UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação *in vitro* de óleos brasileiros como
promotores de penetração cutânea do
5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona (ácido kójico)

Robson Vicente Machado de Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof^ª. Dr^ª. Mitsuko Taba Ohara

São Paulo

2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Oliveira, Robson Vicente Machado de
O48av Avaliação *in vitro* de óleos brasileiros como promotores de
penetração cutânea do 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona
(ácido kójico) / Robson Vicente Machado de Oliveira. --
São Paulo, 2004.
295p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ohara, Mitsuko Taba

1. Cosméticos : Controle de qualidade 2. Farmacotécnica
I. T. II. Ohara, Mitsuko Taba, orientador.

668.55 CDD

Robson Vicente Machado de Oliveira

Avaliação *in vitro* de óleos brasileiros como promotores de penetração cutânea do 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona (ácido kójico)

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Mitsuko Taba Ohara
Orientador / Presidente

Prof^a. Dr^a. Marta Maria Duarte Carvalho Vila
1º Examinador

Prof. Dr. Marcos Moisés Golçalves
2º Examinador

Prof^a. Dr^a. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
3º Examinador

Prof^a. Dr^a. Érica Rosa Maria Kedor
4º Examinador

São Paulo , 4 de Outubro de 2004

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Mitsuko Taba Ohara, pela dedicação, orientação, paciência, compreensão e apoio, que tornaram essa obra possível.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

À Prof^ª Dr^ª Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

À Prof^ª Dr^ª Érica Rosa Maria Kedor

À Prof^ª Dr^ª Marta Maria Duarte Carvalho Vila

À Prof^ª Dr^ª Ivana Barbosa Suffredini

À Prof^ª Dr^ª Telma Mary Kaneko

Ao Prof. Dr. Marcos Moisés Golçalves

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

À Farmácia Universitária da USP – FARMUSP

A Prof^ª Dr^ª Maria Inês Santoro

Ao Prof. Ms. Newton Andreo Filho

À farmacêutica Maria Goretti Farias de Lima

Ao senhor Joaozinho Domênico da empresa Ionquímica

Ao senhor José de Souza Sobrinho

À todos os funcionários da Universidade de São Paulo, que direta ou indiretamente auxiliaram na realização desta obra.

Aos meus pais, minha esposa e filha.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, pelos estudos de difusão, os óleos de copaíba, andiroba e babaçu, como promotores de penetração do despigmentante ácido kójico, através dos ensaios de pré-tratamento por 1 hora, veiculados em soluções de álcool isopropílico:propilenoglicol 95:5 v/v nas concentrações a 50 e 25% v/v e seguido de aplicação de solução aquosa de ácido kójico 3,9% p/v por até 22,5 horas, ou, pelos ensaios de tratamento, para o óleo de copaíba incorporado em creme "lanette a 50 e 25% v/p, e adicionado de 3,9% p/p de ácido kójico. Controles foram preparados substituindo-se o óleo por água destilada. Foi utilizado o sistema composto por células de difusão com fluxo estático, membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* e solução salina a 34°C como fluido receptor. A concentração de despigmentante liberada nesse fluido foi avaliada em intervalos de tempo de 1,5 horas, através de um método espectrofotométrico previamente validado. As soluções de óleo de copaíba 50 e 25% v/v apresentaram os maiores valores de fluxo e permeabilidade, correspondentes a 12,717 e 7,949 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, e 3,261 e 2,038 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$, e fatores de promoção equivalentes a 3,78 e 4,05, respectivamente. As formulações com óleo de copaíba 50 e 25% v/v e ácido kójico 3,9% p/p apresentaram valores de 4,548 e 2,176 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, e 1,166 e 0,558 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$, para fluxo e permeabilidade, e fatores de promoção equivalentes a 2,16 e 1,18, respectivamente.

Palavras-chave: óleos, andiroba, copaíba, babaçu, promotor de penetração, estudo de difusão, ácido kójico, muda de pele de cobra.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate, using permeation studies, the copaiba, andiroba and babassu oils, like penetration enhancers for the depigmenting agent kojic acid, under 1 hour pre-treatment with solutions containing 50 and 25% v/v of these oils in a mixture of isopropilic alcohol:propylene glycol (95:5 v/v), and after that, 22.5 hour treatment with aqueous solution of kojic acid 3.9% w/v, or, in the case of copaiba oil, treatment with "lanette" cream plus these oils at 50 and 25% v/w, and added with 3.9% w/w of kojic acid. Controls were made changing the oils with distilled water. It was used the static cells permeation system, *Crotalus durissus terrificus* shed snake skin membranes and saline solution at 34°C like receptor fluid. The permeated depigmenting agent concentration in the receptor fluid was determined at 1.5 hour constant intervals by a pre-validated spectrophotometric method. The copaiba oil 50 and 25% v/v solutions showed greatest flux and permeability values, equal to 12.717 and 7.949 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, or 3.261 and 2.038 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$, and resulting in enhancement factors of 3.78 and 4.05, respectively. The formulations including copaiba oil 50 and 25% v/w and kojic acid 3.9% w/w, showed 4.548 and 2.176 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ or 1.166 and 0.558 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$ for flux and permeability, and enhancement factors equal to 2.16 and 1.18, respectively.

Keywords: oil, andiroba, copaiba, babassu, penetration enhancer, permeation study, kojic acid, shed snake skin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E BIOFUNCIONAIS DA PELE	18
3.1.1 Composição da Pele	18
3.1.1.1 Emulsão epicutânea	18
3.1.1.2 Epiderme	19
3.1.1.2.1 Estrato córneo	19
3.1.1.2.2 Epiderme viável	21
3.1.1.3 Derme e endoderme	22
3.1.2 Pigmentação da Pele	22
3.1.2.1 Mecanismo de produção	23
3.1.2.2 Alterações	25
3.1.3 Envelhecimento, degeneração e morte celular	26
3.1.4 Penetração cutânea de substâncias	27
3.1.4.1 Características gerais	27
3.1.4.2 Vias de penetração cutânea	28
3.2 ÓLEOS DE PLANTAS BRASILEIRAS	30
3.2.1 Características gerais	30
3.2.2 Óleo de copaíba	31
3.2.2.1 Origem e composição	31
3.2.2.2 Uso	34
3.2.3 Óleo de andiroba	37
3.2.3.1 Origem e composição	37
3.2.3.2 Uso	38
3.2.4 Óleo de pariparoba	39

3.2.4.1 Origem e composição	39
3.2.4.2 Uso	43
3.2.5 Óleo de babaçu	45
3.2.5.1 Origem e composição	45
3.2.5.2 Uso	46
3.3 DESPIGMENTANTES	47
3.3.1 Características gerais	47
3.3.2 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona ou ácido kójico	48
3.3.2.1 Origem e propriedades físico-químicas	48
3.3.2.2 Propriedades biológicas	49
3.3.2.3 Doseamento	51
3.3.2.4 Aplicações	52
3.3.2.5 Estabilidade	56
3.3.2.6 Toxicidade	57
3.3.3 2-Fosfato de ascorbil e magnésio	59
3.3.3.1 Origem e propriedades físico-químicas	59
3.3.3.2 Propriedades biológicas	60
3.3.3.3 Doseamento	61
3.3.3.4 Aplicações	62
3.3.4 Arbutina	62
3.3.4.1 Origem e propriedades físico-químicas	62
3.3.4.2 Propriedades biológicas	64
3.3.4.3 Doseamento	65
3.3.4.4 Aplicações	65
3.3.5 Avaliação da atividade despigmentante	66
3.3.5.1 Métodos <i>in vitro</i>	66
3.3.5.2 Métodos <i>in vivo</i>	68
3.4 SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA	71
3.4.1 Fundamentos da difusão cutânea	71
3.4.2 Características gerais	74
3.4.3 Mecanismos de ação	75
3.4.4 Terpenos, ácidos e álcoois graxos promotores de penetração	79

3.5 ESTUDOS DE DIFUSÃO	81
3.5.1 Características gerais	81
3.5.2 Células de difusão	81
3.5.2.1 Características gerais	81
3.5.2.2 Fluido receptor	83
3.5.2.3 Membranas	84
3.5.2.3.1 Artificiais	84
3.5.2.3.2 Animais Diversos	84
3.5.2.3.3 Muda de Pele de cobra	85
3.5.2.3.4 Humanas	89
3.5.2.3.5 Alteradas e reconstituídas	90
3.5.3 Estudos de difusão com promotores de penetração	91
3.6 TENDÊNCIA ATUAL DA COSMETOLOGIA	93
4 MATERIAL E MÉTODOS	94
4.1 MATERIAL	94
4.1.1 Matérias-primas	94
4.1.2 Soluções e formulações	95
4.1.3 Equipamentos e materiais de laboratório	95
4.1.3.1 Sistema de células de difusão	95
4.1.3.2 Materiais diversos	98
4.2 MÉTODOS	99
4.2.1 Avaliação da difusão	99
4.2.1.1 Preparo das soluções	100
4.2.1.1.1 Solução salina – cloreto de sódio 0,9% p/v	100
4.2.1.1.2 Álcool isopropílico com propilenoglicol 5% v/v	100
4.2.1.1.3 Ácido Cítrico 10% p/v	100
4.2.1.1.4 Óleos de copaíba, andiroba ou babaçu 50% e 25% v/v	101
4.2.1.1.5 Água em álcool isopropílico 50% e 75% v/v adicionado de propilenoglicol 5% v/v	101
4.2.1.1.6 Solução saturada de ácido kójico 3,9% p/v	102
4.2.1.1.7 Identificação das soluções para pré-tratamento, dos despigmentantes e seus controles	103

4.2.1.2 Preparo das formulações	104
4.2.1.2.1 Creme "lanette"	104
4.2.1.2.2 Incorporação dos óleos a 25% ou 50% v/p e do ativo despigmentante 3,9% p/p	105
4.2.1.2.3 Incorporação dos controles para os óleos	106
4.2.1.2.4 Incorporação dos controles para o despigmentante	106
4.2.1.2.5 identificação das formulações utilizadas e seus controles	107
4.2.1.2.6 Determinação do pH	107
4.2.1.3 Montagem do sistema de células de difusão	108
4.2.1.3.1 Montagem do sistema marca Logan modelo SDCF-6	108
4.2.1.3.2 Obtenção, preparo e armazenamento das mudas de pele de cobra	108
4.2.1.3.3 Formatação das membranas e colocação nas células de difusão	110
4.2.1.3.4 Instalação das membranas nas células de difusão e estabilização do sistema	110
4.2.1.4 Execução dos ensaios de difusão	112
4.2.1.4.1 Pré-tratamento das membranas com óleos	112
4.2.1.4.2 Avaliação das formulações dos despigmentantes	115
4.2.1.4.3 Retirada, diluição e armazenamento das alíquotas do fluido receptor	116
4.2.1.5 Quantificação espectrofotométrica das amostras	117
4.2.1.6 Cálculos dos parâmetros de difusão	117
4.2.1.6.1 Quantidade liberada no fluido receptor e suas correções	118
4.2.1.6.2 Parâmetros da difusão	119
4.2.1.7 Avaliação estatística dos resultados	121
4.2.2 Validação do método espectrofotométrico	122
4.2.2.1 Seleção do comprimento de onda da radiação ultravioleta	122
4.2.2.2 Curva de Calibração	123
4.2.2.3 Limite de detecção	124
4.2.2.4 Limite de quantificação	125
4.2.2.5 Precisão	125

4.2.2.6 Exatidão	126
4.2.2.7 Análise estatística	126
5 RESULTADOS	127
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	127
5.1.1 Seleção do comprimento de onda ultravioleta	127
5.1.2 Curva de calibração	127
5.1.3 Limite de detecção e de quantificação	129
5.1.4 Precisão	130
5.1.5 Exatidão	131
5.1.6 Análise Estatística	132
5.2 AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO	134
5.2.1 Estudos com pré-tratamento	134
5.2.1.1 Quantidade liberada no fluido receptor	135
5.2.1.2 Curva de liberação	140
5.2.1.3 Parâmetros da difusão	147
5.2.1.3.1 Equação da reta, R^2 e tempo de latência	147
5.2.1.3.2 Fluxo	149
5.2.1.3.3 Permeabilidade	152
5.2.1.3.4 Fator de promoção	155
5.2.2 Estudo das formulações	156
5.2.2.1 Quantidade liberada no fluido receptor	156
5.2.2.2 Curva de liberação	159
5.2.2.3 Parâmetros da difusão	161
5.2.2.3.1 Equação da reta, R^2 e tempo de latência	161
5.2.2.3.2 Fluxo	162
5.2.2.3.3 Permeabilidade	164
5.2.2.3.4 Fator de promoção	166
5.2.2.4 Determinação do pH	166
5.2.3 Análise Estatística	167
6 DISCUSSÃO	172
6.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	172
6.1.1 Seleção do comprimento de onda da radiação ultravioleta	172

6.1.2 Curva de calibração	173
6.1.3 Limite de detecção e quantificação	173
6.1.4 Precisão	174
6.1.5 Exatidão	175
6.1.6 Análise Estatística	175
6.2 AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO	175
6.2.1 Preparo das soluções dos óleos	175
6.2.2 Membranas de muda de pele de cobra	178
6.2.3 Fluido receptor	181
6.2.4 Montagem do sistema	182
6.2.5 Ensaios com pré-tratamento	183
6.2.5.1 Soluções saturadas de ácido kójico	184
6.2.5.2 Quantidade liberada no fluido receptor	184
6.2.5.3 Curva de liberação	188
6.2.5.4 Equação da reta, R^2 e tempo de latência	191
6.2.5.5. Fluxo e permeabilidade	192
6.2.5.6 Análise estatística	196
6.2.5.6.1. Análise de variância – teste F	197
6.2.5.6.2. Comparação de médias – teste t	199
6.2.6 Estudos das formulações	201
6.2.6.1 Preparo das formulações	201
6.2.6.2 Quantidade liberada no fluido receptor	204
6.2.6.3 Curva de liberação	205
6.2.6.4 Equação da reta, R^2 e tempo de latência	206
6.2.6.5. Fluxo e permeabilidade	207
6.2.6.6 Análise estatística	209
6.2.6.6.1. Análise de variância – teste F	210
6.2.6.6.2. Comparação de médias – teste t	210
7 CONCLUSÕES	212
APÊNDICE	213
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	270

1

INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida trouxe paralelamente maior preocupação com os cuidados físicos para retardar os sinais de envelhecimento, buscando manter a aparência mais jovem.

Da finalidade de embelezamento, a utilização dos cosméticos passou para tratamento e proteção da pele, aumentando o consumo dessa classe de produtos. Confirmam esta tendência os dados da Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal e Cosméticos, em que se verifica que produtos para os cuidados e proteção da pele representaram 63% do total de mercado de cosméticos no Brasil, em 1998.

Os produtos para o tratamento da pele constituem-se em formulações contendo compostos biologicamente ativos.

A pele é constituída de diferentes camadas. A renovação celular é decorrente da mitose das células basais na camada mais profunda, a basal ou germinativa, que promove a renovação das células mortas da camada córnea, mantendo constante a espessura da epiderme. Nesta camada estão também os melanócitos os quais sintetizam e distribuem os grânulos de melanina para os queratinócitos. A pele necessita de melanina para proteção contra a radiação ultravioleta.

O estrato córneo constitui a barreira mais efetiva contra a penetração de substâncias pela pele. É a camada mais externa, constituída geralmente de 10 a 15 camadas de células achatadas, queratinizadas e mortas. Entre suas células encontra-se uma massa lipídica, formada por uma estrutura multilamelar com camada bilipídica intercalada com água, formando um cristal líquido de regiões polares e apolares. Esse estrato representa a principal barreira para a penetração de substâncias, sendo que as hidrofílicas são absorvidas lentamente nesse estrato, e as lipofílicas mais fácil e rapidamente, porém a passagem para as camadas mais profundas é dificultada.

A camada viável da epiderme, localizada logo abaixo do estrato córneo, apresenta caráter hidrofílico, sendo pouco acessível a substâncias de natureza lipofílica, e mais acessível àquelas hidrofílicas.

Desse modo, a pele é uma barreira para a penetração de substâncias de qualquer natureza, exercendo a função de proteção do organismo contra as substâncias do meio ambiente.

Substâncias ativas para o tratamento da pele, como despigmentantes ou compostos que atuam na renovação da camada celular devem atravessar o estrato córneo para atingir as camadas viáveis da epiderme. Desse modo, necessitam estar incorporadas em formulações que auxiliem a sua penetração na pele.

A adição de compostos que alteram a permeabilidade da pele, os denominados promotores de absorção ou “enhancers”, pode aumentar a difusão de substâncias de difícil penetração.

Dentre as substâncias com esta atividade, ácidos graxos como ácido oléico, linoléico, láurico, cáprico e outros, têm ampla aplicação em cosméticos, uma vez que são compostos presentes em muitas formulações.

Os ácidos graxos também aumentam a absorção de substâncias lipofílicas. O aumento da absorção é dependente do veículo utilizado e da estrutura do ácido graxo (representada pelo número de carbonos e de ligações duplas que constituem a cadeia apolar). Os ácidos graxos com cadeias formadas por 10 ou 12 átomos de carbono são os mais efetivos como “enhancers”. O ácido oléico, com 18 carbonos e uma insaturação (18:1) mostrou ser o mais efetivo enquanto o ácido esteárico, com 18 carbonos e saturado (18:0) geralmente não apresenta as propriedades dos promotores. Outros ácidos graxos insaturados de cadeia longa como ácido miristoléico (14:1), palmitoléico (16:1) linoléico (18:2) linolênico (18:3) também apresentam propriedades promotoras.

Os cosméticos representam uma parcela significativa do mercado econômico, entretanto, a maioria das matérias primas são importadas, embora seja conhecido o potencial da flora brasileira no fornecimento de substâncias para fins farmacêuticos e cosméticos. Algumas matérias primas

estão sendo utilizadas baseadas no uso popular, e outras, com atividade já comprovada (OLIVEIRA, et al., 1996).

Óleos vegetais, como de amêndoas, sementes de uva, rosa mosqueta e outros são utilizados há alguns anos como base para cosméticos em substituição aos óleos minerais pelas seguintes características: são menos oclusivos, relativamente inertes, fornecem nutrientes (tocoferóis, carotenóides e ácidos graxos essenciais), apresentam atividade antioxidante e têm preferência de consumo (produtos naturais).

Óleos de algumas plantas da flora brasileira, como andiroba, copaíba, paiparoba e babaçu foram relatados como promotores de atividade antiinflamatória e propostos como veículos para formulação de medicamentos de uso tópico (FERRARI, 1998; LOFREDO, FERRARI e ROCHA FILHO, 1998; ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996; COSTA, et al., 1995; SERTIÉ, et al., 1995; SCHNEID, et al., 1988; MORAES, 1986; BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992; KIJOA, et al., 1980).

A composição desses óleos mostra alta proporção de ácidos graxos como o oléico (OLIVEIRA, et al., 1996; IONQUÍMICA, 2000) que, como foi mencionado, apresenta atividade auxiliar na penetração de substâncias, através do estrato córneo. Outros compostos como tensoativos e compostos nitrogenados (azo), também são considerados promotores de absorção, entretanto os óleos apresentam outra vantagem que é a capacidade de hidratação e emoliência, muito importante no caso de cosméticos.

Além dos princípios ativos, outro recurso cosmético é a hidratação da pele (OLIVEIRA, et al., 1996). Lipídios presentes, como ácidos graxos essenciais, são responsáveis pela flexibilidade e elasticidade da pele. Outra característica apresentada por alguns óleos é a atividade antiinflamatória que pode ser vantajosa na veiculação de substâncias irritantes.

Alguns óleos já estão sendo comercializados e estudos que comprovem a sua atividade como promotores de absorção, permitirão seu uso baseado em dados experimentais. Na Comunidade Européia, a legislação impôs normas rígidas e guias para as indústrias de cosméticos em relação à segurança, eficácia e também à propaganda. Como exemplo, o objetivo da

6th Amendment to the Cosmetic Directive (COLIPA, 1999) é a proteção do consumidor de qualquer possível decepção (devido a ausência de eficácia) ou dano a saúde que poderia resultar do uso de cosméticos. Cada produto comercializado na Comunidade Européia deve obrigatoriamente ter documentadas as avaliações de segurança e eficácia. Isto significa que as propriedades do produtos cosméticos terão que ser precisas e cientificamente provadas ou o produtor não poderá usá-las como ferramenta de comercialização. Provas podem consistir de dados publicados dos insumos, estudos efetuados em modelos não humanos, teste em seres humanos ou a combinação de diferentes métodos.

A comprovação da eficácia dos ativos despigmentantes inclui como primeiro passo a comprovação da absorção, pois para se obter o efeito benéfico a substância primeiramente deve atravessar a camada córnea.

Estudos de absorção percutânea são efetuados através de metodos *in vitro* e *in vivo*.

Nos estudos de permeação pelos métodos *in vitro* são utilizados sistemas compostos de células com membranas. As células mais freqüentemente utilizadas são as células de Franz que podem ser acopladas a sistemas de fluxo contínuo do fluido receptor ("flow through") e amostradores automatizados, permitindo a execução de maior número de ensaios. Como membranas são utilizadas peles de animais como ratos, camundongos e cobaias, cuja permeabilidade é geralmente maior que a humana. No caso específico de ácidos graxos a pele de roedores é ainda mais permeável que a humana, e em relação às mudas de pele de cobra, a permeabilidade é menor. Mais raramente são utilizadas as peles de seres humanos devido às dificuldades de obtenção, armazenamento e padronização, além de apresentarem diferenças anatômicas e fisiológicas dependendo da parte do corpo. Contudo, apesar da variabilidade entre indivíduos e partes do corpo, é sempre recomendável a realização dos estudos de difusão com esta pele.

Os estudos pelos métodos *in vivo* são utilizados para avaliação da retenção na pele ou penetração de substâncias até a circulação sangüínea,

sendo citados na literatura os métodos de avaliação da excreção urinária e fecal de substâncias radioativas, do balanço de massa e da remoção de estrato córneo com fitas adesivas (FRANZ, LEHMAN e McGUIRE, 1993; BRONAUGH e COLLIER, 1993).

Os despigmentantes atuam sobre os melanócitos da camada basal da epiderme, através da inibição da melanogênese ou por suas propriedades melanotóxicas e de degradação de melanossomas. A melanogênese é um processo biológico enzimático e oxidativo, e sua inibição ocorre através de inibição das enzimas envolvidas (como a tirosinase e dopacromo tautomerase), da alteração dos processos de oxidação (da dopa, leucodopacromo e cistenildopa) (SILVA, et al., 2000; CHIKAMATSU, et al., 1996).

Como os despigmentantes precisam atravessar o estrato córneo e atingir a camada basal da epiderme para atuarem sobre os melanócitos, as formulações contendo esses princípios ativos devem ser avaliadas quanto ao poder de penetração. Além disso, a maior presença nas camadas da pele está associada ao surgimento de reações indesejadas durante o uso tópico, tais como a hipopigmentação do tecido local, prurido, eritema, reações alérgicas e fotossensibilização.

O ácido kójico é um despigmentante de origem natural, obtido a partir da fermentação do arroz por microrganismos, e que inibe a enzima tirosinase, através da quelação do íon Cu^{+2} necessário a sua atividade (CHIKAMATSU, et al., 1996; SILVA, 1998).

Sendo assim, a inclusão de substâncias promotoras da penetração nas formulações com despigmentantes, como o ácido kójico, pode proporcionar a diminuição das concentrações dessas substâncias aplicadas na pele, e aumentar a eficácia e segurança no uso desses produtos.

2

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi estudar *in vitro* os óleos de andiroba, copaíba e babaçu, em soluções de pré-tratamento ou veiculados em formulações dermatológicas, como promotores de penetração cutânea para o 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona (ácido kójico), através dos estudos de difusão, visando a melhoria da eficácia de produtos despigmentantes de pele contendo esse ativo.

3

REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E BIOFUNCIONAIS DA PELE

3.1.1 Composição da Pele

A pele humana é dividida anatomicamente em 3 partes, conforme a figura 1: epiderme (A e G), derme (B), endoderme (C). As estruturas identificadas pelas letras D, E e F correspondem aos anexos cutâneos: glândula sebácea, sudorípara e folículo piloso, respectivamente.

FIGURA 1 -Desenho esquemático da composição da pele humana

3.1.1.1 Emulsão epicutânea

O estado córneo da epiderme, identificado pela letra A na figura 1, apresenta-se recoberto por uma mistura de ácidos graxos livres, triglicérides e água, denominada emulsão epicutânea, em cuja composição química pode-

se observar as substâncias listadas na tabela 1 (OLIVEIRA, et al., 1996). Contudo, de acordo com sítio anatômico avaliado, esses valores sofrem alterações (OSBORNE e HATZENBUHLER, 1993). Sua função é a de promover emoliência e manter a hidratação no estrato córneo.

TABELA 1 - Substâncias presentes na emulsão epicutânea da pele

Substância	%
Ácidos graxos livres	30
Triglicérides	25
Ceras	25
Colesterol e ésteres	5
Esqualeno	5
Outros Hidrocarbonetos	5
Esteróides	1

Segundo Osborne e Hatzenbuhler (1993), as formulações com polaridade ajustada para valores próximos aos da emulsão epicutânea, podem promover a penetração de substâncias na pele através dos folículos pilosos, mesmo que estas sejam predominantemente polares.

3.1.1.2 Epiderme

A epiderme é formada pelo estrato córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e basal ou germinativo, sendo essas três últimas camadas as mais internas e com células ainda viáveis, recebendo a denominação de epiderme viável.

3.1.1.2.1 Estrato córneo

O estrato córneo apresenta células mortas e queratinizadas, com espessura aproximada de 0,3 μm e diâmetro de 3 μm , compostas de filamentos de queratina (NOKHODCHI, et al., 2003; ASBILL e MICHNIAK,

2000). Esses filamentos apresentam ligações cruzadas entre si, unindo desse modo os queratinócitos vizinhos, estruturas essas denominadas desmossomos (ASBILL e MICHNIAK, 2000). Envolvendo toda essa porção protéica existe uma massa lipídica organizada na forma de bicamadas, e que é liberada após a diferenciação e perda da vitalidade dos queratinócitos, como produto da exocitose de corpos lamelares (ASBILL e MICHNIAK, 2000). Nas palmas das mãos e plantas dos pés essa camada apresenta-se com maior espessura, constituindo o estrato lúcido.

Naik e Guy (1997) analisaram o estrato córneo humano utilizando os métodos de espectroscopia de infravermelho e varredura por calorimetria diferencial, considerando-o como um mosaico de proteínas e lipídeos, com espessura de aproximadamente 20 μm . Essa conformação é também denominada por alguns autores como matriz lipídica multilamelar e tridimensional. Segundo Pechtold e colaboradores (1997), esse estrato caracteriza-se por queratinócitos diferenciados embebidos numa matriz contínua de lipídios lamelares extracelulares, constituídos principalmente por ceramidas, ácido graxos livres com mais de 24 carbonos na cadeia e colesterol. Kim e colaboradores (2002) afirmaram que essas ceramidas da pele são obtidas a partir da hidrólise da esfingomielina através de enzimas chamadas esfingomielinases. Entre os ácidos graxos livres, pelo menos 20% são representados pelos ácidos palmítico (16 carbonos) e oléico (18 carbonos) (COTTE, et al., 2004). Essa, Bonner e Barry (2003) citam também o sulfato de colesterol e fosfolipídios presentes nesse estrato.

Segundo Pechtold e colaboradores (1997) o estrato córneo constitui-se em um caminho longo e tortuoso que dificulta a difusão de substâncias hidrofílicas. Outra função do estrato córneo é a prevenção da perda de água através da pele (AKOMEAH, et al., 2004). Pirot e colaboradores (1998) avaliaram a perda transepidérmica de água em função da espessura do estrato córneo, através da aplicação de 15 fitas adesivas (método "tape stripping") no antebraço de voluntários, e análise do peso e espessura do material retirado. Os autores observaram aumento da perda de água proporcional à diminuição do estrato córneo.

Segundo Jackson (1993), o estrato córneo, embora constituído por queratina, como os fios de cabelo, hidrata-se de maneira homogênea, isto é, em todas as direções, diferentemente dos fios de cabelo, onde ocorre hidratação principalmente na direção horizontal, aumentando o comprimento dos fios.

3.1.1.2.2 Epiderme viável

A epiderme viável, identificada pela letra G na figura 1, apresenta-se como um epitélio escamoso estratificado, com os estratos granuloso, espinhoso e basal ou germinativo, formada em sua grande maioria (90%) por queratinócitos, além de melanócitos, células de Merkel, de Langerhans, células dendríticas T e linfócitos epidermotrópicos (LYNCH, ROBERTS e DAYNES, 1987).

Os queratinócitos são produzidos continuamente na camada mais profunda da epiderme, a camada basal, e gradativamente vão sendo empurrados para fora, formando os estratos superiores da epiderme, isto é, os estratos espinhoso, granuloso, lúcido e córneo .

Os melanócitos são responsáveis pela proteção da pele contra radiação ultravioleta, pela produção de melanina (LYNCH, ROBERTS e DAYNES, 1987), e se apresentam em número de 1000 a 2500 células por milímetro quadrado, dependendo da região corporal (SILVA, 1998) e da exposição a luz solar. A relação entre o número de melanócitos e de queratinócitos é de 36 para 1. Segundo Ahn e colaboradores (2003), os queratinócitos e os melanócitos formam a unidade epidermal melânica.

As outras células, presentes em quantidades menores na epiderme viável, apresentam funções específicas (LYNCH, ROBERTS e DAYNES, 1987), como as células de Merkel (associadas a recepção nervosa sensorial) e as células de Langerhans, as células dendríticas T e os linfócitos (associadas à proteção imunológica do tecido).

3.1.1.3 Derme e endoderme

A derme (letra B da figura 1) é um tecido conectivo denso, entremeado por uma rede de colágeno (70% dessa camada), fibras elásticas, vasos sanguíneos e linfáticos, células imunocompetentes, como os mastócitos, antígenos e células linfóides (LYNCH, ROBERTS e DAYNES, 1987, ASBILL e MICHNIAK, 2000). Essa camada apresenta característica predominantemente hidrofílica.

As glândulas sudoríparas, sebáceas e os folículos pilosos, identificados pelas letras E, D e F na figura 1, são estruturas que se originam na derme, atravessam a epiderme, e desembocam no estrato córneo. Esses anexos cutâneos constituem uma via de penetração de substâncias na pele, ocupando 1% da superfície total da pele (WILLIAMS, et al. 1996). Segundo Asbill e Michniak (2000), cada centímetro quadrado de pele apresenta 10 folículos pilosos, 15 glândulas sebáceas, 10 glândulas sudoríparas, 12 terminações nervosas e três capilares sanguíneos.

A endoderme (letra C da figura 1), ou tecido subcutâneo, apresenta como células os adipócitos, e também feixes de fibras de colágeno e elásticas, embora em menor quantidade em relação a derme. Tanto essa camada como a derme não são acessadas intencionalmente pelos produtos cosméticos.

3.1.2 Pigmentação da pele

A coloração da pele humana se deve a vários fatores associados, tais como a espessura, a qualidade da microcirculação e oxigenação sanguínea local, a presença de beta-caroteno, a quantidade de melanócitos e a viabilidade e capacidade destes em produzir a melanina.

quais a eumelanina (escura) e feomelanina (amarela a avermelhada), cuja função é absorver a radiação ultravioleta e impedir a ação de radicais livres oxidativos (LEI, et al., 2002).

Durante a síntese de melanina, inicialmente, na presença da tirosinase, a tirosina é hidroxilada, originando a 3,4-dihidroxifenilalanina (também denominada dopa), que em seguida é oxidada a dopaquinona (SILVA, 1998). Esta, por sua vez, pode sofrer ciclização a leucodopacromo, oxidação a dopacromo, que por ação da enzima dopacromo tatutomerase, ou pela tirosinase, forma eumelanina. A dopaquinona pode também se combinar com cisteína e glutatona formando cisteinildopa, que se oxida espontaneamente e se polimeriza, originando a feomelanina. Todo esse processo é iniciado através da secreção de fatores melanotrópicos pelos queratinócitos (AHN, et al., 2003). Kim e colaboradores (2002) afirmaram que a ceramida C2, presente na pele, inibe a proliferação dos melanócitos, e desse modo, o processo de pigmentação da pele. Lim e colaboradores (1999) citaram a participação das células de Langerhans e os fibroblastos na melanogênese.

A tirosinase é uma cuproproteína, formada de uma fração glicídica de ácido neurâmico e galactose, além do cobre. Essa enzima é sintetizada na superfície do retículo endoplasmático rugoso e transferida em lisossomas para o complexo de Golgi, onde é ativada com adição de uma cadeia de açúcar e secretada em vesículas, originando o melanossoma (SILVA, 1998).

Segundo Donatien e Orlow (1995), após sua síntese, a melanina é depositada nos melanossomas sobre uma matriz proteinácea insolúvel, envolvida pela membrana melanossomal, e em seguida, é transferida aos queratinócitos (LEI, et al., 2002). Haddad, Xu e Medrano (1998), afirmaram que os melanócitos que contêm eumelanina (escura) apresentam processo de síntese e liberação muito mais acelerado que aqueles que contêm feomelanina (amarela a avermelhada).

Além da radiação solar, algumas substâncias provocam aumento da produção e liberação de melanina na pele, e conseqüentemente o escurecimento desta. Substâncias lisossomotrópicas ou inibidoras da síntese

de fosfodiesterase, tais como as metilxantinas e as prostaglandinas, apresentam esta atividade (FUKUDA, et al., 1998).

3.1.2.2 Alterações

Em alguns distúrbios, a pigmentação da pele apresenta-se de forma irregular e desordenada, ocasionando o aparecimento de manchas e marcas no tecido, de aspecto não estético. Essas alterações ocorrem pelo aumento ou pela diminuição da quantidade de melanina, sendo classificadas em hiper ou hipocromias, respectivamente (SILVA, 1998).

As hipercromias podem ser classificadas em melasma (ou cloasma), sardas (ou efélides), lentigens (actínicas ou senis), e por agentes fotossensibilizantes (SILVA, 1998). Em todas essas alterações, ocorre o acúmulo e aumento da produção de melanina (ocorre o aumento da melanina por vários processos e não o aumento de melanócitos), e estão em geral associadas a exposição intensa a luz solar. Outros fatores também são citados como causadores de hipercromias, tais como, secreção de hormônios melanoestimulantes e adrenocorticotróficos, carência vitamínica, hereditariedade ou contato com substâncias como hidrocarbonetos, cosméticos, óleos essenciais e medicamentos (SILVA, 1998).

Para o tratamento das hipercromias, são utilizados os despigmentantes, que agem por diferentes mecanismos. Alguns interferem em etapas do processo de melanogênese, outros apresentam atividade melanotóxica ou degradam os melanossomas. Entre essas substâncias são citadas na literatura: o ácido kójico, que inibe a tirosinase, pela quelação do íon Cu^{+2} necessário a sua atividade; a hidroquinona que acelera a degradação dos melanossomas, e também impede a oxidação da dopa; a arbutina, que inibe competitivamente a tirosinase na oxidação da dopa; o ácido ascórbico que impede a transformação oxidativa da tirosina em dopa; o silicato de alumínio sintético (Antipollon ® HT) que adsorve a melanina secretada nos melanossomas; o ácido azelaico, que inibe a tirosinase e apresenta atividade antioxidante.

Entre as ações indesejadas dos despigmentantes, tem-se o desenvolvimento de hipopigmentação, prurido, eritema, reações alérgicas e fotossensibilização (FUKUDA, et al., 1998; GARCIA e FULTON, 1996; KATSAMBAS e STRATIGOS, 2001).

3.1.3 Envelhecimento, degeneração e morte celular

Os processos patológicos de inflamação, catarata, câncer, e também os de envelhecimento e morte celular (BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992) são ocasionados por fatores diversos, isolados ou associados, como o estresse celular oxidativo e a ação da radiação luminosa. Esses processos causam alterações químicas nas substâncias responsáveis por processos metabólicos (como biossíntese de enzimas, respiração celular), as quais passam a desempenhar inadequadamente suas funções, ocasionando desequilíbrio celular e culminando com a morte da célula (LARSON, 1988).

O estresse celular oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes no citoplasma celular e nas membranas, e os mecanismos antioxidantes. Nas membranas celulares, esse desequilíbrio ocorre com os ácido graxos insaturados e o oxigênio, promovendo a lipoperoxidação. No citoplasma celular, o desequilíbrio promove liberação dos radicais livres, ou espécies com oxigênio ativo (BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992). Os radicais livres atuam sobre aminoácidos (cisteína, metionina, triptofano, histidina) e ácido graxos insaturados (LARSON, 1988).

A radiação luminosa, através de suas ondas ultravioleta tipo A e B, provoca alterações em moléculas de aminoácidos, proteínas essenciais, nucleotídeos (KOBAYASHI, et al., 1998; KOBAYASHI, et al., 1996; HADDAD, XU e MEDRANO, 1998).

Kobaiashi e colaboradores (1998) avaliaram o efeitos da radiação UVB em cobaias. Haddad, Xu e Medrano (1998) estudaram os processos de pigmentação da pele utilizando métodos *in vivo* e *in vitro*. Segundo esses autores, o envelhecimento dos melanócitos induz o surgimento de focos proliferativos, e esses dois fenômenos associados promovem uma

despigmentação cutânea irregular, com locais hiperpigmentados (lentigo senil) intercalados a locais hipopigmentados.

No processo de envelhecimento da pele, as células adjacentes da camada basal da epiderme se tornam separadas, devido ao processo de desidratação. Além disso, a microcirculação mais superficial da derme passa a um estado de desorganização, podendo até desaparecer por completo (MONTAGNA e CARLISKE, 1979), e a pele se apresenta menos espessa (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

3.1.4 Penetração cutânea de substâncias

3.1.4.1 Caraterísticas gerais

O estrato córneo da pele humana é considerado a principal barreira à penetração de substâncias para as outras camadas da epiderme (JACKSON, 1993; PECK e HIGUCHI, 1997). Em segundo lugar, tem-se a junção dermo-epidérmica como barreira à entrada de substâncias para as camadas profundas da derme e endoderme (JACKSON, 1993). Segundo Bronaugh e Colliers (1993), o estrato córneo humano é o fator limitante para a penetração de substâncias hidrofílicas, e a junção dermo-epidérmica (ou epiderme viável), para compostos lipofílicos.

Segundo Jass e Elias (1991), a idéia do estrato córneo como sendo uma barreira impermeável à penetração de substâncias não é mais aceita, mas sim de uma barreira estrutural bicompartimental, com porções protéicas associadas a partes lipídicas.

Segundo Yamamura (1998), fatores como a proliferação e queratinização das células epidérmicas definem a velocidade de renovação dos corneócitos e também do estrato córneo, e desse modo, as condições superficiais da pele. O mesmo autor cita a análise morfológica dos corneócitos, como a forma externa, a área total, forma do núcleo, e a avaliação bioquímica de enzimas como a protease e peroxidase epidérmicas, como métodos para avaliação das condições superficiais epidérmicas.

Algumas classes de substâncias que podem passar através da pele, representam perigo para a saúde, pois podem apresentar características tóxicas próprias, tais como pesticidas, poluentes e contaminantes ambientais e ocupacionais, ou podem estar associadas ao uso de produtos cosméticos, tais como conservantes antimicrobianos, fragrâncias e corantes (JACKSON, 1993).

A hidratação da pele, mais precisamente do estrato córneo, influi na sua capacidade de atuar como barreira para a entrada de substâncias. A água é mantida nessa camada associada a uma mistura contendo principalmente sais minerais e uréia, denominada fator de hidratação natural da pele, cuja função é manter uma concentração de aproximadamente 20% de água na pele.

3.1.4.2 Vias de penetração cutânea

A penetração cutânea refere-se à passagem de substâncias através da pele, podendo ultrapassar camadas da epiderme e derme, acessar a microcirculação sangüínea local e ocorrer distribuição sistêmica. Neste último caso denomina-se penetração transdérmica.

As principais vias de penetração de substâncias na pele estão esquematizadas na figura 3 (adaptada de BARRY, 1987) e ocorrem através do meio intercelular ou do meio intracelular, denominadas de rotas intercelulares e transcelulares, respectivamente. Uma terceira via ocorre através dos anexos cutâneos (folículos pilosos e orifícios de glândulas), denominada rota anexial.

Pela via intercelular, as substâncias devem solubilizar-se na matriz lipídica do estrato córneo, através dos canais hidrofóbicos interlamelares. Essa via está disponível para substâncias apolares ou pouco polares (PECK e HIGUCHI, 1997).

FIGURA 3 -Vias transcelular e intercelular de penetração cutânea

Pela via transcelular, as substâncias necessitam interagir com a queratina, alterando suas forças de ligação com a água e as conformações helicoidais, resultando na formação de canais porosos.

A via de penetração pelos anexos é importante para moléculas iônicas, principalmente através dos pêlos, que cobrem aproximadamente 1% da superfície da pele (WILLIAMS, YAMAMANE e BARRY, 1996). A penetração por essa via pode ser aumentada por processos físicos como aplicação de corrente elétrica (iontoforese e eletroporação) ou ultra-som (sonoforese) (PECHTOLD, et al., 1997). Esses processos promovem aumento do fluxo de água no estrato córneo, e conseqüente hidratação, sem alterar as bicamadadas lipídicas. Alguns tensoativos, como o lauril sulfato de sódio, também promovem penetração de substâncias iônicas pela via anexial (SANTOS e BAHIA, 1985).

3.2 ÓLEOS DE PLANTAS BRASILEIRAS

3.2.1 Características Gerais

Segundo Oliveira e colaboradores (1996), a emulsão epicutânea, emoliente natural da pele, apresenta lipídeos e gorduras comumente encontrados nos óleos vegetais. Além disso, esses lipídeos vegetais são formados a partir de ácidos graxos que são essenciais na formação daquela emulsão. Sendo assim, os óleos vegetais constituem uma excelente fonte de matérias-primas dos cosméticos para a pele.

Os óleos vegetais são utilizados diretamente nos produtos como princípios ativos com propriedades emolientes, ou indiretamente, como material de partida para a fabricação de outros componentes, como os tensoativos (OLIVEIRA, et al., 1996).

Os óleos essenciais das plantas são constituídos de uma fração sólida, denominada esteropteno, e uma fração líquida, oleopteno, que podem ser separadas pelo resfriamento (CASAMADA, 1977). Essas frações contêm hidrocarbonetos alifáticos, derivados de terpenos e de compostos hidrocarbonetos aromáticos.

Os hidrocarbonetos aromáticos podem apresentar grupamentos de álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, lactonas e funções contendo enxofre (CASAMADA, 1977).

Os terpenos, cuja fórmula estrutural está representada na figura 4, são derivados da condensação de duas moléculas de isopreno, e classificados quimicamente em hemiterpenos, diterpenos e sesquiterpenos (CASAMADA, 1977).

FIGURA 4 -Fórmula estrutural do terpeno

A obtenção dos óleos essenciais pode ser efetuada por processos como pressão mecânica (prensas hidráulicas), destilação em vapor d'água, adição de solventes orgânicos e processo de enfleurage (CAMPOS, 1990).

Independentemente de sua composição ou origem, a aplicação dos óleos vegetais na pele produz um efeito emoliente. Ocorre a formação de uma película sobre a camada córnea que impede ou dificulta a perda de água por evaporação, e assim, a pele fica mais macia. Essa película formada é descontínua e desse modo, não promove obstrução completa dos poros, o que poderia provocar o desenvolvimento da acne. Os óleos de origem mineral promovem as mesmas ações dos óleos vegetais, mas a camada de óleo que se deposita na pele é contínua, resultando na obstrução dos poros, além de outros fenômenos como o aumento da temperatura e estímulo da microcirculação local.

No Brasil, a vegetação da região amazônica é rica em plantas, cujos óleos e gorduras podem ser empregados na cosmetologia, tais como aqueles extraídos do licuri, oitica, murumuru, ucuuba, pequi, cupuaçu, baguaçu (OLIVEIRA, et al., 1996), andiroba, pariparoba e copaíba.

3.2.2 Óleo de copaíba

3.2.2.1 Origem e composição

A copaíba é uma planta encontrada no Brasil, nos estados do Pará, Amazonas (ALMEIDA, et al., 1995; ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996; COSTA, et al., 1995; LOFREDO, FERRARI e ROCHA FILHO, 1998; SERTIÉ, et al., 1995), Piauí, Bahia e Sul (FERRARI, 1998), e também em outros países, como a Colômbia, Venezuela, Guianas e nas ilhas de Trinidad (FERRARI, 1998). É utilizada na medicina popular há muito tempo, sendo citada na primeira edição da Farmacopéia Brasileira, em 1926 (SILVA, 1926).

Pertence a família das *Leguminosae* e *Cesalpinese* (SILVA, 1926; FERRARI, 1998), do gênero *Copaifera* L. (ALMEIDA, et al., 1995; COSTA, et al., 1995). As espécies encontradas no Brasil são: *Copaifera guianensis*

(Desfontaines) Kuntze (SILVA, 1926), *Copaifera reticulata* (Linné) (SERTIÉ, et al., 1995, FERRARI, 1998) e *Copaifera multijuga* (FERRARI, 1998) na Amazônia; *Copaifera confertiflora* Benth no Piauí (FERRARI, 1998), *Copaifera coriacea* (Martius) Kuntze na Bahia (SILVA, 1926; FERRARI, 1998); *Copaifera langsdorffii* (Desfontaines) Kuntze na região Sul e nos cerrados (SILVA, 1926; FERRARI, 1998). Na Colômbia, Venezuela, Guianas e Trinidad encontra-se a espécie *Copaifera officinalis* (Linné) Jacquin (SILVA, 1926; FERRARI, 1998). São conhecidas ainda as espécies *Copaifera miller*, *Copaifera oblongifolia* (Martius) Kuntze (SILVA, 1926) e *Copaifera rigida* (FERRARI, 1998).

Do caule da copaíba extrai-se uma resina, através de fissuras, com profundidade suficiente para se atingir a região medular, e desse modo, as glândulas do caule, na região do córtex e do lenho. Após extraído, o óleo-resina apresenta-se como um líquido razoavelmente espesso, de coloração amarelo-claro a amarelo-pardo (SILVA, 1926), alaranjado ou castanho (IONQUÍMICA, 2000), podendo apresentar fluorescência, com forte odor característico e sabor amargo e persistente (SILVA, 1926), e formador de uma película dura e resinosa (IONQUÍMICA, 2000). A figura 5 ilustra as plantas do gênero *Copaifera sp*, das quais se extrai o óleo de copaíba.

FIGURA 5 -Planta do gênero *Copaifera sp*

O óleo de copaíba é constituído de 40 a 50% de óleo essencial e 40 a 60% de resina, apresentando basicamente terpenos, ésteres da resina e outras substâncias provenientes da essência.

No grupo dos terpenos, a copaíba apresenta diterpenos e sesquiterpenos (ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996, COSTA, et al., 1995, SERTIÉ, et al., 1995, CASCON e GILBERT, 2000), e segundo Paiva e colaboradores (2004), nas proporções de 8 e 70%, respectivamente.

Os sesquiterpenos encontrados apresentam grupamentos quinona e lactona (ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996). Entre os sesquiterpenos são citados: β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, β -bisaboleno (COSTA, et al., 1995, FERRARI, 1998), α -copaeno, α -cis-bergamoteno, α e β -selineno, cadineno (CASCON e GILBERT, 2000), β -elemeno e α -curcumeno (PAIVA, et al, 2004)

Entre os diterpenos, são citados o ácido copálico (ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996) ou copaívico (IONQUÍMICA, 2000, FERRARI, 1998), ácido paracopaíbico, ácido metacopaíbico, ácido homoparacopaíbico, ácido ilusônico, ácido caurenóico e ácido polialtico (CASCON e GILBERT, 2000, PAIVA, et al., 2004).

A constituição fitoquímica do óleo de copaíba pode variar, de acordo com o local onde é cultivada a planta. Desse modo, o óleo das plantas colombianas é dextrógiro, mais viscoso, com fluorescência verde, presença de cristais e do ácido copaíbico, e aquele extraído de plantas brasileiras é levógiro (SILVA, 1926), fluído, não fluorescente, isento de cristais e apresenta ácido paracopaíbico.

A primeira edição da Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1926) apresenta 6 ensaios para a caracterização da droga. O óleo de copaíba possui densidade de $0,930 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$ (IONQUÍMICA, 2000; FERRARI, 1998) ou 0,940 a $0,995 \text{ g/cm}^3$ a 25°C (SILVA, 1926), índice de refração de $1,50 \pm 0,02$ a 40°C (FERRARI, 1998; IONQUÍMICA, 2000), índice de acidez de 28 a 95 e ponto de ebulição superior a 250°C (SILVA, 1926). Apresenta boa solubilidade no etanol absoluto, em solventes orgânicos como clorofórmio, éter de petróleo, e também em outros óleos (SILVA, 1926), é parcialmente solúvel no

etanol 90% e 95%, e insolúvel em água (SILVA, 1926; FERRARI, 1998; IONQUÍMICA, 2000). Apresenta ainda sensibilidade à ação da luz e do calor, desenvolvendo coloração escura, devendo ser armazenado em locais escuros, temperatura ambiente (IONQUÍMICA, 2000) e em recipientes opacos.

3.2.2.2 Uso

O óleo-resina balsâmico é o principal responsável pelas propriedades terapêuticas. Essa substância é comercializada pela população, na forma de óleo resinoso não processado, adulterado pela adição de mistura de óleos de várias espécies (FERRARI, 1998), e também com substâncias como trementina, colofônia, ácido graxos, parafina e bálsamo de gurjum. A matéria-prima industrializada é adicionada de 0,02% de antioxidantes (IONQUÍMICA, 2000).

A droga vegetal apresenta as propriedades antisséptica, bactericida, antiinflamatória, anticarcinogênica, diurética (ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996; AHTARDJIEFF, 1966; LOFREDO, FERRARI e ROCHA FILHO, 1998), antimitótica (ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996), cicatrizante (IONQUÍMICA, 2000), analgésica (SERTIÉ, et al., 1995) e antiblenorrágica (diminui a eliminação de muco). Na medicina popular, é administrada pelas via tópica ou oral, dependendo da moléstia para a qual é indicada. Os sesquiterpenos presentes no óleo são citados na literatura como indutores de efeitos fisiológicos como inibição da contração da musculatura lisa e com atividade antimitótica e anticarcinogênica (ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996).

Para uso interno, o óleo de copaíba é administrado na forma de electuários, cápsulas, bolos, opiato, sendo indicado para o tratamento de problemas do aparelho respiratório (bronquite) (FERRARI, 1998), do aparelho genito-urinário (na blenorragia da uretra) e também como diurético (ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996; SERTIÉ, et al., 1995) e até câncer

(FERRARI, 1998). São administradas doses que variam de 2 até 10 gramas da droga por dia, representando valores de pequena toxicidade.

Cascon e Gilbert (2000) citaram as atividades bactericidas, antihelmíntica, analgésica, antiinflamatória, gastroprotetora, antitumoral e tripanossomicida desse óleo. Segundo Krauchenco e colaboradores (2004) a atividade bactericida na planta impede o desenvolvimento de microrganismos através da inibição da atividade de enzimas, como as proteinases.

Topicamente, o óleo de copaíba é aplicado na forma de poção balsâmica (SILVA, 1926), sabonete medicinal (FERRARI, 1998) ou emplastro de borracha (SILVA, 1926), no tratamento das afecções cutâneas, inflamadas ou não, como acne, feridas, úlceras, psoríase e câncer de pele (FERRARI, 1998).

Segundo Costa e colaboradores (1995), a atividade antimitótica do óleo de copaíba ao nível celular se deve à inibição da polimerização de microtúbulos e também da incorporação de 3-H-Timidina, ao nível celular.

Sertié e colaboradores (1997) administraram, pela via oral, doses de 0,126, 0,214 e 0,364 mL de óleo de copaíba por kilo de peso, em ratos, durante 5 semanas, e avaliaram o limiar de percepção de dor dos animais, e observaram que a substância apresenta efeito analgésico. Esses mesmos autores avaliaram o efeito antiinflamatório do óleo de copaíba em comparação com a dexametasona, após administração oral em ratos e indução do processo inflamatório. Observaram efeito antiinflamatório, de intensidade maior que das substâncias inativas utilizadas como controle, e menor que o do corticóide.

Almeida, Sertié e Sudo-Hayashi (1996) administraram volumes de 0,105, 0,21 e 0,63 mL de óleo de copaíba, via oral, em ratos, e em seguida inocularam células tumorais na coxa dos animais, observando o tamanho das lesões durante 20 dias. Notaram inibição do crescimento tumoral no volume menor, e partir de 0,21 mL, a droga produziu efeito inverso, potencializando o crescimento dos tumores. Controles foram efetuados utilizando-se óleo de milho.

Costa e colaboradores (1995) avaliaram a atividade citotóxica do óleo de copaíba num teste *in vitro*, através da inoculação de doses de 0,04 a 1,25 ppm do óleo em ovos de ouriço do mar recentemente fecundados. Observaram inibição da clivagem dos ovos, de maneira dose-dependente, e concluíram que o fenômeno ocorreu devido a atividade citotóxica do óleo.

Almeida, Sertié e Sudo-Hayashi (1996) estudaram a influência do óleo-resina de copaíba na circulação linfática de animais, que representa o meio de disseminação de microrganismos e células cancerígenas para o organismo. Administraram o óleo via oral a ratos e observaram redução significativa do fluxo linfático e do número de linfócitos presentes na linfa do ducto torácico dos animais.

Costa Lotufo e colaboradores (2002) avaliaram as propriedades tóxicas de diversas concentrações de ácido caurenóico (presente no óleo de copaíba), e concluíram que essa substância é potencialmente citotóxica porém não-específica. Os autores avaliaram diversas concentrações quanto à citotoxicidade em ovos de *Lytechinus variegatus* (10 a 300 μ M), poder hemolítico em células humanas e de camundongos (3 a 800 μ M) e embriogenicidade (30 a 300 μ M). Contrariamente a essas observações, Paiva e colaboradores (2003) avaliaram o ácido caurenóico no tratamento de colite ulcerativa em ratos, observando redução de 52 e 42% nas lesões após administração de doses de 100 mg/kg, pelas vias retal e oral, respectivamente. Em outro trabalho (2004) e com o mesmo modelo experimental, os autores trataram os ratos com óleo de copaíba nas doses de 200 e 400 mg/kg, pelas vias retal e oral, e novamente observaram redução das lesões.

O óleo de copaíba, tem sido utilizado como matéria-prima de cosméticos. Os fabricantes (IONQUÍMICA, 2000) indicam o uso do óleo como fixador de essências nos perfumes. Lofredo, Ferrari e Rocha Filho (1998) desenvolveram emulsões múltiplas, contendo o óleo de copaíba associado ao de andiroba.

3.2.3 Óleo de andiroba

3.2.3.1 Origem e composição

A andiroba é uma árvore comum na Amazônia (Brasil), cujas flores apresentam odor e sabor característicos (FERRARI, 1998, DUNISH, SCHWARZ e NEVES, 2002). É utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas moléstias (FERRARI, 1998; IONQUÍMICA, 2000), sendo conhecida pelos nomes andirova, carapinha, iandiroba (FERRARI, 1998). Pertencente à família *Meliaceae*, é representada pela espécie *Carapa guianensis* (FERRARI, 1998; IONQUÍMICA, 2000, DUNISH, ERBREICH e EILERS, 2003). A indústria de processamento deste óleo cita o nome "Crabwood" para a planta (IONQUÍMICA, 2000). A figura 6 representa as castanhas de onde se extrai o óleo de andiroba.

FIGURA 6 -Castanha da qual se extrai o óleo de andiroba

O princípio ativo da droga encontra-se no óleo das sementes (IONQUÍMICA, 2000) e das castanhas marrons (FERRARI, 1998), ilustrada na figura 6. Esse óleo apresenta coloração amarelo-clara a amarelo-avermelhada, sabor amargo, apresentando-se semi-sólido em baixas

temperaturas ou fluido quando acima de 38°C (FERRARI, 1998; IONQUÍMICA, 2000).

A análise fitoquímica do óleo nas sementes indica a presença de ácidos voláteis a 0,8% e ácido graxos (IONQUÍMICA, 2000). Entre os ácidos graxos, são citados na literatura: o ácido oléico a 58,4%, ácido mirístico a 17,9%, ácido palmítico a 12,4% e o ácido linolêico a 4,9%. São citados ainda os ácidos palmitoléico até 2,5%, esteárico 3 a 12%, linolênico 4 a 15% e araquidônico até 3% (CHEMYUNION, 2001; CRODA, 2001).

Abreu e colaboradores (2004), determinaram a composição do óleo de andiroba por cromatografia gasosa, e observaram ácidos graxos com palmítico e esteárico a 27 e 7%, respectivamente. Esses autores observaram ainda ácidos graxos palmitoléico, oléico e linoléico nas proporções de 1, 49 e 16% de respectivamente.

O óleo de andiroba apresenta densidade entre 0,910 e 0,940 g/cm³ a 15,5°C, índice de acidez de 15 a 20, índice de refração de 1,45±0,05 a 40°C, ponto de fusão de 35 a 43°C, índice de saponificação de 190 a 200 e índice de iodo de 55 a 80 (FERRARI 1998; IONQUÍMICA, 2000). É solúvel em óleos vegetais e solventes orgânicos, e é insolúvel na água e no etanol (IONQUÍMICA, 2000).

O princípio ativo da droga processado pelas indústrias encontra-se adicionado de substâncias antioxidantes para conservação, como o butilhidroxitolueno (BHT) a 0,02%, e deve ser armazenado ao abrigo de luz e calor (IONQUÍMICA, 2000).

3.2.3.2 Uso

A droga é muito utilizada, tanto na medicina popular, topicamente ou internamente, quanto para diversas outras finalidades diversas. Entre as propriedades farmacológicas do óleo são citadas as atividades emoliente, antisséptica, cicatrizante, antiinflamatória (IONQUÍMICA, 2000) e antirreumática (FERRARI, 1998).

Para o uso externo, utiliza-se o óleo puro, diluído em outros óleos, o filme resinoso do óleo após secagem (curativo oclusivo, obtido em concentrações de 1 a 7%) ou na forma de sabonete medicinal (contendo cinzas de madeira) (FERRARI, 1998). É indicado para o tratamento de afecções cutâneas em geral (IONQUÍMICA, 2000), picadas de insetos e processos dolorosos das extremidades do corpo ou devidas a contusões, sendo bastante utilizado por lutadores de artes marciais (FERRARI, 1998). É utilizada ainda como repelente de insetos em geral (FERRARI, 1998; IONQUÍMICA, 2000) e, devido a essa característica, para a remoção de piolhos e lêndeas do couro cabeludo (FERRARI, 1998).

Segundo Ferrari (1998), o óleo de andiroba possui outras aplicações, tais como a de combustível para iluminação em residências, solvente para extração de corantes de plantas e é utilizado pelos índios da tribo *Mundurucu* como agente auxiliar para mumificação de corpos. O mesmo autor cita que, devido a característica do óleo repelir insetos, como o cupim, a madeira da árvore é procurada para fabricação de móveis.

O óleo de andiroba tem sido utilizado como matéria-prima para fabricação de cosméticos, como xampus, condicionadores e sabonetes (nas concentrações de 1 a 3%), óleos, loções e cremes para massagem (de 1 a 5%) e loções repelentes de insetos (de 3 a 7%) (IONQUÍMICA, 2000).

Lofredo e colaboradores (1998) desenvolveram emulsões múltiplas, com três compartimentos, contendo o óleo de andiroba associado a outro óleo, o de copaíba.

3.2.4 Óleo de pariparoba

3.2.4.1 Origem e composição

A pariparoba é uma planta da família *Piperaceae*, da espécie *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (SILVA, 1926; BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992; BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1996). É freqüentemente

confundida com outra espécie da mesma família, a *Piper regnellii* (Miq) C.DC. (BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992; MORAES, et al., 1985).

É conhecida vulgarmente com os nomes de pariparoba, caapeba (BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992; BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1996; KIJOA, et al., 1980), capeba (MORAES, 1986), cubeba, pariparoba do Norte, capeba do Norte, pariparoba do Sul (MORAES, et al., 1985), caapeva, caápeva, caápeba mansa, caápeba do mato, caena (SILVA, 1926, MORAES, 1986), atajé, aguaxima, malvavisco, aguaxima malvavisco, pariparoba do mato (MORAES, 1986). As palavras pariparoba e caápeba derivam do tupi, cujos termos “pari” (ou “pereb”), “pa” e “rob” significam ferida, acabar e amargo, e os termos “caa” e “peba” significam vegetal e plano (referência às folhas chatas e largas) (MORAES, 1986).

A pariparoba também é conhecida com os nomes oficiais: *Pothomorphe umbellata* *Heckeria umbellata* (L.) Kunth, *Piper umbellatum* (L.) e *Piper hilarianun* Stend (KIJOA, et al., 1980), *Pothomorphe sidaefolia* Miq., *Pothomorphe phesidaefolia* Miq. var. *subglabrata* Miq., *Pothomorphe donbeyana* Miq., *Pothomorphe allemi* Trei, *Piper peltatum* Ruiz & Pav., *Piper sidaefolium* Link., *Piper umbellatum* L. var. *mayus* C. DC., *Piper subpeltatum* Willd var. *sidaefolium*, *Heckeria sidaefolia* Kunth, *Peperomia umbellata* Kunth, *Peperomia sidaefolia* e *Lepionthes umbellatum* Rap. (MORAES, 1986).

Esta planta cresce espontaneamente na natureza, sendo encontrada em locais úmidos, onde há sombra e grande quantidade de humus (MORAES, 1986). No Brasil são identificadas duas espécies: a *Pothomorphe peltata*, denominada pariparoba do Norte ou capeba do Norte e a *Pothomorphe umbellata*, na região Sul, com os nomes pariparoba do sul ou simplesmente pariparoba, sendo que apenas esta última é dotada de propriedades medicinais (KIJOA, et al., 1980). Também é encontrada na região sudeste, na região da Serra do Mar (KIJOA et al., 1980; MORAES, et al., 1985) e nas regiões da Amazônia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pará e Minas Gerais (MORAES, 1986). A pariparoba também é encontrada em outros países como México, Peru, Chile e nas ilhas de Trinidad (MORAES, 1986; SCHNEID, et al., 1988).

Moraes e colaboradores (1985) desenvolveram os primeiros métodos de estudo farmacognóstico para identificação e análise da pariparoba. Segundo os autores, a *Pothomorphe peltata* apresenta folhas menores e peltatas e a *Piper regnellii* apresenta folhas menores, e inflorescência solitária e oposta.

A *Pothomorphe umbellata* ou pariparoba do sul, quando adulta, apresenta porte arbustivo, medindo 1,0 a 1,5 m de altura por 2,5 a 3,5 cm de diâmetro; apresenta caule anguloso, nodoso, estriado, de coloração verde-clara a verde-acinzentada ou pardo-acinzentada e odor fracamente aromático (SILVA, 1926); as raízes medem de 10 a 15 cm de comprimento por 5 a 10 mm de diâmetro, são adventíceas fasciculadas, tuberculóides, infladas e tortuosas, contendo células produtoras de óleo resina; os frutos são pequenos e triangulosos; as folhas são as maiores do gênero, e não são peltatas, e apresentam inflorescências dispostas em umbela. A análise fitoquímica de raízes e folhas frescas dessa espécie identificou as substâncias listadas nas tabelas 2 e 3.

TABELA 2 -Constituição fitoquímica da casca de pariparoba (*Pothomorphe umbellata*) em 100 g de amostra (MORAES, 1986)

Substância	%
Princípio amargo	0,0220
Resina Mole A	0,3250
Resina Mole B	0,4120
Ácido Resinoso	0,0650
Nitrato de Potássio e Cálcio	0,5230
Matéria Extrativa (sacarina e ácidos orgânicos)	0,5120
Matéria Albuminóide e Gomosa	2,5000
Água e sais orgânicos	95,641

TABELA 3 -Constituição fitoquímica das folhas de pariparoba (*Pothomorphe umbellata*) em 100 g de amostra (MORAES, 1986)

Substância	%
Ácido Polimórfico cristalizado	0,0058
Ácido Resinoso	0,7368
Pariparobina cristalizada	0,0187
Substância cerácea	0,0790
Ácido Tânico	0,1580
Clorofila	0,0842
Ácidos Orgânicos (ácido tartárico e outros)	0,0184
Matéria Albuminóide e Resinosa e Matéria Extrativa	1,1080
Sulfato de Potássio	0,4634
Cinzas	3,1000
Água	85,000

A pariparoba apresenta glândulas que secretam óleo, localizadas principalmente na região cortical das raízes, e em menor quantidade no parênquima cortical do caule (MORAES, et al., 1985). O óleo possui coloração amarelada (MORAES, et al., 1985), e está presente de 0,20 a 2,25% na planta (MORAES, 1986).

A análise fitoquímica do óleo de pariparoba revela substâncias das classes dos terpenos, fenóis, ésteres fenólicos, éteres e ácidos (BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992), às quais são atribuídas atividades antioxidantes. Apresenta as substâncias azarona, um fenilpropano denominado apiol ou dilapiol, piperósido, holósidos, sitosterol, 4-nerolidilcatecol, além de sais de potássio (agentes diuréticos) (MORAES, 1986).

Kijoa e colaboradores (1980) realizaram análises da constituição fitoquímica das raízes da pariparoba, colhida na região sudeste do Brasil. Dentre os constituintes químicos, identificaram no óleo presente na raiz o 4-nerolidinilcatecol. Esta substância foi citada por Moraes (1986) como sendo a

mais importante, responsável pela propriedade antioxidante da planta. Sua fórmula estrutural está indicada na figura 7.

FIGURA 7 -Fórmula estrutural do 4-nerolidinilcatecol

3.2.4.2 Uso

A droga é comercializada na forma de raízes secas trituradas (MORAES, et al., 1985; MORAES, 1986), e geralmente apresenta-se adulterada, contendo folhas e outras partes da planta, e também com raízes de espécies similares, como as do gênero *Piper sp* (MORAES, et al., 1985). As raízes dessa planta apresentam propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, colagoga e colerética, e embora as folhas, os frutos e o caule também apresentem algum efeito farmacológico, os princípios ativos se apresentam em concentrações diferentes (MORAES, 1986).

A planta ou sua droga são utilizadas como medicamentos pela população, através da administração pela via oral ou tópica, na forma de óleo puro, extratos do caule ou das folhas (SILVA, 1926; KIJOA, et al, 1980; MORAES, 1986; SCHNEID, et al., 1988; BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992).

A pariparoba é administrada por via oral, na forma de xarope simples, xarope composto (desobstruente e ferruginoso) (MORAES, 1986), extrato fluido, tintura (SILVA, 1926; KIJOA, et al, 1980). É indicada para: tratamento dos males do aparelho digestório; desordens no fígado (SILVA, 1926; KIJOA, et al, 1980; SCHNEID, et al., 1988; BARROS, TEIXEIRA e AZNAR, 1992); icterícia (MORAES, 1986); má digestão (MORAES, et al., 1985); mau

funcionamento da bile, estimulando e fluidificando a secreção biliar (MORAES, 1986); afecções do aparelho respiratório como bronquite asmática, coqueluche, tosse rebeldes (MORAES, 1986); tratamento do aparelho genito-urinário (desordens menstruais como leucorréia e também como diurético) (MORAES, 1986); epilepsia (KIJOA, et al., 1980).

Segundo Schneid e colaboradores (1988), a pariparoba do gênero *Piper sp* é utilizada na região Sul do Brasil, no tratamento das desordens menstruais (leucorréia, amenorréia e hipermenorréia), problemas hepáticos e até como antídoto para veneno de cobra. Como efeito tóxico desta droga suspeita-se que provoca aborto, observado pela população em animais de pasto. Estes autores administraram, por via oral, extratos aquosos do caule e das folhas de *Piper sp* em ratas grávidas, na dose de 300 mg/Kg de peso, e após 12 dias, analisaram os fetos (normais e abortados) e a placenta dos animais. Concluíram que a pariparoba não possui propriedade de causar abortos em roedores.

O óleo de pariparoba administrado topicamente é indicado para o tratamento de infecções da pele, úlceras (sifilíticas e comuns), e também como repelente de insetos (MORAES, 1986).

Barros, Teixeira e Aznar (1992, 1996) estudaram a capacidade da pariparoba em impedir os processos oxidativos celulares, que são associados ao envelhecimento, inflamação, câncer e morte celular. Através de um método *in vitro*, extratos alcoólicos das folhas, caule e da raiz da planta (1% em etanol 50%), foram adicionados a um homogenato de cérebro de rato, e um dos produtos de degradação das reações ocorridas, o malondialdeído, foi doseado, servindo como parâmetro para a atividade oxidativa. Através da análise dos resultados, concluíram que os extratos da raiz são os mais ativos, seguidos daqueles obtidos das folhas e por último, do caule. Esses mesmos autores, compararam a atividade antioxidante do óleo de pariparoba, em relação à espécie utilizada, concluindo que as duas espécies apresentam ação antioxidante, e a *Pothomorphe umbellata* apresenta maior atividade.

Barros, Teixeira e Aznar (1992) compararam o efeito do 4-nerolidilcatecol extraído do óleo de pariparoba (por cromatografia em camada

delgada), supostamente com atividade antioxidante, com o α -tocoferol, conhecido antioxidante natural. Esses princípios ativos foram expostos ao homogenato de cérebro, e avaliados em relação à quimioluminescência desenvolvida. Segundo os resultados, concluíram que o 4-nerolidilcatecol apresenta alto poder antioxidante.

3.2.5 Óleo de Babaçu

3.2.5.1 Origem e composição

O babaçu é uma palmeira, da espécie *Orbignya phalerata*, predominante nas regiões norte e nordeste do Brasil (SILVA, et al., 2000), e segundo Almeida, Del Menezi e Teixeira (2002), encontrada principalmente nos estados do Maranhão, Mato Grosso, Goiás, Pauí, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Tocantins.

O óleo de babaçu é extraído das amêndoas da planta, que chegam a pesar até 500 g (ALMEIDA, DEL MENEZI e TEIXEIRA, 2002). Essas amêndoas estão ilustradas na figura abaixo.

FIGURA 8 -Amêndoa de onde se extrai o óleo de babaçu

Na sua composição, o óleo de babaçu apresenta os ácidos graxos láurico, mirístico, oléico e palmítico (SILVA, et al., 2000), em proporções diversas. A presença de ácidos graxos saturados e insaturados (de cadeia apolar com mais de 15 átomos) determina o aspecto semi-sólido em que o óleo se apresenta. O óleo de babaçu comercializado apresenta na sua composição média os seguintes ácidos graxos: caprílico 2 a 10%, cáprico 2 a 12%, láurico 35 a 50%, mirístico 12 a 25%, palmítico 4 a 15%, esteárico 1 a 7%, oléico 5 a 20% e linoléico até 3% (CHEMYUNION, 2001; CRODA, 2001). Contudo, Abreu e colaboradores (2004), determinaram a composição do óleo de babaçu por cromatografia gasosa, e observaram ácidos graxos láurico, mirístico, palmítico e esteárico nas proporções de 48%, 16%, 10% e 2%, respectivamente. Esses autores observaram ainda 14 e 5% dos ácidos graxos oléico e linoléico, respectivamente.

Baruque Filho, Baruque e Santana Jr (2000) analisaram as castanhas de babaçu, após extração do óleo, identificando as seguintes substâncias: 14% de água, 50% de amido, 2,3% de proteínas, 10% de fibras, 2,8% de lipídios, 1,3% de carboidratos solúveis e 3,4% de pentosanas.

Silva e colaboradores (2000) determinaram o valor do EHL (equilíbrio hídrico-lipófilo) do óleo de babaçu a 20% p/p em formulações de gel de polímero carboxivinílico e com agentes emulsificantes derivados do sorbitano (Tween e Span). O valor ficou próximo a 12,32. Além disso, avaliaram as características de toxicidade aguda oral e aguda intradérmica, o poder de irritação primária, ocular, dérmica e fotossensibilização na pele de coelhos após a aplicação das emulsões e concluíram que essas três formulações não são tóxicas, irritantes nem sensibilizantes.

3.2.5.2 Uso

O óleo ou a noz de babaçu são utilizados popularmente para o tratamento de artrite, leucemia, reumatismo, dores menstruais, úlceras, e moléstias inflamatórias em geral (SILVA e PARENTE, 2001).

O óleo de babaçu é utilizado como emoliente em produtos tópicos. Silva e colaboradores (2000) compararam o efeito hidratante pela medida da capacitância epidérmica após a aplicação de emulsões O/A contendo 20% dos óleos de babaçu, de amêndoas e de sementes de uva, porém não observaram diferenças estatisticamente significativas.

Silva e Parente (2001) extraíram o polissacarídeo glucana de extratos das nozes de babaçu, e administraram em ratos (com permeabilidade vascular induzida por ácido acético injetado intraperitonalmente) na dose de 100 mg/kg, e verificaram inibição na permeabilidade vascular. Os autores concluíram que esse extrato apresenta propriedade antiinflamatória.

São citadas na literatura outras aplicações do óleo ou nozes de babaçu, tais como: fabricação de combustíveis orgânicos denominados biodiesel (ABREU, et al., 2004, FREITAS, et al.; 2001); composição de cimento (ALMEIDA, DEL MENEZI e TEIXEIRA, 2002); produção de álcool laurílico, etanol, amido, dextrose, farinha e ração para o gado (BARUQUE FILHO, BARUQUE e SANTANA JR, 2000).

3.3 DESPIGMENTANTES

3.3.1 Características gerais

A utilização dos despigmentantes em formulações cosméticas está associada às substâncias promotoras de absorção, já que os melanócitos responsáveis pela pigmentação se encontram nas camadas mais internas da epiderme e abaixo da barreira representada pelo estrato córneo (NISHIZAKA e YAMASAKI, 1998).

As substâncias despigmentantes não são isentas das propriedades indesejadas de causar alergia ou irritação cutânea, durante o uso ou mesmo até durante a manipulação ou síntese, como demonstrou o trabalho de Fukuda e colaboradores (FUKUDA, et al., 1998). Estes autores observaram casos de dermatite e leucodermia em operários que manipulavam a substância despigmentante 4-(p-hidroxifenil)-2-butanona.

O uso das substâncias despigmentantes vai além da incorporação em cosméticos para o clareamento das manchas da pele. Na literatura são encontradas outras indicações, tais como para produtos alimentícios, na função de aditivos, e na terapêutica antineoplásica, como princípio ativo para medicamentos quimioterápicos para o tratamento do câncer de pele do tipo melanoma (MINAMITSUJI, et al., 1998).

3.3.2 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona (ácido kójico)

3.3.2.1 Origem e propriedades físico-químicas

O 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona ou ácido kójico é também denominado quimicamente como: 5-hidroxi-2-hidroximetil- β -pirona, 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona, ou hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona (LOKAJ, et al., 1991; THE MERCK Index, 2001). O nome kójico provavelmente refere-se ao seu processo de obtenção, que segundo Futamura e colaboradores (2001), Nohynek e colaboradores (2004) e Zborowski, Grybos e Proniewicz (2003) ocorre a partir da fermentação do “koji”, na preparação de alimentos e bebidas tradicionais japoneses. Nohynek e colaboradores (2004) afirmaram que o alimento “miso” e a bebida “sakê” apresentam 1,0 e 0,2 ppm de ácido kójico, respectivamente.

É uma substância de origem microbiana, sendo um metabólito dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, e que apresenta atividade despigmentante (DOWD, 1988; WEI, et al, 1991; BURDOCK, SONI e CARABIN, 2001). Ahn e colaboradores (2003) e Futamura e colaboradores (2001) citam essa substância como sendo produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae*, e segundo Alverson (2003), é uma micotoxina do fungo *Aspergillus niger*. Já Blumenthal (2004) afirmou que esse despigmentante não é propriamente uma toxina, mas sim um produto tóxico secundário do metabolismo desses microrganismos. Mohamad e colaboradores (2002) desenvolveram um processo fermentativo para produção desse despigmentante utilizando o fungo *Aspergillus flavus*.

O ácido kójico apresenta peso molecular de 142,11, faixa de ponto de fusão de 153-154°C, pKa entre 7,9 e 8,3, é solúvel em água, etanol, acetona e parcialmente solúvel em éter, etilacetato, clorofórmio e piridina (THE MERCK Index, 2001), pertence ao grupo dos ácidos fenólicos (SON, MOON e LEE, 2001), e apresenta duas hidroxilas, e desse modo, dois prótons dissociáveis (ZBOROWSKI, GRYBOS, e PRONIEWICZ, 2003). A sua fórmula estrutural está representada na figura 9.

FIGURA 9 -Fórmula estrutural do ácido kójico

Yamamoto (1988) desenvolveu um método de purificação do ácido kójico através da sublimação. Além disso, realizou uma análise de estabilidade de cosméticos emulsionados contendo o ácido kójico purificado pelo novo método e pelos métodos convencionais e verificou que o produto contendo o ativo obtido pelo novo método apresentou maior estabilidade. Por outro lado, Kim e colaboradores (2004), seguindo os trabalhos Kayahara e colaboradores (1990), sintetizaram novos despigmentantes, a partir de ácido kójico e tripeptídios, e obtiveram três derivados com atividade e estabilidade superior e toxicidade inferior ao próprio ácido kójico.

3.3.2.2 Propriedades biológicas

Ahn e colaboradores (2003) estudaram o mecanismo de ação do ácido kójico, e observaram que esse despigmentante promove diminuição na secreção de fatores melanotrópicos, os quais são normalmente liberados após irradiação ultravioleta da pele. Contudo, Cabanes, Chazarra e Garcia-

Carmona (1994), afirmaram que o mecanismo de ação do ácido kójico é a inibição da enzima tirosinase, através de uma rápida formação de um complexo inibidor da enzima, e que em seguida, passa a apresentar uma velocidade mais lenta, característica de reações de primeira ordem. Outros autores afirmam que a atividade despigmentante dessa substância se deve a quelação do íon Cu^{+2} necessário a atividade da tirosinase (CHIKAMATSU, et al., 1996; SILVA, 1998).

Segundo Okazaki (1990), a atividade despigmentante do ácido kójico está relacionada com a sua estrutura molecular. O autor utilizou ácido kójico e seus derivados (associados a ácidos graxos com 4 a 26 átomos de carbono e 1 a 6 insaturações na cadeia) como ativos despigmentantes para cosméticos cutâneos. Kobayashi e colaboradores (1995) introduziram aminoácidos na estrutura do ácido kójico e verificaram que a atividade inibitória da tirosinase se mantinha adequada, e em alguns casos, 80 vezes superior.

Ohyama e Mishima (1990) estudaram o ácido kójico obtido da fermentação de fungos do gênero *Aspergillus* sobre a melanogênese, e afirmaram que o mecanismo de ação é a quelação de íons metálicos da tirosinase e do monômero precursor da melanina denominado ácido 5,6-dihidroindol-2-carboxílico (DHICA).

O ácido kójico é citado por alguns autores como um princípio ativo para o tratamento de algumas moléstias da pele e para prevenção do envelhecimento. Honda (1998a) verificou que cosméticos contendo o ácido kójico, aplicados em pacientes portadores de dermatite de contato, promoveram a redução do prurido, eritema e esfoliação cutânea associados, e Thornfeldt (1988), citou o uso do ácido kójico e seus derivados em produtos para o tratamento de moléstias caracterizadas pela hiperatividade de organelas celulares, tais como, dermatoses, queratinizações, alopecia masculina e tumores cutâneos. Esse mesmo autor afirma ainda que os derivados hidroxílicos, carboxílicos, alquilícos e alquenlícos do ácido kójico apresentam-se como promotores de absorção. Dentre esses derivados, Kotulova e colaboradores (1995) citaram o ácido 6-Bromo-2-clorometil-kójico,

que avaliaram na concentração de 20 mg/kg em cobaias pelas vias oral ou tópica, apresentando atividade antiinflamatória.

Honda (1998b, 2000) afirmou que as rugas da pele são causas por alterações na camada córnea, com conseqüente diminuição da retenção hídrica, e que o ácido kójico é um ativo para a prevenção dessas alterações. Essa atividade foi confirmada por Mitani e colaboradores (2001), que através de um método *in vivo*, submeteram ratos sem pelo a irradiação ultravioleta, na região dorsal, seguida de aplicação tópica de solução de ácido kójico 5% ou uma solução controle, durante vinte semanas. Os autores observaram maior tempo para o aparecimento das lesões nos animais que receberam o ácido kójico, e afirmaram que o mecanismo dessa ação ocorre através da quelação do ferro tecidual, que é um agente catalisador dessas alterações.

Na literatura são encontrados vários trabalhos que avaliam as propriedades do ácido kójico como produto de origem microbiana, ou seja, na forma de micotoxina, e associado a outras toxinas (PARRISH, et al., 1966; BASAPPA, SREENIVASAMURTHY e PARPIA, 1970; OWENS, WELTY e LUCAS, 1970; EL KHADEM, TEWFIK e HAMDI, 1975; DURACKOVA, BETINA e NEMEC, 1976).

Dowd (1988) afirmou que o ácido kójico apresenta atividade tóxica sinérgica às aflatoxinas e piretrinas, e atividade antagônica ao “malathion”. Kayahara e colaboradores (1990) sintetizaram e avaliaram o poder microbiológico de dois derivados peptídicos do ácido kójico, contra os fungos filamentosos *Phythium graminicola* e *Rhizoctonia solani*, obtendo resultados positivos. Segundo Honda (1998c), o ácido kójico apresenta atividade antimicrobiana também contra os fungos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, e *Epidermophyton floccosum*.

3.3.2.3 Doseamento

Na literatura são descritos alguns métodos químicos e imunoenzimáticos para o doseamento do ácido kójico.

Shih e Zen (1999) desenvolveram um método voltamétrico com eletrodo de carbono preanodizado para a determinação do ácido kójico em cosméticos clareadores de pele. Os autores afirmaram que o processo é de fácil manuseio e de baixo custo, e detectaram limites de até 0,17 mM.

Vachalková e colaboradores (1996) analisaram o ácido kójico através da polarografia.

Majmudar e colaboradores (1998) aplicaram a cromatografia líquida de alta eficiência para avaliação a atividade despigmentante do ácido kójico, tanto em solução aquosa quanto em não-aquosa, com detecção da absorção de radiação ultravioleta.

Burdock, Soni e Carabin (2001) citam em seu trabalho de revisão os métodos de doseamento do ácido kójico: cromatografia de camada delgada (detecção da absorção de radiação ultravioleta), cromatografia gasosa (coluna de sílica gel), cromatografia líquida de alta eficiência (fase reversa com coluna de octadecil-sílica e detecção da absorção de radiação ultravioleta) e teste imuno-enzimático “Elisa” (em fluidos biológicos). Nakajima e colaboradores (1998) avaliaram a arbutina e o ácido kójico *in vitro*, através dos métodos imuno-enzimáticos (“cell-blotting” e “cell-pelleting”)

3.3.2.4 Aplicações

Vários autores estudaram o ácido kójico como ativo despigmentante cosmético (FURUYA, 1989a ; OKAZAKI, 1990; VACHALKOVA, 1996; DOWD, 1988; HONDA, 1998b; THORNFELDT, 1988; CABANES, CHAZARRA e GARCIA-CARMONA, 1994; HOSHINO, 1999; SHIH e ZEN, 1999) e diversos são os trabalhos encontrados na literatura que descrevem a utilização e as formulações contendo o ácido kójico ou seus derivados, veiculados isolados ou associados, para o tratamento de discromias cutâneas (MEYBECK, 1988; MOTONO, 1988; THORNFELDT, 1988; TAKEUCHI, DEURA e ISHIDA, 1989b; OYAMA, 1989; HATAE, 1989c; OYAMA, 1989; OYAMA, 1987; INOUE, et al., 1990; FURUYA, 1989b; MASUDA, SUZUKI e SHIBUYA, 1997; DAMPEIROU, 1997; TOKUE e ITO, 1997; YOKOGAWA, et al., 1997;

SAKODA e TOYAMA, 1998; IMOKAWA, 1998; HONDA, 2000; AKADA, et al., 1979; HAYASHI e TAKE, 1999; MAEDA e NAGANUMA, 2000). Muitas dessas formulações estão patenteadas, principalmente no Japão ("Japanese Kokai Tokkyo Koho").

Segundo Maeda (1997), o ácido kójico está entre as cinco substâncias despigmentantes de uso permitido para cosméticos no Japão e segundo Nakagawa e colaboradores (1995), é utilizado em cosméticos despigmentantes nesse país desde 1988.

Higa (1989) analisou um creme cosmético aplicado em voluntários masculinos e femininos, contendo monoestearato de ácido kójico 1%, extrato de *cinnamon bark* 1%, monoestearato de polietilenoglicol 2%, monoestearato de glicerina 5%, álcool berrenílico 1%, parafina líquida 1%, trioctanoato de glicerina 10%, 1,3-butilenoglicol 5%, conservante, essência e água qsp 100%.

Mishima e Motono (1990) testaram um creme cosmético contendo ácido kójico 2% em pacientes que apresentavam cloasma senil ou induzido por radiação luminosa e manchas pós-inflamação, aplicado duas vezes ao dia, e obtiveram 79% de sucesso. O creme em questão continha 1,3-butilenoglicol 3%, sorbitol 7%, solução 50% de DL-PCA (pirrolidina-carboxilato) de sódio 3%, polímero carboxivinílico 0,05%, polissorbato 60 2,5%, monoestearato ácido de glicerila 1,5%, cetanol 3,0%, vaselina 5%, miristato de octidodecila 5%, octildodecanol 6%, esqualeno 11%, DL-alfa-tocoferol 0,15% e água qsp 100%.

Oyama (1989) desenvolveu formulações cosméticas despigmentantes contendo ácido kójico 0,5%, monoestearato de polietilenoglicol 2%, monoestearato de glicerina 10%, ácido esteárico 5%, álcool berrenílico 1%, parafina líquida 10%, trioctanoato de glicerina 10%, ésteres do p-hidroxibenzoato 0,2%, 1,3-butilenoglicol 5%, EDTA dissódico 0,01%, ácido láctico 1% e água 60,29%.

Hara (1990a) desenvolveu formulações despigmentantes contendo ácido kójico a 0,5% associado a filtros solares absorvedores de raios ultravioleta, como a tetrahidroxibenzofenona a 0,5%, para proteger o produto da ação da luz. Na composição constavam ainda o óleo de mamona

hidrogenado e polioxietilênico 1%, etanol 15%, p-hidroxibenzoato 0,10%, ácido cítrico 0,1%, citrato de sódio 0,3%, 1,3-butilenoglicol 4%, EDTA dissódico 0,01% e água qsp 100%.

Izumida e colaboradores (1990) e Inoua e colaboradores (1990) exemplificaram formulações de ácido kójico em produtos para o banho como sabonetes líquidos e sólidos.

Cotellessa e colaboradores (1999) avaliaram o efeito despigmentante da associação de ácido kójico 10% com ácido glicólico 50% antecedido por tratamento com ácido tricloroacético 15 a 25%, em pacientes com melasma difuso. Os pacientes foram avaliados clinicamente antes e após os tratamentos, e o desempenho das formulações classificado quanto a regressão da mancha em total, parcial e nenhuma. O produto contendo ácido glicólico promoveu 30%, 60% e 10%, e aquele contendo ácido tricloroacético, 40%, 50% e 10% de regressões total, parcial e nenhuma, respectivamente.

Lim (1999) analisou um cosmético na forma de gel contendo ácido kójico 1% associado a hidroquinona 2% e ao ácido glicólico 10% e o mesmo produto sem o ácido kójico, aplicados simultaneamente nas faces opostas dos rostos de quarenta mulheres que apresentavam melasma, durante doze semanas. A cada quatro semanas as pacientes eram submetidas a análise clínica, fotográfica, e de subjetividade em relação ao uso (através de um questionário). No final do experimento, foi observado diminuição das manchas em todas as pacientes e nas duas faces do rosto. Dentre as faces das quarenta pacientes que utilizaram o produto contendo ácido kójico, duas tiveram remissão completa das manchas e vinte e duas apresentaram grande diminuição (60%); dentre aquelas que utilizaram o cosmético com apenas hidroquinona e ácido glicólico, apenas dezenove faces apresentaram diminuição das manchas (47,5%). Em todas as pacientes analisadas detectaram-se efeitos secundários como esfoliação e vermelhidão da pele, em ambas as faces tratadas.

Garcia e Fulton (1996) realizaram um estudo parecido com o de Lim (1999), utilizando ácido glicólico 5% associado a hidroquinona 2% e ácido glicólico 3% associado ao ácido kójico 2%, com trinta e nove pacientes, e

aplicação alternada dos produtos nas faces do rosto. Como resultados, 51% das pacientes apresentaram as mesmas evoluções nas duas faces do rosto; 28% e 21% das pacientes apresentaram menores manchas na face tratada com ácido kójico e hidroquinona associados ao ácido glicólico, respectivamente. As faces que receberam as preparações contendo ácido kójico apresentaram maior irritação na pele.

Hatae (1989a) desenvolveu uma formulação contendo dipalmitato de ácido kójico 2% associado a alantoína 0,1%, para o tratamento de eritemas causados por exposição à luz solar e para acelerar o processo de cicatrização de feridas. Na formulação utilizada incluiu-se monoestearato de polioxietilenoglicol 2%, monoestearato de glicerila 5%, ácido esteárico 5%, álcool berrenílico 1%, parafina líquida 1%, 1,3-butilenoglicol 5%, trioctanoato de glicerina, conservante, essência e água qsp 100%.

O ácido kójico é citado na literatura para composição de cosméticos bucais, como no trabalho de Sano e Watanabe (1999), que desenvolveram dentifrícios contendo essa substância e Suzuki e Ono (1998), que desenvolveram uma formulação tópica para o clareamento dos dentes contendo ácido kójico, com a função de eliminar as manchas causadas por alimentos, cigarros ou microrganismos.

Dentre as outras propriedades do ácido kójico, além da despigmentante, são citadas na literatura as atividades antiinflamatória (KOTULOVA, et al., 1995), desodorante (FURUYA, 1989a), antitranspirante (HONDA, 2000), antisséptica (FURUYA, 1989a), antipruriginosa (HONDA, 1998a), antimicrobiana (KAYAHARA, et al., 1990; HONDA, 1998c; ZBOROWSKI, GRYBOS e PRONIEWICZ, 2003), inseticida (ALVERSON, 2003), e matéria-prima para obtenção de outras substâncias, como o fungicida actofunicon (KAMINO, KURAMOCHI e KOBAYASHI, 2003), analgésicos e antiinflamatórios (OZTURK, et al., 2002)

Honda (1998b, 2000) indicou a propriedade desodorante do ácido kójico, e Furuya (1989a), citou as propriedades antisséptica e antiinflamatória, além da atividade despigmentante. Esse autor exemplifica um creme despigmentante e antiacne composto de lauroil glutamato de sódio 22%, N-

acetil glutamato de sódio 3%, propilenoglicol 16%, glicerina 8%, diestearato de polietilenoglicol 1,5%, monoestearato de polietilenoglicol 4,5%, EDTA 0,1 % e água 43,9 g.

Alverson (2003) citou a atividade inseticida do ácido kójico sobre mosca de vaca, mosca doméstica e *Aedes atropalpus*. Esse autor determinou poder inseticida sobre o inseto *Lygus hesperus*.

O ácido kójico também é utilizado na indústria alimentícia, como aditivo, com a função de impedir ou retardar o escurecimento dos alimentos, tais como camarão, batata, maçã, cogumelo, lagosta, entre outros (FUKAZAWA, et al., 1990; EKOSHI, 1991; HOSOYAMA, et al., 1996; SAITO e KATAOKA, 1996; CHIBA, et al., 1997; SUN e TAO, 1997; SAITO, SHINRO e HIDA, 1997, BURDOCK, SONI e CARABIN, 2001; BLUMENTHAL, 2004; IYIDOGAN e BAYINDIRLI, 2004, SON, MOON e LEE, 2001). Fukazawa e colaboradores (1990) utilizaram uma solução aquosa de 0,6 g/L de ácido kójico como aditivo para evitar o escurecimento de alimentos à base de camarão. Segundo os autores, o ácido kójico é um inibidor competitivo das reações de oxidação doadoras de coloração nesses alimentos, e segundo Chen, Wei e Marshall (1991), o ácido kójico promove diminuição da disponibilidade de oxigênio e também redução de o-quinonas para difenóis nesses processos. Iyidogan e Bayindirli (2004) avaliaram a mistura de L-cisteína, 4-hexil-resorcinol e ácido kójico na prevenção do escurecimento de suco de maçãs, obtendo melhores resultados nas concentrações de 3,96, 2,34 e 2,78 mM, respectivamente. Son, Moon e Lee (2001) verificaram que o ácido kójico na concentração de 0,05% foi eficaz para a prevenção do escurecimento de maçãs.

3.3.2.5 Estabilidade

O ácido kójico apresenta a propriedade de quelar íons, como o Fe^{+3} , estudado por Makanova e colaboradores (1997). Nitzsche e colaboradores (1988) avaliaram a interação do ácido kójico com íons alumínio em pH de 1,6 a 3,4 e observaram a formação de complexos. A atividade do ácido kójico

pode ser inibida ou neutralizada pela adição de sulfito de hidrogênio ou o peróxido de hidrogênio (MOTONO, 1991).

Segundo Yamamoto (1988), o método de preparo e purificação do ácido kójico influi na sua estabilidade. Su, Li e Liu (1999) indicaram a necessidade de aditivos nos produtos contendo ácido kójico, e citaram o bissulfito de sódio como estabilizante dessas formulações, para evitar a sua oxidação.

Segundo Ha (1998) e Yu (1998), o ácido kójico apresenta baixa estabilidade frente às variações de temperatura, pH e radiação luminosa. Para contornar esses inconvenientes, o primeiro autor sugere o uso de um derivado do ácido kójico, o monoestearato kójico, considerado um pró-fármaco, o qual libera o princípio ativo quando submetido a ação de enzimas esterases da epiderme. Já o segundo autor sugere o uso de veículos, como emulsões múltiplas O/A/O e géis de polímero carboxivinílico, para que ocorra a liberação controlada do princípio ativo.

Majmudar (1998) avaliou a estabilidade do ácido kójico em várias formulações, observando que aquelas com menor conteúdo de água ou anidras determinaram menores valores de perda do princípio ativo.

3.3.2.6 Toxicidade

Shibuya e colaboradores (1982) realizaram experimentos para avaliar a mutagenicidade do ácido kójico em células procariontes e eucariontes, através do "Ames Test" e do cultivo de células de hamster, respectivamente. Observaram que essa substância promoveu mutagenicidade nas bactérias, e isso não ocorreu para as células dos animais utilizados.

Giroir e colaboradores (1991) analisaram as características toxicológicas do ácido kójico administrado pela via oral, na alimentação de cobaias, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 8 g/Kg de peso do animal. Procederam a análise do peso, composição do sangue, características dos órgãos internos das cobaias e observaram alterações nas concentrações acima de 2 g por Kg de peso dos animais. Ocorreu aumento do tamanho do

pâncreas, fígado, do número de eritrócitos do sangue, da concentração de ácido úrico sérico (indicação de nefrotoxicidade), hiperglicemia (indicação de lesões pancreáticas) e aumento da atividade das enzimas glutamato-oxalacético transaminase e creatinina quinase. Segundo os autores, a detecção desses efeitos nos experimentos não significa que a ingestão de alimentos contendo o ácido kójico representa risco para a saúde, pois a concentração necessária para desencadeá-los é muito elevada. Blumenthal (2004) citou o experimento onde a administração oral de 146 mg/kg na alimentação de galinhas durante 21 dias não determinou efeitos adversos.

Ahn e colaboradores (2003) citaram o ácido kójico como potente supressor da síntese de citocinas dos queratinócitos, e através da avaliação da citotoxicidade de vários despigmentantes em queratinócitos humanos, os autores verificaram que esse despigmentante apresentou menor valor de índice de citotoxicidade 50%, equivalente a 60 μ M. Blumenthal (2004) determinou a Dose Letal 50% (DL₅₀) de 250 mg/kg após administração intraperitonal em camundongos.

Nakagawa e colaboradores (1995) identificaram cinco casos de reações alérgicas num total de oito pacientes, que utilizaram cosméticos contendo ácido kójico durante doze meses. Os autores, concordando com Ha e colaboradores (1998) e Yu (1998), afirmaram que esse despigmentante apresenta alto poder alergênico. Burdock, Soni e Carabin (2001) afirmaram que essa substância pode afetar reversivelmente o funcionamento da tireóide através da inibição da captação de iodo.

Wei e colaboradores (1991) realizaram experimentos com ácido kójico em células ovarianas de hamster e em cepas de *Salmonella*, e observaram alterações cromossômicas e mutações, respectivamente. Os autores concluíram afirmando que o ácido kójico apresenta propriedades mutagênicas.

Nohynek e colaboradores (2004) realizaram um abrangente estudo sobre o ácido kójico, avaliando essa substância quanto às propriedades de mutagenicidade (bactérias e mamíferos), genotoxicidade (*in vivo* e *in vitro*) e determinaram as doses tóxicas após absorção tópica e oral em ratos. Os

autores observaram mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*, ausência de genotoxicidade e determinaram as doses oral e tópica subcrônica equivalentes a 250 mg/kg/dia e de 0,03 a 0,06 mg/Kg/dia, respectivamente. Os autores concluíram que o uso do ácido kójico tópico, como despigmentante, ou através da ingestão, em alimentos e bebidas, não apresenta risco de toxicidade.

3.3.3 2-Fosfato de ascorbil e magnésio

3.3.3.1 Origem e propriedades físico-químicas

O 2-fosfato de ascorbil e magnésio é um derivado hidrossolúvel e mais estável do ácido L-ascórbico (KAMEYAMA, et al., 1996), e que contém fosfato e magnésio, denominado também ascorbil-2-monofosfato de magnésio (GEESIN, GORDON e BERG, 1993; EL NAGGAR e LOVELL, 1991), e com nome comercial VC-PMG (KAMEYAMA, et al., 1996). Sua fórmula estrutural está ilustrada na figura 10.

Miyasaki e colaboradores (1991) citaram um método enzimático para síntese do 2-fosfato de ascorbil e magnésio, utilizando enzimas hepáticas e renais de animais, ácido L-ascórbico, e pirofosfato como fosforilador, em meio com pH 5,0 e à temperatura de 30°C.

FIGURA 10 -Fórmula estrutural do 2-fosfato de ascorbil e magnésio

Austria, Semenzato e Bettero (1997) analisaram a estabilidade do 2-fosfato de ascorbil e magnésio, palmitato de ascorbila e ácido ascórbico, em solução e em formulações tópicas, através de cromatografia líquida de alta eficiência, e observaram maior estabilidade para o 2-fosfato de ascorbil e magnésio. Os autores concluíram que a inclusão do ácido palmítico na molécula não promoveu maior estabilidade, mas sim o fez a inclusão do ácido fosfórico.

Geesin e colaboradores (1993) realizaram experimentos para avaliar a estabilidade das soluções de ácido L-ascórbico, 2-fosfato de ascorbil e magnésio e 2-fosfato de ascorbil e sódio. Como resultados, observaram instabilidade apenas para o ácido L-ascórbico na solução aquosa neutra utilizada.

Sakuma e colaboradores (1996) analisaram as atividades despigmentantes do extrato de placenta bovina e humana, associado ao 2-fosfato de ascorbil e magnésio, e observaram que este segundo princípio ativo sofre hidrólise, liberando ácido L-ascórbico.

3.3.3.2 Propriedades biológicas

Geesin, Gordon e Berg (1993) avaliaram as substâncias ácido L-ascórbico, 2-fosfato de ascorbil e magnésio e 2-fosfato de ascorbil e sódio quanto ao estímulo na síntese de fibroblastos por um método *in vitro*. Verificaram que o 2-fosfato de ascorbil e magnésio apresenta o mesmo poder que o ácido L-ascórbico, e o 2-fosfato de ascorbil e sódio, poder 10 vezes menor, em relação ao estímulo da síntese dos fibroblastos.

Kobayashi e colaboradores (1996, 1998) avaliaram o despigmentante 2-fosfato de ascorbil e magnésio quanto aos seus possíveis efeitos protetores da pele, em relação à prevenção da lipoperoxidação causada por radiação ultravioleta e conseqüentemente, à inibição do desenvolvimento e evolução dos quadros de inflamação, hiperplasia e tumor. Os autores administraram o despigmentante pela via intraperitoneal, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, em ratos sem pêlo que foram previamente expostos à irradiação UVB (290 e

320 nm) da ordem de 2 e 15 KJ/m², respectivamente. Observaram inibição do desenvolvimento da inflamação no caso da exposição aguda (equivalente a 15 KJ/m²) e também baixa incidência dos fenômenos de hiperplasia e tumor decorrentes da exposição crônica (2 KJ/m²), e também que o princípio ativo se acumula no fígado e pele por até 24 horas. Segundo os autores, o mecanismo de ação se processa após a transformação do 2-fosfato de ascorbil e magnésio para ácido ascórbico, o qual elimina os radicais hidroxila e lipídicos gerados nos processos.

El Naggar e Lovell (1991) avaliaram a administração de ácido L-ascórbico, 2-fosfato de ascorbil e magnésio e ascorbil-2-sulfato de potássio na dieta de cobaias e os efeitos no peso e características histopatológicas dos animais. Os autores observaram baixo ganho de peso e alterações histopatológicas apenas nos animais tratados com ascorbil-2-sulfato de potássio.

3.3.3.3 Doseamento

Kikuche e colaboradores (1990) desenvolveram um método de cromatografia líquida de alta eficiência determinação de 2-fosfato de ascorbil e magnésio associado a outros derivados de vitamina C (difosfato de L-ascorbil-2-sulfato e o L-ascorbil-6-propionato) em loções. Os autores utilizaram fase reversa de sílica-gel ODS, e eluente composto de 2,5 mM de KH₂PO₄ associado a mistura de 5 mM de sulfato de tetra-butil amônio hidrogênio e acetonitrila (92:8). O pH foi mantido em 2,5 e as amostras foram quantificadas espectrofotometricamente quanto a absorção de radiação ultravioleta em 254 nm. Como resultados, obtiveram desvios padrão inferiores a 4,2% e para o 2-fosfato de ascorbil e magnésio, uma recuperação de 99,1%.

Sottofattori e colaboradores (1998) analisaram o 2-fosfato de ascorbil magnésio associado a imidazolidinilurea, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, fenoxietanol e palmitato de ascorbila, em cremes por cromatografia líquida de alta eficiência. Usaram uma coluna de cianopropil e detecção da absorção de radiação ultravioleta a 220 e 240 nm.

Obtiveram curvas de calibração lineares nas concentrações de 0,05 a 5,00 mg/mL. O método foi considerado preciso e exato após análise de regressão linear dos dados, com valores de 1,57 a 2,21% para os desvios-padrão relativos.

Austria, Semenzato e Bettero (1997) analisaram o 2-fosfato de ascorbil e magnésio, palmitato de ascorbila e ácido ascórbico, em solução e em formulações tópicas, através de cromatografia líquida de alta eficiência. Chang e Chang (2003) aplicaram esse mesmo método, utilizando-se de uma coluna C18 e fase móvel de par-íonico, detecção da absorção de radiação ultravioleta a 220 e 240 nm, e obtiveram linearidade na curva de calibração com a faixa de concentração de 10 a 300 µg/mL.

3.3.3.4 Aplicações

Kameyama e colaboradores (1996, 1999) desenvolveram formulações cosméticas despigmentantes contendo 2-fosfato de ascorbil e magnésio na concentração de 7 e 10%, e avaliaram os efeitos inibidores de tirosinase em melanócitos. Segundo os autores, o creme a 10%, após administração na pele, foi absorvido e ficou retido por até 48 horas, e foi efetivo em dezenove de trinta e quatro pacientes com cloasma senil, e em três de vinte e cinco pacientes com pele normal.

Mahan, Lepine e Dabrowski (1994) avaliaram a administração oral do 2-fosfato de ascorbil e magnésio, como fonte de 46% de vitamina C, e o próprio ácido L-ascórbico, em animais. Os autores não notaram diferenças significativas em ambas dietas.

3.3.4 Arbutina

3.3.4.1 Origem e propriedades físico-químicas

A arbutina é a substância denominada quimicamente como p-hidroxifenil-glicosídeo, representando um composto aromático análogo da D-

glicose (BURKE e GRACEY, 1980), ou mais precisamente, um beta-D-glicopiranosídeo derivado da hidroquinona (CHAKRABORTY, et al., 1998). Apresenta peso molecular de 272,25, e a sua fórmula estrutural está representada na figura 11 (COUTEAU e COIFFARD, 2000).

FIGURA 11 -Fórmula estrutural da arbutina

A arbutina está presente em várias plantas, tais como *Arctostaphylos uva ursi* L. I. (LEIFERTOVA, et al., 1973; SHIH e ZEN, 2000; KUROSU, et al., 2002), *Saxifragaceae* (FROHNE, 1969), *Pyrus* (HILDEBRAND, POWELL e SCHROTH, 1969), *Ericaceae* (AHTARDJIEFF, 1966), cuja função é manter a sobrevivência em condições climáticas extremas como a falta de água (COUTEAU e COIFFARD, 2000) ou baixas temperaturas (OLIVER, et al., 2001). Contudo, essa função fisiológica nas plantas está até hoje pouco esclarecida, embora Oliver e colaboradores (2001) tenham verificado que a arbutina contribua para a estabilização das membranas celulares vegetais.

A arbutina também foi obtida em laboratório, por Funayama e colaboradores (1995), a partir da hidroquinona e amido, através de uma reação enzimática, utilizando a glicosídeo-sintetase e amilase de microrganismos. Já Kurosu e colaboradores (2002) sintetizaram enzimaticamente esse despigmentante através da glicosilação da hidroquinona, com a enzima glicosidade de *Santhomonas campestris*.

Couteau e Coiffard (2000) avaliaram a estabilidade da arbutina em solução aquosa, na concentração de $1,2 \times 10^{-4}$ M e em valores de pH iguais a 5, 7 e 9, e como resultados, obtiveram as taxas de degradação de $5,5 \times 10^{-4}$,

$7,0 \times 10^{-4}$ e $24,1 \times 10^{-4} \text{ Mmin}^{-1}$, respectivamente. Esses autores citaram que após 15,4 dias, à temperatura de 20°C , essa substância pode perder até 10% de sua concentração inicial, apresentando assim baixa estabilidade térmica.

3.3.4.2 Propriedades biológicas

A arbutina é uma substância que apresenta atividade despigmentante quando aplicada na pele, e o mecanismo de ação se deve às suas propriedades antioxidantes, e em segundo lugar, à supressão da expressão e síntese da enzima tirosinase (PETKOU, DIAMANTIDIS e VASILAKAKIS, 2002).

Maeda e Fukuda (1996) estudaram o mecanismo de ação da arbutina, que é um β -D-glucopiranosídeo da hidroquinona, em culturas de melanócitos, e verificaram que esta substância influi na ação da tirosinase em concentrações não-citotóxicas, através de inibição competitiva reversível nos sítios de ligação da L-tirosina. Segundo os autores, outros mecanismos de ação da arbutina podem ser a supressão da expressão ou da síntese da tirosinase, porém secundários ao da inibição competitiva. Maeda e Aganuma (1996), afirmaram que a arbutina promove diminuição do número e do tamanho dos dendritos dos melanócitos, e também ocorre liberação de radicais hidroxila nos queratinócitos após irradiação com ultravioleta.

Lee e colaboradores (1999) verificaram em seu estudo que a arbutina, cujo mecanismo é a inibição competitiva da tirosinase, pode ser associada a outras substâncias com atividade também despigmentante, mas manifestada através de outros mecanismos. Esses autores avaliaram a associação desta com a aloesina, com mecanismo de inibição não-competitivo da tirosinase.

Chakraborty e colaboradores (1998), avaliaram as características protéicas da enzima tirosinase após inibição pela arbutina, através de um método imunológico ("Western-blot"), sem contudo detectar quaisquer alterações. Esses mesmos autores afirmaram ainda que a arbutina também inibe a enzima 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) polimerase.

A arbutina administrada pela via oral em cobaias promoveu um diminuição do fluxo de saída de água do lúmen intestinal (BURKE e GRACEY, 1980). Ahn e colaboradores (2003) determinaram o valor do índice de toxicidade 50% desse despigmentante em queratinócitos humanos, cujo valor (362 μ M) foi aproximadamente 60 vezes superior ao do ácido kójico.

Contudo, a arbutina apresenta atividade também pelo uso interno. Jahodar, Leifertova e Lisa (1983) estudaram a eliminação da arbutina após administração no organismo; Kedzia e colaboradores (1975) detectaram atividade antibacteriana dessa substância em amostras de urina, e PetKou, Diamantidis e Vasilakakis (2002) citaram a possibilidade do uso dessa substância como auxiliar no tratamento de infecções urinárias.

3.3.4.3 Doseamento

Vários autores realizaram estudos de quantificação da arbutina. Akada e colaboradores (1979) e Kraus (1968) avaliaram a arbutina em excreções corporais através de cromatografia líquida de alta eficiência; Sticher, Soldati e Lehman (1979), determinaram as quantidades de arbutina, metilarbutina, hidroquinona e monometiléter de hidroquinona em plantas dos gêneros *Arctostaphylos*, *Bergenia*, *Calluna* e *Vaccinium*; Sun e colaboradores (1997), quantificaram a arbutina em extratos de *Vaccinium*, utilizando coluna de 4,6 por 250 mm, fase móvel metanol e água (15:85) e detecção da absorção da radiação ultravioleta a 280 nm.

Outros métodos foram citados por Kraus (1968), que utilizou espectrofotometria, e Shih e Zen (2000), que desenvolveram um método eletroquímico para o doseamento da arbutina em solução aquosa.

3.3.4.4 Aplicações

Segundo Maeda e Fukuda (1996), a arbutina é indicada para o tratamento de hiperpigmentação cutânea, ocasionada devido a hiperproliferação melanocitária por exposição à radiação ultravioleta.

A arbutina está presente em várias plantas, cujos extratos muitas vezes são utilizados na formulação de cosméticos despigmentantes (FROHNE, 1969; HILDEBRAND, POWELL e SCHROTH, 1969; LEIFERTOVA, et al., 1973; AHTARDJIEFF, 1966).

Rodelet (1996) utilizou o extrato da planta *Bergenia cordifolia*, rico em arbutina, para o encapsulamento em lipossomas e também em glicosferas. O autor preparou cosméticos na forma de hidrogéis de polímero carboxi-vinílico 0,8-1,0%, veiculando lipossomas de *Bergenia cordifolia* e glicosferas de oligômero procianidólico nas concentrações de 30 a 40%.

Grollier, Cantin e Gagnebien (1996) desenvolveram uma formulação cosmética de um creme O/A despigmentante, com associação da arbutina com um derivado da cânfora, o ácido tetraptalilideno-dicânfora sulfônico, nas concentrações de 5 e 3,3%, respectivamente. Esses autores citam a atividade anti-radicaís livres da arbutina, indicada para retardar o envelhecimento cutâneo.

3.3.5 Avaliação da atividade despigmentante

A atividade dos despigmentantes pode ser avaliada através de métodos *in vitro* (culturas celulares e inibição enzimática) e *in vivo* (avaliação clínica em animais ou humanos).

3.3.5.1 Métodos *in vitro*

Vários foram os experimentos citados na literatura utilizando culturas de melanócitos. Masaki (1999) e Yamamoto (1990) realizaram experimentos para avaliações de despigmentantes, utilizando células de melanoma tipo B16 e melanócitos normais. Hayasawa e colaboradores (1997) desenvolveram um método para análise dos despigmentantes inibidores da síntese de melanina baseados na cultura celular de melanócitos B16, fixação em membrana e avaliação da coloração final obtida através de um programa de computador. Lei e colaboradores (2002) desenvolveram uma co-cultura de queratinócitos e

melanócitos, que após avaliação frente a substâncias inibidoras (ácido kójico, arbutina, hidroquinona) e estimulantes da melanogênese, foi considerada pelos autores como sistema modelo para estudos *in vitro*.

A arbutina foi analisada por vários autores. Chakraborty e colaboradores (1998) avaliaram a atividade da arbutina na concentração de 100 µg/mL em culturas de melanócitos, verificando inibição de 20% da tirosinase após 5 dias, em relação aos controles, e sem provocar inibição do crescimento celular. Funayama e colaboradores (1995) compararam as atividades de alfa e beta arbutina através de métodos *in vitro*, utilizando melanócitos de cobaias associado a um método de inibição enzimática, observando maior atividade para alfa arbutina.

O poder despigmentante da arbutina foi avaliado através de métodos enzimáticos por vários autores. Funayama e colaboradores (1995) compararam as atividades de alfa e beta arbutina, através de método *in vitro* de avaliação da inibição da enzima de cogumelo, observando que a alfa-arbutina inibiu somente a atividade de tirosinase de origem animal, mas com intensidade 10 vezes maior que a beta-arbutina. Esse mesmo método foi utilizado por Nihei e Kubo (2003), os quais identificaram a substância 2,4-dihidroxifenil-o-β-glicopiranosídeo como sub-produto. Lee e colaboradores (1999) compararam o efeito da arbutina associada ou não a aloesina quanto a inibição da tirosinase do cogumelo, e concluíram que a associação é sinérgica.

Nakajima e colaboradores (1998) compararam os efeitos da arbutina e do ácido kójico, através de dois métodos imuno-enzimáticos ("cell-blotting" e "cell-pellets") e contrariamente aos resultados encontrados na literatura, observaram que a arbutina, na concentração de 0,5 a 8,0 mM, promove aumento do conteúdo de melanina nas células, e assim, aumento da pigmentação. Esse fenômeno não ocorreu para o ácido kójico, na concentração de 0,5 a 4,0 mM.

A atividade do ácido kójico, isolado ou associado a outros despigmentantes, de inibir a tirosinase foi avaliada por vários autores. Majmudar e colaboradores (1998), utilizaram tirosinase e L-dopa, entre outros

métodos auxiliares, para avaliar o ácido kójico em solução aquosa e não-aquosa, e verificaram maior atividade nas soluções não-aquosas. Morisaki e Ozaki (1996) avaliaram a estabilidade e atividade inibitória do ácido L-ascórbico associado ao ácido kójico, sobre a tirosinase. Cho e colaboradores (1997) analisaram as atividades inibidoras de enzima e a citotoxicidade das substâncias arbutina, ácido kójico, ácido azeláico, ácido ascórbico e ácido tranexâmico sobre tirosinase de cogumelo ou de melanócitos (verificando o conteúdo celular melânico), e observaram que o ácido kójico apresentou ótima inibição de ambas tirosinases e a arbutina inibiu predominantemente a tirosinase humana. Hasebe e colaboradores (1995) avaliaram a atividade inibidora de tirosinase do ácido kójico através de um biosensor amplificador baseado na reação de oxidação catalisada pela tirosinase na presença de polifenóis como substrato.

Curto e colaboradores (1999) avaliaram o poder de inibição da tirosinase pelo ácido kójico, arbutina, 2-fosfato de ascorbil e magnésio, hidroquinona, entre outras substâncias, em culturas celulares de melanócitos de mamíferos, em relação à concentração mínima de substância necessária para se promover a inibição da enzima, e conseguiram detectar os valores de 6 e 72 µg/mL somente para o arbutina e a hidroquinona.

Yu (1998) analisou várias formulações cosméticas de géis e emulsões múltiplas (tipo A/O/A) contendo ácido kójico em células de Franz utilizando membranas sintéticas de celulose, fluido receptor de tampão fosfato-salino pH 7,4 e realizou o doseamento nesse líquido receptor através de cromatografia líquida de alta eficiência. O autor observou que dentre as formulações avaliadas quanto a difusão, aquelas formadas pelas emulsões múltiplas tipo A/O/A foram as que promoveram as menores taxas de liberação do agente despigmentante.

3.3.5.2 Métodos *in vivo*

Alguns testes de avaliação das substâncias despigmentantes são efetuados em pêlos de animais, como o efetuado por Quevedo e

colaboradores (1990). Esses autores promoveram despigmentação nos pêlos de ratos eumelânicos (escuros) e feomelânicos (claros), através da aplicação de substâncias como o fenol, monobenziléter de hidroquinona, amcinonida, durante três semanas. Observaram que o fenol não conseguiu clarear as extremidades dos fios, e o monobenziléter de hidroquinona promoveu aumento da atividade melanocitária nessas regiões; a amcinonida contudo promoveu o clareamento da extremidade dos pelos, explicada pelos autores com sendo ocasionada pela característica deletéria dessa substância sobre as estruturas presentes nessas regiões dos pêlos dos animais.

Nair e Tramposch (1989) avaliaram substâncias despigmentantes, entre elas o ácido kójico, em ratos expostos a irradiação UVB de maneira crônica e gradativa. Os autores afirmaram que a exposição não gradativa às radiações promove fenômenos irritativos e inflamatórios na pele, os quais interferem nas avaliações das atividades despigmentantes.

Diversas são as formas de avaliação clínica dos produtos despigmentantes em humanos encontradas na literatura, diferindo em relação ao tipo de alteração de pigmentação da pele em análise, o tipo de formulação, as substâncias despigmentantes isoladas ou associadas e o método de avaliação clínica (subjetivo ou objetivo).

Quanto às formulações, Majmudar e colaboradores (1998) avaliaram clinicamente vários pacientes que foram submetidos a aplicação tópica do despigmentante ácido kójico, tanto em solução aquosa quanto em não-aquosa. Higa (1989) analisou os efeitos na pele de voluntários masculinos e femininos, após aplicação de um creme cosmético contendo monostearato de ácido kójico 1%. Kameyama, Ohnuma, e Tagawa (1999) e Kamyama e colaboradores (1996) avaliaram formulações cosméticas de despigmentantes (cremes contendo 2-fosfato de ascorbil e magnésio) através da aplicação na pele.

As alterações pigmentares da pele submetidas aos estudos clínicos com os despigmentantes citadas na literatura foram várias. Honda (1998a) avaliou cosméticos contendo o ácido kójico, aplicados em pacientes portadores de dermatite de contato, e observou que este promoveu redução

do prurido, eritema e esfoliação cutânea associadas. Mishima e Motono (1990) testaram um creme cosmético contendo ácido kójico 2% aplicado duas vezes ao dia em pacientes que apresentavam cloasma senil ou cloasma induzido por irradiação luminosa e manchas pós-inflamação, e obtiveram 79% de sucesso na redução das alterações.

Quanto à associação de substâncias despigmentantes, Cotellessa e colaboradores (1999) avaliaram o efeito despigmentante da associação de ácido kójico 10% com ácido glicólico 50% antecedido por tratamento com ácido tricloroacético 15 a 25%, em pacientes com melasma difuso. Os pacientes foram avaliados clinicamente antes e após os tratamentos, e as formulações foram classificadas quanto à regressão da mancha em total, parcial e nenhuma. Lim (1999) analisou um cosmético na forma de gel contendo ácido kójico 1% associado a hidroquinona 2% e ao ácido glicólico 10% e o mesmo produto agora sem o ácido kójico, aplicados simultaneamente nas faces opostas dos rostos de quarenta mulheres que apresentavam melasma, durante doze semanas. Garcia e Fulton (1996) realizaram um estudo parecido com o de Lim (1999), utilizando ácido kójico associado a hidroquinona e ácido glicólico associado a hidroquinona, com trinta e nove pacientes, e tratamento alternado dos produtos nas faces do rosto.

Kawada e colaboradores (2002) desenvolveram um método de avaliação clínica de despigmentantes, não subjetivo, através da análise de imagens digitais obtidas das regiões da pele da face de quinze mulheres que, durante seis semanas, aplicaram uma loção contendo 3% de 2-fosfato de ascorbil e magnésio. Os autores quantificaram as imagens quanto ao contraste, saturação e reflexão (em colorímetro).

Virador e colaboradores (1999) definiram um protocolo com os parâmetros para se avaliar as substâncias com atividade despigmentante, e também para definir seus mecanismos de ação. O método consiste inicialmente na avaliação das substâncias frente à tirosinase purificada, seguido do tratamento de melanócitos com essas substâncias em análise, análises químicas de identificação e finalmente os testes em cobaias.

Majmudar e colaboradores (1998) aplicaram quatro métodos para analisar a atividade de substâncias despigmentantes: um método enzimático (tirosinase e L-dopa), visualização microscópica, cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação clínica. Dentre as substâncias analisadas, incluíram o ácido kójico, tanto em solução aquosa quanto em não-aquosa, sendo esta última solução a de maior atividade despigmentante.

Ueda e colaboradores (2003) aplicaram soluções aquosas a 2, 4, 6, 8, 10 e 15% de 2-fosfato de ascorbil e magnésio no antebraço de voluntários, seguido de aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade (iontoforese), e observaram aumento na quantidade penetrada dessa substância em relação aos controles utilizados (sem aplicação da corrente elétrica). Os autores utilizaram um método espectrofotométrico não invasivo para análise do tecido, com avaliação da reflexão de luz infravermelha.

3.4 SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

3.4.1 Fundamentos da penetração cutânea

A penetração ou difusão de substâncias através da pele, veiculadas em formulações, é um processo passivo, dependente do gradiente de concentração (OSTRENGA, et al., 1974), e definido pelos modelos matemáticos estipulados nas leis de Fick. A velocidade desse processo é determinada pelas características das substâncias em relação ao estrato córneo ou veículos em que se encontram (solubilidade, coeficientes de difusão e partição), a concentração aplicada e as características das membranas (composição, espessura e área).

Quanto às substâncias, sua capacidade de sair da formulação e atravessar o estrato córneo é avaliada através dos parâmetros solubilidade, coeficiente de partição e de difusão.

A solubilidade se refere à afinidade das substâncias em permanecerem dissolvidas nos componentes da formulação, isto é, a atividade termodinâmica. O estrato córneo é considerado um meio predominantemente

lipofílico, mas com porções hidrofílicas representadas pelos queratinócitos, e desse modo, as substâncias devem apresentar lipossolubilidade para poderem atravessar esse meio. Sendo assim, para substâncias ionizáveis, a forma não-dissociada deve prevalecer nas formulações, e para substâncias apolares, a lipossolubilidade deve ser ajustada de tal modo que essas não fiquem muito solubilizadas nesse meio, mas possam passar para as camadas mais profundas da epiderme, com o uso de tensoativos ou solventes.

O pKa corresponde ao valor de pH próprio de cada substância em solução onde encontram-se presentes 50% de suas formas dissociadas. Sendo assim, em valores de pH menores que o pKa, ocorre menor dissociação, e em pH maiores que o pKa, o inverso, isto é, maior dissociação. Para um aumento do poder de penetração, o pH deve ser ajustado de tal forma a propiciar a predominância das formas não-ionizadas de princípios ativos ácidos e básicos. Sendo assim, para substâncias ácidas, o pH deve ser menor que o pKa, e para substâncias alcalinas, o oposto (KITAGAWA, YOKOCHI e MUROOKA, 1995).

O coeficiente de partição se refere a afinidade relativa das substâncias entre a pele e a formulação, e pode ser ajustado nas formulações, de modo que a substância veiculada consiga sair com relativa facilidade e passar para o estrato córneo. Para tal, deve-se levar em consideração a lipo ou hidrossolubilidade dos veículos e da substância a ser liberada. O uso de solventes e co-solventes nas formulações possibilita esse ajuste.

O coeficiente de difusão se refere a capacidade das substâncias em penetrar pelos canais e poros disponíveis no estrato córneo, e depende do tamanho e volume da molécula. Desse modo, moléculas volumosas, como polímeros e peptídeos, apresentam pequeno coeficiente de difusão, e para moléculas pequenas, os valores são maiores. O ajuste desse parâmetro pode ser feito através de meios físicos ou químicos que promovam a formação de novos canais ou poros no estrato córneo.

Em relação a concentração aplicada, deve-se estabelecer uma diferença, ou gradiente, entre a formulação e o sítio da pele onde o princípio

ativo deve atingir, favorecendo-se o processo de penetração pela alteração da atividade termodinâmica desses sistemas.

Em relação à membrana ou pele a ser tratada, influem na velocidade da penetração a sua composição, a área de exposição e a espessura a ser atingida. Desse modo, quando menor a espessura da pele (de crianças, idosos, ou esfoliada) ou desorganizada sua constituição (moléstias como a psoríase), maior é a facilidade de substâncias penetrarem.

Durante o processo de penetração, quando se aplicam concentrações suficientes para promoção de gradiente de concentração, inicialmente a substância deve se absorver completamente na camada superficial (estrato córneo), e somente após essa etapa, passa a se difundir para as camadas mais profundas. Esse fenômeno é denominado de efeito reservatório. Após esse intervalo de tempo, detectam-se concentrações proporcionalmente maiores em relação ao tempo, sendo denominado tempo de latência ou tempo de fluxo constante, ou ainda "lagtime". O efeito reservatório se deve à alta afinidade da substância pelo estrato córneo, e pode ser utilizado para o desenvolvimento de formulações de ação prolongada (BARRY, 1987).

Os parâmetros avaliados nos estudos de difusão são calculados a partir dos valores de concentração da substância em análise presente no fluido receptor e os intervalos de tempo de análise. Apenas com esses dados já é possível a construção de uma curva de liberação, com as quantidades presentes no fluido receptor no eixo y e o tempo de análise no eixo x. Sabendo-se a área da membrana utilizada, e dividindo-se os valores de concentração presente no fluido receptor por esse valor, pode-se construir o gráfico da curva de liberação por área. Como o fluxo é definido como a quantidade de substância (μg) que atravessa a área da membrana (cm^2) em relação ao tempo (h), esse parâmetro pode ser estimado a partir da inclinação da reta obtida por regressão linear dos pontos, para aquelas retas com coeficiente de correlação maior que 0,9 (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

Dividindo-se os valores fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) pela concentração da solução saturada ou formulação aplicada nas membranas ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$), estima-se indiretamente o valor da permeabilidade, que equivale à profundidade da

membrana que a substância consegue atravessar (cm) em relação ao tempo (h), mesmo desconhecendo-se a sua espessura (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

3.4.2 Características gerais dos promotores de penetração

O estudo de compostos com finalidade de aumentar a penetração de substâncias através da pele iniciou-se na década de 60, avaliando-se ungüentos contendo nitroglicerina (EL-KATTAN, ASBILL e HAIDAR, 2000).

Hori, Satoh e Maibach (1990) classificaram as substâncias capazes de promover aumento da penetração cutânea de acordo com suas propriedades físico-químicas, em compostos orgânicos e inorgânicos. Os autores atribuíram valores em relação às moléculas das substâncias promotoras de penetração, calculados a partir da tabela de Fujita, baseada no ponto de ebulição das substâncias. Por essa classificação, tem-se num dos extremos a água, que apresenta valor 0 como orgânico e 100 como inorgânico, e no outro extremo o miristato de isopropila, apresentando valor 330 como orgânico e 60 como inorgânico. Para o ácido oléico, presente nos óleos vegetais, e o propilenoglicol, os autores atribuíram 360 e 60, para os valores orgânicos, e 152 e 200, para inorgânico, respectivamente.

O uso de formulações contendo promotores de penetração não é completamente seguro, devendo essas serem avaliadas quanto ao poder alergênico, tóxico e também as concentrações mínimas e seguras para o uso dos promotores devem ser estipuladas. Segundo Nishizaka e Yamasaki (1998) e Asbill e Michniak (2000), a grande maioria das substâncias promotoras de difusão epidérmica determinam reações de sensibilização e irritação quando incorporadas nos cosméticos. Esses autores avaliaram a atividade promotora de difusão de vários óleos, como o nicotinato de DL-tocoferila e butilparahidroxibenzoato, e classificaram esses óleos, de acordo com a solubilidade das substâncias ativas utilizadas, em muito solúveis e especificamente solúveis. Akimoto e Nagase (2003) afirmaram que alguns promotores de penetração, como os tensoativos e ácidos graxos, podem iniciar processos inflamatórios na pele.

3.4.3 Mecanismos de ação

Os promotores de penetração cutânea podem modificar temporariamente as características da pele através de mecanismos químicos e físicos (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

Os promotores físicos modificam temporariamente as propriedades do estrato córneo ou dos anexos cutâneos, como por exemplo, através da aplicação de gradientes de potencial elétrico, ultra-som ou temperatura (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

A iontoforese baseia-se na aplicação de correntes elétricas de baixa intensidade, de 1 a 2 V, através de pequenos eletrodos, os quais promovem a penetração de compostos iônicos de mesma polaridade (eletro-repulsão) (UEDA, et al., 2003; NAIR e PANCHAGNULA, 2003) ou por gradiente de pH (eletro-osmose). No processo de eletroporação, são aplicados pulsos rápidos (milisegundos) intermitentes e alta voltagem (100 a 1000V), promovendo caminhos transitórios na bicamada lipídica do estrato córneo (ESSA, BONNER e BARRY, 2003). A sonoforese se caracteriza pela aplicação de ultra-som com frequência entre 5 e 100 KHz.

Os promotores químicos são substâncias que apresentam afinidade pelas bicamadas lipídicas do estrato córneo, e que quando presentes, alteram suas propriedades e organização, modificando a fluidez desse estrato, e até a separação das fases das bicamadas (ASBILL e MICHNIAK, 2000). Segundo Goodman e Barry (1989), esses promotores podem agir por três formas no estrato córneo: nos lipídios das bicamadas, nas proteínas (queratina) intracelulares ou alterando o coeficiente de partição local. Contudo, essas substâncias podem apresentar mais de uma dessas propriedades concomitantemente, sendo o promotor ideal aquele com as três ações.

Em relação aos lipídios das bicamadas, os promotores podem se ligar às cabeças polares, alterando as forças iônicas e modificando a hidratação local, rota denominada polar, ou podem se inserir entre as cadeias carbônicas apolares, alterando os espaços entre as mesmas ou até extraíndo os lipídios,

rota denominada apolar (GOODMAN e BARRY, 1989, AKIMOTO e NAGASE, 2003). De qualquer maneira esses promotores causam a desorganização desse sistema lamelar, chegando à ruptura, acompanhada de aumento da fluidez, aumentando assim o coeficiente de difusão para substâncias apolares. Contudo, uma desorganização extrema pode ocasionar efeito inverso, promovendo o aprisionamento do promotor no estrato córneo, conforme mostrou o experimento de Nair e Panchagnula (2003), através da aplicação de soluções de ácido linoléico e eletroforese.

Como exemplo de promotores da rota apolar lipídica são citados a azona (azacicloalcanona), os álcoois graxos (laurílico), ácidos graxos (ácido oléico), terpenos lineares (nerolidol) ou cíclicos (fenchona, timol, limonemo) presentes nos óleos vegetais (ANDEGA, KANIKKANNAN e SINGH, 2001; EL-KATTAN et al., 2001; MONTI, et al., 2002), oxazolidinonas (similaridade com esfingosina e ceramidas) (ASBILL e MICHNIAK, 2000) e tensoativos (como o lauril sulfato de sódio) (BORRAS-BLASCO, et al., 2004).

Quanto à rota polar lipídica, o aumento da hidratação local é um exemplo clássico, produzido pela uréia, além dos solventes dimetilsulfóxido (DMSO) e propilenoglicol. NARISHETTY e PAHCHAGNULA (2004) incluem os terpenos oxigenados (cineol, mentol, mentona, pulegona, alfa-terpineol, carvona) nessa rota, que atuam através da formação de pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos lipídios das bicamadas.

Os mecanismos de ação dos promotores estão representados esquematicamente na figura 12, adaptada de Williams e Barry (2004).

Em relação às proteínas intracelulares, os promotores interagem com os grupamentos polares, promovendo solvatação das proteínas das células queratinizadas, alterando as forças de ligação com a água, alterando as conformações helicoidais, resultando na formação de canais porosos nesses locais, e aumentando o coeficiente de difusão para substâncias polares. Segundo Asbill e Michniak (2000), ocorre desnaturação da alfa-queratina dos filamentos entre os queratinócitos, e também, segundo Larrucea e colaboradores (2001), solvatação dessa proteína. Entre os promotores dessa classe pode-se citar o propilenoglicol, o dimetilsulfóxido (DMS),

decilmethylsulfóxido (DCMS), os tensoativos como o lauril sulfato de sódio (BORRAS-BLASCO, et al., 2004) e os tensoativos não-iônicos (NOKHODCHI, et al. 2003).

FIGURA 12 -Desenho esquemático dos mecanismos de ação dos promotores de penetração na bicamada lipídica do estrato córneo (adaptada de Williams e Barry, 2004).

Os promotores podem também aumentar o coeficiente de partição óleo-água dos lipídios do estrato córneo, tornando-os mais propícios para dissolver melhor outras moléculas apolares, sendo assim denominados de co-solventes, como por exemplo o propilenoglicol e o etanol. Por outro lado, esse fenômeno pode causar maior retenção de substâncias no estrato córneo, diminuindo assim a difusão. Asbill e Michniak (2000) incluem as substâncias poliméricas, como polietilenoglicol e polimetilsiloxano, nessa classe de promotores.

A hiperidrose é causada pela desorganização das lamelas do estrato córneo, de maneira semelhante ao que ocorre na pele quando aplicam-se alguns tipos de promotores de penetração (GOODMAN e BARRY, 1989).

Abaixo, na tabela 4, tem-se a compilação dos mecanismos de ação dos promotores de penetração e alguns exemplos (GOODMAN e BARRY, 1989; COOPER, 1984; ASBILL e MICHIK, 2000).

TABELA 4 -Promotores de penetração e seus mecanismos de ação

Promotor		Mecanismos e Vias de Penetração Cutânea				
		Intercelular		Intracelular (Proteína Queratina)	Coeficiente de Partição	Anexial (Glândulas e Pelos)
		Bicamada Lipídica				
		Cadeia Carbônica	Cabeça Polar			
PPG			X	X	X	
Polímeros					X	
Uréia			X			
Ácido Oléico	X					
AL	X					
Azona	X					
DMSO		X	X			
DCMS			X			
LSS	X		X			X
Etanol					X	
DMF			X			
DMA			X			
Pirrolidona					X	
Terpenos	lineares	X				
	cíclicos	X				
	oxigenio		X			
Papaína				X		

DMSO – dimetilsulfóxido, DCMS – decilmetilsulfóxido, LSS – lauril sulfato de sódio, PPG – propilenoglicol, AL – álcool laurílico, DMF – dimetil-formamida, DMA – dimetil-acetamida

3.4.4 Terpenos, ácidos e álcoois graxos promotores de penetração

Ácidos graxos, álcoois graxos e terpenos são substâncias comumente encontradas nos óleos de plantas. Essas substâncias correspondem a compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio, com cadeia carbônica apolar podendo se apresentar saturada ou insaturada, sendo que os ácidos graxos apresentam carboxilas e os álcoois, hidroxilas. Os terpenos são constituídos quimicamente a partir do isopreno, e classificados quimicamente em hemiterpenos, diterpenos e sesquiterpenos, contendo ou não oxigênio (CASAMADA, 1977). Embora diferentes quimicamente, esses dois tipos de promotores de penetração causam desorganização nas bicamadas lipídicas do estrato córneo. Contudo, Narishetty e Panchagnula (2004) verificaram que os terpenos que contêm oxigênio também atuam na rota polar lipídica, promovendo a ruptura das pontes de hidrogênio entre as ceramidas.

O ácido oléico é um ácido graxo insaturado com uma cadeia de dezessete carbonos e uma carboxila terminal, está presente nos óleos de oliva, de andiroba e babaçu, e amplamente estudado quanto à atividade promotora de penetração. Os terpenos são encontrados em óleos essenciais e fixos, como o óleo de copaíba (8% diterpenos e 70% sesquiterpenos), sendo que os sesquiterpenos (como farnesol e nerolidol) apresentam propriedades de promoção de penetração cutânea comprovadas (MOSER, et al. 2001).

Kitagawa, Yokochi e Murooka (1995) avaliaram ácidos graxos saturados através do método de avaliação da fluorescência produzida por anisotropia e também por avaliação da temperatura de transição de fase de lipossomas, e sugeriram a seguinte ordem decrescente de poder de promoção de penetração: ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico, com 12, 14, 16 e 18 carbonos na cadeia apolar, respectivamente. Contudo, segundo os autores, esses ácidos devem estar na forma não-ionizada para apresentarem poder de promover penetração.

Naik e Guy (1997) citam os ácidos graxos saturados de 10 a 12 átomos de carbono, e os insaturados, com longas cadeias carbônicas, como sendo os melhores promotores de penetração dessa classe. Os autores consideram que esses promotores modulam os domínios lipídicos do estrato córneo, alterando sua organização e promovendo assim canais para a passagem de substâncias para a pele. Nair e Panchagnula (2003) obtiveram promoção de penetração de arginina em membranas de pele de rato após pré-tratamento com solução de ácido oléico 5% em solução de água e etanol (2:1) e aplicação de eletroforese (corrente elétrica de 0,5 mA/cm²).

Em relação aos álcoois graxos, Kanikkannan e Sinch (2002) observaram maior efeito promotor de penetração de melatonina para soluções de água e etanol (50:50) adicionadas de octanol e nonanol (8 e 9 carbonos na cadeia apolar) e menor para aquelas contendo tridecanol e álcool miristílico (13 e 14 carbonos), através de estudos de difusão utilizando membranas de pele de camundongo sem pêlo. Segundo esses autores, cadeias apolares de menor tamanho atuam rompendo as interações de ceramidas e colesterol das bicamadas lipídicas, cujas cadeias apolares apresentam tamanho similar.

Quanto aos terpenos, apresentam maior eficácia para aumentar a penetração cutânea de substâncias hidrofílicas. Vários estudos utilizaram essa classe de substâncias como promotores de penetração, sendo estudados: nerolidol, fenchona, timol, 1,8-cineol, α -pinemo, α -terpineol, cineol, mentol, mentona, pulegona, carvona, e d-limonemo (EL-KATTAN, et al., 2001; MOSER, et al., 2001; MONTI, et al., 2002; ESCRIBANO, et al., 2003; EL-MAGHRABY, WILLIAMS e BARRY, 2004; NARISHETTY e PANCHAGNULA, 2004). O 1,8-cineol, α -pinemo e d-limonemo são terpenos cíclicos, sendo este último o mais estudado dessa classe. Narishetty e Panchagnula (2004) verificaram que os terpenos oxigenados (cineol, mentol, mentona, pulegona, α -terpineol, carvona) são promotores de penetração para substâncias hidrofílicas. Monti e colaboradores (2002) citaram os terpenos cíclicos como promotores de penetração para substâncias moderadamente lipofílicas, e segundo El-Kattan e colaboradores (2001) e Moser e colaboradores (2001), essas substâncias ocasionam a extração de lipídios das bicamadas.

3.5 ESTUDOS DE DIFUSÃO

3.5.1 Características gerais

Os estudos de difusão de substâncias através da pele são realizados através de métodos *in vivo* (excreção urinária e fecal de substâncias radioativas, balanço de massa e remoção de estrato córneo com fitas adesivas) e *in vitro* (células de difusão), cujo objetivo é avaliação da penetração de substâncias através das várias camadas da pele ou até a circulação sangüínea (FRANZ, LEHMAN e McGUIRE, 1993; BRONAUGH e COLLIER, 1993).

Os estudos de difusão *in vitro* possuem outras aplicações além da determinação do poder de penetração de substâncias, tais como o estudo toxicológico de exposição às substâncias presentes em cosméticos durante o uso (YOURICK e BRONAUGH, 1999). Yoshihama (1999) aplicou o método de difusão da célula de Franz em várias substâncias, entre elas os conservantes antimicrobianos do grupo dos parabenos e seus derivados, para relacionar os valores obtidos com o poder alergênico dessas substâncias.

3.5.2 Células de difusão

3.5.2.1 Características gerais

As células de difusão, também denominadas células de Franz, são dispositivos de vidro ou Teflon®, compostos de dois compartimentos, doador e receptor, e que mantêm entre si uma membrana semi-permeável, banhada em sua porção inferior por um líquido, denominado fluido receptor. Na figura 3 tem-se a representação de um sistema composto por três células de difusão.

No compartimento doador (letra A da figura 3) aplicam-se as soluções ou formulação a serem avaliadas quanto ao poder de penetração.

FIGURA 13 -Fotografia do sistema composto por três células de Franz verticais de fluxo estático

No compartimento receptor (letra B da figura 3), que é preenchido pelo fluido receptor, provido de agitação de maneira contínua e homogênea, retiram-se alíquotas, em intervalos de tempo regulares, para serem avaliadas quanto a concentração da substância liberada. Essa etapa pode ser efetuada de maneira intermitente, através da retirada da amostra e reposição do mesmo fluido, ou contínua, através de um fluxo de fluido que é introduzido de maneira contínua sob a membrana. Desse modo, as células de difusão são classificadas em fluxo estático e dinâmico, respectivamente. Esses compartimentos apresentam um ducto coletor (letra C da figura 3), e no segundo tipo, também um ducto introdutor, para o fluido receptor.

A escolha de um ou outro tipo de célula de difusão depende do experimento a ser realizado, sempre observando-se a solubilidade e estabilidade das substâncias em análise no fluido receptor. Para aquelas pouco solúveis, deve-se utilizar as células de difusão com fluxo constante, evitando-se assim a saturação do fluido receptor (EL-KATTAN, ASBILL e HAIDAR, 2000).

As membranas utilizadas devem ficar fixas entre os compartimentos doador e receptor das células através de garras metálicas (letra D da figura 3), e isso pode ser efetuado dispondo-se essas câmaras em posição horizontal (e a membrana vertical) ou posição vertical (e a membrana horizontal), sendo esses sistemas denominados de células de difusão horizontal e vertical, respectivamente.

A formulação ou solução aplicada pode sofrer evaporação no compartimento doador quando se utilizam temperaturas superiores aquelas do ambiente onde se encontram. Nesse caso, deve-se proteger esse compartimento, em geral através da aplicação de filmes flexíveis, como o Parafilm®.

3.5.2.2 Fluido receptor

O fluido receptor deve banhar a parte inferior das membranas, e para tal, deve-se observar e evitar a formação de bolhas de ar, que quando presentes, diminuem a superfície de contato.

A agitação do fluido receptor deve garantir uma homogeneidade de concentração da amostra em todo o volume do compartimento receptor, e impedir assim que ocorra saturação das porções localizadas imediatamente abaixo das membranas. Os dispositivos para agitação do fluido receptor são compostos basicamente por barras magnéticas de pequeno tamanho, e que em alguns sistemas, estão acopladas a uma mola formadora de um vórtex, que melhora o desempenho do dispositivo.

A temperatura do fluido receptor deve ser mantida constante durante todo o experimento, através de sistemas de mantas aquecidas ou fluxo de água quente (para células formadas com camisa dupla no compartimento receptor). Os experimentos de difusão citados na literatura utilizaram valores de temperatura variados até 37°C. Embora esse valor corresponda a temperatura corporal humana, na superfície do estrato córneo da pele esse valor é mais baixo, ao redor de 32°C, pois sua temperatura varia de acordo com a temperatura do ambiente.

Akomeah e colaboradores (2004) realizaram estudos de difusão com células de Franz, variando a temperatura de 23 até 45°C, na penetração de metilparabeno, propilparabeno e cafeína em membranas de pele abdominal humana. Os autores verificaram que a cada aumento de 7 a 8°C, a quantidade liberada no fluido receptor dobrava, e afirmaram que esse fenômeno se deve a expansão do espaço intercelular do estrato córneo.

3.5.2.3 Membranas

As membranas utilizadas nos estudos de difusão podem ser classificadas, em relação a origem, em artificiais, animais, humanas, alteradas e reconstituídas (LOPES e KANEKO, 2000). Essas membranas apresentam variações, de acordo com a apresentação, obtenção e armazenamento, sendo que a seleção das mesmas depende do tipo e das condições experimentais.

3.5.2.3.1 Artificiais

As membranas artificiais mais comumente utilizadas são constituídas de celulose ou de borracha. As membranas de celulose apresentam característica hidrofílica, e aquelas de borracha, lipofílica (LOPES e KANEKO, 2000). Essas membranas apresentam a vantagem de serem homogêneas e com pouca variabilidade quanto a constituição e espessura. Nessa classe de membranas pode-se incluir as poliméricas, preparadas com as características de hidro e lipofilicidade. Como desvantagem, essas membranas não apresentam metabolismo, como ocorre com as membranas de pele animal e humana.

3.5.2.3.2 Animais diversos

As membranas de animais apresentam as vantagens de maior facilidade de obtenção, em relação àquelas de origem humana, e além disso,

pode-se utilizar animais de linhagens genéticas semelhantes. A desvantagem é a presença de um número grande de pêlos, muito superior ao encontrado na pele humana, e que constituem vias alternativas para a penetração de substâncias hidrofílicas. Segundo Andega, Kanikkannan e Singh (2001) as peles de porco e macaco promovem resultados mais próximos da humana.

Lin e colaboradores (1992), afirmaram que as membranas animais apresentam maior permeabilidade do que aquelas de origem humana. Esses autores utilizaram várias membranas em estudos de difusão do diclofenaco de sódio, ácido benzóico e teofilina, tais como as peles de cobra *Phyton molurus*, rã (*Rana catesbiana*), camundongo sem pêlo, porco, rato, humana de prepúceo, e também membranas sintéticas de celulose da marca Visking. Os autores verificaram maior permeabilidade para membranas obtidas de pele de sapo e sintética para teofilina e diclofenado de sódio. Para o ácido benzóico, a membrana de pele de porco foi a menos permeável.

Vários autores utilizaram pele de animais como rato, porco e camundongo, e até mesmo a pele humana, como membranas em estudos de difusão, e indicaram a necessidade de remoção elétrica ou mecânica dos pêlos presentes (LIN, et al., 1992). Segundo El-Kattan, Asbill e Haidar (2000), as membranas de pele de rato são 30 a 40 vezes mais permeáveis que aquelas obtidas de cadáveres humanos; a pele de porco apresenta maior vascularização e tecido subcutâneo; as peles reconstituídas são 15 a 54 vezes mais permeáveis que as humanas; as membranas sintéticas poliméricas são mais permeáveis que aquelas de origem animal ou humana.

Niazy (1991) utilizou pele dorsal de coelho como membrana para avaliação da difusão de dihidroergotamina em presença de ácido oléico em solução com propilenoglicol, como promotor de penetração.

3.5.2.3.3 Muda de pele de cobra

As cobras trocam de pele a cada 3 meses em média, com auxílio de movimentos musculares, liberação de uma secreção e atritando-se contra superfícies rígidas (HAIGH, et al., 1998).

Segundo Barry (1987), as mudas de pele de cobra apresentam-se compostas por uma mistura de filamentos de queratina, dispostas entre as células, e unidas através de ligações dissulfeto.

FIGURA 14 -Muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, conhecida popularmente como cascavel

Haigh e colaboradores (1998) analisaram seções transversais de membranas de pele de cobra *Python* (figura 15), com auxílio de microscópio eletrônico, e observaram duas porções presentes nas membranas, identificadas como partes rígidas (ou de escamação) unidas entre si através de uma parte flexível, que segundo Williams e colaboradores (1996), mantém uma proporção de 80 e 20% da superfície da pele desses animais, respectivamente.

Chang e Zheng (2003), após análise de mudas de pele de cobra *Elaphe taeniura* em microscópico (coradas com hematoxilina e eosina), identificaram quatro camadas, as quais denominaram superficial, alfa, intermediária e beta, as quais, segundo Williams e colaboradores (1996), estão presentes apenas nas porções rígidas. Segundo esses autores, as

porções flexíveis apresentam apenas as camadas alfa e beta, e desse modo, menor espessura.

FIGURA 15 -Micrografia eletrônica da seção transversal das partes dorsais escamosa (à direita) e flexível (à esquerda) de mudas de pele de cobra *Phyton molurus* (HAIGH, et al., 1998)

Vários são os experimentos realizados com mudas de pele de cobra citados na literatura. Chang e Zheng (2003) compararam a resistência à passagem de radiação ultravioleta tipo B em membranas obtidas de muda de pele de cobra *Elaphe taeniura* e de pele humana caucasiana e negra, através da aplicação de doses de 110 a 800 mJ/cm². Os autores observaram menores quantidades de irradiação através das membranas de muda de pele de cobra e maiores para aquelas de pele humana negra e caucasiana, equivalentes a 5,1, 10 e 30% das doses de radiação aplicadas, respectivamente. Segundo os autores, esse fato se deve a maior quantidade de queratina presente na pele das cobras. Embora a pele desses animais seja mais resistente, essas estruturas permitem a evaporação e fluxo de água, de acordo com a temperatura ambiente, conforme o estudo efetuado de Dmiel (1998), comparando cobras noturnas e do deserto. Em outro experimento, Williams e colaboradores (1996) compararam a condutividade elétrica da pele da cobra negra americana (dorsal e ventral) com a pele humana, e obtiveram valores aproximadamente quatro vezes superiores para as peles animais.

Lin e colaboradores (LIN, et al., 1992) compararam a permeabilidade das membranas obtidas de muda de pele de cobra *Python molurus* em relação àquelas obtidas pelo estrato córneo isolado (retirado por imersão em água a 60°C durante 1 minuto) para soluções aquosas de 2 mg/mL (0,2%) de diclofenaco de sódio, teofilina e ácido benzóico. Os autores obtiveram valores de permeabilidade 2 a 4 vezes superiores para membranas obtidas a partir das mudas de pele. Segundo os autores, as mudas de pele de cobra podem ser utilizadas no lugar da pele humana nos estudos *in vitro* de difusão.

Haigh e colaboradores (1998) avaliaram a difusão de progesterona em membranas de muda de pele de cobra de 3 espécies, *Python sebae natalensis*, *Naja melanoleuca* e *Bitis nasicornis*, verificando diferenças nos experimentos de acordo com a espécie e o local do corpo onde as membranas foram obtidas.

Kang, Jun e McCall (2000) avaliaram o efeito da associação de terpenos (mentol, timol e cineol) e propilenoglicol na absorção de lidocaína em células de difusão com membranas de muda de pele de cobra. Os autores observaram promoção da penetração nas soluções aquosas a 40% de propilenoglicol e também para as associações da lidocaína com mentol 50:50.

Wang e colaboradores (2003) avaliaram a liberação de tamsulosina a partir de sistemas transdérmicos de matrizes de polihidroxialcanoatos em células de difusão utilizando membranas de mudas de pele de cobra *Python reticulatus*.

Li e colaboradores (2002) avaliaram o efeito do pré-tratamento com soluções de propilenoglicol, sais de ácido láurico (tensoativo aniônico), brometo de dodecil-trimetilamônio (tensoativo catiônico) e éster de ácido láurico com polioxietileno (tensoativo não-iônico) seguido de iontoforese na penetração de r-apomorfina em células de difusão com membranas de muda de pele de cobra *Elaphe gluttata*. Os autores observaram maiores quantidades do fármaco após o pré-tratamento com tensoativo não-iônico, e menores quantidades com o catiônico, e todos os experimentos determinaram valores de fluxo duas vezes menores em relação aqueles obtidos com membranas de pele humana.

3.5.2.3.4 Humanas

As membranas de pele humana são obtidas de cadáveres, ou de cirurgias redutoras de abdômem ou de mamas. Nesses casos, os estudos podem ser denominados de *ex vivo*, já que a pele não sobrevive após extração, embora o armazenamento em meios de cultura nutritivos possa adiar e retardar sua degradação. Lopes e Kaneko (2000) citam o uso do meio M.E.M. ("Minimal Essential Medium") para o armazenamento das membranas de pele obtidas de cirurgia plástica, e afirmaram que esse meio pode manter a viabilidade das mesmas por até 8 dias. Ostrenga e colaboradores (1971, 1974) utilizaram membranas de pele abdominal de cadáver, obtidas por autópsia, na avaliação da penetração de fluocinolona e acetonido de fluocinolona em géis de propilenoglicol e água.

FIGURA 16 -Fragmento de pele humana obtida de cirurgia redutora da mama

Somente a utilização de membranas obtidas de pele de origem humana não proporciona aos experimentos de difusão uma diminuição na variabilidade de resultados. Para tal, as membranas utilizadas devem ter

espessura controlada, em geral através do uso do dermatômetro, que fornece fatias de pele com valores uniformes. Além disso, a quantidade de pêlos, pigmentação, lesões ou alterações no tecido de pele a ser utilizada como membrana, deve ser observado, e apenas os locais mais homogêneos entre si devem ser utilizados.

3.5.2.3.5 Alteradas e reconstituídas

Em algumas situações especiais podem-se utilizar as membranas animais ou humanas alteradas. Quando não se deseja verificar a penetração através do estrato córneo íntegro, mas sim nas outras camadas da epiderme, pode-se utilizar membranas com essa camada retirada. Em outros casos, há necessidade de verificação da penetração apenas no estrato córneo, sendo assim desnecessária a presença das camadas mais inferiores. No primeiro caso, a pele pode ter o estrato córneo removido completamente através da aplicação de fitas adesivas, num total de aproximadamente 30 fitas. Já no segundo tipo de membrana, o estrato córneo pode ser removido por imersão em água a 60°C durante 1 minuto.

Yamashita e Hashida (1998), baseados na assertiva de que a penetração de substâncias na pele é um processo de difusão passivo que segue a lei da difusão de Fick, podendo ser assim quantificado matematicamente, desenvolveram um modelo *in vitro* para análise da difusão cutânea. Utilizaram uma pele constituída de um estrato córneo com porções polares e apolares, associado a uma camada viável, e um recurso matemático logarítmico denominado “rápida inversão do transformador de Laplace” para a análise dos resultados. Esses autores aplicaram várias substâncias no modelo proposto, entre elas o aciclovir, com variação quanto ao poder lipofílico, e também aplicaram substâncias promotoras de absorção como o 1-geranil-azacilclo-2-heptano, e nesse caso, observaram aumento na absorção, concluindo que este aumento foi ocasionado por um incremento do caminho não-polar de penetração epidérmica, que se tornou mais hidrofílico. Esses autores também desenvolveram um método *in vivo* de quantificação da

absorção epidérmica, através da comparação de valores de excreção urinária de substâncias aplicadas topicamente em relação a administração pela via endovenosa.

Roguet, Cohen e Leclaire (1995) e Roguet e colaboradores (1998) citaram um modelo de pele reconstituída, formado por uma derme substitutiva, constituída de bicamada isenta de células, e recoberta por uma camada de epiderme humana. Afirmaram também que esse modelo, denominado Episkin, pode ser utilizado em ensaios para avaliação de agentes químicos (atividades tóxicas ou protetoras da pele) e agentes físicos (radiação ultravioleta) e que apresenta a vantagem de evitar o uso animais.

Lopes e Kaneko (2000) citaram as membranas de pele reconstituída, formadas por células basais, suprabasais e estrato córneo (associados a uma camada de epiderme sem a derme) ou formadas por uma camada dérmica (com fibroblastos humanos) associada a uma camada epidérmica (com queratinócitos). Contudo, segundo os autores, essas membranas apresentam permeabilidade maior que a pele humana.

3.5.3 Estudos de difusão utilizando promotores de penetração

Os promotores de penetração podem ser avaliados através de estudos de pré-tratamento, quando são aplicados nas membranas em soluções de concentrações variadas, durante determinado período de tempo, sendo depois retirados e as soluções contendo os princípios ativos aplicadas. Esses ensaios proporcionam a seleção do melhor promotor, das concentrações mais eficazes e das condições experimentais adequadas. Em seguida, esses promotores são incluídos em formulações contendo os princípios ativos, e essas são submetidas aos ensaios de difusão nas mesmas condições experimentais.

Na literatura são citados vários estudos utilizando óleos vegetais, ácido oléico, terpenos e outras substâncias quanto ao poder de penetração, associados ou não a outros promotores (químicos ou físicos) e em sistemas de células de difusão diversos, utilizando vários tipos de membranas (animal,

humana, sintética) e em condições experimentais variadas (temperatura, agitação, tempo de pré-tratamento, coleta de amostras, duração).

Akimoto e Nagase (2003) avaliaram polímeros alquildisiloxanos como promotores de penetração para a antipirina (hidrofílica) e a indometacina (lipofílica) em membranas de pele abdominal de ratos, a 37°C, com pré-tratamento durante 12 horas.

Andega, Kanikkannan e Singh (2001) avaliaram a penetração de melatonina utilizando células de difusão com membranas de pele de porco (orelha) e humana, a 32°C, utilizando os álcoois graxos insaturados (oleílico, linoleílico e linolenílico) e saturados (octanol, nonanol, decanol, undecanol e álcool laurílico) na concentração de 5% em solução de água e etanol 40:60 como promotores. Entre os álcoois insaturados, os autores verificaram diminuição do efeito promotor com aumento da insaturação, com melhor atividade para o álcool linoleílico, e entre os saturados, o decanol foi mais eficaz.

Babu e Pandit (2004) estudaram as propriedades de ciclodextrinas como promotoras de penetração de bupranolol, em células de difusão com membranas de pele de rato, a 37°C, e detecção espectrofotométrica. Os autores observaram fluxo 1,7 vezes superior aos controles para os tratamentos com beta-ciclodextrina parcialmente metilada, na concentração de 10%.

Cotte e colaboradores (2004) avaliaram a penetração dos ácidos graxos mirístico (14 carbonos) e palmítico (16 carbonos) marcados radioativamente, em soluções com propilenoglicol, através de células de difusão com membranas de orelha de porco, a 37°C, e observaram maior penetração do ácido mirístico, e maior retenção no estrato córneo do ácido palmítico.

El-Kattan e colaboradores (2001) executaram estudos de difusão em células de Franz com membranas de pele de camudongo sem pêlo, com nicardipina, hidrocortisona, carbamazepina e tamoxifeno e os promotores fenchona, timol, d-limoneno e nerolidol (todos da classe dos terpenos). Os autores verificaram maior efeito promotor para o nerolidol e menor efeito para fenchona. Escribano e colaboradores (2003) verificaram maior efeito promotor

de penetração em soluções e emulsões contendo 5% de d-limoneno em estudos utilizando células de difusão com membranas humanas obtidas de cirurgia plástica.

3.6 TENDÊNCIA ATUAL DA COSMETOLOGIA

A cosmetologia, além de ter em vista a melhoria da qualidade estética da pele e seus anexos, passou a tratá-la, a fim de também prevenir e retardar o seu envelhecimento, e nesse sentido, estão sendo utilizadas substâncias como vitaminas (A, C, D e E), enzimas (catalase, peroxidase, superóxido dismutase), antioxidantes (butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol), proteínas hidrolisadas e complexos naturais e óleos extraídos de plantas, constituindo os biocosméticos (CORNWELL, et al., 1998). Estas substâncias se ligam ao oxigênio, competindo com os radicais livres com este substrato, e formando complexos muito menos reativos (LARSON, 1988).

Por outro lado, a cosmetologia passou a analisar também as características da pele onde os produtos são aplicados. A emulsão epicutânea, composta principalmente ácido graxos livres e triglicérides, passou a influir na escolha dos veículos, excipientes e princípios ativos, bem como a seleção de substâncias similares às aquelas encontradas na pele, preferindo-se aquelas de origem vegetal, surgindo daí os cosméticos eudérmicos (OLIVEIRA, et al., 1996) ou homólogos.

Os vegetais apresentam várias substâncias em sua composição, como vitaminas, flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis, alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos, carotenos (LARSON, 1988) além dos óleos (constituídos basicamente de álcoois e ácidos graxos, terpenos, triglicérides e uma fração insaponificável pequena) (OLIVEIRA, et al., 1996). O uso desses óleos vegetais com propriedades de promoção da penetração de substâncias na pele, em formulações tópicas de depigmentantes representa um fator favorável na garantia da eficácia do produto final.

4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias-primas

- Parafilm ®;
- Muda de pele de cobra cascavel *Crotalus durissus terrificus*;
- Ácido kójico (pureza de 99%) Lote 20020916 (GALENA, 2000);
- Óleo de copaíba (*Copaifera*) grau de pureza farmacêutico Lote 10304-0701 procedente da lonquímica;
- Óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) grau de pureza farmacêutico Lote 110480202 procedente da lonquímica contendo os ácidos graxos: palmítico 28%, esteárico 8,6%, oléico 49,8%, linoléico 10,2%, linolênico 2% e araquidílico 1%;
- Óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) grau de pureza farmacêutico Lote 01310202 contendo os ácidos graxos: decílico 6%, láurico 43,9%, mirístico 16,3%, palmítico 8,6%, esteárico 3,4%, oléico 13,6%;
- Água destilada;
- Propilenoglicol grau de pureza farmacêutico;
- Glicerina grau de pureza farmacêutico;
- Álcool isopropílico grau de pureza analítico;
- Cloreto de sódio grau de pureza analítico;
- Ácido cítrico grau de pureza farmacêutico;
- Oleato de decila (Cetiol ® V) grau de pureza farmacêutico;
- Cera autoemulsionante de álcool ceto-estearílico e tensoativo aniônico (Lanette N);
- Vaselina líquida grau de pureza farmacêutico;
- Trietanolamina grau de pureza farmacêutico;

4.1.2 Soluções e formulações

- Solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% p/v;
- Solução aquosa de ácido cítrico 10% p/v;
- Solução aquosa de ácido kójico 3,9% p/v;
- propilenoglicol 5% v/v em álcool isopropílico;
- Solução aquosa de álcool isopropílico 25% v/v ou 50% v/v adicionado de propilenoglicol 5% v/v;
- Solução de óleo de copaíba, de andiroba ou de babaçu 25% ou 50% v/v em álcool isopropílico e adicionado de propilenoglicol 5% v/v;
- Creme "lanette" – emulsão tipo óleo em água, preparada a partir de uma mistura de álcool estearílico e cetílico (autoemulsionante previamente adicionada de aproximadamente 10% de tensoativo emulsificante aniônico sulfatado), vaselina líquida, oleato de decila, glicerina e água destilada;
- Creme "lanette" adicionado de 50% ou 25% v/p dos óleos de copaíba, andiroba ou babaçu, e também 3,9% de ácido kójico p/p;
- Creme "lanette" adicionado de 50% ou 25% v/p de água destilada e também 3,9% p/p de ácido kójico ;
- Creme "lanette" adicionado de 50% ou 25% v/p dos óleos de copaíba, andiroba ou babaçu, e também 3,9% p/p de água destilada;

4.1.3 Equipamentos e materiais de laboratório

4.1.3.1 Sistema de células de difusão

Utilizou-se o sistema de células de difusão marca Logan modelo SDFC-6 VTC-200. Este sistema apresenta as partes: células de difusão verticais, com compartimento doador e receptor, base para apoio e agitação magnética e sistema de bombeamento e aquecimento de água, representado nas figuras 17 e 18.

FIGURA 17 -Células de difusão, garra metálica, anéis de silicone e suporte utilizados nos ensaios de difusão

As células de difusão utilizadas apresentam-se formadas por dois tubos de vidro de formato reto, com camisa dupla para aquecimento, acopláveis entre si através de dois anéis de silicone e sobre a membrana, que os separa fisicamente, e são mantidos fixos por uma garra de metal. Cada célula apresentou diâmetro de abertura superior de 2 cm, e capacidade para 15,0, 15,1 ou 15,2 mL, sendo essa variação de volume causada pelo processo de moldagem do vidro das células utilizado pelo fabricante.

O tubo de vidro reto transparente, de aproximadamente 3 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro de abertura em seu orifício principal, representa o compartimento doador, onde as amostras são colocadas. O outro tubo de vidro tem o comprimento de aproximadamente 10 cm na sua porção reta, também com diâmetro de 2 cm no orifício principal, e apresenta outro tubo conectado como uma peça única, a partir de 6 cm sua base, com inclinação de aproximadamente 45 graus a partir do orifício principal, comprimento de 7 cm e diâmetro de 1 cm. Esse último representa o compartimento coletor, e o tubo conectado inclinado representa o ducto

coletor, por onde são retiradas as alíquotas para se avaliar a quantidade da substância que atravessou a membrana. Na parte interna e inferior do compartimento coletor existe um espaço para o movimento de um agitador magnético, de aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro. O compartimento coletor é formado por uma camisa dupla de vidro, e apresenta assim duas conexões, localizadas posteriormente ao ducto coletor, que devem ser ligadas ao sistema de bombeamento e aquecimento.

FIGURA 18 - Sistema de células de difusão marca Logan modelo SDFC-6
VTC-200 – vista lateral e frontal

A base de apoio e agitação magnética apresenta-se na forma de um retângulo com aproximadamente 50 cm de comprimento, 30 cm de profundidade e 20 cm de altura, e abriga no seu interior o sistema de agitação magnética. Na sua parte posterior apresenta uma elevação, por onde se encontram os orifícios para conexão dos ductos de circulação de água para aquecimento, provenientes da bomba. Em sua superfície encontram-se três locais para encaixe do compartimento receptor das células de difusão, compostos por um sistema de garras fixadas na base através de dois parafusos. Todo esse sistema de encaixe foi devidamente limpo antes de cada experimento ser efetuado.

O sistema de bombeamento é formado por um reservatório de material transparente, com capacidade para 1400 mL de água, conectado a um sistema de aquecimento elétrico, de temperatura ajustável, e em seguida a base de apoio. O líquido de manutenção da temperatura utilizada foi água destilada, que foi trocada do reservatório semanalmente.

4.1.3.2 Materiais diversos

- Anéis de silicone de 2 cm de diâmetro interno e 4,7 cm externo;
- Tesoura e pinça metálica;
- Banho de ultra-som marca Unique modelo Ultrasonic Cleaner;
- Micropipetas automáticas de volume ajustável de 1,0 até 0,1 mL, marca Gilson modelo Pipetman com ponteira adaptada;
- Seringas de 10 mL;
- Balança analítica marca Sartorius modelo BL-21OS e balança semi-analítica da marca Marti modelo AS5500 ;
- Espectrofotômetro marca Beckman-Coulter modelo DU-640;
- Cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico;
- Unidades filtrantes adaptadas para membranas filtrantes renováveis marca Millipore com 0,45 μm ;
- Agitador de tubos marca Phoenix modelo AP56;
- pHmetro marca Digimed modelo DM20;

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados foram definidos para os estudos de avaliação da difusão através das células verticais e os doseamentos por espectrofotometria no ultravioleta, dos ativos despigmentantes em solução aquosa ou em formulações. O método quantitativo foi submetido à validação, e os resultados obtidos com os ensaios de difusão foram submetidos a avaliação estatística.

4.2.1 Avaliação da difusão

Os estudos de avaliação da difusão foram efetuados pela aplicação de soluções saturadas do ácido kójico com pré-tratamento das membranas com soluções dos óleos, ou aplicação de formulações contendo o ácido kójico associado aos óleos, e em seguida a avaliação quantitativa de amostras, retiradas nos vários intervalos de tempo (COLIPA, 1999).

Os procedimentos foram desenvolvidos para se avaliar inicialmente o comportamento dos despigmentantes associados ou não aos óleos promotores de absorção, através de pré-tratamento, selecionando-se aqueles de maior poder de penetração, os quais foram incorporados em formulações cosméticas e novamente submetidos aos mesmos testes.

O método espectrofotométrico utilizado foi submetido aos testes de validação (LEITE, 2002; BRASIL, 2003; RIBANI, et al., 2004).

4.2.1.1 Preparo das soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se balança analítica, balões e pipetas volumétricas, pipetas graduadas, água destilada recentemente, e aplicando-se todas as normas das boas práticas laboratoriais. Todas as soluções foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas.

Foram preparadas as seguintes soluções: cloreto de sódio 0,9% p/v; propilenoglicol 5% v/v em álcool isopropílico; solução aquosa de álcool isopropílico 50% ou 75% v/v adicionado de 5% de propilenoglicol v/v; solução aquosa de ácido cítrico 10% p/v; solução aquosa de ácido kójico 3,9% p/v; solução de óleo de copaíba, de andiroba ou de babaçu 25% ou 50% v/v em álcool isopropílico adicionado de propilenoglicol 5% v/v.

4.2.1.1.1 Solução salina – Cloreto de Sódio 0,9% p/v

Pesou-se exatamente 9 g de cloreto de sódio, o qual foi transferido para um balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, e o volume foi completado com água destilada.

4.2.1.1.2 Álcool isopropílico com propilenoglicol 5% v/v

Transferiu-se para um tubo de ensaio de 10 mL, com auxílio de uma pipeta graduada de 10 mL e 1 mL, respectivamente, os volumes de 9,5 mL de álcool isopropílico e 0,5 mL de propilenoglicol. A solução foi homogeneizada com auxílio de um agitador de tubos durante 30 segundos. Essa solução foi utilizada para diluição dos óleos utilizados no pré-tratamento das membranas.

4.2.1.1.3 Ácido Cítrico 10% p/v

Pesou-se exatamente 10 g de ácido cítrico, o qual foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade, e o volume foi completado com água destilada.

4.2.1.1.4 Óleos de copaíba, andiroba ou babaçu 50% e 25% v/v

Para a preparação das soluções de óleos de copaíba, andiroba e babaçu, os mesmos foram transferidos dos frascos de estoque para um béquer de 100 mL de capacidade, e aquecidos em banho de água quente até 40°C, para completa fusão e homogeneização.

Com auxílio de uma pipeta graduada de 5 mL, transferiu-se uma alíquota de 5 mL do respectivo óleo, previamente fundido, para um tubo de ensaio de 20 mL de capacidade, onde adicionou-se também, com auxílio de pipeta graduada, uma alíquota de 5 mL de álcool isopropílico adicionado de 5% de propilenoglicol, preparado segundo o item 4.2.1.1.2, e procedeu-se a homogeneização com auxílio de um agitador de tubos. Esse procedimento foi repetido para cada um dos três óleos utilizados, obtendo-se ao final as concentrações de 50% dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu, identificadas conforme o item 4.2.1.1.7.

Para o preparo das soluções dos óleos na concentração de 25% v/v, transferiu-se uma alíquota de 2,5 mL do respectivo óleo, previamente fundido, com auxílio de pipeta graduada de 5 mL, para um tubo de ensaio de 20 mL de capacidade, onde adicionou-se também, com auxílio de pipeta graduada, o volume de 7,5 mL de álcool isopropílico adicionado de 5% de propilenoglicol, preparado segundo o item 4.2.1.1.2, e procedeu-se a homogeneização com auxílio de um agitador de tubos. Esse procedimento foi repetido para cada um dos três óleos utilizados, obtendo-se ao final as concentrações de 25% dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu, identificadas conforme o item 4.2.1.1.7.

4.2.1.1.5 Água em álcool isopropílico 50% e 75% v/v adicionado de propilenoglicol 5% v/v

Com auxílio de uma pipeta graduada de 5 mL, transferiu-se uma alíquota de 5 mL de água destilada, para um tubo de ensaio de 20 mL de

capacidade, onde adicionou-se também, com auxílio de pipeta graduada, uma alíquota de 5 mL de álcool isopropílico adicionado de 5% de propilenoglicol, preparado segundo o item 4.2.1.1.2, e procedeu-se a homogeneização com auxílio de um agitador de tubos. Obteve-se ao final uma solução de álcool isopropílico adicionado de propilenoglicol 5% v/v e água 50%, utilizada como controle ou branco para as soluções dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu a 50%, preparada conforme o item 4.2.1.1.4., identificadas conforme o item 4.2.1.1.7.

Para o preparo das soluções controle ou branco dos óleos nas concentração de 25%, transferiu-se uma alíquota de 2,5 mL de água destilada, com auxílio de pipeta graduada de 5 mL, para um tubo de ensaio de 20 mL de capacidade, onde adicionou-se também, com auxílio de pipeta graduada, o volume de 7,5 mL de álcool isopropílico adicionado de 5% de propilenoglicol, preparado segundo o item 4.2.1.1.2, e procedeu-se a homogeneização com auxílio de um agitador de tubos. Obteve-se ao final uma solução controle ou branco para as concentrações de 25% dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu, preparadas conforme o item 4.2.1.1.4, composta de álcool isopropílico adicionado de propilenoglicol 5% e água 25%, identificadas conforme o item 4.2.1.1.7.

4.2.1.1.6 Solução saturada de ácido kójico 3,9% p/v

Pesou-se exatamente 1,95 g de ácido kójico e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se aproximadamente o volume de 45 mL de água destilada, e submeteu-se a solução ao banho de ultra-som durante 15 minutos. Após verificar-se completa solubilização do despigmentante, completou-se o volume com água destilada, obtendo-se assim uma solução de ácido kójico 3,9% p/v, identificada conforme o item 4.2.1.1.7.

4.2.1.1.7 Identificação das soluções para pré-tratamento, dos despigmentantes e seus controles

As soluções de óleos e do despigmentante utilizadas nos ensaios de pré-tratamento e os respectivos controles foram identificados conforme descrito nas tabelas 5 e 6.

TABELA 5 - Composição em porcentagem das soluções dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu utilizadas como pré-tratamento das membranas e seus controles

Código	Álcool Isopropílico + 5% v/v propilenoglicol	Óleo		Água destilada
	(% v/v)	Nome	(% v/v)	(% v/v)
P1A	50	—	—	50
P2A	50	copaíba	50	—
P3A	50	andiroba	50	—
P4A	50	babaçu	50	—
P1B	75	—	—	25
P2B	75	copaíba	25	—
P3B	75	andiroba	25	—
P4B	75	babaçu	25	—

TABELA 6 - Soluções do despigmentante utilizadas nos ensaios de pré-tratamento das membranas e seu controle

Código	Composição
SS	Solução salina
SAK	Ácido kójico 3,9% p/v em água destilada

4.2.1.2 Preparo das Formulações

Após os testes de pré-tratamento, selecionou-se o óleo de copaíba, para ser incorporado num veículo emulsionado comum em farmácias de manipulação, o creme “lanette”. Esse creme foi preparado isoladamente e depois foi adicionado ou não do ácido kójico ou dos óleos em estudo.

Para o preparo das formulações, procedeu-se às técnicas comumente empregadas para esse fim nas farmácias de manipulação, e utilizaram-se também os mesmos materiais. Nas etapas de pesagem foi utilizada a balança semi-analítica. Os óleos de copaíba, andiroba e babaçu, foram transferidos dos frascos de estoque para um béquer de 100 mL de capacidade, e aquecidos em banho de água quente até 40°C, para completa fusão e homogeneização.

Para as formulações preparadas com óleos nas concentrações de 50%, prepararam-se doze lotes de 50 g, acondicionados em frascos de vidro âmbar de 60 mL, distribuídos da seguinte maneira: quatro deles contendo creme “lanette” adicionados dos óleos a 50% v/p, separadamente, e mais o ácido kójico, quatro com os mesmos óleos adicionados de água ao invés de despigmentante e mais quatro contendo água ao invés dos óleos e mais o despigmentante. Essa mesma disposição foi obtida para os óleos nas concentrações de 25%. No final, obteve-se um total de vinte e quatro frascos de 50 g. Cada trio de formulação, isto é, contendo óleo e despigmentante e os controles para o óleo e para o despigmentante, foi preparado no mesmo dia em que seriam utilizados nos estudos de difusão.

4.2.1.2.1 Creme “lanette”

Essa formulação foi utilizada para veicular o princípio ativo despigmentante a 3,9% p/p ou água destilada (como controle ou branco) e também os óleos de copaíba, andiroba e babaçu nas concentrações de 50 e 25% v/p ou água destilada, nessas mesmas concentrações (como controle ou

branco), Como esses estudos foram efetuados em quatuplicata, prepararam-se quatro formulações para cada concentração de óleo avaliada, isto é, 25 ou 50%, adicionadas posteriormente de óleo e despigmentante, água e despigmentante ou óleo e água.

Em um béquer de 200 mL pesou-se 14 g de oleato de decila, 14 g de vaselina líquida e 24 g de cera lanette N, que denominado fase óleo. Em outro béquer de 200 mL, pesou-se 14 g de glicerina e 134 g de água destilada, que foi identificado como fase água. Aqueceram-se as duas misturas em chapa de amianto e fogareiro, com homogeneização constante por auxílio de bastões de vidro. Quando se atingiu 75°C, verteu-se o béquer contendo a fase água sobre aquele contendo a fase óleo, de maneira contínua e com a homogeneização do sistema, que foi mantida em seguida até a mistura atingir a temperatura ambiente. Obteve-se assim aproximadamente 200 g de um creme aniônico sem adição de sistema conservante, quantidade suficiente para o preparo dos trios de formulação, isto é, 50 g contendo óleo e despigmentante e 50 g dos controles para o óleo e para o despigmentante. O restante de creme que não foi utilizado foi descartado como lixo químico.

Ao final dos experimentos, foram preparados oito lotes desse creme, sendo quatro para os óleos de copaíba, andiroba e babaçu a 50% v/p e seus controles (doze formulações de 50 g), e quatro para esses óleos na concentração de 25% v/p e seus controles (doze formulações de 50 g).

4.2.1.2.2 Incorporação dos óleos a 25% ou 50% v/p e do ativo despigmentante 3,9% p/p

Em um gral de porcelana de 250 mL, pesou-se 1,95 g de ácido kójico e adicionou-se 25 mL do óleo aquecido (copaíba, andiroba ou babaçu). Com auxílio do pistilo de porcelana, procedeu-se a homogeneização e dispersão dessa mistura. Em seguida, adicionou-se creme "lanette" em quantidade suficiente para se completar 50 g, e procedeu-se a homogeneização, com auxílio do pistilo. Em seguida o creme obtido foi acondicionado em frasco de vidro âmbar de 60 mL e tampa de rosca e identificado com o nome do óleo

utilizado, a concentração de 50% e o ativo despigmentante, conforme item 4.2.1.2.5.

Esses procedimentos, repetidos para os óleos de copaíba, andiroba e babaçu, separadamente, foram efetuados observando-se o dia em que seriam utilizados nos estudos de difusão, juntamente com as formulações controle correspondentes.

Para o preparo das formulações contendo despigmentante e 25% v/v dos óleos em estudo, seguiu-se o mesmo procedimento anterior, mas utilizando-se 12,5 mL dos óleos aquecidos.

4.2.1.2.3 Incorporação dos controles para os óleos

Seguindo-se a mesma técnica descrita no item 4.2.1.2.2, utilizando-se água aquecida em banho de água quente até 40°C e ao invés dos óleos, mas nas mesmas quantidades de 25 mL, preparou-se 50 g de creme com despigmentante, que foi acondicionado em frasco de vidro âmbar de 60 mL e tampa de rosca e identificado com o nome controle, o nome do óleo que estava substituindo e o ativo despigmentante, conforme item 4.2.1.2.5.

Para cada óleo utilizado e nas duas concentrações utilizadas, preparou-se um controle equivalente, sempre no mesmo momento do preparo das formulações desse óleos para os estudos de difusão.

4.2.1.2.4 Incorporação dos controles para o despigmentante

Seguindo-se a mesma técnica descrita no item 4.2.1.2.2, substituindo-se o ácido kójico por igual quantidade de água destilada, isto é, 1,95 g, preparou-se 50 g de creme, para cada um dos três óleos utilizados e nas duas concentrações. O pH dessas formulações foi ajustado para o mesmo valor daquelas contendo o ácido kójico, com auxílio da solução de ácido cítrico preparada conforme o item 4.2.1.1.3. As formulações foram acondicionadas

em frascos de vidro âmbar de 60 mL e tampa de rosca e identificadas com o nome controle, o nome do óleo e o ativo despigmentante que foi substituído, conforme item 4.2.1.2.5.

Procedeu-se a preparação desses controles para cada óleo utilizado e nas duas concentrações, sempre no mesmo momento do preparo das formulações a serem submetidas aos estudos de difusão.

4.2.1.2.5 Identificação das formulações utilizadas e seus controles

As formulações utilizadas do óleo de copaíba e seus controles foram identificados pelos códigos descritos na tabela 7.

TABELA 7 - Formulações preparadas e seus controles

Código	Promotor ou Ativo (% v/p ou p/p)			Função
	Óleo de Copaíba	Água	Ácido Kójico	
F1A	50	—	3,9	Formulação
F1B	—	50	3,9	Controle do óleo
F1C	50	3,9	—	Controle do despigmentante
F2A	25	—	3,9	Formulação
F2B	—	25	3,9	Controle do óleo
F2C	25	3,9	—	Controle do despigmentante

4.2.1.2.6 Determinação do pH

Pesou-se 2,0 g das formulações ou seus controles em tubos de ensaio de 30mL, adicionou-se 18 mL de água destilada previamente neutralizada (pH = 7,0) com trietanolamina, e procedeu-se à homogeneização por 2 minutos com auxílio de agitador de tubos Phoenix. As dispersões obtidas foram

submetidas a determinação de pH através da inserção direta do eletrodo de pHmetro digital.

4.2.1.3 Montagem do sistema de células de difusão

4.2.1.3.1 Montagem do sistema marca Logan modelo SDFC-6

As células de difusão foram dispostas nos suportes instalados na base de apoio, obedecendo-se sempre a ordem: aquela com volume de 15,0 mL (no compartimento receptor) à esquerda, de 15,1 mL no centro e de 15,2 mL à direita. Em seguida, foram conectados os ductos e acionado o sistema de circulação. Os compartimentos receptores dessas células foram parcialmente preenchidos com fluido receptor, as barras magnéticas para agitação foram introduzidas, e procedeu-se ao preparo, formatação e instalação das membranas.

4.2.1.3.2 Obtenção, preparo e armazenamento das mudas de pele de cobra

As membranas foram preparadas a partir de mudas de pele de cobra cascavel *Crotalus durissus terrificus*.

As mudas de pele de cobra utilizadas, foram coletadas do viveiro desses animais, semanalmente, do instituto Butantan, e desse modo, se apresentavam inicialmente no formato do corpo desses animais, com diferenças em relação às partes ventral e dorsal, e secas ou levemente umedecidas. A região ventral, composta de regiões de escamas associadas entre si por uma região mais flexível, foi a selecionada para ser utilizada nos experimentos.

Procedeu-se inicialmente à limpeza das mudas de pele, através da separação com auxílio de uma tesoura da parte ventral, e banho em água destilada. A parte dorsal das mudas de pele foi descartada adequadamente

em lixo biológico. A seguir, os últimos 10 cm da parte ventral, próximas à cabeça e ao chocalho, foram também descartados. O restante da muda de pele foi então cortado em vários pedaços, equivalentes a 12 regiões duras (escamas) e moles (flexíveis) consecutivas. Além disso, esses foram avaliados quanto à ausência de buracos, falhas, partes aderidas ou regiões de descontinuidade. Esse cuidado foi necessário para a obtenção de membranas contínuas e resistentes. Os pedaços que apresentavam essas avarias foram descartados e aqueles selecionados foram divididos posteriormente em três outros.

As porções selecionadas das mudas de pele foram limpas através de imersão e agitação manual em água destilada. Essas porções foram armazenadas num béquer contendo 200 mL de água destilada, em quantidade máxima de 5 pedaços, à temperatura ambiente, até o momento do uso. A água foi trocada diariamente. Esses pedaços selecionados foram utilizados após 48 horas de hidratação, e armazenados no máximo por 4 dias consecutivos.

FIGURA 19 - Pedacos da parte ventral de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*

Cada muda de pele de cobra foi utilizada para se avaliar o mesmo óleo promotor e seus controles nas mesmas concentrações, no caso dos ensaios de pré-tratamento, ou da mesma formulação e seus controles, também nas mesmas concentrações, dentro de cada experimento. Sendo assim, o

comprimento das mudas selecionadas foi suficiente para a obtenção de pelo menos doze unidades de escamas unidas íntegras, divididas em três pedaços com quatro unidades de escama, conforme pode-se observar na figura 10.

4.2.1.3.3 Formatação das membranas e colocação nas células de difusão

No momento da realização dos experimentos de difusão, os fragmentos de doze unidades de escama das mudas de pele de cobra foram retirados da água destilada, divididos em três pedaços, com auxílio de uma tesoura, formados por quatro unidades de escama cada (figura 10). Cada pedaço foi seco em papel absorvente, e em seguida foram cortadas novamente, com auxílio de uma tesoura, num tamanho suficiente para fixação e cobertura da borda total do orifício do compartimento receptor das células de difusão, com aproximadamente 3,7 cm de diâmetro externo, com cuidado de manter-se uma margem de segurança para se evitar a retração e formação de dobras de membrana nos orifícios. Cada membrana ficou em formato de retângulo ou quadrado, com aproximadamente 4 cm de lado, e formada por quatro regiões duras (escamas) e três regiões flexíveis.

4.2.1.3.4 Instalação das membranas nas células de difusão e estabilização do sistema

Esta etapa seguiu após a formatação das membranas a partir das mudas de pele de cobra e da montagem do sistema de células de difusão.

Para perfeita aderência das membranas nas células de difusão, utilizaram-se anéis de silicone, de 3,7 cm de diâmetro de borda externa, 2 cm de diâmetro no orifício interno e espessura de 0,2 cm. Os anéis foram posicionados contendo a membrana em seu interior, e em contato com as superfícies de vidro dos compartimentos doador e receptor. O anel de silicone posicionado sobre a membrana contribuiu com aumento de 0,5 mL no volume do fluido receptor de solução salina, após preenchimento do compartimento

receptor. Desse modo, as células de 15,0, 15,1 e 15,2 mL, descritas no item 4.2.1.3.1, passaram a apresentar capacidade para volumes de 15,5, 15,6 e 15,7 mL de fluido receptor, respectivamente. Esses valores foram considerados para os cálculos, conforme o item 4.2.1.6.

Inicialmente, com as células instaladas nos suportes e os ductos de banho de água das camisas duplas conectados, posicionou-se um anel de silicone sobre a borda do compartimento receptor de cada célula, com cuidado e se orientando pelo orifício central de 2 cm de diâmetro. Em seguida, esse compartimentos foram completamente preenchidos com solução salina, preparada conforme o item 4.2.1.1.1 e previamente aquecida à temperatura de 34°C, com cuidado para se formar um menisco convexo na altura das bordas do anel de silicone, e também para se evitar a formação de bolhas de ar na solução adicionada. Nesse momento o sistema de aquecimento através de camisa dupla das células de difusão foi acionado, com a temperatura ajustada para 34°C.

Em seguida, a membrana previamente formatada foi posicionada com as escamas em sentido vertical em relação ao ducto coletor numa das células verticais de difusão, e depositada suavemente sobre o menisco, com a parte equivalente à camada interna das mudas de pele em contato com a solução salina, com cuidado para se evitar a formação de bolhas de ar. Além disso, a membrana foi direcionada de modo a apresentar uma região de escama no centro do orifício do compartimento receptor, e duas regiões flexíveis próximas às bordas. Em seguida, posicionou-se o outro disco de silicone sobre a mesma, e colocou-se o compartimento doador sobre esse disco. Fez-se uma leve pressão sobre o compartimento doador, secando-se o excesso de solução salina presente nas laterais da membrana, e fixou-se todo o sistema com auxílio da garra metálica. Esse passo foi repetido para as outras duas células restantes, começando-se sempre por aquela mais próxima da esquerda do equipamento.

Antes do início dos ensaios de difusão propriamente ditos, para estabilização do sistema, adicionou-se 0,8 mL da mesma solução salina à temperatura de 34°C sobre as membranas no compartimento doador, com

auxílio de uma micropipeta automática, e o compartimento doador foi recoberto com uma fita de Parafilm®. Após 30 minutos, essa solução foi retirada com auxílio de tiras de algodão absorvente, depositadas suavemente.

4.2.1.4 Execução dos ensaios de difusão

Os experimentos iniciais foram executados utilizando-se o pré-tratamento da membrana com os óleos. Esses experimentos foram identificados como 1, 2 e 3 para os óleos de copaíba, andiroba e babaçu na concentração de 50% v/v, e 4, 5 e 6, para esses mesmos óleos na concentração de 25% v/v, respectivamente.

Após seleção do óleo mais efetivo, esse foi veiculado em formulações associado ao despigmentante em estudo. Esses experimentos foram identificados como 7 e 8, para as concentrações de 50 e 25% v/p, respectivamente.

Para cada experimento foram efetuadas quatro réplicas.

4.2.1.4.1 Pré-tratamento das membranas com óleos

Após a montagem e estabilização do sistema, conforme item 4.2.1.3, e retirada da solução salina do compartimento doador, seguiu-se o pré-tratamento das membranas, com as soluções dos óleos ou seus controles, preparados conforme o item 4.2.1.1.4 e 4.2.1.1.5, respectivamente.

Nas células de volumes de 15,0 mL e 15,2 mL, aplicou-se 0,8 mL da solução do óleo (SOC). A terceira célula, com volume de 15,1 mL, recebeu 0,8 mL de solução salina (SS), preparada conforme o item 4.2.1.1.1. O pré-tratamento foi mantido durante 1 hora, quando as soluções foram então retiradas com auxílio de tiras de algodão absorvente aplicadas suavemente, e foram enxaguadas com três porções de 0,8 mL de água destilada, retiradas alternadamente com as tiras de algodão. Em seguida, a primeira célula recebeu 0,8 mL de solução salina (SS), representando o controle ou branco.

As células restantes, uma submetida a pré-tratamento com óleo e a outra apenas com solução salina receberam 0,8 mL da solução saturada de ácido kójico (SAK), equivalente a solução aquosa a 3,9% p/v, preparada segundo o item 4.2.1.1.6, identificando-se o intervalo de tempo zero.

Todas as três células foram submetidas às mesmas condições experimentais de temperatura de 34°C e agitação de 100 rpm, e o experimento seguiu até o tempo de 22,5 horas, com retiradas de alíquotas e reposição de volumes do compartimento receptor nos intervalos de tempos 0, 1,5, 3,0, 4,5, 6,0, 7,5, 9,0, 10,5, 12,0, e 22,5 horas, conforme item 4.2.1.4.3. Apenas para os experimentos com óleo de copaíba 50%, utilizou-se o tempo final como 13,5 horas, ao invés de 22,5.

Os pré-tratamentos, as soluções dos óleos, as amostras aplicadas e suas funções nesses experimentos estão listadas na tabela 8.

TABELA 8 -Identificação dos ensaios de pré-tratamento com os óleos de copaíba, andiroba e babaçu efetuados nas membranas, seus controles (n=4) e suas funções

Experimento	Pré-tratamento	Amostra	Função
1	P2A	SS	branco
	P1A	SAK	água 50% v/v promotor
	P2A	SAK	copaíba 50% v/v promotor
2	P3A	SS	branco
	P1A	SAK	água 50% v/v promotor
	P3A	SAK	andiroba 50% v/v promotor
3	P4A	SS	branco
	P1A	SAK	água 50% v/v promotor
	P4A	SAK	babaçu 50% v/v promotor
4	P2B	SS	branco
	P1B	SAK	água 25% v/v promotor
	P2B	SAK	copaíba 25% v/v promotor
5	P3B	SS	branco
	P1B	SAK	água 25% v/v promotor
	P3B	SAK	andiroba 25% v/v promotor
6	P4B	SS	branco
	P1B	SAK	água 25% v/v promotor
	P4B	SAK	babaçu 25% v/v promotor

SS = solução salina, SAK = solução de ácido kójico 3,9% p/v

4.2.1.4.2 Avaliação das formulações dos despigmentantes

Após a montagem e estabilização do sistema, conforme item 4.2.1.3, procedeu-se a retirada da solução salina do compartimento doador, com auxílio de tiras de algodão, e seguiu-se a aplicação das formulações, preparadas conforme o item 4.2.1.2.

Para cada experimento, as formulações, armazenadas em frascos de vidro âmbar, foram submetidas ao aquecimento até 40°C, em banho de água quente, antes da aplicação das mesmas no compartimento receptor das células, que foi efetuada com auxílio de pipetas graduadas de 2 mL, e observando-se o espalhamento homogêneo e uniforme sobre as membranas.

A célula, com capacidade para 15,0 mL de fluido receptor, recebeu no compartimento doador o volume de 1,0 mL da formulação contendo óleo e água destilada (controle), a outra célula, com capacidade de 15,1 mL, recebeu o mesmo volume da formulação contendo água destilada e o ácido kójico e a terceira célula, com capacidade de 15,2 mL, recebeu 1,0 mL da formulação contendo óleo e o despigmentante no compartimento doador.

Todas as três células foram submetidas às mesmas condições experimentais de temperatura de 34°C e agitação de 100 rpm, e o experimento seguiu até o tempo de 22,5 horas, com retiradas de alíquotas e reposição de volumes do compartimento receptor nos intervalos de tempos 0, 1,5, 3,0, 4,5, 6,0, 7,5, 9,0, 10,5, 12,0, e 22,5 horas, conforme item 4.2.1.4.3.

As formulações aplicadas, composição e suas funções nesses experimentos estão listadas na tabela 9.

TABELA 9 - Identificação dos experimentos de difusão das formulações de óleo de copaíba, seus controles (n=4) e suas funções

Experimento	Formulação	Ativo	Função
7	F1C	AD	branco
	F1B	AK	água 50% promotor
	F1A	AK	copaíba 50% promotor
8	F2C	AD	branco
	F2B	AK	água 25% promotor
	F2A	AK	copaíba 25% promotor

AD = água destilada 3,9% p/p, AK = ácido kójico 3,9% p/p

4.2.1.4.3 Retirada, diluição e armazenamento das alíquotas do fluido receptor

Alíquotas de 500 μ L foram retiradas do compartimento receptor das células de difusão, com auxílio de micropipeta de 1000 μ L e ponteira adaptada (através da inclusão de um capilar de plástico flexível de 10 cm), que foi introduzido no ducto coletor e retiradas amostras da região central da célula, acima do agitador. Imediatamente após a retirada dessa alíquota, novo volume de solução salina, à mesma temperatura de 34°C, foi devolvido ao compartimento receptor, com auxílio da mesma micropipeta mas com outra ponteira adaptada. Em cada intervalo de coleta de alíquota (e reposição do fluido receptor), foram utilizadas duas ponteiras adaptadas para cada célula.

As alíquotas retiradas foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 10 mL, e os volumes foram completados com solução salina. Após homogeneização das soluções, estas foram retiradas e acondicionadas com auxílio de seringa de plástico de 10 mL de capacidade, adequadamente identificadas e armazenadas em geladeira, até o momento da análise. Após a quantificação espectrofotométrica, com os valores obtidos, procedeu-se ao cálculo dos parâmetros de difusão. Durante essa etapa, procedeu-se também

ao preenchimento de um balão volumétrico de 10 mL com solução salina, que foi também armazenada em geladeira na seringa de 10 mL, representando a solução branco para leitura no espectrofotômetro.

4.2.1.5 Quantificação espectrofotométrica das amostras

Utilizou-se o método de detecção da absorção da radiação ultravioleta adaptado do trabalho de Majmudar e colaboradores (1998), os quais utilizaram separação prévia por cromatografia líquida de alta eficiência. O espectrofotômetro utilizado foi da marca Beckman-Coulter modelo DU-640, com indicação de quatro casas decimais após a vírgula para os valores de absorbância.

As soluções obtidas a partir das alíquotas de 0,5 mL retiradas nos vários intervalos de tempo e diluídas para 10 mL, acondicionadas em seringas de plástico, conforme item 4.2.1.4.3, foram retiradas da geladeira onde estavam armazenadas, e deixadas à temperatura ambiente por 2 horas.

Decorrido esse intervalo de tempo, as seringas foram acopladas às unidades filtrantes, com membranas de 0,45 μm de porosidade, e foram agrupadas em relação à composição e em ordem crescente de intervalo de tempo, correspondente à ordem crescente de concentração.

Em todas as análises, os filtros foram inicialmente lavados, através da passagem de 1 mL da amostra ou branco, contidos nas seringas. A cubeta também foi lavada, com auxílio da tampa de plástico, inicialmente com 3 porções de solução salina, e em seguida com duas porções consecutivas equivalentes a 1 mL da amostra ou branco, gotejadas diretamente da seringa acoplada ao filtro. Procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 268 nm, utilizando-se como branco a solução preparada conforme o item 4.2.1.4.3.

4.2.1.6 Cálculos dos parâmetros de difusão

Os cálculos dos parâmetros da difusão compreendem a curva de liberação, a reta de regressão e sua equação, o coeficiente de correlação

(R^2), o “lagtime” ou tempo de latência, quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), fluxo J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) e permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$). Os parâmetros coeficiente de difusão D (cm^2/h) e de partição K (adimensional) não foram calculados porque dependem do conhecimento do valor da espessura das membranas utilizadas, as quais não foram determinadas devido às irregularidades presentes nas mudas de pele de cobra cascavel *Crotalus durissus terrificus*.

Antes dos cálculos dos parâmetros da difusão, é necessária a realização dos cálculos correspondentes às correções e conversões das concentrações detectadas espectrofotometricamente e as massas de ácido kójico presentes no fluido receptor das células de difusão, em relação aos vários intervalos de tempo de análise.

4.2.1.6.1 Quantidade liberada no fluido receptor e suas correções

As alíquotas quantificadas, segundo o item 4.2.1.5, correspondem às alíquotas 0,5 mL diluídas para 10 mL, e foram identificadas como concentrações C1. Para se calcular a massa de ácido kójico presente nessas alíquotas de 0,5 mL (M1) retiradas nos vários intervalos de tempo, procedeu-se à multiplicação do valor da concentração C1 (obtida espectrofotometricamente) por 10, obtendo-se o valor da massa em μg .

Com os valores das massas de ácido kójico presentes nas alíquotas de 0,5 mL retiradas (M1), calcularam-se as massas presentes nos fluidos receptores, isto é, os volumes de 15,6 e 15,7 mL, denominadas de massas $M2_t$, correspondentes aos volumes dos compartimentos receptores das células de difusão ajustados com os anéis de silicone, dispostas conforme o item 4.2.1.3.1, nos vários intervalos de tempo. Contudo, esses valores de massa não correspondem à realidade para os intervalos de tempo após o tempo inicial (tempo zero), já que não consideram as alíquotas de 0,5 mL retiradas nos tempos anteriores.

Sendo assim, para cada intervalo de tempo após o inicial, as massas de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL (M1) anteriormente detectadas foram

somadas, obtendo-se a massa M_3 , equivalente aos valores de ácido kójico retirados nos intervalos de tempo anteriores. Esses valores foram somados aos valores das massas M_{2t} , equivalentes à massa de ácido kójico presente nos volumes totais dos fluidos receptores, obtendo-se assim as massas corrigidas, referentes a quantidade liberada de ácido kójico nos fluidos receptores nos diversos intervalos de tempo (identificadas pela sigla QL_t).

Abaixo tem-se a tabela 10 com as identificações das equações, concentrações e massas utilizadas para o cálculo das quantidade liberadas de ácido kójico.

TABELA 10 - Identificação das concentrações, massas e equações utilizadas no cálculo da quantidade liberada de ácido kójico nos vários intervalos de tempo

	Sigla e Significado	Equação de cálculo
C_1	Concentração na solução obtida da alíquota retirada diluída para 10 mL ($\mu\text{g/mL}$)	Reta de Calibração
M_1	Massa de ácido kójico (μg) da alíquota de 0,5 mL retirada no vários intervalos de tempo	$M_1 = C_1 \times 10$
M_{2t}	Massa de ácido kójico (μg) no volume (15,6 ou 15,7 mL) do compartimento receptor no intervalo de tempo t	$M_{2t} = (M_1 \times V) / 0,5$
M_3	Somatória das massas de ácido kójico (μg) retiradas nas alíquotas de 0,5 mL (M_1) nos intervalos de tempo anteriores	$M_3 = \Sigma M_1$
QL_t	Quantidade liberada de ácido kójico (μg) no volume (15,6 ou 15,7 mL) no tempo t presente no compartimento receptor corrigido com a somatória das quantidades retiradas nos intervalos de tempo anteriores (M_3)	$QL_t = M_{2t} + M_3$

4.2.1.6.2 Parâmetros da difusão

Com os valores das quantidades liberadas (QL_t), para cada intervalo de tempo e experimento, e o valor da área das membranas, que foi constante e

igual a 3,14 cm², calcularam-se os valores de quantidade liberada por área (QLA_t), com unidade de µg/cm². Dividindo-se esse valor pelo tempo (T), calculou-se o valor do fluxo (J), em µg/cm²/h, conforme a equação 1 abaixo.

$$J = \frac{QLA_t}{T} \quad (1)$$

Construiu-se o gráfico da curva de liberação, com os dados de quantidade liberada por área (µg/cm²) representando o eixo y, e os intervalos de tempo de análise (horas) no eixo x. Dessa curva, através da regressão linear, obteve-se a reta de regressão dos pontos, o valor do coeficiente de correlação (R²) e a equação da reta. Além disso, o fluxo médio (J_{médio}) foi estimado com o coeficiente angular da reta obtida, e o tempo de latência (unidade de horas), também denominado “lagtime”, foi considerado como o valor do ponto de interseção da reta no eixo x (do tempo).

Os valores de permeabilidade (P) em cada intervalo de tempo foram calculados através da divisão do fluxo (J) (µg/cm²/h) obtido pela concentração aplicada (C) (µg/mL), e que foi de 3,9% p/v (39000 µg/mL) para todos os experimentos, conforme a equação 2 (NARISHETTY e PANCHAGNULA, 2004). A permeabilidade média (P_{média}) foi calculada pela mesma equação, a partir do valor de fluxo médio.

$$P = \frac{J}{C} \quad (2)$$

O fator de promoção (FP) foi calculado para cada experimento, através da relação entre os valores de fluxo médio (J_{médio amostra}) da solução de óleo ou formulação e seus controles (J_{médio controle}), conforme a equação 3.

$$FP = \frac{J_{\text{médio amostra}}}{J_{\text{médio controle}}} \quad (3)$$

4.2.1.7 Avaliação estatística dos resultados

Os valores médios e desvio-padrão de fluxo foram obtidos a partir das curvas de liberação de cada réplica dos mesmos para cada ensaio de pré-tratamento com as soluções dos óleos ou estudo de difusão com as formulações, citados no apêndice. Esses parâmetros foram submetidos à análise através dos testes F de Fischer, e t de Student, para análise de variância e das médias (BUSSAB e MORETTIN, 1985). Também foram calculados os coeficientes de variação.

Foram utilizadas as equações 4 (valor de F), 5 (valor de t) e 6 (desvio padrão combinado) a seguir, onde S^2_a e S^2_b correspondem às variâncias, S_{ab} ao desvio-padrão combinado, μ_a e μ_b às médias, n_a e n_b ao número de réplicas. Os valores tabelados de F e t foram obtidos da literatura.

$$F = \frac{S^2_a}{S^2_b} \quad (4)$$

$$t = \frac{|\mu_a - \mu_b|}{S_{ab} (1/n_a + 1/n_b)^{1/2}} \quad (5)$$

$$S_{ab} = \left(\frac{(n_a - 1) S^2_a + (n_b - 1) S^2_b}{(n_a + n_b - 2)} \right)^{1/2} \quad (6)$$

A análise estatística não foi efetuada para a permeabilidade média porque esse parâmetro foi obtido a partir dos valores de fluxo, apresentando portanto as mesmas variâncias e desvio-padrão.

4.2.2 Validação do método espectrofotométrico

Foi efetuada a validação do método espectrofotométrico utilizado para solução saturada de ácido kójico, como também para as formulações magistrais com esse ativo. Procedeu-se a obtenção da curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão, conforme estipulado na Farmacopéia Americana XXVI (UNITED States Pharmacopeia, 2003) e complementado em outras referências (LEITE, 2002; BRASIL, 2003; RIBANI, et al., 2004).

4.2.2.1 Seleção do comprimento de onda da radiação ultravioleta

Pesou-se exatamente 0,0500 g de ácido kójico em balança analítica, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com solução salina, obtendo-se solução de 1 mg/mL. Retirou-se, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 1 mL dessa solução, que foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, e o volume completado com solução salina, preparada conforme o item 4.2.1.1.1, obtendo-se uma solução de 10 µg/mL. Alíquota de 10 mL foi filtrada utilizando seringa plástica acoplada a unidade filtrante com membrana de 0,45 µm.

Com a solução salina, efetuou-se a leitura do branco no espectrofotômetro, sendo a cubeta enxaguada duas vezes com essa solução, preenchida completamente, com cuidado para se evitar a formação de bolhas de ar, e fechada com a tampa plástica.

A cubeta foi então preenchida completamente com a solução do despigmentante e colocada para leitura no espectrofotômetro. Em seguida, com auxílio do sistema operacional do espectrofotômetro, efetuou-se uma

varredura de onda ultravioleta nas faixas compreendidas entre 200 a 350 nm na solução preparada, com a finalidade de se verificar aquela em que se obtém maior absorbância.

4.2.2.2 Curva de Calibração

Pesou-se exatamente 0,0500 g de ácido kójico, em um balão volumétrico de 50 mL, e o volume foi completado com solução salina, obtendo-se solução de concentração de 1 mg/mL, identificada como solução S1. Dessa solução, transferiram-se as alíquotas de 5 e 1 mL, para balões volumétricos de 50 e 100 mL, e os volumes foram completados com solução salina, obtendo-se as soluções de concentração de 100 e 10 µg/mL, respectivamente, e identificadas como S2 e S3. A partir dessas três soluções, prepararam-se outras, de 4 µg/mL a 0,05 µg/mL (identificadas como S4 a S16), às quais foram submetidas a espectrofotometria em 268 nm, destinadas a construção da curva de calibração. O experimento foi efetuado utilizando-se 6 réplicas para cada concentração de solução utilizada. Na tabela 11 encontra-se a descrição dessas soluções preparadas e das soluções utilizadas.

Com a curva de calibração, determinou-se a equação da reta, o valor do coeficiente de correlação linear e o desvio padrão.

TABELA 11 - Composição e identificação das soluções utilizadas para construção da curva de calibração do ácido kójico

Sol	Composição	Volume Final (mL)	Concentração por mL (µg)
S1	0,050 g ácido kójico	50	1000
S2	5 mL S1	50	100
S3	1 mL S1	100	10
S4	4 mL S2	100	4,00
S5	1 mL S2	50	2,00
S6	1 mL S2 + 8 mL S3	100	1,80
S7	1 mL S2 + 6 mL S3	100	1,60
S8	1 mL S2 + 4 mL S3	100	1,40
S9	1 mL S2 + 2 mL S3	100	1,20
S10	1 mL S2	100	1,00
S11	4 mL S3	50	0,80
S12	3 mL S3	50	0,60
S13	2 mL S3	50	0,40
S14	1 mL S3	50	0,20
S15	1 mL S3	100	0,10
S16	1 mL S3	200	0,05

S = solução

4.2.2.3 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi calculado a partir dos valores de desvio padrão médio ($DP_{\text{médio}}$), obtidos da curva de calibração, conforme o item 4.2.2.2, e da inclinação (a) da reta de regressão ($y = ax + b$) com concentrações decrescentes de soluções dos ativos despigmentantes em análise, previamente conhecidas, até o menor valor detectável pelo método. Esse limite pode ser expresso pela equação 7, a seguir .

$$LD = \frac{DP_{\text{médio}} \times 3}{a} \quad (7)$$

4.2.2.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi calculado a partir da curva de calibração, obtida conforme o item 4.2.2.2, com concentrações decrescentes de soluções dos ativos despigmentantes em análise até o menor valor detectável pelo método, mas com precisão e exatidão pré-determinadas aceitáveis. O limite de quantificação foi calculado pela equação 8 abaixo, a partir dos valores de desvio padrão médio ($DP_{\text{médio}}$), obtidos da curva de calibração, conforme o item 4.2.2.2, e da inclinação (a) da reta de regressão ($y = ax + b$).

$$LQ = \frac{DP_{\text{médio}} \times 10}{a} \quad (8)$$

4.2.2.5 Precisão

A precisão é a relação das medidas ao redor do valor médio, expressa pela porcentagem do coeficiente de variação ($CV\%$), e representa a concordância entre os resultados obtidos. Foi calculada pela equação 9, a partir dos valores de média ($Conc_{\text{média}}$) e desvio-padrão (DP) da concentração.

$$CV\% = \frac{DP \times 100}{Conc_{\text{média}}} \quad (9)$$

Para a obtenção dos valores para cálculo da concentração média foram efetuadas três determinações de três concentrações teóricas

(previamente definidas), alta, média e baixa, totalizando nove valores, com três réplicas para cada valor. Além disso, essas nove determinações foram efetuadas três vezes, sendo todas no mesmo dia e em dias diferentes, permitindo-se assim a análise das variações intra-dia e inter-dia, respectivamente. Os valores de concentração teórica utilizados foram de 2, 1 e 0,2 µg/mL, e essas soluções foram preparadas a partir de diluições equivalentes àsquelas utilizadas no preparo das soluções S5, S10 e S14 da curva de calibração, indicada no item 4.2.2.2.

4.2.2.6 Exatidão

A exatidão é determinada após estabelecida a linearidade da curva de resposta, o intervalo linear, o limite de variação (inter-dia e intra-dia) e a especificidade do método (BRASIL, 2003). Esse parâmetro expressa a relação entre as médias dos valores obtidos após a análise e o valor teórico da amostra. Para o cálculo das médias foram efetuadas três determinações de três concentrações (alta, média e baixa) totalizando nove valores, para cada ativo despigmentante analisado. As concentrações teóricas utilizadas foram equivalentes a 2, 1 e 0,2 µg/mL, preparadas conforme o item 4.2.2.2. A exatidão foi calculada pela equação 10.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Valor médio obtido} \times 100}{\text{Valor teórico}} \quad (10)$$

4.2.2.7 Análise estatística

Os valores médios de absorvância obtidos nas seis réplicas utilizadas na construção da curva de calibração foram submetidos a análise de variância pelos testes F (Fisher) e t (Student) (LEITE, 2000), conforme as equações descritas no item 4.2.1.7.

5

RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1 Seleção do comprimento de onda ultravioleta

Na figura 20 tem-se o gráfico do espectro de absorção da radiação ultravioleta efetuada na solução de ácido kójico 10 µg/mL em solução salina.

FIGURA 20 -Espectro de absorção da radiação ultravioleta na solução de ácido kójico 10 µg/mL em solução salina.

5.1.2 Curva de calibração

Na tabela 12 estão listados os valores de absorbância das soluções de ácido kójico (S4 a S16), preparadas conforme o item 4.2.2.2, nas seis réplicas avaliadas.

TABELA 12 - Absorbância, média e desvio-padrão das 6 réplicas das soluções de ácido kójico (S4 a S16) nas concentrações de 4,0 a 0,05 $\mu\text{g/mL}$ em solução salina, analisadas espectrofotometricamente em ultravioleta a 268 nm

Solução	Concentração µg/mL	Absorbância						Média	Desvio Padrão
		Réplicas							
		1	2	3	4	5	6		
S16	0,05	0,0030	0,0029	0,0031	0,0034	0,0032	0,0038	0,0032	0,0003
S15	0,10	0,0047	0,0042	0,0046	0,0056	0,0053	0,0054	0,0050	0,0005
S14	0,20	0,0103	0,0094	0,0097	0,0092	0,0107	0,0105	0,0100	0,0006
S13	0,40	0,0239	0,0235	0,0230	0,0214	0,0229	0,0233	0,0230	0,0009
S12	0,60	0,0344	0,0350	0,0351	0,0359	0,0342	0,0329	0,0346	0,0010
S11	0,80	0,0430	0,0450	0,0447	0,0433	0,0420	0,0444	0,0437	0,0012
S10	1,00	0,0543	0,0541	0,0581	0,0560	0,0555	0,0564	0,0557	0,0015
S9	1,20	0,0645	0,0674	0,0679	0,0665	0,0661	0,0664	0,0665	0,0012
S8	1,40	0,0767	0,0757	0,0784	0,0782	0,0769	0,0794	0,0776	0,0014
S7	1,60	0,0879	0,0900	0,0896	0,0900	0,0886	0,0914	0,0896	0,0012
S6	1,80	0,1000	0,1028	0,1002	0,0980	0,1017	0,1011	0,1006	0,0016
S5	2,00	0,1121	0,1100	0,1136	0,1147	0,1125	0,1103	0,1122	0,0018
S4	4,00	0,2282	0,2329	0,2353	0,2354	0,2350	0,2313	0,2330	0,0029

Com os dados da tabela 12, acima, construi-se a reta de calibração para o ácido kójico, ilustrada da figura 21.

FIGURA 21 -Reta de calibração obtida com os valores de absorbância das soluções S4 a S16, de ácido kójico nas concentrações de 0,05 a 4,0 µg/mL em solução salina, determinados em ultravioleta a 268 nm, onde x = concentração e y = absorbância

5.1.3 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados segundo a descrição do item 4.2.2.3 e 4.2.2.4, respectivamente, utilizando-se os dados da tabela 12 e a inclinação da reta de calibração (0,0579), descritos no item 5.1.2. O intervalo de concentrações utilizado foi de 0,20 a 1,00 µg/mL, com um total de 5 pontos, absorbância média de 0,0334 e desvio-padrão de 0,0010.

Os limites de detecção e de quantificação determinados para o experimento foram de 0,057 e 0,173 µg/mL, respectivamente.

5.1.4 Precisão

A precisão foi calculada com os dados referentes às variações intra-dia e inter-dia, através do cálculo do coeficiente de variação, preparadas conforme o item 4.2.2.5.

Abaixo tem-se a tabela 13, com os dados referentes a variação intra-dia, e os coeficientes de variação calculados.

TABELA 13 -Concentração, média, desvio-padrão e coeficiente de variação intradia (CV%) para o ácido kójico das soluções de concentrações teóricas de 2,0, 1,0 e 0,2 µg/mL, obtidas com nove réplicas, avaliadas em intervalos diferentes no mesmo dia

Réplica	Concentração (µg/mL)		
	Teórica		
	2,0	1,0	0,2
	Determinada		
1	1,9585	1,0311	0,2055
2	1,9655	1,0656	0,2090
3	1,8843	1,0311	0,1848
4	1,9223	0,9655	0,1986
5	2,0017	0,9862	0,1917
6	2,0294	0,9758	0,1779
7	1,9706	0,9983	0,1917
8	1,9862	1,0380	0,2055
9	1,9275	1,0190	0,2003
Média	1,9607	1,0123	0,1961
Desvio-padrão	0,0441	0,0329	0,0104
CV (%) Intradia	2,25	3,25	5,30

Segue a tabela 14, com os dados referentes a variação inter-dia, e os coeficientes de variação calculados.

TABELA 14 -Concentração, média, desvio-padrão e coeficiente de variação interdia (CV%) para o ácido kójico das soluções de concentrações teóricas de 2,0, 1,0 e 0,2 µg/mL, obtidas com nove réplicas, avaliadas em dias consecutivos

Réplica	Concentração (µg/mL)		
	Teórica		
	2,0	1,0	0,2
	Determinada		
1	1,8774	1,0138	0,1883
2	2,0086	1,0242	0,2176
3	1,8998	1,0121	0,1900
4	1,9534	0,9896	0,1865
5	1,9862	0,9879	0,1986
6	1,9810	0,9810	0,2090
7	1,9862	1,0035	0,1952
8	2,0449	1,0173	0,2003
9	1,9758	0,9862	0,2090
Média	1,9681	1,0017	0,1994
Desvio-padrão	0,0519	0,0159	0,0107
CV (%) Interdia	2,64	1,58	5,36

5.1.5 Exatidão

A exatidão do método espectrofotométrico foi calculada relacionando-se os valores das médias de absorbância e concentração detectadas, obtidas conforme item 5.1.4, referentes a variação intra-dia, com os valores teóricos. Na tabela 15, estão listados esses valores e aqueles referentes a exatidão, calculado conforme item 4.2.2.6.

TABELA 15 -Concentração média determinada e teórica, referente a variação intra-dia, e exatidão do método espectrofotométrico proposto para o ácido kójico

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)			
Teórica	Determinada (n=9)	Desvio-padrão	Exatidão (%)
2,0	1,9603	0,0743	98,01
1,0	1,0121	0,0622	101,21
0,2	0,1969	0,0397	98,45

5.1.6 Análise estatística

Os valores médios, desvio-padrão e variância das absorbâncias obtidas para as seis réplicas utilizadas na construção da curva de calibração, e os valores de F e t calculados pela comparação desses valores estão dispostos a seguir, na tabela 16. O valores de F e t tabelados foram idênticos para as seis réplicas comparadas, equivalentes a 2,69 e 2,064, respectivamente. Para o teste F foram considerados 12 graus de liberdade para as réplicas comparadas, e para o teste t, 24 graus de liberdade.

TABELA 16 -Valores de F e t calculados e tabelados para comparação dos valores médios de absorbância das seis réplicas de soluções de ácido kójico de 4,00 a 0,05 µg/mL em solução salina (n = 6), utilizadas para a construção da curva de calibração

Réplicas Comparadas	F (Fisher)			t (Student)		
	GL	Tabelado	Calculado	GL	Tabelado	Calculado
1 e 2	12 e 12	2,69	1,04	24	2,064	0,032
1 e 3	12 e 12	2,69	1,06	24	2,064	0,064
1 e 4	12 e 12	2,69	1,06	24	2,064	0,046
1 e 5	12 e 12	2,69	1,05	24	2,064	0,037
1 e 6	12 e 12	2,69	1,02	24	2,064	0,044
2 e 3	12 e 12	2,69	1,02	24	2,064	0,033
2 e 4	12 e 12	2,69	1,02	24	2,064	0,015
2 e 5	12 e 12	2,69	1,02	24	2,064	0,005
2 e 6	12 e 12	2,69	1,02	24	2,064	0,012
3 e 4	12 e 12	2,69	1,00	24	2,064	0,018
3 e 5	12 e 12	2,69	1,00	24	2,064	0,027
3 e 6	12 e 12	2,69	1,03	24	2,064	0,021
4 e 5	12 e 12	2,69	1,01	24	2,064	0,009
4 e 6	12 e 12	2,69	1,04	24	2,064	0,003
5 e 6	12 e 12	2,69	1,03	24	2,064	0,006

GL = graus de liberdade, * - diferença estatisticamente significativa

5.2 AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO

Os resultados a seguir correspondem às médias de cada ensaio de difusão realizado, de um total de quatro réplicas para cada experimento. Os valores obtidos em cada réplica estão citados no apêndice.

Em todos os experimentos, foram utilizados controles dos interferentes, referentes aos pré-tratamentos com as soluções dos óleos seguidas de tratamento com solução salina (experimentos 1 a 6), ou dos tratamentos das membranas com formulações de creme “lanette” com óleo de copaíba mas isentas de ácido kójico (experimentos 7 e 8). Esses controles não apresentaram detecção do despigmentante ou substâncias interferentes, e sendo assim, não foram incluídos nas tabelas e gráficos dispostos a seguir.

Nos intervalos de tempo 0 e 1,5 horas não se obtiveram concentrações acima do limite de quantificação, e desse modo, esses valores foram suprimidos nas tabelas e gráficos apresentados.

5.2.1 Estudos com pré-tratamento

A seguir são apresentados os dados obtidos com os pré-tratamentos com os óleos de copaíba, andiroba e babaçu, nas concentrações de 50 e 25% v/v, aplicados durante 1 hora sobre as membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* nas células de difusão. Esses dados baseiam-se nas absorbâncias das amostras retiradas do fluido receptor das células de difusão, em intervalos de tempo de 1,5 horas, a partir da aplicação da solução de ácido kójico 3,9% p/v, até 22,5 horas, listadas no apêndice. Com esses dados foram calculadas as quantidades liberadas de ácido kójico no fluido receptor nos vários intervalos de tempo. Sabendo-se o valor da área da membrana exposta nos experimentos, isto é, 3,14 cm², construiu-se a curva de liberação da quantidade liberada por área pelo tempo e determinou-se a reta de regressão. A partir desses valores calcularam-se os parâmetros de

difusão (permeabilidade e fluxo), e para as retas com coeficiente de correlação maior que 0,9, calculou-se o tempo de latência.

5.2.1.1 Quantidade liberada no fluido receptor

Os valores médios e desvio-padrão da quantidade liberada de ácido kójico no fluido receptor, nos vários intervalos de tempo, foram calculados a partir dos valores de absorbância da radiação ultravioleta a 268 nm e equação da reta de calibração, e em seguida corrigidos em relação aos volumes de célula de difusão utilizada. Nas tabelas 17 e 18, estão citados esses valores correspondentes aos experimentos 1 a 3, de pré-tratamento com as soluções dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu a 50% v/v, e 4 a 6, quando na concentração de 25% v/v, respectivamente.

Com os dados das quantidades liberadas no fluido receptor nos vários intervalos de tempo e a área das membranas de muda de pele de cobra utilizadas, equivalente a $3,14 \text{ cm}^2$, calcularam-se as quantidades liberadas por área. As tabelas 19 e 20 contém os valores médios e desvio-padrão da quantidade liberada por área, para os experimentos 1 a 6, calculados a partir das quantidades liberadas

TABELA 17 - Média e desvio-padrão da quantidade liberada (μg) de ácido kójico no fluido receptor dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), correspondentes aos experimentos 1, 2 e 3

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Quantidade liberada (μg)								
		Copaíba 50%			Andiroba 50%			Babaçu 50%		
		Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	—	—	-	—	—	1	57,119	—
	SOP	2	85,957	9,587	-	—	—	-	—	—
4,5	SAC	-	—	—	-	—	—	1	85,354	—
	SOP	3	138,850	59,029	-	—	—	-	—	—
6,0	SAC	2	57,927	2,667	1	58,736	—	1	92,881	—
	SOP	4	174,928	102,787	1	59,655	—	-	—	—
7,5	SAC	2	70,292	3,134	3	81,456	20,298	3	76,271	26,283
	SOP	4	225,635	119,827	1	77,281	—	1	69,416	—
9,0	SAC	3	82,272	18,516	3	155,439	9,442	3	95,162	25,220
	SOP	4	275,749	122,871	2	49,157	20,681	2	68,081	15,752
10,5	SAC	4	88,943	22,677	3	117,621	19,942	3	119,612	34,175
	SOP	4	373,203	183,430	3	77,431	20,340	4	71,984	20,396
12,0	SAC	4	109,315	30,959	4	119,583	51,656	4	117,591	52,072
	SOP	4	424,553	193,403	3	94,265	21,906	4	80,190	20,047
13,5	SAC	4	143,994	38,552	-	—	—	-	—	—
	SOP	4	508,505	233,784	-	—	—	-	—	—
22,5	SAC	-	—	—	4	221,921	89,448	4	226,570	98,185
	SOP	-	—	—	4	168,948	70,786	4	154,207	39,062

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle, DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

TABELA 18 - Média e desvio-padrão da quantidade liberada (μg) de ácido kójico no fluido receptor dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), correspondentes aos experimentos 4, 5 e 6

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Quantidade liberada (μg)								
		Copaíba 25%			Andiroba 25%			Babaçu 25%		
		Experimento 4			Experimento 5			Experimento 6		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	64,535	—	-	—	—	-	—	—
4,5	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	88,825	—	-	—	—	-	—	—
6,0	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	129,551	—	-	—	—	1	55,858	—
7,5	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	3	98,016	66,479	1	69,416	—	2	59,730	5,476
9,0	SAC	3	59,813	6,120	3	59,634	3,898	1	71,129	—
	SOP	4	125,269	77,286	3	72,142	13,766	3	78,489	20,324
10,5	SAC	3	71,789	11,165	4	67,444	4,414	3	67,219	12,651
	SOP	4	200,431	137,305	4	85,503	22,677	4	93,914	27,136
12,0	SAC	3	85,345	5,204	4	79,124	10,810	4	77,473	13,954
	SOP	4	251,697	169,045	4	95,340	24,473	4	116,055	40,488
22,5	SAC	4	145,038	42,198	4	140,821	29,250	4	160,851	38,493
	SOP	4	541,934	86,769	4	209,395	89,448	4	255,136	25,665

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle, DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

TABELA 19 - Média e desvio-padrão da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), correspondentes aos experimentos 1, 2 e 3

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)								
		Copaíba 50%			Andiroba 50%			Babaçu 50%		
		Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	—	—	-	—	—	1	18,191	—
	SOP	2	27,375	3,053	-	—	—	-	—	—
4,5	SAC	-	—	—	-	—	—	1	27,183	—
	SOP	3	44,220	18,799	-	—	—	-	—	—
6,0	SAC	2	18,448	0,849	1	18,705	—	1	29,580	—
	SOP	4	55,710	32,734	1	18,998	—	-	—	—
7,5	SAC	2	22,386	0,998	3	25,942	6,464	3	24,290	8,370
	SOP	4	71,858	38,161	1	24,612	—	1	22,107	—
9,0	SAC	3	26,201	5,897	3	49,502	3,007	3	30,306	8,032
	SOP	4	87,818	39,131	2	15,655	6,586	2	21,682	5,016
10,5	SAC	4	28,326	7,222	3	37,459	6,351	3	38,093	10,884
	SOP	4	118,854	58,417	3	24,659	6,477	4	22,925	6,495
12,0	SAC	4	34,814	9,859	4	38,084	16,451	4	37,449	16,583
	SOP	4	135,208	61,593	3	30,021	6,976	4	25,538	6,384
13,5	SAC	4	45,858	12,277	-	—	—	-	—	—
	SOP	4	161,944	74,453	-	—	—	-	—	—
22,5	SAC	-	—	—	4	70,675	28,467	4	72,156	31,269
	SOP	-	—	—	4	53,805	22,543	4	49,110	12,440

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle,
DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

TABELA 20 - Média e desvio-padrão da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), correspondentes aos experimentos 4, 5 e 6

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)								
		Copaíba 25%			Andiroba 25%			Babaçu 25%		
		Experimento 4			Experimento 5			Experimento 6		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	---	---	-	---	---	-	---	---
	SOP	1	20,553	---	-	---	---	-	---	---
4,5	SAC	-	---	---	-	---	---	-	---	---
	SOP	1	28,288	---	-	---	---	-	---	---
6,0	SAC	-	---	---	-	---	---	-	---	---
	SOP	1	41,258	---	-	---	---	1	17,789	---
7,5	SAC	-	---	---	-	---	---	-	---	---
	SOP	3	31,215	21,172	1	22,107	---	2	19,022	1,744
9,0	SAC	3	19,049	1,949	3	18,992	1,241	1	22,653	---
	SOP	4	39,895	24,613	3	22,975	4,384	3	24,997	6,473
10,5	SAC	3	22,863	3,556	4	21,479	1,406	3	21,407	4,029
	SOP	4	63,831	43,728	4	27,230	7,222	4	29,909	8,642
12,0	SAC	3	27,180	1,657	4	25,199	3,442	4	24,673	4,444
	SOP	4	80,158	53,836	4	30,363	7,794	4	36,960	12,894
22,5	SAC	4	46,190	13,439	4	44,847	9,315	4	51,226	12,259
	SOP	4	172,591	27,633	4	66,686	28,487	4	81,253	8,174

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle, DP – desvio-padrão, --- - não calculado, n = número de réplicas

5.2.1.2 Curva de liberação

Foram construídos os gráficos das médias das quantidades de ácido kójico liberadas por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) nos ensaios com pré-tratamento das membranas com os óleos ou os veículos (controles), a partir das réplicas dos experimentos 1 a 6, nas figuras 22 a 27. A seguir foram apresentados apenas os gráficos de liberação do ácido kójico após pré-tratamento das membranas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionadas de 25 ou 50% v/v dos óleos (figuras 28 a 30), ou somente com as soluções dos óleos a 50% ou 25% v/v (figuras 31 e 32). Em seguida, estão os gráficos de liberação do ácido kójico das membranas pré-tratadas comparando-se os ensaios com as soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25 ou 50% v/v de óleos (figura 33) ou de água destilada, referentes aos controles (figura 34).

FIGURA 22 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 1

FIGURA 23 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 2

FIGURA 24 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 3

FIGURA 25 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 4

FIGURA 26 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 5

FIGURA 27 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 6

FIGURA 28 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v de óleo de copaíba (P2A e P2B), referentes às réplicas 1 a 4 dos experimentos 1 e 4

FIGURA 29 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v de óleo de andiroba (P3A e P3B), referentes às réplicas 1 a 4 dos experimentos 2 e 5

FIGURA 30 - Médias da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v de óleo de babaçu (P4A e P4B), referentes às réplicas 1 a 4 dos experimentos 3 e 6

FIGURA 31 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A), andiroba (P3A) e babaçu (P4A), referentes aos experimentos 1, 2 e 3

FIGURA 32 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B), andiroba (P3B) e babaçu (P4B), referentes aos experimentos 4, 5 e 6

FIGURA 33 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobras *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v de óleo de copaiba (P2A e P2B), andiroba (P3A e P3B) e babaçu (P4A e P4B), referentes aos experimentos 1 a 6

FIGURA 34 - Média da quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v de água destilada (P1A e P1B), referentes aos controles dos experimentos 1 a 6

5.2.1.3 Equação da reta, Coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência

A seguir está a tabela 21 contendo os valores médios de tempo de latência, em horas, para liberação do ácido kójico das membranas, referentes aos experimentos 1 a 6, calculados a partir das retas obtidas dos gráficos de quantidade média liberada por área em função do tempo e cujos coeficientes de correlação resultaram em valores maiores que 0,9.

Os valores de tempo de latência (horas) foram calculados através da divisão dos valores de coeficiente linear (-b) pelo coeficiente angular (a) das equações das retas.

TABELA 21 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência médio (horas) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% ou 25% v/v dos óleos de copaíba (P2A ou P2B), andiroba (P3A ou P3B) e babaçu (P4A ou P4B) ou água destilada (P1A ou P1B) correspondentes aos experimentos 1, 2 e 3 ou 4, 5 e 6, respectivamente

Experimento	Pré-tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	P1A	$Y = 3,3611 x - 3,4317$	0,9254	1,34
	P2A	$Y = 12,717 x - 17,041$	0,9832	1,02
2	P1A	$Y = 2,8026 x + 8,5322$	0,8092	-3,04
	P3A	$Y = 2,1911 x + 3,3089$	0,9040	-1,51
3	P1A	$Y = 2,6281 x + 10,017$	0,9423	-3,81
	P4A	$Y = 1,9415 x + 4,3919$	0,9654	-2,26
4	P1B	$Y = 1,9612 x + 2,3442$	0,9939	-1,20
	P2B	$Y = 7,9493 x - 14,801$	0,9524	1,86
5	P1B	$Y = 1,9194 x + 1,7176$	0,9991	-0,89
	P3B	$Y = 3,115 x - 4,4416$	0,9861	1,43
6	P1B	$Y = 2,2922 x - 0,9543$	0,9742	0,42
	P4B	$Y = 4,0053 x - 10,071$	0,9917	2,52

5.2.1.4 Fluxo

A seguir estão as tabelas 22 e 23 contendo os valores médios e desvio-padrão para o fluxo, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, de ácido kójico, referentes aos experimentos 1 a 6, calculados a partir das concentrações presentes no fluido receptor nos vários intervalos de tempo e utilizando-se a área das membranas de muda de pele de cobra com valor médio de $3,14 \text{ cm}^2$.

Os valores de fluxo médio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) foram correspondentes aos valores de coeficiente angular (a) das equações das retas. Esses valores foram dispostos graficamente, na figura 35, com o experimento no eixo x e os valores de fluxo médio no eixo y.

TABELA 22 - Média e desvio-padrão do fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), dos experimentos 1, 2 e 3

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)								
		Copaíba 50%			Andiroba 50%			Babaçu 50%		
		Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	—	—	-	—	—	1	6,064	—
	SOP	2	9,125	1,018	-	—	—	-	—	—
4,5	SAC	-	—	—	-	—	—	1	6,041	—
	SOP	3	9,827	4,178	-	—	—	-	—	—
6,0	SAC	2	3,075	0,142	1	3,118	—	1	4,930	—
	SOP	4	9,285	5,456	1	3,166	—	-	—	—
7,5	SAC	2	2,985	0,133	3	3,459	0,862	3	3,239	1,116
	SOP	4	9,581	5,088	1	3,282	—	1	2,948	—
9,0	SAC	3	2,911	0,655	3	5,500	0,334	3	3,367	0,892
	SOP	4	9,758	4,348	2	1,739	0,732	2	2,409	0,557
10,5	SAC	4	2,698	0,688	3	3,567	0,605	3	3,628	1,036
	SOP	4	11,319	5,563	3	2,348	0,617	4	2,183	0,619
12,0	SAC	4	2,901	0,822	4	3,174	1,371	4	3,121	1,382
	SOP	4	11,267	5,133	3	2,502	0,581	4	2,128	0,532
13,5	SAC	4	3,397	0,909	-	—	—	-	—	—
	SOP	4	11,996	5,515	-	—	—	-	—	—
22,5	SAC	-	—	—	4	3,141	1,266	4	3,207	1,390
	SOP	-	—	—	4	2,391	1,002	4	2,183	0,553
Médio	SAC	-	3,3611	—	-	—	—	-	2,628	—
	SOP	-	12,717	—	-	2,191	—	-	1,941	—

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle,
DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

TABELA 23 - Média e desvio-padrão do fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), dos experimentos 4, 5 e 6

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)								
		Copaíba 25%			Andiroba 25%			Babaçu 25%		
		Experimento 4			Experimento 5			Experimento 6		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	6,851	—	-	—	—	-	—	—
4,5	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	6,286	—	-	—	—	-	—	—
6,0	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	6,876	—	-	—	—	1	2,965	—
7,5	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	3	4,162	2,823	1	2,948	—	2	2,536	0,232
9,0	SAC	3	2,116	0,216	3	2,110	0,138	1	2,517	—
	SOP	4	4,433	2,735	3	2,553	0,487	3	2,777	0,719
10,5	SAC	3	2,177	0,339	4	2,046	0,134	3	2,039	0,384
	SOP	4	6,079	4,164	4	2,593	0,688	4	2,848	0,823
12,0	SAC	3	2,265	0,138	4	2,100	0,287	4	2,056	0,370
	SOP	4	6,680	4,486	4	2,530	0,649	4	3,080	1,074
22,5	SAC	4	2,053	0,597	4	1,993	0,414	4	2,277	0,545
	SOP	4	7,671	1,228	4	2,964	1,266	4	3,611	0,363
Médio	SAC	-	1,961	—	-	1,919	—	-	2,292	—
	SOP	-	7,949	—	-	3,115	—	-	4,004	—

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle,
DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

FIGURA 35 -Valores de fluxo médio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v de óleo (SOP) de copaíba (experimentos 1 e 4), andiroba (experimentos 2 e 5) ou babaçu (experimentos 3 e 6) ou 50 ou 25% v/v água (SAC – experimentos 1 a 6)

5.2.1.5 Permeabilidade

A seguir estão as tabelas 24 e 25 contendo os valores de permeabilidade média e desvio-padrão, em $\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$, referentes aos experimentos 1 a 6, calculados a partir das concentrações presentes no fluido receptor nos vários intervalos de tempo e utilizando-se a área das membranas de muda de pele de cobra com valor médio de $3,14 \text{ cm}^2$.

Os valores de permeabilidade média ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) foram calculados a partir dos valores de fluxo médio, divididos pela concentração das soluções utilizadas nos tratamentos, ($39000 \mu\text{g}/\text{mL}$). Esses valores foram dispostos graficamente, na figura 36, com o experimento no eixo x e os valores de permeabilidade média no eixo y.

TABELA 24 - Média e desvio-padrão da permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), dos experimentos 1, 2 e 3

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)								
		Copaíba 50%			Andiroba 50%			Babaçu 50%		
		Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	—	—	-	—	—	1	1,555	—
	SOP	2	2,340	0,261	-	—	—	-	—	—
4,5	SAC	-	—	—	-	—	—	1	1,549	—
	SOP	3	2,520	1,071	-	—	—	-	—	—
6,0	SAC	2	0,788	0,036	1	0,799	—	1	1,264	—
	SOP	4	2,381	1,399	1	0,812	—	-	—	—
7,5	SAC	2	0,765	0,034	3	0,887	0,221	3	0,830	0,288
	SOP	4	2,457	1,305	1	0,841	—	1	0,756	—
9,0	SAC	3	0,746	0,168	3	1,410	0,086	3	0,863	0,229
	SOP	4	2,502	1,115	2	0,446	0,188	2	0,618	0,143
10,5	SAC	4	0,692	0,176	3	0,915	0,155	3	0,930	0,266
	SOP	4	2,902	1,426	3	0,602	0,158	4	0,560	0,159
12,0	SAC	4	0,744	0,211	4	0,814	0,351	4	0,800	0,354
	SOP	4	2,889	1,316	3	0,641	0,149	4	0,546	0,136
13,5	SAC	4	0,871	0,233	-	—	—	-	—	—
	SOP	4	3,076	1,414	-	—	—	-	—	—
22,5	SAC	-	—	—	4	0,805	0,325	4	0,822	0,356
	SOP	-	—	—	4	0,613	0,257	4	0,560	0,142
Médio	SAC	-	0,862	—	-	—	—	-	0,674	—
	SOP	-	3,261	—	-	0,562	—	-	0,498	—

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle, DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

TABELA 25 - Média e desvio-padrão da permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu (SOP) ou água destilada (SAC), dos experimentos 4, 5 e 6

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)								
		Copaíba 25%			Andiroba 25%			Babaçu 25%		
		Experimento 4			Experimento 5			Experimento 6		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	1,757	—	-	—	—	-	—	—
4,5	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	1,612	—	-	—	—	-	—	—
6,0	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	1	1,763	—	-	—	—	1	0,760	—
7,5	SAC	-	—	—	-	—	—	-	—	—
	SOP	3	1,067	0,724	1	0,756	—	2	0,650	0,060
9,0	SAC	3	0,543	0,055	3	0,541	0,035	1	0,645	—
	SOP	4	1,137	0,701	3	0,654	0,125	3	0,712	0,184
10,5	SAC	3	0,558	0,087	4	0,524	0,034	3	0,523	0,098
	SOP	4	1,559	1,068	4	0,665	0,176	4	0,730	0,211
12,0	SAC	3	0,581	0,035	4	0,538	0,073	4	0,527	0,095
	SOP	4	1,713	1,150	4	0,649	0,166	4	0,790	0,275
22,5	SAC	4	0,526	0,153	4	0,511	0,106	4	0,584	0,140
	SOP	4	1,967	0,315	4	0,760	0,325	4	0,926	0,093
Médio	SAC	-	0,503	—	-	0,492	—	-	0,588	—
	SOP	-	2,038	—	-	0,799	—	-	1,027	—

SOP – solução dos óleos promotores, SAC – solução aquosa controle,
DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

FIGURA 36 - Permeabilidade média (cm x 10⁻⁴/h) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v de óleo (SOP) de copaíba (experimentos 1 e 4), andiroba (experimentos 2 e 5) ou babaçu (experimentos 3 e 6) ou 50 ou 25% v/v água (SAC – experimentos 1 a 6)

5.2.1.6 Fator de promoção

Os fatores de promoção para os pré-tratamentos com as soluções dos óleos a 50 ou 25% v/v estão descritos na tabela 26.

TABELA 26 - Fatores de promoção para liberação do ácido kójico nos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v dos óleos de copaíba, andiroba e babaçu, e tratadas com solução aquosa de ácido kójico a 3,9% p/v correspondentes aos experimentos 1 a 6

Óleo	Fator de Promoção e Concentração	
	50%	25%
Copaíba	3,78	4,05
Andiroba	---	1,62
Babaçu	0,74	1,75

--- - não calculado

5.2.2 Estudos das formulações

A seguir são apresentados os dados referentes ao creme “lanette” contendo ou não óleo de copaíba 50% v/p, e adicionado de ácido kójico 3,9% p/p, aplicados durante 22,5 horas sobre as membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* nas células de difusão. Esses dados consistem nos valores de absorbância da radiação ultravioleta a 268 nm das amostras retiradas do fluido receptor das células de difusão, em intervalos de tempo de 1,5 horas, a partir da aplicação da formulação, até 22,5 horas, listadas no apêndice, as quantidades médias liberadas no fluido receptor nos vários intervalos de tempo, a curva de liberação da quantidade liberada por área pelo tempo, a reta de regressão e os valores dos parâmetros de difusão (permeabilidade e fluxo), e para as retas com coeficiente de correlação maior que 0,9, o tempo de latência.

5.2.2.1 Quantidade liberada no fluido receptor

A tabela 27 contém os valores médios e desvio-padrão da quantidade liberada de ácido kójico no fluido receptor, nos vários intervalos de tempo, referente às replicas 1 a 4 dos experimentos 7 e 8, cujos valores parciais foram calculados a partir das absorbâncias e da equação da reta de curva de calibração.

A seguir na tabela 28 estão apresentados os valores médios e desvio-padrão para a quantidade liberada por área, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, referente aos experimentos 7 e 8, calculados a partir das quantidades liberadas em relação à área das membranas de muda de pele de cobra e o intervalo de tempo da análise.

TABELA 27 - Média e desvio padrão da quantidade liberada (μg) de ácido kójico no fluido receptor dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (FOP) ou água destilada (FAC), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, correspondentes aos experimentos 7 e 8, respectivamente

Tempo (horas)	Tratamento	Quantidade liberada (μg)					
		Óleo de copaíba 50%			Óleo de copaíba 25%		
		Experimento 7			Experimento 8		
		n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	FAC	1	57,658	—	-	—	—
	FOP	-	—	—	-	—	—
4,5	FAC	1	64,895	—	-	—	—
	FOP	2	63,451	6,136	1	59,655	—
6,0	FAC	1	88,470	—	-	—	—
	FOP	3	83,598	11,164	1	63,181	—
7,5	FAC	2	85,736	22,942	1	58,197	—
	FOP	3	105,379	8,170	2	76,494	11,543
9,0	FAC	2	95,114	27,720	2	64,787	3,986
	FOP	3	128,675	12,849	4	74,278	14,792
10,5	FAC	4	84,955	35,079	3	73,475	2,424
	FOP	4	128,286	50,292	4	88,642	21,345
12,0	FAC	4	95,081	35,364	4	90,773	30,252
	FOP	4	150,003	53,309	4	109,084	18,832
22,5	FAC	4	193,957	77,847	4	144,097	62,640
	FOP	4	323,190	110,633	4	178,222	37,613

FOP – formulação dos óleos promotores, FAC – formulação aquosa controle, DP – desvio-padrão, — não calculado, n = número de réplicas

TABELA 28 - Média e desvio padrão da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico no fluido receptor dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (FOP) ou água destilada (FAC), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, correspondentes aos experimentos 7 e 8, respectivamente

Tempo (horas)	Tratamento	Quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)					
		Óleo de copaíba 50%			Óleo de copaíba 25%		
		Experimento 7			Experimento 8		
		n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	FAC	1	18,362	—	-	—	—
	FOP	-	—	—	-	—	—
4,5	FAC	1	20,667	—	-	—	—
	FOP	2	20,207	1,954	1	18,998	—
6,0	FAC	1	28,175	—	-	—	—
	FOP	3	26,624	3,555	1	20,121	—
7,5	FAC	2	27,304	7,306	1	18,534	—
	FOP	3	33,560	2,602	2	24,361	3,676
9,0	FAC	2	30,291	8,828	2	20,633	1,269
	FOP	3	40,979	4,092	4	23,655	4,711
10,5	FAC	4	27,056	11,171	3	23,340	0,772
	FOP	4	40,855	16,016	4	28,230	6,798
12,0	FAC	4	30,281	11,262	4	28,908	9,634
	FOP	4	47,772	16,977	4	34,740	5,997
22,5	FAC	4	61,770	24,792	4	45,891	19,949
	FOP	4	102,927	35,233	4	56,759	11,979

FOP – formulação dos óleos promotores, FAC – formulação aquosa controle, DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

5.2.2.2 Curva de liberação

Abaixo estão apresentadas as figuras correspondentes aos gráficos de liberação de ácido kójico referente aos experimentos 7 e 8, construídos a partir dos valores médios das quantidades liberadas por área em relação ao tempo de análise. As retas de regressão e os valores de coeficiente de correlação (R^2) também foram determinados.

Inicialmente foram apresentados os gráficos de liberação do ácido kójico dos ensaios com as formulações de creme "lanette" contendo ácido kójico 3,9% p/p adicionado de 50 ou 25% v/p do óleo de copaíba e seus controles, nas figuras 37 e 38. Em seguida estão representados os gráficos dos ensaios com as formulações contendo óleo a 50 ou 25% v/p e ácido kójico (figura 39) e dos ensaios com as formulações contendo água destilada a 50 ou 25% v/p e ácido kójico (figura 40).

FIGURA 37 - Média da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou 50% v/p de água destilada (F1B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 7

FIGURA 38 - Média da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou 25% v/p de água destilada (F2B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 8

FIGURA 39 - Média da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (F1A e F2A) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 dos experimentos 7 e 8

FIGURA 40 - Média da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 50 ou 25% v/p de água destilada (F1B e F2B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 (controles) dos experimentos 7 e 8

5.2.2.3 Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência

Abaixo está a tabela 29, contendo os valores médios e desvio-padrão do tempo de latência para liberação do ácido kójico, em horas, referentes aos experimentos 7 e 8, calculados a partir das retas obtidas dos gráficos de quantidade média liberada por área em função do tempo, cujos coeficientes de correlação resultaram em valores maiores que 0,9.

Os valores de tempo de latência (horas) foram calculados através da divisão dos valores de coeficiente linear (-b) pelo coeficiente angular (a) das equações das retas.

TABELA 29 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência médio (horas) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50% ou 25% v/p do óleo de copaíba (F1A ou F2A) ou água destilada (F1B ou F2B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, correspondentes aos experimentos 7 e 8, respectivamente

Experimento	Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
7	F1B	$Y = 2,0979 x + 10,82$	0,9155	-5,16
	F1A	$Y = 4,5478 x - 2,0741$	0,9855	0,46
8	F2B	$Y = 1,8418 x + 4,8194$	0,9892	-2,62
	F2A	$Y = 2,1761 x + 7,1695$	0,9804	- 3,30

5.2.2.4 Fluxo

A seguir está apresentada a tabela 30, contendo os valores médios e desvio-padrão para o fluxo de ácido kójico, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, para os intervalos de tempo de 3,0 a 22,5 horas, referentes aos experimentos 7 e 8, calculados a partir das quantidades liberadas em relação à área das membranas de muda de pele de cobra e o intervalo de tempo da análise.

Os valores de fluxo médio foram correspondentes aos valores de coeficiente angular (a) das equações das retas, referentes aos gráficos de curva de liberação descritos no item 5.2.2.4.1. Esses valores foram dispostos também na forma de gráfico, com o experimento no eixo x e, função do valor médio do fluxo (no eixo y), na figura 41.

TABELA 30 - Média e desvio-padrão do fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (FOP) ou água destilada (FAC), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, correspondentes aos experimentos 7 e 8, respectivamente

Tempo (horas)	Tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)					
		Óleo de copaíba 50%			Óleo de copaíba 25%		
		Experimento 7			Experimento 8		
		n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	FAC	1	6,121	—	-	—	—
	FOP	-	—	—	-	—	—
4,5	FAC	1	4,593	—	-	—	—
	FOP	2	4,490	0,434	1	4,222	—
6,0	FAC	1	4,696	—	-	—	—
	FOP	3	4,437	0,593	1	3,354	—
7,5	FAC	2	3,640	0,974	1	2,471	—
	FOP	3	4,475	0,347	2	3,248	0,490
9,0	FAC	2	3,366	0,981	2	2,292	0,141
	FOP	3	4,553	0,455	4	2,628	0,523
10,5	FAC	4	2,577	1,064	3	2,228	0,073
	FOP	4	3,891	1,525	4	2,688	0,647
12,0	FAC	4	2,523	0,938	4	2,409	0,803
	FOP	4	3,981	1,415	4	2,895	0,500
22,5	FAC	4	2,745	1,102	4	2,040	0,887
	FOP	4	4,574	1,566	4	2,523	0,532
Médio	FAC	-	2,098	—	-	1,842	—
	FOP	-	4,548	—	-	2,176	—

FOP – formulação dos óleos promotores, FAC – formulação aquosa controle, DP – desvio-padrão, — - não calculado, n = número de réplicas

FIGURA 41 - Valores de fluxo médio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo óleo de copaíba (FOP) nas concentrações de 50% ou 25% v/p (experimentos 7 e 8) ou água destilada (FAC) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*

5.2.2.5 Permeabilidade

A seguir, na tabela 31, estão apresentados os valores médios e desvio-padrão para permeabilidade de ácido kójico, em $\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$, para os intervalos de tempo de 3,0 a 22,5 horas, referentes aos experimentos 7 e 8. Esses parâmetros foram calculados a partir dos valores de fluxo calculados segundo o item 5.2.2.5.2 e da concentração da formulação aplicada nas membranas, equivalente a $39000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Os valores de permeabilidade média ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) foram calculadas a partir dos valores de fluxo médio. Esses valores foram dispostos também na forma de gráfico, com o experimento no eixo x em função do valor médio de permeabilidade (no eixo y), na figura 42.

TABELA 31 - Média e desvio-padrão da permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico nos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50 ou 25% v/v de óleo de copaíba (FOP) ou água destilada (FAC), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, correspondentes aos experimentos 7 e 8, respectivamente

Tempo (horas)	Tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)					
		Óleo de copaíba 50%			Óleo de copaíba 25%		
		Experimento 7			Experimento 8		
		n	Média	DP	n	Média	DP
3,0	FAC	1	1,570	---	-	---	---
	FOP	-	---	---	-	---	---
4,5	FAC	1	1,178	---	-	---	---
	FOP	2	1,151	0,111	1	1,082	---
6,0	FAC	1	1,204	---	-	---	---
	FOP	3	1,138	0,152	1	0,860	---
7,5	FAC	2	0,933	0,250	1	0,634	---
	FOP	3	1,147	0,089	2	0,833	0,126
9,0	FAC	2	0,863	0,251	2	0,588	0,036
	FOP	3	1,167	0,116	4	0,674	0,134
10,5	FAC	4	0,661	0,273	3	0,571	0,019
	FOP	4	0,998	0,391	4	0,689	0,166
12,0	FAC	4	0,647	0,240	4	0,618	0,206
	FOP	4	1,021	0,363	4	0,742	0,128
22,5	FAC	4	0,704	0,282	4	0,523	0,227
	FOP	4	1,173	0,401	4	0,647	0,136
Médio	FAC	-	0,538	---	-	0,472	---
	FOP	-	1,166	---	-	0,558	---

FOP – formulação dos óleos promotores, FAC – formulação aquosa controle, DP – desvio-padrão, --- - não calculado, n = número de réplicas

FIGURA 42 - Valores médios de permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo óleo de copaíba (FOP) nas concentrações de 50% ou 25% v/p (experimentos 7 e 8) ou água destilada (FAC) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*

5.2.2.6 Fator de promoção

Os fatores de promoção para liberação do ácido kójico nos ensaios de difusão com as formulações adicionadas de 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba foram equivalentes a 2,16 e 1,18, respectivamente.

5.2.2.7 Valores de pH

Os valores de pH determinados estão listados na tabela 32, abaixo.

TABELA 32 - Valores de pH para as formulações e seus controles

Formulações e valores de pH					
F1A	F1B	F1C	F2A	F2B	F2C
4,16	3,79	4,20	3,85	3,88	4,27
4,10	4,06	4,14	3,82	3,94	3,75
4,01	3,96	4,02	4,04	4,02	4,15
3,85	4,30	3,98	4,17	4,12	4,04

5.2.3 Análise estatística

Os valores das médias e desvio-padrão para fluxo e permeabilidade de ácido kójico, obtidos a partir do coeficiente angular das retas dos gráficos de liberação das réplicas de cada experimento ($n = 3$ ou 4), para ensaios de pré-tratamento com os óleos de copaíba, andiroba ou babaçu a 50 ou 25% v/v em solução de álcool isopropílico:propilenoglicol (95:5 v/v), referente às soluções P2A, P3A, P4A ou P2B, P3B, P4B, respectivamente, ou seus controles, contendo água ao invés de óleo (soluções controle P1A e P2A), ou para os ensaios de difusão com as formulações de creme “lanette” com ácido kójico 3,9% p/p e adicionado de 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (F1A e F2A) ou seus controles, com água no lugar do óleo (F1B e F2B) estão descritos na tabela 33.

Os valores de F (Fisher) e t (Student) foram obtidos a partir dos valores da média, desvio-padrão e variância para fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico obtidos nos experimentos dos ensaios de pré-tratamento e com as formulações. Para os ensaios de pré-tratamento, foram comparados entre si os valores obtidos após o pré-tratamento com as soluções dos óleos utilizados (tabela 34) ou as soluções controle (tabela 35), e também as soluções dos óleos em relação às soluções controle (tabela 36). Para os ensaios de difusão, foram comparados os valores obtidos durante os tratamentos com as formulações contendo óleo entre si (tabela 34), as formulações controle entre si (tabela 35), e também as formulações com óleo em relação às formulações controles utilizadas (tabela 36). Os valores de F e t calculados na comparação dos experimentos estão descritos a seguir.

TABELA 33 - Médias, desvio-padrão, variância e coeficiente de variação para fluxo e permeabilidade média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e cm/h) de ácido kójico nos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v dos óleos de copaíba (P2A e P2B), andiroba (P3A e P3B), babaçu (P4A e P4B) ou água destilada (P1A e P1B), e dos ensaios de difusão para as membranas tratadas com creme "lanette" contendo ácido kójico a 3,9% p/p e 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (F1A e F2A) ou água (F1B e F2B)

Experimento	Pré ou Tratamento	n	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			CV%
			Média	DP	S ²	Média	DP	S ²	
1	P1A	4	4,665	0,953	0,909	1,196	0,244	0,060	20,43
	P2A	4	13,911	5,383	28,98	3,567	1,380	1,904	38,70
2	P1A	4	3,222	1,481	2,193	0,826	0,380	0,144	45,97
	P3A	3	3,278	0,939	0,881	0,840	0,241	0,058	28,64
3	P1A	4	3,340	1,674	2,802	0,856	0,429	0,184	50,12
	P4A	4	2,239	0,668	0,446	0,574	0,171	0,029	29,84
4	P1B	3	2,369	0,979	0,959	0,607	0,251	0,063	41,34
	P2B	4	9,855	0,752	0,566	2,527	0,193	0,037	7,63
5	P1B	3	2,198	0,709	0,503	0,492	0,182	0,033	32,26
	P3B	4	3,294	1,746	3,048	0,845	0,448	0,201	53,00
6	P1B	4	2,565	1,186	1,407	0,658	0,304	0,092	42,23
	P4B	4	4,396	0,254	0,065	1,127	0,065	0,004	5,79
7	F1B	4	2,815	1,247	1,555	0,722	0,320	0,102	44,30
	F1A	4	4,917	1,533	2,350	1,261	0,393	0,154	31,17
8	F2B	4	1,907	1,307	1,710	0,489	0,335	0,112	68,55
	F2A	4	2,382	0,638	0,408	0,611	0,164	0,027	26,81

CV% - coeficiente de variação, DP = desvio-padrão, S² = variância, n = número de réplicas

TABELA 34 - Valores de F e t para fluxo médio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico nos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v dos óleos de copaíba (P2A e P2B, experimentos 1 e 4), andiroba (P3A e P3B, experimentos 2 e 5) e babaçu (P4A e P4B, experimentos 3 e 6), e dos ensaios de difusão para as membranas tratadas com creme "lanette" contendo ácido kójico a 3,9% p/p e 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (F1A e F2A, experimentos 7 e 8)

Experimentos Comparados	F (Fisher)			t (Student)		
	GL	Tabelado	Calculado	GL	Tabelado	Calculado
1 (P2A) e 2 (P3A)	3 e 2	19,16	32,87*	5	2,571	3,305*
1 (P2A) e 3 (P4A)	3 e 3	9,28	64,92*	6	2,447	4,303*
1 (P2A) e 4 (P2B)	3 e 3	9,28	51,21*	6	2,447	1,493
1 (P2A) e 5 (P3B)	3 e 3	9,28	9,51*	6	2,447	3,752*
1 (P2A) e 6 (P4B)	3 e 3	9,28	447,32*	6	2,447	3,531*
2 (P3A) e 3 (P4A)	2 e 3	9,55	1,97	5	2,571	1,726
2 (P3A) e 4 (P2B)	2 e 3	9,55	1,56	5	2,571	10,351*
2 (P3A) e 5 (P3B)	3 e 2	19,16	3,46	5	2,571	0,014
2 (P3A) e 6 (P4B)	2 e 3	9,55	13,61*	5	2,571	2,340
3 (P4A) e 4 (P2B)	3 e 3	9,28	1,27	6	2,447	15,139*
3 (P4A) e 5 (P3B)	3 e 3	9,28	6,83	6	2,447	1,128
3 (P4A) e 6 (P4B)	3 e 3	9,28	6,89	6	2,447	6,034*
4 (P2B) e 5 (P3B)	3 e 3	9,28	5,39	6	2,447	6,903*
4 (P2B) e 6 (P4B)	3 e 3	9,28	8,73	6	2,447	13,748*
5 (P3B) e 6 (P4B)	3 e 3	9,28	47,05*	6	2,447	1,250
7 (F1A) e 8 (F1B)	3 e 3	9,28	5,76	6	2,447	3,054*

$\alpha = 0,05$, * - diferença estatisticamente significativa, GL = graus de liberdade

TABELA 35 - Valores de F e t para fluxo médio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico nos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v (P1B, experimentos 1 a 3) ou 25% v/v (P1B, experimentos 4 a 6), de água destilada e dos ensaios de difusão para as membranas tratadas com creme "lanette" contendo ácido kójico a 3,9% p/p e 50 ou 25% v/p água destilada (F1B e F2B, experimentos 7 e 8)

Experimentos Comparados	F (Fisher)			t (Student)		
	GL	Tabelado	Calculado	GL	Tabelado	Calculado
1 (P1A) e 2 (P1A)	3 e 3	9,28	0,41	6	2,447	1,639
1 (P1A) e 3 (P1A)	3 e 3	9,28	0,32	6	2,447	1,375
1 (P1A) e 4 (P1B)	2 e 3	9,55	0,95	5	2,571	3,119*
1 (P1A) e 5 (P1B)	3 e 2	19,16	1,81	5	2,571	3,470*
1 (P1A) e 6 (P1B)	3 e 3	9,28	0,65	6	2,447	2,760*
2 (P1A) e 3 (P1A)	3 e 3	9,28	1,28	6	2,447	0,106
2 (P1A) e 4 (P1B)	3 e 2	19,16	2,29	5	2,571	0,856
2 (P1A) e 5 (P1B)	3 e 2	19,16	4,37	5	2,571	1,089
2 (P1A) e 6 (P1B)	3 e 3	9,28	1,56	6	2,447	0,692
3 (P1A) e 4 (P1B)	3 e 2	19,16	2,92	5	2,571	0,885
3 (P1A) e 5 (P1B)	3 e 2	19,16	5,58	5	2,571	1,090
3 (P1A) e 6 (P1B)	3 e 3	9,28	1,99	6	2,447	0,755
4 (P1B) e 5 (P1B)	2 e 2	19,00	1,91	4	2,776	0,246
4 (P1B) e 6 (P1B)	3 e 2	19,16	1,47	5	2,571	0,232
5 (P1B) e 6 (P1B)	3 e 2	19,16	2,80	5	2,571	0,471
7 (F1B) e 8 (F2B)	3 e 3	9,28	1,10	6	2,447	1,005

$\alpha = 0,05$, * - diferença estatisticamente significativa, GL = graus de liberdade

TABELA 36 -Valores de F e t para fluxo médio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico nos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com soluções de álcool isopropílico (95:5 v/v) adicionado de 50 ou 25% v/v dos óleos de copaíba (P2A e P2B, experimentos 1 e 4), andiroba (P3A e P3B, experimentos 2 e 5), babaçu (P4A e P4B, experimentos 3 e 6) ou água destilada (P1A e P1B), e dos ensaios de difusão para as membranas tratadas com creme "lanette" contendo ácido kójico a 3,9% p/p e 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (F1A e F2A, experimentos 7 e 8) ou água destilada (F1B e F2B)

Experimentos Comparados	F (Fisher)			t (Student)		
	GL	Tabelado	Calculado	GL	Tabelado	Calculado
1 – P2A e P1A	3 e 3	9,28	31,89*	6	2,447	3,383*
2 – P3A e P1A	3 e 2	9,28	2,49	5	2,571	0,057
3 – P4A e P1A	3 e 3	9,28	6,28	6	2,447	1,222
4 – P2B e P1B	2 e 3	9,55	1,70	5	2,571	11,525*
5 – P3B e P1B	3 e 2	19,16	6,07	5	2,571	1,007
6 – P4B e P1B	3 e 3	9,28	21,71*	6	2,447	3,019*
7 – F1A e F1B	3 e 3	9,28	1,51	6	2,447	2,128
8 – F2A e F2B	3 e 3	9,28	4,19	6	2,447	0,652

$\alpha = 0,05$, * - diferença estatisticamente significativa, GL = graus de liberdade

6

DISCUSSÃO

6.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método espectrofotométrico foi selecionado para avaliação do ácido kójico no presente estudo devido ao baixo custo, facilidade de execução e preparo. Os métodos de doseamento para o ácido kójico, citados na literatura envolvem a avaliação da absorção de radiação ultravioleta, precedidos por separação cromatográfica, processo mais sensível porém de maior custo operacional.

O aparelho espectrofotômetro utilizado foi apropriado para a metodologia, com uma escala apresentando valores de absorbâncias com quatro casas decimais após a vírgula, e os valores médios de absorbância detectados estiveram compreendidos na faixa entre 0 e 0,24. O método espectrofotométrico foi utilizado por outros autores na quantificação de substâncias, como nos estudos de difusão de Lin e colaboradores (1992).

6.1.1 Seleção do comprimento de onda da radiação ultravioleta

Na figura 20, pode-se verificar a presença de dois picos de absorção máxima de radiação ultravioleta, a 216 e 268 nm, para a solução de ácido kójico avaliada. Embora o pico de absorção tenha sido menor para o comprimento de onda equivalente a 268 nm, este foi selecionado porque apresenta maior seletividade de absorção em relação aquele de 216 nm, onde pode ocorrer absorção de interferentes como o cloreto de sódio, a proteína queratina ou outros contaminantes provenientes das membranas. O valor obtido está próximo daquele utilizado por Majmudar e colaboradores (1998) e Shih e Zen (1999), que foi de 254nm, e também daquele citado por Burdock, Soni e Carabin (2001), equivalente a 267 nm.

6.1.2 Curva de calibração

A curva de calibração foi construída com 6 réplicas para cada ponto, e com um total de 13 pontos, acima do usual, que são 3 réplicas e 5 pontos. Isso foi necessário devido à faixa de valores de concentrações baixas utilizada, de 0,05 até 4 $\mu\text{g/mL}$, em solução salina. O número maior de réplicas promove uma maior segurança, para os cálculos das médias e desvio-padrão (LEITE, 2002).

A faixa de valores de concentração utilizada para construção da curva de calibração foi estipulada de acordo com resultados obtidos em experimentos prévios de difusão, contemplando assim as concentrações a serem detectadas nesses experimentos.

A reta obtida apresentou coeficiente de correlação de 0,9993, sendo muito próximo a 1,0, significando uma adequada linearidade entre os valores de concentração utilizados (0,05 a 4,00 $\mu\text{g/mL}$).

6.1.3 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação são determinados considerando-se uma faixa com os menores valores de concentração utilizados na construção da curva de calibração, e estão relacionados com o tamanho do desvio-padrão e a inclinação da reta (LEITE, 2002). Quanto menor o desvio-padrão dos sinais detectados e maior a inclinação da reta construída (sensibilidade maior), menores são os limites de detecção e de quantificação.

Selecionou-se a faixa de 0,20 até 1,00 $\mu\text{g/mL}$ considerando-se que está abrange as concentrações mais comumente detectadas nos experimentos de difusão, através de ensaios preliminares. Sendo assim, com base nessa faixa, os valores para limites de detecção e concentração calculados foram correspondentes a 0,057 e 0,173 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

6.1.4 Precisão

A precisão se refere a capacidade do método em fornecer valores próximos entre si, e é medida pelo coeficiente de variação. Para a obtenção desse parâmetro, procedeu-se a repetição do método para concentrações pré-estabelecidas (ou teóricas), várias vezes no mesmo dia e também em dias diferentes, e calculou-se a média e desvio-padrão em relação às concentrações detectadas (ou calculadas). Esse parâmetro estima os erros possíveis durante a execução dos procedimentos laboratoriais do método, tanto os decorrentes dos equipamentos e das condições nas quais foram utilizados, quanto dos operadores. Como o método utilizado foi espectrofotométrico, os possíveis erros devem ser oriundos das etapas de pesagem da amostra, das diluições volumétricas e do aparelho de análise, embora tenha se padronizado as operações, as quais foram efetuadas sempre pelo mesmo analista.

Para o método proposto, a precisão obtida esteve compreendida na faixa de 2,25 a 5,30%, para o coeficiente de variação intradia, e na faixa de 1,58 a 5,36%, para o coeficiente de variação interdia (tabelas 13 e 14). Somente os valores correspondentes às menores concentrações estiveram ligeiramente superiores aos padrões propostos pela literatura especializada, que estipula o máximo de 5% (LEITE, 2002; BRASIL, 2003). Contudo, segundo Ribani e colaboradores (2004), para faixas de valores de concentração muito baixas, é aceitável até o limite de 20%. Desse modo, o método pode ser considerado preciso.

6.1.5 Exatidão

A exatidão se refere à capacidade do método em fornecer valores próximos a um valor teoricamente aceito e pré-estabelecido. Pode ser calculada submetendo-se soluções de concentrações diferentes e conhecidas (valores teóricos) ao método, e comparação desses valores com aqueles

calculados a partir da equação da reta de calibração (valores obtidos). Da mesma maneira que a precisão, os possíveis erros devem ser oriundos das etapas de pesagem da amostra, das diluições volumétricas e do aparelho de análise, embora tenha se padronizado as operações, as quais foram efetuadas sempre pelo mesmo analista.

Para o método proposto, obteve-se a exatidão entre 98,01 e 101,21% (tabela 15), compatíveis com aqueles propostos pela literatura especializada (BRASIL, 2003).

6.1.6 Análise estatística

Da tabela 16, pode-se observar que todas as seis réplicas utilizadas na construção da curva de calibração apresentaram a mesma variação e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as médias, através da análise dos valores de F e t calculados, respectivamente. Essa observação indica adequada capacidade do método em relação a sua repetitividade, que é um parâmetro de precisão (LEITE, 2002).

6.2 AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO

6.2.1 Preparo das soluções dos óleos

Os óleos foram diluídos em solução de álcool isopropílico:propilenoglicol (95:5) v/v. Essa solução foi preparada visando o melhor poder solvente para os óleos, a melhor preservação das membranas e a menor interferência possível nos resultados de difusão por liberação de substâncias contaminantes.

O propilenoglicol foi adicionado à solução de álcool isopropílico na concentração de 5% v/v, visando evitar a desidratação das membranas de muda de pele de cobra, o que poderia ocasionar falsos resultados. Essa substância é conhecida como promotor de penetração de substâncias em

estudos de difusão, mas como foi também incorporado nos controles, que apresentavam água ao invés dos óleos, esse efeito de promoção ficou ajustado.

Segundo Ostrenga e colaboradores (1971) concentrações elevadas de propilenoglicol produzem efeito contrário, isto é, promovem a desidratação das membranas e assim a diminuição da penetração. Contrariamente, Kang, Jun e McCall (2000) obtiveram maiores quantidades permeadas de lidocaína em muda de pele de cobra após tratamento com solução aquosa de propilenoglicol 40%, e afirmaram que esse promotor diminui a formação de pontes de hidrogênio na alfa-queratina dessas membranas.

Segundo Goodman e Barry (1989), os promotores de penetração que atuam por mecanismo de desorganização e rompimento da bicamada lipídica são mais efetivos quando em veículos com propilenoglicol do que em veículos aquosos.

O óleo de copaíba apresenta em sua composição 70% terpenos da classe dos sesquiterpenos (β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, β -bisaboleno, α -copaeno, α -cis-bergamoteno, α e β -selineno, cadineno, β -elemeno e α -curcumeno), diterpenos (ácido copálico, ácido paracopálico, ácido metacopálico, ácido homoparacopálico, ácido ilusônico, ácido caurenóico e ácido polialtico), e ésteres de resina (SILVA, 1926; COSTA, et al., 1995; ALMEIDA, SERTIÉ e SUDO-HAYASHI, 1996; FERRARI, 1998; CASCON e GILBERT, 2000; PAIVA, et al, 2004). Contudo, o fornecedor não indica no laudo de matéria-prima, a concentração dessas substâncias ou quais estão presentes no óleo.

O óleo de andiroba, segundo laudo do fornecedor, contém 49,8% de ácido oléico (IONQUÍMICA, 2000), e sendo assim, como foram utilizadas concentrações de 50 e 25% v/v desse óleo nas soluções de pré-tratamento, o conteúdo de ácido oléico veiculado nessas soluções foi equivalente a 24,2 e 12,45%, respectivamente.

O óleo de babaçu, segundo laudo do fornecedor, contém 13,6% de ácido oléico (IONQUÍMICA, 2000). Sendo assim, como foram utilizadas concentrações de 50 e 25% v/v desse óleo nas soluções de pré-tratamento, o

conteúdo de ácido oléico veiculado nessas soluções foi equivalente a 6,8 e 3,4%, respectivamente.

Niazy (1991) utilizou o ácido oléico diluído em propilenoglicol em estudos de difusão em pele dorsal de coelho, observando a ocorrência de sinergismo em relação a promoção de penetração de dihidroergotamina por essa mistura. O autor utilizou soluções de ácido oléico nas concentrações de 2, 6 e 10% v/v em propilenoglicol, obtendo os maiores valores para liberação com a concentração de ácido oléico de 6% v/v.

Cooper (1984) afirmou que a associação de ácido oléico, presente nos óleos vegetais, com propilenoglicol produz sinergismo no poder de promoção de penetração cutânea de substâncias. Larrucea e colaboradores (2001) também obtiveram maior liberação de tenoxicam em membranas de pele abdominal de rato tratadas com géis contendo esse princípio ativo associado a 20% de propilenoglicol e 15% de ácido oléico.

A necessidade de diminuição da desidratação das membranas pela solução de álcool isopropílico foi identificada em experimentos iniciais, onde na presença dessa substância associada aos óleos, ocorria rompimento das membranas, que, logo após o tratamento com a solução saturada de ácido kójico (3,9% p/v) (equivalente ao intervalo de tempo zero do experimento), provocava a liberação de ácido kójico, detectado espectrofotometricamente.

Hori, Satoh e Maibach (1990) classificaram os promotores de penetração em orgânicos e inorgânicos, e afirmaram que as misturas de promotores dessas duas classes promove sinergismo no efeito. Os autores citaram o ensaio onde uma associação desse tipo favoreceu o aumento da penetração do ácido salicílico e do metronidazol.

Essa associação também é favorável nos experimentos de difusão com muda de pele de cobra e que utilizam método de quantificação menos sensível, como o espectrofotométrico, pois aumentam o poder de penetração da substância em teste, proporcionando assim maiores quantidades liberadas e atingindo-se os limites de quantificação em intervalos de tempo menores. Contudo, deve-se incorporar o propilenoglicol também nos controles.

Kitagawa, Yokochi e Murooka (1995) avaliaram a penetração de soluções de fenol em valores de pH 7,4 e 5,0, em membrana de pele de cobaia e obtiveram maiores valores de penetração em pH ácido. Segundo os autores, isso se deve ao valor alto de pKa do fenol, ao redor de 10,0.

O ácido kójico também apresenta valor de pKa elevado, na faixa de 7,0 a 8,3 (THE MERCK Index, 2001), e desse modo, a sua utilização em veículos dermatológicos deve ser preferida naquelas onde o pH é ácido, no sentido de se favorecer a presença das formas não dissociadas, e desse modo, o aumento da penetração. Na solução aquosa saturada de ácido kójico, equivalente a concentração de 3,9% p/v, utilizada nos estudos de pré-tratamento, o pH final não foi ajustado, ficando ao redor de 4,0, favorecendo portando sua forma não-ionizada e assim, a penetração nas membranas.

Os volumes das soluções dos óleos aplicados nos pré-tratamentos das membranas, equivalente a 0,8 mL, foram estipulados tendo-se em vista uma quantidade adequada para se cobrir toda a área circular de 3,14 cm² delimitada pelos anéis de silicone, e também o mínimo de pressão exercida sobre as membranas, o que poderia ocasionar seu rompimento no decorrer dos experimentos.

6.2.2 Membranas de muda de pele de cobra

Selecionaram-se mudas de pele de cobra como membranas para os ensaios de difusão devido ao baixo custo, facilidade de obtenção e armazenamento, não necessidade de sacrifício de animais e indicações da literatura especializada (LIN, et al., 1992; HAIGH, et al., 1998).

O estrato córneo é considerado a principal barreira a penetração de substâncias através das várias outras camadas da pele (JACKSON, 1993). Entretanto, as substâncias lipofílicas conseguem penetrar e se difundir mais facilmente através desse estrato.

Como a substância despigmentante utilizada no presente experimento foi o ácido kójico, de caráter hidrofílico, e as membranas utilizadas consideradas similares a esse estrato, as condições experimentais foram

ajustadas para facilitar a penetração desse princípio ativo, através da hidratação, pois de outro modo, as concentrações a serem liberadas no fluido receptor poderiam ficar muito abaixo do limite de quantificação.

As mudas de pele de cobra foram armazenadas já formatadas, para facilitar a execução dos experimentos. O tamanho dos pedaços das mudas de pele armazenadas foi suficiente para o preparo de três membranas, já que em cada réplica dos experimentos utilizavam-se três células de difusão. Além disso, selecionaram-se somente os pedaços da parte ventral da mesma muda de pele de cobra, cuidado necessário para se manter a homogeneidade das condições experimentais.

Haigh e colaboradores (1998) verificaram que a parte dorsal das membranas de muda de pele de cobra das espécies *Pithon sebae natalensis*, *Naja melanoleuca* e *Bitis nasicomis* apresentam maior permeabilidade que a parte ventral. Segundo os autores, isso se deve ao tamanho menor das regiões de escamas ("scales") em relação aquelas de flexibilidade ("hinge") e também ao desgaste que apresentam devido ao modo como esses animais se liberam da pele, atritando-se contra superfícies rígidas, principalmente para o gênero *Phyton*.

Contudo, na seleção das partes das mudas de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, preferiu-se a parte ventral por ser a mais adequada às condições experimentais e de armazenamento, devido a área de 3,14 cm² das células de difusão e a necessidade de resistência ao peso exercido pelas amostras de solução de óleos ou formulações aplicadas. Contudo, devido ao tamanho reduzido das regiões de escamação, de aproximadamente 1 cm, as membranas obtidas, após posicionamento nas células de difusão, apresentaram as regiões de escamação e flexibilidade submetidas aos ensaios de pré-tratamento ou de difusão.

A hidratação do estrato cóceo favorece a maior facilidade de penetração de substâncias por essa barreira (JACKSON, 1993). Sendo assim, o armazenamento das mudas de pele de cobra em água, que propicia a hidratação das mesmas, é um aspecto favorável aos experimentos pois promove a maior penetração das substâncias através dessas membranas,

resultando em maiores concentrações das substâncias em teste no fluido receptor, superando-se os limites de detecção e de quantificação do método analítico.

Outra vantagem no uso de muda de pele de cobra é a ausência de pêlos, evitando-se a etapa de remoção mecânica ou elétrica dos mesmos, que pode provocar furos nas membranas (HAIGH, et al., 1998).

As membranas obtidas de muda de pele de cobra apresentaram-se irregulares, com regiões espessas, provenientes de escamação, associadas a regiões de flexibilidade, mais finas, e ambas regiões com tamanhos variáveis, de acordo com a posição do corpo da cobra utilizada. Isso ocorre devido ao atrito dessa parte com o chão durante a locomoção dos animais e também a exposição a luz solar (CHANG e ZHENG, 2003). Sendo assim, a espessura das membranas obtidas não foi avaliada, pois os valores obtidos apresentam muita variação. Para minimizar o efeito dessa variação nos experimentos, as membranas foram dispostas nas células de difusão de maneira a apresentar a região mais espessa no centro, e aquelas flexíveis, próximas às bordas.

O valor da espessura das membranas utilizadas nos experimentos de difusão são estipulados previamente, e mantidos uniformizados através do tratamento das membranas. No caso de estudos com pele humana, ou de orelha de porco, as membranas são submetidas a remoção mecânica ou elétrica dos pêlos, seguido de dermatomização, obtendo-se espessuras padronizadas. No caso da utilização das mudas de pele de cobra, esse processo fica inviável, pois as mesmas apresentam porções com a espessura pequena. Além disso, como a espessura das membranas de muda de pele de cobra utilizadas não foram medidas, os parâmetros coeficiente de partição e de difusão, que dependem dessa variável, não foram calculados.

Haigh e colaboradores (1998) avaliaram seções transversais de membranas de muda de pele de cobra, através microscopia eletrônica, e observaram os valores médios de espessura ($n = 6$) de 42 e 6 μm e 16 e 5 μm para as regiões com escamas e de flexibilidade das partes ventral e dorsal, respectivamente. Não foram encontrados furos ou poros em nenhuma das amostras avaliadas.

Durante a obtenção das mudas de pele de cobra, foram selecionadas somente as mais recentes, caracterizadas por maior umidade e flexibilidade presentes. Contudo, não foi possível a identificação exata do momento de troca de pele das cobras, e sendo assim, o período de tempo após liberação das mesmas do corpo dos animais não foi determinado.

Haigh e colaboradores (1998) avaliaram a difusão do gel de progesterona a 4% em membranas de muda de pele de cobra de diferentes espécies, e concluíram que essas membranas não são modelos para a pele humana. Contudo, as condições experimentais que os autores utilizaram foram diferentes daquelas aplicadas neste ensaio, tais como: as mudas de pele foram formatadas e armazenadas em água por aproximadamente 12 horas; o fluido receptor foi composto por uma solução de laurilsulfato de sódio a 0,5%, mantido na temperatura de 37°C e com volume de 1000 mL; a área de exposição das membranas foi de aproximadamente 5 cm². Contudo, os autores afirmaram que essas membranas são úteis na comparação de formulações e do efeito de promotores de penetração, e as mesmas comportam-se como membranas de difusão.

6.2.3 Fluido receptor

O fluido receptor utilizado foi composto por solução salina. Essa solução foi selecionada visando a maior solubilidade do ácido kójico, já que é uma substância hidrossolúvel. Além disso, a composição simples do fluido receptor favorece a ausência de substâncias interferentes para os métodos de quantificação.

Ostrosky (2001) obteve melhores perfis de liberação de alfa-tocoferol quando utilizou um fluido receptor composto por solução hidroalcoólica, em relação a uma solução de plasma. Segundo o autor, a simplicidade desse fluido e sua maior solubilidade aos compostos lipofílicos facilitaram a execução dos experimentos, evitando-se os processos de extração e separação das substâncias em análise.

O pH da solução salina ficou levemente ácido, ao redor de 6, correspondente ao pH da água destilada utilizada no seu preparo.

Lin e colaboradores (1992) utilizaram água destilada como fluido receptor para os estudos de difusão de ácido benzóico com membranas animais, entre as quais, muda e estrato córneo isolado de pele de cobra *Phyton molurus*.

A temperatura do fluido receptor foi mantida em 34°C, observando-se a maior facilidade de liberação do ácido kójico para as membranas e também a menor evaporação dessa solução saturada aplicada.

Observando-se a retirada de amostras representativas da concentração no fluido receptor, optou-se por utilizar um sistema de micropipetas automáticas com a ponteira adaptada, através da inserção de um capilar plástico de 10 cm. Isso proporcionou acesso às regiões próximas ao centro do compartimento receptor, obtendo-se amostras significativas e mais homogêneas.

As células utilizadas no sistema apresentaram volumes variáveis, de 15, 15,1 e 15,2 mL (devido ao processo de fabricação), e foram dispostas numa ordem que foi mantida até o final, para se facilitar a execução dos cálculos dos parâmetros da difusão.

6.2.4 Montagem do sistema

Os ensaios de pré-tratamento são importantes na seleção de substâncias candidatas a promotores de penetração a serem incluídas em formulações de uso tópico. Nesses estudos, as substâncias são avaliadas isoladamente, e sem o efeito que os veículos das formulações podem exercer, tais como retardar a liberação dos princípios do veículo, ou promover ação oclusiva sobre a membrana.

Durante a montagem do sistema e retirada das alíquotas houve necessidade de atenção para se evitar a formação de bolhas de ar embaixo das membranas, o que prejudica a execução do experimento.

Nas etapas de remoção das soluções de pré-tratamento também foi necessário cuidado durante a aplicação das tiras de algodão absorvente, para se evitar pressão excessiva sobre as membranas e também evitar a liberação de fragmentos de algodão.

O compartimento doador, que recebeu as soluções de óleos aplicadas nos ensaios de pré-tratamento, foi protegido com a aplicação de filme flexível (Parafilm®). Isso foi necessário para se evitar a evaporação das soluções de ácido kójico 3,9% p/v, ou das formulações, durante o período do experimento, que seguiu até 22,5 horas.

Lin e colaboradores (1992) utilizaram um sistema de difusão de duas câmaras, apresentando compartimento receptor com volume de 15,0 mL e área de membrana de 2,27 cm². Os autores aplicaram soluções de 2 mg/mL (de diclofenaco de sódio, teofilina e ácido benzóico) sobre as membranas, e retiraram alíquotas de 1 mL a cada 2 horas, que foram quantificadas espectrofotometricamente, e o experimento seguiu até 26 horas. Para cada substância analisada, os autores efetuaram quatro réplicas do experimento.

6.2.5 Ensaios com pré-tratamento

Os experimentos de difusão são executados em números de réplicas razoáveis para se obterem médias de dados significativos. No presente estudo foram utilizadas quatro réplicas para cada experimento, executadas consecutivamente na mesma semana, visando a mínima variação das condições experimentais. O número de réplicas utilizadas nos experimentos de difusão citados na literatura variam entre três (LOPES, 1999; ROLLAND, et al., 1992), quatro (LIN, et al., 1992; NIAZY, 1991; OSTRENGA, et al., 1974) e seis (HAIGH, et al., 1998; PIEMI, et al., 1998).

6.2.5.1 Soluções saturadas de ácido kójico

As soluções aquosas de ácido kójico utilizadas nos experimentos foram equivalentes a 3,9% p/v, valor esse correspondente ao máximo de

solubilização dessa substância. Isso foi necessário para se obter a maior diferença possível entre as concentrações no compartimento doador e receptor das células de difusão, criando um gradiente de concentração. Sendo assim, como a dose aplicada no compartimento doador foi a de saturação da solução, o ensaio de difusão pode ser classificado como de dose infinita.

Embora o ácido kójico seja descrito na literatura como uma substância solúvel em água (THE MERCK Index, 2001), foi necessária exposição ao banho de ultra-som para se acelerar esse processo devido a alta concentração utilizada.

6.2.5.2 Quantidade liberada no fluido receptor

Em cada intervalo de tempo de 1,5 horas, a partir da remoção das soluções dos óleos utilizadas nos ensaios de pré-tratamento e aplicação da solução saturada do despigmentante, efetuou-se a retirada de uma alíquota de 0,5 mL do compartimento receptor. Esse intervalo de tempo foi determinado para proporcionar a obtenção de concentrações suficientemente diferentes para serem quantificadas pelo método espectrofotométrico utilizado. O volume de 0,5 mL retirado em cada alíquota foi correspondente ao máximo possível de ser retirado sem provocar a introdução de bolhas no sistema.

Observando-se as tabelas 17 e 18, verifica-se que o intervalo de tempo para início da detecção de ácido kójico foi de no mínimo 3 horas, para todos os experimentos realizados. Isso ocorreu devido ao método de quantificação espectrofotométrica utilizado, que apresentou valor de 0,173 µg/mL como limite de quantificação para o ácido kójico presente nas alíquotas de 0,5 mL retiradas.

Os ensaios de pré-tratamento foram continuados até 13,5 horas para as soluções de óleo de copaíba 50% v/v porque nesse intervalo obtiveram-se quantidades de ácido kójico suficientes para a construção das curvas de liberação. Para todos os outros experimentos, houve necessidade da duração

de 22,5 horas, devido às baixas concentrações presentes no fluido receptor. Porém, em todas as réplicas e em todos os experimentos, no final, foram obtidos valores acima do limite de quantificação.

Contudo, uma formulação contendo esse princípio ativo não permanece tanto tempo em contato com a pele humana no seu uso tópico diário no tratamento de hiperpigmentações.

Para as membranas pré-tratadas com solução de óleo de copaíba, tanto a 50% v/v (P2A) quanto 25% v/v (P2B), no tempo inicial de detecção do ácido kójico, equivalente a 3 horas, foram obtidos os valores médios de 85,957 e 64,535 μg , respectivamente. Para aquelas tratadas com solução de óleo de andiroba a 50% v/v (P3A) e 25% v/v (P3B), o ácido kójico foi detectado a partir de 6 e 7,5 horas, e as quantidades liberadas médias foram de 59,655 e 69,416 μg , respectivamente. Para membranas que receberam soluções de óleo de babaçu 50% v/v (P4A) e 25% v/v (P4B), o tempo inicial de detecção foi de 7,5 horas, com as médias das quantidades liberadas de ácido kójico equivalentes a 69,416 e 55,858 μg , respectivamente. Das três soluções avaliadas nos ensaios de pré-tratamento, aquela contendo óleo de copaíba determinou tempo de início de detecção menor, e maiores quantidades liberadas no fluido receptor, e para o óleo de babaçu, ocorreu o inverso.

Como regra geral dos procedimentos dos estudos de difusão, para se garantir as denominadas "sink conditions", ou condições de drenagem ou de liberação dos princípios ativos das membranas para o fluido receptor, as quantidades liberadas das substâncias em análise não devem ser superiores a 10% da solubilidade de saturação no fluido receptor. No presente estudo, considerando-se a solução saturada a 3,9% p/v, ou 39000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido kójico, e o volume de 15,5 mL da célula de difusão com menor volume (considerando-se também o volume do anel de silicone), o valor máximo desse despigmentante a ser liberado no fluido receptor no final do experimento, mantendo-se as condições de drenagem, corresponde a 60450 μg .

Analisando-se as tabelas 17 e 18, para o ensaio com a solução de óleo de copaíba a 50% v/v (P2A), foi obtida a média de quantidade liberada de ácido kójico, equivalente a 508,505 μg , e o experimento pode ser finalizado em 13,5 horas. Para o ensaio com o mesmo óleo a 25% v/v (P2B), o tempo de 22,5 horas apresentou 541,934 μg no fluido receptor. As membranas pré-tratadas com solução de óleo de andiroba a 50 % v/v (P3A) e 25% v/v (P3B), apresentaram, no tempo de 22,5 horas, as médias das quantidades liberadas de ácido kójico equivalentes a 168,948 e 209,395 μg , respectivamente. Os ensaios com as soluções de óleo de babaçu 50% v/v (P4A) e 25% v/v (P4B) determinaram os valores médios de 154,207 e 255,136 μg de ácido kójico no tempo final de 22,5 horas, respectivamente. Pode-se notar que os ensaios de pré-tratamento com as soluções de óleo de andiroba e babaçu, nas menores concentrações, resultaram em maiores quantidades liberadas de ácido kójico no fluido receptor, porém menores quando comparados com aqueles obtidos após o pré-tratamento com as soluções de óleos de copaíba. Contudo, a condição de drenagem foi mantida durante todo o experimento.

A partir dos valores médios das quantidades liberadas após os ensaios de pré-tratamento com as soluções dos óleos, seguida da aplicação da solução aquosa do ácido kójico 3,9% p/v, e sabendo-se que a área das membranas utilizadas foi de 3,14 cm^2 , calcularam-se os valores de quantidade liberada por área. Esses valores foram utilizados na construção dos gráficos de liberação em função do tempo.

Monti e colaboradores (2002) também avaliaram óleos vegetais (melaleuca, cardamomo, melissa, mirra, laranja) como promotores de penetração do estradiol em células de difusão com membranas de pele de camundongo sem pêlo, e observaram melhor efeito para o óleo de melaleuca, contendo 1,8-cineol a 50%, α -pineno a 16,3%, d-limoneno a 6% e α -terpineol a 8,3%.

Moser e colaboradores (2001) citaram que a classe dos sesquiterpenos representa promotores de penetração que causam aumento do coeficiente de difusão das substâncias nas membranas, e segundo El-Kattan e colaboradores (2001), essas substâncias atuam na rota apolar lipídica.

O óleo de copaíba é constituído de 40 a 50% de óleo essencial e 40 a 60% de resina, apresentando basicamente terpenos, ésteres da resina e outras substâncias provenientes da essência. Entretanto os terpenos presentes nesse óleo não foram especificados nos estudos de difusão citados na literatura.

O óleo de andiroba veiculado nas soluções continha o equivalente a 24,2 e 12,45% de ácido oléico, e desse modo, essa alta concentração do promotor veiculada nas soluções pode ter dificultado a penetração do ácido kójico, correspondendo aos dados obtidos por Niazy (1991). Além disso, a presença de substâncias de maior peso molecular e que são oclusivas, como o ácido palmítico, e que determinam o aspecto semi-sólido e a necessidade de aquecimento a 40°C para incorporação nas soluções, podem ter contribuído para a menor eficácia desse óleo como promotor.

Em relação às soluções de óleo de babaçu utilizadas nos ensaios de pré-tratamento, as maiores quantidades de ácido kójico liberadas correspondem àquelas obtidas após a aplicação das soluções a 25% v/v, equivalentes ao conteúdo de 3,4% de ácido oléico veiculado, conforme laudo do fornecedor. O aumento na concentração desse óleo, equivalente ao conteúdo de ácido oléico de 6,8%, ocasionou diminuição no efeito de promoção de penetração do ácido kójico. Essa observação contudo não corresponde àquela obtida no experimento de difusão realizado por Niazy (1991), que obteve melhor efeito promotor quando utilizou 6% de ácido oléico, e a diminuição dessa concentração para 2%, proporcionou menor efeito promotor. Esse autor avaliou as propriedades promotoras do ácido oléico associado ao propilenoglicol para a substância dihidroergotamina, através de células de difusão e membranas obtidas de pele dorsal de coelhos. Após 24 horas do início do tratamento das membranas com soluções de ácido oléico equivalentes a 2, 6 e 10% v/v, foram detectadas quantidades de 6,1, 1510,9 e 366,0 µg/mL da substância em análise no fluido receptor. Os autores observaram que a melhor concentração de ácido oléico para uso como promotor de absorção nos ensaios foi aquela equivalente a 6% v/v.

Lin e colaboradores (1992) aplicaram soluções aquosas de 2 mg/mL (0,2%) de diclofenaco de sódio, teofilina e ácido benzóico sobre membranas obtidas de muda e estrato córneo de pele de cobra *Phyton molurus* e retiraram alíquotas de 1 mL do fluido receptor a cada 2 horas, para quantificação espectrofotométrica. Ao final de 26 horas, os autores obtiveram quantidades liberadas por área equivalentes a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para as duas primeiras substâncias, e 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o ácido benzóico aplicado sobre as membranas de muda de pele de cobra, os quais foram superiores àqueles obtidos com as membranas de estrato córneo isolado de pele de cobra. Esses valores estão próximos aos obtidos no presente estudo do ácido kójico, nos ensaios de pré-tratamento com as soluções do óleo de copalba a 50 e 25% v/v, equivalentes a 161,944 e 172,591 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ após 13,5 e 22,5 horas, respectivamente (tabelas 19 e 20).

6.2.5.3 Curva de liberação

As curvas de liberação foram construídas com as médias das quantidades liberadas por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico no fluido do receptor das células de difusão em função do tempo de análise da coleta da alíquota de volume de 0,5 mL (submetida a diluição para 10 mL com solução salina e quantificação espectrofotométrica). Com os pontos obtidos efetuou-se a regressão linear, calculou-se a equação e o valor do coeficiente de correlação (R^2).

As retas das médias das curvas de liberação de ácido kójico obtidas com os diferentes ensaios de pré-tratamento (soluções de óleo ou controle) podem ser analisadas quanto a posição e também quanto a inclinação. Foram obtidas 6 retas de regressão para as curvas de liberação do ácido kójico após os ensaios de pré-tratamento, sendo que apenas aquela equivalente ao ensaio com a solução controle do óleo de andiroba 50% v/v, a única cujo coeficiente de correlação ficou abaixo de 0,9.

Para os ensaios com as soluções de óleos e seus controles, que apresentavam água ao invés de óleo na composição, mas também

apresentavam o veículo álcool isopropílico:propilenoglicol (95:5) v/v, equivalentes às figuras 22 a 34, pode-se observar que as soluções dos óleos na concentração de 25% v/v (figuras 25 a 27), e para aquela com óleo de copaíba a 50% v/v (P2A), da figura 22, a liberação de ácido kójico após o pré-tratamento das membranas foi maior para os óleos em relação aos controles. Já para os ensaios de pré-tratamento com as soluções dos óleos de andiroba e babaçu a 50% v/v (P3A e P4A), referente às figuras 23 e 24, os controles promoveram maior liberação de ácido kójico através das membranas.

A inclinação das retas obtidas das curvas de liberação nos ensaios de pré-tratamento é um indicador do fluxo, isto é, quanto mais inclinada for a reta obtida, mais fácil é a liberação do ácido kójico através das membranas, e maiores são as quantidades presentes no fluido receptor. Analisando-se as figuras 22 e 25, nota-se que para os ensaios com as soluções de óleo de copaíba 50% v/v (P2A) e 25% v/v (P2B), obtiveram-se as retas com maior inclinação em relação às soluções controle. Já para os ensaios com as soluções dos óleos de andiroba e babaçu a 50% v/v (P3A e P4A), nas figuras 23 e 24, as inclinações das retas dos ensaios com as soluções dos óleos e dos controle ficaram muito próximas. Isso indica que a solução do óleo utilizado no pré-tratamento não promoveu maior liberação de ácido kójico para o fluido receptor.

Nas figuras 28 e 33, têm-se a comparação dos resultados obtidos nos ensaios de pré-tratamento das membranas com soluções dos óleos em relação às concentrações de 50 e 25%. A partir das figuras 28, 31 e 33, pode-se observar que para o pré-tratamento com óleo de copaíba, maiores quantidades de ácido kójico no fluido receptor foram obtidas nos ensaios com a solução a 50% v/v (P2A). Os ensaios com os óleos de andiroba e babaçu apresentaram maior liberação de ácido kójico nos pré-tratamentos equivalentes às soluções à 25% v/v (P3B e P4B), conforme pode-se verificar nas figuras 29 e 30.

Analisando-se a figura 31, referente ao gráfico das curvas de liberação do ácido kójico dos ensaios com as soluções dos óleos de copaíba (P2B), andiroba (P3B) e babaçu (P4B) a 50% v/v, pode-se observar que ocorreu

maior liberação para o ensaio com o óleo de copaíba. Os ensaios com as soluções contendo óleo de andiroba ou babaçu 50% v/v (P3A e P4A), determinaram praticamente o mesmo perfil de liberação.

Comparando-se o gráfico das curvas de liberação do ácido kójico da figura 32, pode-se observar que o pré-tratamento com a solução de óleo copaíba 25% v/v resultou em maior difusão do despigmentante, e que novamente os ensaios com os óleos de andiroba ou babaçu, agora a 25% v/v, determinaram praticamente o mesmo perfil de liberação.

A figura 33 contém as retas de todos os ensaios com os 3 óleos avaliados, nas concentrações de 50 e 25% v/v. Dessa figura pode-se listar de maneira decrescente quanto a capacidade de atuar como promotor de penetração do ácido kójico, as soluções dos óleos: copaíba 50%, copaíba 25%, babaçu 25%, andiroba 25%, andiroba 50% e babaçu 50%. Isso provavelmente se deve a maior concentração de terpenos na solução de óleo de copaíba a 50% v/v e menores concentrações de ácidos graxos oclusivos nas soluções dos óleos de andiroba e babaçu.

A figura 34 representa as curvas de liberação dos controles utilizados nos ensaios de pré-tratamento dos experimentos 1 a 6. Pode-se observar que os controles dos experimentos 4, 5 e 6, referentes aos pré-tratamentos com as soluções contendo álcool isopropílico:propilenoglicol 95:5 (v/v) adicionado de 25% de água destilada, determinaram retas muito próximas e de mesma inclinação. Esse mesmo comportamento foi observado também para os ensaios com os controles dos experimentos 2 e 3, referentes às soluções álcool isopropílico:propilenoglicol 95:5 (v/v) contendo 50% de água destilada, porém essas retas ficaram em posição superior aquelas com 25% de água, mas a inclinação foi muito semelhante. Desse modo, nesses experimentos controle, a velocidade de liberação do ácido kójico se manteve constante, e maiores quantidades foram liberadas com os pré-tratamentos com as soluções contendo 50% de água destilada (experimentos 2 e 3). Isso pode ter sido causado pela maior quantidade de álcool isopropílico nas soluções controle dos experimentos 4, 5 e 6, promovendo maior desidratação das membranas, e diminuindo consequentemente a sua permeabilidade.

6.2.5.4 Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência

As equações das retas foram calculadas para todos os ensaios, com exceção daquele referente ao pré-tratamento com a solução controle para o óleo de copalba 50% v/v, cujo coeficiente de correlação foi menor que 0,9.

O parâmetro tempo de latência quantifica o tempo necessário para que a liberação da substância em teste pela área de membrana aplicada se torne constante, isto é, se obtenha fluxo constante. Calculado a partir das curvas de liberação, o tempo de latência se refere ao ponto onde as retas de regressão cruzam o eixo x (tempo). Esses valores estão citados na tabela 21.

O tempo de latência se refere ao intervalo de tempo necessário para que ocorra a difusão completa da substância pelo estrato córneo (efeito reservatório), a partir do qual passa a ser liberada constantemente para as outras camadas da epiderme (BARRY, 1987). O valor ideal desse parâmetro depende da indicação da formulação. Para formulações de uso prolongado, esse tempo deve ser elevado, e para formulações tópicas que permanecem por pouco tempo na pele, como é o caso dos despigmentantes, a liberação mais rápida é desejável.

Os valores de tempo de latência no ensaio com pré-tratamento da membrana com solução de óleo de copalba 50% v/v e seu controle (P2A e P1A), foram de 1,34 e 1,02 horas. Nesse caso, a diminuição na concentração do óleo causou uma diminuição no tempo de latência do despigmentante.

Os ensaios com as soluções dos óleo de andiroba (P3B) e de babaçu (P4B) a 25% v/v, promoveram tempo de latência para o ácido kójico de 1,43 e 2,52 horas, respectivamente, sendo superiores aqueles encontrados para os ensaios com as soluções de óleo de copalba a 50 e 25% v/v.

Em relação ao ensaio com a solução de óleo de babaçu a 25% v/v (P4B), o tempo de latência calculado para o ácido kójico foi de 2,52 horas, enquanto a solução controle utilizada (P2B) determinou tempo de 0,42 h. Isso significa que o ácido kójico aplicado após o ensaio de pré-tratamento com a

solução desse óleo demorou aproximadamente 6 vezes mais até atingir fluxo constante de liberação em relação à solução controle.

Os ensaios com as soluções dos óleos de andiroba e babaçu a 50% v/v (P3A e P4A) e seus controles (P1A), e as soluções controle desses óleos a 25% v/v (P1B) determinaram valores negativos de tempo de latência para o ácido kójico. Isso ocorreu porque a reta de regressão obtida interceptou o eixo x (do tempo) no seu quadrante negativo, indicando que não houve demora para início da liberação do despigmentante das membranas após o pré-tratamento, e desse modo, não ocorreu o efeito reservatório. Isso é desejado para produtos despigmentantes, cujo tempo de contato com a pele é pequeno, mas para produtos de liberação controlada, há necessidade de efeito reservatório para a manutenção das doses terapêuticas.

6.2.5.5 Fluxo e permeabilidade

Os parâmetros fluxo e permeabilidade para o ácido kójico podem ser calculados individualmente para cada intervalo de tempo, a partir das curvas de liberação do ácido kójico em cada uma das réplicas, ou ainda a partir das curvas das médias das quantidades liberadas por área em função do tempo.

Os valores de fluxo e permeabilidade, obtidos a partir dos valores de inclinação de cada uma das retas de regressão de cada réplica em cada experimento, foram utilizados na análise estatística, para os testes F (Fisher) e t (Student), já que essas análises utilizam os dados de média e desvio-padrão nos cálculos. Já os valores de fluxo e permeabilidade média obtidos a partir dos gráficos das médias das quantidades liberadas por área pelo tempo, referente às figuras 22 a 27, não apresentam valores de média e desvio-padrão, e foram utilizados para expressar o comportamento médio das quatro réplicas dos ensaios executadas para cada experimento.

Os valores de fluxo de ácido kójico foram calculados para cada tempo de análise, através da divisão da quantidade liberada pela área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelo valor do tempo correspondente (horas). Na análise do desempenho médio do

pré-tratamento, utilizou-se o valor de fluxo médio, equivalente ao coeficiente angular (a) da reta $y = ax - b$.

Os valores de permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) foram calculados para cada tempo de análise, através da divisão do valor de fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) pelo valor da concentração da solução saturada aplicada após o pré-tratamento, na unidade de $\mu\text{g}/\text{mL}$. Na análise do desempenho global do pré-tratamento, utilizou-se o valor de permeabilidade média, equivalente ao fluxo médio dividido pelo valor da concentração da solução saturada aplicada.

Os pré-tratamentos com soluções dos óleos (SOP) de copaíba 50 e 25% v/v (P2A e P2B) e de andiroba e babaçu 25% v/v (P3B e P4B) determinaram valores médios de fluxo de ácido kójico e permeabilidade superiores aos obtidos para as correspondentes soluções aquosas controle (SAC), conforme pode-se verificar nas tabelas 22 a 25. O pré-tratamento com solução de óleo de copaíba nas concentrações de 50% ou 25% (P2A e P2B) determinou valores médios de fluxo e permeabilidade de ácido kójico equivalentes a 378 e 405% superiores aos obtidos com a solução aquosa controle, respectivamente.

Para os ensaios com os óleos de andiroba e babaçu, na concentração de 25% v/v (P3B e P4B), esses valores foram 162 e 175% superiores aqueles obtidos com os pré-tratamentos com as soluções aquosas controle.

Para os ensaios com as soluções de óleo de andiroba e babaçu 50% v/v (P3A e P4A), os valores médios de fluxo e permeabilidade de ácido kójico nos ensaios de pré-tratamento com as soluções aquosas controle foi superior. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito oclusivo dessas soluções oleosas, ocasionando diminuição na velocidade de liberação do ácido kójico através das membranas.

Para o ensaio com a solução de óleo de babaçu a 50% v/v os valores médios de fluxo e permeabilidade de ácido kójico foram 74% menores em relação a solução controle. Já para o ensaio com a solução de óleo de andiroba a 50% v/v esse parâmetro não foi calculado porque o valor do coeficiente de correlação ficou abaixo de 0,9.

Comparando-se os valores de fluxo de ácido kójico obtidos nos ensaios de pré-tratamento com os controles, listados nas tabelas 22 e 23, nota-se diminuição no valor desse parâmetro com a maior quantidade de álcool isopropílico e menor quantidade de água veiculada. Para os ensaios de pré-tratamento com as soluções controle de óleo de copaíba e babaçu nas concentrações de 50 e 25% v/v de água destilada, os valores de fluxo de ácido kójico passaram de 3,361 para 1,961 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e de 2,628 para 2,292 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, correspondentes a diminuição de 58,34% e 87,21%, respectivamente. Isso também foi observado para os ensaios com as soluções dos óleos de copaíba a 50 e 25% v/v, passando de 12,717 para 7,949 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, cuja redução foi equivalente a 62,51%.

Kang, Jun e McCall (2000) avaliaram o efeito da associação de mentol 50% e solução aquosa de propilenoglicol 40% na absorção de lidocaína em células de difusão com membranas de muda de pele de cobra, e obtiveram os valores de fluxo 35,7 e 316,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

O comportamento de promotor de penetração para o ácido kójico das soluções dos óleos avaliadas nos ensaios de difusão com pré-tratamento fica mais evidente quando comparado aos controles utilizados. Para tal, compara-se as quantidades liberadas da substância em estudo com aquelas obtidas durante os ensaios com os controles dos óleos, nas mesmas condições experimentais.

O fator de promoção da liberação foi utilizado como parâmetro para se relacionar o fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico obtido após o pré-tratamento com as soluções dos óleos ou as soluções controle. Esses valores estão listados na tabela 26.

Os maiores fatores de promoção para liberação do ácido kójico foram obtidos para os ensaios de pré-tratamento com as soluções de óleo de copaíba 50 e 25% v/v, equivalentes a 3,78 e 4,05, muito próximos entre si. Contudo, da tabela 22 e 23 pode-se observar que a diminuição na concentração do óleo de copaíba utilizado no pré-tratamento não aumentou o fluxo do ácido kójico através da membrana.

O fator de promoção para liberação do ácido kójico obtido no ensaio de pré-tratamento com solução de óleo de andiroba a 50% v/v não foi calculado porque o fator de correlação da reta, equivalente a 0,8092, ficou abaixo do coeficiente de correlação mínimo, de 0,9. Para a concentração de 25% v/v, o fator resultou em 1,62, menor que aquele obtido com o ensaio de pré-tratamento com a solução de óleo de copaíba na mesma concentração.

Para o ensaio de pré-tratamento com solução de óleo de babaçu, os fatores de promoção para liberação do ácido kójico foram equivalentes a 0,74 e 1,75, respectivamente para as concentrações de 50 e 25% v/v. Nesse caso, a diminuição da concentração do óleo promoveu uma melhora no desempenho, porém ainda muito inferior ao fator obtido no pré-tratamento com as soluções de óleo de copaíba. O fator de promoção menor obtido no ensaio de pré-tratamento com a solução de óleo mais concentrada está relacionado com o efeito oclusivo dos mesmos, através da formação de uma película sobre as membranas e diminuição do contato com a solução do ácido kójico. Ostrosky (2001) também obteve esse efeito quando aumentou em 25 vezes a concentração de alfa-tocoferol como princípio ativo veiculado em géis.

Nos ensaios de pré-tratamento com óleo babaçu 50% v/v (P4A), o valor médio de fluxo e permeabilidade de ácido kójico obtido após a aplicação da solução aquosa controle foi 1,35 vezes superior aqueles calculado para a solução do óleo, conforme as tabelas 22 a 25. Os valores médios de fluxo e permeabilidade do ácido kójico após pré-tratamento efetuado com solução de óleo de andiroba 50% v/v (P3A) não foi calculado porque a reta de regressão apresentou coeficiente de correlação inferior a 0,9.

Comparando-se os valores médios de fluxo de ácido kójico nos ensaios de pré-tratamento com as soluções aquosa controle, em todos os experimentos, da tabela 22 e 23, observa-se que se apresentaram numa faixa de 1,919 até 3,361 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Para a permeabilidade média do ácido kójico, nas tabelas 24 e 25, após os pré-tratamentos com essas mesmas soluções, os valores estiveram compreendidos entre 0,492 e 0,862 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$.

Através da análise das figuras 35 e 36, pode-se classificar as soluções de óleo utilizadas nos ensaios de pré-tratamento em relação a média de fluxo e permeabilidade de ácido kójico na seguinte ordem decrescente: copaíba 50% v/v (experimento 1), copaíba 25% v/v (experimento 4), babaçu 25% v/v (experimento 6), andiroba 25% v/v (experimento 5), andiroba 50% v/v (experimento 2) e babaçu 50% v/v (experimento 3).

Lin e colaboradores (1992) obtiveram valores de permeabilidade 2 a 4 vezes superiores para diclofenaco de sódio, teofilina e ácido benzóico (2 mg/mL ou 0,2%, em soluções aquosas) em ensaios com muda de pele de cobra *Phyton molurus* em relação ao estrato córneo isolado desses animais.

6.2.5.6 Análise estatística

Os valores de fluxo e permeabilidade de ácido kójico são parâmetros dos ensaios de difusão obtidos a partir das retas dos gráficos de liberação, podendo ser calculados a partir do gráfico das médias das quantidades liberadas por área, equivalentes às réplicas analisadas em conjunto porém sem a estimativa do desvio-padrão, ou a partir das médias dos valores obtidos em cada réplica do experimento, com desvio-padrão calculado.

A análise de variância, através dos valores de F (Fisher) e t (Student), compara conjunto de dados, suas médias e desvio-padrão. Sendo assim, foi necessária a utilização das médias valores de fluxo e permeabilidade obtidos dos gráficos de cada réplica efetuada, que apresentam os valores de desvio-padrão, ao invés daqueles obtidos dos gráficos elaborados com as médias da quantidade liberada por área, cujos valores médios extrapolados das retas de regressão não apresentam desvio-padrão. Além disso, como a permeabilidade foi calculada a partir dos valores de fluxo, os valores de F e t para esses parâmetros foram equivalentes.

Os valores calculados de fluxo e permeabilidade de ácido kójico nos ensaios com as soluções de óleos e seus controles apresentaram coeficiente de variação na faixa de 5,79 até 68,55% (tabela 33). Para o cálculo das médias de concentração de ácido kójico liberado no fluido receptor, todos os

valores foram considerados, mesmo quando em determinados experimentos apenas uma das quatro réplicas apresentava concentração do despigmentante acima do limite de quantificação, esse dado foi considerado.

Os experimentos de difusão utilizando membranas animais ou humana apresentam largas faixas de coeficiente de variação, daí a necessidade de grande número de réplicas. Lopes (1999) em seus estudos de difusão com diclofenaco de sódio sob pré-tratamento com soluções de papaína a 0,20% em membranas de pele humana, obteve uma faixa de coeficiente de variação de 6,9 até 73,2% nos valores das quantidades liberadas.

Segundo Ostrenga e colaboradores (1974) as variações são causadas pelas diferenças de espessura e tortuosidade características das membranas utilizadas, e não significam necessariamente maior ou menor efeito de promoção de penetração quando se consideram apenas as soluções de igual composição e concentração aplicadas. Segundo o autor, esses valores de desvio-padrão não devem ser indicados nos gráficos das curvas de liberação.

6.2.5.6.1 Análise de variância – Teste F

O teste F compara a precisão de dois conjuntos de dados, através da comparação de suas variâncias (BUSSAB e MORETTIN, 1985; BOTTER, et al., 1996). Essa análise foi efetuada para se avaliar a segurança dos dados obtidos de fluxo e permeabilidade de ácido kójico, quanto a variação entre os diferentes experimentos, e entre cada experimento e seu controle utilizado.

Analisando-se a tabela 34, verifica-se diferença estatisticamente significativa nas variâncias para fluxo e permeabilidade de ácido kójico nos ensaios com a solução de óleo de copaíba a 50% (P2A) em relações a todos os outros ensaios de pré-tratamento efetuados, inclusive em relação a solução do mesmo óleo na concentração de 25% (P2B). Isso significa que esse ensaio apresentou variação diferente nos resultados obtidos em relação a todos os outros, cujo coeficiente de variação, da tabela 33, foi de 38,70%.

Os valores de fluxo e permeabilidade de ácido kójico obtidos no ensaio de com as soluções de óleo de copaíba 25% v/v (P2B) apresentaram

coeficiente de variação de 7,63%, da tabela 33, e sua variabilidade não diferiu daquelas obtidas para esses parâmetros nos demais ensaios de pré-tratamento, conforme a avaliação do teste F.

O ensaio de pré-tratamento com soluções de óleo de andiroba a 50% v/v (P3A) apresentou variância estatisticamente diferente e coeficiente de variação inferior para fluxo e permeabilidade de ácido kójico em relação àquela obtida nos ensaios com soluções de óleo de copaíba na concentração de 50% (P2A), e coeficiente de variação maior quando comparado com os parâmetros obtidos nos ensaios com as soluções de óleo de babaçu a 25% v/v (P4B). Em relação ao ensaio com o mesmo óleo nas soluções a 25% v/v (P3B), o valor médio de fluxo e permeabilidade de ácido kójico obtido após o pré-tratamento diferiu estatisticamente apenas daquele obtido nos pré-tratamentos com soluções de óleo de copaíba 50% v/v e babaçu 50 ou 25% v/v (P2A, P4A e P4B).

O ensaio com soluções de óleo de babaçu a 50% v/v (P4A) apresentou variância estatisticamente diferente para fluxo e permeabilidade de ácido kójico apenas quando comparado com os valores obtidos após o pré-tratamento com a solução de óleo de copaíba a 50% v/v (P2A).

Na tabela 35 têm-se os valores da variância para fluxo médio obtido com ensaios de pré-tratamento com as soluções controles, e nota-se que não ocorreu diferença estatisticamente significativa para variância de fluxo e permeabilidade de ácido kójico apenas entre os ensaios referentes aos experimentos 1 em relação aos experimentos 4, 5 e 6, referentes ao pré-tratamento com soluções de álcool isopropílico:propilenoglicol (95:5) adicionadas de 50 ou 25% de água destilada. Sendo assim, excetuando-se o experimento 1, pode-se considerar que os ensaios de pré-tratamento com as soluções controle foram homogêneos durante todos os experimentos.

A tabela 36 compara os valores de F de cada experimento em relação ao seu controle utilizado. Pode-se observar que apenas o experimento 1, do ensaio com solução de óleo de copaíba 50% v/v, e o 6, com solução de óleo de babaçu a 25% v/v, apresentaram diferenças estatisticamente significativas para fluxo e permeabilidade de ácido kójico. Isso indica que as soluções e

seus controles, embora submetidas as mesmas condições experimentais, não apresentaram variação da mesma forma. Isso se deve principalmente às membranas de muda de pele de cobra utilizadas, que apresentam-se irregulares na superfície.

6.2.5.6.2 Comparação de médias – Teste t

O teste t compara as médias obtidas em dois experimentos (BUSSAB e MORETTIN, 1985; BOTTER, et al., 1996). Essa análise foi efetuada para comparar o efeito das concentrações das soluções dos óleos, utilizadas nos ensaios de pré-tratamento, entre si e entre as demais em relação ao fluxo e permeabilidade de ácido kójico. Na interpretação dos resultados, considera-se que os valores de t tabelados quando menores que os valores de t calculados, indicam uma diferença estatística significativa entre as médias.

Os ensaios de pré-tratamento com soluções de óleo de copaíba a 50 e 25% v/v (P2A e P2B) determinaram diferenças estatisticamente significativas para média de fluxo e permeabilidade de ácido kójico em relação a todos os outros experimentos de pré-tratamento efetuados, e não apresentaram diferenças nas médias desses parâmetros quando comparados entre si, conforme pode-se observar na tabela 34, confirmando-se assim a superioridade na promoção da penetração do ácido kójico com essas soluções. Essa observação concorda com os fatores de promoção, da tabela 26, cujos valores calculados foram muito próximos.

Os ensaios de pré-tratamento com as soluções de óleo de andiroba a 50 e 25% v/v (P3A e P3B) determinaram valores médios de fluxo e permeabilidade de ácido kójico estatisticamente diferentes apenas daquele efetuado no ensaio de pré-tratamento com as soluções de óleo de copaíba a 50 e 25% v/v (P2A e P2B), com valores inferiores, e não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si ou aos valores médios desses parâmetros obtidos nos outros ensaios de pré-tratamento efetuados, conforme pode se observar na tabela 34.

O valor médio de fluxo e permeabilidade de ácido kójico obtido no ensaio de pré-tratamento com solução de óleo de babaçu a 50% v/v (P4A) foi estatisticamente diferente daqueles valores obtidos nos ensaios efetuados com as soluções dos óleos de copaíba a 50 e 25% v/v (P2A e P2B), com valores inferiores, e daquele obtido nos ensaios com óleo de babaçu 25% v/v (P4B), com valor superior, conforme pode-se observar na tabela 34.

A tabela 36 compara os valores de t de cada experimento em relação ao seu controle utilizado. Pode-se observar que apenas os experimentos 1 e 4, referentes aos ensaios com solução de óleo de copaíba 50 e 25% v/v, e o 6, com solução de óleo de babaçu a 25% v/v, apresentaram diferenças estatisticamente significativas para fluxo de ácido kójico frente às soluções controle, indicando a superioridade desses ensaios quanto a esses parâmetros.

Na tabela 35 tem-se os valores de t obtidos na comparação das médias de fluxo e permeabilidade de ácido kójico obtidos com ensaios de pré-tratamento com as soluções controle, e nota-se que ocorreram diferenças estatisticamente significativas apenas entre o experimento 1, referente ao pré-tratamento com soluções de álcool isopropílico:propilenoglicol (95:5) adicionadas de 50% de água destilada, em relação aos ensaios dos controles dos experimentos 4, 5 e 6, que apresentavam 25% de água destilada na composição. Isso pode ter ocorrido devido a diferenças constitucionais das membranas utilizadas nesse experimento. Contudo, para os experimentos 2 (P3A), 3 (P4A), 4 (P1A) e 6 (P4B), as soluções controle utilizadas nos ensaios não determinaram diferenças estatisticamente significativas nas médias de fluxo e permeabilidade, quando comparadas entre si.

Da análise das médias pelo teste t pode-se observar que o ensaio de pré-tratamento com o óleo de babaçu a 25% v/v em solução de álcool isopropílico:propilenoglicol (95:50) foi o que apresentou menores valores estatisticamente significativos para fluxo e permeabilidade do ácido kójico, e o óleo de copaíba a 50% v/v, com o mesmo veículo e condições experimentais, apresentou os maiores valores estatisticamente significantivos desses parâmetros.

6.2.6 Estudos das formulações

6.2.6.1 Preparo das formulações

Os veículos utilizados no preparo de formulações apresentam fundamental importância, e a composição destes deve proporcionar a liberação do princípio ativo até a pele (OSTRENGA, et al., 1974). Desse modo, os veículos devem solubilizar as substâncias em questão, mas de maneira limitada para não aprisioná-las nesse meio.

Segundo Ostrenga e colaboradores (1974) na seleção dos veículos deve se observar a solubilização dos princípios ativos de modo a se manter um coeficiente de partição adequado a saída destes das formulações. Além disso, os outros componentes da formulação não devem interferir no processo de liberação. Piemi e colaboradores (1998) avaliaram o perfil de liberação de glicose marcada radioativamente e veiculada em emulsões simples (O/A e A/O) e múltiplas (A/O/A) em membranas de pele de rato, através de ensaios de difusão com dose infinita e finita. Após 10 horas de tratamento, os autores observaram os maiores valores de quantidade permeada por área e fluxo para as emulsões O/A, e maior retenção da glicose no estrato córneo para emulsões A/O.

As formulações dermatológicas são em geral prescritas para serem aviadas em farmácias de manipulação. Esses estabelecimentos recebem as prescrições e preparam as formulações utilizando-se de alguns tipos de veículos previamente preparados e estocados até o momento do uso. Não realizam testes de liberação dos princípios ativos das formulações, e tampouco se preocupam com a inclusão de substâncias promotoras de penetração naquelas prescrições nas quais isso é desejado, como é o caso dos despigmentantes. Sendo assim, selecionou-se o creme "lanette", muito utilizado em farmácia de manipulação para incorporação de princípios ativos, e de maior capacidade de incorporar as elevadas concentrações do óleo de copaíba.

Majmudar e colaboradores (1998) testaram a estabilidade do ácido kójico frente a vários tipos de formulação e observaram as melhores condições naquelas com maior quantidade de óleo, em relação aquelas contendo maior quantidade de água. Sendo assim, é desejável uma maior quantidade de óleos adicionada no creme "lanette" para se veicular o ácido kójico.

Como o ácido kójico é uma substância solúvel em água, a adição de maior quantidade de óleo na formulação produz um meio menos solúvel para essa substância, diminuindo assim a tendência dessa ficar retida. Caso esse óleo apresente propriedades de promoção de penetração na pele, melhores serão as chances de se obter um produto despigmentante adequado. Ostrosky (2001) obteve maior sucesso na liberação de alfa-tocoferol em géis quando trocou o propilenoglicol, na concentração de 10% p/p, pela mesma concentração de etanol.

O óleo de copaíba é constituído de 40 a 50% de óleo essencial e 40 a 60% de resina, apresentando basicamente terpenos, ésteres da resina e outras substâncias provenientes da essência. El-Kattan e colaboradores (2001) avaliaram o efeito promotor de penetração de géis contendo 2% de terpenos (fenchona, timol, nerolidol e d-limonemo) em células de difusão com membranas de pele de camundongo sem pelo, para substâncias de diferentes valores de lipofilicidade (nicardipina, hidro cortisona, carbamazepina e tamoxifeno) e obtiveram maiores quantidades liberadas para o nerolidol. Esse autores afirmaram que os promotores de penetração dessa classe são mais efetivos para substâncias hidrofílicas. Sendo assim, a inclusão desse óleo em formulações com ácido kójico é favorável no sentido de se aumentar a penetração desse despigmentante.

As formulações foram preparadas inicialmente isentas dos óleos e do ácido kójico, os quais foram adicionados num segundo momento, com auxílio do gral de porcelana e pistilo, de modo similar ao que ocorre nas farmácias de manipulação. Procedeu-se ao armazenamento das formulações em frascos de vidro para se facilitar o processo de tratamento e retirada das amostras a serem aplicadas nas membranas.

Na formulação do veículo foi incluído o oleato de decila, como agente emoliente, a glicerina como umectante, o óleo mineral como fase interna apolar. O sistema conservante não foi incluído para se evitar a liberação desses no fluido receptor, os quais podem atuar como interferentes na análise quantitativa espectrofotométrica. Sendo assim, as formulações dos veículos foram preparadas em pequena quantidade, suficiente para as quatro réplicas de cada experimento, armazenadas em geladeira e adicionadas do óleo de copaíba e do despigmentante ácido kójico no momento da execução dos experimentos. Após a série de réplicas do experimento, as mesmas foram descartadas adequadamente em lixo químico.

O pH das formulações pode propiciar alteração da queratina do estrato córneo, porém em valores superiores a 10, ocasionando alteração da conformação da mesma com aumento da difusão de água nesse estrato (BARRY, 1987). O valor de pH final das formulações contendo ácido kójico 3,9% p/p não foi ajustado, e ficou ao redor de 4,0, conforme pode-se verificar na tabela 32, favorecendo portando sua forma não-ionizada e também a penetração nas membranas, já que essa substância apresenta pKa entre 7,9 e 8,3 (KITAGAWA, YOKOCHI e MUROOKA, 1995; THE MERCK Index, 2001). Contudo, para a formulação utilizada como controle de interferentes, que apresentava óleo de copaíba mas isenta de ácido kójico, o pH foi ajustado até o valor 4,0 com solução de ácido cítrico.

A concentração de ácido kójico nas formulações, correspondente à 3,9% p/p, foi superior ao máximo permitido para o uso em cosméticos, isto é, 2%, porém permitida para produtos medicamentosos indicados através de prescrição médica. Essa concentração foi utilizada para garantia do estabelecimento do maior gradiente de concentração possível entre o compartimento doador e receptor das células de difusão, mantendo-se assim a dose infinita.

As amostras das formulações foram aplicadas após aquecimento em banho de água quente, até 40°C, com auxílio de pipetas graduadas. Isso foi necessário para uma melhor distribuição das formulações sobre as membranas, observando-se a cobertura de toda a área disponível,

equivalente a $3,14 \text{ cm}^2$. O volume de 1,0 mL aplicado foi suficiente para essa cobertura, e adequado para se evitar pressão excessiva sobre as mesmas, sendo correspondente a aproximadamente 0,8 g.

6.2.6.2 Quantidade liberada no fluido receptor

Observando-se a tabela 27, verifica-se que o intervalo de tempo onde se iniciou a detecção de ácido kójico foi de no mínimo 3 horas, para o ensaio com a formulação controle contendo água 50% v/p (F1B, réplica 1), e para a formulação contendo óleo de copaíba 50% v/p (F1A, réplicas 1 e 4) o ácido kójico passou a ser detectado no fluido receptor a partir do tempo de 4,5 horas.

Para o experimento 8, referente ao ensaio com a formulação contendo óleo de copaíba 25% v/p (F2A – réplica 2), o ácido kójico foi detectado após 4,5 horas do início do tratamento. A formulação controle, contendo água (F2B – réplicas 1 e 4) 25% v/p liberou ácido kójico no fluido receptor após 7,5 horas. De maneira similar aos estudos de pré-tratamento, isso ocorreu devido ao método de quantificação utilizado, com valor de $0,173 \mu\text{g/mL}$ como limite de quantificação.

As formulações contendo despigmentantes geralmente permanecem em contato com a pele durante o uso por no máximo 8 horas, sendo retiradas por lavagem (OSTROSKY, 2001). Contudo, os experimentos de difusão com as formulações foram continuados até 22,5 horas, intervalo necessário devido à baixa liberação de ácido kójico das formulações.

Analisando-se a tabela 27, em relação aos ensaios com as formulações contendo óleo de copaíba a 50% v/v (F1A), e seus controles contendo a mesma concentração de água destilada (F1B), nos intervalos de tempo iniciais, foram obtidas as médias das quantidades liberadas de ácido kójico de 63,451 e $57,658 \mu\text{g}$, e no final do experimento, os valores de 323,190 e $193,957 \mu\text{g}$, respectivamente. Já para os ensaios com as formulações contendo óleo de copaíba, a 25% v/v (F2A), e seus controles (F2B), foram obtidas inicialmente as médias de quantidade liberada de ácido

kójico iguais a 59,655 e 76,494 μg , e no final do experimento, 178,222 e 144,097 μg , respectivamente. Como o valor máximo de concentração de ácido kójico obtido no tempo de 22,5 horas foi inferior a 60450 μg (quantidade equivalente a 10% da solubilidade do ácido kójico no fluido receptor com volume de 15,5 mL), para todos os experimentos, as condições de drenagem foram mantidas.

Os valores médios de quantidade liberada de ácido kójico no fluido receptor observados no final dos ensaios de difusão com as formulações foram menores que aqueles correspondentes aos ensaios de pré-tratamento com as soluções, equivalentes a 508,505 e 541,934 μg (tabelas 17 e 18) para as soluções de óleo de copaíba a 50 e 25% v/v, respectivamente. Essa observação corresponde àquelas citadas na literatura, podendo ser causada pela afinidade do despigmentante pela formulação (COOPER, 1984; OSTROSKY, 2001). Ostrosky (2001) observou maior liberação de alfa-tocoferol em soluções com etanol ou propilenoglicol 0,2 e 5,0% p/p em relação a formulações de géis.

A partir dos valores médios das quantidades liberadas de ácido kójico nos ensaios de difusão com as formulações dos óleos ou água, e adicionadas de ácido kójico 3,9% p/p, e os tempos de coleta das alíquotas para quantificação, e sabendo-se que a área das membranas de muda de pele de cobra utilizadas foi de 3,14 cm^2 , calcularam-se os valores de quantidade média de ácido kójico liberada por área. Esse valor foi utilizado na construção das curvas de liberação da quantidade por área em função do tempo, referentes as figuras 37 a 40.

6.2.6.3 Curva de liberação

As curvas de liberação foram construídas com as quantidades médias liberadas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido kójico para o fluido do receptor das células de difusão em função do tempo de análise, as retas de regressão e os coeficientes de correlação (R^2) foram determinados, e as posições e inclinação das mesmas, em relação à formulação com óleo e formulações

controle, foram avaliadas. Todas as retas obtidas apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,9.

Através da análise das curvas de liberação (figuras 37 e 38), pode-se observar que para os ensaios de difusão das formulações com óleo na concentração de 50% v/v apresentaram-se mais inclinadas e em posição superior àquelas correspondentes aos ensaios com os controles. Já para os ensaios com as formulações contendo 25% do óleo, a inclinação das retas ficou próxima às retas dos ensaios com os controles, e em posição levemente superior. Como a inclinação das retas de regressão das curvas de liberação é um indicador do fluxo, pode-se constatar maior facilidade de liberação do ácido kójico através das membranas para a formulação com óleo de copaíba 50% v/p.

Na figura 39, têm-se a comparação dos ensaios de difusão com os tratamentos das formulações com óleos em relação às concentrações de 50 e 25% v/p. Observa-se que para o tratamento das membranas com formulações contendo óleo de copaíba, os maiores valores de ácido kójico no fluido receptor foram obtidos nos ensaios com concentração de 50% v/p (F2A). Isso também ocorreu para os ensaios de pré-tratamento com as soluções desse mesmo óleo e nessa mesma concentração utilizada.

A figura 40 contém as retas de liberação dos ensaios com as formulações controle, contendo 50 e 25% v/p de água (F1B e F2B), e ácido kójico 3,9% p/p. Nota-se que as mesmas apresentam-se praticamente paralelas, e aquela contendo 50% v/p de água destilada em posição superior.

6.2.6.4 Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência

O parâmetro tempo de latência, referente ao tempo necessário para que ocorra liberação constante do ácido kójico através das membranas, isto é, obtenha-se fluxo constante, foi calculado a partir das curvas de liberação.

As formulações com óleo de copaíba 50% v/p determinaram o tempo de 0,46 horas, inferior a aquele calculado para os ensaios de pré-tratamento

com solução do mesmo óleo e na mesma concentração, equivalente a 1,02 horas, conforme pode se observar na tabela 29.

Os ensaios de difusão com as formulações com óleo de copaíba 25% v/p e seu controles, e com a formulação controle para o óleo de copaíba a 50% v/p apresentaram valores negativos de tempo de latência de ácido kójico. Isso ocorreu porque a reta de regressão obtida interceptou o eixo x (do tempo) no seu quadrante negativo, e nessas soluções não houve demora para início da liberação do despigmentante das membranas após o tratamento, e desse modo, não ocorreu o efeito reservatório.

6.2.6.5 Fluxo e permeabilidade

Os ensaios de difusão com formulações dos óleos (FOP) de copaíba 50 e 25% v/p (F1A e F2A) determinaram valores médios de fluxo e permeabilidade de ácido kójico equivalentes a 4,548 e 2,176 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, e 1,166 e 0,558 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$, respectivamente. Esses valores foram superiores àqueles obtidos para os ensaios com as correspondentes formulações aquosas controle (FAC), na ordem de 2,17 e 1,18 vezes.

Do gráfico da figura 39 pode-se observar que dentre as formulações de óleo de copaíba testadas, em relação a média de fluxo e permeabilidade para o ácido kójico, aquela contendo 50% v/p de óleo determinou valor superior ao daquela contendo 25% v/p do mesmo óleo.

Ostrosky (2001) comparou os resultados dos ensaios de difusão com formulações de alfa-tocoferol em géis e soluções, nas concentrações de 0,2 e 5,0% p/p, e obteve menores valores de liberação desse princípios ativos para as formulações com maior concentração. Segundo o autor, isso ocorreu devido ao efeito oclusivo que esse princípio em altas concentrações exerceu sobre as membranas tratadas.

Lopes (1999) utilizou óleo de pequi associado a papaína em formulações de géis com diclofenaco de sódio 1,5 % p/p em experimentos de difusão utilizando membrana de pele humana, e obteve maiores valores de

fluxo e permeabilidade do diclofenaco de sódio para aquelas formulações contendo concentrações do óleo equivalentes a 5% de ácido oléico.

Embora os parâmetros coeficiente de partição e difusão do ácido kójico em relação as membranas não tenham sido avaliados, devido a irregularidade de espessura das membranas obtidas de mudas de pele de cobra, a análise dos parâmetros médios de fluxo e permeabilidade de ácido kójico nos ensaios de pré-tratamento com as soluções de óleo de copaíba 50 e 25% v/v (P2A e P2B), listados nas tabelas 22 a 25, em relação aos ensaios de difusão com formulações de mesma concentração de óleo e de ácido kójico (F1A e F2A), listados nas tabelas 30 e 31, sugere maior retenção do despigmentante nessas formulações.

Os valores obtidos de fluxo médio de ácido kójico para os ensaios de pré-tratamento com as soluções de óleo de copaíba a 50 e 25% v/v (P2A e P2B – experimentos 1 e 4) foram 12,717 e 7,949 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (tabelas 22 e 23), e para permeabilidade, 3,261 e 2,038 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$ (tabelas 24 e 25), respectivamente. Para os ensaios de difusão com as formulações F1A e F2A os valores obtidos foram 4,548 e 2,176 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para fluxo, e os valores de 1,166 e 0,558 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$ para permeabilidade de ácido kójico, respectivamente (tabelas 30 e 31). Sendo assim, o pré-tratamento com as soluções P2A e P2B determinou valores médios de fluxo de ácido kójico proporcionalmente maiores que aqueles obtidos nos ensaios de difusão com as formulações F1A e F2A, nas razões de 2,80 e 3,65, respectivamente.

Os fatores de promoção de liberação de ácido kójico obtidos para os ensaios com as formulações com óleo de copaíba nas concentrações de 50 e 25% v/v foram 2,16 e 1,18, respectivamente. Desse modo, a diminuição da concentração do óleo promotor na formulação foi seguida pela diminuição também no efeito promotor, o que não ocorreu durante os ensaios de pré-tratamento com as soluções desse óleo (P2A e P2B) nas mesmas concentrações, cujos valores foram equivalentes a 3,78 e 4,05, respectivamente (tabela 26). Além disso, os valores de fator de promoção diminuíram comparando-se os ensaios com os óleos em solução e os ensaios com as formulações. Isso ocorreu devido a influência do veículo sobre o

despigmentante, que passou a ficar retido e também sobre as membranas, através de oclusão com os óleos presentes nas formulações

Para os ensaios de difusão com as formulações controle F1B e F2B com água a 50 e 25% v/p, os valores de fluxo médio de ácido kójico obtidos foram 2,098 e 1,842 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (tabela 30), representando diminuição de 87,8% no fluxo com o menor conteúdo de água da formulação controle. Em relação as soluções controle dos ensaios de pré-tratamento do óleo de copaíba, a diminuição de fluxo médio foi de 58,34% com a menor quantidade de água da solução, e os valores obtidos foram 3,3611 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para fluxo e 1,961 $\text{cm}\times 10^{-4}/\text{h}$ para permeabilidade.

O creme "lanette" utilizado apresentou em sua composição uma mistura de 14% de óleos não-promotores, como o oleato de decila e vaselina líquida, e 12% de cera lanette, formada a partir de uma mistura de álcoois graxos saturados de cadeia longa, o cetílico e o estearílico, com 16 e 17 carbonos, respectivamente (BRANDÃO, 2000). Desse modo, essa formulação lipófila, mesmo contendo o óleo de copaíba, pode ter formado uma película sobre as membranas e diminuído assim a liberação de ácido kójico, o que não ocorreu com as soluções de óleo e álcool isopropílico:propilenoglicol (95:5 v/v) utilizadas nos ensaios de difusão com pré-tratamento.

6.2.6.6 Análise Estatística

Os valores detectados e calculados de ácido kójico no fluido receptor, para os ensaios de difusão com as formulações de óleo de copaíba e seus controles apresentaram coeficiente de variação na faixa de 26,81 até 68,55% (tabela 33).

Lopes (1999) em seus estudos de difusão de formulações de géis com diclofenaco de sódio 1,50% p/p associado a papaína 0,2% p/p em membranas de pele humana, obteve uma faixa de coeficiente de variação de 29,4 até 80,1%.

6.2.6.6.1 Análise de variância – Teste F

Observando-se as tabelas 34 e 36, nota-se que os ensaios de difusão com as formulações de creme com ácido kójico 3,9% p/p e adicionadas de 50 ou 25% v/p de óleo de copaíba (F1A e F2A) ou de água destilada (F1B e F2B) não apresentaram entre si variância estatisticamente diferente quanto aos valores de fluxo e permeabilidade de ácido kójico. A comparação dos ensaios com as formulações e os controles respectivos, da tabela 36, na média dos experimentos, também não apresentou variação estatisticamente significativa para esses parâmetros.

Sendo assim, esses experimentos podem ser comparados pois estatisticamente foram submetidos às mesmas variações experimentais.

6.2.6.6.2 Comparação de médias – Teste t

Da tabela 34, pode-se verificar que os valores médios de fluxo e permeabilidade de ácido kójico para os ensaios de difusão com as formulações de creme "lanette" com ácido kójico 3,9% p/p e adicionadas de óleo de copaíba a 50% v/p (F1A) foram estatisticamente diferentes daqueles ensaios onde utilizaram-se as formulações com o mesmo óleo, mas na concentração de 25% v/p (F2A), comprovando a melhor eficácia de promotor para o creme com óleo de copaíba a 50% v/p.

Analisando-se a tabela 35 pode-se notar que os ensaios controles (experimentos 7 e 8), correspondentes ao creme "lanette" adicionado de 3,9% p/p de ácido kójico e 50 ou 25% v/p de água destilada, respectivamente, não apresentaram diferença entre si em relação aos valores médios de fluxo ou permeabilidade de ácido kójico.

A análise da tabela 36 indica que as médias dos valores de fluxo e permeabilidade de ácido kójico determinado nos ensaios de difusão com as formulações e seus controles não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Contudo, a proximidade dos valores de t calculado e tabelado

para o ensaio com a formulação F1A, contendo óleo de copaíba 50% v/p, indica uma tendência desta a ser diferente de seu controle. Isso pode ter sido causado pela variabilidade nos resultados devido principalmente às membranas de muda de pele de cobra, cujas etapas de obtenção e seleção de animais não foram controladas. Desse modo, os ensaios devem ser efetuados observando-se o controle dessas variáveis.

7

CONCLUSÕES

- 7.1 O óleo de copaíba nas concentrações de 50 e 25% apresentou maior atividade de promotor de penetração do ácido kójico em solução aquosa a 3,9% p/v nas membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*. Os óleos de andiroba e babaçu não apresentaram essa atividade nas concentrações de 50%.
- 7.2 As formulações contendo ácido kójico 3,9% p/p e adicionadas de óleo de copaíba 50% v/p foram aproximadamente duas vezes mais eficazes que aquelas contendo 25% v/p do mesmo óleo, na liberação do ácido kójico nos ensaios de difusão em membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*.
- 7.3 O ácido kójico a 3,9% p/p apresentou afinidade pela formulação contendo óleo de copaíba, apresentando menor liberação quando incorporado nesse veículo.
- 7.4 O ácido kójico pode ser analisado quantitativamente com precisão e exatidão por espectrofotometria no ultravioleta a 268 nm em solução salina de concentrações acima de 0,173 µg/mL na faixa de 0,20 a 4,00 µg/mL.

APÊNDICE

A seguir estão apresentados os dados experimentais obtidos em cada réplica de cada experimento, na seguinte forma: valores de absorbância da radiação ultravioleta a 269 nm das alíquotas de 0,5 mL retiradas do fluido receptor (a cada 1,5 horas) diluídas para 10 mL com solução salina (tabelas 37 a 44); quantidades liberadas de ácido kójico, calculadas a partir das absorbâncias, observando-se o limite de quantificação (tabelas 45 a 52); gráficos das quantidades liberadas de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) (figuras 43 a 74); valores de tempo de latência em horas, equações das retas e coeficiente de correlação (R^2) (tabelas 53 a 60); valores de fluxo de ácido kójico, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ calculados a partir das quantidades liberadas por área e o tempo de análise, e os valores de fluxo médio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) (tabelas 61 a 68); valores calculados de permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) e também os valores de permeabilidade média ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) (tabelas 69 a 76).

TABELA 37 - Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 1

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Tratamento	Absorbância			
			Réplicas			
			1	2	3	4
0	P2A	SS	0,0002	0,0009	0,0010	0,0005
	P1A	AK	0,0008	0,0008	0,0001	0,0003
	P2A	AK	0,0006	0,0006	0,0004	0,0006
1,5	P2A	SS	0,0003	0,0006	0,0010	0,0006
	P1A	AK	0,0022	0,0027	0,0018	0,0030
	P2A	AK	0,0014	0,0040	0,0028	0,0060
3,0	P2A	SS	0,0009	0,0010	0,0014	0,0009
	P1A	AK	0,0023	0,0028	0,0018	0,0020
	P2A	AK	0,0028	0,0129	0,0038	0,0154
4,5	P2A	SS	0,0005	0,0009	0,0003	0,0011
	P1A	AK	0,0028	0,0081	0,0047	0,0078
	P2A	AK	0,0048	0,0314	0,0115	0,0278
6,0	P2A	SS	0,0001	0,0010	0,0009	0,0013
	P1A	AK	0,0030	0,0094	0,0059	0,0087
	P2A	AK	0,0088	0,0478	0,0205	0,0417
7,5	P2A	SS	0,0010	0,0006	0,0006	0,0001
	P1A	AK	0,0039	0,0114	0,0060	0,0106
	P2A	AK	0,0143	0,0596	0,0277	0,0506
9,0	P2A	SS	0,0007	0,0010	0,0004	0,0010
	P1A	AK	0,0080	0,0148	0,0096	0,0148
	P2A	AK	0,0234	0,0641	0,0336	0,0630
10,5	P2A	SS	0,0011	0,0005	0,0008	0,0009
	P1A	AK	0,0093	0,0164	0,0134	0,0172
	P2A	AK	0,0290	0,0810	0,0439	0,0960
12,0	P2A	SS	0,0010	0,0001	0,0009	0,0008
	P1A	AK	0,0120	0,0187	0,0150	0,0237
	P2A	AK	0,0356	0,0912	0,0502	0,1026
13,5	P2A	SS	0,0009	0,0010	0,0002	0,0007
	P1A	AK	0,0178	0,0252	0,0185	0,0312
	P2A	AK	0,0418	0,1003	0,0621	0,1282

AK – solução de ácido kójico 3,9% p/v, SS – solução salina

TABELA 38 - Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 2

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Tratamento	Absorbância			
			Réplicas			
			1	2	3	4
0	P2A	SS	0,0006	0,0003	-0,0001	0,0006
	P1A	AK	0,0014	0,0007	0,0004	0,0010
	P2A	AK	0,0009	0,0008	0,0008	0,0007
1,5	P2A	SS	0,0012	0,0005	0,0006	0,0010
	P1A	AK	0,0026	0,0057	0,0036	0,0044
	P2A	AK	0,0028	0,0026	0,0038	0,0026
3,0	P2A	SS	0,0007	0,0007	0,0004	0,0005
	P1A	AK	0,0028	0,0059	0,0053	0,0077
	P2A	AK	0,0013	0,0010	0,0046	0,0040
4,5	P2A	SS	-0,0001	0,0010	0,0010	0,0006
	P1A	AK	0,0031	0,0062	0,0038	0,0073
	P2A	AK	0,0020	0,0020	0,0060	0,0080
6,0	P2A	SS	0,0004	0,0011	0,0009	0,0009
	P1A	AK	0,0062	0,0076	0,0039	0,0092
	P2A	AK	0,0024	0,0021	0,0050	0,0093
7,5	P2A	SS	0,0008	0,0002	0,0006	0,0008
	P1A	AK	0,0146	0,0092	0,0042	0,0161
	P2A	AK	0,0038	0,0022	0,0064	0,0122
9,0	P2A	SS	0,0010	0,0004	0,0009	0,0011
	P1A	AK	0,0150	0,0184	0,0062	0,0174
	P2A	AK	0,0064	0,0022	0,0092	0,0138
10,5	P2A	SS	0,0019	0,0009	0,0002	0,0006
	P1A	AK	0,0152	0,0195	0,0073	0,0221
	P2A	AK	0,0087	0,0025	0,0125	0,0149
12,0	P2A	SS	0,0006	0,0010	0,0008	0,0009
	P1A	AK	0,0164	0,0219	0,0088	0,0293
	P2A	AK	0,0109	0,0030	0,0159	0,0173
22,5	P2A	SS	0,0009	0,0011	0,0009	0,0010
	P1A	AK	0,0422	0,0421	0,0151	0,0503
	P2A	AK	0,0371	0,0112	0,0276	0,0374

AK – solução de ácido kójico 3,9% p/v, SS – solução salina

TABELA 39 - Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 3

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Tratamento	Absorbância			
			Réplicas			
			1	2	3	4
0	P2A	SS	0,0003	0,0009	0,0009	0,0002
	P1A	AK	0,0003	0,0003	0,0002	0,0006
	P2A	AK	0,0007	0,0010	0,0003	0,0005
1,5	P2A	SS	0,0009	0,0012	0,0005	0,0004
	P1A	AK	0,0021	0,0045	0,0031	0,0013
	P2A	AK	0,0026	0,0004	0,0019	0,0020
3,0	P2A	SS	0,0012	0,0005	0,0003	0,0012
	P1A	AK	0,0054	0,0089	0,0047	0,0049
	P2A	AK	0,0014	0,0007	0,0054	0,0038
4,5	P2A	SS	0,0005	-0,0001	0,0008	0,0008
	P1A	AK	0,0065	0,0138	0,0055	0,0050
	P2A	AK	0,0010	0,0010	0,0040	0,0059
6,0	P2A	SS	0,0002	0,0003	0,0010	0,0006
	P1A	AK	0,0047	0,0147	0,0052	0,0069
	P2A	AK	0,0016	0,0027	0,0044	0,0073
7,5	P2A	SS	0,0012	0,0007	0,0006	-0,0001
	P1A	AK	0,0035	0,0167	0,0092	0,0101
	P2A	AK	0,0049	0,0040	0,0041	0,0111
9,0	P2A	SS	0,0003	0,0012	0,0009	-0,0004
	P1A	AK	0,0047	0,0194	0,0126	0,0132
	P2A	AK	0,0078	0,0088	0,0051	0,0125
10,5	P2A	SS	0,0010	0,0006	0,0003	0,0005
	P1A	AK	0,0063	0,0249	0,0144	0,0179
	P2A	AK	0,0087	0,0116	0,0089	0,0159
12,0	P2A	SS	0,0012	0,0004	0,0010	0,0010
	P1A	AK	0,0086	0,0285	0,0168	0,0203
	P2A	AK	0,0094	0,0138	0,0101	0,0162
22,5	P2A	SS	0,0011	0,0009	0,0004	0,0009
	P1A	AK	0,0138	0,0497	0,0401	0,0489
	P2A	AK	0,0196	0,0317	0,0200	0,0310

AK – solução de ácido kójico 3,9% p/v, SS – solução salina

TABELA 40 - Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 4

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Tratamento	Absorbância			
			Réplicas			
			1	2	3	4
0	P2A	SS	0,0006	-0,0004	-0,0001	0,0004
	P1A	AK	0,0003	-0,0002	0,0006	0,0005
	P2A	AK	0,0007	0,0005	0,0006	0,0007
1,5	P2A	SS	0,0001	0,0010	0,0006	0,0009
	P1A	AK	0,0013	0,0026	0,0027	0,0029
	P2A	AK	0,0032	0,0010	0,0026	0,0016
3,0	P2A	SS	0,0009	0,0009	0,0010	0,0006
	P1A	AK	0,0015	0,0047	0,0039	0,0033
	P2A	AK	0,0102	0,0006	0,0005	0,0003
4,5	P2A	SS	0,0010	0,0006	0,0014	0,0012
	P1A	AK	0,0020	0,0043	0,0056	0,0042
	P2A	AK	0,0143	0,0027	0,0013	0,0015
6,0	P2A	SS	0,0010	0,0010	0,0011	0,0008
	P1A	AK	0,0026	0,0063	0,0066	0,0051
	P2A	AK	0,0213	0,0054	0,0051	0,0037
7,5	P2A	SS	0,0015	0,0009	0,0010	0,0004
	P1A	AK	0,0041	0,0069	0,0059	0,0059
	P2A	AK	0,0289	0,0089	0,0072	0,0097
9,0	P2A	SS	0,0012	0,0004	0,0014	0,0006
	P1A	AK	0,0040	0,0086	0,0107	0,0089
	P2A	AK	0,0398	0,0129	0,0181	0,0115
10,5	P2A	SS	0,0011	0,0007	0,0010	0,0011
	P1A	AK	0,0039	0,0089	0,0124	0,0125
	P2A	AK	0,0688	0,0177	0,0278	0,0206
12,0	P2A	SS	0,0006	0,0006	0,0012	0,0010
	P1A	AK	0,0036	0,0124	0,0141	0,0136
	P2A	AK	0,0850	0,0228	0,0306	0,0298
22,5	P2A	SS	0,0012	0,0004	0,0007	0,0006
	P1A	AK	0,0163	0,0292	0,0198	0,0318
	P2A	AK	0,1129	0,0841	0,0891	0,0906

AK – solução de ácido kójico 3,9% p/v, SS – solução salina

TABELA 41 - Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 5

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Tratamento	Absorbância			
			Réplicas			
			1	2	3	4
0	P2A	SS	0,0006	0,0009	-0,0003	0,0001
	P1A	AK	-0,0001	0,0003	0,0010	0,0002
	P2A	AK	0,0005	0,0005	0,0003	-0,0002
1,5	P2A	SS	0,0008	0,0012	0,0006	0,0012
	P1A	AK	0,0017	0,0045	0,0025	0,0031
	P2A	AK	0,0015	0,0051	0,0034	0,0025
3,0	P2A	SS	0,0010	0,0010	0,0010	0,0005
	P1A	AK	0,0020	0,0061	0,0030	0,0030
	P2A	AK	0,0013	0,0041	0,0028	0,0019
4,5	P2A	SS	0,0004	0,0010	0,0001	0,0007
	P1A	AK	0,0040	0,0073	0,0045	0,0034
	P2A	AK	0,0019	0,0061	0,0037	0,0021
6,0	P2A	SS	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
	P1A	AK	0,0063	0,0082	0,0061	0,0035
	P2A	AK	0,0033	0,0082	0,0045	0,0011
7,5	P2A	SS	0,0001	0,0005	0,0012	0,0014
	P1A	AK	0,0077	0,0082	0,0058	0,0042
	P2A	AK	0,0035	0,0111	0,0075	0,0038
9,0	P2A	SS	0,0002	0,0005	0,0015	0,0009
	P1A	AK	0,0102	0,0079	0,0090	0,0089
	P2A	AK	0,0127	0,0130	0,0087	0,0073
10,5	P2A	SS	0,0007	0,0008	0,0010	0,0010
	P1A	AK	0,0104	0,0100	0,0116	0,0102
	P2A	AK	0,0158	0,0180	0,0103	0,0105
12,0	P2A	SS	0,0012	0,0011	0,0004	0,0005
	P1A	AK	0,0110	0,0108	0,0149	0,0126
	P2A	AK	0,0170	0,0197	0,0110	0,0122
22,5	P2A	SS	0,0013	0,0010	0,0002	0,0009
	P1A	AK	0,0307	0,0242	0,0185	0,0199
	P2A	AK	0,0391	0,0562	0,0199	0,0267

AK – solução de ácido kójico 3,9% p/v, SS – solução salina

TABELA 42 - Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 6

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Tratamento	Absorbância			
			Réplicas			
			1	2	3	4
0	P2A	SS	0,0003	0,0010	-0,0001	-0,0001
	P1A	AK	0,0003	0,0006	0,0003	0,0006
	P2A	AK	0,0004	0,0008	0,0003	0,0004
1,5	P2A	SS	0,0012	0,0004	-0,0003	0,0007
	P1A	AK	0,0013	0,0010	0,0036	0,0030
	P2A	AK	0,0012	0,0029	0,0015	0,0005
3,0	P2A	SS	0,0004	0,0007	0,0004	0,0009
	P1A	AK	0,0015	0,0048	0,0040	0,0035
	P2A	AK	0,0021	0,0040	0,0049	0,0011
4,5	P2A	SS	0,0010	0,0002	0,0010	0,0014
	P1A	AK	0,0020	0,0061	0,0049	0,0039
	P2A	AK	0,0036	0,0052	0,0048	0,0001
6,0	P2A	SS	0,0006	0,0010	0,0011	0,0010
	P1A	AK	0,0047	0,0060	0,0077	0,0041
	P2A	AK	0,0086	0,0071	0,0058	0,0006
7,5	P2A	SS	0,0005	0,0008	0,0006	0,0006
	P1A	AK	0,0050	0,0082	0,0070	0,0056
	P2A	AK	0,0097	0,0076	0,0086	0,0077
9,0	P2A	SS	0,0002	0,0010	0,0010	0,0009
	P1A	AK	0,0067	0,0085	0,0115	0,0063
	P2A	AK	0,0159	0,0082	0,0123	0,0091
10,5	P2A	SS	0,0004	0,0009	0,0008	0,0005
	P1A	AK	0,0087	0,0103	0,0129	0,0082
	P2A	AK	0,0215	0,0115	0,0145	0,0126
12,0	P2A	SS	0,0008	0,0004	0,0009	0,0010
	P1A	AK	0,0100	0,0126	0,0153	0,0112
	P2A	AK	0,0286	0,0132	0,0162	0,0163
22,5	P2A	SS	0,0010	0,0012	0,0010	0,0007
	P1A	AK	0,0279	0,0371	0,0201	0,0241
	P2A	AK	0,0479	0,0412	0,0458	0,0394

AK – solução de ácido kójico 3,9% p/v, SS – solução salina

TABELA 43 -Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo ou não 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50% v/p de óleo de copaíba (F1A e F1C) ou contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50% v/p de água destilada (F1B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 7

Tempo (horas)	Tratamento	Absorbância			
		Réplicas			
		1	2	3	4
0	F1C	0,0001	0,0004	0,0009	0,0001
	F1B	0,0006	0,0009	0,0008	0,0002
	F1A	0,0010	0,0002	0,0010	0,0006
1,5	F1C	0,0041	0,0016	0,0039	0,0006
	F1B	0,0071	0,0013	0,0030	0,0016
	F1A	0,0050	0,0004	0,0020	0,0017
3,0	F1C	0,0041	0,0021	0,0042	0,0013
	F1B	0,0090	0,0059	0,0039	0,0018
	F1A	0,0078	0,0061	0,0036	0,0069
4,5	F1C	0,0048	0,0032	0,0048	0,0021
	F1B	0,0100	0,0054	0,0046	0,0026
	F1A	0,0108	0,0082	0,0043	0,0092
6,0	F1C	0,0045	0,0042	0,0036	0,0029
	F1B	0,0140	0,0074	0,0049	0,0049
	F1A	0,0156	0,0120	0,0051	0,0128
7,5	F1C	0,0040	0,0046	0,0050	0,0033
	F1B	0,0160	0,0112	0,0068	0,0062
	F1A	0,0183	0,0158	0,0072	0,0169
9,0	F1C	0,0047	0,0040	0,0042	0,0043
	F1B	0,0178	0,0119	0,0071	0,0068
	F1A	0,0224	0,0184	0,0082	0,0213
10,5	F1C	0,0050	0,0048	0,0045	0,0050
	F1B	0,0201	0,0150	0,0086	0,0093
	F1A	0,0275	0,0195	0,0092	0,0255
12,0	F1C	0,0048	0,0042	0,0048	0,0046
	F1B	0,0217	0,0156	0,0102	0,0111
	F1A	0,0311	0,0225	0,0122	0,0291
22,5	F1C	0,0045	0,0046	0,0046	0,0058
	F1B	0,0419	0,0456	0,0186	0,0238
	F1A	0,0685	0,0576	0,0275	0,0658

TABELA 44 -Absorbância de ácido kójico das alíquotas de 0,5 mL de fluido receptor diluídas para 10 mL com solução salina, obtidas nos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo ou não 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 25% v/p de óleo de copaíba (F2A e F2C) ou contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 25% v/p de água destilada (F2B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 8

Tempo (horas)	Tratamento	Absorbância			
		Réplicas			
		1	2	3	4
0	F2C	0,0009	0,0009	0,0008	0,0008
	F2B	0,0006	0,0005	0,0011	0,0005
	F2A	0,0010	0,0008	0,0006	0,0012
1,5	F2C	0,0020	0,0035	0,0030	0,0012
	F2B	0,0009	0,0021	0,0021	0,0037
	F2A	0,0015	0,0042	0,0032	0,0042
3,0	F2C	0,0028	0,0042	0,0026	0,0015
	F2B	0,0026	0,0026	0,0031	0,0037
	F2A	0,0020	0,0063	0,0040	0,0042
4,5	F2C	0,0042	0,0047	0,0020	0,0022
	F2B	0,0048	0,0040	0,0031	0,0061
	F2A	0,0031	0,0093	0,0040	0,0062
6,0	F2C	0,0054	0,0034	0,0019	0,0031
	F2B	0,0068	0,0041	0,0049	0,0068
	F2A	0,0062	0,0096	0,0065	0,0082
7,5	F2C	0,0045	0,0046	0,0020	0,0051
	F2B	0,0091	0,0041	0,0051	0,0073
	F2A	0,0080	0,0132	0,0080	0,0109
9,0	F2C	0,0041	0,0030	0,0026	0,0060
	F2B	0,0105	0,0039	0,0057	0,0098
	F2A	0,0101	0,0147	0,0101	0,0115
10,5	F2C	0,0052	0,0045	0,0020	0,0052
	F2B	0,0117	0,0065	0,0118	0,0112
	F2A	0,0106	0,0185	0,0137	0,0125
12,0	F2C	0,0054	0,0044	0,0041	0,0054
	F2B	0,0213	0,0088	0,0139	0,0142
	F2A	0,0167	0,0212	0,0152	0,0153
22,5	F2C	0,0042	0,0042	0,0044	0,0052
	F2B	0,0396	0,0138	0,0214	0,0209
	F2A	0,0286	0,0374	0,0223	0,0287

TABELA 45 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão realizados com membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 1

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	---	---	---	---
	P2A	---	79,178	---	92,736
4,5	P1A	---	---	---	---
	P2A	---	182,028	71,585	162,936
6,0	P1A	---	59,814	---	56,041
	P2A	56,943	276,684	122,674	243,413
7,5	P1A	---	72,508	---	68,076
	P2A	88,584	349,226	165,554	299,174
9,0	P1A	---	93,091	60,891	92,832
	P2A	140,698	384,218	202,629	375,454
10,5	P1A	59,275	104,563	83,319	108,615
	P2A	175,402	487,233	264,584	565,592
12,0	P1A	75,724	120,083	94,549	146,905
	P2A	216,497	556,832	306,625	618,259
13,5	P1A	109,344	158,632	116,294	191,706
	P2A	256,563	622,228	280,124	775,105

--- - não calculado

TABELA 46 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão realizados com membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 2

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	—	—	—	—
	P3A	—	—	—	—
4,5	P1A	—	—	—	—
	P3A	—	—	—	—
6,0	P1A	—	—	—	58,736
	P3A	—	—	—	59,654
7,5	P1A	87,834	58,736	—	97,800
	P3A	—	—	—	77,281
9,0	P1A	92,805	110,193	—	107,879
	P3A	—	—	59,112	88,359
10,5	P1A	96,767	119,592	—	136,504
	P3A	56,401	—	78,891	97,002
12,0	P1A	106,152	136,186	56,580	179,413
	P3A	70,128	—	99,782	112,884
22,5	P1A	248,304	249,112	92,342	297,927
	P3A	214,390	69,958	156,273	225,171

— - não calculado

TABELA 47 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão realizados com membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 3

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	—	57,119	—	—
	P4A	—	—	—	—
4,5	P1A	—	85,354	—	—
	P4A	—	—	—	—
6,0	P1A	—	92,881	—	—
	P4A	—	—	—	—
7,5	P1A	—	106,490	58,736	63,585
	P4A	—	—	—	69,416
9,0	P1A	—	124,218	78,939	82,328
	P4A	—	56,943	—	79,219
10,5	P1A	—	157,499	91,109	110,228
	P4A	56,401	73,941	57,485	100,110
12,0	P1A	55,503	181,492	106,822	126,546
	P4A	61,993	88,169	65,824	104,777
22,5	P1A	85,302	300,946	235,572	284,459
	P4A	119,226	187,920	121,551	188,131

— - não calculado

TABELA 48 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão realizados com membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 4

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	—	—	—	—
	P2B	64,535	—	—	—
4,5	P1B	—	—	—	—
	P2B	88,825	—	—	—
6,0	P1B	—	—	—	—
	P2B	129,551	—	—	—
7,5	P1B	—	—	—	—
	P2B	174,739	57,485	—	61,824
9,0	P1B	—	55,502	66,818	57,119
	P2B	239,136	81,009	107,378	73,554
10,5	P1B	—	58,898	78,121	78,349
	P2B	403,575	109,561	163,402	125,185
12,0	P1B	—	79,589	89,717	86,729
	P2B	503,606	140,570	183,682	178,929
22,5	P1B	96,995	172,553	123,161	187,444
	P2B	669,886	477,240	506,515	514,097

— - não calculado

TABELA 49 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão realizados com membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 5

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
4,5	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
6,0	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
7,5	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	69,416	—	—
9,0	P1B	64,124	—	57,658	57,119
	P3B	78,093	81,931	56,401	—
10,5	P1B	67,257	63,047	73,516	65,955
	P3B	97,392	111,586	66,874	66,162
12,0	P1B	72,580	69,378	93,596	80,943
	P3B	106,922	124,207	72,743	77,489
22,5	P1B	180,929	143,744	115,862	122,750
	P3B	230,003	325,848	123,202	158,525

— - não calculado

TABELA 50 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão realizados com membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), nas quais foi aplicada solução de ácido kójico a 3,9% p/v, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 6

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	—	—	—	—
	P4B	—	—	—	—
4,5	P1B	—	—	—	—
	P4B	—	—	—	—
6,0	P1B	—	—	—	—
	P4B	55,858	—	—	—
7,5	P1B	—	—	—	—
	P4B	63,603	—	55,858	—
9,0	P1B	—	—	71,129	—
	P4B	99,195	—	77,703	58,570
10,5	P1B	56,041	64,663	80,953	—
	P4B	132,604	71,585	92,051	79,416
12,0	P1B	64,843	79,129	96,407	69,513
	P4B	175,116	83,085	104,069	101,951
22,5	P1B	163,319	213,620	125,209	141,254
	P4B	285,015	237,506	267,685	230,335

— - não calculado

TABELA 51 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou de 50% v/p de água destilada (F1B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 7.

Tempo (horas)	Tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	F1B	57,658	—	—	—
	F1A	—	—	—	—
4,5	F1B	64,895	—	—	—
	F1A	67,789	—	—	59,112
6,0	F1B	88,470	—	—	—
	F1A	95,979	74,297	—	80,518
7,5	F1B	101,958	69,513	—	—
	F1A	113,610	97,271	—	105,257
9,0	F1B	114,715	75,513	—	—
	F1A	139,299	114,394	—	132,332
10,5	F1B	130,477	94,566	55,503	59,275
	F1A	171,119	123,831	59,112	159,081
12,0	F1B	142,863	100,684	65,903	70,874
	F1A	195,685	143,762	77,264	163,302
22,5	F1B	255,755	265,330	113,223	141,520
	F1A	404,176	338,294	162,639	387,651

— - não calculado

TABELA 52 -Quantidade ácido kójico liberada no fluido receptor dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referentes às réplicas 1 a 4 do experimento 8.

Tempo (horas)	Tratamento	Quantidade liberada (µg)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	F2B	—	—	—	—
	F2A	—	—	—	—
4,5	F2B	—	—	—	—
	F2A	—	59,655	—	—
6,0	F2B	—	—	—	—
	F2A	—	63,181	—	—
7,5	F2B	58,197	—	—	—
	F2A	—	84,656	—	68,332
9,0	F2B	67,606	—	—	61,967
	F2A	63,993	95,364	63,993	73,762
10,5	F2B	76,180	—	72,746	71,499
	F2A	68,743	118,805	85,554	81,464
12,0	F2B	130,224	56,580	86,394	89,893
	F2A	103,948	136,936	96,349	99,102
22,5	F2B	232,808	86,337	129,503	128,743
	F2A	171,661	228,746	137,772	174,708

— - não calculado

FIGURA 43 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 1 do experimento 1

FIGURA 44 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 2 do experimento 1

FIGURA 45 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 3 do experimento 1

FIGURA 46 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 4 do experimento 1

FIGURA 47 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 1 do experimento 2

FIGURA 48 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 2 do experimento 2

FIGURA 49 - Quantidade liberada de ácido fólico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido fólico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 3 do experimento 2

FIGURA 50 - Quantidade liberada de ácido fólico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido fólico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 4 do experimento 2

FIGURA 51 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 1 do experimento 3

FIGURA 52 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 2 do experimento 3

FIGURA 53 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 3 do experimento 3

FIGURA 54 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente à réplica 4 do experimento 3

FIGURA 55 - Quantidade liberada de ácido fólico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido fólico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 1 do experimento 4

FIGURA 56 - Quantidade liberada de ácido fólico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido fólico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 2 do experimento 4

FIGURA 57 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 3 do experimento 4

FIGURA 58 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 4 do experimento 4

FIGURA 59 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 1 do experimento 5

FIGURA 60 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 2 do experimento 5

FIGURA 61 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 3 do experimento 5

FIGURA 62 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 4 do experimento 5

FIGURA 63 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 1 do experimento 6

FIGURA 64 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 2 do experimento 6

FIGURA 65 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 3 do experimento 6

FIGURA 66 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico a 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente à réplica 4 do experimento 6

FIGURA 67 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou 50% v/p de água destilada (F1B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente à réplica 1 do experimento 7

FIGURA 68 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou de 50% v/p de água destilada (F1B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente à réplica 2 do experimento 7

FIGURA 69 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou de 50% v/p de água destilada (F1B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente à réplica 3 do experimento 7

FIGURA 70 - Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou de 50% v/p de água destilada (F1B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente à réplica 4 do experimento 7

FIGURA 71 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente à réplica 1 do experimento 8

FIGURA 72 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente à réplica 1 do experimento 8

FIGURA 73 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) para as membranas tratadas com creme "lanette" contendo 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, referente à réplica 3 do experimento 8

FIGURA 74 -Quantidade liberada de ácido kójico por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas), reta, equação e coeficiente de correlação (R^2) para as membranas tratadas com creme "lanette" contendo 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B) e adicionados de 3,9% p/p de ácido kójico, referente à réplica 4 do experimento 8

TABELA 53 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência dos ensaios de difusão com solução aquosa de ácido kójico a 3,9% p/v em membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 1

Réplica	Pré-Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	P1A	$Y = 5,3152 x - 37,844$	0,9623	7,12
	P2A	$Y = 8,5929 x - 34,169$	0,9974	3,98
2	P1A	$Y = 3,9326 x - 6,0345$	0,9579	1,53
	P2A	$Y = 16,030 x - 15,302$	0,9915	0,95
3	P1A	$Y = 3,7672 x - 14,113$	0,9922	3,75
	P2A	$Y = 10,559 x - 26,162$	0,9852	2,48
4	P1A	$Y = 5,6451 x - 19,786$	0,9516	3,50
	P2A	$Y = 20,463 x - 44,112$	0,9727	2,16

TABELA 54 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência dos ensaios de difusão com solução aquosa de ácido kójico a 3,9% p/v em membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 2

Réplica	Pré-Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	P1A	$Y = 3,6035 x - 4,0773$	0,9641	1,13
	P3A	$Y = 4,2602 x - 27,712$	0,9987	6,50
2	P1A	$Y = 3,6947 x - 2,5258$	0,9658	0,68
	P3A	—	—	—
3	P1A	$Y = 1,0847 x + 5,0031$	1,0000	- 4,61
	P3A	$Y = 2,3895 x - 0,0885$	0,9736	0,04
4	P1A	$Y = 4,5038 x - 4,0516$	0,9775	0,90
	P3A	$Y = 3,1839 x - 0,7679$	0,9950	0,24

— - não calculado

TABELA 55 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência dos ensaios de difusão com solução aquosa de ácido kójico a 3,9% p/v em membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 3

Réplica	Pré-Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	P1A	$Y = 0,9038 x + 6,8299$	1,0000	- 7,56
	P4A	$Y = 1,6926 x - 0,1641$	0,9988	0,10
2	P1A	$Y = 3,9994 x + 6,534$	0,9911	- 1,63
	P4A	$Y = 3,0601 x - 8,9083$	0,9996	2,91
3	P1A	$Y = 3,7512 x - 9,7595$	0,9983	2,60
	P4A	$Y = 1,6966 x + 0,5452$	1,0000	- 0,32
4	P1A	$Y = 4,7066 x - 15,397$	0,9992	3,27
	P4A	$Y = 2,5078 x + 3,6538$	0,9945	- 1,46

TABELA 56 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência dos ensaios de difusão com solução aquosa de ácido kójico a 3,9% p/v em membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 4

Réplica	Pré-Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	P1B	—	—	—
	P2B	$Y = 10,869 x - 11,378$	0,9022	1,05
2	P1B	$Y = 2,8511 x - 9,3059$	0,9941	3,26
	P2B	$Y = 9,2075 x - 58,102$	0,9888	6,31
3	P1B	$Y = 1,2422 x + 11,718$	0,9633	- 9,43
	P2B	$Y = 9,3693 x - 49,974$	0,9971	5,33
4	P1B	$Y = 3,0143 x - 8,079$	0,9972	2,68
	P2B	$Y = 9,974 x - 61,942$	0,9946	6,21

— - não calculado

TABELA 57 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência dos ensaios de difusão com solução aquosa de ácido kójico a 3,9% p/v em membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 5

Réplica	Pré-Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	P1B	$Y = 2,9134 x - 8,6868$	0,9804	2,98
	P3B	$Y = 3,5840 x - 7,5871$	0,9980	2,12
2	P1B	$Y = 2,1836 x - 3,4371$	0,9980	1,57
	P3B	$Y = 5,5940 x - 23,393$	0,9927	4,18
3	P1B	$Y = 1,1956 x + 10,980$	0,8320	—
	P3B	$Y = 1,5436 x + 4,5768$	0,9980	- 2,96
4	P1B	$Y = 1,4959 x + 5,8217$	0,9781	- 3,89
	P3B	$Y = 2,4537 x - 4,7271$	1,0000	1,93

— - não calculado

TABELA 58 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência dos ensaios de difusão com solução aquosa de ácido kójico a 3,9% p/v em membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 6

Réplica	Pré-Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	P1B	$Y = 2,8986 x - 13,308$	0,9983	4,59
	P4B	$Y = 4,5355 x - 7,9568$	0,9620	1,75
2	P1B	$Y = 3,9996 x - 22,052$	0,9993	5,51
	P4B	$Y = 4,5067 x - 25,968$	0,9972	5,76
3	P1B	$Y = 1,1871 x + 13,728$	0,9349	- 11,56
	P4B	$Y = 4,5279 x - 17,644$	0,9935	3,90
4	P1B	$Y = 2,1759 x - 3,9735$	1,0000	1,83
	P4B	$Y = 4,0149 x - 16,759$	0,9991	4,17

TABELA 59 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência médio (horas) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou de 50% v/p de água destilada (F1B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente às réplicas 1 a 4 do experimento 7

Réplica	Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	F1B	$Y = 3,2621 x + 7,5069$	0,9976	- 2,30
	F1A	$Y = 5,9832 x - 7,5077$	0,9971	1,25
2	F1B	$Y = 4,3344 x - 14,739$	0,9816	3,40
	F1A	$Y = 5,1294 x - 10,368$	0,9845	2,02
3	F1B	$Y = 1,4963 x + 2,4637$	0,9970	- 1,65
	F1A	$Y = 2,6893 x - 8,5968$	0,9975	3,20
4	F1B	$Y = 2,1680 x - 3,6804$	0,9998	1,70
	F1A	$Y = 5,8683 x - 9,9846$	0,9981	1,70

TABELA 60 -Equação da reta, coeficiente de correlação (R^2) e tempo de latência médio (horas) dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente às réplicas 1 a 4 do experimento 8

Réplica	Tratamento	Equação da reta	R^2	Tempo de latência (horas)
1	F2B	$Y = 3,8226 x - 11,029$	0,9661	2,88
	F2A	$Y = 2,5331 x - 1,6859$	0,9609	0,66
2	F2B	$Y = 0,8722 x + 7,5528$	1,000	- 8,66
	F2A	$Y = 3,1034 x + 3,8999$	0,9914	- 1,26
3	F2B	$Y = 1,4330 x + 9,1457$	0,9863	- 6,38
	F2A	$Y = 1,5592 x + 9,4974$	0,9368	- 6,09
4	F2B	$Y = 1,5017 x + 7,7603$	0,9572	- 5,17
	F2A	$Y = 2,3311 x + 3,0074$	0,9940	- 1,29

TABELA 61 -Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 1

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	---	---	---	---
	P2A	---	8,405	---	9,844
4,5	P1A	---	---	---	---
	P2A	---	12,882	5,066	11,531
6,0	P1A	---	3,175	---	2,975
	P2A	3,022	14,686	6,511	12,920
7,5	P1A	---	3,079	---	2,891
	P2A	3,761	14,829	7,030	12,704
9,0	P1A	---	3,294	2,155	3,285
	P2A	4,979	13,596	7,170	13,286
10,5	P1A	1,798	3,171	2,527	3,294
	P2A	5,320	14,779	8,025	17,155
12,0	P1A	2,010	3,187	2,509	3,899
	P2A	5,746	14,778	8,138	16,408
13,5	P1A	2,579	3,742	2,743	4,522
	P2A	6,052	14,679	8,967	18,285
Médio	P1A	5,315	3,933	3,767	5,645
	P2A	8,593	16,030	10,559	20,463

--- - não calculado

TABELA 62 -Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 2

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	—	—	—	—
	P3A	—	—	—	—
4,5	P1A	—	—	—	—
	P3A	—	—	—	—
6,0	P1A	—	—	—	3,118
	P3A	—	—	—	3,166
7,5	P1A	3,730	2,494	—	4,153
	P3A	—	—	—	3,281
9,0	P1A	3,284	3,899	—	3,817
	P3A	—	—	2,092	3,127
10,5	P1A	2,935	3,627	—	4,140
	P3A	1,711	—	2,393	2,942
12,0	P1A	2,817	3,614	1,502	4,761
	P3A	1,661	—	2,648	2,996
22,5	P1A	3,514	3,526	1,307	4,217
	P3A	3,034	0,990	2,353	3,187
Médio	P1A	3,603	3,695	1,085	4,504
	P3A	4,260	—	2,389	3,184

— - não calculado

TABELA 63 - Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 3

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	—	6,064	—	—
	P4A	—	—	—	—
4,5	P1A	—	6,041	—	—
	P4A	—	—	—	—
6,0	P1A	—	4,930	—	—
	P4A	—	—	—	—
7,5	P1A	—	4,522	2,494	2,700
	P4A	—	—	—	2,948
9,0	P1A	—	4,395	2,793	2,913
	P4A	—	2,015	—	2,803
10,5	P1A	—	4,777	2,763	3,343
	P4A	1,711	2,243	1,743	3,036
12,0	P1A	1,473	4,817	2,835	3,358
	P4A	1,645	2,340	1,747	2,781
22,5	P1A	1,207	4,260	3,334	4,026
	P4A	1,687	2,660	1,720	2,663
Médio	P1A	0,904	3,999	3,751	4,707
	P4A	1,693	3,060	1,697	2,508

— - não calculado

TABELA 64 -Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 4

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	—	—	—	—
	P2B	6,851	—	—	—
4,5	P1B	—	—	—	—
	P2B	6,286	—	—	—
6,0	P1B	—	—	—	—
	P2B	6,876	—	—	—
7,5	P1B	—	—	—	—
	P2B	7,420	2,441	—	2,625
9,0	P1B	—	1,964	2,364	2,021
	P2B	8,462	2,866	3,800	2,603
10,5	P1B	—	1,786	2,369	2,376
	P2B	12,241	3,323	4,958	3,797
12,0	P1B	—	2,114	2,381	2,302
	P2B	13,365	3,731	4,875	4,749
22,5	P1B	1,373	2,442	1,743	2,653
	P2B	9,482	6,755	7,169	7,277
Médio	P1B	—	2,851	1,242	3,014
	P2B	10,869	9,207	9,369	9,974

— - não calculado

TABELA 65 -Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 5

Tempo (horas)	Pré-tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
4,5	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
6,0	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
7,5	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	2,948	—	—
9,0	P1B	2,269	—	2,040	2,021
	P3B	2,763	2,899	1,996	—
10,5	P1B	2,040	1,912	2,230	2,000
	P3B	2,954	3,384	2,028	2,007
12,0	P1B	1,926	1,841	2,484	2,148
	P3B	2,838	3,296	1,930	2,056
22,5	P1B	2,561	2,034	1,640	1,737
	P3B	3,255	4,612	1,744	2,244
Médio	P1B	2,913	2,184	—	1,496
	P3B	3,584	5,594	1,544	2,454

— - não calculado

TABELA 66 -Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 6

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	---	---	---	---
	P4B	---	---	---	---
4,5	P1B	---	---	---	---
	P4B	---	---	---	---
6,0	P1B	---	---	---	---
	P4B	2,965	---	---	---
7,5	P1B	---	---	---	---
	P4B	2,701	---	2,372	---
9,0	P1B	---	---	2,517	---
	P4B	3,510	---	2,749	2,072
10,5	P1B	1,700	1,961	2,455	---
	P4B	4,022	2,171	2,792	2,409
12,0	P1B	1,721	2,100	2,558	1,845
	P4B	4,647	2,205	2,762	2,706
22,5	P1B	2,312	3,024	1,772	1,999
	P4B	4,034	3,362	3,789	3,260
Médio	P1B	2,899	3,999	1,187	2,176
	P4B	4,535	4,507	4,528	4,015

--- - não calculado

TABELA 67 - Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou de 50% v/p de água destilada (F1B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente às réplicas 1 a 4 do experimento 7

Tempo (horas)	Tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	F1B	6,121	—	—	—
	F1A	—	—	—	—
4,5	F1B	4,593	—	—	—
	F1A	4,797	—	—	4,183
6,0	F1B	4,696	—	—	—
	F1A	5,094	3,944	—	4,274
7,5	F1B	4,329	2,952	—	—
	F1A	4,824	4,130	—	4,469
9,0	F1B	4,059	2,672	—	—
	F1A	4,929	4,048	—	4,683
10,5	F1B	3,957	2,868	1,683	1,798
	F1A	5,190	3,756	1,793	4,825
12,0	F1B	3,791	2,672	1,749	1,881
	F1A	5,193	3,815	2,050	4,865
22,5	F1B	3,620	3,755	1,602	2,003
	F1A	5,721	4,788	2,302	5,487
Médio	F1B	3,262	4,334	1,496	2,168
	F1A	5,983	5,129	2,689	5,868

— - não calculado

TABELA 68 -Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente às réplicas 1 a 4 do experimento 8

Tempo (horas)	Tratamento	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	F2B	—	—	—	—
	F2A	—	—	—	—
4,5	F2B	—	—	—	—
	F2A	—	4,222	—	—
6,0	F2B	—	—	—	—
	F2A	—	3,354	—	—
7,5	F2B	2,471	—	—	—
	F2A	—	3,595	—	2,901
9,0	F2B	2,392	—	—	2,193
	F2A	2,264	3,374	2,264	2,610
10,5	F2B	2,310	—	2,206	2,169
	F2A	2,085	3,603	2,595	2,471
12,0	F2B	3,456	1,502	2,293	2,386
	F2A	2,759	3,634	2,557	2,630
22,5	F2B	3,295	1,208	1,833	1,822
	F2A	2,430	3,238	1,950	2,473
Médio	F2B	3,823	0,872	1,433	1,502
	F2A	2,533	3,103	1,559	2,331

— - não calculado

TABELA 69 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de copaíba (P2A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 1

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	—	—	—	—
	P2A	—	2,155	—	2,524
4,5	P1A	—	—	—	—
	P2A	—	3,303	1,299	2,957
6,0	P1A	—	0,814	—	0,763
	P2A	0,775	3,766	1,669	3,313
7,5	P1A	—	0,789	—	0,741
	P2A	0,964	3,802	1,802	3,257
9,0	P1A	—	0,845	0,553	0,842
	P2A	1,276	3,486	1,838	3,406
10,5	P1A	0,481	0,813	0,648	0,845
	P2A	1,364	3,789	2,058	4,399
12,0	P1A	0,515	0,817	0,643	0,999
	P2A	1,473	3,789	2,086	4,207
13,5	P1A	0,661	0,959	0,703	1,159
	P2A	1,552	3,763	2,299	4,688
Médio	P1A	1,363	1,008	0,966	1,447
	P2A	2,203	4,110	2,707	5,247

— - não calculado

TABELA 70 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de andiroba (P3A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 2

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	---	---	---	---
	P3A	---	---	---	---
4,5	P1A	---	---	---	---
	P3A	---	---	---	---
6,0	P1A	---	---	---	0,799
	P3A	---	---	---	0,812
7,5	P1A	0,956	0,639	---	1,065
	P3A	---	---	---	0,841
9,0	P1A	0,842	0,999	---	0,979
	P3A	---	---	0,536	0,802
10,5	P1A	0,753	0,930	---	1,062
	P3A	0,439	---	0,613	0,754
12,0	P1A	0,722	0,927	0,385	1,221
	P3A	0,477	---	0,679	0,768
22,5	P1A	0,901	0,904	0,335	1,081
	P3A	0,778	0,254	0,603	0,817
Médio	P1A	0,924	0,947	0,278	1,155
	P3A	1,092	---	0,613	0,816

--- - não calculado

TABELA 71 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 50% v/v de óleo de babaçu (P4A) ou de 50% v/v de água destilada (P1A), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 3

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1A	—	1,555	—	—
	P4A	—	—	—	—
4,5	P1A	—	1,549	—	—
	P4A	—	—	—	—
6,0	P1A	—	1,264	—	—
	P4A	—	—	—	—
7,5	P1A	—	1,159	0,639	0,692
	P4A	—	—	—	0,756
9,0	P1A	—	1,127	0,716	0,747
	P4A	—	0,517	—	0,719
10,5	P1A	—	1,225	0,708	0,857
	P4A	0,439	0,575	0,447	0,778
12,0	P1A	0,378	1,235	0,727	0,861
	P4A	0,422	0,600	0,448	0,713
22,5	P1A	0,309	1,092	0,855	1,032
	P4A	0,433	0,682	0,441	0,683
Médio	P1A	0,232	1,025	0,962	1,207
	P4A	0,434	0,785	0,435	0,643

— - não calculado

TABELA 72 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de copaíba (P2B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 4

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	—	—	—	—
	P2B	1,757	—	—	—
4,5	P1B	—	—	—	—
	P2B	1,612	—	—	—
6,0	P1B	—	—	—	—
	P2B	1,763	—	—	—
7,5	P1B	—	—	—	—
	P2B	1,902	0,626	—	0,673
9,0	P1B	—	0,503	0,606	0,518
	P2B	2,170	0,735	0,974	0,667
10,5	P1B	—	0,458	0,607	0,609
	P2B	3,139	0,852	1,271	0,973
12,0	P1B	—	0,542	0,610	0,590
	P2B	3,427	0,956	1,250	1,216
22,5	P1B	0,352	0,626	0,447	0,680
	P2B	2,431	1,732	1,838	1,866
Médio	P1B	—	0,731	0,316	0,773
	P2B	2,787	2,361	2,402	2,557

— - não calculado

TABELA 73 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de andiroba (P3B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 5

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
4,5	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
6,0	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	—	—	—
7,5	P1B	—	—	—	—
	P3B	—	0,756	—	—
9,0	P1B	0,582	—	0,523	0,518
	P3B	0,708	0,743	0,512	—
10,5	P1B	0,523	0,490	0,572	0,513
	P3B	0,757	0,868	0,520	0,514
12,0	P1B	0,494	0,472	0,637	0,551
	P3B	0,728	0,845	0,495	0,527
22,5	P1B	0,657	0,522	0,420	0,445
	P3B	0,835	1,183	0,447	0,575
Médio	P1B	0,747	0,560	—	0,383
	P3B	0,919	1,434	0,396	0,629

— - não calculado

TABELA 74 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com solução de ácido kójico 3,9% p/v através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus* pré-tratadas com solução de álcool isopropílico-propilenoglicol (95:5 v/v) adicionado de 25% v/v de óleo de babaçu (P4B) ou de 25% v/v de água destilada (P1B), referente às réplicas 1 a 4 do experimento 6

Tempo (horas)	Pré- tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	P1B	---	---	---	---
	P4B	---	---	---	---
4,5	P1B	---	---	---	---
	P4B	---	---	---	---
6,0	P1B	---	---	---	---
	P4B	0,760	---	---	---
7,5	P1B	---	---	---	---
	P4B	0,692	---	0,608	---
9,0	P1B	---	---	0,645	---
	P4B	0,900	---	0,705	0,531
10,5	P1B	0,436	0,503	0,629	---
	P4B	1,031	0,557	0,716	0,618
12,0	P1B	0,441	0,538	0,656	0,473
	P4B	1,192	0,565	0,708	0,694
22,5	P1B	0,593	0,775	0,454	0,513
	P4B	1,034	0,862	0,971	0,836
Médio	P1B	0,743	1,025	0,304	0,558
	P4B	1,163	1,155	1,161	1,029

--- - não calculado

TABELA 75 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 50% v/p de óleo de copaíba (F1A) ou de 50% v/p de água destilada (F1B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente às réplicas 1 a 4 do experimento 7

Tempo (horas)	Tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	F1B	1,569	---	---	---
	F1A	---	---	---	---
4,5	F1B	1,178	---	---	---
	F1A	1,230	---	---	1,073
6,0	F1B	1,204	---	---	---
	F1A	1,306	1,011	---	1,096
7,5	F1B	1,110	0,757	---	---
	F1A	1,237	1,059	---	1,146
9,0	F1B	1,041	0,685	---	---
	F1A	1,264	1,038	---	1,201
10,5	F1B	1,015	0,735	0,432	0,461
	F1A	1,331	0,963	0,460	1,237
12,0	F1B	0,972	0,685	0,448	0,482
	F1A	1,332	0,978	0,526	1,247
22,5	F1B	0,928	0,963	0,411	0,514
	F1A	1,467	1,228	0,590	1,407
Médio	F1B	0,836	1,111	0,384	0,556
	F1A	1,534	1,315	0,689	1,505

--- - não calculado

TABELA 76 - Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$) de ácido kójico dos ensaios de difusão com creme "lanette" contendo 3,9% p/p de ácido kójico e adicionado de 25% v/p de óleo de copaíba (F2A) ou de 25% v/p de água destilada (F2B), através de membranas de muda de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, referente às réplicas 1 a 4 do experimento 8

Tempo (horas)	Tratamento	Permeabilidade ($\text{cm} \times 10^{-4}/\text{h}$)			
		Réplicas			
		1	2	3	4
3,0	F2B	---	---	---	---
	F2A	---	---	---	---
4,5	F2B	---	---	---	---
	F2A	---	1,082	---	---
6,0	F2B	---	---	---	---
	F2A	---	0,860	---	---
7,5	F2B	0,634	---	---	---
	F2A	---	0,922	---	0,744
9,0	F2B	0,613	---	---	0,562
	F2A	0,581	0,865	0,581	0,669
10,5	F2B	0,592	---	0,566	0,556
	F2A	0,535	0,924	0,665	0,633
12,0	F2B	0,886	0,385	0,588	0,612
	F2A	0,707	0,932	0,656	0,674
22,5	F2B	0,845	0,310	0,470	0,467
	F2A	0,623	0,830	0,500	0,634
Médio	F2B	0,211	0,224	0,367	0,385
	F2A	0,649	0,796	0,400	0,598

--- - não calculado

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com a NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos obedecem as normas do Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1999.

- ABREU, F.R.; LIMA, D.G.; HAMÚ, E.H.; WOLF, C.; SUAREZ, P.A.Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, Amsterdam, v.209, n.1/2, p.29-33, 2004.
- AHN, K.S.; MOON, K.-Y.; LEE, J.; KIM, Y.S. Downregulating of NF-kb activation in human keratinocytes by melanogenic inhibitor. *J. Dermatol. Sci.*, Amsterdam, v.31, p.193-201, 2003.
- AHTARDJIEFF, C. On the occurrence of arbutin and tannins in indigenous representatives of the *Ericaceae* family. *Pharmazie*, Eschborn, v.21, n.1, p.59-60, 1966.
- AKADA, Y.; KAWANO, S.; GOTOH, M.; TANASE, Y. High-speed liquid chromatographic analysis of drugs. III. Rapid estimation of arbutin in crude drugs. *Yakugaku Zasshi*, Tokyo, v.99, n.1, p.98-101, 1979.
- AKIMOTO, T.; NAGASE, Y. Novel transdermal drug penetration enhancer: synthesis and enhancing effect of alkylsiloxane compounds containing glucopyranosyl group. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.88, p.243-252, 2003.
- AKOMEAH, F.; NAZIR, T.; MARTIN, G.P.; BROWN, M.B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.21, p.337-345, 2004.
- ALMEIDA, A.; SERTIÉ, J.A.; HANADA, S.; SUDO, L.S. Modulação da atividade linfática pelo óleo de copaíba (*Leguminosae, Mimosae*). Apud X

- REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Serra Negra, 1995. *Resumos*. São Paulo: FESBE, 1995. p.267, res.16127.
- ALMEIDA, A.; SERTIÉ, J.A.; SUDO-HAYASHI, L.S. Atividade antitumoral do óleo de copaíba (*Leguminosae, Mimosaceae*) sobre o tumor sólido de Erlich. Apud XI REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, 1996. *Resumos*. São Paulo: FESBE, 1996. p.86, res.10029.
- ALMEIDA, R.R.; DEL MENEZZI, C.H.S.; TEIXEIRA, D.E. Utilization of the coconut shell of babaçu (*Orbignya sp.*) to produce cement-bonded particleboard. *Bioresour. Technol.*, Amsterdam, v.85, p.159-163, 2002.
- ALVERSON, J. Effects of mycotoxins, kojic acid and oxalic acid, on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *J. Invertebr. Pathol.*, New York, v.83, p.60-62, 2003.
- ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.77, p.17-25, 2001.
- ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Pharm. Sci. Technol. Today*, Oxford, v.3, n.1, p.36-41, 2000.
- AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.15, n.6, p.795-80, 1997.
- BABU, R.J.; PANDIT, J.K. Effect of cyclodextrins on the complexation and transdermal delivery of bupranolol through rat skin. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.271, p.155-165, 2004.
- BARROS, S.B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorpha umbellata* (L.) Miq. (Paniparoba). *Cienc. Cult.*, São Paulo, v.48, n.1-2, p.114-116, 1996.
- BARROS, S.B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E. Antioxidant properties of ethanolic extract of *paniparoba* (*Pothomorphe umbellata* L. Miq.). Apud XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA

- MOLECULAR, Caxambu, p.411, res.12-49, 1992.
- BARRY, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. In: ANDERSON, J.M., KIM, S.W., eds. *Advances in drug delivery systems 3: proceedings of the third International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems*, Salt Lake City, UT, U.S.A. Amsterdam, New York: Elsevier, 1987. p.85-97. (Journal of Controlled Release, v.6, sp. iss., n.1-3).
- BARUQUE FILHO, E.A.; BARUQUE, M.G.A.; SANTANNA Jr., G.L. Babassu coconut starch liquefaction: an industrial scale approach to improve conversion yield. *Bioresour. Technol.*, Amsterdam, v.75, p.49-55, 2000.
- BASAPPA, S.C.; SREENIVASAMURTHY, V.; PARPIA, H.A. Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus flavus* Link. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v.61, n.1, p.81-86, 1970.
- BLUMENTHAL, C.Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Orlando, v.39, p.214-228, 2004.
- BORRAS-BLASCO, J.; DIEZ-SALES, O.; LOPEZ, A.; HERRAEZ-DOMINGUEZ, M. A mathematical approach to predicting the percutaneous absorption enhancing effect of sodium lauryl sulphate. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.269, p.121-129, 2004.
- BOTTER, D.A.; PAULA, G.A.; LEITE, J.G.; CORDANI, L.K. *Noções de estatística: com apoio computacional: versão preliminar*. São Paulo: Ime-Usp, 1996. 231p.
- BRANDÃO, L.A. *Index ABC: ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes*. 2.ed. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2000. 1070p.
- BRASIL. Resolução RE n.899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília.
- BRONAUGH, R.L.; COLLIER, S.W. *In vitro* methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J.L., ed. *Skin permeation: fundamentals and application*. Weaton: Allured, 1993, p.93-110.

- BURDOCK, G.A.; SONI, M.G.; CARABIN, I.G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Orlando, v.33, p.80-101, 2001.
- BURKE, V.; GRACEY, M. An experimental model of gastrointestinal candidiasis. *J. Med. Microbiol.*, Hagerstown, v.13, n.1, p.103-110, 1980.
- BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. *Estatística básica*. 4.ed. São Paulo: Atual, 1985. 321p. (Métodos quantitativos)
- CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.46, n.12, p.982-985, 1994.
- CAMPOS, P.M.B.G.M. *Determinação de vitaminas lipossolúveis D₃, E e A em cremes cosméticos por cromatografia líquida de alta eficiência*. São Paulo, 1990. 130p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- CASAMADA, S.M.R. *Tratado de farmacognosia*. 6ª edição, Madrid: Editorial Científico-Médica, 1977, 1121p.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Photochemistry*, Letchworth, v.55, p.773-778, 2000.
- CHAKRABORTY, A.K.; FUNASAKA, Y.; KOMOTO, M.; ICHIHASHI, M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigm. Cell Res.*, Oxford, v.11, n.4, p.206-212, 1998.
- CHANG, C.; ZHENG, R. Effects of ultraviolet B on epidermal morphology, shedding, lipid peroxide, and antioxidant enzymes in Cope's rat snake (*Elaphe taeniura*). *J. Photochem. Photobiol., B*, Amsterdam, v.72, p.79-85, 2003.
- CHANG, M.-I.; CHANG, C.-M. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.33, p.617-626, 2003.
- CHEMYUNION. *Chemforest: oleos de andiroba e de copaíba*. São Paulo,

- 2001, 2p. [Catálogo].
- CHEN, J.S.; WEI, C.I.; MARSHALL, M.R. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.39, n.11, p.1897-901, 1991.
- CHIBA, K.; USAMI, A.; SAITO, S.; KATAOKA, K. *Food discoloration prevention with kojic acid, sodium chloride, and alum*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 09075033 A2, 1997. 7p.
- CHIKAMATSU, Y.; ANDO, H.; YAMAMOTO, A.; KYO, S.; YAMASHITA, K.; DOJO, K. *Hydroxytyrosol as melanin formation inhibitor and lipid peroxide formation inhibitor and its application to topical preparations and bath preparations*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 08119825 A2, 1996. 10 p.
- CHO, J.H.; LEE, K.M.; KIM, N.S.; KANG, W. The effects of whitening components on human melanocytes *in vitro*. *Sci. Conf. Asian Soc. Cosmet. Sci.*, Taichung, v.3, p.162-168. 1997.
- COLIPA Guidelines. *Annex X – Guidelines for in vitro methods to assess percutaneous absorption of cosmetic ingredients*. Brussels, p.77-85, 1999.
- COOPER, E.R. Increased skin permeability for lipophilic molecules. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.73, n.8, p.1152-1157, 1984.
- CORNWELL, P.A.; TUBEK, J.; VAN GOMPEL, H.A.H.P.; LITTLE, C.J.; WIECHERS, J.W. Glyceryl monocaprylate/caprate as a moderate skin penetration enhancer. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.17, p.243-255, 1998.
- COSTA LOFUTO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*, Amsterdam, v.40., p.1231-1234, 2002.
- COSTA, L.V.; ALMEIDA, A.D.; MALPEZZI, E.L.A.; FREITAS, J.C.; SUDO, L.S.; SERTIÉ, J.A.A. Atividade antimetabólica do óleo extraído de copaíba (*Leguminosae, Mimosae*). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL. *Resumos*. São Paulo, 1995. p.267, res.16129.
- COTELLESA, C.; PERIS, K.; ONORATI, M.T.; FARGNOLI, M.C.;

- CHIMENTI, S. The use of chemical peelings in the treatment of different cutaneous hyperpigmentations. *Dermatol. Surg.*, New York, v.25, n.6, p.450-454, 1999.
- COTTE, M.; DUMAS, P.; BESNARD, M.; TCHORELOFF, P.; WALTER, P. Synchroton FT-IR microscopic study of chemical enhancers in transdermal drug delivery: example of fatty acids. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.97, p.269-281, 2004.
- COUTEAU, C.; COIFFARD, L.J. Photostability determination of arbutin, a vegetable whitening agent. *Farmaco*, Paris, v.55, n.5, p.410-413, 2000.
- CRODA do Brasil. *Crodamazon: óleos de andiroba e de copaíba*. São Paulo: 2001. 2p. [Catálogo].
- CURTO, E.V.; KWONG, C.; HERMERSDURFER, H.; GLATT, H.; SANTIS, C.; VIRADOR, V.; HEARING, V.J.; DOOLEY, T.P. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, Amsterdam, v.57, n.6, p.663-672, 1999.
- DAMPEIROU, C. *Cosmetics containing hydroxycarboxylic acids and plant extracts*. Fr. Demande, FR 2736263 A1, 1997. 28p.
- DIRETRIZES para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso/ Vânia M. B. de Oliveira Funaro, coord, ... [et al.]. – São Paulo: Sibi-USp, 2004. 110p.
- DMIEL, R. Skin resistance to evaporative water loss in viperid snakes: habitat aridity versus taxonomic status. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.*, Amsterdam, v.121, p.1-5, 1998.
- DONATIEN, P.D.; ORLOW, S.J. Interaction of melanosomal proteins with melanin. *Eur. J. Biochem.*, Oxford, v.232, n.1, p.159-164, 1995.
- DOWD, P.F. Toxicological and biochemical interactions of the fungal metabolites fusaric acid and kojic acid with xenobiotics in *Heliothis zea* (F.) and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, New York, v.32, n.2, p.123-134, 1988.
- DUNISH, O.; ERBREICH, M.; EILERS, T. Water balance and water potentials of a monoculture and an enrichment plantation of *Carapa guianensis*

- Aubl. in the central Amazon. *For. Ecol. Manage.*, Amsterdam, v.172, p.355-367, 2003.
- DUNISH, O.; SCHWARZ, T.; NEVES, E.J.M Nutrient fluxes and growth of *Carapa guianensis* Aubl. in two plantation systems in the central Amazon. *For. Ecol. Manage.*, Amsterdam, v.166, p.55-68, 2002.
- DURACKOVA, Z.; BETINA, V.; NEMEC, P. Bioautographic detection of mycotoxins on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.116, n.1, p.155-161, 1976.
- EKOSHI, K. *Kojic acid and sulfites for discoloration prevention of crab, shrimp, or lobster meat*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 03151822 A2, 1991. 3p.
- EL-KATTAN, A.; ASBILL, C.S.; HAIDAR, S. Transdermal testing: practical aspects and methods. *Pharm. Sci. Technol. Today*, Oxford, v.3, n.12, p.426-430, 2000.
- EL-KATTAN, A.F.; ASBILL, C.S.; KIM, N.; MICHNIAK, B.B. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.215, p.229-240, 2001.
- EL-KHADEM, M.; TEWFIK, M.S.; HAMDI, Y.A. Effect of aflatoxin B1, aspergillic and kojic acid on peanut seedlings. *Zentralbl. Bakteriол., Parasitenkd., Infektionskrankh. Hyg.*, Jena, v.130, n.6, p.556-559, 1975.
- EL-MAGHRABY, G.M.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Interactions os surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.276, p.143-161, 2004.
- EL-NAGGAR, G.O.; LOVELL, R.T. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. *J. Nutr.*, Bethesda, v.121, n.10, p.1622-1626, 1991.
- EL-SHARKAWY, S.H. Kojic acid production from cocoa juice by *Aspergillus flavus* entrapped in calcium alginate. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v.134, n.6, p.316-319, 1995.
- ESSA, E.A.; BONNER, M.C.; BARRY, B.W. Electroporation and ultradeformable liposomes: human skin barrier repair by phospholipid. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.92, p.163-172, 2003.

- FERRARI, M. *Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaiba*. Ribeirão Preto, 1998. 147p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- FRANZ, T.J.; LEHMAN, P.A.; MCGUIRE, E.L. *In vivo* methods for the assessment of percutaneous absorption in man. In: ZATS, J.L. *Skin Permeation: fundamentals and application*. Weaton: Allured, p.73-92, 1993.
- FREITAS, J.C.C.; EMMERICH, F.G.; CERNICCHIARO, G.R.C.; SAMPAIO, L.C.; BONAGAMBA, T.J. Magnetic susceptibility on ^{13}C mass NMR spectra of carbon materials and graphite. *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, Orlando, v.20, p.61-63, 2001.
- FROHNE, D. Presence of arbutin in *Saxifragaceae*. *Pharmazie*, Eschborn, v.24, n.11, p.701-702, 1969.
- FUKAZAWA, R.; ITO, T.; MATSUDA, Y.; WAKABAYASHI, H.; NATORI, Y. *Color-fading preventing agents containing kojic acid and method for prevention of color-fading for processed foods*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 02069156 A2, 8 Mar 1990. 4p.
- FUKUDA, Y.; NAGANO, M.; TSUKAMOTO, K.; FUTATSUKA, M. *In vitro* studies on the depigmenting activity of 4-(p-hydroxyphenyl)-2-butanone. *J. Occup. Health*, Tokyo, v.40, n.2, p.137-142, 1998.
- FULLER, B.B. *Enhancement of skin pigmentation by prostaglandins*. PCT Int. Appl., WO 9800100 A1, 8, 1998. 46p.
- FUNAYAMA, M.; ARAKAWA, H.; YAMAMOTO, R.; NISHINO, T.; SHIN, T.; MURAO, S. Effects of alpha- and beta-arbutin on activity of tyrosinase from mushroom and mouse melanoma. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.59, n.1, p.143-144, 1995.
- FURUYA, T. *Antidandruff hair preparations containing kojic acid*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01275517 A2, 1989. 3p.
- FURUYA, T. *Cleansing cosmetics containing kojic acid*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01275524 A2, 1989. 3p.
- FUTAMURA, T.; OKABE, M.; TAMURA, T.; TODA, K.; MATSUNOBU, T.; PARK, Y.S. Improvement of production of kojic acid by a mutant strain

- Aspergillus oryzae* MK 107-39. *J. Biosci. Bioeng.*, Osaka-fu, v.3, p.272-276, 2001.
- GALENA. *Arbutin, VC-PMG e ácido kójico*. São Paulo, 2000. 3p. [Catálogo].
- GARCIA, A.; FULTON, J.E. The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions. *Dermatol. Surg.*, New York, v.22, n.5, p.443-447, 1996.
- GEESIN, J.C.; GORDON, J.S.; BERG, R.A. Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts by the sodium and magnesium salts of ascorbyl-2-phosphate. *Skin Pharmacol.*, Basel, v.6, n.1, p.65-71, 1993.
- GIROIR, L.E.; HUFF, W.E.; KUBENA, L.E.; HARVEY, R.B.; ELISSALDE, M.H.; WITZEL, D.A.; YERSIN, A.G.; IVIE, G.W. Toxic effects of kojic acid in the diet of male broilers. *Poult. Sci.*, Savoy, v.70, n.3, p.499-503, 1991.
- GOODMAN, M.; BARRY, B.W. Lipid-protein partitioning (LPP) theory of skin activity: finite dose technique. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.57, p.29-40, 1989.
- GROLIER, J.F.; CANTIN, H.; GAGNEBIEN, D. *Skin whitening and antiaging compositions for protection of the skin containing arbutin and benzylidene camphor derivatives*. Eur. Pat. Appl. EP 749750 A1, 1996. 14p.
- HA, Y.H.; YU, S.U.; KIM, D.S.; LIM, S.J.; CHOI, Y.W. Hydrolysis, skin permeation and *in vivo* whitening effect of kojic acid monostearate as an antimelanogenic agent. *Yakhak Hoechi*, Seoul, v.42, n.1, p.39-45, 1998.
- HADDAD, M.M.; XU, W.; MEDRANO, E.E. Aging in epidermal melanocytes: cell cycle genes and melanins. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, Malden, v.3, n.1, p.36-40, 1998.
- HAIGH, J.M.; BEYSSAC, E.; CHANET, L.; AIACHE, J.-M. *In vitro* permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.170, p.151-156, 1998.
- HARA, K. *Melanin-formation preventing skin preparations containing kojic acids and UV absorbers*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 02200622 A2, 1990. 6p.
- HASEBE, Y.; OSHIMA, K.; TAKISE, O.; UCHIYAMA, S. Chemically amplified kojic acid responses of tyrosinase-based biosensor, based on inhibitory

- effect to substrate recycling driven by tyrosinase and L-ascorbic acid. *Talanta*, Amsterdam, v.42, n.12, p.2079-2085, 1995.
- HATAE, S. *Skin preparations containing allantoin (derivatives) and kojic acid (esters)*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01113314 A2, 1989. 5p.
- HATAE, S. *Skin-lightening preparations containing mucopolysaccharides and kojic acid (esters)*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01100114 A2, 1989. 5p.
- HAYASAWA, H.; FUKUWATARI, Y.; SHINODA, K.; NAKAJIMA, M. *A method of evaluation of melanin formation inhibitors, and the evaluated inhibitors*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 09275997 A2, 1997. 9p.
- HAYASHI, H.; TAKE, M. *Nonirritant cosmetics containing kojic acids and tyrosinase inhibitors*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 11335225 A2, 1999. 10p.
- HIGA, Y. *Melanin-inhibiting skin preparations containing kojic acid (esters) and pharmaceutical natural products*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01083009 A2, 1989. 6p.
- HILDEBRAND, D.C.; POWELL, C.C.; SCHROTH, M.N. Fire blight resistance in *Pyrus*: localization of arbutin and beta-glucosidase. *Phytopathology*, Saint Paul, v.59, n.10, p.1534-1539, 1969.
- HONDA, S. *Antifungal agents containing kojic acids*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 10059847 A2, 1998. 6p.
- HONDA, S. *Antiperspirants containing kojic acids*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 2000016928 A2, 2000. 7p.
- HONDA, S. *Antiwrinkle cosmetic and topical agents containing kojic acids*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 10212225 A2, 1998. 6p.
- HONDA, S. *Topical preparations containing kojic acid for atopic dermatitis*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 10017468 A2 20, 1998. 7p.
- HORI, M.; SATOH, S.; MAIBACH, H.T. Classification of percutaneous enhancers: a conceptional diagram. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.42, p.71-72, 1990.
- HOSHINO, T. Skin-whitening effects of kojic acid. *Kagaku*, Kyoto, v.54, n.3, p.29-31, 1999.
- HOSOYAMA, H.; ARIGA, T.; NISHAMA, N.; YUASA, K. *Stabilization of colors*

- of astaxanthin-containing foods with flavanols and kojic acid*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 08332052 A2, 1996. 3p.
- IMOKAWA, G. Skin-lightening agents. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi*, Tokyo, v.108, n.12, p.1690-1694, 1998.
- INOUE, Y.; IIDA, K.; IZUMIDA, H.; TAKADERA, T. *Skin-lightening cleansers containing kojic acids*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 02036117 A2, 1990. 3p.
- IONQUÍMICA. Óleo de copaíba (*Copaifera Leguminosae*), andiroba (*Carapa guianensis* Meliaceae) e babaçu (*Orbygnia phalerata*). São Paulo, 2000. 2p. [Catálogo].
- IYIDOGAN, N.F.; BAYINDIRLI, A. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *J. Food Eng.*, Oxford, v.62, n.3, p.299-304, 2004.
- IZUMIDA, H.; IIDA, K.; TAKADERA, T.; INOUE, Y. *Solid detergents having skin-whitening effects*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 02014296 A2, 1990. 3p.
- JACKSON, E.M. Toxicological aspects of percutaneous absorption. In: ZATZ, J.L., ed. *Skin permeation: fundamentals and application*. Weaton: Allured, p.177-192, 1993.
- JAHODAR, L.; LEIFERTOVA, I.; LISA, M. Elimination of arbutin from the organism. *Pharmazie*, Eschborn, v.38, n.11, p.780-1, 1983.
- JASS, H.E.; ELIAS, P.M. The living stratum corneum. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.106, n.10, p.47-55, 1991.
- KAMEYAMA, K.; OHNUMA, T.; TAGAWA, M. *Skin cosmetics containing ascorbic acid derivatives*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 11079930 A2, 1999. 6p.
- KAMEYAMA, K.; SAKAI, C.; KONDOH, S.; YONEMOTO, K.; NISHIYAMA, S.; TAGAWA, M.; MURATA, T.; OHNUMA, T.; QUIGLEY, J.; DORSKY, A.; BUCKS, D.; BLANOCK, K. Inhibitory effect of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v.34, n.1, p.29-33, 1996.
- KAMINO, T.; KURAMOCHI, K.; KOBAYASHI, S. A concise approach to 5-

- substituted-4-pyrones form kojic acid. *Tetrahedron Lett.*, Amsterdam, v.44, p.7349-7351, 2003.
- KAMYAMA, T.; SAWAI, Y.; TAKETOMO, T.; YOSHAMA, Y. *Melanin formation inhibitors containing echinomycin and skin cosmetics containing them.* Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 08217620 A2, 1996. 5p.
- KANG, L.; JUN, H.W.; McCALL, J.W. Physicochemical studies of lidocaine-menthol binary systems for enhanced membrane transport. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.206, p.35-42, 2000.
- KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.248, p.219-228, 2002.
- KATSAMBAS, A.D.; STRATIGOS, A.J. Depigmenting and bleaching agents: coping with hyperpigmentation. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.19, p.483-488, 2001.
- KAWADA, A.; KAMEYAMA, H.; ASAI, M.; SHIRAISHI, H.; ARAGANE, Y.; TEKUZA, T.; IWAKIRI, K. A new approach to the evaluation of whitening effect of a cosmetic using computer analysis of video-captured image. *J. Dermatol. Sci.*, Amsterdam, v.29, p.10-18, 2002.
- KAYAHARA, H.; SHIBATA, N.; TADASA, K.; MAEDA, H.; KOTANI, T.; ICHIMOTO, I. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v.54, n.9, p.2441-2442, 1990.
- KEDZIA, B.; WROCINSKI, T.; MRUGASIEWICZ, K.; GORECKI, P.; GRZEWINSKA, H. Antibacterial action of urine containing products of arbutin metabolism. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, Warsaw, v.27, n.3, p.305-314, 1975.
- KIJOA, A.; GIESBRECHT, A.M.; AKISUE, M.K.; GOTTLIEB, O.R.; GOTTLIEB, H.E. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.39, n.1, p.85-87, 1980.
- KIKUCHI, H.; HONDA, K.; MIMURA, K.; KOWATA, Y. Simultaneous determination of water-soluble L-ascorbic acid derivatives in cosmetic lotions by high performance liquid chromatography. *Nippon Koshohin*

- Kagakkaishi*, Tokyo, v.14, n.1, p.17-20, 1990.
- KIM, D-S.; KIM, S-Y.; CHUNG, J-H.; KIM, K-H.; EUN, H-C.; PARK, K-C. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell. Signalling*, Amsterdam, v.14, p.779-785, 2002.
- KIM, H.; CHOI, J.; CHO, J.K.; KIM, S.Y.; LEE, Y.-S. Solid-phase synthesis of kojic acid-tripeptides and their tyrosinase inhibitory activity, storage stability, and toxicity. *Bioorg. Med. Chem.*, Amsterdam, v.14, p.2843-2846, 2004.
- KITAGAWA, S.; YOKOCHI, N.; MUROOKA, N. Ph-dependence of phase transition of the lipid bilayer of liposomes of stratum corneum lipids. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.126, p.49-56, 1995.
- KOBAYASHI, S.; TAKEHANA, M.; ITOH, S.; OGATA, E. Protective effect of magnesium-L-ascorbyl-2 phosphate against skin damage induced by UVB irradiation. *Photochem. Photobiol.*, Lawrence, v.64, n.1, p.224-228, 1996.
- KOBAYASHI, S.; TAKEHANA, M.; KANKE, M.; ITOH, S.; OGATA, E. Protective effect of magnesium-L-ascorbyl-phosphate on the development of UVB-induced cutaneous damage in mice. *Photochem. Photobiol.*, Lawrence, v.67, n.6, p.669-675, 1998.
- KOBAYASHI, Y.; KAYAHARA, H.; TADASA, K.; NAKAMURA, T.; TANAKA, H. Synthesis of amino acid derivatives of kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.59, n.9, p.1745-1746, 1995.
- KOTULOVA, D.; UHER, M.; BRTKO, J.; JULIUS, S. *Kojic acid derivatives as anti-inflammatory agents*. Slovakia, SK 277821 B6, 1995. 3p.
- KRAUCHENCO, S.; NAGEM, R.A.P.; DA SILVA, J.A.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. *Biochimie*, Paris, v.86, p.167-172, 2004.
- KRAUS, L. Chromatographic and spectrophotometric determination of arbutin. *Cesko-Slov. Farm.*, Praha, v.17, n.5, p.252-255, 1968.
- KUROSU, J.; SATO, T.; YOSHIDA, K.; TSUGANE, T.; SHIMURA, S.; KIRIMURA, K.; KINO, K.; USAMI, S. Enzymatic synthesis of α -arbutin by

- a α -anomer-selective glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. *J. Biosci. Bioeng.*, Osaka-fu, v.93, n.3., p.328-330, 2002.
- LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxican and its retention in the skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v.52, p.113-119, 2001.
- LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, Letchworth, v.27, n.4, p.969-978, 1988.
- LEE, S.J.; CHUNG, M.H.; PARK, J.H.; PARK, Y.I.; CHO, T.H.; LEE, S.K. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharmacol. Res.*, Seoul, v.22, n.3, p.232-236, 1999.
- LEI, T.C.; VIRADOR, V.M.; VIEIRA, W.D.; HEARING, V.J. A melanocyte-keratinocyte coculture model to assess regulators of pigmentation *in vitro*. *Anal. Biochem.*, New York, v.305, p.260-268, 2002.
- LEIFERTOVA, I.; HUBIK, J.; KUDRNACOVA, J.; DVORAK, S. Evaluation of phenolic substances in *Arctostaphylos uva ursi* L. I. Contents of arbutin and water-soluble phenolic substances in the leaves of cultivated plants. *Cesko-Slov. Farm.*, Praha, v.22, n.10, p.450-453, 1973.
- LEITE, F. *Validação em análise química: conceitos, repe, repro, estatística, calibrações*. 4.ed. Campinas: Átomo, 2002. 278p.
- LI, G.L.; VAN DER GEEST, R.; CHANET, L.; VAN ZANTEN, E.; DANHOF, M.; BOWSTRA, J.A. *In vitro* iontophoresis of r-apomorphine across human stratum corneum structure-transport relationship of penetration enhancement. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.84, p.49-57, 2002.
- LIM, J.T. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol. Surg.*, New York, v.25, n.4, p.282-284, 1999.
- LIN, S.-Y.; HOU, S.-J.; HSU, T.H.-S.; YEH, F.-L. Comparisons of different animal skins with human skin in drug percutaneous penetration studies. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, Barcelona, v.14, n.8, p.645-654,

1992.

- LOFREDO, L.C.M.; FERRARI, M.; ROCHA FILHO, P.A. Desenvolvimento de produtos cosméticos contendo óleo de andiroba e copaíba. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 6, Ribeirão Preto, 1998. *Resumos*. São Paulo: USP, 1998. p.116, res.7.19.
- LOKAJ, J.; KOZISEK, J.; KOREN, B.; UHER, M.; VRABEL, V. Structure of kojic acid. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, Oxford, v.C47, n.1, p.193-194, 1991.
- LOPES, P.S. *Influência da papaina e do óleo de pequi na penetração percutânea do diclofenaco de sódio*. São Paulo, 1999. 148p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea. *Cosmet. Toiletries, Ed. Port.*, São Paulo, v.12, n.3/4, p.62-66, 2000.
- LYNCH, D.H.; ROBERTS, L.K.; DAYNES, R.A. Skin immunology: the achilles heel to transdermal drug delivery? In: ANDERSON, J.M., KIM, S.W., eds. *Advances in drug delivery systems 3: proceedings of the third International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems*, Salt Lake City, UT, U.S.A. Amsterdam, New York: Elsevier, 1987. p.39-50. (*Journal of Controlled Release*, v.6, sp. iss., n.1/3).
- MAEDA, K. Recent studies of melanogenesis and its control. *Fragrance J.*, Tokyo, v.25, n.9, p.10-18, 1997.
- MAEDA, K.; FUKUDA, M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.276, n.2, p.765-769, 1996.
- MAEDA, K.; NAGANUMA, M. Depigmenting action of arbutin and its new aspects in cosmetics science. *Nippon Koshohin Kagakkaishi*, Tokyo, v.20, n.1, p.12-16, 1996.
- MAEDA, N.; NAGANUMA, M. *Skin-whitening cosmetics*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 2000016917 A2, 2000. 7p.
- MAHAN, D.C.; LEPINE, A.J.; DABROWSKI, K. Efficacy of magnesium-L-ascorbyl-2-phosphate as a vitamin C source for weanling and growing-

- finishing swine. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v.72, n.9, p.2354-2361, 1994.
- MAJMUDAR, G.; JACOB, G.; LABOY, Y.; FISHER, L. An *in vitro* method for screening skin-whitening products. *J. Cosmet. Sci.*, New York, v.49, n.6, p.361-367, 1998.
- MAKANOVA, J.; SIMA, J.; BREZOVA, V.; ELIAS, H. Stability and photochemistry of kojatoiron(III) chelates. *Monogr. Ser. Int. Conf. Coord. Chem.*, Bratislava, v.3, p.201-206, 1997. (Progress in Coordination and Organometallic Chemistry).
- MASAKI, H. Evaluation method of agents for skin depigmentation. *Fragrance J.*, Tokyo, v.27, n.1, p.22-31, 1999.
- MASUDA, M.; SUZUKI, J.; SHIBUYA, J. *Skin-lightening cosmetics containing hydroquinones and/or kojic acids*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 09052817 A2, 1997. 6p.
- MEYBECK, A. *Pharmaceuticals or cosmetics containing hydroquinone and kojic acid mixtures encapsulated in liposomes or in lamellar lipid phases*. PCT Int. Appl. WO 8809659 A1, 1988. 21p.
- MINAMITSUJI, Y.; SUGIYAMA, S.; SINGH, S.; JIMBOW, K. N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol exerts selective melanocytotoxicity through apoptotic process. *Sapporo Igaku Zasshi*, Sapporo, v.67, n.1/2, p.23-37, 1998.
- MISHIMA, Y.; MOTONO, M. *Topical preparations containing kojic acid for treatment of skin pigmentation*. Eur. Pat. Appl. EP 404162 A1, 1990. 8p.
- MITANI, H.; KOSHIIISHI, I.; SUMITA, T.; IMANARI, T. Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v.411, p.169-174, 2001.
- MIYASAKI, T.; SATO, M.; YOSHINAKA, R.; SAKAGUCHI, M. Synthesis of ascorbyl-2-phosphate by liver enzyme of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.100, n.4, p.711-716, 1991.
- MOHAMAD, R.; ARIFF, A.; HASSAN, M.A.; ISMAIL, M.; KARIN, A.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Importance of carbon source feeding and pH control strategies for maximum kojic acid production from sago starch by *Aspergillus flavus*. *J. Biosci. Bioeng.*, Osaka-fu, v.94, n.2, p.99-105, 2002.

- MONTAGNA, W.; CARLISKE, K. Structural changes in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.73, p.47-53, 1979.
- MONTI, D.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; NAJARRO, M.; SAETTONE, M.F.; BOLDRINI, E. Effect of different terpen-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.237, p.209-214, 2002.
- MORAES, M.S. Consideration about official pariparoba *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Rev. Bras. Farmacogn.*, São Paulo, v.1, n.1, p.101-108, 1986.
- MORAES, M.S.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, M.K.; AKISUE, G.; MANCINI, B. Morfodiagnose da droga pariparoba *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Rev. Cienc. Farm.*, Araraquara, v.7, p.27-37, 1985.
- MORISAKI, K.; OZAKI, S. Design of novel hybrid vitamin C derivatives: thermal stability and biological activity. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.44, n.9, p.1647-1655, 1996.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its Quantification *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v.52, p.103-112, 2001.
- MOTONO, M. Sodium hydrogen sulfite or hydrogen peroxide as discoloration inhibitor in endermic cosmetics of kojic acid or kojic acid derivatives. *Eur. Pat. Appl. EP 419901 A1*, 1991. 10p.
- NAIK, A.; GUY, R.H. Infrared spectroscopy and differential scanning calorimetric investigations of the stratum corneum barrier function. In: POTTS, O.R.; GUI, R.H. *Mechanisms of transdermal drug delivery: drugs and the pharmaceutical sciences*. New York: Marcel Decker, v.83, p.87-162, 1997.
- NAIR, V.B.; PANCHAGNULA, R. Effect of iontophoresis and fatty acids on permeation of arginine vasopressin through rat skin. *Pharmacol. Res.*, Sidcup, v.47, p.563-569, 2003.
- NAIR, X.; TRAMPOSCH, K.M. UVB-induced pigmentation in hairless mice as an *in vivo* assay for topical skin-depigmenting activity. *Skin Pharmacol.*, Basel, v.2, n.4, p.187-197, 1989.

- NAKAGAWA, M.; KAWAI, K.; KAWAI, K. Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermatitis*, Oxford, v.32, n.1, p.9-13, 1995.
- NAKAJIMA, M.; SHINODA, I.; FUKUWATARI, Y.; HAYASAWA, H. Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity. *Pigm. Cell Res.*, Oxford, v.11, n.2, p.12-17, 1998.
- NARISHETTY, S.T.K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.95, p.367-379, 2004.
- NIAZY, E.M. Influence of oleic acid and other permeation promoters on transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.67, p.97-100, 1991.
- NIHEI, K.-I.; KUBO, I. Identification of oxidation product of arbutin in mushroom tyrosinase assay system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Amsterdam, v.13, p.2409-2412, 2003.
- NISHIZAKA, T.; YAMASAKI, S. Screening of skin penetratable oils for cosmetics. *Drug Delivery Syst.*, Tokyo, v.13, n.5, p.347-351, 1998.
- NITZSCHE, R.; HILDEBRANDT, R.; MITZNER, R.; ROEBISCH, G.E. Equilibria and kinetics of 1:1 complex formation of aluminium(III) with kojic acid in aqueous solution. *Monatsh. Chem.*, Wien, v.119, n.4, p.495-504, 1988.
- NOHYNEK, G.J.; KIRKLAND, D.; MARZIN, D.; TOUTAIN, H.; LECLERC-RIBAUD, C.; JINNAI, H. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. *Food Chem. Toxicol.*, Amsterdam, v.42, p.93-105, 2004.
- NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.250, p.359-369, 2003.
- OHYAMA, Y.; MISHIMA, Y. Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. *Fragrance J.*, Tokyo, v.18, n.6, p.53-58, 1990.
- OKAZAKI, K. *Kojic acid mixtures as skin lightening agents*. Eur. Pat. Appl. EP

381057 A2, 1990. 15p.

- OLIVEIRA, M.N.; GIOIELLI, L.A.; FREITAS, P.C.D.; NASCIMBENI, F.N.; BARUFALDI, R. Potencial lipídico da flora brasileira para a fabricação de bases cosméticas veiculando princípios ativos naturais. In: X CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, ENCONTRO BRASILEIRO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 10, São Paulo, 1996. *Anais*. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, p.334-340, 1996.
- OLIVER, A.E.; CROWE, L.M.; ARAUJO, P.S.; FISK, E.; CROWE, J.H. Arbutin inhibits PLA2 in partially hydrated model systems. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1302, n.1, p.69-78, 1996.
- OLIVER, A.E.; HINCHA, D.K.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H. Interactions of arbutin with dry and hydrated bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1370, n.1, p.87-97, 1998.
- OLIVER, A.E.; HINCHA, D.K.; TSVETKOVA, N.M.; VIGH, L.; CROWE, J.H. The effect of arbutin on membrane integrity during drying is mediated by stabilization of the lamellar phase in the presence of nonbilayer-forming lipids. *Chem. Phys. Lipids*, Amsterdam, v.111, n.1, p.37-57, 2001.
- OOYAMA, Y. *Skin-lightening preparations containing (hydrolyzed) proteins and kojic acid (esters)*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01100113 A2, 1989. 5p.
- OSBORNE, D.W.; HATZENBUHLER, D.A. The influence of skin surface lipids on topical formulations. In: OSBORNE, D.W.; AMANN, A.H., eds. *Topical drug delivery formulations: drugs and the pharmaceutical sciences*. New York: Marcel Decker, v.42, p.69-86, 1990.
- OSTRENGA, J.; STEINMETZ, C.; POULSEN, B. Significance of vehicle composition. I. Relationship between topical vehicle composition, skin penetrability and clinical efficacy. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.80, n.8, p.1175-1179, 1971.
- OSTRENGA, J.; STEINMETZ, C.; POULSEN, B.; YETT, S. Significance of vehicle composition. II. Prediction of optimal vehicle composition. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.67, n.8, p.1180-1183, 1974.

- OSTROSKY, E.A. *Sistemas para avaliar in vitro a liberação e permeação da vitamina E (alfa-tocoferol) em formulações tópicas*. São Paulo, 2001. 114p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- OWENS, R.G.; WELTY, R.E.; LUCAS, G.B. Gas chromatographic analysis of the mycotoxins kojic acid, terreic acid, and terrein. *Anal. Biochem.*, New York, v.35, n.1, p.249-258, 1970.
- OYAMA, Y. *Cosmetics containing kojic acid and vitamin E for the inhibition of melanin formation*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 62178506 A2, 1987 Showa, 6p.
- OYAMA, Y. *Cosmetics containing melanin formation-inhibiting agents*. Eur. Pat. Appl. EP 402776 A2, 1990. 9p.
- OYAMA, Y. *Cosmetics with skin-lightening properties containing kojic acid derivatives and melanin synthesis-inhibiting compounds*. Eur. Pat. Appl. EP 308919 A1, 1989. 17p.
- OYAMA, Y. *Melanin formation-inhibiting preparations containing kojic acids and carboxylic acids*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 03011010 A2, 1991. 6p.
- OYAMA, Y. *Skin lotions, ointments, and creams containing thiocetic acid for prevention of skin darkening*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 63008315 A2, 1988. 6p.
- OYAMA, Y. *Skin-whitening preparations containing chelidonic acid*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 63008317 A2, 1988. 5p.
- OZTURK, G.; EROL, D.D.; AYTEMIR, M.D.; UZBAY, T. New analgesic and antiinflammatory agents 4(H)-pyridinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, Amsterdam, v.37, p.829-834, 2002.
- PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; DE SOUSA, T.T.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.93, p.51-56, 2004.
- PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOMÉ, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Anti-inflammatory effect of

- kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vasc. Pharmacol.*, Amsterdam, v.39, p.303-307, 2003.
- PARRISH, F.W.; WILEY, B.J.; SIMMONS, E.G.; LONG, L. Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.14, n.1, p.139, 1966
- PECHTOLD, L.A.R.M.; ABRAHAM, W.; POTTS, O.R.; GUI, R.H. *Mechanisms of transdermal drug delivery*. drugs and the pharmaceutical sciences. New York: Marcel Decker, 1997. p.199-213. (Drugs and pharmaceutical sciences, v.83).
- PECK, K.D.; HIGUCHI, W.I. Characterization of the passive transdermal diffusional route of polar/ionic permeants. In: POTTS, O.R.; GUI, R.H. *Mechanisms of transdermal drug delivery*. drugs and the pharmaceutical sciences. New York: Marcel Decker, 1997. p.267-290. (Drugs and pharmaceutical sciences, v.83).
- PETKOU, D.; DIAMANTIDIS, G.; VASILAKAKIS, M. Arbutin oxidation by pear (*Pyrus communis* L.) peroxidases. *Plant Science*, v.162, p.115-119, 2002.
- PIEMI, M.P.Y.; DE LUCA, M.; GROSSIORD, J.-L.; SCILLER, M.; MARTY, J.-P. Transdermal delivery of glucose through hairless rat skin *in vitro*: effect of multiple and simple emulsions. *Int. J. Pharm.*, The Hague, v.171, p.207-215, 1998.
- PIROT, F.; BERARDESCA, E.; KALIA, Y.N.; SINGH, M.; MAIBACH, H.I.; GUY, R.H. Stratum corneum thickness and apparent water diffusivity: facile and noninvasive quantitation *in vivo*. *Pharm. Res.*, Dordrecht, v.15, n.3, p.492-494, 1998.
- QUEVEDO Jr., W.C.; HOLSTEIN, T.J.; DYCKMAN, J. Influence of depigmenting chemical agents on hair and skin color in yellow (pheomelanin) and black (eumelanin) mice. *Pigm. Cell Res.*, Oxford, v.3, n.2, p.71-79, 1990.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

- RODELET, J.-F. *Depigmenting compositions containing liposomes encapsulating a concentrated plant extract rich in arbutin and glycospheres*. Eur. Pat. Appl. EP 692243 A1, 1996. 9p.
- ROGUET, R.; COHEN, C.; LECLAIRE, J. The use of a reconstructed human epidermis Episkin for the assessment of safety and efficacy of cosmetic products. *In Vitro Toxicol.*, New York, v.8, n.4, p.427-429, 1995.
- ROGUET, R.; COHEN, C.; ROBLES, C.; COURTELLEMONT, P.; TOLLE, M.; GUILLOT, J.P.; DUTEIL, X. An interlaboratory study of the reproducibility and relevance of Episkin, a reconstructed human epidermis, in the assessment of cosmetics irritancy. *Toxicol. In Vitro*, Oxford, v.12, n.3, p.295-304, 1998.
- ROLLAND, A.; DEMICHELIS, G.; JARNOULLE, J.-C.; SHROOT, B. Influence of formulation, receptor fluid and occlusion on *in vitro* drug release from topical dosage forms, using an automated flow-through diffusion cell. *Pharm. Res.*, Dordrecht, v.4, n.1, p.82-86, 1992.
- SAITO, S.; KATAOKA, K. *Discoloration-preventing agents containing kojic acid and sulfur-containing amino acids for fresh foods*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 08266245 A2, 1996. 5p.
- SAITO, S.; SHINRO, O.; HIDA, D. *Discoloration inhibitors for white-meat fish containing kojic acid and discoloration prevention method*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 09173024 A2, 1997. 3p.
- SAKODA, T.; TOYAMA, K. *Aqueous topical compositions comprising kojic acid, salicylic acid and a water soluble glycol ether*. PCT Int. Appl., WO 9817247 A1, 1998. 16p.
- SAKUMA, K.; OGIHARA, M.; YAMAMOTO, K. *In vitro* screening of human and bovine placenta extracts used as an active component in cosmetics. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, Tokyo, v.42, n.2, p.172-177, 1996.
- SANO, H.; WATANABE, T. *Dentifrices containing kojic acid*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 11021222 A2, 1999. 8p.
- SANTOS, D.; BAHIA, M.F.G. *Promotores de absorção e penetração*. *Cosmet. Toiletries*, Ed. Port., São Paulo, v.7, n.9/10, p.42-52, 1985.
- SCHNEID, E.S.; OBELAR, E.; COLARES, M.I.T.; RODEGHERI, V.J.;

- BIZZOTO, J.H.; BATTASTINI, A.M.; BAISCH, A.L.M.; VENSKE DE ALMEIDA, T.R.; SILVA, F.A.; SINNOT SILVA, E. Effects of *Piper sp* extract on pregnancy in rats. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.111-113, 1988.
- SERTIE, J.A.A.; RESENDE, B.D.; SUDO, L.S.; HANADA, S. Atividade analgésica e antiinflamatória do óleo de copaíba. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 10, Serra Negra, 1995. *Resumos*. São Paulo: FESBE, 1995. p.239, res.16.10.
- SHIBUYA, T.; MUROTA, T.; SAKAMOTO, K.; IWAHARA, S.; IKENO, M. Mutagenicity and dominant lethal test of kojic acid—Ames test, forward mutation test in cultured Chinese hamster cells and dominant lethal test in mice. *J. Toxicol. Sci.*, Tokyo, v.7, n.4, p.255-262, 1982.
- SHIH, Y.; ZEN, J. Voltammetric determination of kojic acid in cosmetic bleaching products using a disposable screen-printed carbon electrode. *Electroanalysis*, Bognor Regis, v.11, n.4, p.229-233, 1999.
- SHIMAI, Y.; NAKANO, E.; OZAWA, N.; NISHIURA, A. *Skin-lightening cosmetics containing caffeic acids*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 02255607 A2, 1990. 4p.
- SILVA, B.P.; PARENTE, J.P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*, Amsterdam, v.72, p.887-893, 2001.
- SILVA, E.C. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo arbutina, associada ou não ao ácido glicólico*. São Paulo, 1998. 181p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- SILVA, M.F.; SILVA, L.B.L.; ROLIM NETO, P.J.L.; SANTANA, D.P. Óleo de babaçu: novo adjuvante lipofílico. *Cosmet. Toiletries, Ed. Port.*, São Paulo, v.12, n.9/10, p.65-68, 2000.
- SILVA, R.A.D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Nacional, 1926. p.110, 111, 649.
- SON, S.M.; MOON, K.D.; LEE, C.Y. Inhibitory effects of various antibrowning

- agents on apple slices. *Food Chem.*, Amsterdam, v.73, p.23-30, 2001.
- SOTTOFATTORI, E.; ANZALDI, M.; BALBI, A.; TONELLO, G. Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.18, n.1/2, p.213-217, 1998.
- STICHER, O.; SOLDATI, F.; LEHMAN, D. High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of arbutin, methylarbutin, hydroquinone and hydroquinone monomethylether in *Arctostaphylos*, *Bergenia*, *Calluna* and *Vaccinium* species. *Planta Med.*, Stuttgart, v.35, n.3, p.253-261, 1979.
- SU, Z.; LI, B.; LIU, H. Study on stability of kojic acid and its effect on skin discoloration. *Riyong Huaxue Gongye*, Beijing, v.2, p.56-57, 1999.
- SUN, H.; WANG, X.; HUANG, R.; YUAN, C. Determination of arbutin in the herbs of *Vaccinium vitis-idaea* L. by RP-HPLC. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, Beijing, v.22, n.9, p.555, 1997.
- SUN, W.; TAO, W. Application of kojic acid in food additives. *Shipin Yu Fajiao Gongye*, Beijing, v.23, n.1, p.69-72, 1997.
- SUZUKI, K.; ONO, F. *Tooth-lightening patch*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 10017448 A2, 20 jan. 1998. 4p.
- TAKEUCHI, K.; DEURA, H.; ISHIDA, K. *Skin-lightening cosmetics containing kojic acid (derivatives) and cGMP (derivatives)*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01121206 A2, 1989. 7p.
- TAKEUCHI, K.; DEURA, H.I. SHIDA, K. *Skin-lightening cosmetics containing kojic acid (derivatives) and aloe extract solutions and/or powders*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01121205 A2, 1989. 6p.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. *Compêndio de fitoterapia*. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, p.26-27, 1995.
- THE MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biomedical. 13th. ed. Whitehouse Station: Merck, p.131, 440, 951, 2001.
- THORNFELDT, C.R. *Organic peroxides or kojic acid esters for treatment of disease related to organelle hyperactivity*. Eur. Pat. Appl. EP 268907 A2, 1988. 5p.

- TOKUE, W.; ITO, K. *Rough skin-preventing and skin-lightening cosmetics*.
Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 09263514 A2, 1997. 7p.
- UEDA, T.; WATANABE, Y.; AKAO, K.-I.; SUZUKI, H. Noninvasive detection by ATR and NIR-DR methods for skin-care ionic materials transported into the skin by iontophoresis. *J. Mol. Struct.*, Amsterdam, v.661/662, p.391-396, 2003.
- UNITED States Pharmacopeia: USP 26: The National Formulary: NF 21.
Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.2439-2442.
- VACHALKOVA, A.; BRANSOVA, J.; BRTKO, J.; UHER, M.; NOVOTNY, L. Polarographic behavior of kojic acid and its derivatives, determination of potential carcinogenicity and correlation of these properties with their other attributes. *Neoplasma*, Bratislava, v.43, n.4, p.265-269, 1996.
- VIRADOR, V.M.; KOBAYASHI, N.; MATSUNAGA, J.U.N.; HEARING, V.J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal. Biochem.*, New York, v.270, n.2, p.207-219, 1999.
- WANG, Z.; ITOH, Y.; HOSAKA, Y.; KOBAYASHI, I.; NAKANO, Y.; MAEDA, F.; YAMAKAWA, J.; NISHIMINE, M.; SUENOBU, T.; FUKUZUMI, S.; KAWASE, M.; YAGI, K. Mechanism of enhancement effect of dendrimer on transdermal drug permeation through polyhydroxyalkanoate matrix. *J. Biosci. Bioeng.*, Osaka-fu, v.96, n.6., p.537-540, 2003.
- WEI, C.I.; HUANG, T.S.; FERNANDO, S.Y.; CHUNG, K.T. Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.59, n.1/3, p.213-220, 1991.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Delivery Rev.*, Amsterdam, v.56, p.603-618, 2004.
- WILLIAMS, A.C.; YAMANE, M.A.; BARRY, B.W. Electrical conductivity through snake and human skin membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.4, n.1, p.146, 1996.
- YAMAMOTO, S. *Cosmetics containing melanin formation-inhibiting agent*. Eur. Pat. Appl., EP 402858 A2, 1990. 7p.
- YAMAMOTO, S. *Purification of kojic acid by sublimation, for drugs used externally*. Eur. Pat. Appl., EP 289027 A1, 1988. 6p.

- YAMAMURA, T. Biochemical approach for diagnosis of skin conditions and evaluation of skin care products. *Nippon Keshohin Gijutsusha Kaishi*, Yokohama, v.32, n.2, p.117-123, 1998.
- YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Evaluation and prediction of skin permeation behavior of substances. *Nippon Koshohin Kagakkaishi*, Tokyo, v.22, n.3, p.199-207, 1998.
- YOKOGAWA, Y.; OTA, M.; YAGI, E.; TANAKA, N. *Skin preparations containing melanin formation inhibitors*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 09227355 A2, 1997. 9p.
- YOSHIHAMA, K. *Discrimination of cosmetics for sensitive skin based on paraben permeation through semipermeable membrane and the cosmetics*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 1999. 6p.
- YOURICK, J.J.; BRONAUGH, R.L. Percutaneous penetration as it relates to the safety evaluation of cosmetic ingredients. In: YOURICK, J.J.; BRONAUGH, R.L. *Drugs Pharm. Sci.*, 3.ed. New York: Marcel Dekker, p.659-671, 1999.
- YU, S.U. Drug release characteristics and skin irritancies of topical gels and multiple emulsion creams containing kojic acid. *Yakche Hakhoechi*, Seoul, v.28, n.2, p.87-92, 1998.
- ZBOROWSKI, K.; GRYBOS, R.; PRONIEWICZ, L.M. Determination of the most stable structures of selected hydroxypyrones and their cations and anions. *J. Mol. Struct.*, Amsterdam, v.639, p.87-100, 2003.