

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FORMULAÇÃO DERMOCOSMÉTICA CONTENDO DMAE GLICOLATO
E FILTROS SOLARES: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA, ESTUDO DE ESTABILIDADE E ENSAIO DE BIOMETRIA
CUTÂNEA.

DANIELA SOARES DECCACHE

RIO DE JANEIRO

2006

DANIELA SOARES DECCACHE

**FORMULAÇÃO DERMOCOSMÉTICA CONTENDO DMAE GLICOLATO E
FILTROS SOLARES: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA,
ESTUDO DE ESTABILIDADE E ENSAIO DE BIOMETRIA CUTÂNEA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora:

Prof. Dra. Elisabete Pereira dos Santos, UFRJ

Co-Orientadora:

Prof. Dra. Valeria Pereira de Sousa, UFRJ

Rio de Janeiro

2006

D291f

Deccache, Daniela Soares.

Formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea. / Daniela Soares Deccache. – Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Farmácia, 2006. 152 f. il.; 30 cm.

Orientador: Elisabete Pereira dos Santos

Dissertação (mestrado)-UFRJ/ Faculdade de Farmácia/
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2006.

Referências Bibliográficas: p. 142

Inclui anexos

1. DMAE glicolato. 2. Desenvolvimento de metodologia analítica. 3. FPS *in vitro*. 4. Biometria cutânea. 5. CLAE. 6. Estabilidade de formulações dermocosméticas. 7. Toxicidade dérmica primária e cumulativa. I. Elisabete Pereira dos Santos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 615.778

FOLHA DE APROVAÇÃO

FORMULAÇÃO DERMOCOSMÉTICA CONTENDO DMAE GLICOLATO E FILTROS SOLARES: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, ESTUDO DE ESTABILIDADE E ENSAIO DE BIOMETRIA CUTÂNEA.

DANIELA SOARES DECCACHE

**Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Grau de MESTRE**

**Prof^a. Dr^a. Elisabete Pereira dos Santos
Orientadora/Presidente**

Prof^a. Dr^a. Martha de Luca

Prof^a. Dr^a. Nádia Maria Volpato

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2006.

Dedico esta dissertação à busca e ao encontro de um sonho. À magia de viver e de ter coragem, ao encantamento que experimentamos quando decidimos buscar caminhos e a todos os incríveis seres humanos que eu amo e que compartilham esta busca comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Elisabete, por ter me aceito como aluna e possibilitado meu ingresso nesta jornada. Obrigado pela paciência e transmissão de seu grande conhecimento.

À minha co-orientadora, professora Valeria, por ter participado de forma intensa e dedicada a este trabalho. Por sua competência, boa vontade, entusiasmo e pelas cobranças, que, somadas, contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

À CAPES, pela bolsa de mestrado;

Ao LADEG, Farmácia Universitária e LabCQ pelo apoio financeiro e de materiais;

Ao fornecedor Embrafarma, pelas amostras cedidas.

Uma das partes mais emocionantes da dissertação é escrever os agradecimentos. Emocionante por lembrar de todas as pessoas que me acompanharam durante esse trabalho.

Agradeço ao meu pai Luiz Deccache. Ele que me ensinou desde sempre a acreditar e a buscar meus sonhos, meus objetivos, aonde quer que estivessem, com verdade, persistência e ética. Agradecer a Dulce, minha mãe, é lembrar de todo o amor possível, dedicação e carinho, e ter forças para seguir em frente.

Ao meu querido e amado Rafael, por simplesmente ser um homem incrível, tão companheiro e amigo, por fazer parte da minha vida.

As minhas irmãs Laila e Carolina, meninas risonhas e amigas, que sempre me fazem lembrar quem sou.

Aos professores Nadia Volpato, Sheila Garcia, Mauricio Trambaiolli, Carla Hollandino e Lucio Cabral pelas colaborações e valiosos ensinamentos.

À coordenadora do curso de Pós-graduação professora Gisela Dellamora Ortiz pelo empenho e boa vontade e aos funcionários da coordenação.

Agradeço muito carinhosamente aos amigos presentes e os que já passaram pelo LabCQ pelo auxílio, pelos momentos divertidos, companheirismo e amizade: Laís Bastos, Eliane Medeiros, Tailane Moreira, Bianca Waruar, Bianca Gonzáles, Ana Ferreira, Edilene, Vivian de Souza, Mariana Pinheiro, Carolina Bemvindo, Vinícios Santos, Renata Pietch, Adriana, Joana, Anderson Ferreira, Daniela Ribeiro, Viviane, Raquel, Maria Teresa, Renata, Fernanda e a Maria do Socorro.

À todos os companheiros do LADEG e farmácia universitária da UFRJ, professoras Rita, Márcia Passos, Naira, professor João. Agradeço à Maria Amélia, sempre solícita, Ricardo, Cléo, Renata, Sr. Paulo, Sr. Orcalino, Enock. À farmacêutica Glaucia Pinheiro, com uma palavra sempre amiga, Zaida Freitas, ao querido Carlinhos, por toda a força e torcida, Aline Mota, Bárbara Lorca, Mariana, Ana Lucia Villa, Fabio, Ana Karla e tantos outros.

Aos amigos da UFF, professora Martha de Luca, pelo carinho, profissionalismo e indicação ao mestrado. Aos professores Carlos Peregrino, Celso Oliveira, Euler e Aníbal, por terem sido mestres tão importantes.

À Venício Feo da Veiga, Laboratório de Microscopia, por toda boa vontade nos ensinamentos de microscopia. Ao professor Paulo Bechara, Instituto de Química, professor Newton Castro, Farmacologia, pelo auxílio em bioestatística.

Ao professor Ronir Raggio Luiz, do NESC, pela revisão do tratamento estatístico, profissionalismo e por ter me recebido com toda boa vontade, apesar de seu escasso tempo.

Ao professor Alexandre Pirrho e ao Sr. Souza, pela colaboração nos testes de toxicidade dérmica.

À professora Dra. Mônica Manela Azulay e sua equipe, pela parceria nos testes de biometria cutânea e a todas as voluntárias que participaram dos testes.

À Maria Rosa, responsável pela revisão bibliográfica deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Alexandre, Jeany, Márcia, Lílían e Diana, pela enorme amizade de sempre e por entenderem a minha ausência.

Às minhas amadas primas Cristina, Quequê, Eline e Fernanda, pelas risadas, alegrias e por estarem sempre ao meu lado. À Marina, por já ter que entender, desde tão pequenininha, a ausência involuntária da dinda Dani.

Aos meus avós Nelito e Alaíde, por serem um lindo exemplo de determinação;
Às famílias Soares, Deccache e agora Parrilha, pela torcida e força.

À minha dinda Dora, aonde quer que ela esteja, pelo amor que sempre me dedicou e por de alguma forma, estar sempre ao meu lado. À Tia Ottilia e Mary pelas orações e pelo carinho.

Enfim, obrigado a Deus, todas as energias positivas e ao meu anjo da guarda.

*“... Quereis tocar com os dedos o corpo nu de vossos sonhos.
E é bom que o desejeis.
A fonte secreta de vossa alma precisa brotar e correr
murmurando para o mar;
E o tesouro de vossas profundezas ilimitadas precisa revelar-se a vossos olhos.
Mas não useis balanças para pesar vossos tesouros desconhecidos;
E não procureis explorar as profundidades de vosso ser com uma vara ou uma sonda,
Porque o Eu é um mar sem limites e sem medidas.*

Não digais: Encontrei a verdade. Digais de preferência: Encontrei uma verdade. ...”

(Gibran Khlil Gibran)

RESUMO

O Dimetilaminoetanol (DMAE) em associação aos filtros solares e outros ativos têm sido utilizado de forma significativa e crescente nos produtos dermocosméticos destinados à prevenção e tratamento do envelhecimento cutâneo. Estudos vêm comprovando sua eficácia em atenuar linhas de expressão e melhorar a aparência da pele. No entanto, há na literatura uma escassez de metodologias analíticas para a quantificação do DMAE de uso cosmético. Neste trabalho, determinou-se a validação de duas metodologias analíticas para a quantificação de DMAE glicolato. O método de titulometria potenciométrica em meio não aquoso se mostrou exato, preciso e específico para a análise quantitativa da matéria prima e das formulações dermocosméticas propostas. O método cromatográfico realizado por CLAE em fase reversa, realizado em baixo comprimento de onda (205 nm), apresentou resultados bastante satisfatórios para a quantificação do fármaco na formulação dermocosmética para os mesmos parâmetros de validação. O método titulométrico apresentou melhor performance e foi escolhido para a análise do teor de DMAE glicolato nos testes de estabilidade. De acordo com o estudo de estabilidade, as formulações demonstraram ser estáveis, apresentando decaimento do teor do ativo menor que 5% em relação ao controle (tempo 0). O ensaio de FPS *in vitro* demonstrou decaimento médio de 12 % para formulação A ($P < 0,001$) e de aproximadamente 14 % para formulação B ($P < 0,001$). A análise da biometria cutânea realizada na face das voluntárias demonstrou que a formulação não provocou o aumento da oleosidade ($P > 0,05$) e promoveu o equilíbrio do pH facial para um valor médio final de 5,1. A verificação da hidratação apresentou resultados positivos estatisticamente significativos comparando-se o tempo 0 (controle) e o tempo 15 dias de uso da formulação, com aumento médio de 11,5% neste período ($P < 0,001$). O nível de hidratação foi mantido até o 30° dia ($P > 0,05$). O teste de toxicidade dérmica da formulação demonstrou não haver irritação cutânea primária e cumulativa nos coelhos avaliados.

ABSTRACT

Dimethylaminoethanol (DMAE) associated to sunscreens and other ingredients have significantly been used by cosmetic formulations to prevent skin aging. Many researches have been developed to confirm its effects in treating wrinkles and improve skin appearance. However there is a lack of official methodology to quantify DMAE used in cosmetics formulations. The aim of this study was to validate and evaluate two methodologies to determinate DMAE glicolate raw and in a cosmetic formulation. The non-aqueous potentiometric titration method is a rapid, accurate, specific and precise methodology for determination of DMAE glicolate in raw material and in proposed formulations. The HPLC method using a reversed-phase column was performed in low wavelength detection (205 nm) and also demonstrated satisfactory performance for the same validation parameters than above. The titrimetric method has a better performance and was chosen to determine DMAE glicolato in the proposed formulations for stability tests. According to the stability tests, the proposed formulations showed a good stability performance, with less than 5% decay of DMAE glicolato comparing to control (initial time). The solar protection factor (SPF) *in vitro* assay has demonstrated an average decay of 12 % for formulation A ($P < 0,001$) and an average decay of about 14 % for formulation B ($P < 0,001$). The cutaneous biometry assay performed on volunteer's face has demonstrated that the formulation did not increase oily concentration on skin ($P > 0,05$) and promoted the pH equilibrium to the average value of 5,1 on face. The moisture determination showed positive results, statistically significant comparing the control (time 0) to time 15 days using the formulation, with an average increase of about 11,5 % in this period ($P < 0,001$). Level of moisturizing was kept until the 30 day ($P > 0,05$). The dermal toxicity assay of the formulation has demonstrated no primary and cumulative skin irritancy in the assess rabbits.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH	acetilcolina
λ	comprimento de onda
μg	micrograma
AG	ácido glicólico
AHAs	alfa hidroxiácidos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	butilhidroxitolueno
BZF	benzofenona-3
CAPLUS	Chemical Abstract Plus database
CAS	Chemical Abstract Service
CATEC	Câmara Técnica de Cosméticos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	centímetro
COL	colina
COLIPA	The European cosmetic toiletry and perfumery
CTFA	Cosmetic Toiletry Fragrance Association
DEM	dose eritematógena mínima
DGE	DMAE glicolato comercial
DGN	DMAE glicolato neutralizado
DMAE	dimetilaminoetanol
DPR	desvio padrão relativo
EC	estrato córneo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FPS	fator de proteção solar
FR	fase reversa
HC-3	3-hemicolina

IV	infravermelho
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama
mL	mililitro
mmol	milimolar
MMPs	metaloproteinases de matriz
MRTD	maximun recommended therapeutic dose
MS	Ministério da Saúde
MTO	metoxicinamato de octila
nm	nanômetros
OCT	octocrileno
P.A.	para análise
PAF	fator de ativação plaquetário
PDR	Physician's Desk Reference
PE	ponto de ebulição
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
rpm	rotações por minuto
UA	unidades arbitrárias
UR	umidade relativa
UV	ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta A
UVB	radiação ultravioleta B
UVC	radiação ultravioleta C

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Camadas da pele e estrutura da epiderme.	27
Figura 2 - Diferenciação histológica de pele jovem e envelhecida intrinsecamente.	29
Figura 3 - Penetração da radiação solar nas camadas da pele.	31
Figura 4 - Fórmulas estruturais do DMAE (A), colina (B) e acetilcolina (C).	42
Figura 5 - Fórmulas estruturais do ácido glicólico (A) e DMAE glicolato (B).	47
Figura 6 - Representação esquemática dos processos de instabilidade de uma emulsão.	54
Figura 7 - Equipamento de unidade combinada de biometria cutânea.	86
Figura 8 - Padronização dos pontos de medida para o ensaio de biometria cutânea.	88
Figura 9 - Espectro de absorção UV do DGE e DGN na concentração de 1,0 mg/mL.	94
Figura 10 - Espectro de absorção UV do OCT na concentração de 0,01 mg/mL.	95
Figura 11 - Espectro na região do infravermelho da matéria-prima MTO.	96
Figura 12 - Espectro na região do infravermelho da matéria-prima BZF.	97
Figura 13 - Representação gráfica das curvas de calibração obtidas para CLAE em 3 dias diferentes na faixa de concentração de 400 a 1200 µg/mL.	99
Figura 14 - (A): Cromatograma do placebo na concentração de 1000 µg/mL obtido por CLAE com λ de 205 nm; (B): Cromatograma da formulação A contendo DGE na concentração de 1000 µg/mL realizado nas mesmas condições cromatográficas.	100
Figura 15 - Curva de calibração obtida para titulação potenciométrica em três dias diferente na faixa de concentração 60 a 200 mg DGE/mL.	104
Figura 16 - Perfil da viscosidade da formulação A e padrão Brookfield 12500 cps.	107
Figura 17 - Representação gráfica do comportamento da viscosidade (cps) x tempo (dias) para formulação A em ambas as condições de armazenamento ao longo de 90 dias.	108

Figura 18 - Representação gráfica do comportamento da Viscosidade (cps) x tempo (dias) para formulação B, em ambas as condições de armazenamento ao longo de 90 dias.	109
Figura 19 - Representação gráfica da variação do FPS <i>in vitro</i> em função do tempo (dias) para formulação A, em ambas as condições de armazenamento.	111
Figura 20 - Representação gráfica da variação do FPS <i>in vitro</i> em função do tempo (dias) para formulação B, em ambas as condições de armazenamento.	111
Figura 21 - Representação gráfica do comportamento do teor (%) de DGE em função do tempo (dias) na formulação A, em ambas as condições de armazenamento.	113
Figura 22 - Representação gráfica do comportamento do teor (%) de DGE em função do tempo (dias) na formulação B, em ambas as condições de armazenamento.	113
Figura 23 - Representação gráfica da variação do teor (%) de DGN em função do tempo (dias) na matéria-prima armazenada a temperatura ambiente por período de 90 dias.	114
Figura 24 - Representação gráfica dos valores obtidos em cada ponto, no ensaio de biometria cutânea para oleosidade.	116
Figura 25 - Representação gráfica dos valores médios obtidos em cada tempo, no ensaio de biometria cutânea para oleosidade.	116
Figura 26 - Representação gráfica dos valores obtidos em cada ponto, no ensaio de biometria cutânea para determinação do pH.	117
Figura 27 - Representação gráfica dos valores médios obtidos em cada tempo, no ensaio de biometria cutânea para pH.	117
Figura 28 - Representação gráfica dos valores obtidos em cada ponto, no ensaio de biometria cutânea para determinação da hidratação.	118
Figura 29 - Representação gráfica dos valores médios obtidos em cada tempo no ensaio de biometria cutânea para determinação da hidratação.	118
Figura 30 - (A) resultado do ensaio de toxicidade dérmica primária; (B) resultado do ensaio de toxicidade dérmica cumulativa.	119

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Relação de análises realizadas para a caracterização das matérias-primas.	67
Tabela 2 - Relação entre a concentração e componentes utilizados na fabricação da formulação base.	71
Tabela 3 - Resultados obtidos na determinação do índice de refração do MCO e OCT.	93
Tabela 4 - Determinação do pH nas matérias-primas e soluções a 5 % de DGE e DGN.	98
Tabela 5 - Determinação do teor de DGE e DGN por titulação potenciométrica.	98
Tabela 6 - Avaliação estatística da regressão linear na determinação das curvas de calibração para CLAE.	99
Tabela 7 - Resultados obtidos através da precisão de injeção para CLAE.	101
Tabela 8 - Resultados obtidos na avaliação da precisão e recuperação para CLAE.	102
Tabela 9 - Resultados obtidos na titulação do placebo e do solvente para teste de seletividade do método titulométrico.	103
Tabela 10 - Resultados estatísticos obtidos na determinação das curvas de calibração para titulação potenciométrica.	104
Tabela 11 - Resultados obtidos no ensaio de recuperação e precisão para o método titulométrico.	105
Tabela 12 - Avaliação da inspeção visual, centrifugação e pH das amostras A e B em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.	106
Tabela 13 - Resultados obtidos no teste de viscosidade das formulações A e B, em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.	108
Tabela 14 - Resultados obtidos na determinação do FPS <i>in vitro</i> das formulações A e B, em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.	110
Tabela 15 - Determinação do teor de DMAE glicolato por titulação potenciométrica em meio não aquoso nas formulações A e B em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.	1112

Tabela 16 –	Determinação do teor de DMAE glicolato por titulação potenciométrica em meio não aquoso na matéria-prima (DGN), armazenada à temperatura ambiente no período de 90 dias.	114
Tabela 17 -	Resultados estatísticos obtidos no ensaio de biometria para oleosidade.	116
Tabela 18 -	Resultados estatísticos obtidos no ensaio de biometria para pH.	117
Tabela 19 -	Resultados estatísticos obtidos no ensaio de biometria para hidratação.	118

RELAÇÃO DE FÓRMULAS

	Página
Fórmula 1 - Cálculo do FPS <i>in vitro</i> segundo Mansur.	84

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1 - Fórmula geral para determinação do fator de proteção solar <i>in vivo</i> .	34
Quadro 2 - Critério de classificação do FPS segundo ANVISA.	35
Quadro 3 - Derivados do DMAE para uso tópico e sua relação estequiométrica.	45
Quadro 4 - Derivados do DMAE para uso oral e seus fatores de correção.	46
Quadro 5 - Condição de armazenamento para testes de estabilidade de medicamentos semi-sólidos.	51
Quadro 6 - Relação entre efeito eritematogênico e intensidade da radiação em cada comprimento de onda (λ).	85

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO	23
1.1 - Estrutura da pele	25
1.2 - Envelhecimento cutâneo	27
1.3 - Radiação solar e fotoenvelhecimento	30
1.4 - Filtros solares físicos e químicos	32
1.4.1 - Fator de proteção solar	32
1.5 - Rede neuronal da pele	35
1.6 - DMAE	39
1.6.1 - Relação entre DMAE e acetilcolina	41
1.6.2 - Uso tópico do DMAE	44
1.7 - Ácido glicólico	47
1.8 - Estudo da estabilidade de produtos cosméticos	49
1.8.1 - Fatores extrínsecos e intrínsecos	51
1.8.2 - Estabilidade de emulsões	52
1.8.3 - Formulações gel-creme	55
1.9 - Revisão das metodologias analíticas	56
1.10 - Biometria cutânea	59
1.10.1 - Medidas de hidratação cutânea	60
1.10.2 - Determinação do pH cutâneo	62
1.10.3 - Determinação da oleosidade cutânea	63
2- OBJETIVOS	64
2.1 - Objetivo geral	64
2.2 - Objetivos específicos	64
3- MATERIAL E MÉTODOS	65

3.1- Matérias-primas	65
3.2- Reagentes, solventes e outros	66
3.3- Equipamentos	67
3.4- Padrões	67
3.5- Caracterização das matérias-primas	67
3.5.1 - Determinação da faixa de fusão	68
3.5.2- Determinação do índice de refração	68
3.5.3- Espectrofotometria na região do UV	68
3.5.4- Espectrometria na região do infravermelho	69
3.5.5- Determinação do pH	69
3.5.6- Determinação do teor do padrão de DMAE glicolato	69
3.6- Preparo das formulações	70
3.6.1- Formulação A	70
3.6.2- Formulação B	70
3.6.3- Obtenção do DMAE glicolato em laboratório	71
3.7- Análise Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	72
3.7.1 - Preparo da solução-padrão de DMAE glicolato	72
3.7.2- Preparo da amostra para avaliação da precisão e exatidão	72
3.7.3- Condições cromatográficas	73
3.8 - Validação da metodologia analítica por CLAE	74
3.8.1- Seletividade	74
3.8.2- Linearidade	74
3.8.3- Precisão	75
3.8.4- Exatidão	76
3.9- Análise quantitativa do DMAE glicolato através do método de titulação potenciométrica em meio não aquoso	76
3.9.1- Preparo da solução titulante HClO_4 0,1N	77
3.9.2- Fatoração da solução titulante HClO_4 0,1N	77
3.9.3- Preparo das amostras para avaliação da precisão e exatidão	77
3.9.4- Condições analíticas para titulometria em meio não aquoso	78
3.10- Validação da metodologia analítica por titulação potenciométrica em meio não aquoso.	79

3.10.1- Seletividade	79
3.10.2- Linearidade	79
3.10.3- Precisão	80
3.10.4- Exatidão	80
3.11- Estudo da Estabilidade	81
3.11.2- Inspeção visual	81
3.11.3- Centrifugação	82
3.11.4- Determinação do pH	82
3.11.5- Determinação da viscosidade aparente	82
3.11.6- Determinação do FPS <i>in vitro</i> das formulações	83
3.11.6.1- Preparo da solução das amostras	83
3.11.6.2- Análise espectrofotométrica	84
3.11.7 – Determinação do teor de DMAE glicolato nas formulações	85
3.12- Estudo da biometria cutânea	85
3.12.1- Critérios de inclusão e exclusão para seleção de voluntários	86
3.12.2- Padronização de uso da formulação	87
3.12.3- Padronização das medidas de biometria cutânea	87
3.12.4- Determinação do grau de hidratação	88
3.12.5- Determinação do grau de oleosidade	88
3.12.6- Determinação do pH cutâneo	89
3.13- Toxicidade dérmica	90
3.13.1- Toxicidade dérmica primária	91
3.13.2- Toxicidade dérmica cumulativa	91
4- RESULTADOS	93
4.1- Análise das matérias-primas	93
4.1.1- Determinação da faixa de fusão	93
4.1.2- Determinação do índice de refração	93
4.1.3- Espectrofotometria na região do UV	94
4.1.4- Espectrometria na região do Infravermelho	96
4.1.5- Determinação do pH	98

4.1.6- Determinação do teor de DMAE glicolato	98
4.2 - Validação da metodologia analítica – CLAE	99
4.2.1- Curva de calibração	99
4.2.2- Determinação da seletividade	100
4.2.3- Avaliação da precisão de injeção pelo método da repetibilidade	101
4.2.4- Avaliação da precisão e recuperação	102
4.3 - Validação da metodologia analítica – Titulação Potenciométrica em meio não aquoso	103
4.3.1- Avaliação da seletividade	103
4.3.2- Avaliação da linearidade	104
4.3.3- Avaliação da precisão e recuperação	105
4.4 - Avaliação da estabilidade acelerada	105
4.4.1- Avaliação dos parâmetros macroscópicos e pH	105
4.4.2- Avaliação da viscosidade aparente	107
4.4.3- Avaliação do FPS <i>in vitro</i> das formulações	110
4.4.4- Avaliação do teor de DMAE glicolato nas formulações	112
4.4.5- Avaliação do teor de DMAE glicolato matéria-prima	114
4.5- Avaliação da biometria cutânea	115
4.6- Avaliação da toxicidade dérmica	119
5- DISCUSSÃO	120
6- CONCLUSÃO	139
7- REFERÊNCIAS	138
APÊNDICE – Espectros de infravermelho (IV) e ultravioleta (UV) de referência	149

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O Dimetilaminoetanol (DMAE) em associação aos filtros solares e outros ativos têm sido utilizado de forma significativa e crescente nos produtos dermocosméticos disponíveis no mercado, destinados à prevenção e tratamento do envelhecimento cutâneo. Estudos científicos vêm comprovando a eficácia do DMAE em atenuar linhas de expressão e melhorar a aparência da pele.

O desenvolvimento de formulações contendo o DMAE glicolato e filtros solares, assim como o desenvolvimento de metodologias analíticas para quantificação do DMAE, procura atender a uma crescente demanda do mercado cosmético industrial e de farmácias magistrais, que recebem continuamente prescrições contendo esses ativos associados.

Há no mercado diversos sais do DMAE e as pesquisas parecem se referir ao DMAE base livre (DMAE BL) como substância principal, porém as formulações com DMAE BL não são adequadas ao pH da pele, e o simples fato de se corrigir o pH com um ácido pode transformá-lo no seu sal correspondente.

A escolha do DMAE glicolato e da adição de filtros solares a formulação, pretende associar as propriedades dos alfa-hidroxiácidos (uma vez que este sal é derivado do ácido glicólico) e dos fotoprotetores na melhoria dos sinais do envelhecimento cutâneo.

O desenvolvimento de metodologias analíticas para a quantificação do DMAE glicolato, vem preencher uma lacuna nos processos necessários para se assegurar a qualidade e a segurança da matéria-prima e do produto acabado. A validação das metodologias analíticas permitiu o estudo da estabilidade das formulações, assim como da matéria-prima obtida em laboratório (DGN), verificando-se o

comportamento do DMAE glicolato quando associado aos filtros solares em uma mesma formulação, comprovada também pela avaliação do FPS *in vitro*.

A avaliação da biometria cutânea permite avaliar a eficácia *in vivo* da formulação, neste caso segundo os critérios avaliados de hidratação, oleosidade e pH.

Além dos testes de eficácia através da biometria cutânea, é importante a realização dos testes de toxicidade dérmica primária e cumulativa. Estes testes permitem verificar a segurança do produto e a sua adequação para utilização diária como um dermocosmético, de acordo com o guia de segurança para produtos cosméticos (ANVISA.CATEC, 2003a).

1.1 - Estrutura da pele

O envelhecimento cutâneo tem adquirido grande importância nas últimas décadas, despertando muito interesse na classe científica, que procura entender melhor este processo, transformando-o em objeto de estudo.

A pele é um órgão de grande extensão e importância no organismo humano. É responsável por diversas funções, como: proteção física, exercendo função barreira entre o meio externo e interno; regulação térmica; percepção sensorial através da ocorrência de uma vasta rede de estruturas muito especializadas que permitem a sensação de calor, frio, dor e pressão. A pele participa também de diversas funções biológicas como a resposta inflamatória e imune, pigmentação, crescimento piloso, cicatrização e síntese da vitamina D (LANGRAND *et al.*, 2006; HEGEDUS *et al.*, 2006).

Embora ocorra o comprometimento das funções da pele ao longo da idade, seu principal papel como barreira protetora do organismo frente a diversas agressões de agentes externos, raramente falha no decorrer dos anos. Mas, como a pele é responsável também pela aparência externa do indivíduo, o fator envelhecimento o abala sensivelmente, estimulando-o a buscar meios de retardar ou atenuar certas características adquiridas, como: rugas, diminuição de tônus, perda de elasticidade e hidratação (SCOTTI, 2003).

A pele é formada de três camadas, da mais externa para a mais interna respectivamente: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A epiderme possui origem ectodérmica e a derme origem endodérmica. A epiderme divide-se em subcamadas, que em ordem de profundidade, são: a camada córnea (mais superficial), a camada lúcida, a camada granulosa, a camada espinhosa e o estrato

germinativo ou basal, que é a camada mais profunda da epiderme. A camada córnea é a mais fina e superficial, sendo composta de células mortas e queratinócitos, os quais são transformados em queratina de superfície. Este processo de renovação celular ocorre por toda a vida, porém seu decaimento é um dos principais fatores de manifestação do envelhecimento cutâneo, que pode ser percebido através do afinamento da pele. A camada córnea é hidratada por um filme líquido chamado de manto hidrolipídico, formado por água, sais minerais, enzimas, vitaminas e gorduras (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990; FREEDBERG *et al.*, 2003).

A camada ou estrato lúcido apresenta-se delgada, contendo células achatadas, com citoplasma repleto de filamentos. A camada granulosa é formada por células secretoras de substância fosfolipídica e glicosaminoglicanos que vedam a passagem de água e outras substâncias entre elas. As células da camada ou estrato espinhoso possuem expansões citoplasmáticas que mantêm as células unidas pelos desmossomos, estruturas responsáveis pela coesão entre as células. O estrato germinativo ou camada basal é uma estrutura vascularizada que apresenta intensa atividade mitótica, responsável pela renovação e nutrição da epiderme e demais camadas, sendo formada basicamente por colágeno tipo IV e proteoglicanos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990; ROBERT, 1994).

Abaixo da epiderme, encontra-se a derme, constituída por um tecido conjuntivo denso composto de células como fibroblastos, granulócitos e macrófagos e macromoléculas sintetizadas pelos fibroblastos que formam a matriz extracelular (MEC), formada por colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e glicoproteínas de estrutura, que tem a função de se comunicar com as células controlando suas atividades metabólicas. Ela é formada por duas camadas pouco distintas: a derme papilar e a derme reticular (mais profunda). Ambas contêm muitas fibras elásticas,

vasos sanguíneos e linfáticos além de nervos. Nesta camada encontram-se os pêlos, as glândulas sebáceas e sudoríparas, as unhas e diversas terminações nervosas (ROBERT, 1994).

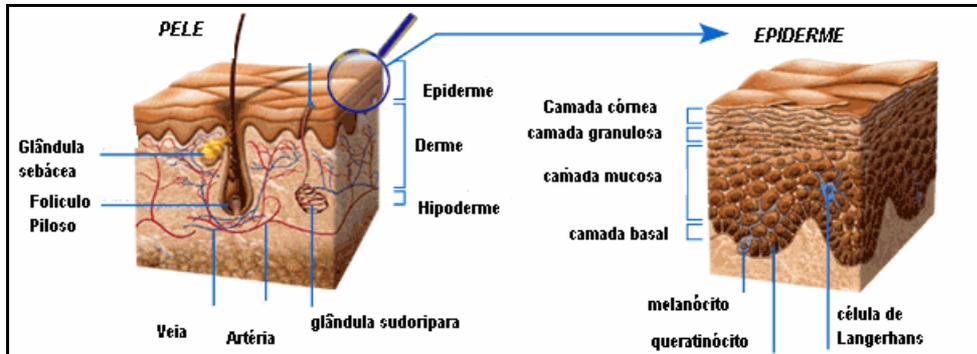


Figura 1 - Camadas da pele e estrutura da epiderme.
 Fonte: www.bioderma.fr/conceils/informations.asp

A ligação entre a derme reticular e a hipoderme é uma transição abrupta entre um tecido dérmico conectivo e fibroso para um tecido predominantemente adiposo. De todo modo, ambas as regiões são funcional e estruturalmente bem integradas através de terminações nervosas e vasculares, que compõe a continuidade dos apêndices epidérmicos. De origem mesenquimal, os adipócitos são as células primárias da hipoderme. Organizam-se em glóbulos definidos por septos de tecido conectivo fibroso. A hipoderme exerce função de isolamento, reserva energética e proteção. Permite ainda a mobilidade das estruturas adjacentes (FREEDBERG *et al.*, 2003).

1.2 - Envelhecimento cutâneo

Durante sua vida o indivíduo sofre diversas agressões por agentes físicos químicos ou biológicos, que podem levar ao aparecimento de patologias ou alterar o processo de envelhecimento. Os tecidos gradualmente passam por mudanças de acordo com a idade, sendo que, na pele, essas alterações são mais facilmente reconhecidas. Atrofia, enrugamento e lassidão representam os sinais mais aparentes de uma pele senil (ORÍÁ *et al.*, 2003).

O envelhecimento intrínseco da pele (Figura 2) é observado na epiderme como um reflexo das modificações que ocorrem também no tecido conjuntivo da derme, que atua como um alicerce natural para a epiderme. Nesta, nota-se a diminuição das células de Langherans e monócitos, diminuição da síntese de melanossomas e menor pigmentação. Na derme, observa-se a diminuição do colágeno, fibras elásticas, macrófagos e dilatação dos canais linfáticos. As mudanças fisiológicas observadas são a diminuição do número de queratinócitos e fibroblastos e redução da vascularização, principalmente próximo aos folículos pilosos e glândulas (RAMOS e SILVA *et al.*, 2001; ORÍÁ *et al.*, 2003).

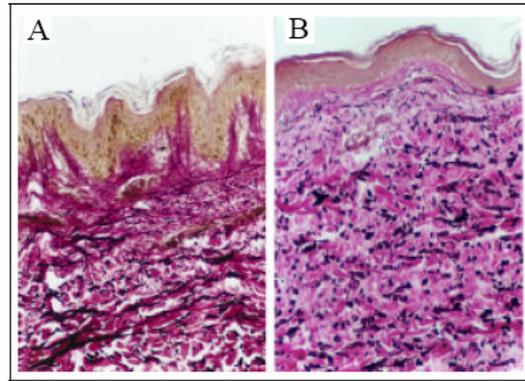


Figura 2 - Diferenciação histológica de pele jovem e envelhecida intrinsecamente. Espécimes de pele dos grupos jovem (A) e idoso (B) corados pelo tricrômio de Van Gieson-elastina, visto por microscopia ótica (x200 de aumento), em que as fibras elásticas são observadas em preto. Observa-se a clara fragmentação das fibras elásticas ao longo da derme com o envelhecimento. Na derme superficial, o aparelho elástico perdeu quase completamente sua disposição vertical na pele senil (adaptado de Oriá *et al.*, 2003).

Com o passar dos anos e principalmente após os 30 anos de idade, surgem rugas, manchas de hiperpigmentação, redução na espessura da pele e dificuldade de cicatrização (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

O envelhecimento cutâneo devido a fatores externos e principalmente influenciado pela radiação solar é conhecido como envelhecimento extrínseco ou actínico. A exposição solar excessiva pode causar diversos danos ao organismo, dentre eles, imunossupressão local e sistêmica, fotoenvelhecimento precoce e, como principal fonte de preocupação, o aparecimento de fotocarcinogênese (FISHER, *et al.*, 2005).

O fotoenvelhecimento da pele é um processo complexo que se caracteriza pela perda do tônus cutâneo, aumento da desidratação e ressecamento, elastose actínica, pigmentação irregular e aparecimento de rugas mais profundas. Este fenótipo é causado por alterações nas funções celulares e deterioração da matriz extracelular dos tecidos conectivos, levando a uma desorganização das proteínas

estruturais primárias como elastina e colágeno (FISHER, *et al.*, 2005; RABE, *et al.*, 2006).

Bioquimicamente a pele fotodanificada apresenta modificações quantitativas e qualitativas nas proteínas da matriz dérmica extracelular, entre elas colágeno, glicosaminoglicanos e elastina, como pode ser visto na Figura 2 (ORIÁ *et al.*, 2003).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de enzimas capazes de degradar a maior parte dos componentes conectivos e proteínas da matriz dérmica. Estudos demonstraram uma relação dose-dependente entre as MMPs e a radiação UVA e UVB (WLASCHEKA, *et al.*, 2003; FISHER, *et al.*, 2005).

1.3 - Radiação solar e fotoenvelhecimento

Os raios ultravioletas dividem-se em UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (200-290 nm). A radiação solar abaixo de 290 nm praticamente não atinge a superfície terrestre, sendo absorvida pela camada estratosférica de ozônio (JAHAN, 1990).

A radiação UV é responsável por 90% dos danos causados a pele e assim como os raios infravermelhos (IV) os quais penetram mais profundamente na pele (Figura 3), afetando em conjunto a renovação celular, diminuindo a elasticidade da pele devido ao aumento das MMPs elastase e colagenase (GASPARRO *et al.*, 1998). A radiação UVB (em torno de 300nm) é suficientemente energética para penetrar no estrato córneo e epiderme causando queimaduras severas ou eritemas. A radiação UVA em torno de 350 nm alcança a derme estimulando a formação de melanina a qual protege a pele de queimaduras imediatas. No entanto, embora os raios UVA possuam menor energia que os raios UVB, os raios UVA penetram na

derme causando também elastose, isto é, a perda das estruturas de suporte natural e elasticidade da pele (SHAAT, 1990).

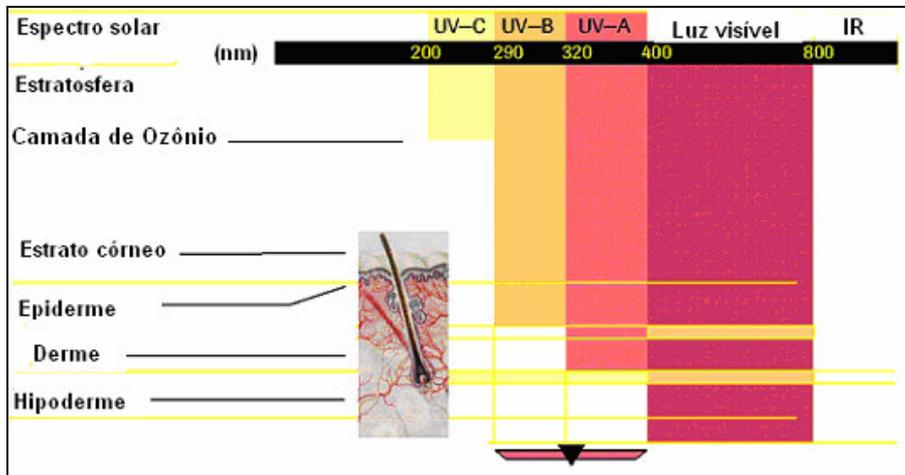


Figura 3 - Penetração da radiação solar nas camadas da pele.

Sabe-se que as radiações UVA e UVB estimulam a formação de peróxidos citotóxicos (radicais livres) que estão intimamente relacionados ao fotoenvelhecimento cutâneo. Para exercer seus efeitos nas células, a energia eletromagnética inerente à radiação UV, deve ser absorvida pelos cromóforos celulares existentes, tais como DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos. Estes cromóforos, quando excitados, podem reagir com o oxigênio molecular, resultando em espécies reativas de oxigênio (ROS) (LONGSTRETH *et al.*, 1998; GILCHREST *et al.*, 2000; FISHER *et al.*, 2005).

Podemos classificar as ROS em duas categorias distintas: radicais livres, representados por radicais superóxido e hidroxil; e compostos não radicais, como por exemplo oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio. Os radicais livres são necessários à vida, pois participam e promovem uma série de reações necessárias à

manutenção do organismo. Deve-se ter em mente porém, a necessidade de um equilíbrio orgânico, evitando-se a produção excessiva destas espécies, frente às defesas naturais antioxidantes existentes no organismo (CADENAS *et al.*, 2000; GILCHREST *et al.*, 2000; FISHER, *et al.*, 2005).

1.4 - Filtros solares físicos e químicos

A utilização diária de fotoprotetores tornou-se imperativa nos dias atuais na prevenção dos danos causados à pele. Diversos fatores ambientais contribuem para o aumento da exposição aos efeitos nocivos da radiação UV. O Brasil é o país com a maior área intertropical do planeta, cujo ângulo de incidência da radiação solar é mais perpendicular, intensificando assim os seus efeitos.

Os fotoprotetores devem ser capazes de absorver ou refletir a radiação incidente protegendo o indivíduo dos danos que podem ser causados pela radiação (SANTOS *et al.*, 1999; NOHYNEK *et al.*, 2000).

Atualmente podemos encontrar dois tipos de filtro solar. Os chamados filtros físicos os quais formam uma barreira física na pele e agem refletindo a radiação (óxido de zinco e dióxido de titânio), e os filtros químicos, que constituem substâncias capazes de absorver a radiação solar (energia eletromagnética) na forma UV e emitir a radiação transformada em outro tipo de energia (SHAATH, 1997). Dentre os filtros químicos destacam-se atualmente os chamados filtros naturais, que são, em sua maioria, substâncias isoladas de espécies botânicas que promovem ou contribuem para o aumento da eficácia fotoprotetora das formulações (GARCIA, 1996; da SILVA *et al.*, 2005).

A eficácia dos filtros solares é proporcional à sua concentração e dependente da capacidade de absorção da energia radiante. Quanto mais amplo o espectro de

associação de filtros solares e quanto mais sinérgica for a mistura, maior será o espectro de proteção solar, aumentando sobremaneira a eficácia da formulação (DE PAOLA e RIBEIRO, 1998; SANTOS *et al.*, 2001).

Formulações antisolares eficazes devem também ser estáveis na pele, não devem provocar irritação ou sensibilização e não devem apresentar fototoxicidade. É necessário observar a aceitação cosmética da formulação, que deve levar em conta a relação entre a concentração dos filtros solares e o fator de proteção solar (FPS) desejado, ter boa espalhabilidade e cobertura na superfície cutânea, mas não deve permitir a penetração dos filtros na pele ou mucosas (NOHYNEK *et al.*, 2000).

1.4.1 - Fator de Proteção Solar

A determinação do fator de proteção solar (FPS) é uma técnica de comprovação de eficácia do fotoprotetor para a porção UVB do espectro eletromagnético. Diversos estudos e esforços vêm sendo realizados no sentido de se padronizar uma metodologia de determinação do FPS quanto à radiação UVA, porém ainda não se alcançou um consenso nesta questão. No entanto, é muito importante que as formulações fotoprotetoras alcancem ambos os espectros, UVA e UVB, da radiação solar (MURPHY, 2002).

A determinação do FPS no Brasil é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), atualmente de acordo com a resolução 237 de 2002, que preconiza a realização deste teste de acordo com a metodologia do FDA (Federal Register, norma FDA, may, 2003). O ensaio preconiza a utilização de uma formulação padrão contendo 8% de salicilato de homomentila (FPS 4,47); ou de acordo com a norma COLIPA (ref. 94/289, october 1994), uma formulação padrão

contendo 2,7% de metoxicinamato de octila (FPS $3,7 \pm 0,3$) (JANOUSEK,1990; ANVISA, 2002).

A determinação do FPS *in vivo* é realizada utilizando-se 20 voluntários sadios de ambos os sexos, com sensibilidade média a radiação UV. Prepara-se uma parte das costas de cada indivíduo (30 cm^2), de modo que em uma parte é aplicada a formulação em teste e a outra é o controle. Irradia-se com lâmpada UV (300 w), vinte minutos após a aplicação da formulação. O tempo para formação do eritema é observado e determina-se o FPS de acordo com a razão entre o tempo necessário de exposição à radiação UV para produzir eritema na pele protegida e o tempo de ocorrência do eritema na pele desprotegida (Quadro 1) (ANVISA, 2002).

Quadro 1 - Fórmula geral para determinação do fator de proteção solar *in vivo* (adaptado de Anvisa, 2002).

$$\text{FPS} = \frac{\text{DME na pele protegida}}{\text{DME na pele desprotegida}}$$

DME: Dose mínima de radiação capaz de produzir eritema mínimo.

Embora a metodologia de determinação *in vivo* seja a mais adequada e oficialmente utilizada na maioria dos países, ela é uma metodologia bastante dispendiosa e apresenta questões éticas por se tratar de testes com seres humanos. A metodologia de determinação do FPS *in vitro* (MANSUR *et al.*, 1986) apresenta como vantagem o fato da não utilização de voluntários humanos, além de ser um método adequado para análises rotineiras no desenvolvimento galênico de formulações e de controle de qualidade. É um método rápido e que apresenta boa

correlação com a determinação do FPS *in vivo* (GARCIA *et al.*, 1990; SANTOS *et al.*, 1999; BARTH, 2000).

No método *in vitro* utiliza-se a espectrofotometria na região do UV, medindo-se a absorvância de uma solução da formulação nos comprimentos de onda da região do UVB 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320 nm (MANSUR, *et al.*, 1986).

As formulações fotoprotetoras são classificadas segundo a ANVISA, de acordo com o FPS apresentado no Quadro 2. As formulações comercializadas devem ser rotuladas de acordo com esta orientação.

Quadro 2 - Critério de classificação do FPS segundo ANVISA, 2002.

FPS	Classificação
$\geq 2 < 6$	Baixo
$\geq 6 < 12$	Moderado
$\geq 12 < 20$	Alta
≥ 20	Muito alta

1.5 - Rede neuronal da pele

Na pele, o sistema nervoso constitui uma complexa rede de estruturas bastante especializadas envolvendo receptores mecânicos, térmicos, químicos e terminações nervosas livres. A inervação motora na pele, é realizada pelo sistema autócrino. As fibras adrenérgicas inervam os vasos sanguíneos (vasoconstricção periférica), músculo eretor do pêlo e glândulas apócrinas. As fibras autonômicas colinérgicas exercem controle sobre as glândulas écrinas (regulação do suor). As

glândulas sebáceas são reguladas pelo sistema endócrino e não são inervadas por fibras autônomas (HABIF, 2003).

A acetilcolina (ACH) é um exemplo de neurotransmissor que teve sua ocorrência extra-neuronal reconhecida recentemente em uma ampla variedade de células. Sabe-se que o sistema colinérgico não neuronal na pele está envolvido em uma série de funções básicas como diferenciação de queratinócitos, formação da barreira epidérmica, circulação sanguínea, angiogênese e uma variedade de reações imunes. Portanto, recentes pesquisas investigam os mecanismos de ação envolvidos neste complexo sistema, que pode ser a chave para o tratamento de diversas patologias dermatológicas como acne vulgar, vitiligo, pênfigo vulgar, dermatite atópica e psoríase (KUNZEN, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que muitas terminações nervosas livres ou conectadas, situam-se muito superficialmente na junção dermo-epidérmica ou na epiderme (LAGRAND *et al.*, 2006). Receptores nicotínicos de ACH são expressos em células neuronais e não neuronais como, por exemplo, células endoteliais, células do epitélio brônquico e queratinócitos da pele (WANG *et al.*, 2005). Em 2003, Nguyen e colaboradores investigaram o mecanismo do controle da mediação colinérgica na adesão celular de queratinócitos humanos, mediada por ACH não neuronal produzida nos próprios queratinócitos. Os resultados demonstraram que os receptores colinérgicos presentes nos queratinócitos regulam a adesão de seus desmossomos.

Ndove e colaboradores (1998) realizaram mapeamento dos subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (m1, m4 e m5), presentes nos queratinócitos humanos e em cultura de células. Os resultados demonstraram a presença dos

receptores nos queratinócitos humanos e principalmente nos sítios de contato entre células.

Pfeifer (1959) verificou que o DMAE tartarato administrado oralmente a humanos na dose de 20 mg/dia (0,084 mmol), produziu leve estimulação mental, aumento gradual no tônus muscular e talvez um aumento da frequência da convulsão em indivíduos suscetíveis. Doses maiores produziram insônia, tensão muscular e tremores espontâneos (PFEIFFER, 1959 apud MASTEN, 2002). Outro estudo relatando o aumento da tensão muscular com o uso de DMAE foi citado por Danysz e colaboradores em 1967. Acredita-se que devido ao relato e a observação clínica do aumento na tensão muscular nos indivíduos tratados começou-se a investigar o uso cosmético do DMAE no aumento do tônus facial e suas propriedades anti-envelhecimento da pele.

O aumento do tônus muscular desejado, ou efeito 'lifting', poderia ser então alcançado de acordo com o estímulo a contração e modulação dos músculos lisos ou aumentando-se a contratilidade e adesão de outras células dérmicas e epidérmicas. Conforme já demonstrado anteriormente (NDOYE *et al.*, 1998; NGUYEN *et al.*, 2003; KUNZEN, 2004; WANG *et al.*, 2005; LAGRANDE *et al.*, 2006), de fato os receptores colinérgicos de superfície das células epidérmicas, modulam uma ampla variedade de atividades celulares, como proliferação, migração, adesão, diferenciação e viabilidade. Os melanócitos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos possuem receptores ou enzimas das classes muscarínicas e nicotínicas, que poderiam formar uma rede de transdução de sinal, utilizando a ACH como citotransmissor comum a diferentes tipos de células (KLAPPROTH *et al.*, 1997).

Segundo a literatura, o interesse cosmético sobre o DMAE teve seu início por volta de 1996, quando Nicholas Perricone, dermatologista americano patenteou e divulgou um cosmético antiidade, promotor do aumento do tônus cutâneo, contendo DMAE (3 a 5 %), éster de vitamina C (ascorbil palmitato) e outras vitaminas e minerais.

Em 2002, pesquisadores da Johnson & Johnson (EUA e França) em parceria com a universidade de Liège na Bélgica, publicaram um trabalho sobre os efeitos tensores de uma formulação em gel contendo DMAE. Comparou-se grupo controle (utilização de um placebo) e outro grupo utilizando formulação contendo 3 % de DMAE. Os resultados foram acessados segundo medidas de distensão da pele dos voluntários através de um equipamento de biometria cutânea Reviscometer® responsável pela medida de RRT (*ressonance runing time*) de ondas cisalhantes aplicadas à superfície da pele. Os valores medidos em RRT são inversamente proporcionais a velocidade de propagação da onda cisalhante emitida pelo equipamento, na superfície e no interior da pele e dizem respeito à tensão intrínseca e a densidade da pele. À medida que a pele envelhece, ocorre degradação de elastina e colágeno presentes na matriz dérmica. Com a degradação das estruturas da matriz, ocorre um decaimento na sua densidade e na velocidade de transmissão do estímulo aplicado. A lassidão da pele é, portanto, caracterizada por altos valores de RRT e o aumento na firmeza da pele, por valores menores de RRT (PIÉRARD *et al.*, 2002). Verificou-se neste estudo que a formulação gel contendo DMAE a 3%, diminuiu os valores de RRT, aumentando assim a firmeza da pele, enquanto o placebo estudado não apresentou nenhum efeito significativo nas medidas de RRT (UHODA, *et al.*, 2002; PIÉRARD *et al.*, 2002).

Uhoda e colaboradores (2002) desenvolveram um estudo utilizando outros parâmetros de biometria cutânea, além da utilização do reviscometer[®]. Utilizou-se um gel contendo DMAE a 3% e um placebo para o grupo controle. Na primeira fase dos estudos o gel foi aplicado em apenas uma bochecha de mulheres com idade entre 26 a 53 anos. As medidas foram realizadas 10 minutos após a aplicação, utilizando-se o equipamento cutometer[®] capaz de medir a distensão ou tração da pele.

1.6 - DMAE

O DMAE (dimetilaminoetanol) (CAS: 108-01-0), é uma molécula natural, classificada como aminoálcool, de peso molecular (PM) 89,1 e fórmula molecular $C_4H_{11}NO$ e pode ser encontrado em pequenas quantidades em alguns peixes e ovas de salmão (HONEGGER e HONEGGER, 1959; apud ZHANISER, 1978; ISHIBASHI, 1984 apud MASTEN, 2002). É uma molécula pequena, de baixo ponto de ebulição $134^\circ C$, e que se apresenta na forma de base livre, como um líquido incolor com forte odor característico das aminas e pH por volta de 11. Recomenda-se cuidado ao manipulá-lo, pois ocorre liberação de vapor irritante e corrosivo para os olhos, mucosas e para a pele. Recomenda-se evitar contato com ácidos e substâncias oxidantes (LANG, 2003; HSDB, 2006).

DMAE é sintetizado de quantidades equimolares de óxido de etileno e dimetilamina. O grupo amina do DMAE forma sais pela reação com ácidos minerais e carboxílicos. O grupo hidroxila dá origem aos ésteres através de reação com ácidos carboxílicos. O DMAE bitartarato é formado a partir da reação do DMAE e ácido tartárico (MASTEN, 2002).

Na indústria química o DMAE é utilizado como intermediário para síntese de antihistamínicos e anestésicos, como catalisador de enzimas epóxi e poliuretanos e como controlador de pH para inibição de processos corrosivos (ZEIGER, 1997).

Desde a década de 70, o DMAE tem sido utilizado no tratamento de diversas desordens do sistema nervoso central, ligadas a uma hipofunção de neurônios colinérgicos, como por exemplo: déficit de aprendizado e hiperatividade em crianças (STENBÄCK *et al.*, 1988); discinesia tardia ou induzida por Levodopa (DE SILVA, 1977); fadiga crônica e neurastenia (American Hospital Formulary Service, 1984; citado por HSDB, 1996). Gosseline colaboradores (1976) relataram a principal contra-indicação de uso do DMAE para o *grand mal* epilético e que doses maiores que 1200 mg/dia (13,46 mmol/dia) não produziram sérios efeitos colaterais (ZEIGER, 1997).

Segundo o Physician's Desk Reference (PDR), o DMAE está em desuso como medicamento e pode ser encontrado atualmente no mercado americano, apenas como suplemento nutricional, utilizado como um estimulante e facilitador das funções cognitivas, o qual apresenta efeito mais prolongado e menores efeitos colaterais. Nos mercados europeu, japonês, mexicano e australiano, pode ser encontrado sob a forma do sal cloridrato de clorfenoxiacetato, ou meclofenoxato, utilizado como estimulante da cognição em idosos (LANG, 2003; PDR, 2006).

Os sais derivados do DMAE para uso interno são encontrados na forma de pó para fabricação de comprimidos e cápsulas, tanto como monodroga quanto em associação a outros compostos. Dentre estes sais, destacam-se os encontrados como referência na literatura: aceglutamato (Cleregil[®], Risatarum[®]); bitartarato (Liparon[®]); hemisuccinato (Tonibral[®], Rishiaril[®]) e p-acetamidobenzoato (Deaner[®]).

O medicamento Deaner (Laboratório Riker - USA) foi prescrito nos Estados Unidos por mais de 20 anos para tratamento de déficit de aprendizado em crianças, tendo sido retirado do mercado em 1983 (MERCK INDEX, 2001; MASTEN, 2002).

A agência americana Food and Drug Administration (FDA) preconiza como dose terapêutica máxima recomendada (MRTD) 15,0 mg/Kg de peso corporal/dia de DMAE. Não foi encontrado registro de medicamento ou suplemento nutricional contendo DMAE no Brasil, porém é comum que farmácias com manipulação aviem fórmulas prescritas por médicos de diversas especialidades clínicas.

1.6.1- Relação entre DMAE e acetilcolina

A utilização clínica do DMAE sempre esteve relacionada a sua função como substância precursora da ACH. Diversos estudos relacionam DMAE e ACH. Verificou-se que o DMAE supre o cérebro de colina (COL), que é posteriormente acetilada pela acetiltransferase para formar ACH (DE SILVA, 1977). Ambas as moléculas apresentam uma grande semelhança estrutural como pode ser observado na figura 4.

A colina, recentemente classificada como um nutriente humano essencial, têm um papel crítico na integridade estrutural das membranas celulares como um precursor da biosíntese de fosfolípeos, fosfatidilcolina e esfingomielina. Sabe-se que estes dois últimos são precursores de mensageiros intracelulares diacilglicerol e ceramida. Alguns metabólitos como fator de ativação plaquetário (PAF) e esfingofosforilcolina, também participam de processos de sinalização celular. Portanto, perturbações no metabolismo da COL, irão afetar uma gama de funções e

estruturas celulares (Oregon State University, 2000; Hendler e Rorvik, 2001a apud MASTEN, 2002).

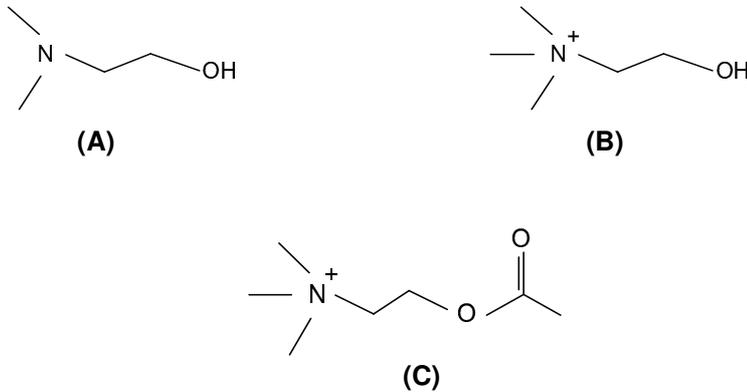


Figura 4 - Fórmulas estruturais do DMAE (A), colina (B) e acetilcolina (C).

Haubrich e colaboradores (1975) desenvolveram um estudo acerca da indução da ACH no cérebro de ratos pelo cloreto de COL e por Deaner[®]. Após a administração de DMAE acetoamidobenzoato (Deaner[®]) ou cloreto de COL verificou-se um aumento da concentração de COL e ACH no cérebro dos ratos (corpo estriado), indicando que a síntese cerebral da ACH pode ser estimulada *in vivo* pelo aumento da concentração tecidual dos precursores COL e DMAE (Deaner[®]) (HAUBRICH *et al.*, 1975).

Em outro estudo realizado por Haubrich e Gerber (1981), investigou-se o mecanismo de inibição da COL-desidrogenase, enzima responsável pela rápida metabolização da COL, impondo a esta um curto limite de ação. Verificou-se neste estudo a atuação do DMAE como um inibidor da COL-desidrogenase *in vitro*, tendo causado um aumento na concentração da COL no fígado e rins de ratos tratados.

Em 1999 um estudo randomizado acerca de protocolos experimentais utilizados no tratamento de discinesia tardia foi realizado por Soares e Mc Grath. A meta-análise demonstrou que o tratamento com DMAE não foi mais efetivo que o controle realizado com placebo (SOARES *et al.*, 1999).

Russel e Jender (1981) realizaram experimento para investigação dos efeitos comportamentais de duas substâncias com efeito oposto no sistema de transmissão colinérgica. Investigou-se o Deanol[®] ou DMAE como precursor colinérgico, atuando no aumento da transmissão colinérgica e a 3-hemicolina (HC-3) e sua ação oposta ao DMAE, atuando na diminuição da síntese de ACH no cérebro de ratos utilizados como cobaias. Alguns dos efeitos comportamentais estudados foram: reatividade ao estímulo visual e tátil; resistência à captura e manuseio; tensão muscular e reação de defesa ao choque induzido. O estudo demonstrou que o DMAE administrado sozinho, não apresentou efeito significativo no comportamento dos animais e apresentou um efeito dose-dependente na supressão da HC-3. O estudo foi consistente na conclusão geral de que uma diminuição da atividade colinérgica está associada com uma hipereatividade e que um aumento da atividade colinérgica está relacionado a hiporeatividade. O estudo indicou ainda que os efeitos comportamentais do Deanol[®] são dependentes do estado do sistema colinérgico, agindo em conjunto com a HC-3, mas não sozinho.

1.6.2 - Uso tópico do DMAE

O DMAE e seus derivados vêm sendo mundialmente utilizados em preparações tópicas e até orais para uso cosmético, como substância capaz de prevenir e amenizar os efeitos causados pelo envelhecimento cutâneo. Diversas patentes descrevem sua utilização utilizando diferentes indicações cosméticas (HIKIMA, 1998; PERRICONE, 1997; TAJIMA *et al.*, 2002).

O DMAE orotato (CAS RN 1446-6-6) foi mencionado em uma patente europeia (ISMAIL, 1985 apud MATEN, 2002), presente em formulação oral associada a vitamina E e vasodilatadores para manutenção e suporte de colágeno da pele.

O DMAE foi indexado no *Chemical Abstract Plus database* (CAPLUS) para uma patente mundial como uma composição com propriedades de penetração transdérmica rápida para ativos farmacêuticos (KIRBY e PETERSSON, 2000). Verificou-se também o registro de formulação contendo alcanolaminas para o tratamento de manchas na pele, utilizando DMAE na concentração de 1 a 10% preferencialmente (c), tendo sido indexado na Europa e Japão como componente de formulações cosméticas utilizadas no tratamento de cabelos tingidos (TAJIMA *et al.*, 2002). O DMAE cloridrato (CAS 2498-25-1) foi encontrado em uma patente japonesa de um cosmético com propriedades antiidade (HIKIMA, 1998).

Há no mercado brasileiro diversos derivados do DMAE disponíveis comercialmente para o uso tópico. A maioria deles é composta por ésteres e sais e encontram-se na forma líquida, descritos no Quadro 3 (CONSULCOM, 2002). A maioria destes derivados é formada após adição estequiométrica do respectivo ácido

ao DMAE, sob resfriamento, já que estas reações de neutralização são bastante exotérmicas.

Para este trabalho a escolha do derivado de DMAE a ser utilizado deveria considerar diversos fatores, como existência de literatura científica disponível, dados toxicológicos, fator de correção a ser utilizado, considerando a relação entre o PM do derivado e o PM do DMAE BL, compatibilidade entre os componentes da formulação e a relação custo benefício. Outro fator a ser considerado seria a possibilidade de benefícios cutâneos que o ácido gerador do derivado de DMAE traria à formulação, uma vez que dependendo do pH final, ele pode estar mais ou menos disponível na formulação.

Os trabalhos já publicados sobre o uso tópico do DMAE (COLE *et al.*, 2002; GROSSMAN *et al.*, 2002; UHODA *et al.*, 2002), não deixam claro a utilização do DMAE BL ou de qualquer outro derivado, citando apenas o DMAE como ativo. No entanto, o uso da base livre por si só, não seria recomendado para uma formulação cosmética, já que o odor desagradável característico das aminas prevalece no pH do DMAE BL não neutralizado (em torno de 11), pH este que não é recomendado para a pele da face. O PM do DMAE glicolato é 164.

Quadro 3 - Derivados do DMAE para uso tópico e sua relação estequiométrica (CONSULCOM, 2002).

<i>Ácido</i>	<i>PM</i>	<i>Relação DMAE/ ácido</i>	<i>Derivado</i>
Benzóico	122,12	1,37	DMAE Benzoato
Cítrico anidro	192,13	2,15	DMAE citrato
tartárico	150,09	0,59	DMAE Tartarato
Lático	90,08	1,01	DMAE Lactato
Glicólico	76,05	1,17	DMAE Glicolato

Há também a possibilidade da utilização dos derivados de DMAE indicados para uso oral (geralmente na forma de pó), para a utilização em formulações cosméticas. Estes sais são utilizados por farmácias com manipulação. O principal inconveniente farmacotécnico, além da ausência de referências científicas, seria a necessidade da utilização do fator de correção derivado/DMAE BL. Como estes fatores são geralmente muito altos, maiores que 2,5, a grande quantidade do pó a ser utilizado, dificultaria uma boa apresentação e aceitação cosmética da formulação, conforme pode ser verificado no Quadro 4.

Quadro 4 - Derivados do DMAE para uso oral e sua relação estequiométrica (CONSULCOM, 2002; MASTEN, 2002)

<i>Derivado</i>	<i>PM</i>	<i>Fator de correção</i>
DMAE BL	89,14	-
DMAE acetoamidobenzoato	268,31	3,01
DMAE bitartarato	239,23	2,68
DMAE orotato	245,24	2,75

O DMAE aceglutamato está contido na lista de substâncias não permitidas para uso cosmético, segundo a norma mercosul GMC n° 29/05 que delibera sobre a permissão de substâncias para uso cosmético (Lista de substancias... MERCOSUR, 2005).

A fim de elucidar estas questões e obter parâmetros acerca da estabilidade e eficácia das formulações propostas, determinou-se neste estudo a utilização do DMAE glicolato, baseado na adequada relação estequiométrica entre o ácido glicólico e o DMAE, e já que se pretende associar à formulação as propriedades querato-reguladoras deste alfa-hidroxiácido.

Neste trabalho, avaliaremos o perfil de estabilidade de uma formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato fabricado industrialmente (DGE), gentilmente cedido pela empresa Embrafarma e de uma formulação contendo DMAE glicolato neutralizado em laboratório (DGN).

1.7- Ácido glicólico

Os alfa-hidroxiácidos (AHAs) são uma classe de substâncias derivadas geralmente de frutas. Um dos principais é o ácido glicólico, que é derivado da cana de açúcar.

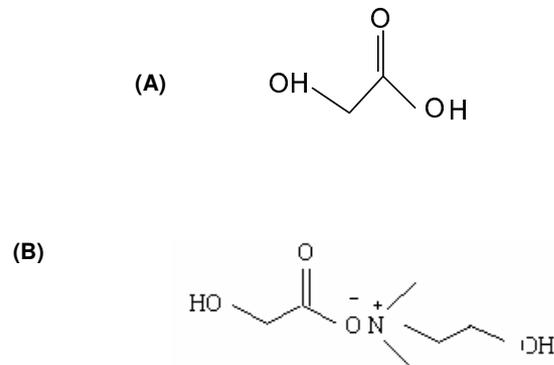


Figura 5 - Fórmulas estruturais do ácido glicólico (A) e DMAE glicolato (B).

O ácido glicólico (AG) é composto por um grupo hidroxil e um grupo carboxílico, ambos os oxigênios carboxílicos estão no mesmo plano. Outros exemplos de AHAs são o ácido málico (de maçãs), tartárico (de uvas), cítrico (de frutas cítricas) e láctico (leite). Os efeitos do ácido glicólico nos corneócitos podem ser demonstrados pela melhora de diversas lesões epidérmicas incluindo ictioses, acne, queratoses seborréicas e queratínicas (ROENIGK, 1997).

O ácido glicólico encontrado comercialmente está na forma de uma solução a 70% (Catálogo do fornecedor Embrafarma, 2004). De acordo com o parecer técnico nº 7 de 28 de setembro de 2001, da câmara Técnica de Cosméticos da ANVISA (CATEC), a concentração dos AHAs em produtos cosméticos deve ser de até 10% e o pH final das formulações maior ou igual a 3,5 para aplicação cosmética (ANVISA.CATEC, 2001).

O uso dos AHAs no tratamento de problemas dermatológicos relacionados a queratinização tem sido bastante estudado e difundido, porém seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Acredita-se que esteja relacionado com mudanças nas ligações iônicas do estrato córneo (EC) (TSAI e HSU, 1999) e provavelmente com a ativação de fibroblastos (MOY *et al.*, 1996).

As células epidérmicas estão interligadas por ligações desmossômicas, e o pH induzido na camada mais externa do estrato córneo pode dissolver estes acoplamentos, resultando na regeneração celular (HARWARD, 1996; SCOTTI, 2002).

DiNardo e colaboradores (1996) desenvolveram um estudo acerca dos efeitos clínicos e histológicos relacionados ao uso do ácido glicólico em diferentes concentrações e níveis de pH. Os resultados demonstraram que todos os níveis de pH (3,25; 3,80 e 4,40) e concentrações estudadas (3,25; 6,50; 9,75 e 13,0%) de AG, apresentaram resultados clínicos satisfatórios. Observou-se que a pele xerótica e ictiônica apresentaram evidências histológicas de afinamento do EC, espessamento da epiderme viável e aumentos significantes no conteúdo de colágeno e glicosaminoglicanos. Outros estudos comprovaram o aumento na densidade epidérmica através do tratamento com AG, provavelmente devido ao aumento da síntese de colágeno, elastina, mucopolissacarídeos e glicosaminoglicanos da derme, estimulando a renovação celular, minimizando principalmente os danos da pele fotoenvelhecida (GARCIA,C.R.C. 1996; GILCHREST,1996; HOOD *et al.*, 1999; INAN *et al.*, 2006). O AG também demonstrou acelerar a síntese de colágeno através dos fibroblastos, mas também modular a degradação da matriz através dos queratinócitos, via citocinas. Concluiu-se que o AG contribuiu para a regeneração da pele fotodanificada através de diversos mecanismos celulares (OKANO *et al.*, 2003).

Dependendo da concentração de AHA utilizado, pode-se verificar resultados diferentes. Um estudo realizado com ratos albinos após a utilização de soluções aquosas contendo 8%, 50% e 70% de AG respectivamente, demonstrou que em concentrações mais baixas, apenas a epiderme foi afetada e espera-se um resultado adequado para o tratamento de rugas. Em concentrações mais altas, considerou-se um estímulo dos fibroblastos da derme, resultando em um aumento da síntese de colágeno. Os efeitos nocivos provocados por altas concentrações de uso não devem ser ignorados e o tempo apropriado de tratamento, deve ser sempre acompanhado por um clínico responsável (INAN *et al.*, 2006).

1.8 - Estudo da Estabilidade de produtos cosméticos

O estudo da estabilidade das formulações fornece informações sobre o grau de estabilidade relativa de um produto nas diversas condições a que possa estar sujeito, desde a fabricação até o término da sua validade (ANVISA.CATEC, 2004). Este estudo contribui para a orientação no aperfeiçoamento das formulações, do material adequado de acondicionamento, na estimativa do prazo de validade e informações sobre confiabilidade e segurança dos produtos.

Segundo o guia de estabilidade de produtos cosméticos (ANVISA.CATEC, 2004), é recomendável que se viabilize um estudo de estabilidade preliminar, com duração de até 15 dias, a fim de se testar o produto em sua fase inicial de desenvolvimento.

O estudo de estabilidade acelerada, também conhecida como exploratória, objetiva o fornecimento de dados preditivos do tempo de vida útil e a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. É empregado em escala laboratorial e piloto de fabricação. Possui duração de 90 dias, podendo se estender por seis meses a um ano. De um modo geral, avalia-se características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas.

O teste de prateleira, *shelf life* ou estudo de estabilidade de longa duração, valida limites de estabilidade do produto e comprova o prazo de validade estimado nos testes de estabilidade acelerada. As amostras são armazenadas a temperatura ambiente e analisadas periodicamente até que o se expire o prazo de validade.

De um modo geral, as condições de estresse aconselhadas são:

- estufa: 37; 40; 45 ou 50 \pm 2°C;
- geladeira: 5 \pm 2°C;
- freezer -5 ou -10 \pm 2°C.

Para os testes preliminares pode-se adotar ciclos de estresse de 24 horas alternando a armazenagem em intervalos regulares de tempo em estufa, geladeira ou freezer (ANVISA.CATEC, 2004).

Segundo a resolução RE n°1 de 29 de julho de 2005, que trata da estabilidade de produtos farmacêuticos; medicamentos líquidos e semi-sólidos de base aquosa devem ser analisados sob as condições apresentadas no Quadro 5 (ANVISA, 2005).

Quadro 5 - Condição de armazenamento para testes de estabilidade de medicamentos semi-sólidos.

<i>Forma Farmacêutica</i>	<i>Condição de armazenamento (°C)</i>	<i>Embalagem</i>	<i>Temperatura e umidade (acelerado)</i>	<i>Temperatura e umidade (longa duração)</i>
Semi-sólido	15-30	Semipermeável	40 °C ± 2 °C 75 % ± 5% UR	30 °C ± 2 °C 75 % ± 5% UR
Semi-sólido	15-30	Permeável	40 °C ± 2 °C	30 °C ± 2 °C

O prazo de validade provisório de 24 meses é concedido caso o relatório do estudo de estabilidade acelerado de 12 meses apresente variação de teor menor ou igual a 5,0 % do valor de análise inicial do lote, mantidas as demais especificações. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1 e 10,0 % no estudo de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório será de 12 meses. O prazo de validade definitivo será concedido para produtos que apresentarem nos estudos de longa duração uma variação de doseamento dos ativos dentro das especificações farmacopéicas ou do método validado de acordo com a legislação em vigor (ANVISA, 2005).

1.8.1 - Fatores Extrínsecos e Intrínsecos

Diversos fatores podem influenciar na estabilidade das formulações. Os fatores extrínsecos ou externos considerados no estudo da estabilidade de cosméticos são: processos de envelhecimento que ocorrem em consequência do tempo, temperatura de armazenamento e de exposição a luz (fotosensibilidade dos

componentes), oxigênio (geração de radicais livres e reações de oxi-redução), umidade, além do material de acondicionamento, contaminação microbiológica e vibração relacionada ao transporte (ANVISA.CATEC, 2004).

Dentre os fatores intrínsecos encontramos as incompatibilidades físicas e químicas. Estes fatores estão relacionados à natureza das formulações e principalmente à interação das substâncias entre si ou com o material de acondicionamento.

As incompatibilidades físicas são observadas quando ocorrem alterações no aspecto físico da formulação, como: precipitação, separação de fases, cristalização, entre outros. As incompatibilidades químicas, dizem respeito às reações químicas propriamente ditas que podem ocorrer entre os componentes da formulação e relacionam-se com a integridade e segurança dos ativos. Os principais fatores são:

- * pH;
- * Reações de oxi-redução;
- * Hidrólise;
- * Interação entre componentes da formulação;
- * Interação entre os componentes e material de acondicionamento.

1.8.2 - Estabilidade de emulsões

Emulsões são preparações heterogêneas e sistemas termodinamicamente instáveis, compostas de dois líquidos imiscíveis, convencionalmente descritos como água e óleo, cada qual disperso em finas gotículas sobre o outro, que retornam para

as fases de água e óleo separadamente, através da fusão ou coalescência de gotículas, a menos que sejam cineticamente estabilizadas por um terceiro componente, o agente emulsificante. A fase interna ou dispersa apresenta-se como pequenas gotículas e o líquido dispersante é chamado de fase externa ou contínua. As emulsões são classificadas como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), dependendo da localização da fase contínua ou externa. No entanto, emulsões farmacêuticas são freqüentemente compostas por sistemas multicomponentes, de fases sólidas ou cristais líquidos (lamelares) (ANSEL *et al.*, 2000; ECCLESTON, 2002; FLORENCE e ATWOOD, 2003).

A estabilidade de uma emulsão relaciona-se principalmente à viscosidade da fase interna. Partículas pequenas dispersas em um líquido (ou gás), estão em constante choque devido ao movimento browniano. Diversas instabilidades podem ocorrer no sistema devido a estas movimentações e interações entre as fases (Figura 6): inversão de fases, coalescência, formação de creme ou *creaming* e até a quebra total da emulsão (FLORENCE e ATWOOD, 2003).

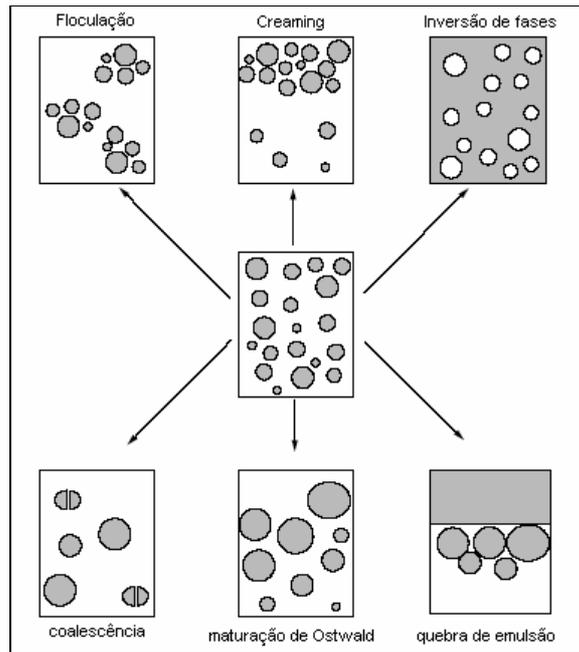


Figura 6 - Representação esquemática dos processos de instabilidade de uma emulsão (ECCLESTON, 2002).

De acordo com a Lei de Stokes, a velocidade de sedimentação ou formação de creme de uma partícula esférica (v) em um meio fluido, pode ser obtida pela equação 1 (FLORENCE e ATWOOD, 2003):

$$v = \frac{2ga^2(\rho_1 - \rho_2)}{9\eta} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: v = Velocidade de sedimentação de uma partícula esférica;
 g = constante de aceleração gravitacional, 981 cm/s^2
 a = diâmetro das partículas dispersas, cm;
 ρ_1 = densidade da fase dispersa (interna);
 ρ_2 = densidade da fase dispersante (contínua ou externa);
 η = viscosidade da fase dispersante

1.8.3 - Formulações gel-creme

As formulações gel-creme adquiriram grande força e aceitação no mercado brasileiro a partir das farmácias de manipulação, que tiveram grande demanda para desenvolver formulações do tipo “oil-free”, com menor quantidade possível de óleos e com aspecto de creme.

De um modo geral, elas são constituídas de uma base em gel, emulsificantes, substâncias oleosas ou silicones, adquirindo um aspecto leitoso ou cremoso.

O gel é um sistema solvente-polímero, que contém uma rede tridimensional de ligações bastante estáveis, quase não afetadas por movimento térmico. Podem ser subdivididos em dois grupos, dependendo das ligações entre as cadeias da rede. Os do tipo I são sistemas irreversíveis com uma rede tridimensional formada por ligações covalentes entre as macromoléculas. Os géis do tipo II, mais comumente usados em farmácia, são reversíveis pelo calor e mantidos por ligações intermoleculares do tipo ligação hidrogênio (FLORENCE e ATWOOD, 2003).

O gel-creme é uma emulsão cuja fase aquosa está previamente gelificada pelo polímero hidrófilo gelificante. Os agentes gelificantes empregados na formação do gel-creme são usualmente os mesmos utilizados para a obtenção de um hidrogel, como por exemplo, carbopol (carbomer) e natrosol (FERREIRA, 2002; FERNANDEZ-MONTES, 2005; MARTINI, 2005).

Devida atenção deve ser dada às possíveis incompatibilidades entre o agente gelificante e os ativos empregados. Formulações com pH ácido, devem utilizar gelificantes não iônicos, para se evitar a quebra da rede tridimensional do gel (FERNANDEZ-MONTES, 2005).

Do ponto de vista galênico o gel-creme apresenta maior consistência em relação às emulsões originais. Do ponto de vista dermocosmético, as formulações gel-creme acentuam o grau de evanescência da emulsão original, desde que não contenha em sua fase oleosa, alta concentração de substâncias graxas de alta oclusão (FERNANDEZ-MONTES, 2005). Devido à baixa concentração de substâncias oleosas, a formulação gel-creme apresenta sensação tátil de gel, com certa refrescância, especialmente para peles oleosas e mistas, podendo ser utilizada por todos os tipos de pele, dependendo, porém, dos demais componentes agregados (MARTINI, 2005).

Diversas macromoléculas de polímeros atuam também como agentes emulsificantes, alterando as forças hidrodinâmicas da emulsão durante o processo de agitação, devido a sua influência nas propriedades reológicas (ECCLESTON, 2002).

Recentemente, diferentes matrizes de géis aquosos (hidrogéis), como carbomer 940, goma xantana e carragena, vêm sendo utilizadas para aumentar a viscosidade de emulsões e microemulsões. A adição destes polímeros tornou as microemulsões estudadas mais apropriadas para uso tópico e com ótima estabilidade (CHEN, 2006).

1.9 - Revisão das metodologias analíticas

Atualmente, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na quantificação de fármacos. A maioria das farmacopéias preconiza a utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens como precisão, exatidão, rapidez, seletividade e capacidade de

automação. A revisão das metodologias analíticas envolvendo a quantificação de DMAE por CLAE em fase reversa (FR), permitiu concluir que não há metodologia oficial ou validada, para a determinação de DMAE glicolato em formulações cosméticas.

Um dos primeiros métodos descritos na literatura para a determinação quantitativa e simultânea do DMAE, ACH e COL descreve uma análise por cromatografia gasosa (CG). Esta análise foi realizada empregando-se DMAE acetoamidobenzoato (Deanol) a roedores com posterior análise de seu tecido cerebral e plasma. Nenhum dos métodos de extração empregados (tetrafenilboro, pareamento iônico, precipitação de Reinecke e resina catiônica), foi capaz de separar totalmente o DMAE da ACH e COL, porém a detecção de Deanol por CG, demonstrou ser bastante específica e reprodutível, sob as condições do ensaio (ZAHNISER *et al.*, 1977). Outro método descrito por Mishani e colaboradores (2002), descreve a utilização de CLAE, utilizando uma coluna de troca iônica e detector condutimétrico. O método demonstrou ser capaz de separar com eficiência a COL e DMAE (ambos na forma do sal cloreto), em uma formulação radiomarcada, utilizada na detecção de tumores.

A titulação potenciométrica em meio não aquoso é outra metodologia que se mostra adequada para a determinação de substâncias fracamente básicas ou fracamente ácidas, assim como para alguns sais de amônio quaternário (BECKETT & STENLAKE, 2001). Esta metodologia é comumente utilizada por alguns fornecedores para a determinação quantitativa do DMAE na matéria-prima, porém, na ausência de referências oficiais, tornou-se necessário a adaptação e validação desta metodologia.

A validação de metodologias analíticas simplificadas, que permitam assegurar uma análise confiável e reprodutível, utilizando-se CLAE em FR e titulação potenciométrica em meio não aquoso para a determinação e quantificação do DMAE glicolato na matéria-prima e nas formulações, se mostrou uma ferramenta necessária e desafiadora, além de determinante da etapa posterior dos estudos de estabilidade.

Ainda no intuito de alcançar outras metodologias que pudessem estar relacionadas ao DMAE glicolato, pesquisou-se métodos de determinação envolvendo o ácido glicólico, um ácido carboxílico de cadeia curta, o qual reage com o DMAE, em uma reação de neutralização formando o DMAE glicolato.

De acordo com a literatura, os métodos cromatográficos descritos para a determinação de ácidos carboxílicos de cadeia curta empregam a CG após derivatização e CLAE, utilizando quatro principais métodos de separação: exclusão iônica, troca iônica, fase reversa e pareamento iônico (SCALIA *et al.*,1998).

Scalia e colaboradores (1998) descreveram uma metodologia para a determinação do ácido glicólico (AG) em produtos cosméticos por CLAE em fase reversa, utilizando o pareamento iônico, após processo de purificação em cartuchos de troca iônica, obtendo uma porcentagem de recuperação em torno de 92,4 a 96,2 % para as formulações em creme e gel. O pareamento iônico é um recurso muito utilizado na análise de compostos ionizáveis. Uma vez que a fase estacionária na CLAE FR é apolar, ela interage fracamente com o soluto iônico, reduzindo demasiadamente seu tempo de retenção, podendo acarretar uma seletividade insatisfatória do método. No pareamento iônico, o contra-íon de carga oposta ao soluto analisado é adicionado na fase móvel, formando com este um complexo de

carga neutra, capaz de interagir melhor com a fase estacionária, aumentando a seletividade do sistema (CHANG e CHANG, 2003; RIBEIRO e VOLPATO, 2005).

Outro trabalho utilizando CLAE em fase reversa e pareamento iônico foi descrito para determinação simultânea de agentes clareadores hidrofílicos em produtos cosméticos, incluindo-se entre eles o AG. O método mostrou-se linear para a faixa de 8,0 a 36,3 mg/mL de AG. A faixa de recuperação obtida para o AG, variou entre 99,6 e 100,1 % e precisão (CV%) de 6,43 a 5,17 no comprimento de onda de 220 nm (CHANG e CHANG, 2003).

1.10 - Biometria cutânea

A dermocosmética atual requer para o desenvolvimento de uma formulação a utilização de métodos que comprovem a eficácia e a segurança de uso do produto desenvolvido.

A bioengenharia cutânea tem se tornado uma importante área, capaz de gerar ferramentas cada vez mais utilizadas na determinação científica de diversos parâmetros (KLIGMAN, 1995).

A aplicação das metodologias não invasivas na avaliação da eficácia dos cosméticos permite que medidas mais precisas sejam realizadas e possam complementar a avaliação clínica, muitas vezes subjetiva. A aplicação destes métodos requer um delineamento cuidadoso do experimento, seguido de padronização das metodologias aplicadas, uma vez que diversos parâmetros podem interferir nas medidas (GASPAR *et al.*, 2001). É muito importante, portanto, que exista um controle dos processos e do ambiente em que as medidas serão

realizadas, registrando-se temperatura e umidade, presença de luz solar e fluxo de ar (SERUP, 1995).

As medidas de biometria cutânea por métodos não invasivos são técnicas rápidas e seguras de se aplicar a humanos, uma vez que é possível avaliar a pele *in vivo*, em tempo real, sem a necessidade de se violar sua integridade (KLIGMAN, 1995).

Os equipamentos de biometria cutânea permitem que diversos parâmetros sejam avaliados, como por exemplo, conteúdo aquoso do estrato córneo (hidratação), teor lipídico (oleosidade), pH, coloração da pele, perda transepidermica de água, visco-elasticidade, textura superficial da pele, características tensoras (deformação e elasticidade), técnicas de imagem, dentre outros (GASPAR, 2001, catálogo do fornecedor Courage khazaka, 2006).

1.10.1 - Medidas de hidratação cutânea

A hidratação representa o elemento mais importante para preservar a condição física e a aparência da pele. O nível de hidratação da pele depende de vários fatores como o poder higroscópico do estrato córneo, a taxa de fornecimento de água pelas camadas mais internas da epiderme e a taxa de perda de água, via evaporação.

A água por si só seria suficiente como agente de tratamento para a pele desidratada. No entanto existe uma dificuldade de aplicação da água como um único agente de tratamento, já que apenas um fino filme líquido poderia aderir à pele. Nessas condições, a evaporação da água de re-hidratação ocorreria antes que

qualquer efeito emoliente pudesse ocorrer. Por outro lado, a imersão prolongada em água solucionaria o problema da evaporação, mas resultaria no inchamento do estrato córneo, causando danos às células e até mesmo exacerbando a condição original. Esses problemas podem ser contornados a partir da incorporação da água em veículos que regulem sua administração (TAGAMI, 1995).

Uma vez que o grau de hidratação do estrato córneo é um fator de extrema importância na preservação das condições físicas da pele, muitos esforços têm sido direcionados no sentido de restabelecer os teores normais de água na pele com diversas formulações.

Em biometria, a técnica mais utilizada na determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo é realizada por medidas de capacitância. A sonda capaz de medir esta capacitância é composta de eletrodos que contém uma rede interdigital de ouro. A parte ativa do eletrodo é composta de fina membrana de material vítreo de baixo potencial dielétrico. Não há contato galvânico entre a sonda e a superfície da pele e um campo elétrico de frequência variando entre 40 a 75 kHz é estabelecido na camada superior da pele (BAREL & CLARIS, 1995). As mudanças na capacitância são convertidas em unidades de hidratação que variam de 0 a 120 unidades arbitrárias (UA), onde 0 unidade corresponde à pele muito seca e 120 unidades à pele muito hidratada (SWATSCHEK *et al.*, 2002). Este método é considerado exato e reprodutível quando utilizado sob condições padronizadas e tem sido utilizado em diversos trabalhos como uma importante ferramenta para pesquisa cosmética, farmacológica e dermatológica (SWATSCHEK *et al.*, 2002; DISTANTE *et al.*, 2002; YILMAZ e BORCHERT, 2006).

1.10.2 - Determinação do pH cutâneo

A natureza ácida da superfície cutânea foi descrita primeiramente por Hesus em 1892 e diversos trabalhos vêm investigando este parâmetro. Um estudo realizado por Zlotogorski (1987) com cerca de 600 adultos, demonstrou uma faixa representativa do pH populacional variando entre 4,0 e 5,5 (região da testa) e 4,2 a 5,9 na região da bochecha, para indivíduos com menos de 80 anos. Após os 80 anos, verificou-se que os valores de pH são mais alcalinos.

O pH da pele tem sido visto por alguns pesquisadores como um importante indicador funcional, relacionado com a produção de ácido láctico, formação do manto hidrolipídico, manutenção da homeostase e funções imunológicas (ZLOTOGORSKI, 1987; LEONARDI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2006). Alguns trabalhos também apontam a ligação entre o pH, atividades enzimáticas e renovação celular e algumas patologias como dermatite de contato, dermatite atópica, ictiose, acne vulgar e infecções por *C. Albicans*. Fatores exógenos como uso de detergentes, alguns medicamentos e cosméticos podem obviamente afetar o pH cutâneo (SCHMID-WENDTNER e KORTING, 2006).

As técnicas potenciométricas atuais para a determinação cutânea do pH, envolvem a utilização de eletrodos especiais de vidro, os quais representam um avanço sobre os eletrodos de hidrogênio, quinidrona e antimônio, utilizados anteriormente (ZLOTOGORSKI, 1995).

Recente trabalho realizado por Weber e colaboradores (2006) empregou um biosensor com nanotubos de carbono em uma célula eletroquímica, capaz de detectar especificamente lactato e o pH de uma solução de suor artificial.

1.10.3 - Determinação da oleosidade cutânea

A pele saudável é naturalmente coberta por um manto lipídico, derivado do sebo e de lipídios da epiderme. A produção do sebo é um processo regulado pelos hormônios e receptores androgênicos. Embora esta secreção seja mais caracterizada individualmente por fatores hereditários, ela também varia de acordo com a idade, sexo e região da pele (YOUN *et al.*, 2002).

Os lipídeos do EC são compostos de quantidades praticamente equivalentes de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. As ceramidas encerram uma família de, no mínimo, sete sub-frações e são críticas para a função barreira do EC (PROKSCH *et al.*, 2006).

Um dos equipamentos mais utilizados para a determinação da oleosidade da pele é o Sebumeter[®], o qual é baseado em uma medida fotométrica de acordo com a opacidade de uma fita especial colocada em contato com a pele e fornece valores quantitativos entre 0-99 μg sebo/ cm^2 . No entanto é necessário observar a saturação da fita utilizada para se evitar erro nas medidas (PIÉRARD *et al.*, 2000; YOUN *et al.*, 2002).

Medicamentos e formulações cosméticas podem afetar positiva ou negativamente o conteúdo graxo do EC, determinando, de certa forma, as formulações mais indicadas para determinado tipo de pele. Desta forma, a investigação acerca do conteúdo graxo do EC pode auxiliar no desenvolvimento de formulações mais apropriadas para determinada população de indivíduos.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivos gerais

Formulação de um dermocosmético estável e eficaz com funções antiidade agregadas.

2.2 - Objetivos específicos

- * Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por titulação potenciométrica para análise do teor de DMAE glicolato na matéria-prima e na formulação;
- * Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise do teor de DMAE glicolato na formulação;
- * Determinação do FPS da formulação pelo método in vitro;
- * Determinação da estabilidade acelerada e em temperatura ambiente das formulações desenvolvidas;
- * Comparação da estabilidade do DMAE glicolato industrializado e do sintetizado em laboratório na formulação;
- * Avaliação da toxicidade dérmica da formulação proposta;
- * Avaliação da eficácia da formulação quanto aos parâmetros de biometria cutânea: oleosidade, pH e hidratação.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Matérias-primas

- Ácido glicólico - Galena
- Benzofenona 3 - Deg
- Butilhidroxitolueno (BHT) - Via Pharma
- DMAE base livre - Deg
- DMAE glicolato - Embrafarma
- Emulgin VL 75 - ChemSpecs
- Octocrileno - Spectrum
- Phenochem - ChemSpecs
- p-metoxicinamato de octila - Spectrum
- Structure XL - National Starch

3.2 - Reagentes, Solventes e outros

- Acetonitrila grau cromatográfico - Tedia
- Ácido acético glacial P.A. - Vetec
- Ácido perclórico 70% P.A. - Vetec
- Anidrido acético P.A. - Controltec
- Etanol P.A. - Vetec
- Fluido Padrão Brookfield 12500 cps

- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) - Vetec
- Hidróxido de Sódio P.A. - Vetec
- Membrana de filtro hidrofílica 0,20 μm – Millipore

3.3 - Equipamentos

- Agitador magnético Corning
- Agitador mecânico Fisatom modelo 713 D
- Balança analítica Mettler Toledo AG 204
- Balança de precisão Mettler Toledo PB 3002
- Banho de ultra-som Thornton T 14
- Centrífuga Beckman Coulter Avanti™ J 25
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu – bomba modelo LC-10AD vp, auto-injetor modelo SIL-10 AD vp, detetor de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A vp e sistemas de dados (*software*) modelo Class -VP versão 6.1
- Agitador para alta dispersão Ultra Turrax T18 basic
- Espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR 8300
- Espectrofotômetro Shimadzu UV 2401 PC
- Estufa de secagem e esterilização Fanem modelo 315 SE
- pHmetro/conduvímeter Digimed DM 21, eletrodo CV1 e CV4
- Placas de aquecimento e agitador mecânico Corning PC 351
- Equipamento para determinação de ponto de fusão Büchi B-540
- Refratômetro Carl Zeiss 120540

- Titulador automático Mettler DL25
- Unidade combinada de biometria cutânea Courage Khazaka: Corneometer 820 PC, Sebumeter SM 810 e Skin pHmeter pH 900
- Viscosímetro analógico Brookfield modelo LVT

3.4 - Padrões

Devido ao fato de não haver no mercado substância química de referência do DMAE glicolato, utilizou-se como padrão de trabalho a matéria-prima com teor de pureza declarado, gentilmente cedida pela empresa Embrafarma (DGE).

3.5 - Caracterização das matérias –primas

A tabela 1 relaciona as análises realizadas para caracterização das matérias-primas utilizadas neste estudo.

Tabela 1 - Relação de análises realizadas para a caracterização das matérias-primas.

<i>Matéria -prima</i>	<i>Análises realizadas</i>	<i>Referência</i>
Benzofenona	• Faixa de fusão	MERCK, 2001.
	• Espectrofotometria IV	SHAAT, 1990. ENCICLOPEDIA..., 1995.
DMAE glicolato	• Espectrofotometria UV	
	• pH	Laudo de análise do fornecedor.
	• Teor	
Metoxicinamato de octila	• Espectrofotometria IV	ENCICLOPEDIA..., 1995.
	• Índice de refração	MERCK, 2001.
Octocrileno	• Espectrofotometria UV	
	• Índice de refração	ENCICLOPEDIA..., 1995. USP, 2004.

3.5.1 - Determinação da faixa de fusão

Introduziu-se a amostra de benzofenona-3 (BZF) em capilar de vidro, procedendo-se à leitura para determinação da faixa de fusão. A análise foi realizada em duplicata (USP 2004; Enciclopédia de absorvedores de UV para produtos com filtro solar, 1995).

3.5.2 - Determinação do índice de refração

Amostras de octocrileno (OCT) e metoxicinamato de octila (MTO) foram analisadas diretamente no equipamento através da disposição de gotas das amostras sobre o prisma opaco do refratômetro (USP 2004, Enciclopédia..., 1995).

3.5.3 - Espectrofotometria na região do UV

Para a obtenção do espectro de absorção da luz na região do UV, pesou-se acuradamente cerca de 100,0 mg de cada matéria prima DMAE glicolato comercial (DGE), DMAE glicolato sintetizado (DGN) e OCT e transferiu-se para seus respectivos balões volumétricos de 100,0 mL. A essas soluções adicionou-se cerca de 50 mL de etanol P.A., homogeneizou-se em ultra-som por 5 minutos e o volume foi então completado com etanol. Transferiu-se uma alíquota de 10,0 mL de cada solução obtida para seu respectivo balão de 100,0 mL e completou-se o volume com etanol, obtendo-se solução na concentração de 100 µg/mL de cada matéria prima (USP, 2004).

3.5.4 - Espectrometria na região do infravermelho

Os espectros foram obtidos utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo 1% (p/p) de BZF. Já a análise do MTO foi realizada adicionando diretamente a amostra entre placas de brometo de potássio. A varredura para a obtenção do espectro foi realizada entre 400 e 4000 cm^{-1} . Os espectros obtidos foram comparados com os padrões encontrados na literatura (SHAAT, 1990; ENCICLOPEDIA..., 1995; USP 2004).

3.5.5 - Determinação do pH

O pH das amostras de DGE e DGN e suas respectivas soluções aquosas a 5% p/v, foi determinado através de análise potenciométrica direta utilizando-se eletrodo CV1 de ponte simples. O pHmetro foi calibrado com tampão 4,0 e 7,0 (Merck) antes de cada medida (Laudo do fornecedor Embrafarma).

3.5.6 - Determinação do teor do padrão e matéria-prima DMAE glicolato

Na validação das metodologias analíticas para a determinação do teor de DMAE glicolato por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por titulação potenciométrica em meio não aquoso, utilizou-se o DGE como padrão de trabalho. O teor de ambas as matérias-primas (DGE e DGN) foi determinado por titulação potenciométrica utilizando método validado neste trabalho. Pesou-se em triplicata exatamente cerca de 100,0 mg de cada matéria prima DGE e DGN para seus respectivos recipientes. Diluiu-se em 50,0 mL de ácido acético glacial P.A. e 1,0 mL de anidrido acético. As amostras foram previamente homogeneizadas por 1 minuto

no titulador. Titulou-se diretamente com a solução de HClO_4 0,1 N fatorada imediatamente antes das análises.

3.6 - Preparo das formulações

3.6.1 - Formulação A

Triturou-se os pós de BZF e BHT em gral de porcelana com auxílio de um pistilo. Incorporou-se os filtros solares oleosos, conservantes, essência e o emulsificante (fase oleosa). Pesou-se o DGE quantitativamente e transferiu-se para caneco de inox, com auxílio da água destilada. Dispersou-se lentamente o agente gelificante sob constante agitação utilizando-se agitador mecânico equipado com pás em hélice na rotação de 800 rpm e o agitador para alta dispersão a 6000 rpm. Incorporou-se a fase oleosa sob constante agitação, até total homogeneização da formulação. Envasou-se a formulação preparada em embalagens de polipropileno com capacidade de 120 g e fechamento em batoque.

3.6.2 - Formulação B

Triturou-se os pós de BZF e BHT em gral de porcelana com auxílio de um pistilo. Incorporou-se os filtros solares oleosos, conservantes, essência e o emulsificante (fase oleosa). Aqueceu-se 80% da água a $70 \pm 2^\circ\text{C}$ e dispersou-se lentamente o agente gelificante sob constante agitação, utilizando-se agitador mecânico equipado com pás em hélice na rotação de 800 rpm e o agitador para alta dispersão a 6000 rpm. Incorporou-se a fase oleosa sob constante agitação até total homogeneização da formulação. Após resfriamento até aproximadamente 40°C ,

adicionou-se o DGN pesado quantitativamente com auxílio de parte da água destilada não aquecida. Envasou-se a formulação preparada em embalagens de polipropileno com capacidade de 120 g e fechamento em batoque.

Tabela 2 - Relação entre a concentração e componentes utilizados na fabricação da formulação base.

<i>Componentes</i>	<i>Função</i>	<i>Concentração (%)</i>
DMAE glicolato	Ativo	5,0
Octilmetoxicinamato	Filtro Solar UVB e UVA parcial	2
Benzofenona 3	Filtro solar UVA	2
Octocrileno	Filtro solar UVB	2
Dispersão de metilparabeno, propilparabeno, etil e butilparabenos dispersos em fenoxietanol (Phenochem)	Sistema de conservantes	0,5
Lauril glucosido, poligliceril2-dipoli-hidroxiestearato e glicerina (Emulgin VL 75)	Emulsificante	3
Fosfato de hidroxipropilamido (Structure XL)	Agente gelificante	5
Butilhidroxitolueno (BHT)	Antioxidante	0,05
Essência	Aromatizante	0,2
Água destilada	Veículo	qsp 100

3.6.3 - Obtenção do DMAE glicolato em laboratório

Para a obtenção do DMAE glicolato em laboratório (DGN) neutralizou-se lentamente o DMAE base livre com ácido glicólico, sob constante agitação e controle potenciométrico até pH de aproximadamente 6,6. O processo foi conduzido sob

resfriamento em banho de gelo, já que a reação é bastante exotérmica. O teor do DGN obtido foi determinado por titulação potenciométrica de acordo com o item 3.5.6.

3.7 - Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Através de testes preliminares foram determinados os parâmetros e condições ideais para o estabelecimento e validação do método por CLAE para a determinação do DMAE glicolato matéria-prima e nas formulações desenvolvidas e estudadas.

3.7.1 - Preparo da solução-padrão de DMAE glicolato

Pesou-se exatamente cerca de 1,5 g do padrão DGE contendo cerca de 70% de DMAE glicolato para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionou-se uma solução de acetonitrila e tampão fosfato pH 7,4 (1:1) previamente filtrada em membrana com 0,45 µm e desgaseificada em banho de ultra-som e vácuo. Os balões foram submetidos ao ultra-som por 5 minutos. Completou-se o volume com a mesma solução, obtendo-se uma solução-mãe de aproximadamente 20 mg/mL de DMAE glicolato.

3.7.2 - Preparo da amostra para avaliação da precisão e exatidão

As amostras foram preparadas incorporando-se o padrão de DGE a uma matriz em branco (placebo) da formulação, em quantidades relativas a 80, 100 e 120 %, de modo que cada amostra resultasse em uma concentração de 4, 5 e 6 % de

padrão, respectivamente. As amostras foram pesadas em triplicata para cada concentração para balão de 25,0 mL. Adicionou-se cerca de 15 mL de uma solução extratora de acetonitrila e tampão fosfato pH 7,4 (1:1) previamente filtrada em membrana com 0,45 µm e desgaseificada. Os balões foram submetidos ao ultra-som por 5 minutos. Completou-se o volume com a mesma solução e homogeneizou-se manualmente. Transferiu-se alíquotas de 5,00 mL para balão de 25,0 mL, completou-se com a solução extratora e homogeneizou-se manualmente. Obteve-se soluções contendo exatamente cerca de 600 µg/mL (80%), 800 µg/mL (100%) e 1000 µg/mL (120%). Todas as amostras foram filtradas em membrana Millipore com 0,45 µm de diâmetro imediatamente antes da injeção no cromatógrafo. As injeções foram realizadas em duplicata (Ribani *et al.*, 2004).

3.7.3 - Condições cromatográficas

A metodologia em estudo seguiu os seguintes parâmetros cromatográficos:

1. Coluna cromatográfica: Shimpack CLC-ODS fase reversa, C18, 5µm de diâmetro de partícula, medindo 4,6 mm x 25 cm;
2. Vazão: 1,0 mL/min;
3. Temperatura: ambiente;
4. Volume de injeção: 10µL;
5. Detecção: 205 nm;
6. Fase móvel: tampão fosfato pH 7,4;
7. Solvente para padrão e amostras: solução de acetonitrila e tampão fosfato 7,4 (1:1).

Todas as fases móveis e soluções utilizadas foram filtradas em membrana hidrofílica Millipore de 0,40 μm . A degaseificação da FM foi realizada internamente no degasser do equipamento de CLAE.

3.8 - Validação da metodologia analítica por CLAE

Para a validação da metodologia foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão (ICH, 1996; ANVISA, 2003c; USP, 2004).

3.8.1 - Seletividade

A fim de se verificar a seletividade através da interferência dos excipientes no método, as amostras do gel creme placebo, contendo todos os componentes menos o DMAE glicolato, na concentração correspondente a 1000 $\mu\text{g/mL}$ do ativo, foram analisadas por CLAE nas mesmas condições analíticas empregadas para as amostras (ANVISA, 2005).

3.8.2 - Linearidade

As curvas de calibração foram construídas em triplicata a partir de uma solução mãe do padrão numa concentração média de 20 mg/mL . A partir desta solução construiu-se cada curva de calibração utilizando-se 5 níveis de concentração de DGE (400, 600, 800, 1000 e 1200 $\mu\text{g/mL}$). As soluções foram diluídas na mesma solução extratora utilizada para as amostras e levadas ao ultra-som por 5 minutos. Todas as soluções foram filtradas em membrana millipore com

0,45 µm de diâmetro imediatamente antes da injeção no cromatógrafo. Determinou-se a curva padrão utilizando-se as cinco concentrações experimentais com injeção em triplicata. As curvas foram construídas relacionando-se a área média das três injeções contra a concentração em cada nível. O coeficiente de correlação da curva (r) foi obtido pelo método dos mínimos quadrados.

Determinou-se a linearidade do método através dos coeficientes de correlação (r) e de regressão (a e b), obtidos através da regressão linear das curvas de calibração. As curvas de calibração foram determinadas experimentalmente em 3 dias diferentes, utilizando-se cinco concentrações diferentes do padrão de trabalho (400, 600, 800, 1000 e 1200 µg/mL), contemplando-se o intervalo de 80 a 120% da concentração teórica da amostra, cada ponto foi injetado em triplicata. O coeficiente de correlação (r) deve ser maior que 0,99 (ANVISA, 2003).

3.8.3 - Precisão

O preparo das amostras para o ensaio de precisão foi determinado conforme o item 3.7.2 utilizando o recurso de normalização das massas pesadas de DGE. A normalização das massas foi realizada para minimizar possíveis erros gerados na precisão devido a pequenas diferenças de pesagem, que poderiam gerar falsos erros. Calculou-se um valor experimental de área relativa a uma pesada exata e relacionou-se com a massa real para cada nível de concentração, onde:

$$A_{\text{exp}} = \frac{\text{área obtida} \cdot X \text{ (mg)}}{\text{Massa pesada (mg)}}$$

X= Quantidade exata (mg) de DMAE glicolato para cada nível de concentração (80, 100 e 120 mg respectivamente).

A precisão pelo método placebo contaminado foi expressa em termos do DPR das injeções das amostras em triplicata, nos níveis de concentração baixo, médio e alto. O DPR não deve ser maior que 5% (ANVISA, 2003c; Ribani *et al.*, 2004).

3.8.4 - Exatidão

O preparo das amostras e o ensaio de recuperação para a determinação da exatidão do método por placebo contaminado foi realizado de acordo com o item 3.7.2. O cálculo da recuperação foi realizado comparando-se o valor teórico adicionado de DGE nas amostras de placebo das formulações, com o valor mensurado na amostra através da determinação em triplicata, utilizando-se uma curva padrão realizada no mesmo dia da análise (FDA, 1999; ANVISA, 2003c).

3.9 - Análise quantitativa do DMAE glicolato através do método de titulação potenciométrica em meio não aquoso

Através de testes preliminares foram determinados os parâmetros e condições ideais para o estabelecimento e validação do método por titulação potenciométrica em meio não-aquoso para a determinação do DMAE glicolato matéria-prima e nas formulações.

Este foi o método selecionado para a avaliação do teor de DMAE glicolato matéria-prima e para o acompanhamento do estudo da estabilidade das formulações desenvolvidas neste trabalho.

3.9.1 - Preparo da solução titulante HClO₄ 0,1N

Homogeneizou-se em balão volumétrico de 1000,0 mL sob resfriamento, cerca de 8,5 mL de ácido perclórico 70 % P.A., 500 mL de ácido acético glacial P.A. e 21 mL de anidrido acético P.A. O volume foi completado lentamente com ácido acético glacial P.A. A solução titulante foi fatorada imediatamente antes de cada análise.

3.9.2 - Fatoração da solução titulante HClO₄ 0,1N

Imediatamente antes da utilização da solução titulante HClO₄ 0,1N era realizada a fatoração utilizando-se biftalato de potássio, previamente dessecado, como padrão primário. A fatoração foi realizada em triplicata, pesando-se com exatidão cerca de 160,0 mg de biftalato de potássio com adição de 50,0 mL de ácido acético P.A. e titulando-se com a solução de HClO₄ 0,1 N. O branco foi determinado titulando-se 50,0 mL de ácido acético glacial P.A.

3.9.3 - Preparo das amostras para avaliação da precisão e exatidão

As amostras foram preparadas incorporando-se quantidades conhecidas do padrão DGE a amostras do gel creme em branco (placebo) em quantidades equivalentes a 80, 100 e 120 % da concentração de trabalho, de modo que cada amostra resultasse em uma concentração de 4, 5 e 6 % de DGE, respectivamente. As amostras foram pesadas em triplicata para cada nível de concentração diretamente para o copo do titulador. Adicionou-se 50,0 mL de ácido acético glacial P.A. e 1,0 mL de anidrido acético. As amostras foram agitadas sob a hélice do

titulador por 2 minutos antes de cada titulação ou até que todo o gel-creme estivesse diluído na solução solvente. Os resultados foram expressos por normalização das pesadas.

Fator de análise da reação: 1 mL HClO_4 _____ 16,4 mg DMAE glicolato.

3.9.4 - Condições analíticas para titulometria em meio não aquoso

A metodologia seguiu os seguintes parâmetros:

1. Solução titulante: HClO_4 0,1N;
2. Padrão primário para fatoraço: biftalato de potássio previamente dessecado por 4 horas a 105 °C;
3. Solvente: ácido acético glacial P.A. 50,0 mL + anidrido acético 1,0 mL;
4. Tempo de agitação das amostras antes da titulação: aproximadamente 2 minutos;
5. Velocidade da hélice: graduação 4;
6. Eletrodo: dupla ponte CV4 Mettler Tolledo;
7. Eletrólito: KCl 3M/ LiCl 3M em ácido acético P.A.

3.10 - Validação da metodologia analítica por titulação potenciométrica em meio não aquoso.

Para a validação da metodologia foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão (ICH, 1996; ANVISA, 2003c; USP, 2004).

3.10.1 - Seletividade

Com o objetivo de se verificar a existência de interferentes no método proposto, as amostras de placebo foram preparadas da mesma forma que as amostras de gel creme contendo o DMAE glicolato.

Titulou-se diretamente com a solução de HClO_4 cerca de 2,0 g do placebo em triplicata. As amostras de placebo foram diluídas com 50,0 mL de ácido acético glacial P.A. e 1,00 mL de anidrido acético e agitadas sob a hélice do titulador por aproximadamente 2 minutos antes de cada titulação.

3.10.2 - Linearidade

As curvas de calibração foram construídas em triplicata utilizando-se o DGE como padrão de trabalho. Determinou-se experimentalmente a faixa de concentração utilizada, já que não existem referências oficiais na literatura.

Pesou-se diretamente para o recipiente do titulador exatamente quantidades relativas a 40; 60; 80; 100; 120 e 140 mg do padrão de trabalho DMAE glicolato, utilizando-se o fator de correção. Diluiu-se com 50,0 mL de ácido acético glacial P.A.

e 1,0 mL de anidrido acético. Titulou-se diretamente com a solução titulante de HClO_4 0,1N previamente fatorada.

Determinou-se a linearidade do método através dos coeficientes de correlação (r) e de regressão (a e b), obtidos através da regressão linear das curvas de calibração. As curvas de calibração foram determinadas experimentalmente conforme o item 3.6.3. O coeficiente de correlação (r) deve ser maior que 0,99 (ANVISA, 2003).

3.10.3 - Precisão

As amostras foram preparadas conforme o item 3.9.3. Expressou-se os resultados em termos do DPR do teor encontrado das amostras em triplicata, para cada nível de concentração baixo, médio e alto (FDA, 1999; ANVISA, 2003).

3.10.4 - Exatidão

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.9.3. O cálculo da exatidão, através da recuperação, foi realizado pela relação entre o teor de DGE encontrado na amostra do placebo contaminado e o teor de DGE adicionado, para os três níveis de concentração (FDA, 1999; ANVISA, 2003).

3.11 - Estudo da Estabilidade

Foi determinado o perfil da estabilidade de duas formulações produzidas por dois diferentes métodos. A primeira formulação (A) foi produzida por emulsificação a frio, utilizando-se o DGE como princípio ativo. A segunda formulação (B) sofreu o processo de emulsificação à quente, utilizando-se o DGN como ativo, de acordo com os processos descritos nos itens 3.6.1 e 3.6.2 respectivamente. As amostras foram envasadas em embalagem final de polipropileno e armazenadas à temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$; e em condição acelerada utilizando-se estufa a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob saturação de umidade.

As formulações A e B, armazenadas à temperatura ambiente e na condição acelerada, foram analisadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias, de acordo com os parâmetros de inspeção selecionados, a saber, aspecto visual, centrifugação, pH, viscosidade, determinação do FPS e determinação do teor de DMAE glicolato por titulação potenciométrica. Paralelamente realizou-se o ensaio de teor na matéria prima DGN obtida em laboratório, nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, armazenada à temperatura ambiente.

3.11.1- Inspeção visual

No estudo da estabilidade acelerada todas as amostras foram avaliadas visualmente quanto à separação de fases e alteração na coloração. A separação parcial ou total das fases de uma emulsão pode caracterizar instabilidade físico-química ou microbiológica e indicar mudanças necessárias na formulação para se atingir a estabilidade da mesma.

3.11.2- Centrifugação

Amostras submetidas a uma força centrífuga sofrem uma aceleração na mobilidade das partículas através do aumento na força de gravidade. Este teste permite antecipar possíveis instabilidades, as quais podem ser observadas na forma de precipitação, coalescência e até separação total de fases. Para a realização deste ensaio pesou-se 40,0 g de cada amostra para tubo de centrífuga e padronizou-se o ensaio para a rotação de 6000 rpm por 15 minutos, com temperatura interna da centrífuga de 25 °C (ANVISA.CATEC, 2004).

3.11.3- Determinação do pH

Submeteu-se as amostras A e B armazenadas a temperatura ambiente e em condição acelerada à leitura potenciométrica direta em pHmetro equipado com eletrodo de ponte simples. Calibrou-se o pHmetro imediatamente antes de cada leitura com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (Merck). A determinação do valor do pH está relacionada à compatibilidade dos componentes da formulação, eficácia e segurança de uso, constituindo um importante parâmetro a ser avaliado nos estudos de estabilidade.

3.11.4 - Determinação da viscosidade aparente

A viscosidade aparente das formulações A e B foi determinada em viscosímetro analógico de Brookfield. Utilizou-se o padrão Brookfield de 12.500 cps para análise do perfil da viscosidade e padronizou-se as leituras utilizando-se spindle LV 4, na velocidade 6. Estes parâmetros demonstraram maior proximidade

entre as medidas do padrão e das amostras e foram padronizados para todas as medidas. Utilizou-se cerca de 100 g do gel creme, de modo que se atingisse a marca determinada no spindle. As medidas foram realizadas após 2 minutos de rotação, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 5\%$ UR.

3.11.5 - Determinação do FPS *in vitro* das formulações

A determinação do FPS *in vitro* foi realizada segundo metodologia de MANSUR e colaboradores (1986). Ela apresenta vantagens como a não utilização de voluntários humanos, além de ser um método barato, seguro, rápido, eficaz e com boa correlação com a determinação do FPS *in vivo*. Esse ensaio foi preconizado pela ANVISA a partir de 2002 (MANSUR *et al.*, 1986; GARCIA *et al.*, 1990; SANTOS *et al.*, 1999; BARTH, 2001;).

Utilizou-se a espectrofotometria na região do UV para a avaliação do FPS das formulações, medindo-se a absorvância das soluções em triplicata, na faixa do comprimento de onda na faixa do UVB (290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm).

3.11.5.1- Preparo da solução das amostras

Pesou-se com exatidão em triplicata cerca de 0,50 g das amostras de gel creme de cada formulação diretamente para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicionou-se cerca de 30 ml de etanol P.A. e levou-se ao ultra-som por 5 minutos. O volume foi completado com etanol P.A. Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 25,0 mL e completou-se o volume com etanol. As amostras

foram homogeneizadas manualmente. Obteve-se amostras de concentração final de 0,2 mg/mL.

3.11.5.2- Análise espectrofotométrica

Realizou-se a leitura em triplicata, utilizando-se etanol P.A. como medida de referência. Calculou-se o FPS médio de acordo com fórmula abaixo:

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda)$$

Fórmula 1 – Cálculo do FPS segundo Mansur (MANSUR, 1986).

Onde, FC= Fator de correção (igual a 10)

EE (λ)= Efeito eritematogênico da radiação no comprimento de onda λ .

I (λ)= Intensidade da luz solar no comprimento de onda λ .

Abs (λ)= Leitura espectrofotométrica para absorvância da solução no comprimento de onda (λ).

Os valores de EE (λ) X I (λ) são tabelados e descritos em relação a cada comprimento de onda de leitura.

Quadro 6 - Relação entre efeito eritematogênico e intensidade da radiação em cada comprimento de onda (λ) (Mansur *et al.*, 1986).

λ (nm)	EE (λ) X I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
$\Sigma=$	1,0000

3.11.6 – Determinação do teor de DMAE glicolato nas formulações

Determinou-se o teor do DMAE em triplicata, conforme procedimento descrito no item 3.5.6, nas formulações A e B em ambas as condições de armazenamento (temperatura ambiente e condição acelerada), nos tempos 0; 15; 30; 60 e 90 dias.

3.12- Estudo da biometria cutânea

Após a elaboração do protocolo de estudos segundo o capítulo IV da resolução n° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e posterior aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCCF), seguiu-se à seleção dos voluntários segundo critérios específicos de inclusão e exclusão.

No estudo de biometria cutânea, avaliou-se o efeito da formulação dermocosmética proposta (formulação A), através de métodos biométricos não

invasivos capazes de medir a hidratação, a oleosidade e o pH da pele. Para tais medidas utilizou-se o equipamento em unidade combinada de biometria cutânea. Realizou-se as medidas em ambiente climatizado e monitorado, com temperatura variando entre 22°C e 25°C, e umidade relativa do ar entre 40% e 50% (GASPAR *et al.*, 2001).



Figura 7 - Equipamento de unidade combinada de biometria cutânea

3.12.1- Critérios de inclusão e exclusão para seleção de voluntários

Selecionou-se 21 voluntários saudáveis, do sexo feminino, com idade entre 25 e 60 anos, com fototipo de pele branca ou parda (fototipos 1 a 3), capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido por escrito, após informação para participação voluntária no estudo e que estivessem livres do uso de dermocosméticos por no mínimo 30 dias.

Foram excluídos voluntários com histórico ou sinais de dermatopatologias, hipersensibilidade a algum componente da formulação ou que durante o estudo apresentassem sinais ou sintomas de irritação ou dermatite de contato associado.

3.12.2 - Padronização de uso da formulação

Orientou-se as voluntárias para o uso exclusivo da formulação gel creme por 30 dias, 2 vezes ao dia pela manhã e a noite, após lavar o rosto e aproximadamente 30 minutos antes de deitar, de modo que se evitasse a perda do produto em atrito com o travesseiro.

3.12.3 - Padronização das medidas de biometria cutânea

As medidas de biometria cutânea foram realizadas nos tempos 0 (antes do uso da formulação), 15 e 30 dias. As voluntárias tiveram seus rostos lavados com sabonete líquido neutro imediatamente antes das medições e foram acomodadas em ambiente climatizado por 15 a 20 minutos antes do início das medidas. Os testes foram realizados segundo o método de caso-controle, onde cada indivíduo era controle de si mesmo. Desta forma, elimina-se interferências individuais da população amostral. Padronizou-se as medidas para a determinação do pH e oleosidade em três regiões da face, conforme ilustração da figura 8. Para a determinação da hidratação, foram selecionados oito pontos que foram determinados no sentido anti-horário da face, ao longo do círculo indicado na figura, incluindo-se os pontos verificados para oleosidade e pH.



Figura 8 - Padronização dos pontos de medida para o ensaio de biometria cutânea: 1- centro do osso malar; 2- meio da linha de encontro da fenda naso-labial com o maxilar; 3- centro da bochecha (DISTANTE *et al.*, 2002).

3.12.4 - Determinação do grau de hidratação

Colocou-se o sensor do tipo caneta em contato com a pele nos oito pontos indicados aguardando o fim da medição indicado por um bip sonoro. Este equipamento mede o grau de hidratação da superfície cutânea utilizando a medição da capacitância do estrato córneo.

O método de medição baseia-se na variabilidade do valor da constante dielétrica da água que pode ser medida através de um capacitor capaz de determinar essas variações, registrando-as automaticamente no aparelho. (GASPAR *et al.*, 2001; SWATSCHEK *et al.*, 2002; YILMAZ, 2006).

3.12.5 - Determinação do grau de oleosidade

Baseia-se na fotometria (banda do visível) de uma fita plástica especial, a qual se torna progressivamente transparente por adsorção dos lipídios após contato com a superfície da pele em análise. A cabeça do cassete de medição contém uma

tira plástica de aproximadamente 0,1 mm de espessura, que adsorve a gordura ao ser colocada em contato com a pele. O tempo de medição é de 30 segundos para cada ponto medido. Seguidamente, o cassete foi recolocado no aparelho onde uma célula fotoelétrica avalia a transparência da tira plástica, quantificando assim o conteúdo lipídico da superfície cutânea ($\mu\text{g sebo/cm}^2$) (GASPAR *et al.*, 2001; SWATSCHEK *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2006).

3.12.6 - Determinação do pH cutâneo

A medição do pH tem como objetivo a determinação do equilíbrio ácido-básico de soluções aquosas, tendo por base a quantificação da concentração dos íons de hidrogênio (H^+). Desta forma, o valor do pH da superfície cutânea é determinado pelas substâncias hidrossolúveis que são lançadas na pele, resultantes da secreção sudorípara, da secreção sebácea e da eliminação de gás carbônico. A avaliação do pH através do aparelho Skin pH-Meter é considerada como o único método técnico e cientificamente comprovado. A medição é rápida e sem dificuldades, garantindo resultados precisos.

A determinação do pH foi realizada com um eletrodo especial de ponte simples, concebido através de uma fina membrana de vidro e porcelana, cujo eletrólito é o KCl 3 M. O eletrodo foi calibrado imediatamente antes de cada medida com tampão 4,0 e 7,0 (Merck) e colocado diretamente em contato com a pele das voluntárias por 3 segundos, até que um sinal sonoro indicasse o término de cada medida (GASPAR *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2006).

3.13 - Toxicidade dérmica

A metodologia adotada para realizar os testes de toxicidade dérmica baseou-se nas orientações do Guia de avaliação de segurança de produtos cosméticos (ANVISA.CATEC, 2003a).

Os riscos a serem avaliados para produtos cosméticos são do tipo irritativo, alergênico e sistêmico, este último relacionado a sua absorção oral ou permeação. Diversos esforços vêm sendo realizados pela comunidade científica no sentido de se diminuir a utilização de animais e substituí-los por testes *in vitro*. Felizmente, diversos avanços vêm ocorrendo, porém, a utilização de um modelo de pele reconstituída, é considerada uma metodologia validada para ensaios com ingredientes, mas ainda não atende totalmente as necessidades de avaliação de produtos acabados (ANVISA.CATEC, 2003a).

Os testes de toxicidade dérmica primária e cumulativa são indicados quando a formulação contendo o componente a ser testado é destinada ao uso regular, sem enxágüe. Neste trabalho os testes foram utilizados para verificar o comportamento da associação do DMAE glicolato com os filtros solares na faixa de pH 4,5 a 5,5. Para os ensaios utilizou-se a primeira formulação concebida (formulação A), que continha como princípio ativo a matéria-prima DGE já amplamente comercializada, não diferindo da formulação B em concentração ou em relação ao pH. Foram utilizados coelhos diferentes para cada teste.

3.13.1 - Toxicidade dérmica primária

Para a realização deste ensaio, depilou-se de véspera o dorso de um coelho albino de aproximadamente 1,5 kg. Dividiu-se o dorso depilado por uma linha imaginária em quatro quadrantes. Duas áreas de aproximadamente dois centímetros no quadrante direito foram superficialmente rasurados com auxílio de uma agulha estéril, e as duas áreas no quadrante esquerdo permaneceram intactas. Aplicou-se uma única alíquota da formulação em teste recentemente formulada (formulação A) em cada uma das quatro áreas determinadas. As áreas foram cobertas com gaze estéril e fita crepe formando uma oclusão e evitando-se a retirada acidental do produto pelos coelhos. Observou-se as áreas para a verificação de uma possível formação de eritema ou edema após 4 horas de oclusão. Retirou-se o produto do dorso do coelho com auxílio de gaze e água corrente e observou-se após 24 horas da aplicação e nos 7 dias consecutivos (ANVISA.CATEC, 2003a).

3.13.2- Toxicidade dérmica cumulativa

Da mesma forma que para o teste de irritação primária, depilou-se de véspera o dorso de um coelho albino de aproximadamente 1,5 kg. Dividiu-se o dorso depilado por uma linha imaginária em quatro quadrantes. Duas áreas de aproximadamente dois centímetros no quadrante direito foram superficialmente rasurados com auxílio de uma agulha estéril, e as duas áreas no quadrante esquerdo permaneceram intactas. Aplicou-se uma única alíquota da formulação em teste recentemente formulada (formulação A) em cada uma das quatro áreas determinadas. As áreas foram cobertas com gaze estéril e fita crepe para evitar a retirada do produto pelos coelhos. Observou-se as áreas após 24 horas de oclusão

para a verificação da ocorrência de eritema ou edema. Após este período, retirou-se o produto do dorso do coelho com auxílio de gaze e água corrente. Reaplicou-se o produto seguindo-se o mesmo procedimento e observação da integridade da pele por 5 dias consecutivos. Observou-se novamente a integridade da pele após 24 e 72 horas da última aplicação. (ANVISA.CATEC, 2003a).

4- RESULTADOS

4.1- Análise das matérias –primas

4.1.1- Determinação da faixa de fusão

A amostra de benzofenona-3 fundiu-se na faixa de temperatura de 63,5 a 64,0°C, estando dentro da faixa de fusão relatada na literatura de 62 a 64°C (USP 2004; Enciclopédia ..., 1995).

4.1.2 - Determinação do índice de refração

Os resultados obtidos na análise do índice de refração das matérias-primas OCT e MTO e os respectivos valores de referência estão indicados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos na determinação do índice de refração do MCO e OCT.

<i>Matéria -prima</i>	<i>Índice de Refração determinado</i>	<i>Índice de Refração (referência a 20 °C)</i>
OCT	1,567	1,561 - 1,571
MTO	1,544	1,542 - 1,548

4.1.3 - Espectrofotometria na região do UV

Os espectros de absorção da luz UV apresentados na figura 9 representam os resultados obtidos da leitura das amostras de DGE utilizado como padrão e DGN, utilizando-se etanol como solvente. A figura 10 representa o espectro de absorção UV do OCT.

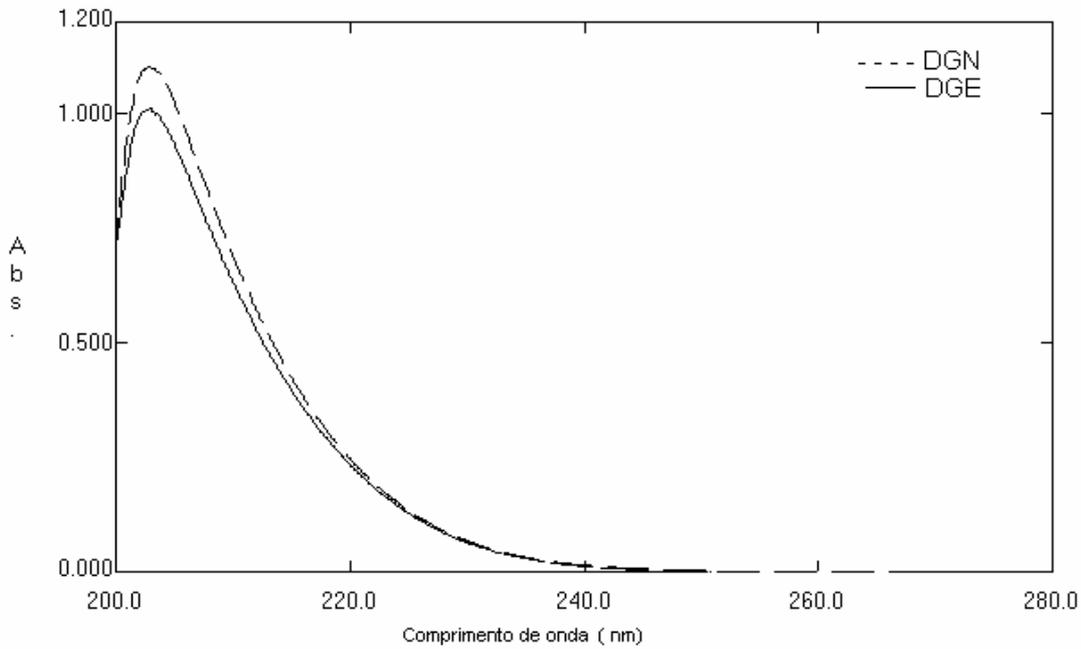


Figura 9 - Espectro de absorção UV do DGE e DGN na concentração de 1,0 mg/mL.

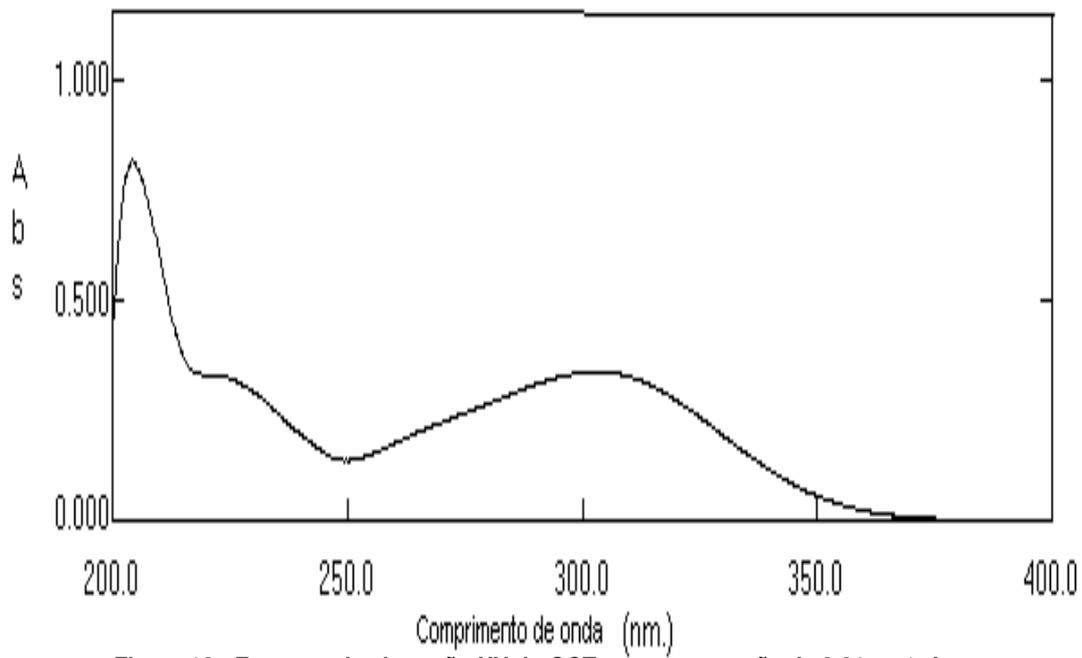


Figura 10 - Espectro de absorção UV do OCT na concentração de 0,01 mg/mL

4.1.4- Espectrometria na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho da figura 11 e 12 representam as matérias-primas MTO e BZF respectivamente.

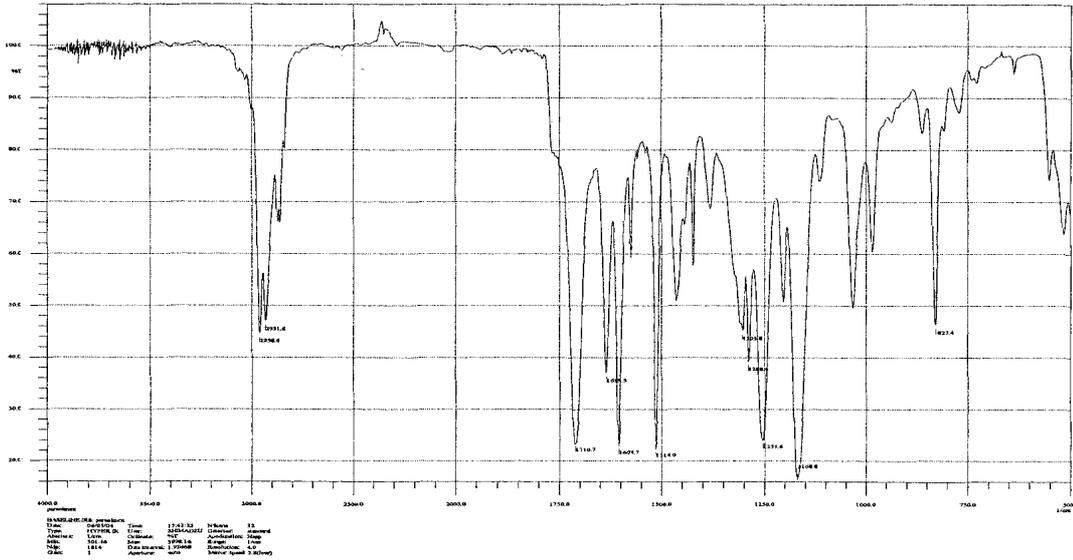


Figura 11 - Espectro na região do infravermelho da matéria-prima MTO.

4.1.5 - Determinação do pH

Estão representados na tabela 4 os valores de pH determinados para as matérias-primas DGN e DGE e suas respectivas soluções aquosas a 5%. Na ausência de referências oficiais, utilizou-se como parâmetro o laudo analítico do fornecedor Embrapharma.

Tabela 4 - Determinação do pH nas matérias-primas e soluções a 5 % de DGE e DGN.

<i>Amostra</i>	<i>pH determinado</i>	<i>pH Referência</i>
DGE	6,47	-
Solução aquosa 5% (DGE)	4,98	4,5 a 6,0
DGN	6,30	-
Solução aquosa 5% (DGN)	4,43	-

4.1.6 - Determinação do teor de DMAE glicolato

A tabela 5 apresenta os valores de teor determinados para as matérias-primas DGE e DGN pelo método de titulação potenciométrica em meio não aquoso.

Tabela 5 - Determinação do teor de DGE e DGN por titulação potenciométrica.

<i>Matéria-prima</i>	<i>Teor (%) ± DPR</i>
DGE	70,06 ± 0,12%
DGN	73,83 ± 0,005%

4.2 - Validação da metodologia analítica – CLAE

4.2.1 - Curva de calibração

A tabela 6 demonstra os resultados estatísticos obtidos na construção da curva de calibração para CLAE (Figura 13). As curvas foram realizadas em 3 dias diferentes, com injeção em triplicata para cada concentração.

Tabela 6 - Avaliação estatística da regressão linear na determinação das curvas de calibração para CLAE.

<i>Média da equação de regressão</i>	<i>Coefficiente de correlação (r) Média ± EP</i>	<i>Inclinação (a) Média ± EP</i>	<i>Intercepto (b) Média ± EP</i>
$y = 355,21 x - 15032,8$	$0,9990 \pm 4,74 \times 10^{-2}$	$355,21 \pm 5,01$	$-15032,8 \pm 2974,35$

N=3; $X \pm EP$; $y = ax + b$

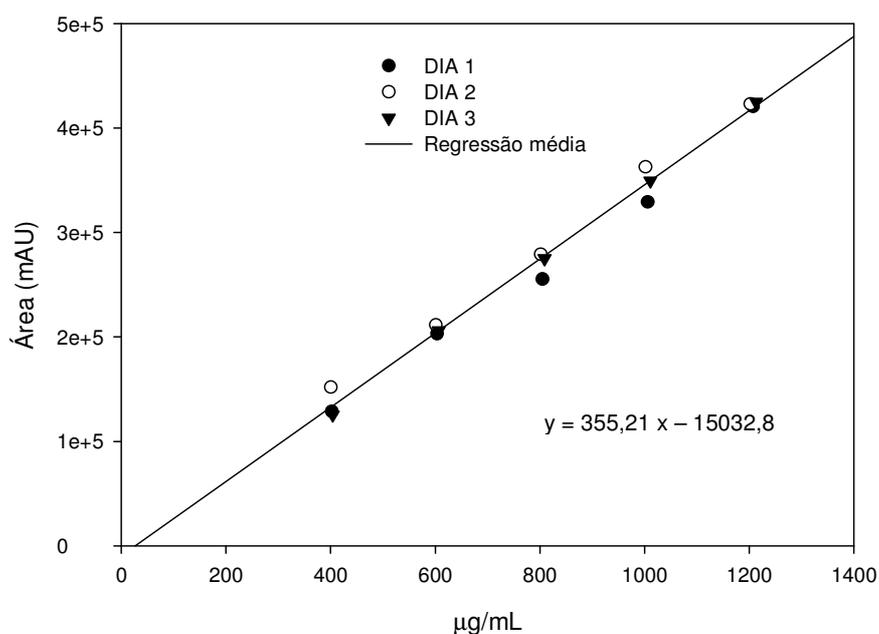


Figura 13 - Representação gráfica das curvas de calibração obtidas para CLAE em 3 dias diferentes na faixa de concentração de 400 a 1200 µg/mL.

4.2.2 - Determinação da seletividade

Os resultados da seletividade do método estão demonstrados na Figura 14. A seletividade foi determinada através da leitura de uma solução do placebo a 1000 µg/mL. O cromatograma B da figura 14 corresponde à leitura da formulação contendo DGE na mesma concentração do placebo e está demonstrado para efeito comparativo.

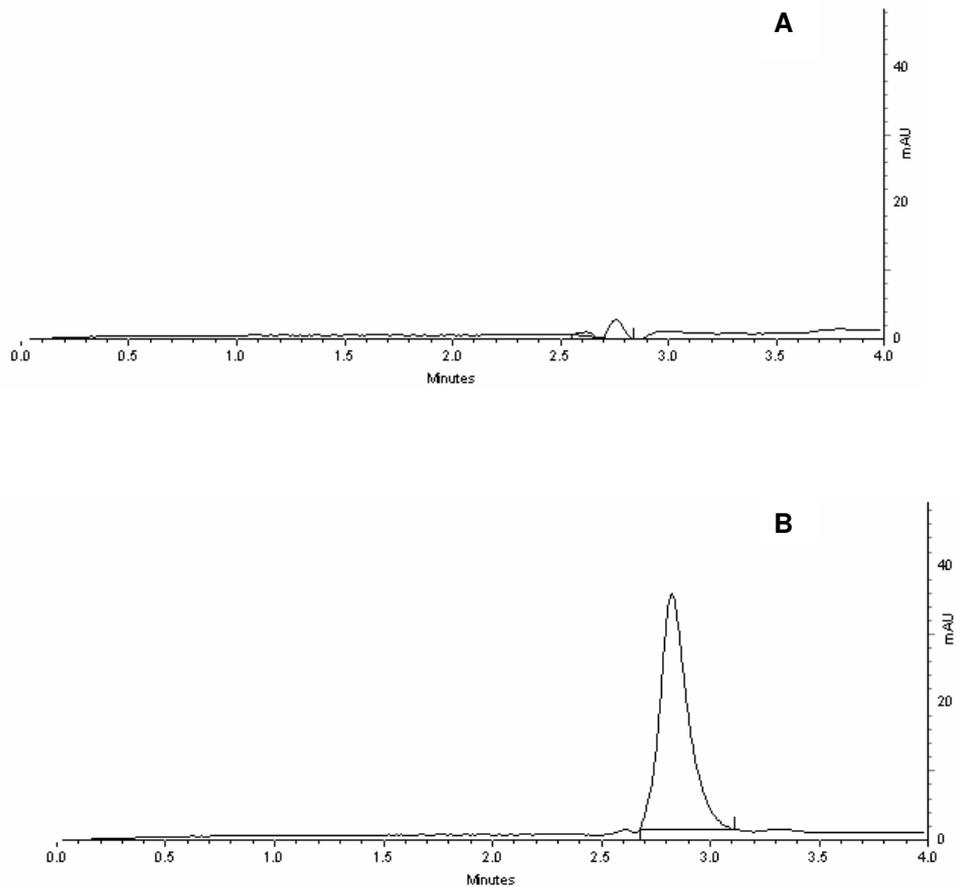


Figura 14 - (A): Cromatograma do placebo na concentração de 1000 µg/mL obtido por CLAE com λ de 205 nm; (B): Cromatograma da formulação A contendo DGE na concentração de 1000 µg/mL realizado nas mesmas condições cromatográficas.

4.2.3 - Avaliação da precisão de injeção pelo método da repetibilidade

A tabela 7 relaciona os resultados encontrados para a precisão de injeção, realizada para os três níveis de concentração avaliados.

Tabela 7 - Resultados obtidos através da precisão de injeção para CLAE

<i>Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Áreas</i>	<i>Média \pm DPR(%)</i>
600	207620,84	211921,08 \pm 1,88
	208518,85	
	211590,0	
	210840,68	
	218227,94	
	214728,20	
800	277048,92	280771,62 \pm 0,80
	282481,41	
	282615,46	
	281123,29	
	280589,04	
	279905,09	
1000	367171,02	367453,58 \pm 0,28
	368644,90	
	368349,93	
	367927,56	
	366034,26	
	366593,82	

4.2.4 - Avaliação da precisão e recuperação para CLAE

Os resultados obtidos no ensaio de precisão e recuperação para o método analítico realizado por CLAE estão demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados obtidos na avaliação da precisão e recuperação para CLAE

Nível de concentração (%)	mg de DGE		Média (mg)	Recuperação	Área
	Adicionado	Encontrado	encontrado ± DPR %	(média ± DPR%)	(média ± DPR %)
80	80,0	86,34	82,50 ± 4,06	103,13 ± 4,06	235255,0 ± 3,34
		81,01			
		80,15			
100	100,0	102,45	102,74 ± 0,45	102,74 ± 0,45	287155,7 ± 1,10
		103,28			
		102,50			
120	120,0	124,75	125,31 ± 1,66	104,65 ± 2,28	344999,6 ± 1,46
		123,56			
		127,67			

Recuperação calculada como: valor adicionado/valor medido X 100; N= 3.

4.3 - Validação da metodologia analítica – Titulação potenciométrica em meio não aquoso

4.3.1 - Avaliação da seletividade

A tabela 9 demonstra os resultados em volume (mL) para a titulação do placebo do gel e para o solvente na avaliação da seletividade do método.

Tabela 9 - Resultados obtidos na titulação do placebo e do solvente para teste de seletividade do método titulométrico.

<i>Amostra</i>	<i>Quantidades avaliadas</i>	<i>Volume (mL) ± DPR (%)</i>
Placebo (gel em branco)	2000,0 g	0,1844 ± 0,49
Solvente (ácido acético glacial P.A : anidrido acético 50:1).	50 mL	0,0116 ± 0,50

N=3; X ± DPR

4.3.2 - Avaliação da linearidade

Os resultados estatísticos obtidos para o cálculo da curva de calibração estão demonstrados na Tabela 10. A curva de calibração obtida está demonstrada na Figura 15.

Tabela 10 - Resultados estatísticos obtidos na determinação das curvas de calibração para titulação potenciométrica.

<i>Média da equação de regressão</i>	<i>Coefficiente de correlação (r) média ± EP</i>	<i>Inclinação (a) média ± EP</i>	<i>Intercepto (b) média ± EP</i>
$y = 0,0595 x + 0,01986$	$0,9999 \pm 6,66 \times 10^{-5}$	$0,01986 \pm 0,0115$	$0,0595 \pm 5,77 \times 10^{-5}$

N=3; $X \pm EP$; $y = bx + a$

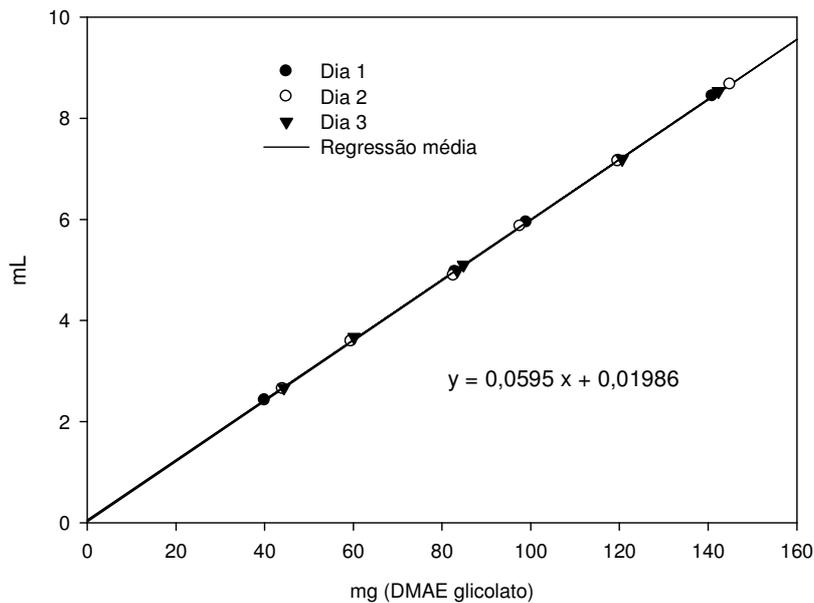


Figura 15 - Curva de calibração obtida para titulação potenciométrica em 3 dias diferentes na faixa de concentração 60 a 200 mg DGE/mL.

4.3.3- Avaliação da precisão e recuperação

Os resultados obtidos nos ensaios de precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação) do método titulométrico estão demonstrados na tabela 11.

Tabela 11 - Resultados obtidos no ensaio de recuperação e precisão para o método titulométrico.

Nível de concentração (%)	mg de DGE		média (mg) encontrado	Recuperação (média % \pm DPR %)
	adicionado	encontrado	\pm DPR%	
80	80,0	80,45	80,43 \pm 0,0099	100,53 \pm 0,0099
		81,21		
		79,62		
100	100,0	100,06	101,18 \pm 0,013	101,18 \pm 0,013
		100,92		
		102,57		
120	120,0	119,63	119,19 \pm 0,0035	99,32 \pm 0,0035
		119,12		
		118,81		

N=3; X \pm DPR

4.4 - Avaliação da estabilidade acelerada

4.4.1 - Avaliação dos parâmetros macroscópicos e pH

Na tabela 12 pode-se observar os resultados dos parâmetros macroscópicos avaliados nas formulações A e B, como inspeção visual, centrifugação e a determinação do pH das amostras armazenadas a temperatura ambiente e na condição acelerada.

Tabela 12 - Avaliação da inspeção visual, centrifugação e pH das amostras A e B em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.

Condição de armazenamento	Aspecto		Centrifugação		Separação de fases		*pH	
	T amb	40 °C	T amb	40 °C	T amb	40 °C	T amb	40 °C
Tempo (dias)	FORMULAÇÃO A*							
0	S/A	S/A	A1/A3	A1/A3	S/A	S/A	5,02	5,02
15	S/A	S/A	A2	A1	S/A	S/A	5,00	4,98
30	S/A	S/A	A2	A1	S/A	S/A	4,98	4,99
60	S/A	S/A	A2	A1	S/A	S/A	5,09	5,12
90	S/A	S/A	A2	A1	S/A	S/A	4,98	4,97
Tempo (dias)	FORMULAÇÃO B*							
0	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	4,50	4,50
15	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	4,40	4,34
30	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	4,43	4,44
60	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	4,34	4,33
90	S/A	S/A	A3	A3	S/A	S/A	4,33	4,32

S/A= sem alteração; A1= formação de halo de até 1 mm; A2= formação de halo de até 2 mm; A3= formação de pó amarelado na parede do tubo de centrifuga; *P > 0,05.

4.4.2 - Avaliação da viscosidade aparente

A figura 16 demonstra o perfil da viscosidade obtido para formulação A, contra um padrão de viscosidade Brookfield. Padronizou-se as medições de acordo com este perfil, tomando-se a leitura da viscosidade na velocidade de 6 RPM.

A viscosidade aparente foi avaliada ao longo do tempo, nas duas condições de armazenamento para ambas as formulações A e B. Os resultados obtidos para as formulações podem ser verificados na tabela 13 e figuras 17 e 18, respectivamente.

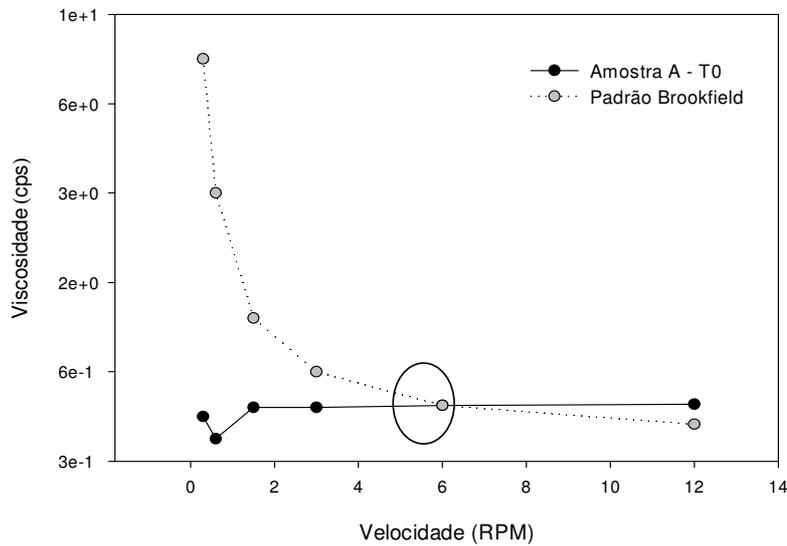


Figura 16 - Perfil da viscosidade da formulação A e padrão Brookfield 12500 cps.

Tabela 13 - Resultados obtidos no teste de viscosidade das formulações A e B, em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.

FORMULAÇÃO	A*		B**		
	Viscosidade (cps)		Viscosidade (cps)		
	Condição de armazenamento	T ambiente	acelerado	T ambiente	acelerado
<i>Tempo (dias)</i>					
0		12500	12500	22000	22000
15		13000	15500	23000	22000
30		12500	15000	21500	21500
60		13500	15000	22000	21500
90		13500	15500	23000	21000

*P < 0,05; **P > 0,05

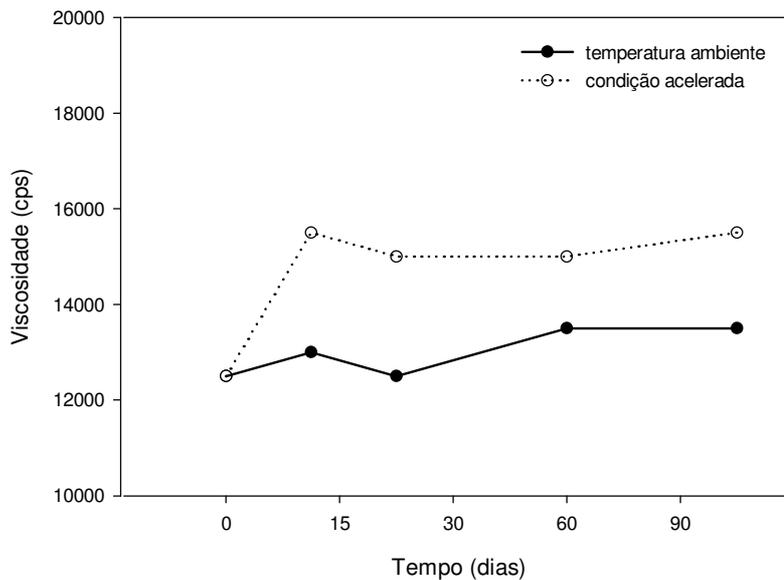


Figura 17 - Representação gráfica do comportamento da viscosidade (cps) x tempo (dias) para formulação A em ambas as condições de armazenamento ao longo de 90 dias.

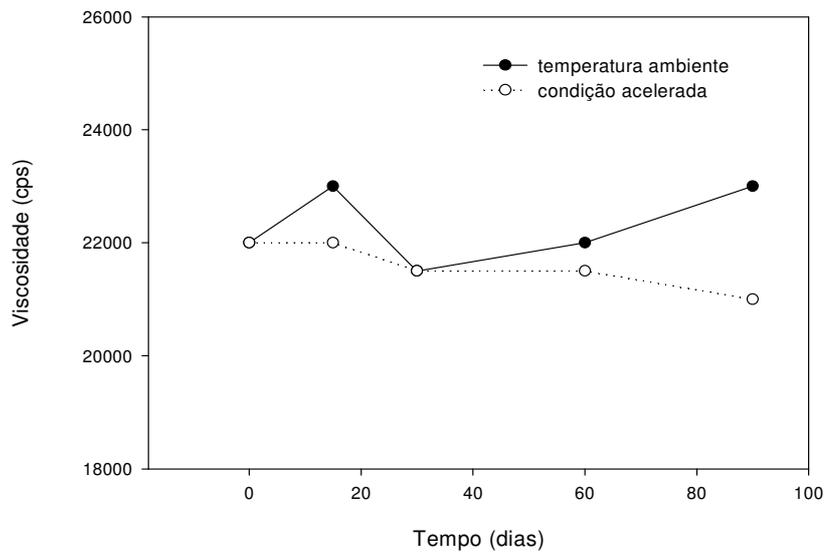


Figura 18 - Representação gráfica do comportamento da Viscosidade (cps) x tempo (dias) para formulação B, em ambas as condições de armazenamento ao longo de 90 dias.

4.4.3 - Avaliação do FPS *in vitro* das formulações

A Tabela 14 e figuras 19 e 20 demonstram os resultados obtidos na avaliação do FPS *in vitro* das formulações A e B em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.

Tabela 14 - Resultados obtidos na determinação do FPS *in vitro* das formulações A e B, em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.

<i>Condição de armazenamento</i>	<i>FORMULAÇÃO</i>			
	<i>A* (média ± DPR %)</i>		<i>B* (média ± DPR%)</i>	
	<i>T ambiente</i>	<i>Acelerado</i>	<i>T ambiente</i>	<i>Acelerado</i>
<i>Tempo (dias)</i>				
0	7,27 ± 1,45	7,27 ± 1,45	7,68 ± 1,21	7,68 ± 1,21
15	6,88 ± 2,40	7,09 ± 0,58	7,06 ± 1,12	6,92 ± 2,55
30	6,85 ± 0,63	6,47 ± 0,64	6,66 ± 2,04	6,52 ± 2,44
60	6,46 ± 1,19	6,46 ± 0,58	6,78 ± 2,20	6,69 ± 2,26
90	6,46 ± 1,20	6,28 ± 1,03	6,70 ± 1,00	6,49 ± 1,76

N=3; X ± DPR; *P < 0,0001

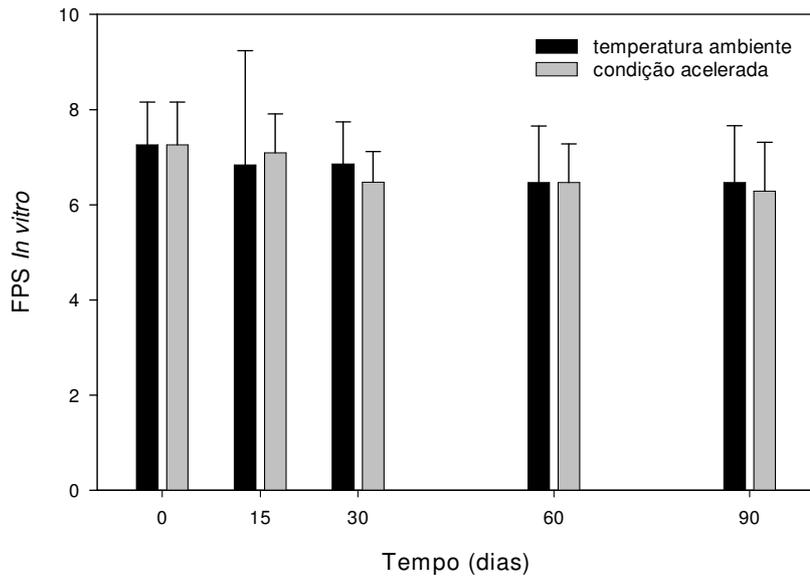


Figura 19 - Representação gráfica da variação do FPS *in vitro* em função do tempo (dias) para formulação A, em ambas as condições de armazenamento.

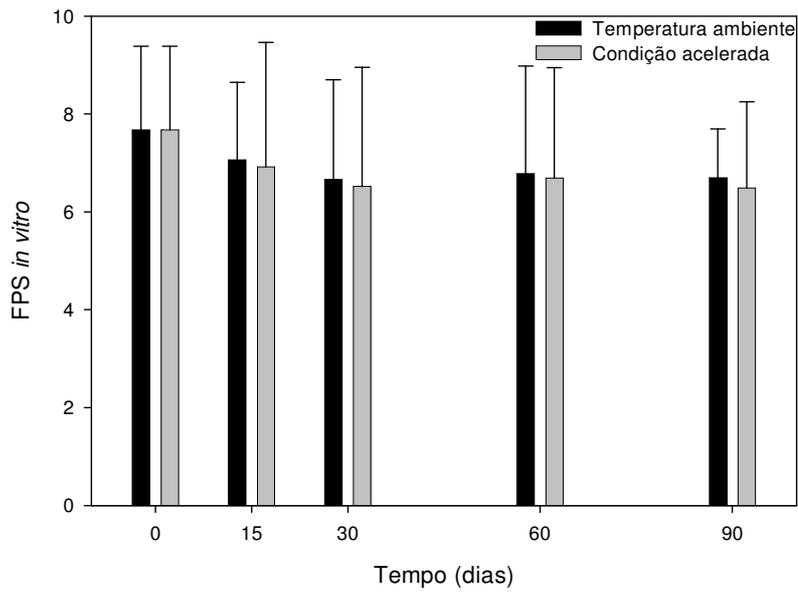


Figura 20 - Representação gráfica da variação do FPS *in vitro* em função do tempo (dias) para formulação B, em ambas as condições de armazenamento.

4.4.4 - Avaliação do teor de DMAE glicolato nas formulações

A tabela 15 e figuras 21 e 22 demonstram os resultados obtidos da avaliação do teor de DMAE glicolato nas formulações A e B em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.

Tabela 15 - Determinação do teor de DMAE glicolato por titulação potenciométrica em meio não aquoso nas formulações A e B em ambas as condições de armazenamento no período de 90 dias.

<i>Condição de armazenamento</i>	<i>FORMULAÇÃO</i>			
	<i>*A (média teor ± DPR %)</i>		<i>*B (média teor ± DPR%)</i>	
	<i>T ambiente</i>	<i>Acelerado</i>	<i>T ambiente</i>	<i>Acelerado</i>
<i>Tempo (dias)</i>				
0	5,252 ± 0,006	5,252 ± 0,006	5,389 ± 0,0006	5,389 ± 0,0006
15	5,216 ± 0,002	5,217 ± 0,002	5,386 ± 0,0005	5,382 ± 0,00
30	5,147 ± 0,0004	5,156 ± 0,0005	5,462 ± 0,0004	5,474 ± 0,001
60	5,230 ± 0,0003	5,227 ± 0,0007	5,435 ± 0,0005	5,444 ± 0,0006
90	5,219 ± 0,0004	5,226 ± 0,001	5,444 ± 0,0002	5,465 ± 0,0013

N=3; *P < 0,0001

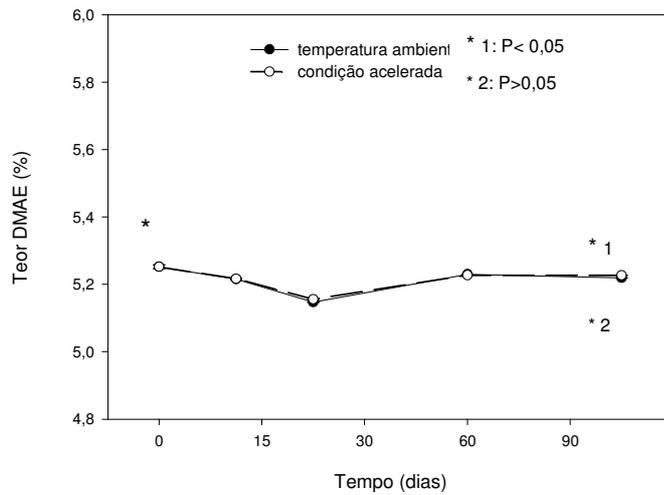


Figura 21 - Representação gráfica da variação do teor (%) de DGE em função do tempo (dias) na formulação A, em ambas as condições de armazenamento.

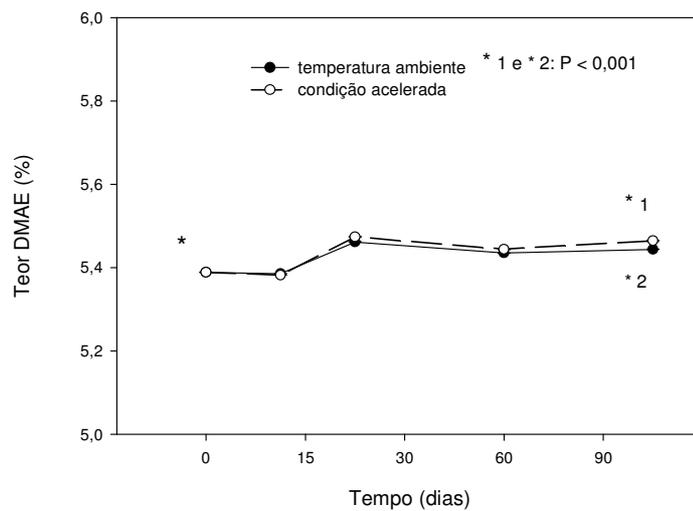


Figura 22 - Representação gráfica da variação do teor (%) de DGN em função do tempo (dias) na formulação B, em ambas as condições de armazenamento.

4.4.5 - Avaliação do teor de DMAE glicolato matéria-prima

Os resultados da tabela 16 expressam o teor da matéria-prima DGN obtida em laboratório e armazenada a temperatura ambiente por um período de 90 dias.

Tabela 16 - Determinação do teor de DMAE glicolato por titulação potenciométrica em meio não aquoso na matéria-prima (DGN), armazenada a temperatura ambiente no período de 90 dias.

<i>Tempo (dias)</i>	<i>* Média do Teor ± DPR %</i>
0	73,826 * ± 0,0045
15	72,996 ± 0,0060
30	73,579 ± 0,0021
90	73,439 * ± 0,096

N=3; *P> 0,05

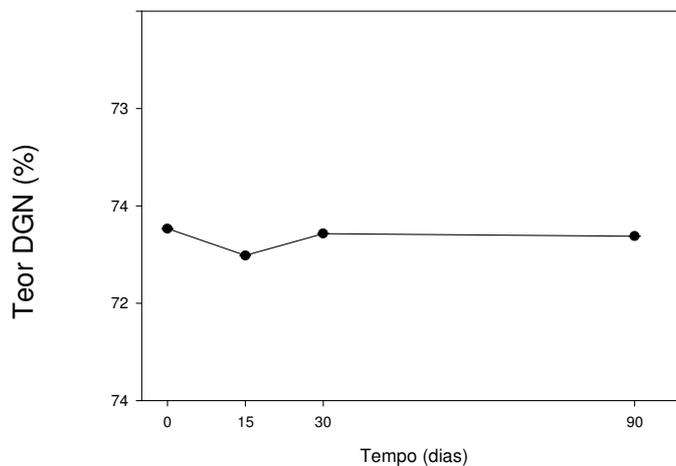


Figura 23 - Representação gráfica da variação do teor (%) de DGN em função do tempo (dias) na matéria-prima armazenada a temperatura ambiente por período de 90 dias.

4.5 - Avaliação da biometria cutânea

Os ensaios de biometria cutânea foram avaliados relacionando-se cada ponto da face estudado. Conforme demonstrado na figura 8, a avaliação da oleosidade e pH foi determinada em 3 pontos da face e a avaliação da hidratação em 8 pontos. As figuras 24, 26 e 28 representam os resultados obtidos na avaliação da oleosidade, pH e hidratação, respectivamente, realizada ponto a ponto da face para cada tempo (T0, T15 e T30 dias). Os gráficos 25, 27 e 29 demonstram os respectivos valores médios dos pontos, obtidos para cada tempo.

A avaliação estatística foi realizada utilizando-se o teste de Friedman para observações pareadas, seguido de um teste *Post Hoc* de Dunn's, que realizou uma análise comparativa entre o valor médio dos pontos, para cada tempo de análise, conforme demonstrado nas tabelas 17,18 e 19 para oleosidade, pH e hidratação respectivamente.

No tempo 0, as voluntárias não estavam utilizando nenhuma formulação dermocosmética há no mínimo 30 dias. Este tempo, portanto, corresponde ao controle do ensaio.

Tabela 17 - Resultados estatísticos obtidos no ensaio de biometria para oleosidade

<i>Tempo</i>	<i>Média dos pontos (1, 2, e 3)</i>	<i>P de Friedman</i>	<i>P Post Hoc (Dunn's)</i>
0	10,07	0,1153	T0 x T15 P > 0.05
15	8,571		T0 x T30 P > 0.05
30	7,917		T15 x T30 P > 0.05

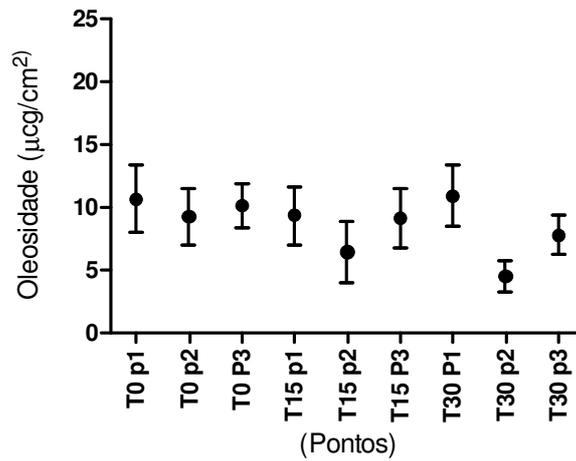
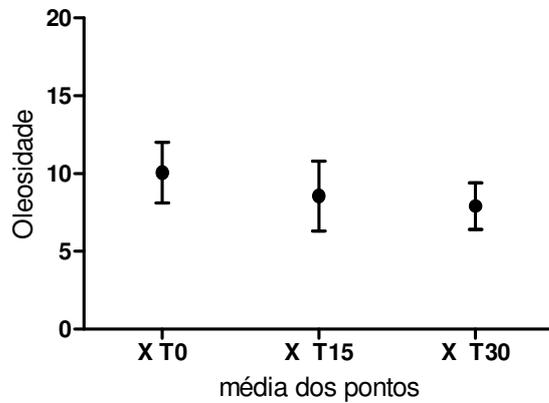
**Figura 24 - Representação gráfica dos valores obtidos em cada ponto no ensaio de biometria cutânea para oleosidade.****Figura 25 - Representação gráfica dos valores médios obtidos em cada tempo, no ensaio de biometria cutânea para oleosidade.**

Tabela 18 - Resultados estatísticos obtidos para no ensaio de biometria para pH

<i>Tempo</i>	<i>Média dos pontos (1, 2, e 3)</i>	<i>P de Friedman</i>	<i>P Post Hoc (Dunn's)</i>
0	3,37		T0 x T15 P > 0,05
15	4,67	0,0018	T0 x T30 P < 0,01
30	5,13		T15 x T30 P > 0,05

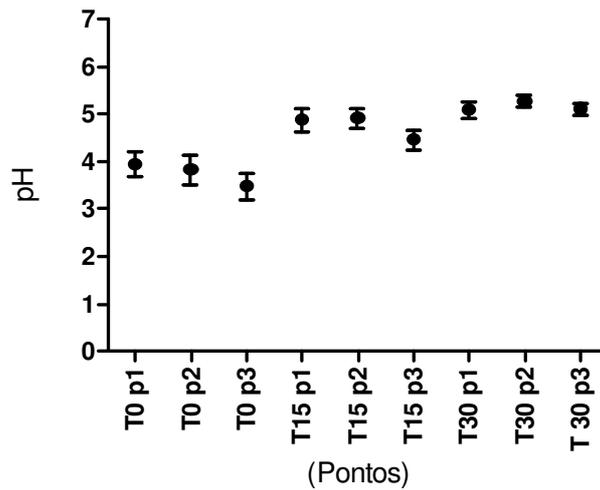


Figura 26 - Representação gráfica dos valores obtidos em cada ponto, no ensaio de biometria cutânea para determinação de pH.

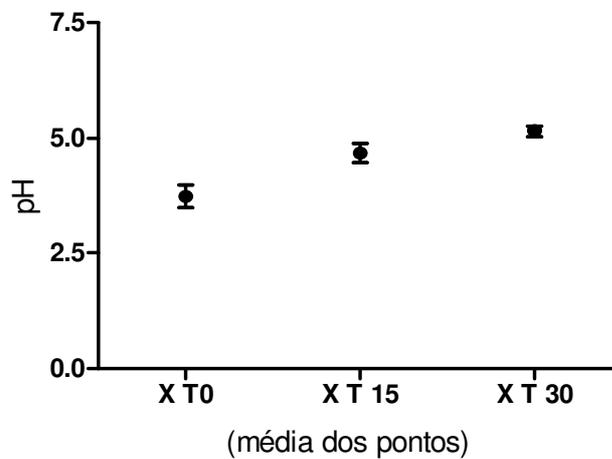


Figura 27 - Representação gráfica dos valores médios obtidos em cada tempo, no ensaio de biometria cutânea para pH.

Tabela 19 - Resultados estatísticos obtidos no ensaio de biometria para hidratação

Tempo	Média dos pontos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8)	P de Friedman	P Post Hoc (Dunn's)
0	48,23		T0 x T15 P < 0.001
15	55,32	0,0003	T0 x T30 P < 0.05
30	51,34		T15 x T30 P > 0.05

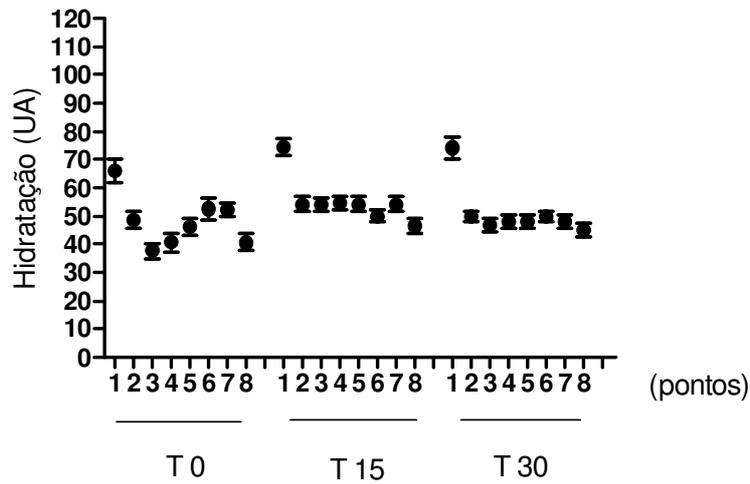


Figura 28 - Representação gráfica dos valores médios obtidos em cada tempo, no ensaio de biometria cutânea para pH.

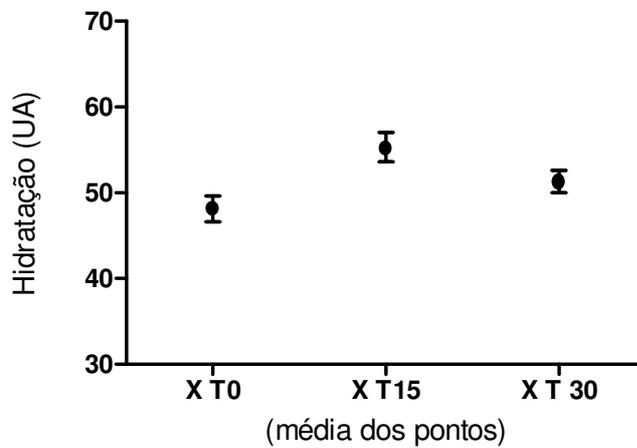


Figura 29 - Representação gráfica dos valores médios obtidos em cada Tempo, no ensaio de biometria cutânea para determinação da hidratação.

4.6 - Avaliação da toxicidade dérmica

Como pode ser observado na Figura 30, não houve sinal de irritação dérmica primária ou cumulativa nos coelhos testados, para a formulação contendo DMAE e filtros solares.

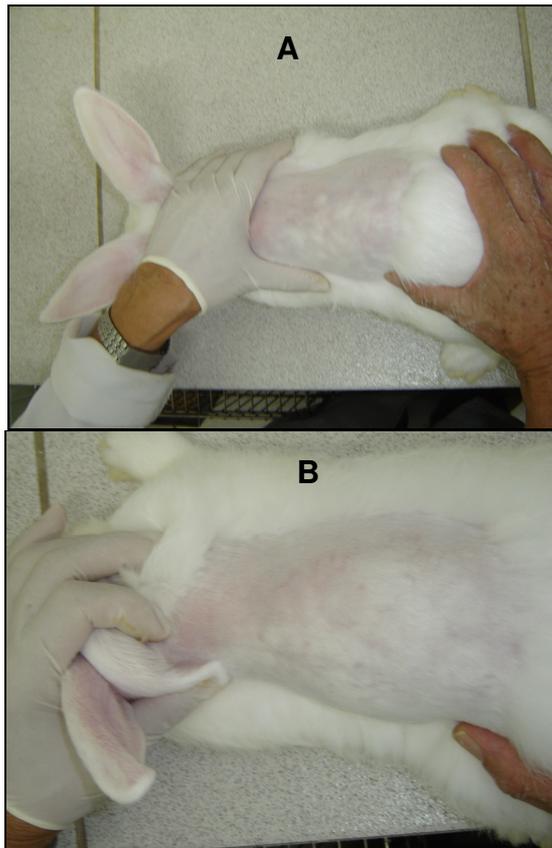


Figura 30 - (A) Resultado do ensaio de toxicidade dérmica primária; (B) resultado do ensaio de toxicidade dérmica cumulativa.

5- DISCUSSÃO

O DMAE glicolato é um dos sais mais recentemente utilizados nas formulações tópicas de dermocosméticos antiidade. O DMAE foi extensamente estudado como um precursor cerebral de COL e conseqüentemente de ACH (HAUBRICH *et al.*, 1975; DE SILVA, 1977; HAUBRICH *et al.*, 1981). Sabe-se que um aumento da concentração de ACH causa um aumento do tônus muscular e o DMAE começou a ser investigado no âmbito cosmético a partir desta premissa, no desejo de se obter formulações capazes de diminuir ou atenuar rugas e linhas de expressão e capazes de produzir um efeito *lifting* inicialmente na região facial (PFEIFFER, 1959 apud MASTEN, 2002; Danysz *et al.*, 1967).

Diversos estudos demonstram a presença de ACH em receptores celulares capazes de modular atividades como proliferação, diferenciação e adesão. Os melanócitos, queratinócitos, células endoteliais, e fibroblastos possuem receptores ou enzimas das classes muscarínicas e nicotínicas que poderiam formar uma rede de transdução de sinal utilizando a ACH como citotransmissor comum a diferentes tipos de células (KLAPPROTH *et al.*, 1997, NDOYE *et al.*, 1998; KUNZEN, 2004).

A utilização específica do DMAE glicolato em dermocosméticos com função antiidade, pode também ser interessante em função da utilização do ácido glicólico na síntese deste sal. O AG é comprovadamente um agente querato-regulador, que atua diretamente na renovação celular, promovendo aumento na densidade epidérmica, aumento da síntese de colágeno, elastina, mucopolissacarídeos e glicosaminoglicanos da derme (GARCIA, 1996; GILCHREST, 1996; HOOD *et al.*, 1999; INAN *et al.*, 2006). O pH recomendado para formulações cosméticas com AG é de no mínimo 3,5 (ANVISA, 2002). Estudos também comprovaram a eficácia

clínica do AG em diferentes pHs e concentrações. Valores de pH de 4,40 e concentração de 3,25% de AG foram citadas, como sendo eficazes clinicamente no aumento da epiderme viável e afinamento do EC (DINARDO *et al.*, 1996).

Conforme pode ser observado na tabela 17, o pH final da formulação A ficou em torno de 5,0 em ambas as condições de armazenamento e o pH da formulação B em torno de 4,4. Ambas apresentando pH apropriado ao uso cosmético. A associação de filtros solares à formulação proposta, permite ao consumidor a facilidade da utilização de um só produto, que ofereça também proteção contra os efeitos deletérios que a exposição à radiação solar pode causar. Conforme demonstrado por diversos autores, a exposição solar colabora para o envelhecimento da pele através de diversos mecanismos (LONGSTRETH *et al.*, 1998; GILCHREST *et al.*, 2000; FISHER *et al.*, 2005).

Atualmente a complexidade da composição dos cosméticos vem aumentando de forma crescente. Há no mercado uma ampla gama de formulações contendo diversos ativos associados. À medida que esta complexidade aumenta, aumentam também as possibilidades de interação e incompatibilidade entre os ativos, possibilitando a ocorrência da inativação dos efeitos desejados e até de efeitos irritantes indesejáveis. Desta forma, o estabelecimento de metodologias analíticas que possibilitem a quantificação dos ativos, permite a garantia da qualidade e segurança para o consumidor.

Atualmente, a CLAE é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na quantificação de fármacos. A maioria das farmacopéias preconiza a utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens como precisão, exatidão, rapidez, seletividade e capacidade de automação. Entretanto, esta técnica apresenta um alto

custo e depende do treinamento constante de uma equipe especializada para sua utilização.

Por outro lado, os métodos titulométricos consistem em ensaios mais simples e de baixo custo, que podem ser aplicados na análise quantitativa de um grande número de compostos. No entanto, a titulometria na grande maioria dos casos, não é capaz de distinguir entre substâncias químicas que porventura apresentem propriedades físico-químicas ou grupos reacionais semelhantes. Desta forma, a titulometria não é considerada um método seletivo (RIBEIRO e VOLPATO, 2005). A titulação potenciométrica em meio não aquoso vem sendo utilizada por diversos fornecedores de matérias-primas para a quantificação do DMAE glicolato na matéria-prima, embora não tenha sido encontrada na literatura científica a descrição ou a proposição deste método. Desta forma, é necessário a padronização e validação de metodologias adequadas.

Para a validação da metodologia por CLAE em FR, foram feitos diversos testes preliminares a fim de se escolher o solvente, concentração e comprimento de onda adequados para o ensaio. Testou-se anteriormente, modificações no pH da fase móvel (FM) para 6,6, modificações na composição da FM adicionando-se acetonitrila a 1, 2 e 5%. Os cromatogramas produzidos nestas condições apresentaram maior cauda no pico do DMAE. Testou-se também a extração do DMAE da formulação, através de uma solução de hexano:tampão fosfato 7,4 (1:1), condição que reproduziu cromatogramas assimétricos e apresentando cauda. As melhores condições de análise apresentadas foram FM tampão fosfato 7,4 e o solvente, uma solução de acetonitrila :tampão fosfato 7,4 (1:1).

Formatados: Marcadores e numeração

A escolha do comprimento de onda adequado é importante para otimização do método. O comprimento de onda escolhido, foi aquele onde é máxima a absorção e maior a sensibilidade. O DMAE glicolato é um cromóforo fraco e, portanto, absorve em baixos comprimentos de onda, em contrapartida ao DMAE acetoamidobenzoato por exemplo, utilizado para uso oral, que possui maior absorvidade.

A fim de garantir que os métodos selecionados forneçam informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos analíticos, foram avaliados neste trabalho quatro parâmetros da validação: seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar de modo inequívoco o analito de interesse na presença de componentes que possam interferir em sua determinação. A especificidade de um método é definida como sua capacidade de detectar apenas uma única substância de interesse. Como há poucos métodos com esta característica, o termo seletividade é o mais apropriado e mais comumente usado (RIBANI, *et al.*, 2004).

Para a determinação da seletividade por CLAE, utilizou-se uma solução contendo o placebo na concentração de 1000 µg/mL, concentração esta que corresponde ao penúltimo ponto da curva de calibração. Concentrações menores não foram avaliadas, uma vez que se pretendia utilizar condições mais rigorosas de análise. Conforme pode ser observado na *Figura 14 (A)*, houve um pequeno pico de retenção na análise do placebo, próximo ao tempo de retenção do DMAE, indicando a possibilidade de uma pequena interferência. Para a avaliação da significância desta interferência, procedeu-se posteriormente a análise da exatidão através da recuperação, nos três níveis de concentração, conforme demonstrado mais adiante.

A análise da exatidão demonstrou que não houve efeito aditivo na porcentagem de recuperação, indicando assim, a ausência de interferência significativa do pico observado para o placebo.

Para a análise da seletividade do método titulométrico em meio não aquoso, titulou-se, em triplicata 2,0 g do placebo, pesada esta semelhante à utilizada para as análises da recuperação na faixa de 120%. Conforme demonstrado na *Tabela 9*, o volume médio gasto na titulação correspondeu a menos de 2,5% do volume gasto na titulação da amostra ao nível de 120 %. Este método foi portanto, considerado específico para a determinação do DMAE glicolato na formulação e matéria-prima.

A linearidade de um método analítico é a capacidade de se demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de concentração especificado. A proporcionalidade deve ser avaliada através de tratamento estatístico adequado, como cálculo da regressão linear. De acordo com a resolução brasileira para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes, de acordo com um intervalo especificado. Para a determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou no produto acabado, o intervalo especificado deve alcançar de 80 a 120% da concentração teórica do teste (ICH, 1996; ANVISA, 2003; USP, 2004).

Verificou-se a linearidade dos métodos através da determinação de uma curva de calibração com cinco níveis de concentração para CLAE e seis níveis para titulometria. Foi realizada análise em triplicata, em três dias diferentes. O tratamento estatístico das curvas demonstrou resultados muito satisfatórios para ambos os métodos, obtendo-se coeficiente de correlação linear (r) de 0,9990 ($\pm 0,0474$) para

CLAE (*Tabela 6*) e $0,9999 (\pm 6,6 \times 10^{-5})$ para análise titulométrica (*Tabela 10*). O coeficiente de correlação linear deve ser de no mínimo 0,99 (ANVISA, 2003).

A precisão de um método é o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra e em condições idênticas de análise (FDA, 1998; ICH, 1996; USP, 2004). Na validação de métodos analíticos, são desejáveis níveis de DPR menores que 5% para a determinação da precisão (ANVISA, 2003).

Verificou-se primeiramente a precisão da injeção para CLAE. A precisão de injeção diz respeito à variabilidade do próprio sistema de injeção. Segundo Ermer e Miller (2005), sistemas dotados de injeção automática devem apresentar faixa de variação de até 0,12 a 2,1 %, quando não controlados por uma especificação interna. A precisão de injeção foi verificada para os três níveis de concentração, com seis replicatas. De acordo com a *tabela 7*, verificam-se níveis de DPR menores que 2,0% para todos os níveis de concentração. O menor nível de concentração verificado (600µg/mL) apresentou maior DPR.

De acordo com os resultados expressos nas *Tabelas 8* para CLAE e *Tabela 11* para titulometria, todos os métodos propostos apresentaram precisão adequada. Para CLAE, observa-se maiores valores de DPR no nível de análise de 80%, onde a concentração do analito foi menor, provavelmente devido à baixa absorvidade do DMAE glicolato e baixo comprimento de onda utilizado (205 nm). Os resultados observados para titulometria foram considerados excelentes, com DPR menor que 1,0 para todos os níveis de concentração.

A exatidão do método pode ser comprovada através dos testes de recuperação e representa o grau de concordância entre resultados individuais

encontrados no ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. É importante ressaltar que o valor verdadeiro ou exato, é aquele obtido por uma medição perfeita, e este valor é indeterminado por natureza (ANVISA, 2003c; RIBANI, *et al.*, 2004). A média da recuperação deve ser de 98% a 102% do valor teórico (Jenke, 1994). A exatidão do método deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003c).

Os ensaios de recuperação foram realizados para ambos os métodos (CLAE e titulometria), em triplicata, nos três níveis de concentração (80, 100 e 120 %), através do ensaio de contaminação ou *spiking*, de modo que o padrão de trabalho foi incorporado às formulações placebo, de acordo com os níveis de concentração determinados no estudo. As *Tabelas 8 e 11* mostram a porcentagem de recuperação das amostras para CLAE e titulometria respectivamente. Os resultados obtidos apresentam-se muito satisfatórios para titulação potenciométrica e bastante razoáveis para CLAE considerando-se as condições simplificadas da análise, o DMAE glicolato como um cromóforo fraco e o baixo comprimento de onda utilizado.

A metodologia desenvolvida para análise da formulação contendo filtros solares e DMAE glicolato por CLAE em fase reversa foi realizada em baixo comprimento de onda (205 nm). Embora a análise em baixos comprimentos de onda apresente algumas desvantagens e maior possibilidade de se obter resultados menos satisfatórios para exatidão, verificou-se, conforme demonstrado na *Tabela 8*, resultados bastante razoáveis, considerando-se as condições simplificadas da análise, obtendo-se recuperação de 103,13% (para o nível de concentração de

80%), 102,7% (para nível de 100 %) e 104,65% para nível de 120%. Alguns artigos citam como satisfatório a exatidão do método para determinação do ácido glicólico em formulações cosméticas utilizando técnicas de extração por fase sólida e pareamento iônico, a partir de 90% (SCALIA *et al.*, 1997). Outro trabalho publicado por Ivanovic´ e colaboradores (1999) considerou como adequadas porcentagens de recuperação de 104 % para vitamina B1 e DPR menor que 4% para repetibilidade na determinação de vitaminas em comprimidos revestidos.

Elegeram-se a forma cosmética gel-creme, por se tratar de um produto com características bastante flexíveis no sentido da adaptação a todos os tipos de pele. Do ponto de vista dermocosmético, as formulações gel-creme acentuam o grau de evanescência da emulsão original, desde que não contenha em sua fase oleosa alta concentração de substâncias graxas de alta oclusão (FERNANDEZ-MONTES, 2005). Devido à baixa concentração de substâncias oleosas (*Tabela 2*) a formulação gel-creme apresenta sensação tátil de gel, com certa refrescância, especialmente para pele oleosas e mistas, podendo ser utilizada por todos os tipos de pele dependendo, porém, dos demais componentes agregados (MARTINI, 2005).

O gel creme pode ser formado a partir da adição de agentes gelificantes hidrofílicos à formulação. É importante salientar o cuidado na escolha deste agente gelificante no sentido de se evitar incompatibilidades entre os componentes e uma possível quebra da emulsão formada. Utilizou-se neste estudo um novo agente gelificante não iônico, derivado do amido de milho, o qual suporta maiores variações de pH, necessário devido à presença do DMAE glicolato.

Ambas as formulações foram planejadas de modo a apresentar um FPS em torno de 8,0, considerado moderado pela ANVISA (ANVISA, 2002) e adequado para

uma proteção solar de uso diário. A baixa concentração dos filtros solares, 6% ao todo, como pode ser verificado na *Tabela 2*, proporcionou uma formulação pouco oclusiva e que pode ser utilizada por todos os tipos de pele, resultado este confirmado posteriormente no teste de biometria cutânea para determinação da oleosidade na pele das voluntárias após o uso da formulação (*Tabela 17*).

A formulação A foi manipulada a frio, utilizando-se o DGE como princípio ativo e a formulação B foi manipulada com aquecimento da fase aquosa, utilizando-se como princípio ativo o DMAE glicolato sintetizado em laboratório (DGN), através da adição quantitativa de AG ao DMAE base livre, sob controle de pH e resfriamento. A manipulação do DGN permite que farmácias com manipulação produzam facilmente o DMAE glicolato a partir das duas matérias-primas.

Padronizou-se para os testes de estabilidade os parâmetros de verificação aspecto e separação de fases; comportamento após centrifugação; pH; viscosidade aparente; avaliação do FPS *in vitro* e determinação do teor do princípio ativo. A escolha dos parâmetros baseou-se no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA. CATEC, 2004). As formulações foram armazenadas em temperatura ambiente monitorada e em estufa climatizada à temperatura de 40 ± 2 °C e saturação da umidade. As formulações A e B armazenadas nas suas embalagens finais de comercialização foram analisadas nos tempos 0; 15; 30; 60; e 90 dias.

A análise dos parâmetros macroscópicos como aspecto visual e separação de fases nos permitiu atestar o caráter adequado para ambas as formulações. Não houve nenhuma modificação visual em relação à cor ou aparência de ambas. Apenas para as formulações A e B armazenadas sob a condição acelerada em estufa, verificou-se uma leve modificação no odor da essência original no tempo 90

dias. As formulações não apresentaram sequer sinal de separação de fases, conforme pode ser verificado na *Tabela 12*.

A centrifugação de uma formulação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade que aumenta a mobilidade das partículas, antecipando possíveis instabilidades que podem ser observadas por exemplo na forma de coalescência, floculação, inversão e separação de fases (ANVISA. CATEC, 2004). Na *Tabela 12* pode se observar os resultados obtidos para o teste de centrifugação. Não se verificou nenhum sinal de modificação ou instabilidade para a formulação *B*, provavelmente devido a sua maior viscosidade aparente quando comparada à formulação *A* (*Tabela 13*). A formulação *A* apresentou no tempo 0, formação de um halo transparente de até 1 mm, na parte superior do tudo da centrífuga e formação de pequena quantidade de um pó amarelado nas paredes. O pó amarelado provavelmente corresponde a benzofenona-3 utilizada como um dos filtros solares da composição. A partir do tempo 15, a formulação *A* (temperatura ambiente) apresentou apenas a formação do halo transparente de até 2 mm. Para a formulação *A* armazenada em condição acelerada, notou-se apenas a formação de um halo líquido de até 1 mm. Este fato pode estar relacionado ao aquecimento da fase aquosa quando da exposição ao calor, causando um aumento na adsorção do polímero, provocando intumescimento deste e acarretando maior viscosidade. A *Tabela 13* demonstra o aumento na viscosidade aparente para a formulação *A* na amostra armazenada sob a condição acelerada em relação à amostra mantida em temperatura ambiente. Na mesma tabela observa-se maiores valores de viscosidade (cps) para a formulação *B*, devido ao fato de a mesma ter sido formulada sob aquecimento da fase aquosa, fato que permitiu de imediato, o aumento da adsorção do polímero gelificante.

Estudos realizados acerca do espalhamento de luz no processo de intumescimento de um gel de acrilamida demonstraram que a heterogeneidade da matriz do gel diminui à medida que a água é incorporada nesta matriz. O processo de intumescimento é mais rápido em temperaturas mais altas (EVINGUR, 2006). Realizou-se o teste *t* na análise da viscosidade das formulações A e B comparando-se as duas condições de armazenamento e verificou-se não haver diferenças estatísticas entre as médias obtidas para a formulação B ($P = 0,0831$). A formulação A apresentou $P < 0,05$, demonstrando haver diferença significativa entre as médias das duas condições de armazenamento. Esta diferença verificada para a viscosidade provavelmente ocorreu devido ao fato da formulação A ter sido formulada a frio. Houve uma maior adsorção de água pelo polímero na amostra armazenada em estufa a 40 °C, em relação àquela que permaneceu a temperatura ambiente. O mesmo não se observou para a formulação B, já que esta foi formulada à quente e as amostras armazenadas em cada condição não sofreram tanta diferença de temperatura. Todas as análises estatísticas foram realizadas para um nível de significância de 95%.

Verificou-se que o pH de ambas as formulações para todos os tempos analisados e condições de armazenamento, não demonstrou diferenças significativas ($P > 0,05$), demonstrando desta forma a estabilidade da formulação quanto a este parâmetro (*Tabela 12*).

A determinação do FPS foi realizada pela metodologia *in vitro* (Mansur, *et al.*, 1986). Este método foi extensamente utilizado em diversos trabalhos e apresenta algumas vantagens no controle de qualidade de formulações. Ele pode ser realizado lote a lote, com simples análises espectrofotométricas e não há a utilização de voluntários. É um método relativamente barato e rápido, que apresenta boa

correlação com método *in vivo* (GARCIA *et al.*, 1990; SANTOS *et al.*, 1999; BARTH, 2000).

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de FPS *in vitro*, pode ser visualizada na *Tabela 14 e figuras 19 e 20*. O tratamento estatístico dos dados foi realizado através da análise de variância com um critério de classificação (*ANOVA one way*), separadamente para cada condição de armazenamento a que as formulações foram submetidas. A análise realizada na formulação A demonstrou existir diferença significativa no FPS entre os tempos analisados ($P < 0,0001$). Uma análise *Post Hoc* realizada através do teste de Tukey comparou separadamente a média obtida para cada tempo. Houve um decaimento de aproximadamente 11% no FPS determinado no tempo 0 em relação ao tempo 90 dias, para a formulação A armazenada a temperatura ambiente ($P < 0,001$). Para a condição acelerada o decaimento foi de aproximadamente 13%, com $P < 0,0001$. Para a amostra B armazenada a temperatura ambiente, observou-se decaimento de 12,8% no FPS do tempo 0 em relação ao tempo 90 dias ($P < 0,001$) e decaimento de 15,5 % para a amostra B armazenada sob a condição acelerada ($P < 0,001$). O Teste *t* realizado para comparação dos resultados de FPS obtidos entre as condições de armazenamento para cada formulação, demonstrou não haver diferenças significativas para a formulação A ($P = 0,861$) e para formulação B ($P = 0,613$). A simples análise dos valores nominais permite observar diferenças muito pequenas nos valores de FPS, de modo que se considerou as amostras estáveis para este critério de classificação. De acordo com Sayre e colaboradores (1979), a análise espectrofotométrica na região do UVB de uma formulação de FPS 15 corresponde a 93,3 % de absorção da radiação UVB em média e não há diferença significativa entre formulações com FPS entre 6 e 8, sendo que ambas apresentam absorção

média da radiação UVB na faixa de 80 %. O maior decaimento do FPS observado para a formulação *B*, pode estar relacionado ao menor pH desta formulação, uma vez que os filtros solares são mais estáveis em pHs próximos da neutralidade. Em pHs neutros há menor possibilidade de se observar deslocamentos batocrômicos ou hipsocrômicos nas bandas de absorção UVB (SHAAT, 1997).

Para a realização dos testes de estabilidade, elegeu-se a titulação potenciométrica em meio não aquoso como a metodologia de escolha para a determinação quantitativa do DMAE glicolato nas formulações *A* e *B* e na matéria-prima sintetizada DGN.

A *Tabela 15* e *Figuras 21* e *22* demonstram os resultados obtidos para o ensaio da determinação do teor de DMAE glicolato nas formulações *A* e *B*. Realizou-se análise estatística nos resultados obtidos através de ANOVA a um critério de classificação (*one way*) para a verificação do comportamento das amostras conforme o tempo de estocagem para cada condição de armazenamento separadamente. A análise estatística da formulação *A*, armazenada a temperatura ambiente, mostrou haver diferenças significativas entre os tempos 0 e 90 dias ($P < 0,05$), embora a diferença nominal observada tenha sido mínima (média de 5,24% de DGE em T0 e média de 5,22% em T 90), verificadas no teste *post hoc* de Tukey. O resultado desta análise estatística está relacionado à pequena variabilidade dos fenômenos observados. Devido a isto podemos concluir pela simples observação dos valores nominais que não houve diferença relevante entre os dados observados. Para a Formulação *A* armazenada na condição acelerada, não houve diferença entre as médias ($P > 0,05$). O decaimento do teor encontrado foi de 0,34%. Para a formulação *B* o teste estatístico aplicado demonstrou diferenças significantes para ambas as condições de armazenamento ($P < 0,001$), comparando-se o T0 em

relação a T90 dias. Observou-se um maior decaimento no teor desta formulação, da ordem de 1,0 % para temperatura ambiente e 1,41% para condição acelerada. De acordo com a legislação brasileira para análise de estabilidade de produtos farmacêuticos, um produto deve apresentar decaimento de até 5% nos parâmetros exigidos para as amostras armazenadas em ambas as condições, por um período de no mínimo 6 meses (ANVISA, 2005). Os resultados obtidos demonstram também a estabilidade do DMAE glicolato frente aos filtros solares utilizados no experimento, não havendo sinal de incompatibilidade química entre eles. Este resultado é bastante significativo para assegurar que as formulações dermocosméticas podem ser produzidas associando-se DMAE glicolato aos filtros solares selecionados, trazendo benefícios quanto à praticidade na utilização de apenas uma formulação contendo proteção solar, sem a necessidade de se utilizar vários produtos cosméticos formulados separadamente.

A análise do teor da matéria-prima DGN obtida em laboratório (*Tabela 16*) mostrou resultados muito satisfatórios. Os resultados estatísticos (*Anova one way*) demonstraram não haver diferença significativa no teor encontrado para T0 em relação a T90 dias ($P > 0,05$). Deste modo esta matéria-prima pode ser facilmente obtida em laboratório e estocada por no mínimo 3 meses, permitindo sua utilização com segurança e eficácia. Aconselha-se o estoque em geladeira devido à volatilidade da matéria-prima.

A verificação da eficácia *in vivo* da formulação através dos testes de biometria cutânea, foi verificada com a formulação A, através de três parâmetros: oleosidade, pH e hidratação da pele de voluntárias nos tempos 0, 15 e 30 dias. O tempo 0 foi considerado o controle, uma vez que as voluntárias estavam livres do uso dermocosméticos por 30 dias. Os dados referem-se então a dois momentos no

mesmo indivíduo, caracterizando pareamento máximo das observações. Realizou-se teste de Friedman para observações pareadas e teste *Post Hoc* de Dunn's (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Os resultados do ensaio realizado para oleosidade estão demonstrados na *Tabela 17 e figuras 24 e 25*. Verificou-se não ter havido diferenças significativas entre a média dos pontos faciais analisados para este parâmetro ($P > 0,05$), o que configura não ter havido estímulo ao aumento da oleosidade na face acarretado pela formulação em ambos os tempos analisados. Verificou-se também uma tendência à diminuição da oleosidade na face dos indivíduos estudados, fato demonstrado pela observação dos valores nominais (*Tabela 17*). Podemos concluir que ocorreu ausência de caráter oleoso da formulação, confirmando a princípio a possibilidade do uso por todos os tipos de pele.

Os resultados obtidos e a análise estatística realizada para a determinação do pH na face das voluntárias, estão demonstrados nas *Figuras 26 e 27 e Tabela 18*. Verificou-se nas médias dos resultados obtidos uma tendência ao aumento do pH da pele da face das voluntárias para uma faixa considerada ótima. A análise estatística da média dos pontos faciais em T0 em relação a T15 dias não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$), porém comparando-se T0 em relação a T30 observa-se claramente um aumento médio nos valores nominais obtidos para a determinação do pH facial e a ocorrência de diferença estatística significativa entre estes tempos ($P < 0,01$). A manutenção do pH cutâneo está diretamente ligada ao equilíbrio do manto hidrolipídico, da homeostase e de funções imunológicas da pele (ZLOTOGORSKI, 1987; LEONARDI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2006). A pele possui a capacidade de regeneração do pH fisiológico em algumas horas, mas é desejável que uma formulação apresente pH compatível com a região facial; tanto melhor se

apresentar uma característica de manutenção deste pH numa faixa ótima (4,5 a 5,5), como demonstrado pela formulação estudada.

Os resultados do ensaio de hidratação podem ser visualizados nas *Figuras 28 e 29* e na *Tabela 19*. Observou-se diferença significativa no aumento médio da hidratação para os oito pontos faciais analisados, nos primeiros 15 dias de uso da formulação (tempo 0 para o tempo 15 dias) ($P < 0,001$) da ordem média de 11,5%. A comparação entre as médias encontradas para T15 e T30 dias, não apresentou diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$), devido principalmente a grande dispersão dos resultados individuais, sendo que o nível de hidratação foi mantido neste período. De um modo geral, 81 % das voluntárias apresentou pequeno aumento na média da hidratação obtida para todos os pontos faciais avaliados do tempo 0 em relação ao tempo 30 dias.

O ensaio de toxicidade dérmica realizado demonstrou não haver sinal de irritação na pele dos coelhos utilizados (*Figura 30*). Este teste demonstrou a segurança da formulação proposta para a utilização como um cosmético de uso diário.

6- CONCLUSÕES

- As matérias-primas analisadas demonstraram conformidade com os valores de referência. Os espectros de IV e UV apresentaram-se semelhantes aos padrões, sendo portanto adequados ao emprego nos estudos decorrentes (USP, 2004; Enciclopédia...,1995; Laudo do fornecedor Embrafarma; MERCK, 2001).
- O método cromatográfico (CLAE) demonstrou linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação) adequados à análise da formulação contendo DMAE glicolato e filtros solares. Ausência de interferência do placebo verificada pelo teste de recuperação (DPR < 5 %).
- O método titulométrico apresentou linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação) excelentes na análise da formulação contendo DMAE glicolato e filtros solares e à matéria-prima DMAE glicolato, apresentando melhor performance que o método CLAE.
- A matéria-prima DMAE glicolato pode ser obtida em laboratório, através de uma reação de neutralização do DMAE base livre com ácido glicólico sob agitação, controle de pH e resfriamento. O DMAE glicolato obtido demonstrou ser estável no período de 90 dias, armazenado a temperatura ambiente.
- A viscosidade formulação A foi menor que a verificada para formulação B devido ao aquecimento da fase aquosa no processo de fabricação da segunda. Ambas foram consideradas estáveis.
- Ambas as amostras foram consideradas estáveis em relação ao aspecto, pH e separação de fases;
- Ambas as amostras consideradas estáveis em relação à determinação do FPS. O menor FPS da formulação B ocorreu devido ao menor pH da formulação.
- As formulações A e B apresentaram estabilidade em relação ao FPS *in vitro* não havendo diferença significativa em relação ao percentual de absorção UVB de uma formulação com FPS entre 6 e 8.

- Ambas as formulações A e B apresentaram-se estáveis em relação ao teor de DMAE glicolato, com decaimento menor que 5% entre o tempo 0 e o tempo 90 dias.
- As formulações contendo DMAE glicolato industrializado (A) e contendo DMAE glicolato obtido em laboratório (B) apresentaram estabilidade semelhante;
- O ensaio de biometria cutânea demonstrou que a formulação analisada não aumentou a oleosidade na pele das voluntárias, demonstrando-se adequada para todos os tipos de pele.
- A formulação demonstrou através dos testes de biometria, equilibrar o pH cutâneo para uma faixa ótima de 4,5 a 5,5.
- A formulação demonstrou ter aumentado a hidratação cutânea em torno de 11,5% em média nos 15 primeiros dias de uso para todos os pontos analisados. O grau de hidratação foi mantido até o 30º dia do teste.
- A formulação não causou irritação dérmica primária ou cumulativa nos coelhos testados, configurando a segurança na utilização da formulação como um cosmético de uso diário.

7- REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC). **Parecer técnico n. 7 de 28 de setembro de 2001**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_alfa.htm>. Acesso em: mar. 2005.

_____. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004. (Séries Temáticas. Qualidade, v.1). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm>. Acesso em : 24 jul. 2004.

_____. **Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos**, maio, 2003 a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>>. Acesso em: 24 jul. 2004.

_____. **Parecer técnico n. 2 de 22 de maio de 2003**. 2003b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_dmae.htm. Acesso em: maio de 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução n. 237, de 22 de agosto de 2002**. Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18298&word=resolu%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: mar. 2006.

_____. **Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003**. 2003c. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>. Acesso em: mar. 2006.

_____. **Resolução RE n. 1 de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word=resolu%C3%A7%C3%A3o%20re>>. Acesso em: 16 jun. 2006.

BARTH, A. L. **Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)– Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

BERNSTEIN E. F. et al. Glycolic acid treatment increases type I collagen mRNA and hyaluronic acid content of human skin. **Dermatol. Surg.**, n. 27, p. 429-431, 2001.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 686, n. 1, p. 3-10, 1996.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries (Ed. Port.)**, v. 14, n. 2, p. 54-57, 2002.

CADENAS, E; DAVIES, K.J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 29, Nos. 3/4, pp. 222–230, 2000

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística Princípios e Aplicações**, Porto Alegre: Artmed, p.78-83, 166-184, 2003.

CHABRIER, P. M. **Cosmetic and/or dermatological compositions containing dimethylaminoethyl p-chlorophenoxyacetate for preventing and repairing dermo-epidermal alterations**. French Patent n. 2757058. 19 June 1998. **Abstract from CA**, n. 129, p. 113303, 1998.

CHEN, H. et al. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 315 p. 52–58, 2006.

COLE, C. A.; GISOLDI, E. M.; GROSSMAN, R. M. Clinical and consumer evaluations of improved facial appearance after 1 month use of topical dimethylaminoethanol. In: ANNUAL MEETING [of the] AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY SCIENTIFIC POSTERS PRESENTATIONS, 60., 2002, New Orleans, LA. **Anais...** New Orleans, LA, 2002. p. 1-4

DMAE como manipular corretamente. Apostila do curso. Rio de Janeiro: CONSULCOM, abril de 2002.

DANYSZ, A. et al. Pharmacological properties of 2-dimethylaminoethanol bimanol, DMAE. I. The influence of DMAE on the function of the central nervous and circulatory systems and striated muscles. **Diss. Pharm. Pharmacol.**, v. 19, n. 5, p. 463-468, 1967a. **Abstract from TOXLIT**, n. 68, p. 1189.

DE PAOLA, M. V. R. V.; RIBEIRO, M. E. Interação entre filtros solares. **Cosmetic&Toiletries**, v. 10, p. 40-50,1998.

DISTANTE, F. et al. Intra and inter-individual differences in sensitive skin. **Cosmetics & Toiletries**, v. 117, n. 7, 2002.

ECCLESTON, G. M. Emulsions and microemulsions. In: SWARBRICK,J.; BOYLAN, J. C. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**, New York: Marcel Dekker, 2002. v. 3, p. 1066-1084.

ERMER, J; MILLER, J. H. McB. **Method validation in pharmaceutical analysis**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. , 2005, p. 21-62.

FLORENCE A. T; ATTWOOD D. **Princípios Físico Químicos em Farmácia**, Editora da USP, São Paulo, p. 345-375; 413-455, 2003

FREEDBERG I. M. et al. (eds). **FITZPATRICK`S Dermatology In General Medicine**, New York: MacGraw Hill Professional, p.107, 2003.

FERNANDEZ-MONTES, E. A. **Técnicas y procedimientos em formulación magistral dermatológica**. Madrid: Ed. E. Aliá, 2005. p. 85-87.

FERREIRA, A. O.; BRANDÃO, M. F.; SILVA, M. A. D. C. G. **Guia prático de farmácia magistral**. Juiz de Fora, MG: Ed. Ortofarma, 2002. p. 356.

FISHER, G.J; XU, Y. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement** (2005) 1, S1—S8.

FR. P. M. Chabrier. **Cosmetic compositions containing meclofenoxate**. European Patent n.1038520. 27 Sept. 2000. **Abstract from CA**, n. 133, p. 256578, 2000.

GARCIA, C. R. C. Atualização em princípios antienvhecimento. **Cosmiatria Méd. Estética**, v. 4, n. 4, p. 9-20, 1996.

GARCIA, S.; SANTOS, E. P. Avaliação do FPS de produtos comerciais por método in vitro. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 71, n. 4, p. 99, 1990.

GARCIA, S.; SANTOS, E. P.; LIMA, M. T. L.; RAMOS, M. F. S. Avaliação do fator de proteção solar por método "in vitro". **Cosmetics & Toiletries (Port.)**, v. 4, n. 1, p. 26-29, 1992.

GASPAR, L. R.; GONÇALVES, G. M. S.; PEREIRA, L. H. T. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Aplicação e padronização de metodologias não invasivas para avaliação de eficácia. **Cosmetics & Toiletries (Port.)**, v.13, n. 5, p.68-73, 2001.

GASPARRO, F. P.; MITCHNICK, M.; NASH, J. F. A review of sunscreen safety and efficacy. **Photochem. Photobiol.**, v. 68,n. 3, p. 243-256, 1998.

GILCHREST, B. A. A review of skin aging and its medical therapy. **Br. J. Dermatol.**, v. 135, n. 6, p. 867-875, 1996.

GOSSELIN, R. E. et al., Ingredient index: deanol. In: **Clinical toxicology of commercial products**. 4. ed. Baltimore: Williams and Wilkins,1976. v. 2, p. 240.

_____. **Clinical toxicology of commercial products**. 5. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 2, p. 401.

GROSSMAN, R. M; GISOLDI, E.M; COLE, C. A. Long term safety and efficacy evaluation of a new skin firming technology: dimethylalminoethanol. In: ANNUAL MEETING [OF THE] AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY SCIENTIFIC POSTERS PRESENTATIONS, 60., 2002, New Orleans, LA. **Anais...** New Orleans, LA, 2002. p. 1 - 4 .

GULSEN, D., CHAUHAN, A. Dispersion of microemulsion drops in HEMA hydrogel: a potential ophthalmic drug delivery vehicle. **Int. J. Pharm.**, v. 292, p. 95-117, 2005.

HABIF, T. P. **Clinical Dermatology: A Color Guide to Diagnosis and Therapy**. Philadelphia: Mosby, 2003. p.7

HEGEDUS, F et al. Non-surgical treatment modalities of facial photodamage: practical knowledge for the oral and maxillofacial professional. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** 2006; v. 35 p. 389–398.

HSDB: Hazardous Substance Data Bank. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+108-01-0>. Acesso em: 16 mai. 2006.

IVANOVIC, D. et al. Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 999-1004, 1999.

JAHAN, M.S. Physics of Optics: Terminology and units. In: LOWE, N. J.; SHAAT, N. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens, development, evaluation and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1990. p-109-112 (Cosmetic Science and Technology Series, v.15).

JANOUSEK, A. Regulatory aspects of sunscreens in europe. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A. **Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 137-147.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 272-280.

KURZEN, H. The extraneuronal cholinergic system of the skin. Basic facts and clinical relevance. **Hautartz**, v. 55, n. 5, p. 453-459, 2004

KLAPPROTH, H. et al., Non neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 355, p. 515-523, 1997.

LISTA de sustancias que no pueden ser utilizadas en productos de higiene personal, cosméticos y perfumes. **MERCOSUR/GMC/RES, n.29/05**. Disponível

em:<http://www.mrree.gub.uy/Mercosur/GrupoMercadoComun/Reunion60/AnexoIII/RES29-05.htm> . Acesso em: 20 jul. 2006.

LONGSTRETH, J. et al. Health risks. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 46, n. 1-3, p. 20-39, 1998.

MANSUR J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Derm.**, v. 61, n. 4, p. 121-124, 1986.

_____. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrometria. **An. Bras. Dermatol.**, v. 61, n. 4, p. 167-172, 1986.

MARTINI, M. C. **Introducion a la dermofarmácia y a la cosmetologia**. Zaragoza: Ed. Acribia, 2005. p. 329.

MASTEN, S. Dimethylethanolamine (DMAE) [108-01-0] and selected salts and esters. **Review of Toxicological Literature**. North Carolina: National Institute of Environmental Health Sciences, 2002. Disponível em : ntp-server.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/DMAE_update_110002.pdf. Último acesso em : jun. 2006.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck e Co. Inc., 2001. p.498, 1213, 1245.

MURPHY, G. M. An update on photoprotection. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 18, p. 1-4, 2002.

NDOVE, A. Localization of muscarinic cholinergic receptor subtypes in human epidermis and keratinocyi'e cell culture.

NGUYEN, V. T. et al. Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. **Life Sciences** .V. 72, Issues 18-19, 28 P. 2081-2085, 2003.

NOHYNEK, G. J.; SCHAEFER H. Benefit and Risk of Organic Ultraviolet Filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.33, p. 285–299 , 2001.

ORIÀ, B. R et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 78(4): jul./ago 2003, p. 425-434.

PDR: Physician's DeskReference, disponível em: http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/dea_0290.shtml. Acesso em: 13 mai. 2006.

PELTOLA, S. et al. Microemulsions for topical delivery of estradiol. **Int. J. Pharm.**, v. 254, p. 99–107, 2003,.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Estética-cosmética**: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele. São Paulo: Andrei Ed., 1998. p. 330-350.

PIERARD, E. G. et al. Measurement of facial skin firmness: topical treatment with Dimethylaminoethanol. In: In: ANNUAL MEETING [of the] AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY SCIENTIFIC POSTERS PRESENTATIONS, 60., 2002, New Orleans, LA. **Anais...** New Orleans, LA, 2002.

PROKSCH, E. et al. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. **Journal of Dermatological Science**. 2006 v.43, p. 159—169

RAMOS e SILVA, M.; CARNEIRO, S. C. A. S. Cosmetics for the elderly. **Clin. Dermatol.**, v. 19, n. 4, p. 413-423, 2001.

RABE, J. H. et al. Photoaging: Mechanisms and repair. **J Am Acad Dermatol**; v. 55. p.1-19, 2006

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A. F.; VOLPATO, N. M. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 852-858, 2005.

ROENIGK, K. R.; ROENIGK Jr., H. H.. **Dermatologic surgery, principles and practice**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 1103-1004.

ROBERT, L. **O envelhecimento**. Lisboa: Instituto Piaget, 1994. p. 21-300.

SANTOS, E. P.; GARCIA,S.; FREITAS, Z. M. F.; BARTH, A. L. Avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 71-76, jul./dez. 2001.

SANTOS, E. P. et al. "In vitro" and "in vivo" determinations of sun protection factors of sunscreens lotions with octylmethoxycinnamate. **International Journal of Cosmetic Science**, n. 20, p. 1-5, 1998).

_____. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreens lotions with octylmethoxycinnamate. **International Journal of Cosmetic Science**, n. 21, p.1-5, 1999.

_____. "In vitro" and "in vivo" determinations of sun protection factors of sunscreens lotions with octylmethoxycinnamate. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 136, p. 155, 1997.

SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LE VEE G. J.; MARLOWE, E. A comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas, **Photochem. Photobiol.** 29 (1979) p.559 – 566.

SERUP, J.; JEMEC, G. B. E. **Handbook of non-invasive methods and the skin**. Denmark: CRC Press , 1995. p. 9 –14.

SCOTTI, L. **Estudo do envelhecimento cutâneo e da eficácia cosmética de substância empregadas em combatê-lo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos - Área de Produção e Controle Farmacêutico)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2002.

SCOTTI, L.; VELASCO M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003. p. 12-108.

SHAAT, N. A. The chemistry of sunscreens. In: LOWE, N. J.; SHAAT, N. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens, development, evaluation and regulatory aspects**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p-263-283 (Cosmetic Science and Technology Series, v.15).

_____. 1 ed. 1990, p.212-216.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin. Pharmacol. Physiol.**, v. 19, n. 6, p. 296-302, 2006.

SILVA, V. V. da et al. Chemical stability and SPF determination of pothomorpe umbellata extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol, **International Journal of Pharmaceutics**, n. 303, p. 125-131, 2005.

SOARES K.V.S; MC GRATH, J.J. The treatment of tardive dyskinesia—a systematic review and meta-analysis. **Schizophrenia Research**. V.39 p.1–16, 1999.

SPICLIN, P.; HOMAR, M.; ZUPANCIC-VALANT, A., et al. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **Int. J. Pharm.**, n. 256, p. 65–73, 2003.

SWATSCHEK, D. et al. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53 p. 107–113, 2002

TAGAMI, H. Measurement of Electrical conductance and impedance. In: SERUP, J.; JEMEC, G. B. E. **Handbook of non-invasive methods and the skin**. Denmark: CRC Press , 1995. p. 159-164.

S. TAJIMA; F. SHIBUE; K. KANEKO. KAO CORPORATION. **Hair cosmetic compositions comprising cis-3-hexenol and ammonium derivatives**. European Patent n. 1190696. Jpn. 27 Mar. 2002. **Abstract from CA**, n. 136, p 284157, 2002.

TRANSDERMAL TECHNOLOGIES, INC., K. B., Kirby, B. Pettersson. **Compositions for rapid and non-irritating transdermal delivery of pharmaceutically active agents and methods for formulating such compositions and delivery thereof.** World Patent n. 2000001351. U.S. 13 Jan. 2000. **Abstract from CA**, n. 132, p. 83678, 2000.

UHODA, I. et al. Split face study on cutaneous tensile effect of 2-dimethylaminoethanol (deanol) gel. **Skin Res. Technol.**, v. 3, n. 8, p.164-167, 2002.

UNITED States Pharmacopoeia. The National Formulary. 27. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. p.1354 –1355; 1373; 2200-2201.

U.S.A. N. V. Perricone. **Method and compositions for treatment and/or prevention of skin damage and aging.** United States Patent n. 5554647. U.S. 10 Sept. 1996. Disponível em: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=5554647.PN.&OS=PN/5554647&RS=PN/5554647>. Acesso em: 10 de maio de 2006.

U.S.A. N. V. Perricone. **Topical compositions and methods for treatment of skin damage and aging using catecholamines and related compounds.** United State Patent n. 5643586. U.S. 1 July 1997. Disponível em: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=14&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=dimethylaminoethanol&s2=perricone&OS=dimethylaminoethanol+AND+perricone&RS=dimethylaminoethanol+AND+perricone>. Acesso em :10 maio 2006.

VALENTA, C., SCHULTZ, K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. **J. Control. Rel.**, v. 95, p. 257–265, 2004.

VEXLER, A. POLYANSKY, I. GORODETSKY, R. Evaluation of skin viscoelasticity and anisotropy by measurement of speed of shear wave propagation with viscoelasticity skin analyzer. **J. Invest. Dermatol.**, n. 113, p. 732-739, 1999.

WLASCHEKA, M. et al. Photoaging as a consequence of natural and therapeutic ultraviolet irradiation—studies on PUVA-induced senescence-like growth arrest of human dermal fibroblasts. **Experimental Gerontology** . v.38 p.1265–1270, 2003.

YILMAZ, E.; BORCHERT H.; Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema - an in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 307, p. 232–238, 2006.

YOUN, S. W. et al. **Skin Res. Technol.** V. 8, p. 168-172, 2002.

ZAHNISER, N. R. et al. Effects of N-methylaminoethanol, and N,N-dimethylaminoethanol in the diet of pregnant rats on neonatal rat brain cholinergic and phospholipid profile. **J. Neurochem.**, n. 30, p. 1245-1252, 1978.

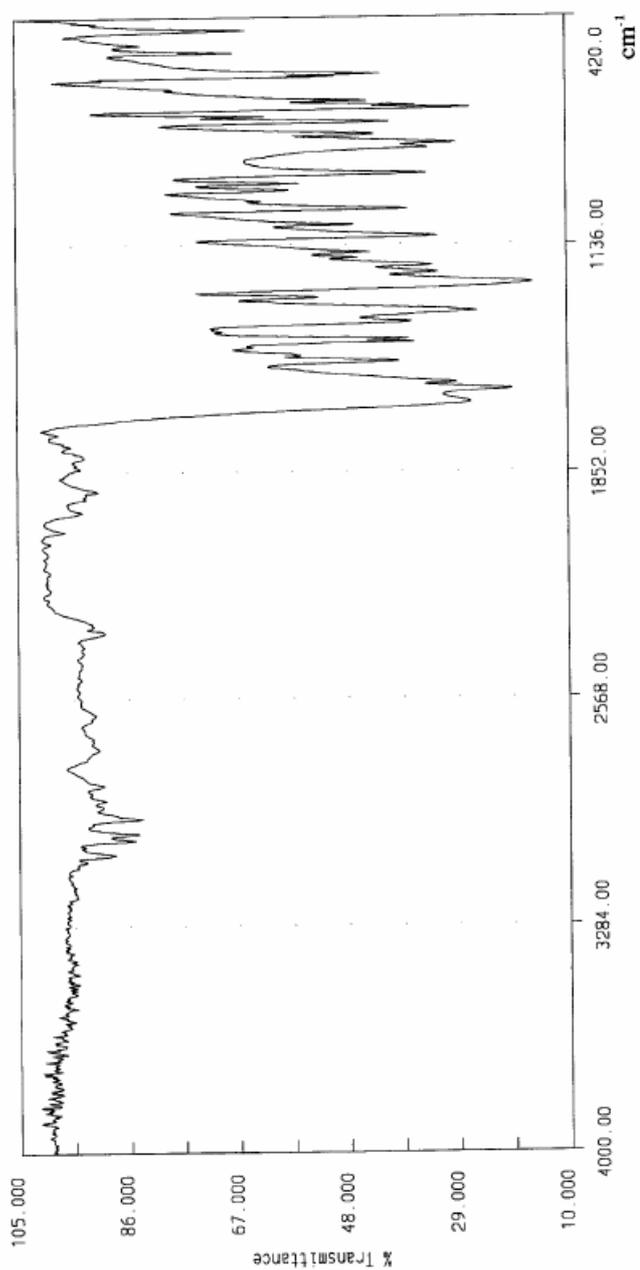
ZEIGER, E. Dimethylethanolamine [108-01-0]. **Review of toxicological literature.** North Carolina, USA: National Institute of Environmental Health Sciences, 1997.

ZLOTOGORSKI, A. Measurement of Skin Surface pH. In: SERUP, J.; JEMEC, G. B. E. **Handbook of non-invasive methods and the skin.** Denmark: CRC Press, p. 223-225, 1995.

APÊNDICE

ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (IV) E ULTRAVIOLETA (UV) DE
REFERÊNCIA

ESPECTRO IV DE REFERÊNCIA DA BENZOFENONA 3



Name : 2-HYDROXY-4-METHOXYBENZOPHENONE

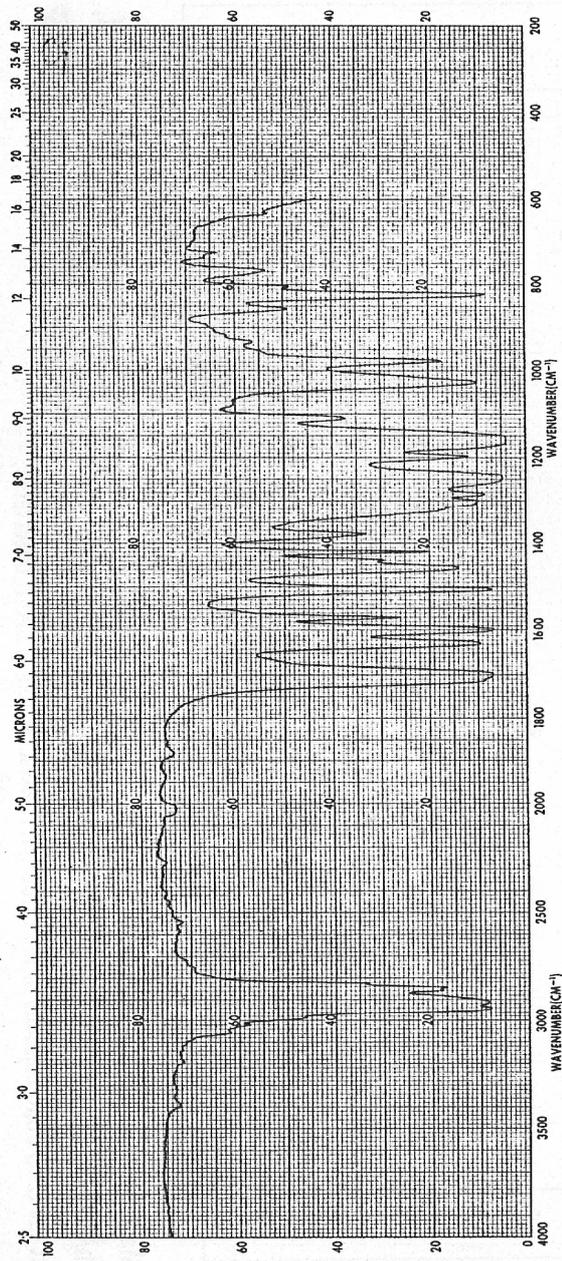
PM Nr : 61360

CAS Nr : 00131-57-7

KBr pellet

ESPECTRO IV DE REFERÊNCIA DO METOXICINAMATO DE OCTILA

OCTYL METHOXY CINNAMATE (Cont.)



IR Spectrum Solvent: neat; NaCl plates. The IR of OMC has an unusually large number of strongly absorbing functional groups. The conjugate ester C=O stretching band is at 1700 cm^{-1} while the conjugated C=C stretching band is at 1628 cm^{-1} . The aromatic ring frequencies appear at 1508 , 1569 , and 1598 cm^{-1} . The C-O bond from the para methoxyl group on the ring is at 1245 cm^{-1} while the ester C-O frequency is at 1160 cm^{-1} . The characteristic hydrogen deformation bands are at 978 cm^{-1} for the trans alkene and 822 cm^{-1} for the ring hydrogens with para substituents.

ESPECTRO UV DE REFERÊNCIA DO OCTOCRILENO

