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* da permeabilidade cutânea da rutina em
emulsões cosméticas**

André Rolim Baby

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2007

André Rolim Baby

Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em
emulsões cosméticas

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2007

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

Baby, André Rolim
B115a Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rotina em
emulsões cosméticas / André Rolim Baby. -- São Paulo, 2007.
144p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

I. Emulsão cosmética : Cosmetologia I. T. II. Velasco,
Maria Valéria Robles, orientador.

668.55 CDD

André Rolim Baby

Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em
emulsões cosméticas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco
orientadora/presidente

Prof.^a Dr.^a Maria Virgínia Scarpa Gomes de
Oliveira
1º. examinador

Prof.^a Dr.^a Renato Ferreira Travenço Lopez
2º. examinador

Prof.^a Dr.^a Leticia Regina Nunes Salgado
3º. examinador

Prof.^a Dr.^a Elisabete Pereira dos Santos
4º. examinador

São Paulo, 10 de 09 de 2007.

DEDICATÓRIA

À **Deus** e aos meus **Senhores**,
meus protetores.

Aos meus pais, **João Carlos** e **Liliam**,
À minha irmã, **Michele**,
À minha tia, **Regina**,
Aos meus avós, **Joaquim** e **Laurice**.

À minha orientadora,
Prof.^a Dr.^a Maria Valéria Robles Velasco.

À **Prof.^a Dr.^a Telma Mary Kaneko**.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** e aos meus **Senhores**, pela proteção e por iluminarem este caminho.

À minha mãe, **Liliam**, meu pai, **João Carlos**, minha irmã, **Michele**, minha tia **Regina** e meus avós, **Joaquim** e **Laurice**.

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Maria Valéria Robles Velasco**.

À **Prof.^a Dr.^a Telma Mary Kaneko**.

À **Prof.^a Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto**.

À **Prof.^a Titular Silvia Regina Cavani Jorge Santos**.

À **Prof.^a Titular Elizabeth Igne Ferreira**.

À **Prof.^a Dr.^a Cristina Helena dos Reis Serra** e **Prof.^a Dr.^a Valentina Porta**.

Ao **Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz**, **Prof.^a Dr.^a Vladi Olga Consiglieri** e **Prof.^a Dr.^a Dominique Corinne Hermine Fischer**.

À **Prof.^a Dr.^a Elisabete Pereira dos Santos** e **Prof.^a Dr.^a Maria José Vieira Fonseca**.

Ao **Prof. Titular Yoshio Kawano**, **Prof.^a Dr.^a Elizabeth Pinheiro Gomes Áreas**, **Prof.^a Dr.^a Maria Elena Santos Taqueda**, **Dr. Otávio Azevedo Mercadante** e **Dr. Wilson Fernandes**.

À **Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos** e **Prof.^a Dr.^a Nilsa Sumie Yamashita Wadt**.

À **Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto**.

À Vivian Zague.

Ao Carlos Alberto Haroutiounian-Filho, Fernanda Daud Sarruf e Carlos Roberto Tavante-Júnior.

À Carolina Penteado Moraes Maciel, Deborah de Oliveira Nishikawa e Luara Laratta Vasconcelos.

À Tânia Cristina de Sá Dias, Idalina Maria Nunes Salgado-Santos, Luciana Scotti e Dona Lélia, Cláudia Silva Cortez Pereira, Fernanda Fialho de Oliveira e Rafael Pinto Vieira.

À Áurea Cristina Lemos Lacerda, Beatriz Resende Freitas, Elissa Arantes Ostrosky, Márcia Lombardo, Patrícia Santos Lopes e Vânia Rodrigues Leite e Silva.

À Maria Fernanda Salomão de Azevedo e Thay Lyse Salzano de Andrade.

À Bianca Ramos Pezzini, Camila Diaz, Carla Aparecida Gonçalves dos Santos, Daniela Roberta Victor Naresse, Evelyn Ojoe, Gabriele Wander Ruas, George Gualberto Gualter Oliveira, Henrique F. Melo, Janisse Crestani de Miranda, Letícia Pessole, Marcelo Alves da Silva, Marcelo Dutra Duque, Michele Georges Issa, Natália Canesin Araújo, Patrícia Rivas Granizo, Rogério Nepomuceno Kreidel, Tércio Elyan Martins, Vanessa Alves Pinheiro e Yang Min Ya.

À Prof.^a Solange Cezário Gomes Ribeiro Cruz, Prof. Robson Miranda da Gama, Prof. Luis Antonio Paludetti, Almir Roberto Osti, Ana Paula Arantes, André Ferreira de Almeida, Cláudia Maria Janssen, Cledimilson de Araújo Hacebe, Eliete Reis Bastos, Francisco Dias Filho, Ivane Correa da Silva, Jailda da Conceição Fonseca, Jeane Pereira Martins da Silva, Luciana Borrely Ataíde, Maisa Fátima Ferreira Campos, Maria Nilza Reis Rocha, Rejane Maria da Silva Hamachi, Ricardo Hipólito do Amaral, Roberto Costa da Silva, Ronaldo Marcos

da Silva, Solange Rocha da Silva Lima, Tais Costa Lago, Tatiana de Oliveira Gomes e Uarlem Oliveira Martins.

À Elisabete Claro de Souza Paiva e Susy Ramos.

Ao Jorge Alves de Lima, Elaine Midori Ychico e Majô (Maria José da Silva).

Ao Ricardo Lira, Júlia Oshima e Caroline Paganucci.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Ao CNPq/MCT (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ministério da Ciência e Tecnologia).

À Croda, FlowScience, ISP e Rhodia.

À todos que fizeram parte deste trabalho e que imensamente enriqueceram mais uma etapa da minha vida!

BABY, A.R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. São Paulo. 2007. 144 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Resumo: A rutina é empregada como antioxidante e na prevenção da fragilidade capilar. Pode ser veiculada em emulsões tópicas adequadas para atingir o local de ação. Estudos de penetração *in vitro* através da pele humana seria a situação ideal, entretanto, há dificuldades de sua obtenção e manutenção de sua viabilidade. Entre os demais modelos de membrana, a muda de pele de cobra apresenta-se como estrato córneo puro, fornecendo barreira similar ao humano e é obtida sem a morte do animal. Os objetivos desta pesquisa foram: **(1)** desenvolver e avaliar a estabilidade de emulsões cosméticas, contendo rutina e promotores de penetração cutânea, tais como, uréia (U), isopropanol (IP) e propilenoglicol (PG); **(2)** avaliar a liberação da referida substância ativa das emulsões e; **(3)** avaliar a penetração e a retenção cutânea *in vitro* da rutina da formulação de melhor desempenho. Emulsões foram desenvolvidas com rutina a 5,0% p/p e U, IP e PG, associados ou não e em proporções distintas, segundo planejamento fatorial com dois níveis com ponto central. Quantificou-se a rutina das emulsões por espectrofotometria a 361,0 nm, método previamente validado. A liberação da rutina nas formulações foi realizada em células de difusão vertical com membrana de acetato de celulose e água destilada e álcool etílico absoluto 99,5% (1:1), como fluido receptor. O experimento foi conduzido em um período de seis horas, a $37,0 \pm 0,5$ °C e agitação constante de 300 rpm. A emulsão de melhor desempenho quanto à liberação foi estudada quanto à estabilidade (Testes de Estabilidade Acelerada). Para o estudo de penetração e retenção cutânea da rutina dessa formulação foi utilizada muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*. Empregou-se o método espectrofotométrico validado a 410,0 nm para a quantificação da rutina após liberação, penetração e retenção cutânea. Todas as emulsões foram consideradas adequadas após desenvolvimento das formulações. A uréia (isolada e em associação com IP e PG) e o isopropanol (isolado e em associação com PG) influenciaram negativamente a liberação da rutina das emulsões em diversos parâmetros. A rutina liberada e acumulada da formulação contendo PG a 5,0% p/p possuiu valor de $648,80 \pm 53,01$ µg/cm². Fora do esperado, a preparação contendo o número maior de promotores (U 5,0% p/p, IP 5,0% p/p e PG 5,0% p/p) resultou em liberação de menor magnitude igual a $419,76 \pm 17,98$ µg/cm². A presença do PG apresentou-se mais eficiente na liberação da rutina, mas não na sua penetração através da muda de pele de *C. durissus*, restando $0,931 \pm 0,0391$ µg de rutina/mg de muda de pele de cobra. Nas condições de armazenamento a $25,0 \pm 2,0$ °C; $5,0 \pm 0,5$ °C e $45,0 \pm 0,5$ °C, a emulsão com PG e rutina apresentou-se quimicamente estável durante 30 dias. De acordo com os resultados, a emulsão contendo PG apresentou liberação mais expressiva da rutina, no entanto, não ocorreu a penetração cutânea, mas apenas sua retenção no estrato córneo de *C. durissus*. A preparação manteve-se estável em todas as condições de armazenamento.

Palavras-chave: Rutina. Emulsão cosmética. Penetração cutânea *in vitro*. Muda de pele de cobra. Estabilidade de produtos cosméticos

BABY, A.R. ***In vitro* evaluation of rutin cutaneous permeability from cosmetic emulsions**. São Paulo. 2007. 144 f. Thesis (Doctoral) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Abstract: Rutin is employed as antioxidant and to prevent the capillary fragility and, when incorporated in cosmetic emulsions, it must target the action site. *In vitro* cutaneous penetration studies through human skin is the ideal situation, however, there are difficulties to obtain and to maintain this tissue viability. Among the membrane models, the shed snake skin presents itself as pure *stratum corneum*, providing barrier function similar to human and it is obtained without the animal sacrifice. The objectives of this research were: **(1)** development and stability evaluation of cosmetic emulsions containing rutin and penetration enhancers, as urea (U), isopropanol (IP) and propylene glycol (PG); **(2)** release evaluation of the mentioned active substance from the emulsions and; **(3)** evaluation of rutin *in vitro* cutaneous penetration and retention from the emulsion of the best performance. Emulsions were developed with rutin 5.0% w/w and U, IP and PG, associated or not according to factorial design with two levels and central point. Active substance on the formulations was quantified by a validated spectrophotometric method at 361.0 nm. Rutin release from emulsions was performed in vertical diffusion cells with cellulose acetate membrane and distilled water and ethanol 99.5% (1:1), as receptor fluid. The experiment was conducted for six hours, at 37.0 ± 0.5 °C with constant stirring of 300 rpm. Formulation with best profile of rutin release had its stability studied by the Accelerated Stability Assays. Rutin cutaneous penetration and retention from the mentioned emulsion was performed with shed snake skin from *Crotalus durissus*. Spectrophotometry at 410.0 nm, previously validated, determined the active substance after release and cutaneous penetration/retention. All emulsions were considered apparently stables after development. Urea (isolated and associated with IP and PG) and isopropanol (isolated and associated with PG) have influenced negatively the rutin release in several parameters. Emulsion with PG 5.0% w/w presented rutin released and accumulated equal to 648.80 ± 53.01 µg/cm². Unexpectedly, the formulation containing all enhancers (U 5.0% w/w, IP 5.0% w/w and PG 5.0% w/w) has decreased the amount released of the active substance (419.76 ± 17.98 µg/cm²). Emulsion with PG presented more adequate for rutin release, but PG did not provide rutin cutaneous penetration through *C. durissus* skin, retaining 0.931 ± 0.0391 µg rutin/mg shed snake skin. The referred formulation was chemically stable for 30 days after they have been stored at 25.0 ± 2.0 °C, 5.0 ± 0.5 °C and 45.0 ± 0.5 °C. In conclusion, emulsion with PG provided rutin release more expressively, although, it has not been verified the active cutaneous penetration, but only its retention on the *Crotalus durissus stratum corneum*. Formulation was stable in all storage conditions.

Keywords: Rutin. Cosmetic emulsion. *In vitro* cutaneous penetration. Shed snake skin. Cosmetic product stability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura geral da pele. O tecido apresenta disposto em estratos ou camadas (<http://137.222.110.150/calnet/cellbio/page9.htm>) 7
- Figura 2.** Tecido adiposo subcutâneo ou panículo adiposo (www.vms.hr/atlas/histology/04/ah04.htm) 7
- Figura 3.** Adipócitos. Os múltiplos lóbulos das células adiposas encontram-se separadas pelo sistema conjuntivo vascular (www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/empage/eat/eat.htm) 7
- Figura 4.** Sistema microcirculatório periférico cutâneo (<http://naturalperfectionskincare.com/images>) 7
- Figura 5.** Vaso linfático (indicado pela seta) (http://faculty.washington.edu/kepeter/118/photos/lymph_vessel) 7
- Figura 6.** Representação esquemática dos flavonóides (estrutura química geral) (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002) 11
- Figura 7.** Representação esquemática da formula estrutural definitiva da rutina (BARRETO, 2005) 13
- Figura 8.** Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2006) 22

Figura 9. Curva padrão do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) e coeficientes de correlação linear, R^2 ($n = 5$). As concentrações da substância química de referência foram 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 361,0 nm ($n = 6$). Empregaram-se como solvente e branco a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1)

59

Figura 10. Relação entre as concentrações, em $\mu\text{g/mL}$, da amostra comercial do flavonóide rutina função da substância química de referência (rutina padrão secundário, $T = 96,1\%$) para avaliação da especificidade do método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm. Foram utilizadas as médias das concentrações, em réplicas de seis, apresentadas na Tabela 7. A mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) foi empregada como solvente e branco de leitura

67

Figura 11. Pesquisa de interferentes (Ensaio 1 a 9) (λ : 361,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1)

71

Figura 12. Curva padrão da rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) obtida a 410,0 nm ($n = 6$). As concentrações da substância química de referência foram 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$. Empregaram-se como solvente e branco a mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025)

82

Figura 13. Curva padrão da amostra comercial da rutina obtida a 410,0 nm ($n = 6$). Concentrações de leitura: 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$. Solvente e branco: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025)

82

Figura 14.	Relação entre as concentrações da amostra comercial da rutina e substância química de referência ($T = 96,1\%$) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico a $410,0\text{ nm}$ ($n = 6$), descritas na Tabela 18. A mistura de água destilada, álcool etílico $99,5\%$ e solução de hidróxido de sódio $0,25\text{ M}$ ($1:1:0,025$) foi empregada como solvente e branco de leitura	88
Figura 15.	Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 1, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi	93
Figura 16.	Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 2, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi	94
Figura 17.	Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 3, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi	95
Figura 18.	Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 4, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi	96
Figura 19.	Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 5, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi	97
Figura 20.	Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 6, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi	98

- Figura 21.** Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 7, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi 99
- Figura 22.** Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do Ensaio 8, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi 100
- Figura 23.** Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dos Ensaios 9 a 12 (média dos resultados; $n = 12$), utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi 102

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Estrutura geral da pele e sua descrição 4
- Quadro 2.** Planejamento experimental – planejamento fatorial com dois níveis ($DOE\ 2^k$) com ponto central. Ensaio 1 a 12 representam as formulações contendo ou não, e associados ou não, os promotores de penetração cutânea em três níveis de concentração 27
- Quadro 3.** Codificação do planejamento experimental das formulações de acordo com a proporção dos promotores de penetração cutânea em três valores de concentração 27
- Quadro 4.** Estudo crítico dos componentes das formulações. Denominações químicas e funções dos componentes empregados no desenvolvimento das preparações (BRUNETON, 1991; BRANDÃO, 2000; CRODA, 2006; THOMPSON, 2006) 28
- Quadro 5.** Composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações (BRANDÃO, 2000; CRODA, 2006; ISP, 2006; RHODIA, 2006; CHEMYUNION, 2006) 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Determinação da recuperação do padrão do método analítico, empregando a rotina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) e a formulação (Ensaio 8) 38
- Tabela 2.** Dados para a construção da curva padrão das diluições do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$). Os valores das absorbâncias foram obtidos a 361,0 nm, empregando como branco e solvente a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na proporção de 99:1 57
- Tabela 3.** Dados para a elaboração da equação da reta obtida pelo cálculo da regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados para a curva padrão do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$). Os parâmetros da equação da reta foram determinados a partir dos resultados expostos na Tabela 2 (λ : 361,0 nm; *branco e solvente*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1) 58
- Tabela 4.** Tratamento estatístico pela Análise da Variância (ANOVA) aplicado nos resultados para a construção da curva padrão das diluições seriadas da rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$), com nível de significância de $\alpha = 5\%$ (λ : 361,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1) 61
- Tabela 5.** Estudo do intervalo das diluições do flavonóide rutina padrão de referência secundário, $T = 96,1\%$ (λ : 361,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1) 63

Tabela 6.	Limites de detecção e quantificação estimados. Concentração teórica do flavonóide rutina padrão de referência, desvio padrão da curva padrão, desvio padrão médio e coeficiente angular proveniente da equação da reta	65
Tabela 7.	Dados para a elaboração da curva das concentrações da amostra comercial do flavonóide rutina função da substância química de referência (rutina padrão de referência secundário, T = 96,1%) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico no comprimento de onda a 361,0 nm	68
Tabela 8.	Especificidade da metodologia analítica espectrofotométrica (λ : 361,0 nm; <i>branco e solvente espectrofotométrico</i> : álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na, 99:1) calculada segundo Feinberg e Raguènès, 1999, para o flavonóide rutina, com nível de significância de $\alpha = 5\%$	69
Tabela 9.	Recuperação do flavonóide rutina padrão de referência secundário (T = 96,1%) na presença da formulação Ensaio 8 (λ : 361,0 nm; <i>branco e solvente espectrofotométrico</i> : álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1)	73
Tabela 10.	Exatidão e precisão intra-dia avaliadas por meio da Formulação Ensaio 8 (λ : 361,0 nm; <i>branco e solvente espectrofotométrico</i> : mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1)	75
Tabela 11.	Exatidão e precisão inter-dias avaliadas por meio da Formulação Ensaio 8 (λ : 361,0 nm; <i>branco e solvente espectrofotométrico</i> : mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1)	75

- Tabela 12.** Dados para construção da curva padrão das diluições do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$). Os valores das absorbâncias foram obtidos a 410,0 nm, empregando como branco e solvente espectrofotométrico a mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025) 80
- Tabela 13.** Dados para construção da curva padrão das diluições da amostra comercial da rutina (λ : 410,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025) 81
- Tabela 14.** Componentes da equação da reta obtida pelo cálculo da regressão linear do método dos mínimos quadrados da curva padrão do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$). Os parâmetros da equação da reta foram determinados a partir dos resultados expostos na **Tabela 12** (λ : 410,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025) 83
- Tabela 15.** Tratamento estatístico (ANOVA) aplicado para a construção da curva padrão das diluições da rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) para $\alpha = 5\%$ (λ : 410,0 nm; *solvente e branco espectrofotométrico*: mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M na proporção de 1:1:0,025) 84
- Tabela 16.** Estudo do intervalo das diluições seriadas da rutina padrão de referência secundário, $T = 96,1\%$ (λ : 410,0 nm; *solvente e branco espectrofotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025) 86

Tabela 17.	Estudo do intervalo, precisão e exatidão das concentrações da amostra comercial da rutina (λ : 410,0 nm; <i>solvente e branco espectrofotométrico</i> : mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025)	87
Tabela 18.	Concentrações da amostra comercial da rutina em função da substância química de referência (T = 96,1%) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico a 410,0 nm	89
Tabela 19.	Especificidade do método espectrofotométrico a 410,0 nm (<i>solvente e branco espectrofotométrico</i> : água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025). Cálculo segundo Feinberg e Raguènès, 1999, para a rutina, com nível de significância de $\alpha = 5\%$	90
Tabela 20.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 1 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	93
Tabela 21.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 2 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	94
Tabela 22.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 3 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	95
Tabela 23.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 4 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	96

Tabela 24.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 5 ($n = 3$), segundo planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	97
Tabela 25.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 6 ($n = 3$), segundo planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	98
Tabela 26.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 7 ($n = 3$), segundo planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	99
Tabela 27.	Rutina liberada e acumulada do Ensaio 8 ($n = 3$), segundo planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	100
Tabela 28.	Rutina liberada e acumulada e média dos resultados ($n = 12$) dos Ensaios 9 a 12, segundo planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose	101
Tabela 29.	Valores médios dos parâmetros avaliados na liberação da rutina (Ensaios 1 a 12) e respectivos desvios padrão, utilizando a membrana de acetato de celulose	104
Tabela 30.	Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$)	106

Tabela 31.	Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro tempo de latência (h)	107
Tabela 32.	Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro coeficiente de permeabilidade aparente (cm/h)	108
Tabela 33.	Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro coeficiente de difusão (cm ² /h)	109
Tabela 34.	Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro coeficiente de partição veículo/membrana	109
Tabela 35.	Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro rotina liberada e acumulada (µg/cm ²)	110
Tabela 36.	Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis (<i>DOE 2^k</i>) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro efetividade promotora de penetração cutânea	111
Tabela 37.	Avaliação dos parâmetros físicos, físico-químicos e químicos (teor remanescente da concentração da rutina, % p/v) da formulação Ensaio 5 submetida aos Testes de Estabilidade Acelerada	115

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. PELE	3
2.1.1. ESTRUTURA GERAL DA PELE	3
2.1.2. FUNÇÕES DA PELE	8
2.1.2.1. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS SOMENTE POR ELA	8
2.1.2.2. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS EM COLABORAÇÃO COM DEMAIS	
ÓRGÃOS	9
2.1.3. ESTRATO CÓRNEO, FUNÇÃO BARREIRA E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE	
PRINCÍPIOS ATIVOS ATRAVÉS OU NA PELE	9
2.2. FLAVONÓIDES	11
2.2.1. RUTINA	12
2.3. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FLAVONÓIDES	14
2.4. PROMOTORES DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA E MODELOS DE MEMBRANA	16
2.4.1. URÉIA, ISOPROPANOL E PROPILENOGLICOL	16
2.4.1.1. URÉIA	16

2.4.1.2. ISOPROPANOL	17
2.4.1.3. PROPILENOGLICOL	18
2.4.2. MODELOS DE MEMBRANA: MUDA DE PELE DE COBRA	18
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. MATERIAL	21
4.1.1. EQUIPAMENTOS E DISPOSITIVOS	21
4.1.2. REAGENTES E SOLVENTES	23
4.1.3. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA	23
4.1.4. MATÉRIAS-PRIMAS	23
4.1.5. MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO (EMBALAGEM PRIMÁRIA)	25
4.1.6. MEMBRANAS	25
4.2. MÉTODOS	26
4.2.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES	26
4.2.1.1. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO	26
4.2.1.2. FORMULAÇÕES	28
4.2.1.3. PROCEDIMENTO DE PREPARO	30
4.2.1.4. AVALIAÇÃO	31
4.2.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)	32
4.2.2.1. TESTE DA CENTRIFUGAÇÃO	32
4.2.2.2. TESTE DO ESTRESSE TÉRMICO	32
4.2.2.3. CRITÉRIOS DA ANÁLISE	33
4.2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES	33
4.2.3.1. VALOR DE pH	33
4.2.3.2. VISCOSIDADE APARENTE	33
4.2.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	34
4.2.4.1. LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO	34

4.2.4.2. LIMITE DE DETECÇÃO	35
4.2.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	35
4.2.4.4. ESPECIFICIDADE	36
4.2.4.5. PESQUISA DE INTERFERENTES	36
4.2.4.6. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO	37
4.2.4.7. PRECISÃO	39
4.2.4.8. EXATIDÃO	39
4.2.5. LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO <i>IN VITRO</i> E ESTUDO DE RETENÇÃO CUTÂNEA DO FLAVONÓIDE RUTINA VEICULADO NAS FORMULAÇÕES	40
4.2.5.1. PREPARO DAS CÉLULAS DE DIFUSÃO E PADRONIZAÇÃO DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE	40
4.2.5.2. PREPARO DAS CÉLULAS DE DIFUSÃO E PADRONIZAÇÃO DA MUDA DE PELE DE <i>Crotalus durissus</i>	41
4.2.5.3. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA RUTINA APÓS LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	42
4.2.5.4. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA	44
4.2.5.5. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ESTRATO CÓRNEO DE MUDA DE PELE DE COBRA DE <i>Crotalus durissus</i> /ÁGUA	45
4.2.5.6. LIBERAÇÃO DA RUTINA DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE DIFUSÃO	45
4.2.5.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS DA LIBERAÇÃO DA RUTINA	46
4.2.5.8. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DA RUTINA EM MUDA DE PELE DE <i>Crotalus durissus</i>	50
4.2.5.9. RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	50
4.2.6. TESTES DA ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)	51
4.2.6.1. CONDIÇÕES DO TESTE	51
4.2.6.2. VARIÁVEIS DO TESTE	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. FORMULAÇÕES	53

5.1.1. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)	54
5.2. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	55
5.2.1. LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO	55
5.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO	64
5.2.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	64
5.2.4. ESPECIFICIDADE	65
5.2.5. PESQUISA DE INTERFERENTES	70
5.2.6. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO	72
5.2.7. PRECISÃO	74
5.2.8. EXATIDÃO	76
5.3. LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO <i>IN VITRO</i> E ESTUDO DE RETENÇÃO CUTÂNEA DO FLAVONÓIDE RUTINA VEICULADO NAS FORMULAÇÕES	76
5.3.1. PADRONIZAÇÃO DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE	76
5.3.2. PADRONIZAÇÃO DA MUDA DE PELE DE <i>Crotalus durissus</i>	77
5.3.3. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA RUTINA APÓS LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	78
5.3.3.1. CURVA PADRÃO: LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO	78
5.3.3.2. ESPECIFICIDADE	88
5.3.3.3. PESQUISA DE INTERFERENTES	90
5.3.4. COEFICIENTES DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA E ESTRATO CÓRNEO DE MUDA DE PELE DE COBRA DE <i>Crotalus durissus</i> /ÁGUA	91
5.3.5. LIBERAÇÃO DA RUTINA DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE DIFUSÃO	91
5.3.6. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DA RUTINA EM MUDA DE PELE DE <i>Crotalus durissus</i>	111
5.3.7. RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	113
5.3.8. TESTES DA ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)	113
6. CONCLUSÕES	118

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
APÊNDICE	141
ANEXO	144

1. INTRODUÇÃO

A exposição da pele às radiações favorece a redução das substâncias antioxidantes endógenas, alterações nos lipídios das membranas celulares; inativação de sistemas enzimáticos; e modificações de constituintes protéicos, carboidratos e DNA, propiciando o desenvolvimento de patologias.

A estrutura geral da pele é formada por um tecido estratificado disposto em cinco planos ou camadas, e dentre eles, do plano interno ao externo: a hipoderme (tecido adiposo ou subcutâneo); a derme reticular e a superficial ou papilar; a epiderme viável e o estrato córneo. Cada plano ou camada possui características fisiológicas distintas e funções biológicas próprias. A pele intacta atua como barreira para a penetração de substâncias exógenas, corroborando com a homeostase e suas funções vitais. Este fato é de suma importância para a sobrevivência do ser humano, porém é um obstáculo à ação de substâncias ativas destinadas a atuação na pele.

Flavonóides são compostos polifenólicos de ocorrência ampla no Reino Vegetal e apresentam em comum a origem, isto é, o processo de síntese. São subdivididos como segue: flavonol, flavona, catequina, flavana, flavanona, antocianidina e isoflavonóide.

A rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina), flavonóide da classe dos flavonóis, é utilizada em função de suas ações antioxidante e vasoprotetora. Esta substância, veiculada em emulsões de uso tópico, deve penetrar na pele, atingindo o tecido alvo em concentração adequada para exercer as ações esperadas.

A insuficiência de literatura científica envolvendo informações sobre a estabilidade química relacionada à penetração cutânea da rutina em emulsões ressalta a relevância desta pesquisa, além da originalidade de se avaliar, durante o período do estudo da estabilidade, o comportamento da permeação e retenção cutânea do flavonóide.

Especificamente, este estudo apresenta como etapas: **(1)** Desenvolvimento de emulsões cosméticas contendo rutina e promotores de penetração cutânea, dentre elas a uréia, o isopropanol e o propilenoglicol, associados ou não e em proporções distintas, segundo planejamento fatorial com dois níveis com ponto central, utilizando três valores de concentração; **(2)** Avaliação da estabilidade física, físico-química e química das preparações; **(3)** Análise da liberação, penetração e retenção

cutânea *in vitro* da rutina, utilizando muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* em células de difusão vertical e; **(4)** Avaliação do comportamento destas propriedades durante o envelhecimento acelerado das formulações.

Pelo exposto, justifica-se o desenvolvimento, avaliação da estabilidade de formulações de uso tópico contendo rutina, bem como o estudo de sua penetração cutânea, inclusive o estudo desta propriedade durante o envelhecimento das preparações.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PELE

A pele não é apenas o maior órgão do corpo humano, como, também é o mais complexo, segundo sua histologia, e contém pelo menos cinco diferentes tipos de células que contribuem para a sua organização estrutural, e demais tipos celulares, provenientes dos sistemas circulatório e imunológico (FOLDVARI, 2000; MENON, 2002; HADGRAFT, 2004).

Segundo Agache, 2000, a estrutura geral da pele é formada por um tecido estratificado disposto em quatro planos ou camadas, ilustrada na **Figura 1**, e dentre eles, do plano interno ao externo: a derme reticular e a superficial ou papilar; a epiderme viável e o estrato córneo. Cada plano ou camada possui características fisiológicas distintas e funções biológicas próprias (AGACHE, 2000; BAUMANN, 2002).

Abamba, 1993, e Baumann, 2002, acrescentaram um quinto plano ou camada, o tecido adiposo, subcutâneo ou hipoderme, situado abaixo da derme reticular (ABAMBA, 1993; BAUMANN, 2002).

Na pele também são observadas estruturas anexas, como: glândulas sebáceas e sudoríparas (écrinas e apócrinas), folículos pilosos e unhas (WILKINSON & MOORE, 1990; BARRY, 2002; MAIA, 2002).

2.1.1. ESTRUTURA GERAL DA PELE

O **Quadro 1** descreve as estruturas que compõem a pele.

Quadro 1. Estrutura geral da pele e sua descrição.

Estruturas	Descrição	Referências
Epiderme	Camada mais externa da pele, derivada da ectoderme, em contato direto com o meio ambiente. Avascular e possui em sua constituição o epitélio pavimentoso estratificado, terminações nervosas livres e algumas células migratórias provenientes da derme.	BENY, 2000
Derme	Representa aproximadamente 90% da massa total da pele e seus principais componentes, de origem mesodérmica, são constituídos pelo tecido conjuntivo denso, vasos sanguíneos e linfáticos e terminações nervosas. Apresenta componentes de origem ectodérmica compostos por pró-colágeno, glicoproteínas, fibrilas e microfibrilas de sustentação. A derme superficial ou papilar encontra-se em contato direto com a epiderme e possui fibras colágenas e elásticas, capilares sanguíneos e vasos linfáticos, fibroblastos, macrófagos e demais células habituais do tecido conjuntivo. A derme reticular é constituída por tecido conjuntivo denso, fibras colágenas e elásticas, proteoglicanas e relativamente menor proporção de vasos sanguíneos comparada com a derme papilar.	PUGLIESI, 1996; GARTNER & HIATT, 1999; BENY, 2000

Quadro 1. Estrutura geral da pele e sua descrição (continuação).

Estruturas	Descrição	Referências
Hipoderme	<p>Tecido conjuntivo composto por múltiplos lóbulos gordurosos separados pelo sistema conjuntivo vascular (Figuras 2 e 3). Em função da idade, sexo e estado nutricional, o tecido adiposo modela a silhueta e a fisionomia corporal. No homem, está disposto em maior proporção na região do tronco e abdômen e, na mulher, apresenta maior incidência na região pélvica e abdominal. Esta diferença na distribuição entre homem e mulher corresponde a uma característica sexual secundária que se instala progressivamente após a puberdade. A porção conjuntiva é composta por fibras colágenas e de reticulina e células do retículo endotelial. A vascularização é formada por numerosos capilares que recorrem os lóbulos e que circulam cada adipócito. Este sistema vascular gera uma rede linfática intensa, além de apresentar enervação de origem simpática. Além de ser um reservatório energético, exerce também as seguintes funções: armazenamento de triglicerídeos, liberação de ácidos graxos livres e glicerol, proteção mecânica e térmica.</p>	<p>GARTNER & HIATT, 1999; TANO, 2003; BABY, 2005</p>

Quadro 1. Estrutura geral da pele e sua descrição (continuação).

Estruturas	Descrição	Referências
Microcirculação cutânea	O sistema microcirculatório periférico cutâneo é composto por cinco elementos: arteríola, vênula, capilar, linfático e tecido intersticial (Figura 4). A microcirculação cutânea está disposta como uma rede tridimensional organizada em dois plexos.	WILKINSON & MOORE, 1990; BRAVERMAN, 2000; ROSSI & VERGNANINI, 2000
Microcirculação linfática	A função primordial da microcirculação linfática (Figura 5) é assegurar o transporte das proteínas de alto peso molar desde os tecidos aos vasos sanguíneos. O tecido linfático origina de um remanejamento de estruturas do tecido intersticial e de uma endotelização de fendas e de lacunas no interior das lâminas conjuntivas. Os vasos linfáticos pertencem à unidade circulatória terminal e o comprometimento de suas funções fisiológicas acarretam em edema e posterior fibrose e esclerose.	CIPORKIN & PASCHOAL, 1992; BABY, 2005

Figura 1. Estrutura geral da pele. O tecido apresenta disposto em estratos ou camadas (<http://137.222.110.150/calnet/cellbio/page9.htm>).

Figura 2. Tecido adiposo subcutâneo ou panículo adiposo (www.vms.hr/atlas/histology/04/ah04.htm).

Figura 3. Adipócitos. Os múltiplos lóbulos das células adiposas encontram-se separadas pelo sistema conjuntivo vascular (www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/empage/eat/eat.htm).

Figura 4. Sistema microcirculatório periférico cutâneo (<http://naturalperfectionskincare.com/images>).

Figura 5. Vaso linfático (indicado pela seta) (http://faculty.washington.edu/kepeter/118/photos/lymph_vessel).

2.1.2. FUNÇÕES DA PELE

A função essencial da pele é a proteção do organismo frente a diversidades do meio externo, como: agentes físicos, químicos e biológicos; microrganismos patogênicos e radiações. Também participa na:

- i. Termorregulação;
- ii. Atua como órgão sensorial;
- iii. Apresenta funções endócrinas;
- iv. Influencia na reprodução humana e perpetuação da espécie;
- v. Por meio de sinais visuais ou expressões emocionais, é um órgão que permite evidenciar a comunicação não-verbal (ABAMBA, 1993; MENON, 2002).

A pele humana intacta apresenta-se como uma eficiente barreira contra a penetração e permeação de substâncias exógenas. O que representa uma proteção ao ser humano se torna um fator limitante na ação das substâncias de atividade terapêutica e cosmética aplicadas topicamente (FEINGOLD, 1998; HADGRAFT, 2001; HADGRAFT, 2004; WILLIAMS & BARRY, 2004; BABY, 2005).

Agache, 2000, discorre concisamente sobre as funções da pele, classificadas em dois grupos:

2.1.2.1. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS SOMENTE POR ELA

- i. *Auto-reparação*;
- ii. *Proteção mecânica* (contra choques, pressão, deformações reversíveis, aderência da palma das mãos e planta dos pés);

- iii. *Barreira química*: limitação da absorção de substâncias exógenas, conservação da pele e substância endógenas;
- iv. *Fotoproteção*;
- v. *Proteção microbiológica*;
- vi. *Função psico-social*: aspecto físico e expressões psicológicas.

2.1.2.2. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS EM COLABORAÇÃO COM DEMAIS ÓRGÃOS

- i. *Função neuro-sensorial*: tato, percepção da temperatura e da dor;
- ii. *Termorregulação*: regulação da perda e ganho de calor;
- iii. *Função imune*: primeira linha de informação e de defesa dos processos imunes, principalmente da imunidade tardia;
- iv. *Função de ossificação*: síntese de vitamina D;
- v. *Função androgênica*: conversão da testosterona em diidrotestosterona, mais ativa.

2.1.3. ESTRATO CÓRNEO, FUNÇÃO BARREIRA E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS ATRAVÉS OU NA PELE

A pele humana intacta é considerada uma barreira contra a penetração e permeação de agentes originados do meio externo, como partículas, substâncias químicas, radiações e microrganismos (WILLIAMS & BARRY, 2004). Este fato é de suma importância para a sobrevivência do ser humano, porém é um obstáculo à ação de substâncias ativas quando aplicadas na pele (KALIA *et al.*, 2004).

O estudo da penetração e permeação cutânea de princípios ativos através da pele pode apresentar como primeiro fator limitante a epiderme, em especial o estrato

córneo, devido sua função barreira e por ser a primeira camada de contato com o meio externo. A epiderme é subdividida em duas porções: **(1) a interna**, epiderme viável, composta de células providas de intensa capacidade proliferativa e; **(2) a externa**, formada pelas mesmas células, que após o processo de queratinização e posterior morte, origina o estrato córneo (EC) (MOSER *et al.*, 2001).

O EC é composto pela fusão compacta das células queratinizadas (comeócitos) circundadas por uma matriz lipídica extracelular, alternando-se domínios hidrofílicos e lipofílicos, passíveis de servir de meio para que os princípios ativos penetrem no ou através do EC (BARRY, 1993).

Os termos penetração, permeação e absorção cutânea, possuem diferenças conceituais, sendo:

- i. **Penetração**: passagem do(s) princípio(s) ativo(s) somente através do EC;
- ii. **Permeação**: passagem do(s) princípio(s) ativo(s) através da epiderme, atingindo a epiderme viável ou a derme;
- iii. **Absorção**: passagem do(s) princípio(s) ativo(s) para a corrente sanguínea (RIEGER, 1993).

A penetração e permeação cutânea podem ser avaliadas por técnicas *in vitro*, envolvendo condições experimentais de maior reprodutibilidade e de realização relativamente facilitada. Os resultados obtidos nestes ensaios são de extrema importância para a caracterização dos sistemas de liberação de princípios ativos veiculados em formas cosméticas ou farmacêuticas de aplicação tópica, avaliando a passagem destes através ou na pele e permitem reduzir ou eliminar o emprego e sacrifício de animais de experimentação, pois os estudos *in vitro* podem ser conduzidos com o emprego de membranas sintéticas e mudas de pele de cobra, dentre outras (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000).

A eficácia de produtos farmacêuticos ou cosméticos apresentando em sua composição princípios ativos funcionais é dependente da penetração limitada destes na pele. Os métodos existentes que promovem aumento deste processo se fundamentam **(1)** no emprego de promotores de absorção, **(2)** no estudo profundo das características químicas e físico-químicas das substâncias ativas e a

possibilidade do emprego de seus derivados quando estas forem desfavoráveis, (3) interação entre substâncias ativas e componentes da formulação e material de acondicionamento, (4) utilização de sistemas veiculados de liberação, como microemulsão, ciclodextrinas, nanossomas, lipossomas ou formulações supersaturadas e; (5) a ação de agentes atuantes como promotores físicos de penetração, como iontoforese, sonoforese e eletroporação (BENTLEY *et al.*, 1997; GUY *et al.*, 2000; NAIK, KALIA e GUY, 2000; MOSER *et al.*, 2001).

2.2. FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos polifenólicos de ocorrência ampla no Reino Vegetal. Foram descritos, aproximadamente, mais de 4.200 tipos deste grupo de substâncias (ZUANAZZI, 2000).

Todos flavonóides apresentam em comum a origem, isto é, o processo de síntese. Assim, sob o ponto de vista químico, são compostos formados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono $C_6-C_3-C_6$, como ilustrado no **Figura 6**. São subdivididos, sucintamente, como segue: flavonol, flavona, catequina, flavana, flavanona, antocianidina e isoflavonóide (COSTA, 1987; BRUNETON, 1991; GUARDIA *et al.*, 2001).

Figura 6. Representação esquemática dos flavonóides (estrutura química geral) (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002).

São compostos polifenólicos que podem se apresentar ausentes de ligação com açúcares (aglicona) ou no estado ou forma glicosídica (glicósidos) (TREASE & EVANS, 1996; YAO *et al.*, 2004).

A principal propriedade pela qual os flavonóides são amplamente reconhecidos é a atividade protetora vascular, com redução da permeabilidade e da fragilidade capilar. Dentre os efeitos biológicos, são citadas atividades: antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa, antineoplásica, antiinflamatória, antioxidante, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, inibitória enzimática, antialergêcia, antiagregação plaquetária, antienvelhecimento, e anticelulítica, dentre outras (WALLE, 2004; DI CARLO *et al.*, 1999; NARAYANA *et al.*, 2001; GUARDIA *et al.*, 2001; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; FORMICA & REGELSON, 1995; ROSSI & VERGNANINI, 2000).

A natureza química e atividades biológicas/fisiológicas dependem das (1) características estruturais, (2) grau de hidroxilação, (3) demais substituições e conjugações e (4) grau de polimerização (TREASE & EVANS, 1996).

Em relação às plantas, os flavonóides atuam na prevenção e danos causados pela radiação ultravioleta, como antioxidantes, inibidores enzimáticos e podem elevar a resistência contra insetos e microrganismos patogênicos (HARBORNE, 1988).

2.2.1. RUTINA

A rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina), flavonóide da classe dos flavonóis, é empregada na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar (BRUNETON, 1991).

Griffith e colaboradores, 1955, identificaram a rutina como um pigmento amarelo no estado físico de cristais em agulha. Foi detectada primeiramente na *Ruta graveolens* em 1842 e isolada, posteriormente, da *Caparis spinosa* como ácido rutínico, denominação utilizada para este composto por se apresentar solúvel em soluções alcalinas. Em 1896, foi estabelecida a fórmula definitiva da rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$), representada pela **Figura 7**, com a descoberta da ligação dos açúcares glicose e ramnose na molécula da quercetina. Demais fontes da rutina são:

- i. *Sophora japonica*;

ii. *Fagopyrum esculentum*;

iii. *Dimorphandra mollis* (COUCH, NAGHSKI e KREWSON, 1946; OOMAH & MAZZA, 1996; BARRETO, 2005; PEDRIALI, 2005).

Figura 7. Representação esquemática da formula estrutural definitiva da rutina (BARRETO, 2005).

Supõe-se que a ação vasoprotetora da rutina ocorra devido a uma elevação da resistência do endotélio, modificação de determinados parâmetros da microcirculação como, por exemplo, redução da síntese de mediadores inflamatórios e da hiperpermeabilidade capilar e redução de edemas. Acredita-se que a rutina promova a inibição da hialuronidase, impedindo o extravasamento das proteínas plasmáticas para o interstício, assim, prevenindo a formação de edemas devido a um possível desequilíbrio hídrico local. Além das atividades acima citadas, existem

relatos que de que a rutina reduza a hiperpermeabilidade capilar e eleve o tônus venoso por estimulação da prolina hidroxilase e inibição da prostaglandina E₂ (PGE₂) (ROSSI, 1996; BABY, 2005).

2.3. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FLAVONÓIDES

Como mencionado anteriormente, para os princípios ativos exercerem sua atividade biológica/fisiológica, devem atingir o local de ação em concentrações suficientes sua atuação. Dessa forma, a rutina, quando veiculada nas diversas formas cosméticas, deve ser passível de penetração e permeação cutânea, atingindo o tecido alvo para exercer satisfatoriamente seus efeitos vasoprotetores na microcirculação periférica presente na derme (SAIJA *et al.*, 1998).

Diversos autores como Arct e colaboradores, 2002; Valenta, Nowack e Bernkop-Schnürch, 1999; e Saija e colaboradores, 1998 estudaram a penetração e permeação de flavonóides por metodologias *in vitro* em células de difusão.

Arct e colaboradores, 2002, avaliaram a permeação da rutina, catequina e quercetina por espectrofotometria na região da radiação ultravioleta (UV) na presença de adjuvantes hidrofílicos, que atuam como umectantes, e sua influência no perfil de permeação dos flavonóides através de uma membrana artificial composta de lipossomas contendo lipídeos semelhantes aos presentes no estrato córneo. Segundo os resultados experimentais obtidos, estas substâncias atuaram como inibidores da permeação dos flavonóides em estudo, porém, em níveis diferentes de inibição.

No estudo, apenas foi avaliado o nível de inibição que os umectantes causaram na permeação dos flavonóides veiculados em solução, simulando a fase aquosa de uma emulsão. Os pesquisadores não avaliaram a permeação em veículo emulsionado propriamente dito, forma cosmética amplamente utilizada para a incorporação de princípios ativos.

Saija e colaboradores, 1998, analisaram o perfil de liberação e permeação cutânea *in vitro* dos flavonóides quercetina, naringenina e hesperetina, utilizando a pele humana como modelo de membrana, obtida de cirurgia de redução de mama, empregando como método analítico a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção nos comprimentos de onda 254, 287 e 282 nm, para a quantificação dos flavonóides mencionados, respectivamente. Os pesquisadores

estudaram a eficiência de dois promotores de permeação cutânea, o d-limoneno e a lecitina de soja. Como veículo, foi empregada a forma cosmética gel hidroalcoólica. Os resultados indicaram que a quercetina não apresentou elevação de permeação com a adição dos promotores utilizados; o d-limoneno aumentou significativamente a permeação da naringenina e a lecitina de soja elevou a permeação da hesperetina. Na pesquisa relatada, o veículo empregado para a incorporação dos flavonóides (gel hidroalcoólico) possuía conteúdo elevado de álcool (50% p/p), o que normalmente não é indicado para uma forma cosmética (SAIJA *et al.*, 1998).

Valenta, Nowack e Bernkop-Schnürch, 1999, verificaram a permeação de rutina, como substância química modelo, veiculada na forma cosmética gel à base de deoxicolato de sódio, hidroxietilcelulose e polímero carboxivinílico. Os veículos apresentaram valores de viscosidade aparente distintas. Os pesquisadores empregaram membrana artificial e pele de rato para a avaliação da permeação da rutina, com quantificação posterior por CLAE, com detecção a 350 nm, e por espectrofotometria a 405 nm. Os resultados indicaram que o gel à base de deoxicolato de sódio favoreceu a permeação da rutina, atuando como veículo promotor. Os géis formulados com hidroxietilcelulose e polímero carboxivinílico não obtiveram resultados satisfatórios comparados com os obtidos com a preparação controle (solução aquosa de rutina) (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999).

A literatura científica envolvendo a penetração e/ou permeação de flavonóides é limitada. Frequentemente, os modelos experimentais são conduzidos com o emprego de solventes orgânicos, não indicados nas formas cosméticas em sistemas emulsionados, pois podem causar reação de sensibilização e alterar a estabilidade das emulsões (ARCT *et al.*, 2002).

Assim, a eficiência de preparações para aplicação na pele contendo flavonóides depende da penetração e permeação da substância ativa na pele, influenciada pelo tipo de formulação, componentes e proporções adicionados, método de preparo e deve-se considerar sua estabilidade física, físico-química, química, microbiológica e toxicológica e segurança de uso.

2.4. PROMOTORES DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA E MODELOS DE MEMBRANA

2.4.1. URÉIA, ISOPROPANOL E PROPILENOGLICOL

Com o objetivo de favorecer a atividade antioxidante/vasoprotetora da rotina nos estratos viáveis da pele, existe a necessidade do emprego de promotores de penetração cutânea nas preparações; envolvendo o estudo das características químicas e físico-químicas da substância ativa; e a seleção adequada dos componentes do veículo, com intuito de permitir a liberação do ativo (MOSER *et al.*, 2001).

A função barreira exercida pela pele, em especial o estrato córneo, promove dificuldades na penetração e permeação cutânea de componentes ativos cosméticos ou terapêuticos. Uma estratégia reconhecidamente efetiva para favorecer a passagem de substâncias através da pele é o emprego de promotores de penetração. Uma vasta gama de substâncias químicas foi avaliada para utilização como promotores de penetração cutânea, todavia, a incorporação em veículos cosméticos ou farmacêuticos é restrita devido à elucidação limitada de seus mecanismos de ação que se apresentam, comumente, complexos (WALKER & SMITH, 1996; WILLIAMS & BARRY, 2004; TROMMER & NEUBERT, 2006).

Promotores de penetração cutânea são compostos químicos que interagem com a pele e são passíveis de elevar o fluxo de difusantes através desta membrana biológica. Devem acarretar na redução reversível da resistência ou efeito barreira do EC sem provocar alterações prejudiciais às células viáveis da epiderme (FINNIN & MORGAN, 1999).

2.4.1.1. URÉIA

O emprego da uréia na dermatologia é fundamentado em suas propriedades hidratantes, utilizada principalmente no tratamento da psoríase, neurodermatites e demais condições envolvendo hiperqueratoses. Exerce também atividade queratolítica moderada para período de contato prolongado da preparação com o tecido, portanto, é capaz de influenciar o fluxo de difusantes através dos queratinócitos da pele (KIM *et al.*, 1993; TROMMER & NEUBERT, 2006).

A uréia pode promover o transporte de substâncias ativas através da pele:

- i. Por meio da elevação da hidratação do estrato córneo;
- ii. Pela formação canais de difusão hidrofílicos no tecido;
- iii. Por alteração da matriz lipídica (WALKER & SMITH, 1996; TROMMER & NEUBERT, 2006).

2.4.1.2. ISOPROPANOL

Mecanismos de ação promotora de penetração cutânea diversos foram propostos para os álcoois. A extensão da cadeia alquila dos alcanóis é reconhecida como parâmetro de extrema importância para ação promotora de penetração. A elevação do efeito promotor parece estar relacionada com o aumento das unidades de carbono das moléculas dos álcoois, pelo menos até um valor limite (WALKER & SMITH, 1996; TROMMER & NEUBERT, 2006).

Alcanóis de peso molecular reduzido podem exercer ação promotora atuando como solventes, promovendo a elevação da solubilidade dos difusantes no estrato córneo. Outro mecanismo proposto envolve a alteração do tecido íntegro por contato com álcoois de hidrofobia maior que parecem contribuir com o fluxo de componentes ativos através da pele (TSUZUKI, WONG e HIGUCHI, 1988; WALKER & SMITH, 1996; FOLDVARI, 2000).

O isopropanol é facilmente permeado através da pele, assim como o propilenoglicol, o que poderia alterar a atividade termodinâmica do difusante (GOLDBERG-CETTINA, 1995) e, como este álcool possui propriedades solventes e pode atuar na extração parcial de lipídeos e proteínas (desenvolvimento de domínios porosos), ele pode sofrer partilha no tecido, carreando concomitantemente as substâncias ativas, assim, facilitando a penetração destas na pele (WALKER & SMITH, 1996; ASBILL & MICHNIAK, 2000; FOLDVARI, 2000; WILLIAMS & BARRY, 2004; TROMMER & NEUBERT, 2006).

2.4.1.3. PROPILENOGLICOL

A complexidade molecular dos diferentes glicóis ou polióis é determinante para sua eficácia como promotor de penetração cutânea. A solubilidade do difusante em veículos possuindo polióis é influenciada intensamente pelo número de grupamentos funcionais denominados óxidos de etileno na molécula, porém, a modificação da solubilidade do componente ativo pode ocasionar tanto em promoção da penetração ou inibição da passagem do difusante, isto é, o fluxo, através de membranas. O comportamento é dependente especificamente do componente ativo e da forma cosmética ou farmacêutica em que este é veiculado (WALKER & SMITH, 1996; LARRUCEA *et al.*, 2001).

A ação promotora de penetração cutânea do propilenoglicol está relacionada com:

- i. Sua capacidade de solvatação da α -queratina presente no estrato córneo;
- ii. Sua tendência em competir ou ocupar locais na proteína onde existem pontes de hidrogênio, o que pode resultar em redução da afinidade ou ligação do difusante com o tecido, assim, favorecendo a penetração cutânea;
- iii. Ação sinérgica com demais compostos químicos que possuem propriedades promotoras, como, por exemplo, o ácido oléico (BARRY, 1991; WALKER & SMITH, 1996; LARRUCEA *et al.*, 2001; WILLIAMS & BARRY, 2004).

2.4.2. MODELOS DE MEMBRANA: MUDA DE PELE DE COBRA

Os estudos de penetração através da pele, utilizando método de avaliação *in vitro*, apresentam vantagens, como economia e rapidez na obtenção de resultados, controle das condições do experimento e a possibilidade de avaliar um maior número de ensaios e réplicas, entre outras. A situação ideal seria utilizar pele humana como modelo, porém a pouca disponibilidade deste tipo de material, a necessidade de submeter o experimento ao Comitê de Ética e as dificuldades e

custos de armazenamento e a viabilidade deste modelo de membrana tornam seu uso limitado (SCHMOOK *et al.*, 2001; RIGG & BARRY, 1990).

Como alternativas de membranas, muitos pesquisadores utilizam pele de animais de experimentação, membranas sintéticas e culturas tridimensionais como a epiderme reconstruída, denominada pele equivalente. Existe atualmente interesse no uso da muda de pele de cobra como modelos substitutos da pele humana e pesquisadores têm avaliado sua aplicabilidade em estudos de penetração/permeação com resposta favorável. Esta é composta de estrato córneo puro desprovido da epiderme viável e de folículos pilosos (RIGG & BARRY, 1990). Fornece barreira similar ao estrato córneo humano e pode ser obtida abundantemente sem a morte do animal, uma vez que a troca de pele (ou ecdise) ocorre regularmente no animal adulto, em geral a cada 2 a 3 meses. A muda de pele de cobra apresenta armazenamento facilitado e não apresenta tendência a contaminação e degradação microbiológica, por não conter tecidos vivos (ITOH *et al.*, 1990a; ITOH *et al.*, 1990b; RIGG & BARRY, 1990; WIDLER, SIGRIST e GAFNER, 2002).

Mudas de pele de cobra possuem similaridades com o EC humano, como:

- i. Espessura do tecido (EC humano – **13 a 15 μm** ; muda de pele de cobra – **10 a 20 μm**);
- ii. Estrutura protéica (queratina do tipo α e β);
- iii. Composição lipídica (EC humano – **2,0 a 6,5%**; muda de pele de cobra – **aproximadamente 6,0%**, envolvendo a presença de colesterol, ácidos graxos livres, glicoceramidas e fosfolipídeos, entre outros) (WIDLER, SIGRIST e GAFNER, 2002).

Os ácidos graxos predominantes em mudas de pele de cobra são: C18:0, C18:1, C18:2 e C16:0, semelhantes aos presentes em peles dos mamíferos em geral (RIGG & BARRY, 1990).

3. OBJETIVOS

- i. Desenvolver e avaliar a estabilidade de emulsões cosméticas contendo rutina e os promotores de penetração cutânea uréia, isopropanol e propilenoglicol, associados ou não e em proporções distintas, segundo planejamento fatorial com dois níveis com ponto central.
- ii. Avaliar a liberação da rutina das emulsões cosméticas em células de difusão vertical, empregando como modelo de membrana a de acetato de celulose e selecionar a formulação de melhor desempenho.
- iii. Avaliar a penetração e a retenção cutânea *in vitro* da rutina da formulação selecionada, em células de difusão vertical, empregando como modelo de membrana a muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. EQUIPAMENTOS E DISPOSITIVOS

- i. Agitador mecânico *Fisatom* (713D) com hélice do tipo centrífuga – Fisatom;
- ii. Balança analítica *Sartorius* (BL - 210S) – Sartorius;
- iii. Balanças semi-analíticas *Mettler* (P - 120) – Mettler – e *Scientech* (SA210) – Quimis;
- iv. Banho termostático digital com agitação e graduação de temperatura entre 25 a 100 °C (500/D) – Nova Ética;
- v. Banho termostático de circulação programável com graduação de temperatura entre - 20 a 200 °C – PolyScience;
- vi. Banho termostático incubador digital com movimento orbital circular de velocidade regulável de 20 a 200 rpm e graduação de temperatura entre de 25 a 60 °C (501/D) – Nova Ética;
- vii. Banho ultrassônico *Ultrasonic Cleaner* – Unique;
- viii. Células de difusão vertical (58-001-455), orifício de 15,0 mm, volume de 7,0 mL e área de exposição de 1,77 cm² – Hanson Research;

Figura 8. Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2006).

- ix. Centrífuga *Safety-head* (Base CT 1004) – Adams;
- x. Destilador de água (106) – Fabbe;
- xi. Espectrofotômetro *Beckman* (DU - 640), com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm – Beckman Coulter;
- xii. Estufa, com graduação de temperatura entre 0 a 100 °C, (002CB) – Fanem;
- xiii. Fita adesiva 100 x 4,5 (*Transpore*) – 3 M;
- xiv. Micropipeta monocanal 20 a 100 μL (*Pipetman P100*) – Gilson;
- xv. Micropipeta monocanal 100 a 1.000 μL (4500) – Labsystems;

- xvi. Micropipeta monocal 500 a 5.000 μ L (Série 2.100) – Eppendorf;
- xvii. Peagômetro *Digimed* (DM 20) – Digimed;
- xviii. Plataforma manual para testes de tópicos e transdérmicos *Start Up 6 Cells* – Variomag/Hanson Research;
- xix. Seringa de precisão para amostragem manual de volume igual a 1,0 mL;
- xx. Viscosímetro *ViscoStar* (R), com adaptador para avaliação de amostras de massa reduzida e agulha (*spindle*) TR8 – Fungilab.

4.1.2. REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes e solventes utilizados apresentavam grau de pureza analítico.

- i. Álcool etílico absoluto 99,5% PA-ACS (Synth) – LabSynth;
- ii. Álcool etílico 95% PA-ACS (Synth) – LabSynth;
- iii. Ácido acético glacial PA (Synth) – LabSynth;
- iv. Hidróxido de sódio escamas USP/NF (Synth) - LabSynth

4.1.3. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

- i. Rutina padrão de referência secundário, de pureza 96,1% (NF XI, lote 02134), sem anterior purificação – PVP.

4.1.4. MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas empregadas no desenvolvimento das formulações apresentavam grau de pureza farmacêutico e especificamente estão mencionadas as de grau de pureza analítico (PA).

- i. 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol – Croda;
- ii. Ácido cítrico anidro PA-ACS – LabSynth;
- iii. Adipato de diisopropila – ISP;
- iv. Álcool cetoestearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE) – Croda;
- v. Álcool (iso) propílico 100% (isopropanol) – LabSynth;
- vi. Butil hidroxitolueno – Henrifarma;
- vii. EDTA Na₂ – Chemyunion;
- viii. Goma xantana – Rhodia;
- ix. Miristato de isopropila – Croda;
- x. Polietilenoglicol 400 – Henrifarma;
- xi. Propilenoglicol PA-ACS – LabSynth;
- xii. Rutina PA (amostra comercial) – Tec Pharma/Henrifarma;
 - ♦ *Lote:* 640060103
 - ♦ *Prazo de validade:* janeiro de 2009
 - ♦ *Especificação:* NF XI
 - ♦ *Aspecto:* pó formado de cristais aciculares, coloração amarelo-esverdeado, insípido e inodoro (NF X, 1955; PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977)
 - ♦ *Perda por dessecação:* 7,0%
 - ♦ *Intervalo de fusão:* 210,0 a 215,0 °C
 - ♦ *Teor:* 99,1%

- ♦ *Teor de quercetina*: 1,2%
- ♦ *Teor de pigmentos vermelhos*: 0,0%
- ♦ *Teor de clorofila*: 0,0%
- ♦ *Resíduo de ignição*: 0,2% (CERTIFICADO DE ANÁLISE, s.d.)

xiii. Trietanolamina USP – LabSynth;

xiv. Uréia – PharmaSpecial.

4.1.5. MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO (EMBALAGEM PRIMÁRIA)

- i. Potes brancos opacos boca larga de polietileno com tampa do tipo rosca e batoque – capacidade 50 g;
- ii. Bisnagas brancas opacas de polietileno com tampa do tipo *flip-top* – capacidade 30 g.

4.1.6. MEMBRANAS

- i. Membrana de acetato de celulose (0,45 µm de diâmetro de poro);
- ii. Muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* – amostras gentilmente cedidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

4.2. MÉTODOS

4.2.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

4.2.1.1. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

O desenvolvimento das formulações envolveu a elaboração de emulsões, baseadas em preparações desenvolvidas previamente por BABY, 2005, contendo como substância ativa o flavonóide rutina a 5,0% p/p e, como promotores de penetração cutânea, uréia, isopropanol e propilenoglicol, associados ou não e em proporções distintas, segundo planejamento fatorial com dois níveis (*DOE 2^k*) com ponto central (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2003; BOX, HUNTER e HUNTER, 2005), utilizando três valores de concentração: mínima (sem adição do promotor de penetração cutânea), mediana (2,5% p/p – ponto central) e máxima (5,0% p/p) descrito nos **Quadros 2 e 3**.

Segundo critérios do formulador, mercadológicos e outros referendados pela literatura (DE NAVARRE, 1993; HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999), o desenvolvimento objetivou a obtenção de emulsões macroscopicamente estáveis, valor de pH biocompatível com a pele e de características organolépticas adequadas (aspecto, cor e odor).

Quadro 2. Planejamento experimental – planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central. Ensaios 1 a 12 representam as formulações contendo ou não, e associados ou não, os promotores de penetração cutânea em três níveis de concentração.

Ensaios (Formulações)	Promotores de penetração cutânea		
	Uréia	Isopropanol	Propilenoglicol
1	- 1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1	- 1
3	- 1	+ 1	- 1
4	+ 1	+ 1	- 1
5	- 1	- 1	+ 1
6	+ 1	- 1	+ 1
7	- 1	+ 1	+ 1
8	+ 1	+ 1	+ 1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

Quadro 3. Codificação do planejamento experimental das formulações de acordo com a proporção dos promotores de penetração cutânea em três valores de concentração.

Codificação	Promotores de penetração cutânea (% p/p)		
	Uréia	Isopropanol	Propilenoglicol
- 1	Zero	Zero	Zero
0	2,5	2,5	2,5
+ 1	5,0	5,0	5,0

Legenda:

- 1: concentração mínima (sem adição do promotor de penetração cutânea);
0: concentração mediana (2,5% p/p); + 1: concentração máxima (5,0% p/p)

4.2.1.2. FORMULAÇÕES

As funções cosméticas dos componentes (estudo crítico) e a composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações estão descritas nos **Quadros 4 e 5**, respectivamente.

Os promotores de penetração cutânea incorporados ou não, em associação ou não, e em proporções (% p/p) distintas caracterizaram-se como as variáveis das formulações.

Quadro 4. Estudo crítico dos componentes das formulações. Denominações químicas e funções dos componentes empregados no desenvolvimento das preparações (BRUNETON, 1991; BRANDÃO, 2000; CRODA, 2006; THOMPSON, 2006).

Componentes (denominação química)	Função
Álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE) Adipato de diisopropila Miristato de isopropila Butil hidroxitolueno	Cera auto-emulsionante O/A Emoliente Emoliente Antioxidante
EDTA Na ₂ Goma xantana 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol Água destilada	Quelante/seqüestrante de metais Espessante hidrofílico aniônico Conservante Veículo
Uréia Isopropanol Propilenoglicol	Hidratante e promotor de penetração cutânea Solvente e promotor de penetração cutânea Umectante e promotor de penetração cutânea
Polietilenoglicol 400 Rutina PA	Umectante e agente levigante da rotina Antioxidante e redutor da fragilidade ou permeabilidade capilar

Quadro 5. Composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações (BRANDÃO, 2000; CRODA, 2006; ISP, 2006; RHODIA, 2006; CHEMYUNION, 2006).

Componentes			Composição (% p/p)
Nome químico	Nome INCI	Nome comercial	
FASE A			
Álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE) Adipato de diisopropila Miristato de isopropila Butil hidroxitolueno	Cetearyl alcohol (and) dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate	Crodafos® CES	2,50
	Diisopropyl adipate	Ceraphyl® 230	1,00
	Isopropyl myristate	Crodamol® IPM	2,00
	BHT	---	0,10
	FASE B		
EDTA Na ₂ Goma xantana 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol Água destilada (q.s.p.)	Disodium EDTA	Uniquelan® NA2S	0,10
	Xanthan gum	Rhodicare® S	1,00
	2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	Protectol® BN	0,01
	Aqua	---	100,00
FASE C			
Ureia Isopropanol Propilenoglicol	Urea	---	Zero; 2,50 e/ou 5,00
	---	---	
	Propylene glycol	---	
FASE D			
Polietilenoglicol 400	PEG-8	Carbowax® 400	5,00
Rutina PA	Rutin	Rutina	5,00

4.2.1.3. PROCEDIMENTO DE PREPARO

I. FASE A

Foram pesados os componentes álcool cetoestearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE), adipato de diisopropila, miristato de isopropila e butil hidroxitolueno nas quantidades equivalentes (% p/p), indicadas no **Quadro 5**, suficientes para elaborar de 50,0 a 1.000,0 g de cada preparação.

II. FASE B

Após pesagem dos componentes 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol e EDTA Na₂ em quantidades equivalentes (% p/p), indicadas no **Quadro 5**, suficientes para preparar 50,0 a 1.000,0 g de preparação, efetuou-se sua solubilização em água recém-destillada. Após obtenção da solução, adicionou-se a goma xantana, previamente pesada e homogeneizou-se a dispersão, empregando-se o agitador mecânico, com velocidade de rotação igual a 1.000 rpm e hélice do tipo centrífuga, até obtenção do gel de aspecto opalescente.

III. PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO

Realizou-se o aquecimento das **FASES A e B**, separadamente, à temperatura de 75 – 85 °C. A seguir, a **FASE B** foi adicionada lenta e constantemente à **FASE A**, sob agitação constante a 3.000 rpm pelo período de 5 minutos, empregando-se agitador mecânico e hélice do tipo centrífuga. Após ocorrer o processo de emulsificação pela técnica da inversão de fases (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995; BINKS, 1998; SALAGER *et al.*, 2004; PINTO, 2005), procedeu-se à agitação na velocidade de rotação de 2.000 rpm, até o arrefecimento da preparação (35 – 40 °C).

IV. FASE C

Os componentes uréia, isopropanol e/ou propilenoglicol foram pesados e adicionados ao veículo emulsionado resfriado (35 – 40 °C), sob agitação constante de 2.000 rpm, até homogeneização da preparação.

V. FASE D

A rutina PA foi triturada para redução do tamanho de partícula com auxílio de grau e pistilo de vidro. Após trituração, foi submetido à padronização de tamanho de partícula, empregando tamiz de malha 100 mesh.

O flavonóide rutina foi disperso a temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), levigando-o no polietilenoglicol 400 (THOMPSON, 2006), com auxílio de agitação mecânica adequada até completa dispersão e formação de uma pasta.

A mistura rutina-polietilenoglicol foi transferida lentamente para a formulação resfriada (35 – 40 °C) sob agitação constante do sistema emulsionado à velocidade de 3.000 rpm com hélice do tipo centrífuga, até homogeneização.

Após 48 horas de repouso da preparação, a fim de se completar o processo de emulsificação (LANZET, 1993; RIEGER, 2001; BABY, 2005), corrigiu-se o valor de pH ($6,0 \pm 1,0$) das formulações com trietanolamina ou solução de ácido cítrico 10% p/p, quando necessário.

4.2.1.4. AVALIAÇÃO

As formulações apresentando sinais de instabilidade (cremeação ou sedimentação, floculação e separação de fases), adicionalmente às propriedades organolépticas consideradas inadequadas, segundo critérios do formulador e também referendadas pela literatura, como aspecto, cor e odor subjetivamente desagradáveis, foram rejeitadas no estudo do desenvolvimento das formulações (FOSTER & RYBINSKI, 1998).

4.2.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)

As formulações, Ensaios 1 a 9 (**Quadros 2, 3 e 5**), foram submetidas à Avaliação Preliminar da Estabilidade, empregando os **Testes da Centrifugação e do Estresse Térmico** (WITTERN *et al.*, 1985; BABY, 2005; BRASIL, 2004c; PINTO, 2005).

4.2.2.1. TESTE DA CENTRIFUGAÇÃO

Foram pesados cerca de 5,0 g das formulações em tubos de centrífuga. Procedeu-se ao **Teste da Centrifugação**, em réplicas de três, nas seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C); velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G); tempo de teste de 30 minutos (IDSON, 1988; IDSON, 1993; BRASIL, 2004c).

Após o ensaio, as formulações foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto e classificadas como segue:

- i. **(M)** para modificada;
- ii. **(N)** para normal, sem alteração quanto ao aspecto (BRASIL, 2004c; BABY, 2005).

4.2.2.2. TESTE DO ESTRESSE TÉRMICO

Cerca de 5,0 g das formulações foram pesados e transferidos para tubos de ensaio. As amostras, em réplicas de três, foram submetidas ao estresse térmico, em banho-maria termostatzado, no intervalo de temperatura controlada entre 40 – 80 °C, com progressão de elevação de 10 °C/30 minutos. As formulações foram avaliadas ao término de 80 °C, após atingirem a temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C).

Após o ensaio, as formulações foram classificadas como descrito no *item* 4.2.2.1 (BRASIL, 2004c; BABY, 2005).

4.2.2.3. CRITÉRIOS DA ANÁLISE

Como critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras submetidas à Avaliação Preliminar da Estabilidade, apenas as formulações-teste classificadas como **normal (N)** para ambos os ensaios foram consideradas aptas para serem submetidas sequencialmente aos Testes de Estabilidade Acelerada.

4.2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES

4.2.3.1. VALOR DE pH

Foi determinado nas dispersões das amostras em água recém-destillada e neutralizada na proporção 1:10 em réplicas de três e à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995; PINTO, 2005).

4.2.3.2. VISCOSIDADE APARENTE

Foram pesados cerca de 10,0 g das formulações e transferidos para dispositivo (compartimento) destinado à análise de amostras pequenas (massa reduzida). As condições do viscosímetro *ViscoStar* (R) foram:

- i. Agulha (*spindle*) TR 8;
- ii. Velocidade de agitação de 10 rpm.

O valor da viscosidade aparente (cP, *centiPoise*) foi registrado após 1 minuto de agitação à temperatura ambiente de $25,0 \pm 2,0$ °C.

4.2.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

4.2.4.1. LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO

A linearidade do método analítico foi avaliada por meio da curva padrão e tratamento estatístico pertinente realizado pela regressão linear por meio dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA) (BRASIL, 2003; USP, 2003; BABY *et al.*, 2006a), envolvendo diluições seriadas do flavonóide rutina padrão de referência secundário, de pureza 96,1% (NF XI, lote 02134), sem purificação prévia.

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg do flavonóide rutina padrão de referência secundário e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se uma solução de concentração de 500,0 µg/mL, denominada de solução-estoque. Foi empregado como solvente e branco de leitura espectrofotométrica a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na proporção de 99:1.

A partir da solução-estoque da rutina padrão de referência secundário, diluições foram realizadas em balões volumétricos de 25 mL, originando soluções de concentrações: 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µg/mL.

As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 361,0 nm (BABY *et al.*, 2006a), em réplicas de seis (CAUSON, 1997; BEER *et al.*, 2003; ROLIM *et al.*, 2005). O solvente descrito foi empregado como branco de leitura (NF X, 1955; PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965; VELASCO *et al.*, 2004).

Foi construída a curva padrão segundo a média das leituras das absorbâncias em função das concentrações (µg/mL) do flavonóide rutina padrão de referência secundário. O cálculo da equação da reta da curva padrão foi realizado pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados (MULHOLLAND & HIBBERT, 1997; BABY *et al.*, 2006a).

Para cada concentração foram calculados a média das absorbâncias, o desvio padrão, a precisão (como desvio padrão relativo) e a exatidão, obtendo-se o estudo do intervalo das concentrações da substância química de referência e a linearidade oferecida pelo método espectrofotométrico (BRASIL, 2003). O gráfico foi avaliado visualmente, verificando-se se houve relação linear de resposta, e pela análise estatística pertinente (FABRE *et al.*, 1993; ICH Q2B, 1995; FDA, 2000; BRASIL, 2003).

4.2.4.2. LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção é o menor valor de concentração da substância em análise capaz de ser detectado com grau de confiabilidade adequado, porém, não quantificado com precisão e exatidão aceitáveis. Diferencia-se do ruído do equipamento na relação mínima de ruído:resposta instrumental de 1:3 (GREEN, 1996; ICH Q2B, 1995; JENKE, 1996; USP, 2003; FDA, 2001; BRASIL, 2003).

I. LIMITE DE DETECÇÃO ESTIMADO

O limite de detecção estimado foi calculado segundo a **Equação 1** (BRASIL, 2003), descrita a seguir:

$$LD = 3,3 \times \sigma / CA$$

Equação 1. Limite de detecção estimado. Onde: *LD* é o limite de detecção; σ é o desvio padrão médio obtido por meio da curva padrão e *CA* é o coeficiente angular da equação da reta.

4.2.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação é a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores limites de precisão e exatidão adequados apresentam-se referendados pela literatura (GREEN, 1996; ICH Q2B, 1995; JENKE, 1996; BRASIL, 2003; USP, 2003).

I. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO ESTIMADO

O limite de quantificação estimado foi calculado segundo a **Equação 2** (BRASIL, 2003), descrita a seguir:

$$LQ = 10 \times \sigma / CA$$

Equação 2. Limite de quantificação estimado. Onde: LQ é o limite de quantificação; σ é o desvio padrão médio obtido por meio da curva padrão e CA é o coeficiente angular da equação da reta.

4.2.4.4. ESPECIFICIDADE

A especificidade foi obtida comparando-se, por meio da sobreposição dos espectros de varredura da absorbância, em réplicas de dois e no intervalo de comprimento de onda entre 250,0 – 400,0 nm, soluções com concentração de 20,0 µg/mL do flavonóide rutina padrão de referência secundário (T = 96,1%) e da amostra comercial do referido princípio ativo (rutina, 99,1%) (PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965; POLESELLO, 1997; FDA, 2001; ROLIM *et al.*, 2005).

O branco de leitura e o solvente foram preparados de forma similar ao procedimento descrito no *item 4.2.4.1*.

A obtenção da especificidade do método foi complementada por análise estatística sugerida por Feinberg e Raguènès, 1999. Elaborou-se a curva das concentrações da amostra comercial da rutina em função das concentrações da substância química de referência, em réplicas de seis, nos valores 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µg/mL. As diluições foram realizadas como previamente descrito (*item 4.2.4.1*). Foram determinados o coeficiente angular e a intersecção com o eixo y por meio da obtenção da equação da reta.

A especificidade foi considerada adequada quando o coeficiente angular e a intersecção com o eixo y apresentaram valores estatisticamente iguais a, respectivamente, 1,0 e 0,0 (zero), empregando-se o Teste t de *Student* (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999; BABY *et al.*, 2006a).

4.2.4.5. PESQUISA DE INTERFERENTES

Foram pesados exatamente cerca de 200,0 mg das formulações sem adição da rutina e transferidos para balões volumétricos de 50 mL. Após adição do solvente (álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1), foi realizada agitação vigorosa para

completa dispersão, obtendo-se concentração de 4,0 mg/mL. Posteriormente, se necessário, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 5 minutos para acelerar a sedimentação de possíveis substâncias insolúveis.

Tomaram-se alíquotas de 2,5 mL dos sobrenadantes e procederam-se às diluições, obtendo-se concentrações de 400,0 µg/mL das formulações em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1.

Realizados os espectros de varredura da absorbância, estes foram analisados visualmente por comparação. O método analítico foi considerado sem interferência dos componentes das formulações se não ocorrer leitura espectrofotométrica a 361,0 nm (BABY *et al.*, 2006a).

4.2.4.6. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO

Foram pesados exatamente cerca de 100,0; 200,0 e 300,0 mg da formulação denominada de Ensaio 8, sem a adição da rutina, e transferidos para balões volumétricos de 50 mL, separadamente, e adicionou-se o solvente seguido de agitação vigorosa para completa dispersão. As diluições foram finalizadas por meio da transferência de alíquotas de 2,5 mL das soluções prévias para balões volumétricos de 25 mL, como apresentado na **Tabela 1**.

Partindo-se da solução-estoque do flavonóide rutina padrão de referência secundário, alíquotas foram tomadas e procederam-se às diluições, como descrito na **Tabela 1**. Obtiveram-se concentrações finais de 10,0; 20,0 e 30,0 µg/mL da substância química de referência para determinação da recuperação do padrão do método analítico.

Tabela 1. Determinação da recuperação do padrão do método analítico, empregando a rotina padrão de referência secundário (T = 96,1%) e a formulação (Ensaio 8).

Massa da formulação (mg)	Volume (mL) das diluções da formulação	Concentração da solução-estoque do flavonóide rotina	Volume (mL) da solução-estoque do flavonóide rotina	Concentração final da formulação em solução (µg/mL)	Concentração final da substância química de referência em solução (µg/mL)
transferida para balão volumétrico de 50 mL	transferido para balão volumétrico de 25 mL	padrão de referência secundário (µg/mL)	padrão de referência secundário		
			transferido para balão volumétrico de 25 mL		
100,0			0,5	200,0	10,0
200,0	2,5	500,0	1,0	400,0	20,0
300,0			1,5	600,0	30,0

As absorvâncias foram obtidas a 361,0 nm. O solvente foi utilizado como branco de leitura (GREEN, 1996; BRASIL, 2003; TABORIANSKI, 2003; USP, 2003). O ensaio foi realizado em réplicas de três.

4.2.4.7. PRECISÃO

A precisão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre os resultados das análises individuais, quando o procedimento for aplicado a uma amostra homogênea, em condições de teste idênticas. Envolve a avaliação do grau de dispersão dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra, avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (BRITTAIN, 1998; BRASIL, 2003; BABY, 2005).

Foram pesados exatamente cerca de 100,0; 200,0 e 300,0 mg da formulação (Ensaio 8) contendo 5,0% p/p de rutina e foram diluídas no solvente (álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1), obtendo-se concentrações finais de 10,0; 20,0 e 30,0 µg/mL do referido princípio ativo, respectivamente.

A precisão, calculada como desvio padrão relativo (DPR, %), foi realizada em réplicas de três para cada valor de concentração, envolvendo ensaios intra e inter-dias (FDA, 2000; BRASIL, 2003). As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 361,0 nm (BABY *et al.*, 2006).

$$DPR(\%) = \frac{DP}{C} \times 100$$

Equação 3. Precisão, calculada como desvio padrão relativo (DPR, %). Onde: *DP* é desvio padrão e *C* é a média das concentrações.

4.2.4.8. EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico envolve a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação a um valor nominal ou aceito como verdadeiro ou real (FDA, 2001; SHABIR, 2003).

Procedeu-se às diluições da formulação (Ensaio 8) possuindo 5,0% p/p da rutina, como descrito no item 4.2.4.7, e submeteu-se a leitura espectrofotométrica a

361,0 nm, utilizando a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1, como solvente e branco (BABY *et al.*, 2006).

A exatidão (%) foi realizada em réplicas de três, envolvendo ensaios intra e inter-dias (GREEN, 1996; JENKE, 1996; BRASIL, 2003; ROLIM *et al.*, 2005).

$$Exatidão(\%) = \frac{C}{CT} \times 100$$

Equação 4. Exatidão (%). Onde: C é a média das concentrações e CT é a concentração teórica ou nominal.

4.2.5. LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDO DE RETENÇÃO CUTÂNEA DO FLAVONÓIDE RUTINA VEICULADO NAS FORMULAÇÕES

4.2.5.1. PREPARO DAS CÉLULAS DE DIFUSÃO E PADRONIZAÇÃO DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

Previamente à realização do estudo de liberação da rutina presente nas formulações denominadas de Ensaios 1 a 12, as membranas de acetato de celulose sofreram o processo de padronização.

As membranas foram recortadas adequadamente e lavadas com água destilada corrente. Em seguida, foram imersas em água destilada, a aproximadamente 100 °C, durante 60 segundos (HAIGH & SMITH, 1994; VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999). Este procedimento foi realizado três vezes, e a cada repetição o volume de água destilada era desprezado e repostado por um novo, mantido à mesma temperatura.

Membranas de acetato de celulose foram adequadamente dispostas sobre seis células de difusão vertical, que foram preenchidas pela fase receptora composta pela solução de água destilada e álcool etílico absoluto 99,5%, 1:1 (BARRY, 1983; SAIJA *et al.*, 1998; OECD, 2000; REICHLING *et al.*, 2006). O experimento foi conduzido a $37,0 \pm 0,5$ °C (LI & BIRT, 1996; HAIGH *et al.*, 1998; NGAWHIRUNPAT, OPANASOPIT e PRAKONGPAN, 2004). Procedeu-se à agitação a 300 rpm (LI *et al.*, 2002) durante 10 minutos e, após este período, a fase receptora foi desprezada e repostada em sua totalidade. A fração eliminada da fase receptora foi

analisada por espectrofotometria a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999), para avaliar os possíveis interferentes gerados pela membrana de acetato de celulose em contato com a fase receptora.

4.2.5.2. PREPARO DAS CÉLULAS DE DIFUSÃO E PADRONIZAÇÃO DA MUDA DE PELE DE *Crotalus durissus*

Mudas de pele de cobra de *Crotalus durissus* íntegras foram gentilmente doadas pelo Instituto Butantã, que imediatamente após seu recebimento foram lavadas abundantemente com água destilada. O excesso de água foi removido com o emprego de papel toalha aplicado com compressão suave. O processo de secagem foi finalizado à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) (BABY *et al.*, 2006b; BABY *et al.*, 2006c; BABY *et al.*, 2007). As mudas de pele foram armazenadas em bandejas de plástico, protegidas da luz e à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C).

Porções ventrais das mudas de pele de *Crotalus durissus*, previamente à realização do estudo de penetração e retenção cutânea *in vitro*, foram padronizadas por remoção mecânica das camadas superficiais do tecido, aplicando fita adesiva uma vez. Em seguida, foram hidratadas por imersão em água destilada, a $25,0 \pm 2,0$ °C durante 24 horas, aproximadamente (TURUNEN *et al.*, 1993; MEGRAB, WILLIAMS e BARRY, 1995; HAIGH *et al.*, 1998; PONGJANYAKUL *et al.*, 2002).

Mudas de pele de cobra de *Crotalus durissus* foram recortadas e dispostas sobre seis células de difusão vertical, que foram preenchidas pela fase receptora composta pela solução de água destilada e álcool etílico absoluto 99,5%, 1:1. Procedeu-se à agitação a 300 rpm (LI *et al.*, 2002) por 10 minutos e, após este período, a fase receptora foi desprezada em sua totalidade e repostada completamente. O experimento foi conduzido a $37,0 \pm 0,5$ °C (LI & BIRT, 1996; HAIGH *et al.*, 1998; NGAWHIRUNPAT, OPANASOPIT e PRAKONGPAN, 2004).

4.2.5.3. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA RUTINA APÓS LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

I. CURVA PADRÃO: LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO

A linearidade do método analítico para a determinação da rutina após a liberação, penetração e retenção cutânea *in vitro* foi avaliada por meio da curva padrão e tratamento estatístico dos dados (BRASIL, 2003; USP, 2003; BABY *et al.*, 2006a; ROLIM *et al.*, 2006), envolvendo diluições seriadas da rutina padrão de referência secundário (NF XI, lote 02134), de pureza 96,1%, sem purificação prévia, e da amostra comercial do referido componente ativo.

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg da rutina padrão de referência secundário e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se uma solução de concentração de 500,0 µg/mL (solução-estoque). Foi empregado como solvente e branco de leitura espectrofotométrica a mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M, na proporção de 1:1:0,025 (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999).

Foram preparadas soluções de concentrações: 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 µg/mL, submetidas à leitura espectrofotométrica a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999), em réplicas de seis (CAUSON, 1997; BEER *et al.*, 2003; ROLIM *et al.*, 2005). O solvente descrito foi empregado como branco de leitura.

O procedimento para avaliação da linearidade e do estudo do intervalo foi o mesmo descrito no *item 4.2.4.1*.

II. ESPECIFICIDADE

Foi verificada de forma similar ao descrito no *item 4.2.4.4.*, sendo o intervalo de leitura espectrofotométrica entre 200,0 e 500,0 nm e branco constituído por água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025).

III. PESQUISA DE INTERFERENTES

A. MUDA DE PELE DE COBRA *Crotalus durissus*

Exatamente cerca de 50,0 mg de muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*, que passaram pelo processo de remoção mecânica das camadas superficiais do tecido empregando fita adesiva, foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com a solução de água destilada e álcool etílico absoluto 99,5% (1:1). Transferiu-se o conteúdo do balão volumétrico para vidraria adequada e iniciou-se agitação a 200 rpm, por 24 horas a $37,0 \pm 1,0$ °C. Após a temperatura da solução na presença da muda de pele de cobra atingir $25,0 \pm 2,0$ °C, procedeu-se à adição de 3,125 mL da solução de hidróxido de sódio 0,25 M. A solução foi reservada. Todo o procedimento foi realizado em réplicas de três.

Exatamente de cerca 25,0 mg da rotina padrão de referência secundário foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se uma solução de concentração de 500,0 µg/mL. Foi empregado como solvente e branco de leitura espectrofotométrica, a mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025).

A pesquisa de interferentes foi realizada por meio da sobreposição dos espectros de varredura da absorbância, em réplicas de dois e no intervalo de 200,0 – 500,0 nm, da rotina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$), com concentração igual a 20,0 µg/mL, e da solução hidroalcoólica obtida a partir da muda de pele de cobra *Crotalus durissus*. Realizados os espectros de varredura da absorbância, estes foram analisados visualmente. O método analítico possuiu ausência de interferentes provenientes das mudas de pele de cobra de *Crotalus durissus* quando estas não exibiram leitura espectrofotométrica a 410,0 nm. A mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025) foi empregado como branco.

B. FORMULAÇÕES

Exatamente cerca de 300,0 mg das formulações (Ensaio 1 a 12) sem adição da rotina foram transferidos isoladamente para os compartimentos doadores das

células de difusão vertical, empregando a membrana de acetato de celulose e muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* com remoção mecânica das camadas superficiais do tecido. A distribuição das amostras nos compartimentos foi obtida com o auxílio de espátula plástica e flexível. Os experimentos foram conduzidos a $37,0 \pm 0,5$ °C e agitação constante de 300 rpm (LI & BIRT, 1996; HAIGH *et al.*, 1998; NGAWHIRUNPAT, OPANASOPIT e PRAKONGPAN, 2004).

A pesquisa de interferentes envolvendo as formulações sem rotina em contato com membranas de acetato de celulose e mudas de pele de cobra foi realizada durante seis horas. Em períodos de tempo pré-determinados, coletaram-se alíquotas de 1,0 mL das fases receptoras e adicionou-se 1,5 mL do solvente composto pela mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025), para a verificação de possíveis interferentes provenientes das preparações em contato com as membranas e o fluido receptor. As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999) e, o método foi considerado sem interferentes, nas condições experimentais descritas, se não ocorreu leitura espectrofotométrica no comprimento de onda citado anteriormente. O solvente foi empregado como branco de leitura.

4.2.5.4. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA

Exatamente cerca de 10,0 mg da amostra comercial da rutina foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água destilada neutralizada, obtendo-se uma solução com 100,0 µg/mL. Tomou-se uma alíquota para balão de 50 mL, obtendo solução de concentração aproximada de 50,0 µg/mL.

O coeficiente de partição óleo/água do referido componente ativo foi determinado empregando-se 10,0 mL de miristato de isopropila (previamente saturado com água destilada) adicionado de 10,0 mL da solução da amostra comercial da rutina (50,0 µg/mL). A mistura foi submetida à agitação de 200 rpm, a $25,0 \pm 2,0$ °C, por 30 minutos (HADGRAFT & RIDOUT, 1987). A mistura foi transferida para funil de separação e mantida em repouso por 10 minutos e separou-se a fase contendo a solução aquosa da rutina. Réplicas de três foram realizadas.

Antes e após a realização do coeficiente de partição óleo/água, alíquotas de 4,0 mL foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e adicionadas do solvente e branco de leitura, mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025), para quantificação da rutina. As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999). O coeficiente de partição óleo/água foi expresso em valor logarítmico de base 10 (ROTHWELL, DAY e MORGAN, 2005).

4.2.5.5. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ESTRATO CÓRNEO DE MUDA DE PELE DE COBRA DE *Crotalus durissus*/ÁGUA

Exatamente cerca de 30,0 mg de muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*, após remoção mecânica das camadas superficiais e hidratação, foram pesados e transferidos para 10 mL de solução aquosa da amostra comercial da rutina aproximada de 50,0 µg/mL. A mistura foi submetida à agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), a 200 rpm. Réplicas de três foram realizadas.

Alíquotas de 4,0 mL do sobrenadante foram tomadas, transferidas para balão volumétrico de 25 mL e adicionadas do solvente e branco de leitura (mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025), para quantificação de rutina. As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999). O coeficiente de partição estrato córneo de muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*/água foi expresso em valor logarítmico de base 10 (ROTHWELL, DAY e MORGAN, 2005).

4.2.5.6. LIBERAÇÃO DA RUTINA DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE DIFUSÃO

Exatamente cerca de 300,0 mg das formulações (Ensaio 1 a 12) foram transferidos isoladamente para os compartimentos doadores das células de difusão vertical de orifícios de 15 mm e área de exposição de 1,77 cm². A distribuição das amostras nos compartimentos foi obtida com o auxílio de espátula plástica e flexível, a fim de garantir contato uniforme das formulações com as membranas.

O estudo de liberação da rutina presente nas formulações foi realizado em réplicas de três, em membrana de acetato de celulose e por período de seis horas

(LI & BIRT, 1996; VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999). Os compartimentos receptores foram preenchidos com solução de água destilada e álcool etílico absoluto 99,5% (1:1). Os experimentos foram conduzidos a $37,0 \pm 0,5$ °C (LI & BIRT, 1996; HAIGH *et al.*, 1998; NGAWHIRUNPAT, OPANASOPIT e PRAKONGPAN, 2004), com agitação constante de 300 rpm (LI *et al.*, 2002), exceto durante a coleta de alíquotas dos compartimentos receptores.

Foram tomadas manualmente alíquotas de 1,0 mL dos compartimentos receptores em períodos de tempo pré-definidos: 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00; 4,00; 4,50; 5,00 e 6,00 horas (LI & BIRT, 1996; VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999). Concomitantemente às coletas, realizadas com o auxílio de seringa de precisão de 1,0 mL, foi realizada a reposição nos compartimentos receptores com a solução de água destilada e álcool etílico absoluto 99,5% na proporção de (1:1) a $37,0 \pm 0,5$ °C (LI & BIRT, 1996; HAIGH *et al.*, 1998; NGAWHIRUNPAT, OPANASOPIT e PRAKONGPAN, 2004), para a manutenção do volume constante das células de difusão vertical de exatamente cerca de 7,0 mL.

As alíquotas coletadas foram adicionadas de 1,5 mL do solvente e branco de leitura composto pela mistura de água destilada, álcool etílico absoluto e hidróxido de sódio (1:1:0,025), para quantificação da rutina liberada. As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999).

4.2.5.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS DA LIBERAÇÃO DA RUTINA

Os perfis de liberação foram determinados experimentalmente por meio dos estudos de difusão em membrana de acetato de celulose e envolveram os cálculos dos parâmetros, a saber:

i. Fluxo (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$)

$$J = \frac{D \cdot K_{V/M} \cdot C_R}{E} = CA$$

Equação 5. Fluxo (SHAH, 1993). Onde: D é o coeficiente de difusão (cm^2/h); $K_{V/M}$ é o coeficiente de partição veículo (formulação)/modelo de membrana de difusão; C_R é a concentração da rutina na formulação (μg); E é a espessura do modelo de membrana (cm); CA é o coeficiente angular da equação da reta da curva da concentração de rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas).

ii. Tempo de latência (L_T , h)

$$L_T = \frac{E^2}{6 \cdot D} = \text{Intersecção com o eixo } x$$

Equação 6. Tempo de latência (*lag time*) (BARRY, 1983; SHAH, 1993; SHAH *et al.*, 1994; PARKS, CLEEK e BUNGE, 1997). Onde: E é a espessura do modelo de membrana (cm); D é o coeficiente de difusão (cm^2/h); *Intersecção com o eixo x* da equação da reta da curva da concentração de rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas).

iii. Coeficiente de permeabilidade aparente (P , cm/h)

$$P = \frac{K_{V/M} \cdot D}{E} = \frac{J}{C_R}$$

Equação 7. Coeficiente de permeabilidade aparente (BARRY, 1983; SHAH, 1993; ZATZ, 1993; SHAH *et al.*, 1994; REICHLING *et al.*, 2006). Onde: $K_{V/M}$ é o coeficiente de partição veículo (formulação)/modelo de membrana de difusão; D é o coeficiente de difusão (cm^2/h); E é a espessura do modelo de membrana (cm); J é o fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$); C_R é a concentração da rutina na formulação (μg).

iv. Coeficiente de difusão (D , cm^2/h)

$$D = \frac{E^2}{6 \cdot L_T}$$

Equação 8. Coeficiente de difusão (SHAH *et al.*, 1989; SHAH *et al.*, 1994). Onde: E é a espessura do modelo de membrana (cm); L_T é o tempo de latência (horas).

- v. Coeficiente de partição veículo (formulação)/membrana ($K_{V/M}$)

$$K_{V/M} = \frac{J \cdot E}{D \cdot C_R}$$

Equação 9. Coeficiente de partição veículo (formulação)/membrana (SHAH, 1993). Onde: J é o fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$); E é a espessura do modelo de membrana (cm); D é o coeficiente de difusão (cm^2/h); C_R é a concentração da rutina na formulação (μg).

- vi. Modelo de cinética da difusão (R^2): o modelo de cinética da difusão (liberação da rutina) foi determinado pelos coeficientes de correlação linear calculados pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados da relação entre a rutina liberada e acumulada (g/cm) em função do tempo (horas) – *modelo de ordem zero* – e em função da raiz quadrada do tempo ($\text{horas}^{1/2}$) – *modelo de cinética segundo Higuchi* (SHAH *et al.*, 1994; KALIA & GUY, 2001; LARRUCEA *et al.*, 2001; REICHLING *et al.*, 2006).

- vii. Efetividade promotora de penetração cutânea (EP)

$$EP = \frac{\text{fluxo da rutina na presença do promotor de penetração cutânea}}{\text{fluxo da rutina sem adição do promotor de penetração cutânea}}$$

Equação 10. Efetividade promotora de penetração cutânea (WONG *et al.*, 1989; BONINA & MONTENEGRO, 1994; GOLDBERG-CETTINA *et al.*, 1995).

Adicionalmente ao tratamento estatístico realizado para a determinação do efeito causado pela presença dos promotores de penetração cutânea uréia, isopropanol e propilenoglicol na liberação da rutina das emulsões cosméticas, por meio do planejamento fatorial com dois níveis (*DOE 2^k*) com ponto central, analisaram-se os parâmetros dos ensaios de difusão por *one way* ANOVA com o Teste de Múltipla Comparação de Tukey.

4.2.5.8. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DA RUTINA EM MUDA DE PELE DE *Crotalus durissus*

A determinação da penetração cutânea *in vitro* da rutina, presente na formulação de melhor desempenho quanto ao perfil de liberação de acordo com o item 4.2.6.7., utilizou como modelo de membrana a muda de pele de cobra (*Crotalus durissus*).

O experimento foi realizado de forma similar ao descrito no item 4.2.6.6., alterando apenas o modelo de membrana.

4.2.5.9. RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

As mudas de pele de cobra de *Crotalus durissus* utilizadas na avaliação da penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada na formulação selecionada no item 4.2.6.6. foram retiradas das células de difusão vertical após o término do experimento (seis horas), recortadas adequadamente em concordância com a área de exposição (1,77 cm²) e em contato com a formulação.

O excesso da preparação foi removido das mudas de pele de cobra com auxílio de algodão embebido em água destilada e, posteriormente, em álcool etílico absoluto 99,5%. As amostras foram reduzidas a fragmentos, pesadas, aproximadamente 7,0 mg, e transferidas para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com solvente, mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025). Foram transferidas para banho de ultra-som por 90 minutos, com o objetivo de favorecer a liberação da rutina retida no tecido para o solvente e branco de leitura. Alíquotas dos sobrenadantes foram tomadas e submetidas à leitura espectrofotométrica a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999), em réplicas de seis.

Previamente à realização do experimento, determinou-se a recuperação do padrão retido no modelo de membrana. Exatamente cerca de 30,0 mg de muda de pele de cobra de *C. durissus*, após remoção mecânica das camadas superficiais e hidratação, foram pesados e transferidos para 30 mL da solução hidroalcoólica (água destilada e álcool etílico absoluto 99,5%, 1:1) da rotina padrão de referência secundário a, aproximadamente, 50,0 µg/mL. A mistura foi submetida à agitação durante 60 minutos à temperatura ambiente ($37,0 \pm 1,0$ °C), a 100 rpm. Réplicas de dois foram realizadas. Quantificou-se a substância química de referência na solução hidroalcoólica anterior e posteriormente ao experimento e na muda de pele de *C. durissus* para determinação da recuperação do padrão.

4.2.6. TESTES DA ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)

A formulação considerada estável pela Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE) e possuindo perfil de liberação *in vitro* da rotina mais favorável, em concordância com os critérios das análises adotados, foi submetida aos Testes da Estabilidade Acelerada (TEA).

Foram pesados cerca de 20,0 g da formulação e acondicionados em bisnagas opacas de polietileno, tampa de rosca do tipo flip-top, cor branca e capacidade de 30 g (amostras em réplicas de dois).

4.2.6.1. CONDIÇÕES DO TESTE

A formulação foi avaliada à temperatura ambiente de $25,0 \pm 2,0$ °C após o período de repouso de 48 horas do preparo (início do teste, dia 0 ou t_0), a fim de se completar o processo de emulsificação (LANZET, 1993; RIEGER, 2001; BABY, 2005). As condições de armazenamento e os dias pré-estabelecidos das análises estão descritos a seguir (o TEA foi realizado nos meses de janeiro e fevereiro de 2007):

i. **$45,0 \pm 0,5$ °C** durante 30 dias: análises no 5º, 10º, 15º, 20º e 30º dias;

ii. **Exposição à luz solar indireta e direta, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C)**, durante 30 dias: análises no 5º, 10º, 15º, 20º e 30º dias;

- iii. $5,0 \pm 0,5$ °C durante 30 dias: análises no 5º, 10º, 15º, 20º e 30º dias.

4.2.6.2. VARIÁVEIS DO TESTE

As características físicas, físico-químicas e químicas avaliadas nos dias pré-estabelecidos foram:

- i. Valor de pH (método descrito no *item 4.2.3.1.*);
- ii. Viscosidade aparente, cP (método descrito no *item 4.2.3.2.*);
- iii. Teor do flavonóide rutina, remanescente nas amostras, µg/mL (BABY, 2005) (método descrito no *item 4.2.4.*);
- iv. Penetração e retenção cutânea *in vitro* empregando como modelo de membrana a muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* padronizada (métodos descritos nos *itens 4.2.6.8. e 4.2.6.9.*, respectivamente).

A determinação quantitativa dos flavonóides totais foi realizada por espectrofotometria na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm (ROLIM *et al.*, 2005; BABY *et al.*, 2006a) para a obtenção do teor remanescente do referido componente ativo na formulação submetida aos Testes de Estabilidade Acelerada, segundo adaptações da metodologia analítica validada por Baby e colaboradores, 2006a. A determinação da rutina penetrada e retida na muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* foi realizada por espectrofotometria a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FORMULAÇÕES

O desenvolvimento de formulações cosméticas, nas suas diversas formas de apresentação (sólidas, semi-sólidas e líquidas), exige a seleção rigorosa das matérias-primas envolvidas, o desenvolvimento tecnológico criterioso e a validação da metodologia analítica utilizada no doseamento da(s) substância(s) ativa(s) de modo a assegurar a qualidade (física, físico-química, química, microbiológica e toxicológica), a segurança, a eficácia, a aceitação e a adesão do produto final pelo usuário (SIMMONS, 2000; MAIA CAMPOS, 2002; SCHUELLER & ROMANOWSKI, 2002).

Formulações veiculadas em formas cosméticas emulsionadas, devem apresentar propriedades e atributos, além daqueles citados anteriormente, como: espalhabilidade, ausência do efeito de transferência do produto final para as peças de vestimenta, percepção sensorial agradável, facilidade de aplicação e características organolépticas adequadas, entre outros (DE NAVARRE, 1993; FOSTER & RYBINSKI, 1998; REALDON *et al.*, 2002). Estas características são obtidas por meio da triagem criteriosa das matérias-primas e da tecnologia utilizada na produção das formulações (SIMMONS, 2000).

As formulações desenvolvidas nesta pesquisa foram macroscopicamente analisadas, após o período de repouso de 48 horas necessário para a finalização do processo de emulsificação pelos agentes emulsionantes, verificando-se criteriosamente aquelas consideradas aparentemente estáveis com características organolépticas adequadas, segundo critérios do formulador e também referendados pela literatura (TADROS, 2004).

Os sistemas emulsionados considerados macroscopicamente estáveis pelo desenvolvimento das formulações (Ensaio 1 a 9) formaram emulsões de viscosidade aparente elevada (WOOD, 2001; TADROS, 2004), com intervalo de valores entre **3.243 a 4.546 cP**. Os valores de pH se apresentaram no intervalo de **6,5 a 6,9**.

5.1.1. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)

A Avaliação Preliminar da Estabilidade envolve, comumente, número elevado de formulações e testes que apresentam condições drásticas de temperatura, efeito da gravidade e umidade, aplicadas às preparações, portanto, permitindo selecionar as de melhor desempenho quanto a estabilidade física e físico-química. Usualmente, as preparações são submetidas ao ensaio de centrifugação e banho termostatzado. A APE permite que o formulador escolha, dentre as várias fórmulas da etapa de desenvolvimento do produto e em concordância com os critérios estabelecidos para a aceitação ou rejeição, qual ou quais estão aparentemente estáveis (BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004c).

O **Ensaio da Centrifugação** pode ser conduzido em temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5$ °C) com duração de tempo de 10 minutos, à velocidade de rotação de 10.000 rpm; 30 minutos a 3.000 rpm, ou 1.000, 2.500 e 3.500 rpm durante 15 minutos para cada valor de velocidade (QUACK, RENG e SKRYPZAK, 1976; WITTERN *et al.*, 1985; CADWALLADER, 1989; WASHINGTON, 1996).

O teste envolvendo o **banho termostatzado** é realizado sob condições controladas e com valores crescentes de temperatura, que devem ser compatíveis com a estabilidade dos componentes da formulação. O ensaio pode ser conduzido elevando-se gradativa e controladamente o valor inicial de temperatura, mantendo-se por determinado período de tempo até atingir um valor máximo. O ensaio pode ser conduzido a partir de 40 °C (temperatura inicial) até o valor de 80 °C (temperatura final), elevando-se a temperatura em intervalos de 5 ou 10 °C e mantendo 30 minutos para cada valor de temperatura (WITTERN *et al.*, 1985; CADWALLADER, 1989).

As formulações que apresentam modificações após o teste, deverão ser rejeitadas pelo estudo ou pesquisadas as possíveis modificações nos componentes das preparações para melhoria da estabilidade. Aquelas que indicarem melhor desempenho deverão ser submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada.

Dentre os veículos utilizados no desenvolvimento de formas cosméticas, a emulsão possui boa aceitação no mercado e desempenho adequado. Porém, trata-se de um sistema termodinamicamente instável, exigindo estudo criterioso de sua estabilidade física, química e físico-química, que fornecerá indicações sobre seu

comportamento e desempenho no decorrer de determinado intervalo de tempo (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; RIEGER, 2001).

Devido a crescente e elevada demanda dos produtos cosméticos, necessidades mercadológicas e dos consumidores, a promoção do envelhecimento precoce em sistemas emulsionados, por meio do armazenamento em condições drásticas de luminosidade, temperatura e umidade, permite reduzir o período exigido para a avaliação da estabilidade e, conseqüentemente, a predição do prazo de validade. Pelo exposto, justifica-se a avaliação da estabilidade dos produtos cosméticos por meio da Avaliação da Estabilidade Preliminar (RIEGER, 1996; GIL-ALEGRE *et al.*, 2001).

Após a análise macroscópica das formulações submetidas ao Teste da Centrifugação e ao Teste do Estresse Térmico, não foram identificados sinais de instabilidade, sendo assim, todas as preparações (Ensaio 1 a 9) foram consideradas adequadas para os experimentos seguintes.

5.2. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A necessidade de se comprovar a qualidade das medições químicas, por meio da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade têm exigido o desenvolvimento de novas metodologias analíticas que, após um processo denominado de validação, confere aos resultados determinados em laboratório, propiciarem informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra em estudo (RIBANI *et al.*, 2004).

5.2.1. LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO

Na **Tabela 2** estão descritos os dados para a construção da curva padrão, representada pelo gráfico na **Figura 9**, que originou a equação da reta (**Tabela 3 e Equação 12**).

A curva analítica apresenta a relação entre a resposta instrumental em função das concentrações determinadas da substância química de referência e da amostra comercial em análise (FDA, 2001). A linearidade é avaliada por meio da curva padrão e está relacionada com a capacidade do método em demonstrar que os resultados experimentais obtidos são diretamente proporcionais à resposta instrumental (USP, 2003; SHABIR, 2003).

Segundo ICH Q2B, 1995, FDA, 2001, Brasil, 2003 e USP, 2003, recomenda-se que a linearidade seja estabelecida com a determinação de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (excluindo-se o branco da leitura instrumental) e, de acordo com Causon, 1997, a média das réplicas de seis concentrações ou respostas instrumentais devem ser utilizadas para a elaboração da curva padrão e a determinação da linearidade.

Após a avaliação visual da curva padrão e verificação da relação linear da resposta instrumental em função das concentrações da rotina padrão de referência secundário, os resultados devem ser tratados por análises estatísticas pertinentes, determinando-se: coeficiente de correlação linear, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos mínimos quadrados da regressão linear e desvio padrão relativo (ICH Q2B, 1995; BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

Tabela 3. Dados para a elaboração da equação da reta obtida pelo cálculo da regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados para a curva padrão do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$). Os parâmetros da equação da reta foram determinados a partir dos resultados expostos na **Tabela 2** (λ : 361,0 nm; *branco* e *solvente*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1).

Parâmetros	Equação da reta					
	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅	CP ₆
<i>Coefficiente angular</i>	0,0301	0,0302	0,0300	0,0303	0,0301	0,0300
<i>Intercepto com eixo y</i>	-0,0211	-0,0244	-0,0194	-0,0222	-0,0223	-0,0219
<i>R</i> ²	0,9992	0,9993	0,9993	0,9990	0,9993	0,9993
<i>M</i> $\pm$ <i>dp</i>	0,0301 $\pm$ 0,00012					
	-0,0219 $\pm$ 0,00164					
	0,9992 $\pm$ 0,00012					

Legenda:

CP₁ a CP₆: curvas padrão ($n = 6$); *M* $\pm$ *dp*: média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros da equação da reta; *R*²: coeficiente de correlação linear das réplicas das curvas padrão.

Figura 9. Curva padrão do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) e coeficientes de correlação linear, R^2 ($n = 5$). As concentrações da substância química de referência foram 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µg/mL. As soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 361,0 nm ($n = 6$). Empregaram-se como solvente e branco a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1).

O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados empregado na obtenção da curva padrão gerou a equação da reta descrita a seguir (**Equação 12**), com valores médios e desvios padrão do coeficiente angular (inclinação da reta) e da intersecção com o eixo y iguais a $0,0301 \pm 0,00012$ e $-0,0219 \pm 0,00164$, respectivamente, e coeficiente de correlação linear (R^2) igual a $0,9992 \pm 0,00012$.

$$y = 0,0301 (\pm 0,00012)x - 0,0219 (\pm 0,00164)$$

Equação 12. Equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados. Onde: x é a concentração do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($\mu\text{g/mL}$); y é a absorbância. Valores entre parênteses descrevem o desvio padrão, $n = 6$ (λ : 361,0 nm; *solvente e branco espectrofotométrico*: mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na proporção de 99:1).

O método apresentou linearidade entre os valores das absorbâncias em função das concentrações do flavonóide rutina padrão de referência secundário (5,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$) em solução na mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1).

A Legislação Brasileira vigente admite a linearidade de uma metodologia analítica quando o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados resulta em coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003) e 0,90 (INMETRO, 2003), citado por Ribani e colaboradores, 2004. Porém, um valor de coeficiente de correlação linear acima de 0,999 é passível de ser considerado evidência de um ajuste ideal dos resultados obtidos pela regressão linear (RIBANI *et al.*, 2004).

A **Tabela 4** apresenta os resultados do tratamento estatístico pela Análise da Variância aplicado às informações obtidas experimentalmente para a elaboração da curva padrão.

Tabela 4. Tratamento estatístico pela Análise da Variância (ANOVA) aplicado nos resultados para a construção da curva padrão das diluições seriadas da rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$), com nível de significância de $\alpha = 5\%$ (λ : 361,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1).

	GL	SQ	MQ	F	F _{crítico}
Regressão	1	0,7438	0,7438	3.873,37	$9,14 \times 10^{-6}$
Resíduo	3	$5,76 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-4}$		
Total	4	0,7444			

Legenda:

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos mínimos quadrados; MQ: médias dos mínimos quadrados; F: valor de ANOVA-F calculado; F_{crítico}: valor de ANOVA-F tabelado (GIL-ALEGRE *et al.*, 2001).

Mulholland e Hibbert, 1997, sugeriram que apenas o cálculo do coeficiente de correlação linear (R^2) não evidencia possíveis erros associados à mensuração individual das amostras. O teste da Análise da Variância (ANOVA) propicia a obtenção de resultados interpretáveis quanto à linearidade de uma metodologia analítica, permitindo complementar o tratamento estatístico pela regressão linear e concluindo sobre a relação de proporcionalidade direta da resposta instrumental frente às concentrações da amostra em teste.

O valor de F calculado (**3.873,37**) presente na **Tabela 4**, foi superior ao valor de F_{crítico} ($9,14 \times 10^{-6}$). Tal relação demonstrou a significância estatística do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para comprovação da relação linear da resposta instrumental, isto é, as medidas das absorbâncias, em função das concentrações do flavonóide rutina padrão de referência secundário nas condições preconizadas pelo método espectrofotométrico utilizado (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999).

O intervalo de uma metodologia analítica envolve a abrangência de valores de respostas obtidas experimentalmente das concentrações mínimas e máximas especificadas da substância em análise, com níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade (USP, 2004).

O estudo do intervalo (**Tabela 5**) evidenciou a adequação dos valores das concentrações da substância química de referência empregados para a construção

da curva padrão pelos cálculos da precisão (DPR, %) e exatidão, demonstrando aproximação dos valores das concentrações com aqueles aceitos como reais (concentrações teóricas ou nominais) e dispersão adequada dos resultados. Os valores da exatidão ($\pm$ desvio padrão) localizaram-se no intervalo entre **96,178 $\pm$ 0,434** e **103,505 $\pm$ 0,503%** e, os da precisão, calculada como desvio padrão relativo, não excederam **0,634%**.

Tabela 5. Estudo do intervalo das diluições do flavonóide rutina padrão de referência secundário, $T = 96,1\%$ (λ : 361,0 nm; branco e solvente espectrofotométrico: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1).

CT _P (µg/mL)	Concentração calculada do flavonóide rutina padrão secundário de referência (µg/mL)						C _{média ± dp}	E (%)	DPR (%)
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆			
5,0	5,211	5,163	5,194	5,174	5,139	5,170	5,175 ± 0,025	103,505 ± 0,503	0,486
10,0	9,630	9,592	9,695	9,575	9,623	9,592	9,618 ± 0,043	96,178 ± 0,434	0,451
20,0	20,572	20,375	20,534	20,727	20,438	20,413	20,510 ± 0,130	102,550 ± 0,650	0,634
30,0	29,664	29,547	29,571	29,733	29,499	29,512	29,588 ± 0,092	98,626 ± 0,308	0,312
40,0	40,220	40,292	40,078	40,292	40,103	40,054	40,173 ± 0,108	100,433 ± 0,271	0,270

Legenda:

CT_P: concentrações teóricas do flavonóide rutina padrão de referência secundário (µg/mL); C₁ a C₆: réplicas das concentrações calculadas (µg/mL); C_{média ± dp}: média ± desvio padrão das concentrações calculadas do flavonóide rutina (µg/mL); E (%): exatidão (%); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas do flavonóide rutina (µg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação $y = 0,0301 (\pm 0,00012)x - 0,0219 (\pm 0,00164)$.

5.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LD) é o menor valor de concentração da substância em análise possível de ser detectado, porém não quantificado precisa e exatamente (BRASIL, 2003).

Empregando a **Equação 1**, item 4.2.4.2., e as informações apresentadas na **Tabela 6**, o limite de detecção estimado do flavonóide rutina padrão de referência secundário foi **0,146 µg/mL**, portanto, valores de concentração da substância química em estudo superior ou igual ao limite de detecção foram diferenciados do ruído do equipamento (Espectrofotômetro *Beckman* DU - 640) e detectados (BRASIL, 2003; DIAS, 2004).

5.2.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação de um método analítico reflete a menor concentração da substância em exame que pode ser medida precisa e exatamente, utilizando um determinado procedimento analítico.

O LQ estimado foi **0,442 µg/mL** para o flavonóide rutina padrão de referência secundário, conseqüentemente, valores de concentração de rutina superior ou igual ao valor estimado são provavelmente quantificados com precisão e exatidão aceitáveis pela metodologia empregada, demonstrando a sensibilidade do método (JENKE, 1996; BRASIL, 2003; USP, 2003).

A **Tabela 6** apresentou as informações para os cálculos dos limites de detecção e quantificação estimados, utilizando as **Equações 1 e 2**, respectivamente.

Tabela 6. Limites de detecção e quantificação estimados. Concentração teórica do flavonóide rutina padrão de referência, desvio padrão da curva padrão, desvio padrão médio e coeficiente angular proveniente da equação da reta.

Concentrações Teóricas ($\mu\text{g/mL}$)	dp	σ	C. A.	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
5,0	0,0008	0,00133	0,0301	0,146	0,442
10,0	0,0013				
20,0	0,0039				
30,0	0,0028				
40,0	0,0033				

Legenda:

Concentrações teóricas ($\mu\text{g/mL}$): concentrações do flavonóide rutina padrão de referência secundário em álcool 95% e ácido acético 0,02M (99:1); *C. A.:* coeficiente angular, inclinação da curva analítica; *dp:* desvio padrão das absorbâncias; *σ :* desvio padrão médio; *LD:* limite de detecção estimado ($\mu\text{g/mL}$); *LQ:* limite de quantificação estimado ($\mu\text{g/mL}$).

5.2.4. ESPECIFICIDADE

A especificidade de uma metodologia analítica expressa a capacidade que o método possui de medir exata e especificamente a concentração da substância em análise na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra (DUTRA, 2005). Em relação à espectrofotometria, o método mais simples de identificação da especificidade é a sobreposição dos espectros de varredura das absorbâncias individuais da substância química de referência, da amostra e, caso esta esteja veiculada em uma forma farmacêutica ou cosmética, das matrizes. Sendo assim, a determinação da especificidade é obtida qualitativamente.

Ermer, 2001, descreve que o termo técnico **especificidade**, como parâmetro característico da validação de metodologias analíticas, pode possuir interpretação controversa e similar ao termo **seletividade**. Segundo a mesma referência, a seletividade pode ser interpretada como a separação física e identificação de substâncias presentes em misturas, empregando técnicas analíticas como, por exemplo, cromatografia e eletroforese. A identificação e determinação de um analito na presença de demais componentes, isto é, ausente de demais substâncias ou classes destas que apresentam influência significativa em sua quantificação, é

definida como especificidade e, freqüentemente, é determinada por técnicas espectrométricas (espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, infravermelho, fluorescência, espectroscopia na região da radiação ultravioleta ou visível, detecção eletroquímica e titulação). No entanto, Ribani e colaboradores, 2004, definem a seletividade de um método instrumental de separação como a capacidade de avaliar, inequivocamente, a substância em estudo na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Os autores complementam que a definição anteriormente descrita tem sido relacionada também com termo especificidade.

Segundo os cálculos do método proposto por Feinberg e Raguènès, 1999, modificado, pode-se avaliar a especificidade de um método analítico elaborando-se um gráfico das concentrações da substância em análise em função das concentrações da substância química de referência e por meio da determinação da equação da reta pelos cálculos da regressão linear.

Para o flavonóide rutina padrão de referência secundário verificaram-se dois picos de absorbância máxima, a 258,0 e a 361,0 nm, empregando como solvente e branco de leitura espectrofotométrica a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) (NF X, 1955; PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965). Em conformidade com as mesmas referências, o segundo pico de absorbância máxima para a rutina ocorre no comprimento de onda de 362,5 nm. A pequena variação em relação ao resultado obtido experimentalmente (variação de 1,5 nm) pode ser atribuída ao equipamento utilizado, ao grau de pureza dos solventes e da substância química de referência ou dos erros sistemáticos da metodologia analítica e analistas.

Figura 10. Relação entre as concentrações, em µg/mL, da amostra comercial do flavonóide rutina função da substância química de referência (rutina padrão secundário, $T = 96,1\%$) para avaliação da especificidade do método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm. Foram utilizadas as médias das concentrações, em réplicas de seis, apresentadas na **Tabela 7**. A mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) foi empregada como solvente e branco de leitura.

Observou-se pela **Figura 10** a relação linear de resposta entre as concentrações da amostra comercial da rutina em função das concentrações da substância química de referência. A proporcionalidade foi confirmada pela obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação linear, representados pela **Equação 13**, empregando o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

$$y = 0,9978 (\pm 0,00945)x + 0,01522 (\pm 0,1475), R^2 = 0,9991 \pm 0,0004$$

Equação 13. Equação da reta obtida para determinação da especificidade do método espectrofotométrico a 361,0 nm para a quantificação do flavonóide rutina.

Onde: x é a concentração da rutina padrão de referência secundário ($\mu\text{g/mL}$); y é a concentração da amostra comercial do referido composto ativo; R^2 é o coeficiente de correlação linear.

Tabela 7. Dados para a elaboração da curva das concentrações da amostra comercial do flavonóide rutina função da substância química de referência (rutina padrão de referência secundário, $T = 96,1\%$) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico no comprimento de onda a 361,0 nm.

Concentração nominal da substância química de referência ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{\text{SQR}} \pm dp$	$C_{\text{A}} \pm dp$
5,0	$5,18 \pm 0,03$	$4,79 \pm 0,04$
10,0	$9,62 \pm 0,04$	$9,93 \pm 0,05$
20,0	$20,51 \pm 0,13$	$20,36 \pm 0,06$
30,0	$29,59 \pm 0,09$	$30,12 \pm 0,11$
40,0	$40,17 \pm 0,11$	$39,71 \pm 0,27$

Legenda:

$C_{\text{SQR}} \pm dp$: média das concentrações e desvio padrão ($n = 6$) da rutina padrão de referência secundário ($\mu\text{g/mL}$); $C_{\text{A}} \pm dp$: média das concentrações e desvio padrão ($n = 6$) da amostra comercial da rutina. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0301 (\pm 0,00012)x - 0,0219 (\pm 0,00164)$.

A **Tabela 8** apresenta o tratamento estatístico para a avaliação da especificidade do método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm para a amostra comercial do flavonóide rutina.

Tabela 8. Especificidade da metodologia analítica espectrofotométrica (λ : 361,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na, 99:1) calculada segundo Feinberg e Raguènès, 1999, para o flavonóide rutina, com nível de significância de $\alpha = 5\%$.

Tratamento Estatístico	V_D	V_C
<i>Coefficiente angular</i>	0,9978	1,0
<i>Desvio padrão do coeficiente angular</i>	0,0094	-
<i>Intersecção com o eixo y</i>	0,0152	0,0
<i>Desvio padrão da intersecção com o eixo y</i>	0,1475	-
<i>Graus de liberdade</i>	10	-
<i>Teste t de Student para CA</i>	0,5868	2,2281 *
<i>Teste t de Student para I-y</i>	0,8056	

Legenda:

V_D : valores determinados; V_C : valores críticos; CA: coeficiente angular; I-y: intersecção com o eixo y;

*: t de Student tabelado.

O método analítico pode ser considerado específico se os valores do coeficiente angular e da intersecção com o eixo y (para a relação das concentrações da substância em exame em função das concentrações da substância química de referência) não apresentarem diferença significativa dos valores críticos ou de referência 1,00 e 0,00 (zero), respectivamente, e valor de R^2 próximo a 1 ($R^2 = 0,9991 \pm 0,0004$), indicando relação linear de resposta excelente entre as concentrações da amostra em função da substância química de referência (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999; BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2003).

Em concordância com os resultados obtidos, o método apresentou especificidade para a quantificação da rutina, pois os valores calculados do Teste t de Student para o coeficiente angular e para a intersecção com o eixo y resultaram em valores inferiores ao de t tabelado (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999), denotando igualdade estatística, como descrito na **Tabela 8**.

5.2.5. PESQUISA DE INTERFERENTES

No comprimento de onda de 361,0 nm ocorreu ausência ou resposta desprezível dos interferentes oriundos dos componentes das preparações (Ensaio 1 a 9) selecionadas pela Avaliação Preliminar da Estabilidade e foi considerado adequado para a análise espectrofotométrica do flavonóide rutina, presentes nas formulações. A **Figura 11** ilustra os resultados da pesquisa de interferentes.

Figura 11. Pesquisa de interferentes (Ensaio 1 a 9) (λ : 361,0 nm; branco e solvente espectrofotométrico: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1). Os números indicados de 1 a 9 representam as formulações 1 a 9 (Ensaio 1 a 9). [Abs] é absorbância e Wavelength (nm) é comprimento de onda.

5.2.6. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada em concentrações conhecidas na porção analítica do material-teste, que é extraída e passível de ser quantificada precisa e exatamente (RIBANI *et al.*, 2004).

A **Tabela 9** contém os resultados obtidos na avaliação da recuperação do flavonóide rutina padrão de referência secundário para o Ensaio 8 (formulação selecionada por apresentar maior variedade de componentes em concentrações máximas, segundo o planejamento experimental).

Tabela 9. Recuperação do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) na presença da formulação Ensaio 8 (λ : 361,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1).

CT ($\mu\text{g/mL}$)	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C _{média $\pm$ dp}	R _{C $\pm$ dp} (%)	R _{C médio $\pm$ dp} (%)
10,0	11,282	11,322	11,292	11,302	11,319	11,302	11,303 $\pm$ 0,015	113,03 $\pm$ 0,15	
20,0	21,970	21,970	21,937	21,937	21,947	21,914	21,946 $\pm$ 0,022	109,73 $\pm$ 0,11	112,690 $\pm$ 2,809
30,0	34,465	34,449	34,578	34,691	34,578	34,807	34,595 $\pm$ 0,137	115,32 $\pm$ 0,46	

Legenda:

CT: concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($\mu\text{g/mL}$) na presença da Formulação 8; C₁ a C₆: réplicas das concentrações calculadas ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos resultados experimentais; C_{média $\pm$ dp}: média $\pm$ desvio padrão das concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$); R_{C $\pm$ dp} (%): recuperação do padrão $\pm$ desvio padrão (%); R_{C médio $\pm$ dp} (%): média da recuperação do padrão $\pm$ desvio padrão (%). As concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação $y = 0,0301 (\pm 0,00012)x - 0,0219 (\pm 0,00164)$.

Nas condições experimentais utilizadas, a recuperação do padrão foi próxima a 100%, gerando valores nos intervalos entre **109,73** a **115,32%** ($R_{c \text{ médio}} = \mathbf{112,690 \pm 2,809\%}$) para a formulação Ensaio 8. Segundo os resultados da recuperação do padrão, ficou confirmada a exatidão do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm para a quantificação do flavonóide rutina. Os valores determinados demonstraram proximidade das concentrações calculadas do flavonóide rutina com os seus respectivos valores teóricos ou nominais.

5.2.7. PRECISÃO

A precisão de uma metodologia analítica representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra homogênea, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e padronizadas. Segundo ICH Q2B, 1995, e Brasil, 2003, a precisão é calculada como desvio padrão relativo (DPR, %) e em três diferentes níveis: **Repetibilidade** ou **Precisão Intra-Dia** (concordância entre os resultados em um período de tempo reduzido com o mesmo analista e mesma instrumentação); **Precisão intermediária** ou **Inter-Dias** (concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes); **Reprodutibilidade** ou **Precisão Interlaboratorial** (concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica).

As **Tabelas 10** e **11** apresentam os cálculos da precisão intra e inter-dias, como desvio padrão relativo (DPR, %), para a formulação Ensaio 8. Tal formulação foi selecionada para a validação da metodologia por possuir número maior de componentes e, assim como os demais Ensaios, não provocou interferentes para o método espectrofotométrico a 361,0 nm.

Tabela 10. Exatidão e precisão intra-dia avaliadas por meio da Formulação Ensaio 8 (λ : 361,0 nm; branco e solvente espectrofotométrico: mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1).

Concentrações teóricas ($\mu\text{g/mL}$)	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média $\pm$ dp} ($\mu\text{g/mL}$)	E (%)	DPR (%)
10,0	10,48	11,48	11,15	11,04 $\pm$ 0,51	110,36 $\pm$ 5,07	4,60
20,0	22,09	22,59	20,76	21,81 $\pm$ 0,94	109,06 $\pm$ 4,72	4,33
30,0	32,35	34,36	36,16	34,29 $\pm$ 1,91	114,30 $\pm$ 6,36	5,57

Legenda:

Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$); C₁ a C₃: réplicas das concentrações calculadas ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos resultados experimentais; C_{média $\pm$ dp}: média $\pm$ desvio padrão das concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$); E (%): exatidão (%); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação $y = 0,0301 (\pm 0,00012)x - 0,0219 (\pm 0,00164)$.

Tabela 11. Exatidão e precisão inter-dias avaliadas por meio da Formulação Ensaio 8 (λ : 361,0 nm; branco e solvente espectrofotométrico: mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, 99:1).

Concentrações teóricas ($\mu\text{g/mL}$)	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média $\pm$ dp} ($\mu\text{g/mL}$)	E (%)	DPR (%)
10,0	11,15	11,48	10,79	11,14 $\pm$ 0,34	111,40 $\pm$ 3,41	3,06
20,0	22,28	22,59	24,28	23,05 $\pm$ 1,08	115,25 $\pm$ 5,39	4,68
30,0	34,36	33,46	36,16	34,66 $\pm$ 1,38	115,53 $\pm$ 4,59	3,98

Legenda:

Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$); C₁ a C₃: réplicas das concentrações calculadas ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos resultados experimentais; C_{média $\pm$ dp}: média $\pm$ desvio padrão das concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$); E (%): exatidão (%); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação $y = 0,0301 (\pm 0,00012)x - 0,0219 (\pm 0,00164)$.

Os valores obtidos dos desvios padrão relativo (DPR, %), para a avaliação da precisão do método, não extrapolaram o valor máximo exigido pela Legislação Brasileira de 5,0% (BRASIL, 2003), exceto para a concentração de 30,0 µg/mL para a precisão intra-dia. O intervalo da precisão intra-dia foi de **4,33 a 5,57%**, e para a precisão inter-dias, **3,06 a 4,68%**, como descritos nas **Tabelas 10 e 11**.

5.2.8. EXATIDÃO

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do padrão (SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; DUTRA, 2005).

O número de ensaios é dependente da legislação ou da diretriz adotada e também com a adequação das características da pesquisa.

Nas **Tabelas 10 e 11** são apresentados os resultados para a exatidão intra e inter-dias. O intervalo da exatidão intra-dia da formulação Ensaio 8 encontrou-se entre **109,06 ± 4,72 a 114,30 ± 6,36%** (**Tabela 10**), e inter-dias, entre **111,40 ± 3,41 a 115,53 ± 4,59%** (**Tabela 11**). Os valores calculados apresentaram-se próximos a 100%, em concordância com o limite especificado pela literatura (BRASIL, 2003). Os resultados para a exatidão evidenciaram, adicionalmente aos resultados da recuperação do padrão, similaridade elevada entre os valores de concentrações teóricas da rotina e daqueles calculados experimentalmente.

5.3. LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDO DE RETENÇÃO CUTÂNEA DO FLAVONÓIDE RUTINA VEICULADO NAS FORMULAÇÕES

5.3.1. PADRONIZAÇÃO DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

O processo de padronização das membranas de acetato de celulose, descrito no *item 4.2.5.1.*, objetivou remover aditivos comumente presentes nestas, como substâncias plastificantes e conservantes, dentre outros, que poderiam afetar a liberação da rutina. Segundo Haigh e Smith, 1994, a padronização é imperativa para a remoção de tais compostos presentes nas membranas, empregando-se hidratação

à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) ou à temperatura de 100 °C. Geralmente, aditivos como plastificantes e conservantes podem absorver radiação ultravioleta interferindo na metodologia analítica empregada para a quantificação da substância ativa liberada no meio receptor das células de difusão. Adicionalmente à possível geração de interferentes, a presença dos aditivos influencia no fluxo dos difusantes através da membrana por mecanismos como adsorção ou impedimento, por ocupação das cadeias de celulose (HAIGH & SMITH, 1994; QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2001).

Identificou-se, por análise espectrofotométrica a 410,0 nm (método descrito nos itens 4.2.5.1. e 4.2.5.3.), que o procedimento de padronização das membranas de acetato de celulose não favoreceu a liberação de aditivos na fase receptora das células de difusão, solução de água destilada e álcool etílico absoluto 99,5% (1:1), que absorvem radiação a 410,0 nm, comprimento de onde utilizado para a determinação da rutina liberada. Portanto, o método analítico não apresentou interferentes possivelmente gerados pelas membranas de acetato de celulose em contato com o fluido receptor.

5.3.2. PADRONIZAÇÃO DA MUDA DE PELE DE *Crotalus durissus*

A utilização de muda de pele de cobra como modelo de membrana para ensaios de penetração cutânea exige que este material seja hidratado previamente à sua utilização nas células de difusão, por se tratar de um tecido queratinoso não maleável e frágil, quando desidratado. Segundo Turunen e colaboradores, 1993, Megrab, Williams e Barry, 1995, Haigh e colaboradores, 1998, e Pongjanyakul e colaboradores, 2002, períodos de tempo e valores de temperaturas diversos podem ser utilizados para promover a hidratação da muda de pele de cobra, como: **(1)** tempo – de 30 minutos até três dias; **(2)** temperatura – de 25 a 27 °C e de 37 a 40 °C.

A estrutura da muda de pele de cobra possui três camadas distintas, a saber: **(1)** camada externa, denominada de β , composta por β -queratina; **(2)** camada intermediária ou *meso*, similar ao estrato córneo humano, possuindo de três a quatro estratos de células de espessura extremamente reduzida circundadas por lipídeos intercelulares e; **(3)** camada interna ou α composta por α -queratina (ITOH *et al.*, 1990a; TAKAHASHI *et al.*, 1993).

Itoh e colaboradores, 1990a, e Takahashi e colaboradores, 1993, identificaram que a camada intermediária ou *meso* apresenta-se como o obstáculo principal à permeabilidade de substâncias e, corroborando com as mesmas referências, Baby e colaboradores, 2006b, 2006c e 2007, que avaliaram a interação de tensoativos do tipo aniônico, catiônico e não-iônico com muda de pele de cobra de *Bothrops jararaca* por técnicas espectrométricas (espectroscopia fotoacústica no infravermelho e Raman) e termoanalíticas (calorimetria exploratória diferencial), identificaram que somente após a remoção mecânica das camadas superficiais do tecido com fita adesiva (procedimento realizado uma única vez) houve a interação dos tensoativos dodecil sulfato de sódio, cloreto de hexadecil trimetil amônio e PEG-12 lauril éter com este material, evidenciando que, adicionalmente à camada *meso*, a camada β contribui com o efeito barreira das mudas de pele de cobra, reduzindo a permeabilidade deste tecido às demais substâncias ativas em estudos de difusão.

Pelo exposto, fez-se necessária a padronização da muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*, como modelo de membrana, por meio da hidratação do tecido e remoção mecânica das camadas superficiais com fita adesiva, procedimentos descritos no item 4.2.5.2.

5.3.3. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA RUTINA APÓS LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

A quantificação do flavonóide rutina após liberação, penetração e retenção cutânea foi realizada conforme o método espectrofotométrico, exposto no item 4.2.5.3.

5.3.3.1. CURVA PADRÃO: LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO

O método analítico proporcionou linearidade de resposta da absorbância em função da concentração para as soluções da rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) e da amostra comercial do referido composto ativo, na mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025), no intervalo de concentrações entre 0,5 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$, submetidas à leitura

espectrofotométrica a 410,0 nm (VALENTA, NOWACK e BERNKOP-SCHNÜRCH, 1999).

Nas **Tabelas 12 e 13**, estão descritos os resultados experimentais para a construção da curva padrão da substância química de referência e da amostra comercial da rutina, representadas pelos gráficos nas **Figuras 12 e 13**, respectivamente.

A equação da reta está exposta na **Tabela 14** e representada pela **Equação 14**.

Tabela 12. Dados para construção da curva padrão das diluições do flavonóide rutina padrão de referência secundário (T = 96,1%). Os valores das absorbâncias foram obtidos a 410,0 nm, empregando como branco e solvente espectralfotométrico a mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025).

Concentração teórica da rutina padrão de referência secundário (µg/mL)		Absorbâncias (λ = 410,0 nm)						A _{média} ± dp
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆		
0,5	0,0162	0,0166	0,0175	0,0166	0,0168	0,0164	0,0167 ± 0,0004	
2,0	0,0793	0,0796	0,0803	0,0806	0,0792	0,0798	0,0798 ± 0,0006	
5,0	0,1829	0,1830	0,1806	0,1784	0,1789	0,1810	0,1808 ± 0,0019	
10,0	0,3842	0,3842	0,3801	0,3810	0,3784	0,3790	0,3812 ± 0,0025	
20,0	0,7348	0,7290	0,7287	0,7309	0,7272	0,7285	0,7298 ± 0,0027	
30,0	1,1323	1,1105	1,1313	1,1094	1,0997	1,1111	1,1157 ± 0,0131	

Legenda:

A_1 a A_6 : réplicas das absorvâncias ($n = 6$); $A_{média \pm dp}$: média $\pm$ desvio padrão das absorvâncias.

Tabela 13. Dados para construção da curva padrão das diluições da amostra comercial da rutina (λ : 410,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025).

Concentração teórica da amostra do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbâncias ($\lambda = 410,0 \text{ nm}$)					
	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6
0,5	0,0164	0,0162	0,0157	0,0160	0,0167	0,0152
2,0	0,0730	0,0727	0,0728	0,0723	0,0717	0,0722
5,0	0,1812	0,1831	0,1824	0,1812	0,1818	0,1815
10,0	0,3723	0,3749	0,3749	0,3753	0,3754	0,3760
20,0	0,7256	0,7271	0,7291	0,7299	0,7299	0,7284
30,0	1,1086	1,1068	1,1060	1,1080	1,1074	1,1119
Legenda:						
A_1 a A_6 : réplicas das absorbâncias ($n = 6$); $A_{\text{média} \pm dp}$: média $\pm$ desvio padrão das absorbâncias.						
						$A_{\text{média} \pm dp}$

Figura 12. Curva padrão da rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) obtida a $410,0 \text{ nm}$ ($n = 6$). As concentrações da substância química de referência foram $0,5$; $2,0$; $5,0$; $10,0$; $20,0$ e $30,0 \text{ µg/mL}$. Empregaram-se como solvente e branco a mistura de água destilada, álcool etílico $99,5\%$ e solução de hidróxido de sódio $0,25 \text{ M}$ ($1:1:0,025$).

Figura 13. Curva padrão da amostra comercial da rutina obtida a $410,0 \text{ nm}$ ($n = 6$). Concentrações de leitura: $0,5$; $2,0$; $5,0$; $10,0$; $20,0$ e $30,0 \text{ µg/mL}$. Solvente e branco: água destilada, álcool etílico $99,5\%$ e solução de hidróxido de sódio $0,25 \text{ M}$ ($1:1:0,025$).

Tabela 14. Componentes da equação da reta obtida pelo cálculo da regressão linear do método dos mínimos quadrados da curva padrão do flavonóide rutina padrão de referência secundário (T = 96,1%). Os parâmetros da equação da reta foram determinados a partir dos resultados expostos na **Tabela 12** (λ : 410,0 nm; *branco* e *solvente espectralfotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025).

Parâmetros	Equação da reta						Média ± dp
	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅	CP ₆	
<i>Coefficiente angular</i>	0,0375	0,0368	0,0374	0,0368	0,0365	0,0396	0,0374 ± 0,00113
<i>Intercepto com eixo y</i>	-0,0004	0,0030	-0,0010	0,0017	0,0023	0,0014	0,0012 ± 0,00156
<i>R²</i>	0,9996	0,9996	0,9994	0,9997	0,9998	0,9997	0,9996 ± 0,00014

Legenda:

CP_1 a CP_6 : réplicas das curvas padrão ($n = 6$); Média $\pm$ dp: média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros da equação da reta; R^2 : coeficiente de correlação linear das réplicas das curvas padrão.

O cálculo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, gerou a equação da reta descrita a seguir (**Equação 14**), e coeficiente de correlação linear (R^2) igual a **$0,9996 \pm 0,00014$** .

$$y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$$

Equação 14. Equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados. Onde: x é a concentração do flavonóide rutina padrão de referência secundário ($\mu\text{g/mL}$); y é a absorbância. Valores entre parênteses descrevem o desvio padrão, $n = 6$ (λ : 410,0 nm; *solvente e branco espectrofotométrico*: mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M na proporção de 1:1:0,025).

A **Tabela 15** descreve os resultados do tratamento estatístico (ANOVA) aplicado às informações obtidas experimentalmente para a elaboração da curva padrão.

Tabela 15. Tratamento estatístico (ANOVA) aplicado para a construção da curva padrão das diluições da rutina padrão de referência secundário ($T = 96,1\%$) para $\alpha = 5\%$ (λ : 410,0 nm; *solvente e branco espectrofotométrico*: mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M na proporção de 1:1:0,025).

	GL	SQ	MQ	F	F _{crítico}
Regressão	1	0,91679	0,91679	11.916,04	$4,22 \times 10^{-8}$
Resíduo	3	$3,08 \times 10^{-4}$	$7,69 \times 10^{-5}$		
Total	4	0,91098			

Legenda:

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos mínimos quadrados; MQ: médias dos mínimos quadrados; F: valor de ANOVA-F calculado; F_{crítico}: valor de ANOVA-F tabelado (GIL-ALEGRE *et al.*, 2001).

O valor de F calculado, igual a **11.916,04** (**Tabela 15**), foi superior ao valor de F_{crítico}, o que evidenciou a significância estatística do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para comprovação da relação linear das medidas

das absorvâncias em função das concentrações da substância química de referência (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999).

O estudo do intervalo (**Tabela 16**) confirmou a adequação dos valores das concentrações da substância química de referência empregados para a construção da curva padrão pelos cálculos da precisão (DPR, %) e exatidão.

Os valores da exatidão ($\pm$ desvio padrão) localizaram-se no intervalo entre **84,288 $\pm$ 2,320** e **106,345 $\pm$ 0,779%** e os da precisão entre **0,371** e **2,753%**, próximos dos valores de concentração aceitos como reais e dispersão reduzida dos resultados experimentais.

Como apresentado na **Tabela 17**, o estudo do intervalo para as diluições da amostra comercial da rotina proporcionou a obtenção de valores no intervalo de **0,186** a **3,067%** e de **93,948 $\pm$ 2,882** a **101,924 $\pm$ 0,350%** para a precisão (DPR, %) e exatidão, respectivamente, considerados adequados para a validação da metodologia analítica (JENKE, 1996; BRASIL, 2003).

Tabela 16. Estudo do intervalo das concentrações da rutina padrão de referência secundário, $T = 96,1\%$ (λ : 410,0 nm; *solvente e branco espectrofotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025).

CT _p (µg/mL)	Concentração calculada do flavonóide rutina padrão de referência secundário (µg/mL)						C _{média ± dp}	E (%)	DPR (%)
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆			
0,5	0,408	0,420	0,442	0,420	0,425	0,414	0,421 ± 0,012	84,288 ± 2,320	2,753
2,0	2,113	2,121	2,141	2,149	2,110	2,127	2,127 ± 0,016	106,345 ± 0,779	0,733
5,0	4,913	4,915	4,851	4,792	4,806	4,862	4,856 ± 0,052	97,128 ± 1,036	1,067
10,0	10,355	10,355	10,242	10,268	10,197	10,214	10,272 ± 0,069	102,718 ± 0,685	0,667
20,0	19,829	19,672	19,664	19,725	19,624	19,661	19,696 ± 0,073	98,479 ± 0,365	0,371
30,0	30,573	29,983	30,545	29,954	29,691	30,000	30,125 ± 0,355	100,415 ± 1,183	1,178

Legenda:

CT_p: concentrações teóricas do flavonóide rutina padrão secundário de referência (µg/mL); C₁ a C₆: réplicas das concentrações calculadas (µg/mL);

C_{média ± dp}: média ± desvio padrão das concentrações calculadas do flavonóide rutina (µg/mL); E (%): exatidão (%); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas da rutina (µg/mL) foram obtidas empregando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Tabela 17. Estudo do intervalo, precisão e exatidão das concentrações da amostra comercial da rutina (λ : 410,0 nm; *solvente e branco espectrofotométrico*: mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025).

CT _A ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada da amostra do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$)						C _{média} $\pm$ dp	E (%)	DPR (%)
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆			
0,5	0,480	0,474	0,461	0,469	0,488	0,447	0,470 $\pm$ 0,014	93,948 $\pm$ 2,882	3,067
2,0	2,014	2,005	2,008	1,995	1,978	1,992	1,999 $\pm$ 0,013	99,932 $\pm$ 0,646	0,646
5,0	4,946	4,997	4,978	4,946	4,962	4,954	4,964 $\pm$ 0,020	99,277 $\pm$ 0,408	0,411
10,0	10,125	10,195	10,195	10,206	10,209	10,225	10,192 $\pm$ 0,035	101,924 $\pm$ 0,350	0,343
20,0	19,699	19,740	19,794	19,816	19,816	19,775	19,773 $\pm$ 0,046	98,866 $\pm$ 0,231	0,233
30,0	30,079	30,030	30,008	30,062	30,046	30,168	30,065 $\pm$ 0,056	100,218 $\pm$ 0,186	0,186

Legenda:

CT_A: concentrações teóricas da amostra do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$); C₁ a C₆: réplicas das concentrações calculadas ($\mu\text{g/mL}$); C_{média} $\pm$ dp: média $\pm$ desvio padrão das concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$); E (%): exatidão (%); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas da rutina ($\mu\text{g/mL}$) foram obtidas empregando-se a equação $y = 0,0374 (+ 0,00113)x + 0,0012 (+ 0,00156)$.

5.3.3.2. ESPECIFICIDADE

A análise da rotina padrão de referência secundário, na mistura empregada como solvente e branco de leitura espectrofotométrica, água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025), obteve um pico de absorvância máxima a 410,0 nm. De acordo com Valenta, Nowack e Bernkop-Schnürch, 1999, o pico de absorvância máxima para a rotina ocorre no comprimento de onda de 405 nm, mas em função do equipamento utilizado, grau de pureza dos solventes e da substância química de referência ou dos erros de metodologia analítica podem ocorrer variações do resultado experimental e o apresentado na literatura científica.

A relação linear de resposta entre as concentrações da amostra comercial da rutina em função das concentrações do flavonóide padrão de referência secundário está representada na **Figura 14** e **Tabela 18**.

Figura 14. Relação entre as concentrações da amostra comercial da rutina e substância química de referência (T = 96,1%) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico a 410,0 nm (n = 6), descritas na **Tabela 18**. A mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025) foi empregada como solvente e branco de leitura.

Tabela 18. Concentrações da amostra comercial da rutina em função da substância química de referência (T = 96,1%) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico a 410,0 nm.

Concentração nominal da substância química de referência (µg/mL)	$C_{SQR} \pm dp$	$C_A \pm dp$
0,5	0,42 $\pm$ 0,012	0,47 $\pm$ 0,014
2,0	2,13 $\pm$ 0,016	2,00 $\pm$ 0,013
5,0	4,86 $\pm$ 0,052	4,96 $\pm$ 0,020
10,0	10,27 $\pm$ 0,069	10,19 $\pm$ 0,035
20,0	19,70 $\pm$ 0,073	19,77 $\pm$ 0,046
30,0	30,13 $\pm$ 0,355	30,07 $\pm$ 0,056

Legenda:

$C_{SQR} \pm dp$: média das concentrações e desvio padrão (n = 6) da rutina padrão de referência secundário (µg/mL); $C_A \pm dp$: média das concentrações e desvio padrão (n = 6) da amostra comercial da rutina. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

A proporcionalidade foi confirmada pela obtenção da equação da reta (**Equação 15**), do tratamento estatístico (**Tabela 19**) e do valor do coeficiente de correlação linear.

$$y = 0,9994 (\pm 0,0110)x + 0,0016 (\pm 0,0425), R^2 = 0,9999 \pm 0,000098$$

Equação 15. Equação da reta obtida para determinação da especificidade do método espectrofotométrico na quantificação da rutina a 410,0 nm. Onde: x é a concentração da rutina padrão de referência secundário (µg/mL); y é a concentração da amostra comercial do referido composto ativo; R^2 é o coeficiente de correlação linear.

A **Tabela 19** expõe o resultado do tratamento estatístico empregado para a avaliação da especificidade do método espectrofotométrico a 410,0 nm para a amostra comercial da rutina.

Tabela 19. Especificidade do método espectrofotométrico a 410,0 nm (*solvente e branco espectrofotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025). Cálculo segundo Feinberg e Raguènès, 1999, para a rotina, com nível de significância de $\alpha = 5\%$.

Tratamento Estatístico	V _D	V _C
<i>Coefficiente angular</i>	0,9994	1,0
<i>Desvio padrão do coeficiente angular</i>	0,0110	-
<i>Intersecção com o eixo y</i>	0,0016	0,0
<i>Desvio padrão da intersecção com o eixo y</i>	0,0425	-
<i>Graus de liberdade</i>	10	-
<i>Teste t de Student para CA</i>	0,8992	2,2281 *
<i>Teste t de Student para I-y</i>	0,9283	

Legenda:

V_D: valores determinados; V_C: valores críticos; CA: coeficiente angular; I-y: intersecção com o eixo y;

*: t de Student tabelado.

Em concordância com os resultados obtidos, descritos na **Tabela 19**, o método foi considerado específico para a determinação da rotina (λ : 410,0 nm; *branco e solvente espectrofotométrico*: água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025), pois os valores do coeficiente angular e da intersecção com o eixo y não apresentaram diferença estatística dos valores críticos 1,00 e 0,00 (zero), respectivamente, e valor de R^2 igual a **0,9999 $\pm$ 0,000098**, próximo a 1 (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999; BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2003).

5.3.3.3. PESQUISA DE INTERFERENTES

O método espectrofotométrico foi considerado ausente de interferentes provenientes da solução hidroalcoólica obtida a partir da muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* e dos fluidos receptores das formulações sem rotina em contato com membranas de acetato de celulose e mudas de pele de cobra dispostas nas células de difusão por um período de seis horas.

As soluções submetidas à leitura a 410,0 nm, possuindo como solvente e branco a mistura de água destilada, álcool etílico absoluto 99,5% e hidróxido de sódio 0,25 M (1:1:0,025), originaram respostas desprezíveis oriundas dos possíveis interferentes no comprimento de onda citado anteriormente.

5.3.4. COEFICIENTES DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA E ESTRATO CÓRNEO DE MUDA DE PELE DE COBRA DE *Crotalus durissus*/ÁGUA

A obtenção dos valores logarítmicos dos coeficientes de partição se tornou um procedimento padrão para a predição do transporte (difusão) em membranas ou da tendência de interação/associação de substâncias ativas. Segundo Florence e Attwood, 1988, Rothwell e colaboradores, 2005, propriedades como hidrofília ou lipofília (*in vivo*) de componentes ativos orientam a tendência da interação destes com os sistemas biológicos, que envolvem membranas ou proteínas. A lipofília de substâncias ativas, como por exemplo aquelas submetidas aos ensaios de difusão, pode ser expressa como coeficiente de partição, uma constante de equilíbrio que correlaciona o modo no qual um soluto partilha entre ambientes apolares e polares (HADGRAFT & RIDOUT, 1987; ROTHWELL, DAY e MORGAN, 2005).

Os valores logarítmicos de base 10 dos coeficientes de partição óleo/água e estrato córneo de muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*/água foram - **0,697** e - **1,239**, respectivamente. Segundo Zatz, 1993, admitindo-se que a pele de muda de cobra de *C. durissus* se comporte como modelo de membrana composta por domínios lipídicos e porosos dispostos paralelamente ou intercalados, somente difusantes possuindo valores logarítmicos de coeficientes de partição óleo/água reconhecidos como moderado a elevado (acima de zero) possuem tendência favorável para a penetração através da membrana.

Corroborando com o resultado obtido experimentalmente, Rothwell e colaboradores, 2005, obtiveram o valor de - 0,64 de coeficiente de partição óleo/água para a rutina.

5.3.5. LIBERAÇÃO DA RUTINA DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE DIFUSÃO

Experimentos de liberação de princípios ativos *in vitro*, empregando modelos de membranas sintéticas, fornecem dados sobre o comportamento do componente

ativo veiculado em formas cosméticas ou farmacêuticas semi-sólidas, permitindo obter informações relativas ao perfil de liberação máxima, como:

- i. Caracterização e diferenciação entre formulações;
- ii. Avaliação da qualidade da produção e uniformidade lote-a-lote;
- iii. Comparação do desempenho de produtos inovadores com aqueles disponíveis no mercado.

No entanto, é imprescindível seguir pré-requisitos na realização do teste, como:

- i. O compartimento doador deve contemplar a característica de dose infinita;
- ii. A membrana de difusão disposta entre os compartimentos receptor e doador não deve apresentar resistência à difusão da substância ativa em estudo;
- iii. O fluido receptor deve possuir propriedades solventes para o componente ativo ensaiado, garantindo a solubilidade deste, propriedade denominada de *sink condition* (GUY & HADGRAFT, 1990; REICHLING *et al.*, 2006).

Os perfis de liberação (cinética de liberação) da rotina dos Ensaio 1 a 12 (formulações descritas nos **Quadros 2, 3 e 5**), possuindo os promotores de penetração cutânea uréia, isopropanol e propilenoglicol, associados ou não e em proporções distintas, segundo planejamento fatorial com dois níveis (*DOE 2^k*) com ponto central (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2003; BOX, HUNTER e HUNTER, 2005), e empregando como modelo de membrana a de acetato de celulose, estão descritos nas **Tabelas 20 a 28** e representados pelas **Figuras 15 a 23**, como rotina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) e em função da raiz quadrada do tempo ($\sqrt{h}$).

Tabela 20. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 1 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada e acumulada (µg/cm ²)			
	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Média ± dp
0,25	19,236	20,275	19,368	19,627 ± 0,599
0,5	42,824	40,624	40,823	41,424 ± 1,290
1,0	86,608	81,758	75,899	81,422 ± 5,685
1,5	129,317	131,675	116,085	125,692 ± 8,909
2,0	187,249	185,130	167,685	180,022 ± 11,383
3,0	271,664	274,708	249,903	265,425 ± 14,343
4,0	357,092	361,304	325,478	347,958 ± 20,761
4,5	410,327	403,603	366,884	393,604 ± 24,792
5,0	452,982	445,007	405,715	434,568 ± 26,828
6,0	526,504	526,402	483,589	512,165 ± 26,238
Legenda:				

Ensaio 1: formulação controle sem adição de promotores de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 15. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 1, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 21. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 2 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada e acumulada (µg/cm ²)			
	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Média ± dp
0,25	19,612	20,560	18,732	19,635 ± 0,915
0,5	42,726	47,579	42,987	44,431 ± 2,730
1,0	97,928	107,396	96,527	100,617 ± 5,913
1,5	143,626	155,721	138,852	146,066 ± 8,695
2,0	186,491	198,750	180,880	188,707 ± 9,138
3,0	273,437	292,982	265,612	277,344 ± 14,097
4,0	330,597	382,280	346,669	353,182 ± 26,450
4,5	438,389	456,307	407,770	434,155 ± 24,544
5,0	470,839	482,332	432,877	462,016 ± 25,881
6,0	533,910	548,222	500,273	527,468 ± 24,615

Legenda:

Ensaio 2: uréia 5,0% p/p como promotor de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 16. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 2, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 22. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 3 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada e acumulada (µg/cm ²)			
	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Média ± dp
0,25	20,106	18,938	18,118	19,054 ± 0,999
0,5	50,836	46,806	44,229	47,290 ± 3,330
1,0	112,100	104,574	92,846	103,174 ± 9,703
1,5	162,776	148,872	134,008	148,552 ± 14,386
2,0	214,066	194,786	175,801	194,884 ± 19,133
3,0	315,119	287,873	253,371	285,454 ± 30,945
4,0	413,047	385,428	353,195	383,890 ± 29,956
4,5	490,241	457,300	419,908	455,816 ± 35,190
5,0	529,531	488,177	444,949	487,552 ± 42,295
6,0	614,016	560,621	509,387	561,341 ± 52,319

Legenda:

Ensaio 3: isopropanol 5,0% p/p como promotor de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 17. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 3, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 23. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 4 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada acumulada (µg/cm ²)			
	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Média ± dp
0,25	24,544	25,501	24,675	24,907 ± 0,519
0,5	48,257	49,343	48,108	48,569 ± 0,674
1,0	94,106	94,058	92,883	93,682 ± 0,693
1,5	141,345	141,888	138,054	140,429 ± 2,074
2,0	189,225	185,799	184,210	186,411 ± 2,563
3,0	275,154	279,041	275,056	276,417 ± 2,273
4,0	357,557	369,119	357,834	361,503 ± 6,597
4,5	416,743	422,481	413,981	417,735 ± 4,336
5,0	452,381	457,079	451,924	453,794 ± 2,853
6,0	516,981	525,940	513,082	518,668 ± 6,593

Legenda:

Ensaio 4: uréia 5,0% p/p e isopropanol 5,0% p/p como promotores de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 18. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 4, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 24. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 5 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada acumulada (µg/cm ²)		
	Célula 1	Célula 2	Célula 3
0,25	39,560	43,497	38,024
0,5	70,478	79,801	70,259
1,0	130,678	150,757	126,687
1,5	179,952	208,849	181,278
2,0	242,935	301,526	226,621
3,0	333,518	386,404	328,705
4,0	427,277	495,364	415,960
4,5	493,479	560,685	475,244
5,0	535,365	601,660	513,582
6,0	643,541	704,237	598,610
Legenda:			

Ensaio 5: propilenoglicol 5,0% p/p como promotor de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 19. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 5, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 25. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 6 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada acumulada (µg/cm ²)			
	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Média ± dp
0,25	23,209	20,522	19,588	21,106 ± 1,880
0,5	43,167	41,838	39,146	41,384 ± 2,048
1,0	98,544	97,227	89,854	95,208 ± 4,684
1,5	150,246	142,256	134,684	142,395 ± 7,782
2,0	202,234	195,742	181,960	193,312 ± 10,353
3,0	302,020	291,604	269,101	287,575 ± 16,826
4,0	409,401	374,443	341,064	374,969 ± 34,172
4,5	482,961	435,889	398,124	438,991 ± 42,503
5,0	540,778	475,241	437,326	484,448 ± 52,337
6,0	637,456	558,847	518,521	571,608 ± 60,485

Legenda:

Ensaio 6: uréia 5,0% p/p e propilenoglicol 5,0% p/p como promotores de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 20. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 6, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 26. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 7 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada acumulada (µg/cm ²)			
	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Média ± dp
0,25	24,951	27,637	22,525	25,038 ± 2,557
0,5	47,931	53,022	45,690	48,881 ± 3,757
1,0	94,910	103,179	90,383	96,158 ± 6,488
1,5	144,700	154,668	131,727	143,698 ± 11,504
2,0	191,933	206,526	184,182	194,214 ± 11,345
3,0	284,542	314,853	266,870	288,755 ± 24,267
4,0	378,978	420,691	360,038	386,569 ± 31,031
4,5	440,531	484,787	410,113	445,144 ± 37,550
5,0	482,649	524,453	451,361	486,155 ± 36,672
6,0	562,432	611,340	529,224	567,666 ± 41,307

Legenda:

Ensaio 7: isopropanol 5,0% p/p e propilenoglicol 5,0% p/p como promotores de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 21. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 7, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 27. Rutina liberada e acumulada do Ensaio 8 (n = 3), segundo planejamento fatorial com dois níveis (DOE 2^k) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada acumulada (µg/cm ²)			
	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Média ± dp
0,25	23,496	27,966	26,432	25,965 ± 2,271
0,5	40,281	46,122	41,819	42,741 ± 3,027
1,0	82,756	90,139	83,748	85,548 ± 4,007
1,5	120,226	130,329	118,848	123,134 ± 6,269
2,0	167,048	173,879	159,824	166,917 ± 7,028
3,0	232,826	249,430	222,186	234,814 ± 13,730
4,0	306,652	324,043	294,611	308,435 ± 14,797
4,5	342,569	366,068	334,195	347,611 ± 16,524
5,0	386,959	423,884	375,966	395,603 ± 25,101
6,0	413,774	439,978	405,541	419,764 ± 17,983

Legenda:

Ensaio 8: uréia 5,0% p/p, isopropanol 5,0% p/p e propilenoglicol 5,0% p/p como promotores de penetração cutânea. As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 22. Rutina liberada e acumulada (µg/cm²) do Ensaio 8, utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Tabela 28. Rutina liberada e acumulada e média dos resultados dos Ensaios 9 a 12, segundo planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central e modelo de membrana de acetato de celulose.

tempo (h)	Rutina liberada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)				
	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 9-12
	$C_{el\ 1 \rightarrow 3} \pm dp$	$C_{el\ 1 \rightarrow 3} \pm dp$	$C_{el\ 1 \rightarrow 3} \pm dp$	$C_{el\ 1 \rightarrow 3} \pm dp$	Média $\pm dp$
0,25	$37,230 \pm 6,688$	$22,711 \pm 3,201$	$26,718 \pm 1,089$	$18,106 \pm 1,950$	$26,191 \pm 8,084$
0,5	$69,170 \pm 11,003$	$44,552 \pm 6,369$	$44,159 \pm 1,019$	$36,185 \pm 3,442$	$48,516 \pm 14,107$
1,0	$123,199 \pm 19,654$	$90,236 \pm 16,291$	$87,734 \pm 1,068$	$85,055 \pm 6,614$	$96,556 \pm 19,709$
1,5	$184,726 \pm 30,628$	$134,191 \pm 19,440$	$124,720 \pm 1,436$	$130,765 \pm 7,775$	$143,601 \pm 29,634$
2,0	$237,613 \pm 37,967$	$188,416 \pm 25,936$	$169,885 \pm 2,746$	$177,868 \pm 10,104$	$193,446 \pm 34,071$
3,0	$331,741 \pm 58,715$	$276,207 \pm 40,522$	$246,698 \pm 7,645$	$266,821 \pm 12,458$	$280,367 \pm 45,254$
4,0	$425,563 \pm 64,380$	$363,298 \pm 49,830$	$324,730 \pm 6,014$	$343,711 \pm 20,699$	$364,326 \pm 53,442$
4,5	$485,722 \pm 80,501$	$413,413 \pm 66,516$	$363,956 \pm 11,433$	$396,076 \pm 16,970$	$414,791 \pm 65,053$
5,0	$516,431 \pm 70,666$	$451,755 \pm 67,436$	$421,248 \pm 15,608$	$437,077 \pm 19,270$	$456,628 \pm 57,220$
6,0	$600,203 \pm 102,478$	$532,020 \pm 71,620$	$441,717 \pm 9,090$	$520,396 \pm 23,519$	$523,584 \pm 80,054$

Legenda:

Ensaios 9 a 12: uréia 2,5% p/p, isopropanol 2,5% p/p e propilenoglicol 2,5% p/p como promotores de penetração cutânea $C_{el\ 1 \rightarrow 3} \pm dp$: média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$); $Ensaio_{9-12}$: média dos Ensaios de 9 a 12 ($n = 12$). As concentrações foram calculadas utilizando-se a equação $y = 0,0374 (\pm 0,00113)x + 0,0012 (\pm 0,00156)$.

Figura 23. Rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dos Ensaio 9 a 12 (média dos resultados; $n = 12$), utilizando membrana de acetato de celulose: (a) modelo de ordem zero e (b) modelo de cinética segundo Higuchi.

Analisando-se os resultados obtidos experimentalmente da liberação *in vitro* da rutina, tratamentos matemáticos e estatísticos foram aplicados para a determinação do modelo de cinética da difusão do componente ativo através da membrana de acetato de celulose, empregando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) – *modelo de cinética de ordem zero* – e em função da raiz quadrada do tempo ($\sqrt{h}$) – *modelo de cinética segundo Higuchi* (KALIA & GUY, 2001).

Os Ensaio 1 a 12 apresentaram como modelo de cinética o **de ordem zero** para a liberação da rutina, em concordância com o valor do coeficiente de correlação linear (R^2) superior a **0,9923 $\pm$ 0,0019** para a relação de linearidade entre a concentração da rutina liberada em função do tempo (h), **Tabela 29**. Segundo Shah e colaboradores, 1994, e Larrucea e colaboradores, 2001, aceita-se como valor de coeficiente de correlação linear adequado na determinação do modelo de cinética aquele igual ou superior a 0,997.

Embora o coeficiente de correlação linear da relação entre a quantidade de rutina liberada em função do tempo apresentou valores inferiores a 0,997 para os Ensaio 2 (formulação contendo como promotor de penetração a uréia 5,0% p/p), **0,9948 $\pm$ 0,0026**, e 8 (formulação contendo como promotores de penetração a uréia 5,0% p/p, o isopropanol 5,0% p/p e o propilenoglicol 5,0% p/p), **0,9923 $\pm$ 0,0019**, a relação da liberação do difusante em função da raiz quadrada do tempo resultou em R^2 não excedentes a **0,9808 $\pm$ 0,0051**, sugerindo que o modelo de cinética segundo Higuchi não se aplicou aos experimentos de difusão. Pelo exposto, verificou-se que o transporte da rutina através da membrana de acetato de celulose teve a dissolução da substância ativa como fator limitante do processo de difusão (SHAH *et al.*, 1994; KALIA & GUY, 2001; LARRUCEA *et al.*, 2001).

Os perfis de liberação da rutina foram complementados com a obtenção dos parâmetros: fluxo (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$), tempo de latência (*lag time*; L_T , h), coeficiente de permeabilidade aparente (P , cm/h), coeficiente de difusão (D , cm^2/h), coeficiente de partição veículo/membrana (K_{VM}), modelo de cinética da difusão (R^2) e efetividade promotora de penetração cutânea (EP), descritos na **Tabela 29**.

Tabela 29. Valores médios dos parâmetros avaliados na liberação da rutina (Ensaio 1 a 12) e respectivos desvios padrão, utilizando a membrana de acetato de celulose.

Parâmetros	Ensaio								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-12 Média
<i>J</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	86,82 + 4,71 ±	89,97 + 4,53 ±	96,09 + 8,34 ±	88,16 + 1,03 ±	105,12 + 8,59 ±	96,58 + 10,76 ±	96,18 + 7,42 ±	72,36 + 3,66 ±	88,26 + 8,93 ±
<i>L_T</i> ($\times 10^{-3} \text{ h}$)	8,45 + 1,50 ±	- 63,55 + 39,58 ±	- 21,09 + 6,81 ±	- 85,87 + 8,16 ±	- 269,17 + 46,74 ±	25,34 + 67,88 ±	- 13,91 + 1,06 ±	- 197,09 + 12,82 ±	- 108,23 + 137,50 ±
<i>P</i> ($\times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{h}$)	5,79 + 0,314 ±	6,00 + 0,302 ±	6,41 + 0,556 ±	5,88 + 0,069 ±	7,01 + 0,572 ±	6,44 + 0,717 ±	6,41 + 0,495 ±	4,82 + 0,244 ±	5,88 + 0,596 ±
<i>D</i> ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{h}$)	1,27 + 0,225 ±	- 9,53 + 5,94 ±	- 3,16 + 1,02 ±	- 12,88 + 1,22 ±	- 40,38 + 7,01 ±	3,8 + 0,102 ±	- 2,09 + 0,159 ±	- 29,56 + 1,92 ±	- 16,23 + 20,62 ±
<i>K_{VM}</i>	140,40 + 30,30 ±	- 31,65 + 30,89 ±	- 65,07 + 20,19 ±	- 13,77 + 1,37 ±	- 5,29 + 0,86 ±	- 68,75 + 87,83 ±	- 92,92 + 14,07 ±	- 4,91 + 0,41 ±	- 32,48 + 31,94 ±
<i>R²_{MOZ}</i>	0,9991 + 0,0003 ±	0,9948 + 0,0026 ±	0,9971 + 0,0010 ±	0,9979 + 0,0002 ±	0,9973 + 0,0022 ±	0,9989 + 0,0001 ±	0,9991 + 0,0003 ±	0,9923 + 0,0019 ±	0,9965 + 0,0035 ±
<i>R²_{MH}</i>	0,9742 + 0,0017 ±	0,9754 + 0,0078 ±	0,9744 + 0,0023 ±	0,9769 + 0,0008 ±	0,9808 + 0,0051 ±	0,9716 + 0,0077 ±	0,9717 + 0,0004 ±	0,9791 + 0,0023 ±	0,9770 + 0,0045 ±
<i>EP</i>	N.A.	1,04 + 0,02 ±	1,11 + 0,05 ±	1,07 + 0,05 ±	1,21 + 0,07 ±	1,11 + 0,08 ±	1,11 + 0,05 ±	0,83 + 0,03 ±	1,02 + 0,10 ±
<i>Rutina</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	512,17 + 26,24 ±	527,47 + 24,62 ±	561,34 + 52,32 ±	518,67 + 6,59 ±	648,80 + 53,01 ±	571,61 + 60,49 ±	567,67 + 41,31 ±	419,76 + 17,98 ±	523,58 + 80,05 ±

Legenda:

1 a 8: valores médios dos parâmetros para os Ensaios 1 a 8 (n = 3); 9-12 Média: valores médios dos parâmetros para os Ensaios 9 a 12 (n = 12); *J*: fluxo; *L_T*: tempo de latência; *P*: coeficiente de permeabilidade aparente; *D*: coeficiente de difusão; *EP*: efetividade promotora de penetração cutânea; *K_{VM}*: coeficiente de partição veículo (formulação)/membrana; *R²_{MOZ}*: modelo de cinética de ordem zero; *R²_{MH}*: modelo de cinética segundo Higuchi; *Rutina*: rutina liberada e acumulada após seis horas de ensaio.

Os valores determinados para o fluxo (**Equação 5**) se apresentaram no intervalo entre $72,36 \pm 3,66 \times 10^{-3}$ e $105,12 \pm 8,59 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$, respectivamente para os Ensaios 8 (formulação contendo como promotores de penetração a uréia 5,0% p/p, o isopropanol 5,0% p/p e o propilenoglicol 5,0% p/p) e 5 (formulação contendo como promotor o propilenoglicol 5,0% p/p). O valor calculado do fluxo para o Ensaio 8 se apresentou estatisticamente diferente dos Ensaios 3, 5, 6 e 7 ($p < 0,0011$). Os demais Ensaios possuíam valor de fluxo homogêneo, isto é, não foram estatisticamente diferentes entre si.

Os tempos de latência calculados pela **Equação 6** foram próximos de zero ($- 269,17 \pm 46,74 \times 10^{-3}$ – Ensaio 5 – a $25,34 \pm 67,88 \times 10^{-3} \text{ h}$ – Ensaio 6, contendo uréia 5,0% p/p e propilenoglicol 5,0% p/p) para todos os Ensaios e os coeficientes de permeabilidade aparente (**Equação 7**) possuíam valores entre $4,82 \pm 0,244 \times 10^{-3}$ e $7,01 \pm 0,572 \times 10^{-3} \text{ cm}/\text{h}$, para os Ensaios 8 e 5, respectivamente.

Os Ensaios 5 e 8 obtiveram os menores valores estatisticamente significativos de coeficiente de difusão (**Equação 8**) iguais a $- 40,38 \pm 7,01 \times 10^{-3}$ e $- 29,56 \pm 1,92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{h}$, respectivamente, enquanto que os Ensaios 1 (formulação controle ausente de promotores de penetração) e 6 propiciaram os maiores valores para este parâmetro, iguais a $1,27 \pm 0,225$ e $3,8 \pm 0,102 \text{ cm}^2/\text{h}$ ($p < 0,0001$).

Os coeficientes de partição veículo/membrana (**Equação 9**) possuíam valores no intervalo de $- 92,92 \pm 14,07$ a $140,40 \pm 30,30$ para os Ensaios 7 (formulação contendo como promotores de penetração o isopropanol 5,0% p/p e o propilenoglicol 5,0% p/p) e 1, respectivamente. O Ensaio possuindo o propilenoglicol 5,0% p/p (Ensaio 5) apresentou efetividade promotora de penetração cutânea (**Equação 10**) mais elevada, igual a $1,21 \pm 0,07$, e a formulação contendo uréia 5,0% p/p, isopropanol 5,0% p/p e propilenoglicol 5,0% p/p (Ensaio 8) originou o menor, $0,83 \pm 0,03$ ($p < 0,0001$).

A quantidade de rutina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo, após seis horas de experimento, foi estatisticamente mais expressiva para o Ensaio 5, analisada estatisticamente por *one way* ANOVA com o Teste de Múltipla Comparação de Tukey ($p < 0,0002$), possuindo valor igual a $648,80 \pm 53,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Portanto, a presença do propilenoglicol a 5,0% p/p apresentou tendência a ser mais

adequado para promover a liberação da rutina da formulação, enquanto que, fora do esperado, a preparação contendo o número maior de promotores de penetração cutânea associados na concentração máxima previamente padronizada (uréia 5,0% p/p, o isopropanol 5,0% p/p e o propilenoglicol 5,0% p/p) resultou em uma liberação de menor magnitude, igual a $419,76 \pm 17,98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A possível explicação para o comportamento inibidor da liberação *in vitro* da rutina pode envolver a elevação da afinidade do componente ativo pela formulação (Ensaio 8 – formulação contendo como promotores de penetração a uréia 5,0% p/p, o isopropanol 5,0% p/p e o propilenoglicol 5,0% p/p).

O tratamento estatístico, fundamentado no planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2003; BOX, HUNTER e HUNTER, 2005), para os parâmetros determinados no estudo da liberação *in vitro* da rutina avaliou a intensidade do efeito dos promotores de penetração cutânea (uréia, isopropanol e propilenoglicol), associados ou não e em proporções distintas, utilizando três valores de concentração: mínima (sem adição do promotor de penetração cutânea), mediana (2,5% p/p – ponto central) e máxima (5,0%), apresentado nas **Tabelas 30 a 36**.

Tabela 30. Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$).

Promotores	Efeito	Erro padrão	p	- 95%	+ 95%
Uréia (1)	-9,2847	3,712796	0,018295 [*]	-16,8782	-1,69115
Isopropanol (2)	-6,4258	3,712796	0,094130 [*]	-14,0194	1,16769
Propilenoglicol (3)	2,3017	3,712796	0,540146	-5,2919	9,89519
1 e 2	-6,5893	3,712796	0,086436 [*]	-14,1829	1,00419
1 e 3	-6,8938	3,712796	0,073528 [*]	-14,4874	0,69969
2 e 3	-10,1577	3,712796	0,010507 [*]	-17,7512	-2,56415

Legenda:

^{*} denota diferença estatística significativa para $p < 0,1$ (BOX, HUNTER e HUNTER, 2005).

Segundo os resultados obtidos por meio do tratamento estatístico para o fluxo, descrito na **Tabela 30**, verificou-se que a presença dos promotores de penetração

cutânea influenciou de modo significativo e negativamente o transporte da rutina através da membrana de acetato de celulose por unidade de área e tempo em diferentes níveis de interação (efeito). Excepcionalmente, o propilenoglicol isolado não provocou resultado estatisticamente significativo, conseqüentemente, não favorecendo a redução do valor do fluxo.

Tabela 31. Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro tempo de latência (h).

Promotores	Efeito	Erro padrão	p	- 95%	+ 95%
Uréia (1)	-0,006364	0,040572	0,876454	-0,089343	0,076616
Isopropanol (2)	-0,004758	0,040572	0,907446	-0,087737	0,078221
Propilenoglicol (3)	-0,073187	0,040572	0,081649 [*]	-0,156166	0,009792
1 e 2	-0,117617	0,040572	0,007065 [*]	-0,200596	-0,034637
1 e 3	0,062028	0,040572	0,137139	-0,020951	0,145007
2 e 3	0,021174	0,040572	0,605722	-0,061806	0,104153

Legenda:

^{*} denota diferença estatística significativa para $p < 0,1$ (BOX, HUNTER e HUNTER, 2005).

O tratamento estatístico para o tempo de latência (**Tabela 31**) demonstrou que o efeito provocado pela uréia e isopropanol isolados; e pelas associações entre a uréia e o propilenoglicol e o isopropanol e propilenoglicol foram homogêneos, isto é, estes não causaram efeitos estatisticamente significativos.

Os promotores de penetração cutânea que ofereceram resposta significativa do efeito (propilenoglicol isolado e a associação da uréia com isopropanol) ocasionaram tempos de latência maiores, o que comprovou que estes influenciam negativamente o tempo necessário para que a rutina inicie sua liberação para a fase receptora linearmente em função do tempo. Porém, os valores do tempo de latência para a liberação da rutina foram próximos a zero, como apresentado na **Tabela 29**.

A associação da uréia com o isopropanol provocou a elevação do tempo de latência com maior intensidade em comparação ao propilenoglicol isolado.

Tabela 32. Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis (*DOE 2^k*) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro coeficiente de permeabilidade aparente (cm/h).

Promotores	Efeito	Erro padrão	p	- 95%	+ 95%
Uréia (1)	-0,000619	0,000247	0,018263 [✱]	-0,001125	-0,000113
Isopropanol (2)	-0,000429	0,000247	0,093948 [✱]	-0,000935	0,000078
Propilenoglicol (3)	0,000153	0,000247	0,540605	-0,000353	0,000659
1 e 2	-0,000439	0,000247	0,086424 [✱]	-0,000945	0,000067
1 e 3	-0,000460	0,000247	0,073398 [✱]	-0,000966	0,000046
2 e 3	-0,000677	0,000247	0,010491 [✱]	-0,001183	-0,000171

Legenda:

[✱] denota diferença estatística significativa para $p < 0,1$ (BOX, HUNTER e HUNTER, 2005).

A análise da influência da presença dos promotores para o coeficiente de difusão aparente (**Tabela 32**) demonstrou que a uréia e o isopropanol isolados e a associação da uréia e isopropanol e do isopropanol e propilenoglicol promoveram redução significativa dos valores deste parâmetro, indicando que a presença de tais promotores e suas associações nas formulações contendo rutina não foi adequada por inibirem o transporte deste composto ativo para a fase receptora. O efeito provocado pelo propilenoglicol não apresentou resposta significativa, portanto, não contribuindo com a redução expressiva do coeficiente de difusão aparente.

Tabela 33. Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro coeficiente de difusão (cm^2/h).

Promotores	Efeito	Erro padrão	p	- 95%	+ 95%
Uréia (1)	-0,000001	0,000006	0,875937	-0,000013	0,000011
Isopropanol (2)	-0,000001	0,000006	0,905973	-0,000013	0,000012
Propilenoglicol (3)	-0,000011	0,000006	0,081663 [*]	-0,000023	0,000001
1 e 2	-0,000018	0,000006	0,007055 [*]	-0,000030	-0,000005
1 e 3	0,000009	0,000006	0,136886	-0,000003	0,000022
2 e 3	0,000003	0,000006	0,605755	-0,000009	0,000016

Legenda:

^{*} denota diferença estatística significativa para $p < 0,1$ (BOX, HUNTER e HUNTER, 2005).

Somente a presença do propilenoglicol isolado e da associação entre uréia e isopropanol propiciaram redução significativa do valor do coeficiente de difusão. Os demais promotores isolados ou em associações obtiveram homogeneidade de resposta para este parâmetro.

Tabela 34. Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro coeficiente de partição veículo/membrana.

Promotores	Efeito	Erro padrão	p	- 95%	+ 95%
Uréia (1)	-24,0513	22,70175	0,298142	-70,4815	22,3790
Isopropanol (2)	-52,8443	22,70175	0,027107 [*]	-99,2745	-6,4140
Propilenoglicol (3)	-50,4451	22,70175	0,034239 [*]	-96,8754	-4,0148
1 e 2	93,7056	22,70175	0,000283 [*]	47,2753	140,1359
1 e 3	36,3281	22,70175	0,120386	-10,1022	82,7584
2 e 3	40,9518	22,70175	0,081644 [*]	-5,4785	87,3820

Legenda:

^{*} denota diferença estatística significativa para $p < 0,1$ (BOX, HUNTER e HUNTER, 2005).

Verificou-se para o coeficiente de partição veículo/membrana (**Tabela 34**) que o isopropanol e o propilenoglicol isolados apresentaram efeito significativo na redução do valor deste parâmetro enquanto que as associações dos promotores como uréia e isopropanol e do isopropanol com o propilenoglicol propiciaram a elevação do coeficiente de partição veículo/membrana.

A uréia isolada e em associação com propilenoglicol não obtiveram efeitos estatisticamente significativos para este parâmetro.

Tabela 35. Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro rotina liberada e acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Promotores	Efeito	Erro padrão	p	- 95%	+ 95%
Uréia (1)	-63,1148	23,72729	0,012595 [*]	-111,643	-14,5870
Isopropanol (2)	-48,1496	23,72729	0,051695 [*]	-96,677	0,3782
Propilenoglicol (3)	22,0479	23,72729	0,360445	-26,480	70,5757
1 e 2	-32,1724	23,72729	0,185588	-80,700	16,3553
1 e 3	-49,4296	23,72729	0,046153 [*]	-97,957	-0,9018
2 e 3	-68,3374	23,72729	0,007399 [*]	-116,865	-19,8097

Legenda:

^{*} denota diferença estatística significativa para $p < 0,1$ (BOX, HUNTER e HUNTER, 2005).

A liberação da rotina (**Tabela 35**) das preparações foi negativa e significativamente influenciada, isto é, inibida, pela presença da uréia isolada e em associação com o propilenoglicol e pelo isopropanol isolado e em associação com o propilenoglicol.

A presença do propilenoglicol isolado e da associação da uréia com o isopropanol não geraram efeito estatisticamente significativo para este parâmetro, conseqüentemente, não inibiram a liberação da rotina presente nas preparações.

Tabela 36. Tratamento estatístico, segundo o planejamento fatorial com dois níveis ($DOE 2^k$) com ponto central, para análise do efeito dos promotores de penetração cutânea para o parâmetro efetividade promotora de penetração cutânea.

Promotores	Efeito	Erro padrão	p	- 95%	+ 95%
Uréia (1)	-0,106274	0,036189	0,006437 [*]	-0,180290	-0,032259
Isopropanol (2)	-0,073361	0,036189	0,051928 [*]	-0,147376	0,000655
Propilenoglicol (3)	0,025861	0,036189	0,480571	-0,048155	0,099876
1 e 2	-0,074799	0,036189	0,047775 [*]	-0,148815	-0,000784
1 e 3	-0,080261	0,036189	0,034560 [*]	-0,154276	-0,006245
2 e 3	-0,116631	0,036189	0,003131 [*]	-0,190646	-0,042615

Legenda:

^{*} denota diferença estatística significativa para $p < 0,1$ (BOX, HUNTER e HUNTER, 2005).

O efeito promotor de penetração cutânea se apresentou influenciado negativamente quando as preparações continham uréia isolada, em associação com o isopropanol e com o propilenoglicol, e a associação do isopropanol com propilenoglicol também propiciou efeito negativo na efetividade promotora.

Somente o propilenoglicol não resultou em efeito estatisticamente significativo, portanto, não apresentou tendência em reduzir a efetividade promotora de penetração cutânea em comparação com a formulação controle (Ensaio 1, ausente de uréia, isopropanol ou propilenoglicol).

Em concordância com o exposto, o Ensaio 5 (formulação contendo como promotor de penetração cutânea o propilenoglicol 5,0% p/p) se apresentou estatisticamente favorável, partindo-se dos parâmetros analisados, para ser selecionado como a preparação a ser avaliada quanto a penetração e retenção cutânea *in vitro* da rutina em muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* e para o estudo da estabilidade pelos Testes de Estabilidade Acelerada.

5.3.6. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DA RUTINA EM MUDA DE PELE DE *Crotalus durissus*

A avaliação da penetração cutânea da rutina veiculada no Ensaio 5 (formulação que se apresentou favorável à liberação da rutina) possuiu como

modelo de membrana a muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*. Embora a muda de pele de cobra não seja um tegumento de procedência de mamíferos, este material biológico apresenta vantagens potenciais que a tornam um modelo de membrana para ensaios de difusão (SPEARMEN & RILEY, 1978; GANS & POUGH, 1982).

O procedimento para o estudo da penetração cutânea da rutina está descrito no *item 4.2.5.8*.

Os ensaios de difusão foram realizados inicialmente por seis horas e alíquotas foram coletadas da fase receptora nos tempos pré-definidos de 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00; 4,00; 4,50; 5,00 e 6,00 horas.

O Ensaio 5, contendo propilenoglicol como promotor de penetração cutânea e rutina, ambos na concentração de 5,0% p/p, não apresentou tendência para favorecer o transporte da substância ativa para a fase receptora, mesmo com método espectrofotométrico a 410,0 nm ter gerado valor de limite de quantificação estimado para a rutina igual a **0,308 µg/mL**. Conseqüentemente, não foi verificada penetração cutânea da rutina através da pele de muda de cobra de *Crotalus durissus* no período de seis horas, comportamento corroborado com o valor logarítmico do coeficiente de partição óleo/água reduzido de - **0,697** (FLORENCE & ATTWOOD, 1988) e com estudos realizados por Li e Birt, 1996, e Casagrande e colaboradores, 2007, que observaram a tendência dos flavonóides em não penetrar membranas biológicas em ensaios de difusão, utilizando, respectivamente, como modelos a pele humana e a pele de porco.

Opostamente às referências anteriormente citadas, Valenta, Nowack e Bernkop-Schnürch, 1999, verificaram a penetração da rutina através da pele de rato e, adicionalmente, sugeriram que o referido composto ativo tende a interagir com o modelo de membrana utilizado, comportamento também verificado nesta pesquisa com a rutina em relação a muda de pele de cobra.

Montenegro e colaboradores, 2007, estudaram a penetração cutânea da quercetina e seus ésteres de 3-O-acila através da pele humana obtida por cirurgia plástica do abdômen. Os autores constataram a penetração cutânea da quercetina e, adicionalmente, os mesmos identificaram que o período de tempo de realização do experimento foi um fator de extrema relevância. Segundo a mesma referência, o período de tempo para o ensaio de difusão deve ser igual ou superior a 22 horas, pois somente a partir deste intervalo de tempo houve a identificação e quantificação

da quercetina no fluido receptor das células de difusão utilizadas pelos autores e, conseqüentemente, possibilitou o cálculo do valor de fluxo para o flavonóide através da pele humana, empregada como membrana modelo.

A fim de se verificar se o tempo de realização do experimento desta pesquisa não se apresentava apropriado, outro ensaio de difusão foi conduzido nas condições experimentais especificadas no *item 4.2.5.8.*, exceto para a duração do experimento, que foi modificada para 52 horas e, novamente, houve a tendência do não favorecimento do transporte da rutina através do modelo de membrana e, por conseguinte, não se verificou a penetração cutânea da rutina através da muda de pele de cobra.

5.3.7. RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

As mudas de pele de cobra de *Crotalus durissus* utilizadas na avaliação da penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada no Ensaio 5 foram retiradas das células de difusão vertical, após o período de seis horas de experimento, e avaliadas quanto a tendência em reter a referida substância ativa, empregando o método descrito no *item 4.2.5.9.*

Após a quantificação da rutina retida no modelo de membrana (μg de rutina/mg de muda de pele de cobra), por espectrofotometria a 410,0 nm (*solvente e branco espectrofotométrico*: mistura de água destilada, álcool etílico 99,5% e solução de hidróxido de sódio 0,25 M, 1:1:0,025), obteve-se valor igual a **$0,931 \pm 0,0391 \mu\text{g/mg}$** (o método apresentou valor de recuperação do padrão igual a $87,126 \pm 1,018\%$).

5.3.8. TESTES DA ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos e farmacêuticos procuram fornecer informações que indiquem o grau de estabilidade relativa de um produto nas condições diversas de exposição a que possa estar sujeito, até o encerramento de seu prazo de validade (BRASIL, 2002; BRASIL, 2004a; BRASIL, 2004b; BRASIL, 2004c). Geram subsídios para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como:

- i. Na escolha dos componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado;
- ii. Forma de apresentação;
- iii. Materiais de acondicionamento e embalagens alternativos;
- iv. Confirmação do prazo de validade estimado (BABY *et al.*, 2004).

Segundo a Legislação Brasileira vigente, os TEA são destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificações físicas de substâncias e/ou alterações na forma farmacêutica ou cosmética, empregando condições drásticas de armazenamento, com a finalidade de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (BRASIL, 2002; BRASIL, 2004a; BRASIL, 2004b; BRASIL, 2004c).

As informações obtidas no estudo de estabilidade são particularmente importantes para os veículos emulsionados, pois quando estocados podem fornecer sinais de desestabilização como: cremeação, sedimentação, floculação, coalescência e, por fim, separação das fases e a inativação de substâncias ativas e ineficácia do sistema (IDSON, 1988; WASHINGTON, 1996).

Os Testes de Estabilidade Acelerada visaram conferir às formulações condições para o envelhecimento acelerado, permitindo selecionar aquelas de melhor perfil de estabilidade física, físico-química e química, segundo os parâmetros avaliados. Trata-se, portanto, de um teste orientativo, indicando qual veículo cosmético em estudo confere estabilidade adequada (BRASIL, 2004c).

A **Tabela 37** ilustra os resultados dos parâmetros físicos, físico-químicos e químicos (teor remanescente da concentração da rutina, % p/v) analisados pelos TEA para a formulação Ensaio 5.

Tabela 37. Avaliação dos parâmetros físicos, físico-químicos e químicos (teor remanescente da concentração da rotina, % p/v) da formulação Ensaio 5 submetida aos Testes de Estabilidade Acelerada.

Testes de Estabilidade Acelerada																		
Condições de Armazenamento																		
Ensaio 5		25,0 ± 2,0 °C									5,0 ± 0,5 °C							
		tempo (dias)									45,0 ± 0,5 °C							
Variáveis	t ₀	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30		
Teor (%)	110,68	115,88	112,77	119,95	119,47	124,93	131,25	115,29	114,05	118,77	115,55	107,24	118,83	116,16	121,13	121,57		
pH	7,2	6,9	7,1	6,6	6,7	6,7	7,0	7,2	6,7	6,9	6,9	6,6	7,2	6,1	6,1	6,0		
% pH	-	- 4,17	- 1,39	- 8,33	- 6,94	- 6,94	- 1,72	Zero	- 6,94	- 4,17	- 4,17	- 8,33	Zero	- 15,28	- 15,28	- 16,67		
η	3.453	3.650	3.440	3.637	3.760	3.622	3.573	3.440	3.530	3.543	3.627	3.571	3.440	3.770	3.433	3.690		
% η	-	5,7	- 0,4	5,3	8,9	4,9	3,5	- 0,4	2,2	2,6	5,0	1,9	- 0,4	9,2	- 0,6	6,9		

Legenda:

(-): não avaliado; η: viscosidade aparente (em cP); t₀: tempo de repouso (48 horas após o preparo); % pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial; % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial; Teor (%): concentração percentual da rotina remanescente na formulação Ensaio 5 (contendo como promotor de penetração o propilenoglicol 5,0% p/p).

Os valores de pH para Ensaio 5 (**Tabela 37**) resultaram em redução com variações de maior intensidade aparente na condição de estufa a $45,0 \pm 0,5$ °C, com intervalo percentual de variação entre **zero** e **- 16,67%**. Apesar das alterações, os valores de pH mantiveram-se compatíveis com o valor de pH fisiológico (**6,0 a 7,2**). Na temperatura elevada da condição de armazenamento a $45,0 \pm 0,5$ °C, alterações significativas eram esperadas para este parâmetro físico-químico analisado (valor de pH), pois a elevação da temperatura possui influência direta na estabilidade física, físico-química e química de diversas formas cosméticas e dos princípios ativos (MAIA, 2002). As condições de ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) e refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) se apresentaram adequadas como condição de armazenamento para o Ensaio 5, possuindo tendência inferior de variações percentuais entre **- 1,39 a - 8,33%** e **zero a - 6,94%**, respectivamente.

As alterações percentuais do valor de pH para o Ensaio 5, verificadas nesta pesquisa, é corroborada com os resultados obtidos por Baby e colaboradores, 2007b, para uma emulsão cosmética fluida de composição similar contendo, como substância ativa, 5,0% p/p do extrato de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais, expressos em rutina. Segundo os mesmos autores, foram observadas variações percentuais mais relevantes do valor deste parâmetro físico-químico na condição de armazenamento de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) e estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C). As formulações citadas anteriormente foram armazenadas em um período de 90 dias (BABY *et al.*, 2007b).

Os valores da viscosidade aparente (**Figura 37**), em todas as condições de armazenamento, acarretaram em variações percentuais diminutas entre **- 0,4 (3.440 cP) a 9,2% (3.770 cP)** em relação ao valor da viscosidade aparente obtida após 48 horas de repouso (t_0), igual a **3.453 cP**.

A estabilidade química determinada em função do teor remanescente da rutina (% p/v) no Ensaio 5 (**Tabela 37**), foi avaliada por meio da quantificação do referido componente ativo pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm (NF X, 1955; PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965) previamente validado (ROLIM *et al.*, 2005; BABY *et al.*, 2006).

Nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), em refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) e em estufa ($45,0 \pm 0,5$ °C), o Ensaio 5 se apresentou quimicamente estável, durante 30 dias (**Tabela 37**). Embora temperaturas elevadas

favoreçam a deterioração dos flavonóides por serem compostos polifenólicos sensíveis à presença de metais, à radiação ultravioleta, à temperatura e à hidrólise (BRUNETON, 1999; FRIEDMAN & JÜRGENS, 2000; ZUANAZZI, 2000; COSTA *et al.*, 2001), não foi verificada tendência à degradação da rutina armazenada a $45,0 \pm 0,5$ °C (em um período de, pelo menos, 30 dias), mesmo com a constatação da variação do valor de pH, indicando que a modificação deste parâmetro físico-químico, no intervalo percentual de **zero** e **- 16,67%**, não causou elevação da degradação da substância ativa.

Estudos de retenção cutânea *in vitro* foram realizados durante os Testes de Estabilidade Acelerada para o Ensaio 5 (formulação contendo como promotor de penetração cutânea o propilenoglicol 5,0% p/p) armazenado unicamente na condição de temperatura ambiente, a $25,0 \pm 2,0$ °C, e nos dias zero (t_0), 20 e 30. Os valores da retenção cutânea da rutina na muda de pele de cobra de *C. durissus* foram iguais a **$0,931 \pm 0,0391$** (t_0); **$1,754 \pm 0,442$** (dia 20) e **$0,468 \pm 0,0618$ µg/mg** (dia 30).

Constatou-se que, no período de realização dos Testes de Estabilidade Acelerada, o Ensaio 5 se manteve adequado quanto ao favorecimento da retenção da referida substância ativa no estrato córneo do modelo de membrana utilizado e, novamente, não houve penetração cutânea da rutina através da muda de *C. durissus*.

6. CONCLUSÕES

Todas as emulsões cosméticas contendo rutina 5,0% p/p e os promotores de penetração cutânea uréia, isopropanol e propilenoglicol, associados ou não e em proporções distintas, foram consideradas aprovadas (**estáveis**) após a Avaliação Preliminar da Estabilidade.

O método espectrofotométrico ($\lambda = 361,0 \text{ nm}$) para a quantificação da rutina nas emulsões cosméticas, foi validado quanto aos critérios: **linearidade**, **especificidade**, **ausência de interferentes**, **limites de detecção** e **de quantificação** reduzidos, **recuperação do padrão**, **precisão** e **exatidão** adequados.

O método espectrofotométrico ($\lambda = 410,0 \text{ nm}$) para a determinação da rutina após a liberação, a penetração e a retenção cutânea *in vitro* foi validado nos seguintes quesitos: **linearidade**, **especificidade**, **ausência de interferentes** (provenientes da membrana de acetato de celulose, da muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* e dos componentes das emulsões), **limites de detecção** e **quantificação** reduzidos, **recuperação do padrão**, **precisão** e **exatidão** (estudo do intervalo) adequadas.

A **liberação *in vitro*** da rutina de todas as emulsões cosméticas, utilizando a membrana de acetato de celulose, apresentou o modelo de cinética **de ordem zero**, em concordância com os valores do coeficiente de correlação linear (R^2) superiores a **0,9923 + 0,0019**.

Os promotores de penetração cutânea **uréia** (**isolada** e em associação com **isopropanol** e **propilenoglicol**); **isopropanol** (**isolado** e em associação com **propilenoglicol**) influenciaram significativa e negativamente a **liberação *in vitro*** da rutina das emulsões cosméticas em diversos parâmetros avaliados: **fluxo** ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$), **coeficiente de permeabilidade aparente** (cm/h), **rutina liberada e acumulada** ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (exceto para a associação da uréia com o isopropanol) e **efetividade promotora de penetração cutânea**.

A presença do **propilenoglicol a 5,0% p/p** na emulsão cosmética com rutina a 5,0% p/p (Ensaio 5) apresentou tendência de **maior liberação in vitro** do referido componente ativo, empregando como modelo de membrana a de acetato de celulose, sendo a indicada para os demais experimentos.

O estudo da **penetração cutânea in vitro** da rutina na emulsão cosmética contendo **propilenoglicol a 5,0% p/p** (Ensaio 5), utilizando a muda de pele de cobra de *Crotalus durissus*, indicou somente a **retenção cutânea** da substância ativa estudada no modelo de membrana.

A emulsão com **rutina e propilenoglicol**, ambos a **5,0% p/p** (Ensaio 5), se manteve estável em todas as condições de armazenamento ($25,0 \pm 2,0$ °C; $5,0 \pm 0,5$ °C e $45,0 \pm 0,5$ °C), em um período de 30 dias, avaliada nos Testes de Estabilidade Acelerada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[§]

ABAMBA, G. Skin preparation. In: BUTTLER, H., ed. **Poucher's perfumes, cosmetics and soaps**. 9.ed. London, New York: Chapman & Hall, 1993. v.3, Cap.14, p.335-392.

AGACHE, P. Histophysiologie du derme. In: _____. **Physiology de la peau et explorations fonctionnelles cutanées**. Paris: Editions Médicales Internationales, 2000. Cap.17, p.193-207.

AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. **National formulary X**. 10.ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1955. p.498-501.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.113-173; 397-402.

ARCT, J.; OBORSKA, A.; MOJSKI, M.; BINKOWSKA, A.; SWIDZIKOWSKA, B. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.24, n.6, p.357-366, 2002.

ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharm. Sci. Technol. Today**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 36-40, 2000.

[§] De acordo com a NBR 6023/2002 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o *CHEMICAL ABSTRACTS SOURCE INDEX* (CASSI), 2004.

BABY, A.R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais.** São Paulo, 2005. 159p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Evaluation of the interaction of surfactants with stratum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* by DSC. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 317, n. 1, p. 7-9, 2006b.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Spectroscopic studies of stratum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* treated with cationic surfactant. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 61-65, 2006a.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; KANEKO, T.M. PAS-FTIR and FT-Raman qualitative characterization of sodium dodecyl sulfate interaction with an alternative stratum corneum model membrane. **Pharmazie**, Berlim, 2007a. [No prelo]

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.89, n. 6, p.1532-1537, 2006a.

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade de produtos de aplicação tópica: ensaios aplicados aos produtos cosméticos e dermatológicos emulsionados. **Int. J. Pharm. Compd. (Ed. Bras.)**, São Paulo, v.6, n.3, p.130-139, 2004.

BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, 2007b. [No prelo]

BARRETO, M. **Causes and prevention of rutin (quercetina-3-O-rhamnoglucoside) crystal deposition in pickled asparagus (*Asparagus officinalis*)**. Arkansas, 2005. 124p. Tese de Doutorado – University of Arkansas.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 2003. 401p.

BARRY, B.W. **Dermatological formulations**. Percutaneous Absorption. New York; Basel: Marcel Dekker, 1983. 480p.

BARRY, B.W. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 237-248, 1991.

BARRY, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 54, supl. 1, p. S31-S40, 2002.

BARRY, B.W. Vehicle effect: what is an enhancer? In: SHAH, V.P.; MAIBACK, H.I. (Ed.). **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York: Plinim, 1993. Cap. 14, p. 261 - 276.

BAUMANN, L.; WEISBERG, E., eds. Basic science of the epidermis. In: _____. **Cosmetic dermatology: principles and practice**. New York: McGraw Hill, 2002. Cap.1, p.3-8.

BEER, J.O.; BATEN, P.; NSENGYUMVA, C.; SMEYERS-VERBEKE, J. Measurement uncertainty from validation and duplicate analysis results in HPLC analysis of multivitamin preparations and nutrients with different galenic forms. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.32, n.4/5, p.767-811, 2003.

BENTLEY, M.V.L.B.; KEDOR, E.R.M.; VIANNA, R.F.; COLLETT, J.H. The influence of lecithin and urea on the *in vitro* permeation of hydrocortisone acetate through skin hairless mouse. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 255-262, 1997.

BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.12, n.2, p.44-50, 2000.

BINKS, B.P. Emulsions: recent advances in understanding. In: _____, ed. **Modern aspects of emulsion science**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. Cap.1, p.1-54.

BONINA, F.P.; MONTENEGRO, L. Effects of some non-toxic penetration enhancers on *in vitro* heparin skin permeation form gel vehicles. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 191-196, 1994.

BOX, G.E.P.; HUNTER, J.S.; HUNTER, W.G. **Statistic for experimenters**. Design, innovation and discovery. 2.ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. 639p.

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. 1 CD-ROM.

BRASIL. Consulta Pública n.43, de 7 de julho de 2004a. Determina a publicação do "Guia para a realização de estudos de estabilidade" (anexo). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 13 set. 2004.

BRASIL. Resolução R.E. n.485, de 19 de março de 2002. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de estabilidade” (anexo). Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5384&word>>. Acesso em: 13 set. 2005.

BRASIL. Resolução R.E. n.398, de 12 de novembro de 2004b. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de estabilidade” Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=13227&word>>. Acesso em: 4 jun. 2005.

BRASIL. Resolução R.E. n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em: 26 jan. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004c. v.1, 45p. (Séries Temáticas: Qualidade 1).

BRAVERMAN, I.M. The Cutaneous microcirculation. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, Malden, v.5, n.1, p.3-9, 2000.

BRITTAİN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, São Paulo, v.2, n.3, p.4-9, 1998.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991. 594p.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry and medicinal plants**. 2.ed. Paris: Lavoisier Publishing; Secaucus: Intercept, 1999. p.310-341.

CADWALLADER, D.E. Stability testing: its role in pre-formulation and formulation of cosmetic products. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.104, n.11, p.87-102, 1989.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR., W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 328, n. 2, p. 183-190, 2007.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: view point and discussion. **J. Chromatogr., B, Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.689, n.1, p.175-180, 1997.

CERTIFICADO DE ANÁLISE. **Rutina**. São Paulo: Tec Pharma Imp. Prods. Químicos e Farmacêuticos, s.d. 1p.

CHEMYUNION. Nossos Produtos. **Cosmético**. 2004. Disponível em: <http://www.chemyunion.com.br/>. Acesso em: 13 fev. 2006.

CIPORKIN, H., PASCHOAL, L.H. **Atualização terapêutica e fisiopatogênica da lipodistrofia ginóide**. São Paulo: Santos, 1992. 218p.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.3, p.728-747.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. v.2, p.194-225.

COUCH, J.F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C.F. Buckwheat as a source of rutin. **Science**, Washington, v. 103, p. 197-198, 1946.

CRODA. Cosméticos. **Área cosmética**. 2003. Disponível em: <http://www.croda.com.br/>. Acesso em: 21 maio 2006.

DE NAVARRE, M.G. Protective and barrier creams. In: _____. **The chemistry and manufacture of cosmetics**. 2.ed. Orlando: Continental Press, 1993. v.3, Cap.21, p.311-321.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, Amsterdam, v.65, n.4, p.337-353, 1999.

DIAS, T.C.S. **Análise da eficácia condicionante de substâncias cosméticas incorporadas em alisante capilar à base de tioglicolato de amônio**. São Paulo, 2004. 114p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

DUTRA, E.A. **Determinação de alfa-hidroxiácidos por eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência**. São Paulo, 2005. 152p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v. 24, n. 5/6, p. 755-767, 2001.

FABRE, H.; SUN, S.W.; MANDROU, B.; MAILLOLS, H. Assay validation for an active ingredient in pharmaceutical formulation: practical approach using ultraviolet spectrophotometry. **Analyst**, Letchworth, v.118, p.1061-1064, 1993.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p. 697-700.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.391, n.2, p.239-252, 1999.

FEINGOLD, K.R. Homeostase da permeabilidade da barreira: seu fundamento bioquímico e regras. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.10, n.2, p.57-63, 1998.

FINNIN, B.C.; MORGAN, T.M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 88, n. 10, p. 955-958, 1999.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical principles of pharmacy**. 2.ed. Oxford: Macmillan, 1988. p. 132-171.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharm. Sci. Technol. Today**, Oxford, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

FOSTER, T.; RYBINSKI, W.V. Applications of emulsions. In: BINKS, B.P., ed. **Modern aspects of emulsion science**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. Cap.12, p.395-406.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H.S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, n.6, p.2101-2110, 2000.

GANS, C.; POUGH, F.H. (Ed.). **Biology in Reptilla**. New York: Academic Press, 1982. v. 12. p.397.

GARTNER, L.P.; HIATT, G.F. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.1-95, 253-266.

GIL-ALEGRE, M.E.; BERNABEU, J.A.; CAMACHO, M.A.; TORRES-SUAREZ, A.I. Statistical evaluation for stability studies under stress storage conditions. **Farmaco**, Paris, v. 56, n. 11, p. 877-883, 2001.

GOLDBERG-CETTINA, M.; LIU, P.; NIGHTINGALE, J.; KURIHARA-BERGSTROM, T. Enhanced transdermal delivery of estradiol *in vitro* using binary vehicles of isopropyl myristate and short-chain alkanols. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 237-245, 1995.

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, Columbus, v.68, p.305-309, 1996. Disponível em: <http://www.pubs.acs.org>. Acesso em: 12 jun. 2004.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids: effects of rutin, quercetin and hesperedin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, Paris, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.

GUY, R.H.; HADGRAFT, J. On the determination of drug release from topical dosage forms. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. R1-R3, 1990.

GUY, R.H.; KALIA, Y.N.; DELGADO-CHARRO, B.; MERINO, V.; LÓPEZ, A.; MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 64, n. 1/3, p. 129-132, 2000.

HADGRAFT, J. Skin deep. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 291-299, 2004.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 224, n. 1-2, p. 1-18, 2001.

HADGRAFT, J.; RIDOUT, G. Development of model membranes for percutaneous absorption measurements. I. Isopropyl myristate. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 149-156, 1987.

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 2, n. 5-6, p. 311-330, 1994.

HAIGH, J.M.; BEYSSAC, E.; CHANET, L.; AIACHE, J.-M. In vitro permeation of progesterone from a gel through the shed snake skin of three different species. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 170, n. 2, p. 151-156, 1998.

HANSON RESEARCH. **Document Library: Operation Manuals – HRC Equipment.** Manual Diffusion Cell System. Chatsworth: Hanson Research Corporation, Corporate Headquarters, 2006. 1 CD-ROM.

HARBORNE, J.B. The flavonoids. In: _____(Ed.). **The flavonoids: advances in research since 1980.** London, New York: Chapman & Hall, 1988. 621p.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.55, n.6, p.481-504, 2000. [Review].

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, Stoneham, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de cosmetologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p.207-208.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.143, n.6, p.35-38, 74, 1988.

IDSON, B. Stability testing of emulsions: part 2. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.152, n.2, p.38-43, 72, 1993.

INTERNATIONAL SPECIALTY PRODUCTS. **Skin care**. Disponível em: <http://www.ispcorp.com/products/hairskin/index.html>. Acesso em: 09 mar. 2006.

ITOH, T.; MAGAVI, R.; CASADY, R.L.; NISHIHATA, T.; RYTTHING, J.H. A method to predict the percutaneous permeability of various compounds: shed snake skin as a model membrane. **Pharm. Res.**, New York, v. 7, n. 12, p. 1302-1306, 1990b.

ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTHING, J.H. Use of shed snake skin as a model membrane for *in vitro* percutaneous penetration studies: comparison with human skin. **Pharm. Res.**, New York, v. 7, n. 10, p. 1042-1047, 1990a.

JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, Philadelphia, v.19, n.5, p.737-757, 1996.

KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Modeling transdermal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 48, n. 2-3, p. 159-172, 2001.

KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R.H. Iontophoretic drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.

KIM, C.K.; KIM, J.J.; CHI, S.C.; SHIM, C.K. Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 99, n. 2-3, p. 109-118, 1993

LANZET, M. Lotions. In: DE NAVARRE, M.G. **The chemistry and manufacture of cosmetics**. 2.ed. Orlando: Continental Press, 1993. v.3, Cap.24, p.379-417.

LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **Eur. J. Phar. Biopharm.**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 113 - 119, 2001.

LI, B.; BIRT, D.F. *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of cancer preventive flavonoid apigenin in different vehicles in mouse skin. **Pharm. Res.**, New York, v. 13, n. 11, p. 1710-1715 1996.

LI, G.L.; van der GEEST, R.; CHANET, L.; van ZANTEN, E.; DANHOF, M.; BOUWSTRA, J.A. *In vitro* iontophoresis of R-apomorphine across human stratum corneum. Structure-transport relationship of penetration enhancement. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 84, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

MAIA, A.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. São Paulo, 2002. 117p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MAIA CAMPOS, P.M.B.M. Desenvolvimento de produtos cosméticos. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.14, n.5, p.66-69, 2002.

MEGRAB, N.A.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: the effects of ethanol/water co-solvent systems. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 101-112, 1995.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.54, suppl.1, p.S3-S17, 2002.

MONTENEGRO, L.; CARBONE, C.; MNISCALCO, C.; LAMBUSTA, D.; NICOLOSI, G.; VENTURA, C.A.; PUGLISI, G. *In vitro* evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 336, n. 2, p. 257-262, 2007.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **Eur. J. Phar. Biopharm.**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 103 - 112, 2001.

MULHOLLAND, M.; HIBBERT, D.B. Linearity and the limitations of squares calibration. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.762, n.1/2, p.73-82, 1997.

NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharm. Sci. Technol. Today**, Oxford, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.

NARAYANA, K.R.; REDDY, M.S.; CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian J. Pharmacol.**, Mumbai, v.33, n.1, p.2-16, 2001.

NGAWHIRUNPAT, T.; OPANASOPIT, P.; PRAKONGPAN, S. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 645-651, 2004.

OECD Environment Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment N. 28. Organization for Economic Co-operation and Development (Draft). Guidance **Document for the Conduct of Skin Absorption Studies**. 2000.

OOMAH, B.D.; MAZZA, G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 44, n. 7, p. 1746-1750, 1996.

PARKS, J.M.; CLEEK, R.L.; BUNGE, A.L. Chemical release form topical formulations across synthetic membranes. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 86, n. 2, p. 187-192, 1997.

PEDRIALI, C.A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. São Paulo, 2005. 127p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PHARMACOPÉE Française. 8.ed. Paris: Comissão Permanente de Pharmacopée par l'Ordre National des Pharmaciens, 1965. p.946-948.

PINTO, C.A.S.O. **Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas contendo papaína livre e modificada**. São Paulo, 2005. 128p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

POLESELLO, S. How to present an analytical method. **Food Chem.**, Oxford, v. 58, n. 1-2, p. 145-147, 1997

PONGJANYAKUL, T.; PRAKONGPAN, S.; PANOMSUK, S.; PUTTIPIPAKHACHORN, S.; PRIPREM, A. Shed king cobra and cobra skins as model membranes for in-vitro nicotine permeation studies. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 54, n. 10, p. 1345-1350, 2002.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. p.597-668.

PUGLIESI, P.T. **Physiology of the skin**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1996. Cap.1, p.1-15.

QUACK, J.M.; RENG, A.K.; SKRYPZAK, W. Testing the stability of cosmetic emulsions. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.91, n.10, p.21-38, 1976.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

REALDON, N.; PERIN, F.; MORPURGO, M.; RAGAZZI, E. Influence of processing conditions in the manufacture of O/W creams. I. Effect on dispersion grade and rheological characteristics. **Farmaco**, Paris, v.57, n.5, p.341-347, 2002.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; SCHAEFER, U.F. *In vitro* studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 222-228, 2006

RHODIA. **Home, Personal Care & Industrial Ingredients (HPCII)**. 2003. Disponível em: http://www.rhodia.com/us/home_tunel.asp. Acesso em: 07 mar. 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, C.F.S.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIEGER, M.M. Emulsões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.2, Cap.17, p.855-905.

RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J.L. (Ed.). **Skin Permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993. Cap. 2, p. 33-72.

RIEGER, M.M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.8, n.5, p.47-53, 1996.

RIGG, P.C.; BARRY, B.W. Shed snake skin and hairless mouse skin as a model membrane for human skin during permeation studies. **J. Invest. Dermatol.**, Estados Unidos, v. 94, n. 2, p. 235-240, 1990.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benthham (Olacaceae) commercial extract. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.88, n.4, p.1015-1019, 2005.

ROLIM, A.; OISHI, T.; MACIEL, C.P. M.; ZAGUE, V.; PINTO C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 308, n. 1-2, p. 107-114, 2006.

ROSSI, A.B.R. **Lipodistrofia ginóide: aspectos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e terapêuticos**. Campinas, 1996. 126p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas.

ROSSI, A.B.; VERGNANINI, A.L. Cellulite: a review. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v.14, n.4, p.251-262, 2000.

ROTHWELL, J.A.; DAY, A.J.; MORGAN, M.R.A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 53, n. 11, p. 4355-4360, 2005.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTE, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.175, n.1, p.85-94, 1998.

SALAGER, J.L.; FORGIARINI, A.; MÁRQUEZ, L.; PENA, A.; PIZZINO, A.; RODRIGUEZ, M.P.; RONDO-GONZÁLEZ, M. Using emulsion inversion in industrial processes. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, v.108, may, p.259-272, 2004.

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

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. **Iniciação à química cosmética**. São Paulo: Tecnopress, 2002. v.1, p.23-29.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHAH, J. Analysis of permeation data: evaluation of lag time method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 161-169, 1993.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.; LAM, S.Y.; SKELLY, J.P. Determination of *in vitro* drug release from hydrocortisone creams. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 53-59, 1989.

SHAH, J.C.; KAKA, I.; TENJARLA, S.; LAU, S.W.J.; CHOW, D. Analysis of percutaneous permeation data: II. Evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 283-290, 1994.

SIMMONS, J.V. **Cosméticos**: formulación, preparación y aplicación. Madri: A. Madrid Vicente, 2000. p.214-230.

SPEARMAN, R.I.C.; RILEY, P.A. (Ed.). **The skin of vertebrates**. London: Academic Press, 1978. p.23.

TABORIANSKI, A.M. **Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas**. São Paulo, 2003. 143p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, v.108, may, p.227-258, 2004.

TAKAHASHI, K.; TAMAGAWA, S.; KATAGI, T.; RYTTING, J.H.; NISHIHATA, T.; MIZUNO, N. Percutaneous permeation of basic compounds through shed snake skin as a model membrane. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 45, n. 10, p. 882-886, 1993.

TANO, C.T.N. **Avaliação histológica do tecido adiposo da pele de ratas sob ação de cafeína e Cafeisilane® C**. São Paulo, 2003. 143p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

THOMPSON, J.E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2006. p. 345-367.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. Phenols and phenolic glycosides. In: _____. **Pharmacognosy**. 14.ed. London: W.B. Saunders, 1996. p. 218-254.

TROMMER, H.; NEUBERT, R.H.H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. **Skin Pharmacol. Physiol.**, New York, v. 19, n. 2, p. 106-121, 2006.

TSUZUKI, N.; WONG, O.; HIGUCHI, T. Effect of primary alcohols on percutaneous absorption. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 46, n. 1-2, p. 19-23, 1988.

TURUNEN, T.M.; BÜYÜKTIMKIN, S.; BÜYÜKTIMKIN, N.; URTTI, A.; PARONEN, P.; RYTTING, J.H. Enhanced delivery of 5-fluorouracil through skin by two new transdermal penetration enhancers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 92, n. 1-3, p. 89-95, 1993.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. **Guidance for industry: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology.** Rockville, 1995. (CPMP/ICH/281/95). Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2006.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Chemistry (Draft). **Analytical procedures and methods validation: chemistry, manufacturing and controls documentation.** 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/>. Acesso em: 12 nov. 2005.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Biopharmaceutics. **Bioanalytical method validation.** 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance>. Acesso em: 12 nov. 2005.

UNITED States Pharmacopeia: USP27; The National Formulary: NF22. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.2622-2625.

VALENTA, C.; NOWACK, E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.185, n.1, p.103-111, 1999.

VELASCO, M.V.R.; BABY, A.R.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O. Validação de metodologia analítica para o doseamento de bioflavonóides presentes em extratos vegetais de ação anticelulítica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 18, São Paulo, 2004. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2004. 1 CD-ROM.

WALKER, R.B.; SMITH, E.W. The role of percutaneous penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 295-301, 1996.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.36, n.7, p.829-837, 2004.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.20, n.2/3, p.131-145, 1996.

WIDLER, N.; SIGRIST, A.; GAFNER, F.M. Lipid analysis and transepidermal water loss in snakes. **IFSCC Magazine**, Augsburg, v. 5, n. 1, p. 24-29, 2002.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Cosmetologia de Harry**. Madrid: Díaz de Santos, 1990. p.10-11.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.56, n.5, p.603-618, 2004.

WITTERN, K.P.; ANSMANN, A.; HÜTTINGER, R.; BILLEK, D.; CHARLET, E.; HOENEN, L.; KUCZERA, K.; MOTITSCHKE, L.; QUACK, J.; SEIB, K.; UMBACH, I.; WOLFF, G. Stability testing of cosmetic emulsions: experience of a circular test. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.100, n.10, p.33-39, 1985.

WONG, O.; TSUZUKI, N.; NGHIEM, B.; KUEHNHOFF, J.; ITOH, T.; MASAKI, K.; HUNTINGTON, J.; KONISHI, R.; RYTTHING, J.H.; HIGUCHI, T. Unsaturated cyclic ureas as new non-toxic biodegradable transdermal penetration enhancers. II. Evaluation study. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 191-202, 1989.

WOOD, J.H. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.1, Cap.6, p.211-252.

YAO, L.H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, Dordrecht, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.

ZATZ, J.L. **Skin permeation**. Fundamentals and application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. 300p.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROCIVK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. cap.23, p.489-516.

Produção Científica 2005-2007

Artigos completos publicados em periódicos

1. ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benthham (Olacaceae) commercial extract. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.88, n.4, p.1015-1019, 2005.
2. ROLIM, A.; OISHI, T.; MACIEL, C.P. M.; ZAGUE, V.; PINTO C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 308, n. 1-2, p. 107-114, 2006.
3. BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Evaluation of the interaction of surfactants with stratum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* by DSC. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 317, n. 1, p. 7-9, 2006.
4. BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Spectroscopic studies of stratum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* treated with cationic surfactant. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 61-65, 2006.

5. BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.89, n. 6, p.1532-1537, 2006.
6. MAIA, A.M.; BABY, A.R.; YASAKA, W.J.; SUENAGA, E.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R.. Influence of sodium metabisulfite and glutathione on the stability of vitamin C in O/W emulsion and extemporaneous aqueous gel. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 322, p. 130-135, 2006.
7. BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; KANEKO, T.M. PAS-FTIR and FT-Raman qualitative characterization of sodium dodecyl sulfate interaction with an alternative stratum corneum model membrane. **Pharmazie**, Berlim, 2007. [No prelo]
8. BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, 2007. [No prelo]

9. MAIA, A.M.; BABY, A.R.; YASAKA, W.J.; SUENAGA, E.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Validation of HPLC stability-indicating method for vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. **Talanta**, Amsterdam, v. 71, p. 639-647, 2007.