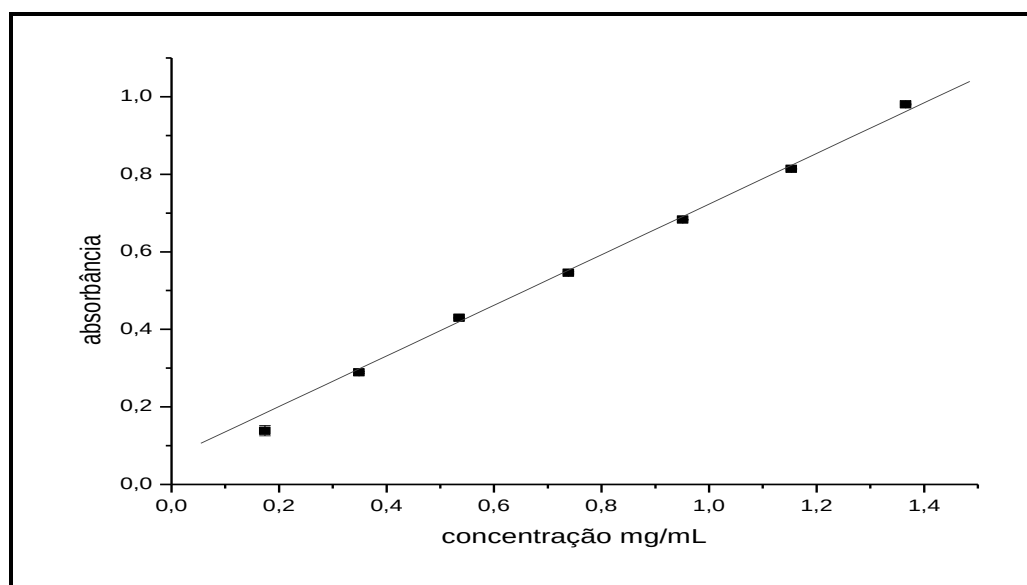


Figura 111. Curva analítica do ácido alfa-lipóico padrão secundário $r = 0,99855$, equação da reta $y = 0,07021 + 0,65282x$

Tabela XXXII. Valores das concentrações em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ácido alfa - lipóico retido no estrato córneo e na epiderme/derme.

Tempo (horas)	Retido na epiderme/derme $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ **EA 1	Retido na epiderme/derme $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ **EB 1	% Retida na epiderme/derme $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ **EA 1	% Retida na epiderme/derme $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ **EB 1
8	237,29	141,24	7,77	2,66
Tempo (horas)	Retido no estrato córneo $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ **EA 1	Retido no estrato córneo $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ **EB 1	% Retida no estrato córneo $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ **EA 1	% Retida no estrato córneo $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ **EB 1
8	0	0	0	0

No teste de retenção não foi possível quantificar a quantidade de ácido retido no estrato córneo após 8 horas de teste, com isso foi considerado o valor como zero.

14.3. Ensaio de citotoxicidade in vitro

O ensaio de citotoxicidade foi realizado através da metodologia do MTT que tem, como princípio, a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma), formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta.

Para este teste foram escolhidas duas linhagens celulares; HepG2 (células de hepatoma metabolicamente competentes) e HaCat (queratinócitos metabolicamente incompetentes). Essas células foram semeadas em placas para ELISA de 96 poços, incubadas por 24 horas em estufa de CO_2 a 37°C e depois deste período de incubação tratadas com solução de meio DMEM contendo 2% de propilenoglicol acrescidas de ácido alfa – lipóico de modo que foram obtidas seis soluções com concentrações diferentes de ácido alfa – lipóico, sendo elas; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5 mg/mL. Após o tratamento as células foram novamente incubadas em estufa de CO_2 a 37°C durante 24 horas.

Após as 24 horas de incubação, as soluções de tratamento dos 96 poços foram retiradas e foram adicionadas aos 96 poços 100 μl da solução de MTT. Após a adição do MTT foi necessário aguardar 5 horas para revelar a placa com álcool isopropílico e realizar a leitura da placa em leitor de placas no comprimento de onda de 540 nm com refletância de 630 nm.

O valor de células vivas foi calculado, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG et al., 2004.

Tabela XXXIII: Percentagem de células HepG2 e HaCat vivas

Concentrações de ácido alfa – lipóico utilizado na tratamento de HepG2 e HaCat (mg/mL)	% de células HepG2 vivas	% de células HaCat vivas
0,125	6,532	6,76
0,25	6,734	9,12
0,5	11,58	10,53
1,0	35,69	14,86
1,25	44,04	25,11
1,5	92,12	48,93

Os resultados mostraram que mais de 90% das células tratadas somente com a solução de meio DMEM contendo 2% de propilenoglicol morreram, sendo que a quantidade de células vivas é proporcional ao aumento da concentração de ácido alfa – lipóico, o que prova que o ácido agiu de maneira eficaz prevenindo a morte celular causada pelo propilenoglicol. Na figura 112 esse resultado fica mais representativo através da construção de um gráfico.

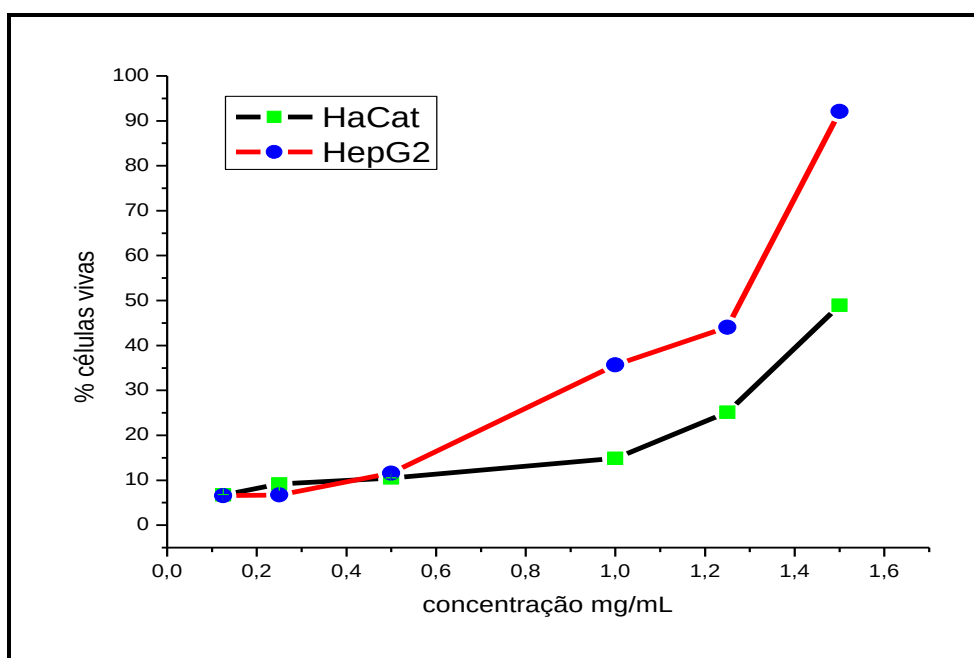


Figura 112. Relação da concentração de ácido alfa – lipóico e a percentagem de células vivas $P < 0,05$ os valores são estatisticamente diferentes entre si.

O MTT é amplamente utilizado em testes para quantificar a viabilidade e proliferação celular. Como se trata de um ensaio não-radioativo, rápido e econômico, é muitas vezes utilizado na triagem de fármacos. No entanto, devido ao seu mecanismo de detecção de

substâncias químicas, o teste tem que ser aplicado com precauções quando as substâncias com potencial redutor intrínseca são testadas. Muitas células são usadas para determinar a relação entre o número de células e da quantidade de formazan gerados e a duração da incubação de células com MTT conforme relatado por MOSMANN (1983).

Antioxidantes são muitas vezes adicionados ao meio de cultura celular como agentes citoprotetor (BRUGGISSER et al., 2001). Em uma pesquisa de citotoxicidade *in vitro* realizada por YAMAMOTO & GAYNOR, 2001, o ácido alfa – lipóico interagiu com mediadores cruciais dos processos inflamatórios e da carcinogenese. Este potencial está ligado a sua capacidade antioxidante (PACKER, WITT & TRITSCHLER, 1995; SALOIU et al., 1999). A ativação de NF-kB é comum em processos de estresse oxidativo nas células e substâncias com potencial antioxidante são descritas como inibidoras da ativação de NF-kB. Em uma outra pesquisa realizada por PODDA et al., 2001 mostrou que somente o potencial antioxidante do ácido alfa – lipóico além de impedir a ativação de NF-kB também impede o fator de transcrição de outro pró-inflamatório o AP-1.

15. Conclusão parcial

Através do teste de permeação foi possível concluir que a permeação do ácido alfa-lipóico através da pele pode sofrer influência das características reológicas das emulsões utilizadas neste estudo, uma vez que o ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão B 1 permeou a pele mais rápido e em maior quantidade quando comparado com o ácido incorporado na emulsão A 1. Essas emulsões apresentaram características reológicas diferentes. Nos testes de citotoxicidade, os resultados mostraram que o ácido alfa-lipóico é um eficiente protetor das células frente ao propilenoglicol que já é conhecido na literatura por apresentar alguns danos às células.

16. Conclusão final

Todas as emulsões propostas apresentaram um comportamento reológico desejável para um cosmético de uso tópico. No que diz respeito à estabilidade, a emulsão B 1 se destacou por apresentar maior estabilidade frente aos testes realizados.

Nos testes de permeação e retenção cutânea, foi observado que o ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão B 1 ficou mais retido na epiderme/derme, podendo agir nessas camadas mais superficiais da pele, sendo essa emulsão a mais promissora para o que se deseja, atuar na prevenção de alterações da pele e do envelhecimento cutâneo.

As emulsões apresentaram particularidades em todos os testes realizados, sendo assim, o ácido alfa-lipóico incorporado na emulsão A 1 ou B 1 terá um desempenho diferenciado em relação à estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea.

O ácido alfa-lipóico mostrou-se eficiente como protetor celular, agindo na redução da morte celular, quando houve o contato das células com o propilenoglicol na concentração estudada a 2%, concentração citotóxica para as células HaCat e HepG2.

17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 899 de 29/05/2003, 2004.

ALBERY, W.J.; HADGRAFT, J. Percutaneous absorption: theoretical description. **J. Pharmacol.**, v. 31, p.129-39, 1979.

ALENCASTRE, J.B.; BENTLEY, M.V.L.B.; GARCIA, F.S.; MORAGAS, M.; VILADOT, J.L.; MARCHETTI, J.M. A study of the characteristics and *in vitro* permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.42, n.1, p. 69-76, 2006.

ALEXANDROU, A. N., CONSTANTINOU, N., GEORGIOU, G. Shear rejuvenation, aging and shear banding in yield stress fluids. **J. Non-Newtonian. Fluid. Mech.**, v. 158, 6-17, 2009.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e Aplicações na Área Cosmético-Farmacêutica. **Cosm. Toiletries.**, v.15, n.3, p.96-100, 2003.

ANGELINI, G.; MENEHINI, C.L. Contact allergy from propylene glycol. **Contact. Dermatitis.**, v.7(4), p. 197-8, 1981.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; LOYD, V. O. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Série Qualidade 1, Brasil, 2004. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm. Acesso em 29 de agosto, 2010.

ARAUJO, A. F. Processamento e análise de imagens aplicados na caracterização da superfície do titânio submetido a um ensaio de cultura de células. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências e Engenharia de Materiais. Universidade Federal do Rio grande do Norte, Natal, 2009.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas Farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre. Editora Artmed, 2005

BALSAM, M.S.; SANGARIN, E. eds. **Cosmetics science and technology**. 2 ed. New York; London, v.1,p. 393-421, 1972.

BANDEN, H.P.; GOLDSMITH, L.A.; FLEMING, B.A. comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.322, p.269 – 278, 1973.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, Editora da Unicamp: Campinas, 2001.

BARRY, B. Liberação Transdérmica de Fármacos. In: AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. São Paulo: Artmed p. 504-536, 2005.

BARRY, B. W. **Dermatological Formulations**. New York: Marcel Dekker, 1993.

BARRY, B.H. Breaching the skin Barrier to drugs. **Nat. Biotechnol.**, v. 22(2), p.165 – 167, 2004.

BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: Marcel Dekker, 1983.

BARRY, B.W., EL EINI, D.I. Influence of non-ionic surfactants on permeation of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone across cellulose acetate membrane. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.28, p.219–227, 1976.

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

BECHER, P. **Emulsiones Teoria Y Práctica**, Editorial Blume, Madri, 1972.

BEMECKER, K.D.; KOCH, B.; KRAUSE, W.; NEUENROTH, L. Application-triggered drug release from an O/W emulsion.**M.Pharm. Ind**, v.54(22), p.182-185, 1992.

BENTLEY, M.V.L.B. Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia in vitro. 1994. 155p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BENY, M. G.. Fisiologia da Pele. **Cosm. Toiletries**. (edição em português)., Vol. 12, N° 2, 2000.

BETTLEY, F.R., GRICE, K.A. The influence of ambient humidity on transepidermal water loss. **Br. J. Dermatol.**, v. 78, p.575– 581, 1967.

BEVAQUA, A. J.; LAHANAS, K. M.; COHEN, I. D.; CIOCA, G. Liquid crystal in multiple emulsions. **Cosm. Toiletries**., v. 106, n. 5, p. 53-56, 1991.

BIEWENGA, G,P.; HAENEN, G,R.; A, BAST. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **Gen. Pharmacol.**, V. 29, p.315–331, 1997.

BLANK, I.H. Factors which influence the water content of the stratum corneum. **J. Invest. Dermatol.**, v.18, p.433–439, 1952.

BLANK, I.H. Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum. **J. Invest. Dermatol.**, v.21, p. 259–271, 1953.

BORENFREUND, E., PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tiss. Cult. Meth.**, Vol. 9, p.7–9, 1984

BOUWSTRA, J.A.; DUBBELAAR, F.E.; GOORIS, G.S.; WEERHEIM, A.M.; PONEC, M. The role of ceramide composition in the lipid organization of the skin barrier. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1419, p.127-136, 1999.

BOWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; DUBBELAAR, F.E.; WEERHEIM, A.M.; IJZERMAN, A.P.; PONEC, M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. **J. Lipid. Res.**, 39:186-96, 1998.

BRASIL(a). Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1.

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

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing., **J. sol-Gel. sci. Technol.**, Los Angeles: Academic Press, 1990.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta.**, v.128, p. 93, 1998.

BRUGGISSER, R.; DAENIKEN, K.V.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. **Planta. Med.**, v. 68(5), p. 445-448, 2002.

BRUSCHI, M.L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIAO, M.P.; DE FREITAS, O.; LARA, E.H. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In Vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Sci.**, 2007.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosm. Toiletries.**, Ed. Port., São Paulo, v.14, n.2, p.54-57, 2002.

BUNGE, A.L.; GUY, R.H.; HADGRAFT, J. The determination of a diffusional pathlength through the stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, v.188, p.121-124, 1999.

BURCH, G.E.; WINSOR, T. Diffusion of water through dead plantar, palmar and tarsal human skin and through toe nails. **Arch. Dermatol. Syph.**, v.53, p.39-41, 1946.

CAFALI, L. C. Desenvolvimento e atividade do fitocosmético contendo licopeno para o combate à aceleração do envelhecimento cutâneo. Araraquã, 2009. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

CARMINI, M. O.; JORGE, M. C. G. Cremes e emulsões cosméticas: conceitos básicos. **Cosm. Toiletries.**, São Paulo, v. 1, n. 5. p. 13 – 22, 1989.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI J.R.; W.A.; DORTA, D.J.; DOS SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **J. Photochem. Photobiol.**, v. B 84, p. 21-27, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **Int. J. Pharm.**, v.328, p.183-190, 2007.

CASTRO, M.P. **Cultura de células do tecido animal: um esboço histórico**. Publ. Aciesp, São Paulo, n.10, p. i-v, 1978 [prefácio].

CHAMBERLAIN, M.; GAD, S.C.; GAUTHERON, P.; PRINSEN, M.K. Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. **Food. Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 35, p.23-37, 1997.

CHIAVACCI, L.A. Formação de sóis e géis a partir de soluções aquosas de oxicloreto de zircônio: efeito da modificação por sulfato na termoreversibilidade da transição solgel. 1996.88f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicol. In Vitro.**, Oxford, v.12, p.251-258, 1998.

CHILCOTT, R.P, et al. Inter- and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements: an international multicenter study using quasi-standardized methods and materials. **J. Pharm. Sci.**, v. 94, p. 632–638, 2005.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neural red and amido Black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomater. Med. Devices Artif. Organs.**, Oxford, v.17, n.13, p.1259-1264, 1996.

CNUBBEN, N.H.; ELLIOTT, G.R.; HAKKERT, B.C.; MEULING, W.J.; VAN DE SANDT, J.J. Comparative in vitro–in vivo percutaneous penetration of the fungicide ortho-phenylphenol. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.35, p.198–208, 2002.

COMBRIER, E.; CASTELLI, D. The agarose overlay method as a screening approach for ocular irritancy: application to cosmetic products. ATLA, **Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.20, n.3, p.438-444, 1992.

CORRÊA, M.A. **Cosmetologia teórico e pratica**. Apostila do curso de atualização de Cosmetologia. 2010.

CROSS, S. E.; ROBERTS, M. S. Subcutaneous absorption kinetics of interferon and other solutes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.45, p.606-609, 1993.

CRUZ, A. S. Teste de citotoxicidade in vitro como alternative ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos. São Paulo, Universidade de São Paulo - USP, 2003. 107p. Tese de doutorado (doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

D' LEON, L. F. P. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosm. Toiletries.**, São Paulo, v. 13, n. 4. p. 54 – 62, 2001.

DATTNER, A.M. Phytotherapeutic approaches to common dermatological conditions. **Clin. Dermatol.**, 17: 57-64, 1999.

DAVIDSON, M.W., ABRAMOWITZ, D. Optical Microscopy. Disponível em <http://microscopy.fsu.edu/primer/pdfs/microscopy.pdf>, 2003. Acesso em 19 de outubro de 2010.

DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotion. In: **Newburguer's manual of cosmetic analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, Senzel, AJ. p.32, 1977

DELANGE, J.; VANECK, P.; BRUIJNZEEL, P.L.B.; ELLIOTT, G.R.; The rate of percutaneous permeation of xylene, measured using the perfused pig ear model, is dependent on the effective protein concentration in the perfusing medium. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 127, p. 298–305, 1994.

DELONG, C.W.; THOMPSON, R.C.; KORNBERG, H.A. Percutaneous absorption of tritium oxide. **Nucl. Med.**, v. 71, p.1038–1045, 1954.

DEVARY, Y.; ROSETTE, C.; DIDONATO, J. A.; KARIN, M. NF-kappa-B Activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. **Science.**, v. 261, p.1442–1445, 1993.

DI MAMBRO, V.M., MARQUELE, F.D., FONSECA, M.J.V. Avaliação in vitro da Ação Antioxidante em Formulações Antienvhecimento. **Cosm. Toiletries.**, v. 17, p.74-78, 2005.

DIFFEY, B.L. What is light? Photodermatol Photo **immunol. Photomed.**, V.18:68-74, 2002.

DUARTE, I.; BUENSE, R.; KOBATA, C. Fototerapia. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, p.74-82, 2006.

DYER, A., HAYES, G.G., WILSON, J.G., CATTERALL, R. Diffusion through skin and model systems. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.1, p. 91–100, 1979.

ELIAS, P. M.; FRIEND, D. S. The permeability barrier in mammalian epidermis. **J. Cell. Biol.**, v.65, p.180-191, 1975.

ELIAS, P.M.; MARK, V.; THORNFIELD, C.; FEINGOLD, K.R. Interference with stratum corneum lipid biogenesis. In: BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. eds. **Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, p 3-55, 1999.

EUN , H. C.; SUH , D. H. Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize Test. **J. Derm. Sci.**, v. 24, p. 77-91, 2000.

EURACHEM WORKING GROUP, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.

EXEROWA, D.; GOTCHEV, G.; KOLAROV, T.; KHRISTOV, K.; LEVECKE, B.; TRADOS, T. Interaction forces in thin liquid films stabilized by hydrophobically modified inulin polymeric surfactant. 2. Emulsion films. **J. Surfaces. Colloids.**, v.23(4), p.1711-1715, 2007.

FERRARI, M.; MONTEIRO, L.C.L.; NETZ, D.J.A.; ROCHA FILHO, P.A. Identifying cosmetic forms and crystalline phases from ternary systems. **Cosm. Toiletries.**, v.118, n.8, p.61-70, 2003.

Figura 8. disponível em: <http://www.annapegova.com.br/gp.aspx?id=103&Ba=pegotan-fps-60> acesso em 18 de Out. de 2010.

Figura 9. disponível em: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/la/lastructure.html>, acesso em 18 de Out. de 2010.

Figura 91. disponível em: <http://irmasgg.blogspot.com/2010/08/importancia-da-pele.html>, acesso em 19 de Out. de 2010.

FLORENSE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico químicos em farmácia**, São Paulo: Edusp., p. 732, 2003.

FORTENBACH, B.S.; MAIBACH, H.I. Role of Physical Chemical Properties in Drug Relay into Skin Compartments. **Skin. Pharmacol. Physiol.**, v. 21, p.294-299, 2008.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.**, v. 64, p.190–195, 1975.

FRANZ, T.J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. **Curr. Prob. Dermatol.**, v.7, p. 58–68, 1978.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2.ed. New York; Wiley-liss, p 397, 1987.

FRUEHAUF, J.P. & MEYSKENS JR., F.L. Reactive oxygen species: a breath of life or death? **Clin. Cancer.**, v. 13, p. 789–794, 2007.

GARCIA, C. R. C. Atualização em Princípios-Ativos Antienvhecimento. **Revista de Cosmiatria & Medicina Estética**, v.4, n. 4, p 9-15, 1996.

GLATTER, O. **Small-angle x-rays scattering**. London: Academic Press, 1982.

GNIADCKA, M.; NIELSEN, O.F.; CHRISTENSEN, D.H.; WULF, H.C. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair and nail. **J. Invest. Dermatol.**, v.110, p.393-398, 1998.

GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S. A.; SCHMIDT, B.; AUTAIN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on culture cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 54, p. 1545-1547, 1965.

GUIRARD, B. M.; SNELL, E. E. AND WILLIAMS, R. J. "Occurrence in Natural Products of a Physiologically Active Metabolite of Pyridoxine," **Arch. Biochem.**, v.9, p.381- 396, 1942.

GWAK, H.C.; CHUN, I.K. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro Percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. **Int. J. Pharm.**, v. 236, p.57-64, 2002.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. Cell cytotoxicity assays. **Food. Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.79-126, 1997.

HEMKER, W.J. Universal oil-in-water polyelectrolyte emulsifiers for advanced cosmetic product formulation. **Softw**, v.116(14), p.505-508, 1990.

HERMANN R, NIEBCH G, BORBE HO, ET AL: Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic alpha-lipoic acid formulations in healthy volunteers. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.4, p.167–174, 1996.

HIRATA, L. L.; SATO, M.E.O & SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, p.418-24 , 2004.

HÖNIGSMANN, H. Phototherapy for psoriasis. **Clin Exp Dermatol.**, v.26, p. 343-50, 2001.

HOTCHKISS, S.A.M. Dermal metabolism. In: Roberts, M. S., Walters, K. A. eds. **Derm. Abs. . Tox. Assessm.**, New Yoork: Marcel Dekker, p. 43-101, 1998.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC. Int.**, v.11, p.96, 1998

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons. cap.16, p.299-332, 2001.

IDSON, B. Water and the skin. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 24, p.197–212, 1973.

Instituto Nacional de Metodologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

International Standard Organization, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.

International Standard Organization, Statistics – Vocabulary and Symbols – Part 1: Probability and General Statistical Terms, ISO 3534-1, 1993.

International standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

ISAAC, V.L.B. Desenvolvimento, estabilidade e liberação *in vitro* de preparações lipolíticas. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998. 138f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

JAKASA, I & KEZIC, S. Evaluation of in-vivo animal and in-vitro models for prediction of dermal absorption in man. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 27, p. 281, 2008.

JAY, V.J.Y.; BERTHON, P.; HAGEGE, M.P.; POUGET, B.; LEJEUNE & H. POURRAT. New active ingredient for aging prevention. **Cosm. Toiletries.**, v.113, p.71-77, 1998.

JENKINS, G., Molecular mechanisms of skin ageing. **Mech. Ag. Develop.**, v.123, 2002.

KAMATA, H. & HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cell. Signal.**, Vol. 11, p. 1–14, 1999.

CASTING, G.B.; FILLOON, T.G.; FRANCIS, W.R.; MEREDITH, M.P. Improving the sensitivity of in vitro skin penetration experiments. **Pharm. Res.**, v. 11, p. 1747–1754, 1994.

KOBAYASHI, Y.; MIYAMOTO, M.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Drug permeation through the three layers of the human nail plate. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 51, p.271-278, 1999.

KOFUJI, K., NAKAMURA, M., TAKASHI, I., YOSHIFUMI, M., KAWASHIMA, S. Stabilization of a-lipoic acid by complex formation with chitosan. **Food. Chem.**, v. 109, p. 167–171, 2008.

KOHEN, R. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. **Biomed. Pharmacother.**, 53: 181-92, 1992.

KORHONEN, M.; HELLEN, L.; HIRVONEN, J.; YLIRUUSI, J. Rheological properties of creams with four different surfactant combinations – effect of storage time and conditions. **Int. J. Pharm.**, v. 221, p.187-196, 2001.

LECOMTE, A. Application de La diffusion des rayons-x à l'étude de séparation de phases amorphes et aux procédés sol-gel. Tese (Doutorado). L'Université de Limoges, 1988.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **J. Controlled. Release.**, v. 136, 88-98, 2009.

LEITE, F.; **Validação em Análise Química**, 4ª ed., Editora Átomo: Campinas, 2002.

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

LIRA, A.M.M. Estudo da permeação *in vitro* e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapachol. Recife: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LOCHHEAD, R.Y. Emulsions. **Cosmet. Toiletries.**, v.109, n.5, p.93-103, 1994

LOCHHEAD, R.Y.; HEMKER, W.J.; CASTANEDA, J.Y.; GARLEN, D. Novel cosmetic emulsions. **Cosmet. Toiletries.**, v.101, p.125-138, 1986.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, vol. 41, n. 2, 2005.

MA W, WLASCHEK M, TANTCHEVA-POOR I, SCHNEIDER LA, NADERI L, RAZIWOLF Z, SCHULLER J, SCHARFFETTER-KOCHALEK K: Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 26, p. 592-599, 2001.

MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: **Cosmetologia: com questões de avaliação**. Rio de Janeiro, p.33-42, 61-145, 2000.

MARRIOTT, C. **Rheology and the flow of fluids**. In: AULTON, M.E. *Pharmaceutics: the science of dosage form design*. Churchill Livingstone, 1996.

MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. Method development and validation for the determination of mineral elements in food and botanical materials by capillary electrophoresis., **J. Chromatogr.**, v.22, p.14, 1994

MASSON, D.S. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes. [Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; 2005.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N.; **Statistics for Analytical Chemistry**, 2^a ed., Ellis Horwood: Chichester, 1988.

MONTAGNER, D.; CORREIA, G.M. Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs. **Rev. Bras. Farm.**, v.85 (3), p. 69-72, 2004.

MONTEIRO, M.L.; SOUZA, E.A.; GIANOTTO, A.S.; NERY, F.M.M.; DUARTE, C.J.; FREITAS.; CASAGRANDE, R.; BARACAT, M.M. Comprimidos Matriciais Preparados com Hidroxipropilmetilcelulose e Pectina contendo Quercetina para Liberação Cólon-específica. **Lat. Am. J. Pharm.**, 26 (2): 179-84, 2007.

MOORE, J.W.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharm. Technol.**, v.20, n.6, p. 64-74, 1996.

MORAES, J. D. D. ; CHIARI, B. G ; MARTINI, P. C. ; CORREA, M. A ; ISAAC, V. L. B . Estudo do comportamento reológico de emulsões o/a contendo óleos vegetais. 24º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, São Paulo. Anais do 24º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2010.

MORGANTI, P.; RUOCCO. E.; WOLF. R.; RUOCCO. V. Percutaneous Absorption and delivery systems. **Clin. Dermatol.**, N° 19 (4), p.489 – 501, 2001.

MORIKAWA, T.; YASUNO R.; WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. **Febs .Lett.**, v.498, p.16–21, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

NAMJOSHI, S.; CACCETTA R.; BENSON, H.A. E. Skin peptides: Biological activity and therapeutic opportunities. **J. Pharm. Sci.**, v.97(7), p.2524-2542, 2007.

National Association of testing Authorities (NATA). Technical Note 17. Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods, 1997.

NESSEEM, D. I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biomed.**, Anal, v. 26, p. 387-399, 2001.

NIELSEN, J.A. IN: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.; LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. **Diffraction, refraction and absorption of x-rays and neutrons: a comparative exposition.** Paris: Springer Verlag, 1993. p. 3-21.

O'HARA, T.; DUNNE, A; BUTLER, J.; DENAVE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharm. Sci. Technol.**, Today, Cambridge, v.1, n. 5, 214-223, 1998.

OLIVEIRA, F.M., FONSECA, Y.M., FREITAS, O., FONSECA, M.J.V. Development of topical functionalized formulations addres with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **Int. J. Pharm.**, v. 342, p.40-48, 2007.

OTTO, A.; DU PLESSIS, J.; WIECHERS, J.W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.31(1), p.1- 19, 2009.

OTTO, A.; WIECHERS, J.W.; KELLY, C.L.; DEDEREN, J.C.; HADGRAFT, J.; DU PLESSIS, J. Effect of emulsifiers and their liquid crystalline structures in emulsions on dermal and transdermal delivery of hydroquinone, salicylic acid and octadecenedioic acid. **Skin. Pharm.Phys.**, vol. 23, p. 273-282, 2010.

PACKER, L.; WITT E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, p. 227-50, 1995.

PAUL, J. **Cell and tissue culture.** 5 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p 484, 1975.

PEMULEN. Introducing **Pemulen Ò Polymeric Emulsifiers.** Technical Literature, Cleveland, 1999.

PERRICONE, N.V. Pharmacologic cognitive enhancers: Pharmacologic cognitive enhancers: dermatologic indications. **Skin. aging.**, v.6, p.68 – 74, 1998.

PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões. **Cosm. Toiletries.**, São Paulo, v.10, n.6., p.44 – 56, 1998.

PODDA M, ZOLLNER TM, GRUNDMANN-KOLLMANN M, THIELE JJ, PACKER L, KAUFMANN R: ACTIVITY of alpha-lipoic acid in the protection against oxidative stress in skin. **Curr. Problems. Dermatol.**, v.29, p.43–51, 2001.

PODDA, M. & M.; GRUNDMANN-KOLLMANN. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 54, p. 578-82, 2001.

PODDA, M.; RALLIS, M.; TRABER, M.G.; PACKER, L.; MAIBACH, H.I. kinetic study of cutaneous and subcutaneous distribution following topical application of [7,8 – 14 c] rac alphaslipoic acid onto hairless mice. **Biochem. pharmacol.**, v. 52, p. 627 – 633, 1998.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug. Inf. J.**, v.30, p. 1113-20, 1996

POULSEN, H.E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **Eur. J. Canc. Prev.**, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

REED, L. J. Multienzyme complex. Accounts **Chem. Res.**, v.7, p.40-46, 1974.

REED, L. J.; DEBUSK, B. G.; GUNSALUS, I. C. and HORNBERGER, Jr.C.C.S. Crystalline alpha-lipoic acid: A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. **Science.**, v. 114 (2952), p. 93-4, 1951.

REINER, M. **The Deborah Number**. Physics Today. January: 62, 1964.

RIBEIRO, C.J. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. 2 ed. São Paulo. Pharmabooks editora. p.1-5, 2010.

RIBEIRO, H.M.; MORAIS, J.A.; ECCLESTON, G.M. Strucuture and rheology of semisolid O/W creams containing cetyl alcohol/ non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **Int. J. Cosm. Sci.**, v. 26, n.2, p. 47-59, 2004.

RICHARD, A. Lipoic acid basics. **Whole Foods**, 1996.

RIEGER, M.M. Fotoenvelhecimento e Recuperação da Pele. **Cosm. Toiletries.**, v.19, p. 48-51, 2007.

RIEGER, M.M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosm. Toiletries.**, v.8, n.5, p.47-53, 1996.

RIZZZO, E.; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. **Técnicas básicas de cultura celular**. 4.ed. São Paulo: Instituto Butantã, p. 123, 1983.

ROBERT J. S. & IRVIN H. B. **Permeability of the Skin. Physiological Reviews**. Vol. 51, N°4, United States of America, 1971.

ROBERTS, M.S., WALTERS, K.A. The relationship between function and barrier function of the skin. In: Roberts, M. S., Walters, K. A. eds. **Dermal Absorption and toxicity Assessment**. New York: Marcel Dekker, p. 1-42, 1998.

ROBERTS, M.S.; ANDERSON, R.A.; SWARBRICK, J.; MOORE, D.E. The percutaneous absorption of phenolic compounds: the mechanism of diffusion across the stratum corneum. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 30, p.486-490, 1978.

ROCHA, F.D.; PEREIRA, R.C.; KAPLAN, M.A.C.; TEIXEIRA, V, L. Natural products from marine seaweeds and their antioxidant potencial. **Rev. bras. Farmacol.**, v.17, n.4, 2007.

ROSENBLUTH, S.A.; WEDDINGTON, G.R.; GUESS, W.L.; AUTIAN, J. Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.54, p.156-159, 1965.

SALIOU, C.; KITAZAWA M.; MCLAUGHLIN, L *et al.* Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF- kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 174–83, 1999.

SALIOU, C.;KITAZAWA, M.; MCLAUGHLIN, L.; YANG, J.; LODGE, J.K.; TETSUKA, T.; IWASAKI, K.; CILLARD, J.; OKAMOTO, T.; PACKER, L. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 26, p.174 – 183, 1999.

SANCTIS, D. S. Emulsões para uso externo. **Revista Racine**, São Paulo, n. 53, p. 53 – 62, 1999.

SARTORELLI, P.; ANDERSON, H.R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GÖEN, T.; et al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 8, p. 133–152, 2000.

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

SCHAEFER, H., ZESCH, A., STUTTGEN, G. Penetration, permeation, and absorption of triamcinolone acetonide in normal and psoriatic skin. **Arch. Dermatol. Res.**, 258:241-249, 1977.

SCHEUPLEIN, R.J., BLANK, I.H., Permeability of the skin. **Physiol. Rev.**, v. 51, p. 702-747, 1986.

SCHEUPLEIN, R.J.; MORGAN, L.J. Bound water in keratin membranes measured by a microbalance technique. **Nature.**, v. 214, p.456–458, 1967.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**. Fundamentos Teóricos e Práticos. São Paulo: Artiliber, 2006.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Emulsões. **Cosmet.Toiletries.**, v. 12, p. 71-74, 2000.

SCOTT, R.C., DUGARD, P.H., DOSS, A.W. Permeability of abnormal rat skin. **J. Invest Dermatol.**, v. 86, p. 201-207, 1986.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization **J. Chromatogr.**, v.987, p. 57, 2003.

SHARMA, S. K.; MULVANEY, S.J.; RIZVI, S. S. H. **Food processing engineering theory and laboratory experiments**. United States of America: Wiley Interscience, 2000.

Sharma, S.K.; Mulvaney, S.J.; Rizvi, S.S.H. **Food process engineering: theory and laboratory experiments**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, p. 348, 2000.

SILVA, E. C.; SOARES, I. C. Tecnologia de emulsões. **Cosm. Toiletries.**, São Paulo, v.8, n.5., p.37 – 46, 1996.

SIMOVIC, S.; TAMBURIC, S.; MILIC-ASKRABIC, J.; RAJIC, D. An investigation into interactions between polyacrylic polymers and a non-ionic surfactant: an emulsion preformulation study. **Int. J. Pharm.**, v.184(2), p. 207-217, 1999.

SLOMINSKI, A. Neuroendocrine System of the Skin. **Skin. Derm.**, 2008.

SNELL, E. E.; TATUM, E. L. AND PETERSON, W. H. Growth factors for bacteria. **J. bacterial.**, v.33, p. 207, 1937.

SQUIER, C.A. The permeability of keratinized and nonkeratinised oral epithelium to horse-radish peroxidase. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 43, p.160-177, 1973.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, Press, East Lansing, Michigan State, USA., p. 418, 1996.

STRAND, R.D. - **O que seu médico não sabe sobre medicina nutricional pode estar matando você.** São Paulo, M. Books do Brasil, 2004.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S.; **Pharm. Technol.**, v.2, p.12, 1998

SZUBA, A., ROCKSON S.G. Lymphedema: anatomy, physiology and pathogenesis. **Vasc. Med.**, v. 2, p.321-326, 1997.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Adv. Colloid. Interface. Sci.**, v. 108/109, p. 227-258, 2004.

TADROS, T. Principles of emulsion stabilization with special reference to polymeric surfactants. **J. Cosmet. Sci.**, v.57(2), p.153-169, 2006.

TEICHERT, J.; TUEMMERS, T.; ACHENBACH, H.; PREISS, C.; HERMANN, R.; RUUS, P.; PREISS, R. Pharmacokinetics of alfa -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 45, p. 313–328, 2005.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLELABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS (IUPAC TECHNICAL REPORT) **Pure. Appl. Chem.**, v.74, p.835, 2002.

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.

TROMMER, H.; NEUBERT, R.H.H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. **Skin. Pharmacol. Physiol.**, v. 19, p.106-121, 2006.

TYLE, P. Liquid crystal and their applications in drug delivery, In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH publishers, p. 125-162, 1989.

United States Pharmacopeia (USP) Convention, US Pharmacopeia 26, NF 19, Rockville, 2003

UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP). 31th ed. United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2008.

VAN DE SANDT, J.J.M.; VAN BURGSTEDEN, J.A.; CAGE, S.; CARMICHAEL, PL.; DICK, I.; KENYON, S, et al. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.39, p. 271–281, 2004.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H.; **Pure. Appl. Chem.**, v.73, p.1381, 2001

VIGLIOGLIA, P.A. & J. RUBIN. **“Cosmiatria III”** Americana Publicações, Buenos Aires, 1997.

WAHLBERG, J. E.; NILSSON, G. Skin irritancy from propylene glycol. **Acta. Derm. Venereol.**, (Stockh), v. 64, p. 286–290, 1984.

WALTER, J.M & MAIBACH, H.I. Bioquímica Cutânea no Envelhecimento da Pele. **Cosm. Toiletries.**, v.20, p. 56-59, 2008.

WALTERS, A. K. **Dermatological and transdermal formulations**, 4^a ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 2002.

WERTZ, P.W. Epidermal lipids. **Semin. Dermatol.**, v.11, p.106-113, 1992.

WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Resp. Physiol.**, V.128, p. 379-91, 2001.

WILKINSON, S.C.; MAAS, W.J.; NIELSEN, J.B.; GREAVES, L.C.; VAN DE SANDT, J.J.; WILLIAMS, F.M. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, v. 79, p. 405–413, 2006.

WILKINSON, S.C.; WILLIAMS, F.M.; Effects of experimental conditions on absorption of glycol ethers through human skin in vitro. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, v. 75, p. 519–527,

2002.

WILLIAMS, C. In: BARUCHEL, J.; HODEAN, J. L.; LECHMAN, M. S.; REGNARD, J. R.; SCHLENKER, C. **Diffraction, refraction and absorption of X-rays and neutrons: a comparative exposition**. Paris: Sping Verlag. P. 3-21, 1993.

WITKOWSKI, J.A.; PARISH, L.C. You've come a long way baby: a history of cosmetic lead toxicity. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.367-370, 2001.

World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Thirty-second report, WHO Technical Report Series, No. 823, Geneva, 1992.

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

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 107: 135–42, 2001.

ZESCH, A. Skin irritation by topical drugs. **Derm. Beruf. Umwelt.**, v.31, p. 74–78, 1983.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta. Pharm.**, v.25, p. 83-89, 2004.

ZOUBOULIS, C.C. & A. BOSCHNAKOW. Chrono- and photoageing of the human sebaceous gland. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.26, p. 600-7, 2001.