UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de
formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato
comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e)
Ptychopetalum olacoides Benthham, padronizado em
flavonóides totais

André Rolim Baby

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2005

André Rolim Baby

André Rolim Baby

Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações
cosméticas anticelulíticas contendo o extrato comercial de
Trichilia catigua Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham,
padronizado em flavonóides totais

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a Dr.^a Maria Valéria Robles Velasco
orientadora/presidente

Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
1º. examinador

Prof.^a Dr.^a Nilsa Sumie Yamachita Wadt
2º. examinador

São Paulo, 26 de julho de 2005.

André Rolim Baby

André Rolim Baby

Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de
formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato
comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e)
Ptychopetalum olacoides Benthham, padronizado em
flavonóides totais

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2005

André Rolim Baby

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE – O AUTOR

Ficha Catalográfica

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

	Baby, André Rolim
B115d	Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato comercial de <i>Trichilia catigua</i> Adr. Juss (e) <i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth, padronizado em flavonóides totais. / André Rolim Baby. -- São Paulo, 2005. 159p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles
	1. Produtos naturais : Cosméticos : Tecnologia 2. Emulsão cosmética : Cosméticos : Tecnologia 3. Cosméticos : Controle de qualidade I. T. II. Velasco, Maria Valéria Robles, orientador.
	668.55 CDD

DEDICATÓRIA

Aos meus Senhores,
meus Protetores
que iluminaram e permitiram a realização de cada etapa deste trabalho.

Aos meus pais, João Carlos e Liliam,
À minha irmã, Michele,
À minha tia, Regina,
Aos meus avós, Joaquim e Laurice,
pelo amor e apoio incondicionais,
pela minha formação moral e afetiva
e por tudo que representam em minha vida,
meus modelos.

À minha orientadora,
Prof.^ª Dr.^ª Maria Valéria Robles Velasco,
quem eu admiro e tenho como exemplo,
que nesses anos de convivência,
pela orientação singular e pelos ensinamentos,
contribuiu muitíssimo para o meu desenvolvimento
e minha formação científica, intelectual e pessoal.

André Rolim Baby

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus *Senhores*, por iluminarem meu caminho e por permitirem a condução deste trabalho e que pessoas maravilhosas fizessem parte dele.

À minha mãe, *Liliam*, ao meu pai, *João Carlos*, à minha irmã, *Michele*, à minha tia *Regina* e aos meus avós, *vô Quinca* e *vó Laurice*, pela dedicação, força, paciência e amor.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a *Maria Valéria Robles Velasco*, pela orientação única e valiosa, pela amizade, paciência, dedicação, por acreditar mim e nas minhas idéias.

À *Carol* (Carolina Penteado Moraes Maciel), pela amizade, por sua dedicação, motivação e idéias, uma pessoa especial com quem eu muito aprendi.

À *Clau* (Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto), por acreditar em mim, pela amizade, dedicação, sugestões valiosas, equilíbrio, meu muito obrigado.

À *Dona Lélia*, pelo carinho, cuidado, atenção e força.

À *Tânia Cristina de Sá Dias*, *Idalina Maria Nunes Salgado-Santos*, *Luciana Scotti*, *Vivian Zague*, *Tânia Oishi*, *Livia Martins Del Bosco*, *Raquel Baldin Saponara*, *Ana Paula Darini*, *Renata Costa Oliveira*, *Deborah de Oliveira Nishikawa*, *Denise Helena Green*, *Eduardo Traversa*, *Clara Tsugumi Nakamura Tano*, colegas da Pós-Graduação e da Iniciação Científica, por participarem do meu caminho, pela confiança e amizade.

Aos meus amigos *Alexandre Lauri Henriksen, Caio César Loureiro, Gisele Moraes de Souza, Maria Fernanda Salomão de Azevedo, Fan Jen Yeu, Rodrigo Craveiro de Freitas, Paula Moherdau Blasi e Thay Lyse Salzano de Andrade.*

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Farmacotécnica *Alexandre Gruber Pugliesi, Ana Paula Ghidetti Mazzanti, Bianca Ramos Pezzini, Carla Aparecida Gonçalves dos Santos, Cristiane Yuri Hamai Zaim, Daniela Spuri Bernardi, Eduardo Domingues Tavares, Evelyn Ojoe, Gabriele Wander Ruas, George Gualberto Gualter Oliveira, Gislaine Zulli, Leandro Naoki Tsubone, Mariana Menegassi, Michele Georges Issa, Newton Andreo Filho, Rodrigo Spricigo, Tércio Martins, Thiago Martinello e Vanessa Alves Pinheiro,* por serem pessoas dedicadas e atenciosas, com os quais tive o prazer de dividir momentos excelentes de descontração.

Aos Professores Doutores *Cristina Helena dos Reis Serra, Dominique Corinne H. Fischer, Edna Tomiko Myiako Kato, Elfriede Marianne Bacchi, Elizabeth Igne Ferreira, Humberto Gomes Ferraz, Maria Inês Rocha Miritello Santoro, Mitsuko Taba Ohara, Valentina Porta,* pelo apoio e sugestões.

Às Professoras Doutoras *Telma Mary Kaneko e Vladi Olga Consiglieri,* pelo apoio, confiança, presença e atenção, um muito obrigado especial.

Às Professoras Doutoras *Érika Rosa Maria Kedor e Nilsa Sumie Yamashita Wadt,* por participarem do meu Exame de Qualificação e enriquecerem este trabalho com sugestões maravilhas.

À Secretaria do Departamento de Farmácia, em especial à *Elisabete Claro de Souza Paiva, Celi Teixeira Rabelo e Susy Ramos,* pela paciência e atenção.

À Secretaria de Pós-Graduação, em especial ao *Jorge Alves de Lima*, *Elaine Midori Ychico* e *Majô* (Maria José da Silva) pela sempre disposição e atenção.

Ao *CNPq* (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro e pela Bolsa de Mestrado concedida.

Às empresas *Chemyunion*, *Croda*, *Dow Corning*, *ISP*, *Rhodia*, e *lonquímica*, pela colaboração.

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

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

RESUMO: A hidrolipodistrofia ginóide, popularmente denominada de celulite, é caracterizada como um processo distrófico que produz alterações estruturais dos elementos presentes na pele, como: modificações no tecido conjuntivo, comprometimento da microcirculação periférica cutânea, hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e edema. Os flavonóides são utilizados como substâncias ativas em preparações anticelulíticas por reduzirem a permeabilidade capilar. Os objetivos estabelecidos para esta pesquisa foram: (1) desenvolver emulsões cosméticas com finalidades anticelulíticas; (2) validar metodologia analítica para o doseamento de flavonóides totais, equivalentes em rutina, por espectrofotometria na região do ultravioleta; (3) avaliar a estabilidade física, físico-química e química das formulações. Formulações cosméticas anticelulíticas foram desenvolvidas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham (*Slimbuster*® H1), padronizado em flavonóides totais, equivalentes em rutina, e avaliadas quanto à estabilidade física, físico-química e química. Para sua quantificação, o método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm foi empregado, comparando-se com rutina padrão secundário de referência (T = 96,1%). A avaliação da estabilidade envolveu três condições distintas de temperatura ($5,0 \pm 0,5$; 24 ± 2 e $40,0 \pm 0,5$ °C), pelo período de três meses, e as variáveis analisadas foram as características organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente e teor de flavonóides totais. A metodologia foi validada quanto à linearidade, limites de detecção e quantificação, especificidade e pesquisa de interferentes, recuperação do padrão, precisão e exatidão intra e inter-dias. Os resultados da estabilidade indicaram que o teor de flavonóides totais, equivalentes em rutina, sofreu decaimento inferior a 10% nas condições de exposição à luz solar direta e/ou indireta, à temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), sendo que a $40,0 \pm 0,5$ °C, condição de estufa, ocorreu redução de, aproximadamente, 35%.

Palavras-chave: Hidrolipodistrofia ginóide; Flavonóides; Validação de metodologia analítica; Estabilidade de produtos cosméticos

BABY, A.R. **Development and stability assay of anticellulitic cosmetic formulations containing the *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham commercial extract, standardized in total flavonoids.** São Paulo. 2005. 159 f. Dissertation (Master) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

ABSTRACT: Gynoid hydrolipodystrophy, popularly known as cellulite, is characterized as a dystrophic process that generates structural alterations of skin elements, as: connective tissue modifications, cutaneous microcirculation abnormalities, hypertrophy and hyperplasia of adipocytes and edema. Flavonoids are employed as raw materials in anticellulitic products by their capability to reduce capillary permeability. The objectives established for this research were: (1) development of anticellulitic cosmetic emulsions; (2) analytical method validation for total flavonoids, expressed in rutin, by ultraviolet spectrophotometry; (3) physical, physicochemical and chemical stability assay for the preparations. Anticellulitic cosmetic formulations containing the *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham commercial extract (*Slimbuster*[®] H1), standardized in total flavonoids, expressed in rutin, were developed and their physical, physicochemical and chemical stability was assessed. Flavonoids were quantified within the ultraviolet spectrophotometric method at 361.0 nm as rutin equivalents by comparison with secondary standard rutin (T = 96.1%). Stability assay was conducted in three temperature conditions (5.0 ± 0.5 ; 24 ± 2 e 40.0 ± 0.5 °C) and the following parameters were analyzed: aspect, color and odor, pH and apparent viscosity values and flavonoid content. Analytical methodology was validated determining linearity, limits of detection and quantification, specificity and interferent assay, recovery and intra and inter-run precision and accuracy. Results from stability evaluation have indicated decrease of flavonoid content inferior than 10% at sunlight exposure (room temperature, 24 ± 2 °C) and at 5.0 ± 0.5 °C; high temperature (40.0 ± 0.5 °C) has reduced the flavonoid content at, approximately, 35%.

Key-words: Gynoid hydrolipodystrophy; Flavonoids; Analytical method validation; Stability of cosmetic products

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral da pele. O tecido apresenta disposto em estratos ou camadas.....	3
Figura 2. Tecido adiposo subcutâneo ou panículo adiposo.....	5
Figura 3. Adipócitos. Os múltiplos lóbulos das células adiposas encontram-se separadas pelo sistema conjuntivo vascular.....	6
Figura 4. Sistema microcirculatório periférico cutâneo.....	7
Figura 5. Vaso linfático (indicado pela seta).....	8
Figura 6. Locais freqüentemente afetados pela hidrolipodistrofia ginóide (LDG).....	10
Figura 7. Comprometimento da microcirculação sangüínea periférica em decorrência da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos.....	12
Figura 8. Aspecto ondulado da superfície da pele causado pelo agravamento da hidrolipodistrofia ginóide (LDG).....	12
Figura 9. Septos de fibras colágenas provocando agravamento no aspecto ondulado da superfície da pele.....	13
Figura 10. Aspecto ondulado da superfície da pele acometida pela hidrolipodistrofia ginóide.....	13
Figura 11. Hidrolipodistrofia ginóide de grau II: aspecto normal do relevo da pele em repouso (a) e após contração glútea (b) (ROSSI & VERGNANINI, 2000).....	15

Figura 12. Hidrolipodistrofia ginóide de grau III: aspecto da superfície da pele em repouso (a) e após contração glútea (b) (ROSSI & VERGNANINI, 2000).....	15
Figura 13. Grau IV da hidrolipodistrofia ginóide: (a) relevo da superfície da pele visualizada em repouso e (b) após contração glútea (ROSSI & VERGNANINI, 2000).....	16
Figura 14. <i>Trichilia catigua</i> Adr. Juss, popularmente denominada de catuaba	19
Figura 15. <i>Ptychopetalum olacoides</i> Bentham, planta conhecida vulgarmente como marapuama.....	20
Figura 16. Fórmula estrutural do flavonóide rutina (ROLIM <i>et al.</i> , 2005).....	22
Figura 17. Cremeação (1) e sedimentação (2). A cremeação e a sedimentação são os processos de separação das gotículas da fase interna, a partir da fase contínua, de sistemas emulsionados por ação da gravidade e gradiente de densidade (LOCHEEAD <i>et al.</i> , 1989).....	32
Figura 18. Floculação. Tal fenômeno trata-se da adesão reversível das gotículas da fase interna, com manutenção do filme interfacial e da individualidade, sem coalescência (SILVA & SOARES, 1996)..	32
Figura 19. Coalescência. É o processo de crescimento durante o qual as gotículas emulsificadas da fase interna se unem, promovendo a fusão do filme interfacial de gotículas adjacentes e aumento o diâmetro destas (SILVA & SOARES, 1996).....	33

Figura 20. Aspecto das formulações-teste (1) FLB , (2) FLGM , (3) FLG , (4) FLX e (5) FLXM após avaliação da estabilidade pela Avaliação da Estabilidade Preliminar (Teste do Estresse Térmico).....	75
Figura 21. Indício de separação de fases do sistema emulsionado das formulações-teste (1) FLB e (2) FLBM , após o Teste do Estresse Térmico. As setas indicam a separação de fases (BABY <i>et al.</i> , 2004).....	76
Figura 22. Aspecto modificado da formulação-teste FLGM após o Teste do Estresse Térmico. A seta indica sinais de instabilidade como indícios de cremeação e alteração da coloração (BABY <i>et al.</i> , 2004).....	77
Figura 23. Avaliação Preliminar da Estabilidade para a formulação-teste FLGM . Teste do Estresse Térmico. A seta indica o processo de cremeação.....	77
Figura 24. Curva analítica do flavonóide rutina padrão secundário de referência (T = 96,1%) e coeficientes de correlação linear, R^2 (n = 6). As concentrações da substância química de referência foram 5,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 µg/mL. As leituras das absorbâncias (n = 6) foram obtidas no comprimento de onda de 361,0 nm. Empregaram-se como solvente e branco a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na proporção de 99:1.....	94

Figura 25. Sobreposição dos espectros de absorbância das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência nas concentrações 5,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 µg/mL em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) empregados para a construção da curva analítica. Para cada incremento de concentração da substância química de referência, ocorreu elevação proporcional dos valores de absorbância do espectro. [Abs]: absorbância; *Wavelength (nm)*: comprimento de onda.....

99

Figura 26. Especificidade do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes nas formulações-teste FLX e FLXM e estudo dos interferentes. Sobreposição dos espectros de varredura da absorbância: (1) é o extrato vegetal comercial de *T. catigua* Adr. Juss e *P. olacoides* Bentham (10,0 µg/mL flavonóides totais, equivalentes em rutina); (2) é o flavonóide rutina padrão secundário de referência (10,0 µg/mL); (3) e (4) são as formulações-teste **FLX** e **FLXM** (20,0 mg/mL), respectivamente. A seta indica a sobreposição idêntica do flavonóide rutina padrão secundário de referência e do conteúdo de flavonóides totais do extrato vegetal comercial, equivalentes em rutina, no comprimento de onda de 361,0 nm. *Wavelength* é o comprimento de onda (nm); [Abs] é a absorbância.....

107

Figura 27. Especificidade do método e identificação qualitativa da presença de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato vegetal comercial de *T. catigua* Adr. Juss e *P. olacoides* Bentham. A Figura ilustra a idêntica sobreposição dos espectros de varredura da absorbância para concentrações equivalentes em rutina para a substância química de referência (1) e o extrato comercial *T. catigua* Adr. Juss e *P. olacoides* Bentham (2).....

108

- Figura 28.** Relação entre as concentrações, em $\mu\text{g/mL}$, dos flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthham em função da substância química de referência (rutina padrão secundário, $T = 96,1\%$) para avaliação da especificidade do método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361.0 nm. Foram utilizadas as médias das concentrações, em réplicas de seis, apresentadas na Tabela 12. A mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) foi empregada como solvente e branco de leitura..... 109
- Figura 29.** Variação percentual do valor de pH para a formulação-teste **FLX** nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal..... 128
- Figura 30.** Variação percentual do valor da viscosidade aparente para a formulação-teste **FLX** nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal..... 129
- Figura 31.** Variação percentual do valor de pH para a formulação-teste **FLXM** nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal..... 130
- Figura 32.** Variação percentual do valor da viscosidade aparente para a formulação-teste **FLXM** nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal..... 131

Figura 33. Teor remanescente de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes na formulação-teste **FLX**, em percentagem. As determinações foram realizadas nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e em estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C) no Teste de Estabilidade Normal..... 134

Figura 34. Teor remanescente de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes na formulação-teste **FLXM**, em percentagem. As determinações foram realizadas nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e em estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C) no Teste de Estabilidade Normal..... 135

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1.	Desenvolvimento das formulações-teste. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor) e valor de pH das formulações-teste anticelulíticas, após o período de repouso de 24 horas.....	70
Tabela 2.	Avaliação das formulações-teste quanto ao aspecto, no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade (Testes da Centrifugação e do Estresse Térmico).....	74
Tabela 3.	Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste FLG obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada....	80
Tabela 4.	Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste FLX obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada....	81
Tabela 5.	Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste FLXM obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.	82
Tabela 6.	Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste F1 obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.....	83
Tabela 7.	Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste FCCG obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.	84

Tabela 8. Dados para a construção da curva analítica das diluições seriadas do flavonóide rutina padrão secundário de referência (T = 96,1%) e estudo do intervalo.....	93
Tabela 9. Tratamento estatístico pela análise da variância (ANOVA) aplicado nos resultados para a construção da curva analítica ($\alpha = 5\%$).....	96
Tabela 10. Limites de detecção e quantificação estimados. Concentração teórica do flavonóide rutina padrão de referência, desvio padrão, desvio padrão médio e coeficiente angular proveniente da curva analítica.....	102
Tabela 11. Limites de detecção e quantificação experimentais para o flavonóide rutina padrão de referência secundário (T = 96,1%).....	104
Tabela 12. Dados para a elaboração da curva das concentrações dos flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato comercial de <i>T. catigua</i> (e) <i>P. olacoides</i> em função das concentrações da rutina padrão secundário de referência (T = 96,1%) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico no comprimento de onda a 361,0 nm.....	110
Tabela 13. Especificidade da metodologia analítica espectrofotométrica calculada segundo Feinberg e Raguènès, 1999, para flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato vegetal comercial de <i>T. catigua</i> (e) <i>P. olacoides</i> ($\alpha = 5\%$).....	111

Tabela 14.	Recuperação do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida (0,05% p/p) na formulação-teste FLX	113
Tabela 15.	Recuperação do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida (0,05% p/p) na formulação-teste FLXM	113
Tabela 16.	Precisão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLX	116
Tabela 17.	Precisão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLXM	116
Tabela 18.	Precisão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLX	117
Tabela 19.	Precisão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLXM ..	117
Tabela 20.	Exatidão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLX	119
Tabela 21.	Exatidão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLXM	119
Tabela 22.	Exatidão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLX	120
Tabela 23.	Exatidão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLXM ..	120
Tabela 24.	Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valores de pH e da viscosidade aparente da formulação-teste FLX submetida ao Teste de Estabilidade Normal.....	123
Tabela 25.	Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valores de pH e da viscosidade aparente da formulação-teste FLXM submetida ao Teste de Estabilidade Normal.....	124

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1. Grupos químicos presentes em extratos vegetais e suas ações/indicações correspondentes (FREITAS, 1995; ROSSI, 1996; SANTOS & MELLO, 2000).....	21
Quadro 2. Denominações químicas, comerciais e o estudo crítico dos componentes empregados no desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas contendo o extrato comercial de <i>T. catigua</i> (e) e <i>P. olacoides</i> (BRANDÃO, 2000; CTFA, 2000; CONSULCOM, 2001; CRODA, 2003; DOW CORNING, 2003; ISP, 2003; RHODIA, 2003; CHEYUNION, 2004; IONQUÍMICA, 2004).....	43
Quadro 3. Composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações-teste anticelulíticas (emulsão) apresentando concentração total da cera auto-emulsionante 2,5% p/p.....	49
Quadro 4. Composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações-teste anticelulíticas (emulsão) apresentando concentração total da cera auto-emulsionante 7% p/p.....	50
Quadro 5. Principais parâmetros estabelecidos na validação da metodologia analítica (USP, 2000; USP, 2004).....	90
Quadro 6. Limites percentuais da concentração da substância em exame que devem estar contido no intervalo de linearidade (BRASIL, 2003).....	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. PELE.....	3
2.1.1. ESTRUTURA GERAL DA PELE.....	4
2.1.1.1. EPIDERME.....	4
2.1.1.2. DERME.....	4
2.1.1.3. TECIDO ADIPOSEO, SUBCUTÂNEO OU HIPODERME.....	5
2.1.1.4. MICROCIRCULAÇÃO CUTÂNEA.....	6
2.1.1.5. MICROCIRCULAÇÃO LINFÁTICA.....	7
2.1.2. FUNÇÕES DA PELE.....	8
I. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS SOMENTE POR ELA.....	9
II. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS EM COLABORAÇÃO COM OUTROS ÓRGÃOS.....	9
2.2. HIDROLIPODISTROFIA GINÓIDE.....	9
2.2.1. HISTÓRICO E ETIOLOGIA.....	9
2.2.1.1. CLASSIFICAÇÃO.....	14
2.2.2. TRATAMENTO DA HIDROLIPODISTROFIA GINÓIDE.....	16
2.2.3. MECANISMOS DE AÇÃO ANTICELULÍTICO.....	17
2.3. SLIMBUSTER® H1 – EXTRATO VEGETAL COMERCIAL DE <i>Trichilia catigua</i> Adr. Juss (e) <i>Ptychopetalum olacoides</i> Bentham.....	18
2.3.1. GENERALIDADES.....	18
2.4. FLAVONÓIDES.....	22
2.5. PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	25
2.5.1. SELEÇÃO DAS PLANTAS.....	25
2.5.2. IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	26
2.5.3. CULTIVO.....	26
2.5.4. COLHEITA OU COLETA.....	27
2.5.5. TRATAMENTO.....	27
2.5.6. TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE.....	28
2.5.7. CONTAMINANTES.....	28

2.5.8. CONSERVAÇÃO.....	29
2.5.9. CONTROLE DE QUALIDADE.....	29
2.5.10. TENDÊNCIAS FUTURAS.....	30
2.6. ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS.....	31
2.6.1. ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	33
2.6.1.1. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE).....	34
2.6.1.2. TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA (TEA).....	35
2.6.1.3. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (TEN).....	37
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. MATERIAL.....	40
4.1.1. EQUIPAMENTOS.....	40
4.1.2. REAGENTES E SOLVENTES.....	41
4.1.3. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA.....	41
4.1.4. MATÉRIAS-PRIMAS.....	41
4.1.5. MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO (EMBALAGENS PRIMÁRIAS).....	47
4.2. MÉTODOS.....	48
4.2.1. FORMULAÇÕES-TESTE ANTICELULÍTICAS.....	48
4.2.1.1. COMPONENTES.....	48
4.2.1.2. PROCEDIMENTO GERAL DE PREPARO DAS FORMULAÇÕES-TESTE ANTICELULÍTICAS.....	51
I. FASE A.....	51
II. FASE B.....	51
III. PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO.....	51
IV. FASE C.....	52
4.2.1.3. ANÁLISE DAS FORMULAÇÕES-TESTE.....	52
4.2.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE).....	52
4.2.2.1. TESTE DA CENTRIFUGAÇÃO.....	53
4.2.2.2. TESTE DO ESTRESSE TÉRMICO.....	53
4.2.2.3. CRITÉRIOS DA ANÁLISE.....	54

4.2.3. TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA (TEA).....	54
4.2.3.1. CONDIÇÕES DO TESTE.....	54
4.2.3.2. VARIÁVEIS DO TESTE.....	55
I. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	55
II. VALOR DE pH.....	56
III. VISCOSIDADE APARENTE.....	56
4.2.3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	56
4.2.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	57
4.2.4.1. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE.....	57
4.2.4.2. LIMITE DE DETECÇÃO.....	58
I. LIMITE DE DETECÇÃO ESTIMADO.....	59
II. LIMITE DE DETECÇÃO EXPERIMENTAL.....	59
4.2.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	59
I. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO ESTIMADO.....	60
II. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO EXPERIMENTAL.....	60
4.2.4.4. ESPECIFICIDADE E PESQUISA DE INTERFERENTES.....	60
4.2.4.5. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO.....	62
4.2.4.6. PRECISÃO.....	62
4.2.4.7. EXATIDÃO.....	63
4.2.5. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (TEN).....	64
4.2.5.1. CONDIÇÕES DO TESTE.....	64
4.2.5.2. VARIÁVEIS DO TESTE.....	65
4.2.5.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1. FORMULAÇÕES-TESTE ANTICELULÍTICAS.....	67
5.1.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS FORMULAÇÕES-TESTE.....	69
5.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE.....	73
5.3. TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	78
5.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	88
5.4.1. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE.....	91
5.4.2. LIMITE DE DETECÇÃO.....	100

5.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	101
5.4.4. ESPECIFICIDADE E PESQUISA DE INTERFERENTES.....	105
5.4.5. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO.....	112
5.4.6. PRECISÃO.....	114
5.4.7. EXATIDÃO.....	118
5.5. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (TEN).....	121
 6. CONCLUSÕES.....	 136
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 138

1. INTRODUÇÃO

A inigualável biodiversidade da flora brasileira permitiu à população nativa descobrir uma gama diversa de atividades terapêuticas e embelezadoras das plantas, porém, por meio da casualidade, do empirismo e da tradição de uso. Atualmente, o conhecimento científico substitui, complementa e oferece base ao empirismo na busca de novos princípios ativos, considerando principalmente a demanda crescente nesta área.

Existe tendência atual de incorporação de extratos vegetais em produtos cosméticos, que devem ser padronizados, exigindo rigoroso estudo da planta ou das plantas que o compõe, quanto à sua composição.

Trichilia catigua Adr. Juss. (família Meliaceae), conhecida como catuaba, é uma árvore de ocorrência ampla no Brasil, de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul. A catuaba contém os seguintes constituintes químicos: catuabina, óleos essenciais, taninos, saponinas, esteróides, matéria resinosa e flavonóides. A planta é conhecida popularmente por suas propriedades afrodisíacas e tonificantes. Também são relatadas indicações farmacológicas para tratamento da instabilidade emocional, atividades antiviral e antibiótica, dificuldade de concentração, moléstias do estômago e auxiliar no tratamento de neurastenia.

Ptychopetalum olacoides Benthham (família Olacaceae), vulgarmente conhecida como marapuama, é um arbusto ou árvore pequena originária da Amazônia. Estudos fitoquímicos do extrato da planta indicaram a presença de marapuamina, ácidos graxos livres de cadeia longa, cumarina, alcalóides, saponinas, flavonóides, campesterol, β -sitosterol, taninos e óleos essenciais. Histórica e popularmente todas as partes da planta têm sido usadas com propósitos como tratamento de impotência, distúrbios neuromusculares, reumatismo, resfriado, astenias, imunoestimulante e depressão.

A incorporação do extrato comercial composto pelas plantas catuaba e marapuama nas formulações cosméticas tem por objetivo utilizar suas propriedades antioxidantes e vasoprotetoras na prevenção e atenuação da hidrolipodistrofia ginóide, popularmente denominada de celulite, problema

que afeta cerca de 90% das mulheres após a adolescência, que além do desconforto estético, causa hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo, retenção de líquidos nas áreas afetadas, comprometimento da microcirculação periférica e alterações celulares modificando a morfologia constitucional da epiderme, derme e hipoderme.

Dentre os veículos utilizados no desenvolvimento de formas cosméticas, a emulsão tem apresentado boa aceitabilidade e desempenho adequado. Porém, trata-se de um sistema termodinamicamente instável, exigindo estudo criterioso de sua estabilidade física, química e físico-química, que fornecerá indicações sobre seu prazo de validade. As informações obtidas no estudo de estabilidade são particularmente importantes para os veículos emulsionados, pois quando estocados podem fornecer sinais de desestabilização.

Encontra-se no mercado Cosmético o extrato vegetal comercial composto pelas plantas *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth (Slimbuster® H1), padronizado em conteúdo de flavonóides totais, equivalentes em rutina. Este será incorporado em diferentes bases cosméticas emulsionadas com a finalidade de prevenir ou atenuar a manifestação da hidrolipodistrofia ginóide.

Nesta pesquisa serão desenvolvidas formulações cosméticas na forma de emulsão contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth (Slimbuster® H1), e avaliadas quanto a estabilidade física, físico-química e química por meio da Avaliação da Estabilidade Preliminar, Testes de Estabilidade Acelerada e Teste de Estabilidade Normal. Neste estudo será validada a metodologia analítica para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes nas formulações, por espectrofotometria na região da radiação ultravioleta estabelecendo os parâmetros analíticos preconizados por Compêndios Farmacopéicos, literatura científica e pela Legislação vigente, como: linearidade e curva analítica, limites de detecção e quantificação, especificidade, recuperação, precisão e exatidão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PELE

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

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

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

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

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

2.1.1. ESTRUTURA GERAL DA PELE

2.1.1.1. EPIDERME

A epiderme é a camada mais externa da pele, derivada da ectoderme, em contato direto com o meio ambiente. É avascular e apresenta em sua constituição o epitélio pavimentoso estratificado, terminações nervosas livres e algumas células migratórias provenientes da derme (BENY, 2000; TANO, 2003).

2.1.1.2. DERME

A derme representa aproximadamente 90% da massa total da pele e seus principais componentes, de origem mesodérmica, são constituídos pelo tecido conjuntivo denso (não modelado), vasos sangüíneos e linfáticos e terminações nervosas. Apresenta, também, componentes de origem ectodérmica compostos por pró-colágeno, glicoproteínas, fibrilas e microfibrilas de sustentação (BENY, 2000).

A derme superficial ou papilar encontra-se em contato direto com a epiderme. De espessura reduzida, contém fibras colágenas e elásticas, capilares sangüíneos e vasos linfáticos, fibroblastos, macrófagos e demais células habituais do tecido conjuntivo (PUGLIESI, 1996).

A derme reticular é constituída por tecido conjuntivo denso, fibras colágenas e elásticas, proteoglicanas e relativamente menor proporção de vasos sangüíneos comparada com a derme papilar. São encontradas células, como: fibroblastos, mastócitos, linfócitos, macrófagos e, freqüentemente, células adiposas provenientes da porção mais inferior da

camada reticular (PUGLIESI, 1996; GARTNER & HIATT, 1999; TANO, 2003).

2.1.1.3. TECIDO ADIPOSEO, SUBCUTÂNEO OU HIPODERME

A fisiologia do tecido adiposo é baseada na biossíntese dos triglicerídeos. Existem dois tipos de tecido adiposo: o de coloração marrom, presente em mamíferos hibernantes, nos fetos e recém-nascidos e o branco, predominante em adultos, localizado na hipoderme e formando a panículo adiposo ilustrada na **Figura 2**.

Em função da idade, sexo e estado nutricional, o tecido adiposo modela a silhueta e a fisionomia corporal. No homem, está disposto em maior proporção na região do tronco e abdômen e, na mulher, apresenta maior incidência na região pélvica e abdominal. Esta diferença na distribuição entre homem e mulher corresponde a uma característica sexual secundária que se instala progressivamente após a puberdade (MANSO, 1994b).

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

O tecido adiposo subcutâneo é um tecido conjuntivo composto por múltiplos lóbulos gordurosos separados pelo sistema conjuntivo vascular (**Figura 3**).

A porção conjuntiva é composta por fibras colágenas e de reticulina e células do retículo endotelial. A vascularização é formada por numerosos capilares que recorrem os lóbulos e que circulam cada adipócito. Este sistema vascular gera uma rede linfática intensa, além de apresentar inervação de origem simpática (GARTNER & HIATT, 1999; TANO, 2003).

Além de ser um reservatório energético, exerce também as seguintes funções: armazenamento de triglicerídeos, liberação de ácidos graxos livres e glicerol, proteção mecânica e térmica (MANSO, 1994b).

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

2.1.1.4. MICROCIRCULAÇÃO CUTÂNEA

O sistema microcirculatório periférico cutâneo é composto por cinco elementos (ROSSI & VERGNANINI, 2000): arteríola, vênula, capilar, linfático e tecido intersticial (**Figura 4**).

A microcirculação cutânea está disposta como uma rede tridimensional organizada em dois plexos. O primeiro está situado, aproximadamente, a 1 – 1,5 mm abaixo da superfície da pele e, o segundo, na junção entre derme reticular e a hipoderme (WILKINSON & MOORE, 1990; BRAVERMAN, 2000).

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

2.1.1.5. MICROCIRCULAÇÃO LINFÁTICA

A função primordial da microcirculação linfática é assegurar o transporte das proteínas de alto peso molar desde os tecidos aos vasos sanguíneos. O tecido linfático origina de um remanejamento de estruturas do tecido intersticial e de uma endotelização de fendas e de lacunas no interior das lâminas conjuntivas.

Os vasos linfáticos (**Figura 5**) pertencem à unidade circulatória terminal e o comprometimento de suas funções fisiológicas acarretam em edema e posterior fibrose e esclerose (CIPORKIN & PASCHOAL, 1992).

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

2.1.2. FUNÇÕES DA PELE

A função primordial da pele é a proteção do organismo frente a diversidades do meio externo, como: agentes físicos, químicos e biológicos; microrganismos patogênicos e radiações. Também participa na termorregulação; atua como órgão sensorial; apresenta funções endócrinas (síntese de vitamina D); influencia na reprodução humana e perpetuação da espécie (pela síntese de ferormônio) e, por meio de sinais visuais ou expressões emocionais, é um órgão que permite evidenciar a comunicação não-verbal (ABAMBA, 1993; MENON, 2002).

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

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

I. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS SOMENTE POR ELA

- i. Auto-reparação;
- ii. Proteção mecânica (contra choques, pressão, deformações reversíveis, aderência da palma das mãos e planta dos pés);
- iii. Barreira química: limitação da absorção de substâncias exógenas, conservação da pele e substância endógenas;
- iv. Fotoproteção;
- v. Proteção microbiológica;
- vi. Função psico-social: aspecto físico e expressões psicológicas.

II. FUNÇÕES DA PELE EXERCIDAS EM COLABORAÇÃO COM OUTROS ÓRGÃOS

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

2.2. HIDROLIPODISTROFIA GINÓIDE

2.2.1. HISTÓRICO E ETIOLOGIA

A HLDG, popularmente denominada como celulite, promove mudanças estruturais na estética corporal, envolvendo a aparência física e a textura da pele, transtornos orgânicos e alterações da autoimagem. Esta manifestação ocorre em cerca de 80 a 95% da população feminina após a puberdade (VELASCO *et al.*, 2004). Em termos clínicos e técnicos, a celulite é denominada lipodistrofia ou hidrolipodistrofia ginóide (HLDG) ou

paniculopatia edemato-fibroesclerótica. Envolve uma manifestação de pluralidade etiológica e de caráter loco-regional, mais freqüentemente instalada nos quadris, nos glúteos e nos membros inferiores e, em alguns casos, no abdômen e na porção inferior dos membros superiores (**Figura 6**) (SÁNCHEZ *et al.*, 1994; GERSMAN *et al.*, 1996; PAULINO *et al.*, 2002; TANO, 2003).

Figura 6. Locais freqüentemente afetados pela hidrolipodistrofia ginóide (HLDG) (<http://3dproduction.com/assets/images/cellulite.jpg>).

Alquier e Paviot, 1920 (segundo CIPORKIN & PASCHOAL, 1992), definiram a HLDG como uma distrofia celular de caráter não-inflamatório do sistema mesenquimatoso acompanhada do desequilíbrio hídrico, causando saturação do tecido conjuntivo pelos líquidos intersticiais. Lagèze, 1928 – 1929 (segundo HERMITTE, 1987; CIPORKIN & PASCHOAL, 1992), afirmou a natureza alérgica da HLDG. O autor descreveu três estágios no desenvolvimento da manifestação: infiltração serosa no espaço intersticial celular; fibrose e retração esclerótica. Observou a ausência dos fenômenos inflamatórios e relatou a presença de exsudato de origem vascular, resultante da vasodilatação semelhante ao fenômeno encontrado nas reações alérgicas.

Ricaux, 1936 (segundo HERMITTE, 1987), propôs que a etiologia da celulite estava associada à hiperatividade da paratireóide. Esta teoria foi aceita por Parturier, 1943, que acrescentou uma origem reumática à HLDG e por Weil-Fage, 1952. Rubens-Duval, 1950 (segundo HERMITTE, 1987; CIPORKIN & PASCHOAL, 1992), explicou que o desenvolvimento da manifestação era originário de uma disfunção metabólica. Merlen, 1958 (segundo CIPORKIN & PASCHOAL, 1992), reconheceu origens ou características alérgicas e hemodinâmicas da HLDG. Diversas teorias foram propostas para explicar o comprometimento do sistema microcirculatório periférico, como a modificação físico-química da substância fundamental amorfa, impedindo a circulação dos líquidos intersticiais.

Kermongant, 1960 (segundo CIPORKIN & PASCHOAL, 1992), definiu a origem da HLDG como uma perturbação bioquímica e envolve fatores, como: alteração metabólica da substância fundamental do tecido conjuntivo e deficiência da mucopolissacaridase, causando modificação do equilíbrio biológico dos componentes da matriz extracelular, como por exemplo, a agregação de ácido hialurônico e sulfato de condroitina que provocaria diminuição do valor de pH do interstício e elevação do caráter hidrofílico da região. O distúrbio metabólico acarretaria em extravasamento mais intenso de líquidos do meio intra para o extravascular.

Bassas e Grau, 1966 (segundo HERMITTE, 1987), observaram em pacientes acometidas pela HLDG a ocorrência de edema de caráter não-inflamatório no tecido subcutâneo e hiperpolimerização da substância fundamental intersticial e, em 1972, Müller e Nürnberger explicaram que a formação das depressões da pele (*orangepeel*) era causada pela tensão entre as fibras colágenas e a superfície da pele. Cariel, 1982 (segundo CIPORKIN & PASCHOAL, 1992), relatou que fenômenos sócio-psicológicos desempenhavam papel fundamental na etiologia da HLDG.

Binazzi e Panini, 1982 (segundo HERMITTE, 1987), confirmaram a ocorrência da hiperplasia, hipertrofia e deformação dos adipócitos, além da presença de exsudato. Merlen e Curri, 1982 (segundo HERMITTE, 1987), relataram que a esclerose endoarterial causava modificações no fluxo

sangüíneo, o que explicaria o comprometimento da circulação (**Figura 7**), envolvendo: alteração da permeabilidade capilar, micro-hemorragias, edema e esclerose da microcirculação periférica. Curri, 1971, descreveu no quadro da HLDG a presença de adipócitos hipertróficos, lipodistrofia acompanhada de rompimento de membrana e formação de nódulos.

Figura 7. Comprometimento da microcirculação sangüínea periférica em decorrência da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos (www.hsendermologie.co.uk/cellulite.htm).

Figura 8. Aspecto ondulado da superfície da pele causado pelo agravamento da hidrolipodistrofia ginóide (HLDG) (members.aol.com/lpcell/cellendermo1.html). **Legenda:** *Dermis*: derme; *Fat layers*: tecido adiposo ou subcutâneo; *Muscle layer*: tecido muscular.

Moretti, 1997, e Rosembaum, 1998 (segundo LEONARDI *et al.*, 2001), relacionaram a fáscia superficial com a HLDG, pois os septos de fibras colágenas bloqueiam as áreas acometidas de edema, causando o aspecto ondulado da pele (**Figuras 8, 9 e 10**). A fáscia superficial de mulheres e homens apresenta diferenças estruturais, ocorrendo irregularidades no limite derme-hipoderme e os septos são verticais, favorecendo a formação das ondulações na topografia da pele.

Figura 9. Septos de fibras colágenas provocando agravamento no aspecto ondulado da superfície da pele (www.drhuber.at/kosmetik/kosmetik03b.html).

Figura 10. Aspecto ondulado da superfície da pele acometida pela hidrolipodistrofia ginóide (www.cellulite.com/what_is_cellulite.htm).

A partir do exposto, a HLDG é caracterizada como um processo distrófico que produz modificações estruturais e histológicas dos elementos presentes na epiderme, derme e hipoderme. Promove alterações no tecido conjuntivo e na matriz extracelular, como a excessiva polimerização dos mucopolissacarídeos, resultando no comprometimento do balanço hídrico local, elevação da pressão intersticial e compressão do sistema microcirculatório periférico. O tecido apresenta degeneração das fibras elásticas, proliferação das fibras colágenas, hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e edema (CIPORKIN & PASCHOAL, 1992; PAULINO *et al.*, 2002; TANO, 2003).

Pela complexidade da etiologia da HLDG, podem ser destacados múltiplos fatores desencadeantes e/ou agravantes, como: predisposição genética e hereditariedade; fator hormonal; sedentarismo; fumo; fatores circulatórios; alimentação e álcool; fatores psico-sociais; obesidade; alterações imunológicas e fatores estruturais e fisiológicos do tecido adiposo (CIPORKIN & PASCHOAL, 1992; KUREBAYASHI, 2003; TANO, 2003).

2.2.1.1. CLASSIFICAÇÃO

A hidrolipodistrofia ginóide pode ser classificada segundo o aspecto clínico e histológico (graus ou estágios) ou por meio da avaliação da consistência da pele. Quanto à primeira, resumidamente, tem-se HLDG de:

- i. **Grau I:** assintomático, com ausência das alterações clínicas;
- ii. **Grau II:** palidez, hipotermia, diminuição da elasticidade e a superfície da pele se visualiza normal quando em repouso, porém, após compressão, ocorre alteração do relevo (**Figura 11**);

Figura 11. Hidrolipodistrofia ginóide de grau II: aspecto normal do relevo da pele em repouso (a) e após contração glútea (b) (ROSSI & VERGNANINI, 2000).

- iii. **Grau III:** relevo ondulado da superfície da pele, dor à palpação, redução da elasticidade, sensação palpatória de granulações, palidez e hipotermia (**Figura 12**);

Figura 12. Hidrolipodistrofia ginóide de grau III: aspecto da superfície da pele em repouso (a) e após contração glútea (b) (ROSSI & VERGNANINI, 2000).

- iv. **Grau IV:** engloba as características do grau III com adicional agravante da presença de nódulos palpáveis, visíveis e dolorosos e relevo da superfície da pele altamente alterado (**Figura 13**) (ROSSI, 1996; TANO, 2003).

Figura 13. Grau IV da hidrolipodistrofia ginóide: (a) relevo da superfície da pele visualizada em repouso e (b) após contração glútea (ROSSI & VERGNANINI, 2000).

Quanto à avaliação da consistência da pele, a HLDG pode ser classificada como (ROSSI & VERGNANINI, 2000): **dura** (aspecto compacto, consistente e não sofre modificação independente da posição), **flácida** (relevo da superfície da pele evidente e consistência reduzida), **edematosa** (pele de aspecto brilhante acompanhada de sensação de peso e dor) e **mista** (ocorrência das demais classificações em uma única paciente e em regiões do corpo distintas).

2.2.2. TRATAMENTO DA HIDROLIPODISTROFIA GINÓIDE

Os tratamentos estéticos, holísticos e cirúrgicos empregados até o momento na prevenção e redução da celulite envolvem: massagem e drenagem linfática, cromoterapia, eletrolipoforese, acupuntura, mesoterapia, lipoaspiração, endermologia, indermoterapia, ultra-som, iontoforese, subincisão e talassoterapia (MANSO, 1994a; PAULINO *et al.*, 2002; KUREBAYASHI, 2003).

Dentre as inúmeras possibilidades de prevenção e atenuação do quadro da HLDG, o emprego de produtos cosméticos é o mais amplamente utilizado, pois possui acesso fácil e pode ser conduzido pela usuária, sem necessitar a intervenção de um profissional. Os cosméticos anticelulíticos apresentam em sua composição substâncias ativas com mecanismos de

ação diversos, como: redução da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, inibição da lipogênese, reorganização do tecido conjuntivo por meio do estímulo da regeneração celular, estímulo da microcirculação periférica, drenagem linfática e redução da fragilidade capilar (PAULINO *et al.*, 2002; TANO, 2003; VELASCO *et al.*, 2004).

A incidência elevada da celulite em mulheres exige o desenvolvimento de substâncias ativas funcionais e produtos cosméticos seguros clinicamente e eficazes (HERMITTE, 1987; PAULINO *et al.*, 2002).

2.2.3. MECANISMOS DE AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTICELULÍTICAS

Os adipócitos são células da hipoderme que sintetizam e armazenam os triglicerídeos. Seu conteúdo lipídico pode ser regulado por diferentes mensageiros biológicos e dependendo destes, é produzida ou degradada a gordura, ocorrendo a lipogênese ou a lipólise, respectivamente. Pode ser obtido efeito redutor do conteúdo lipídico interessante se a estimulação da lipólise se complementar com a redução da lipogênese.

A lipólise é estimulada por moléculas que aumentam a atividade da enzima lipase hormônio-sensível (HSL). A HSL é mais ativa quando o nível intracelular aumenta os de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), isto é, quando sua produção eleva ou quando sua degradação é reduzida.

A lipogênese é reduzida por moléculas conhecidas como redutoras da atividade de enzimas envolvidas na formação da nova gordura, como a sintetase de ácidos graxos (FAS). A FAS é inibida por ácidos graxos insaturados e alguns esteróis, como, β -sitosterol e campesterol (MORVAN & MIGUEL, 2002).

A HLDG se caracteriza por alterações celulares e vasculares que modificam a morfologia constitucional do tecido, tanto histológicas como biológicas. Inúmeros sistemas foram testados com intuito de evitar ou atenuar a formação da celulite, entre eles: massagem, cromoterapia, eletrolipoforese, acupuntura, drenagem linfática, mesoterapia e lipoaspiração.

Dentre as formas de tratamento para o combate à celulite, a mais amplamente utilizada é a prevenção com o uso de produtos cosméticos que estimulam a microcirculação periférica cutânea, a reestruturação do tecido conjuntivo e a lipólise.

Cosméticos específicos para a prevenção da celulite contêm diversos princípios ativos com funções definidas para cada atividade. Os principais mecanismos de ação envolvidos, além da melhora na circulação, drenagem linfática e o rearranjo do tecido conjuntivo, abrangem a redução da hipertrofia do tecido adiposo (PAULINO *et al.*, 2002).

2.3. SLIMBUSTER® H1 – EXTRATO VEGETAL COMERCIAL DE *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth

O *Slimbuster*® H1 (Chemyunion, Sorocaba, SP – Brasil) é o insumo composto pela mistura dos extratos hidroglicólicos de duas plantas consideradas exóticas, *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Benth. A padronização do extrato vegetal comercial, em conteúdo de flavonóides totais (1,02% p/p), foi obtida por meio da adição da rutina.

2.3.1. GENERALIDADES

Trichilia catigua A. Juss. (família Meliaceae), popularmente conhecida como catuaba (**Figura 14**), é uma árvore de 3 a 8 m de altura, ramificada, possui copa densa quase até o solo e tem ocorrência ampla no Brasil, de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (SOUZA *et al.*, 2001). Suas propriedades medicinais foram relatadas pelos indígenas e comunidades locais como digestiva, tônica e purgativa.

A catuaba contém os seguintes constituintes químicos: catuabina, óleos essenciais, taninos, saponinas, esteróides, matéria resinosa e flavonóides (ALMEIDA, 1993; MING & CORRÊA-JÚNIOR, 2002).

A planta é conhecida pela população por suas propriedades afrodisíacas e tonificantes. Também são relatadas indicações

farmacológicas para tratamento do sono agitado, instabilidade emocional, atividades antiviral e antibiótica, dificuldade de raciocínio e concentração, moléstias do estômago e auxiliar no tratamento de neurastenia (MANABE *et al.*, 1992).

Figura 14. *Trichilia catigua* Adr. Juss, popularmente denominada de catuaba (www.bdt.fat.org.br/iScan?59+galia+1+0+Trichilia_bAND_bcatigua).

Ptychopetalum olacoides Benthham (família Olacaceae), vulgarmente conhecida como marapuama (**Figura 15**), é um arbusto ou árvore pequena, folhas verde-escuras, flores brancas e pequenas, de odor pungente similar ao jasmim. A Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil, 1929, a descreve e apresenta seu emprego oficial como extrato fluido, pó e tintura de marapuama. É originária da Amazônia e dificilmente se adapta em outras regiões do país.

A triagem fitoquímica do extrato da planta indica a presença de marapuamina, ácidos graxos livres de cadeia longa, cumarina, alcalóides, saponinas, flavonóides, campesterol, β -sitosterol e óleos essenciais (MAUL *et al.*, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2003).

Histórica e popularmente todas as partes da planta têm sido usadas como medicamento por suas propriedades farmacológicas, mas a casca e a raiz são estruturas utilizadas preferencialmente. As tribos indígenas do Brasil utilizam as cascas e as raízes em infusão com vários propósitos como

tratamento de impotência, distúrbios neuromusculares, reumatismo, resfriado e astenias cardíaca e gastrintestinal.

Também são relatadas outras indicações de uso para o tratamento de nevralgias, paralisias parciais, dispepsias, esgotamento, imunoestimulante e depressão nervosa (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2002).

Figura 15. *Ptychopetalum olacoides* Bentham, planta conhecida vulgarmente como marapuama (http://rain-tree.com/Plant-Images?ptychopetalum_olacoides_p1.jpg).

A catuaba empregada no desenvolvimento do extrato vegetal comercial *Slimbuster*[®] H1 é distinta, tanto ao gênero e espécie (*Trichilia catigua*) quanto à família (Meliaceae), daquela descrita pela Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil, 1929, que apresenta a *Anemopaegma mirandum* Alph. Candolle (família Bignoniaceae) como a planta ou extrato oficial, portanto, o composto comercial não se trata do extrato da planta farmacopéica.

Sob o ponto de vista da Ciência Cosmética, a incorporação deste extrato comercial, padronizado em conteúdo de flavonóides totais, em formulações se focaliza nas suas propriedades antioxidante, vasoprotetora, anticelulítica e também pela sua efetividade nas preparações destinadas na prevenção da queda dos cabelos (TAKAHASHI *et al.*, 1999; MORVAN & MIGUEL, 2002).

A eficácia do extrato vegetal padronizado de catuaba e marapuama ocorre pela presença de seus princípios ativos e do efeito sinérgico do conjunto de seus constituintes (USP, 2003).

O **Quadro 1** apresenta a divisão simplificada dos grupos químicos encontrados em extratos vegetais e suas ações.

Quadro 1. Grupos químicos presentes em extratos vegetais e suas ações/indicações correspondentes (FREITAS, 1995; ROSSI, 1996; SANTOS & MELLO, 2000):

Grupos químicos	Atividade
Óleos essenciais	Antisséptica, rubefaciente ou hiperemizante
Mucilagens	Emoliente, hidratante
Taninos	Precipitante de proteínas, cicatrizante, antisséptica, antioxidante, antiinflamatório
Alcalóides	Anticelulítico, lipolítico, vasoprotetor
Flavonóides	Antioxidante, antiinflamatório, vasoprotetor
Saponinas	Ativador da circulação e vasoproteção

O extrato vegetal comercial de *T. catigua* (e) *P. olacoides* pode ser identificado quali e quantitativamente por meio da determinação do marcador taxonômico presente, o flavonóide rutina na concentração de 1,02% p/p, como flavonóides totais, expressos em rutina (COSTA, 2001). Zuanazzi, 2000, justifica a utilização dos flavonóides como marcadores taxonômicos devido a fatores como: relativa abundância em quase todo o reino vegetal, especificidade em determinadas espécies, relativa facilidade de identificação; estabilidade química e seu acúmulo com menor influência das condições ambientais. As demais características físicas e físico-químicas do extrato comercial que permitem sua identificação são: **(1)** Aspecto: líquido; **(2)** Cor: marrom avermelhado; **(3)** Odor: característico; **(4)** Valor de pH (direto): 7,37 e **(5)** Conteúdo de sólidos (180 °C, % p/p): 39,14.

2.4. FLAVONÓIDES

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

Todos flavonóides apresentam em comum a origem, isto é, o processo de síntese. Assim, sob o ponto de vista químico, são compostos formados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a anel aromático. São subdivididos, sucintamente, como segue: flavonol, flavona, catequina, flavana, flavanona, antocianidina e isoflavonóide (COSTA, 1987; BRUNETON, 1991; GUARDIA *et al.*, 2001).

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

A rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina), flavonóide da classe dos flavonóis representada pela **Figura 16**, é empregada na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar (BRUNETON, 1991).

Figura 16. Fórmula estrutural do flavonóide rutina (ROLIM *et al.*, 2005).

Supõe-se que a ação vasoprotetora da rutina ocorra devido a uma elevação da resistência do endotélio, modificação de determinados parâmetros da microcirculação como, por exemplo, redução da síntese de mediadores inflamatórios e da hiperpermeabilidade capilar e redução de edemas. Acredita-se que a rutina promova a inibição da hialuronidase, impedindo o extravasamento das proteínas plasmáticas para o interstício, assim, prevenindo a formação de edemas devido a um possível desequilíbrio hídrico local. Além das atividades acima citadas, existem relatos que de que a rutina reduza a hiperpermeabilidade capilar e eleve o tônus venoso por estimulação da prolina hidroxilase e inibição da prostaglandina E_2 (PGE_2) (ROSSI, 1996; ARAÚJO, 2003).

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

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

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

- Considerando os glicóis mencionados, em ordem crescente de inibição da permeação da rutina, tem-se: propilenoglicol, glicerina e butilenoglicol. No

estudo, apenas foi avaliado o nível de inibição que os umectantes causaram na permeação dos flavonóides veiculados em solução, simulando a fase aquosa de uma emulsão. Os pesquisadores não avaliaram a permeação em veículo emulsionado propriamente dito, forma cosmética amplamente utilizada para a incorporação de princípios ativos anticelulíticos.

Saija e colaboradores, 1998, analisaram o perfil de liberação e permeação cutânea *in vitro* utilizando a pele humana como membrana, obtida de cirurgia de redução de mama dos flavonóides quercetina, naringenina e hesperetina, empregando como método analítico a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção nos comprimentos de onda 254, 287 e 282 nm, para a quantificação dos flavonóides mencionados, respectivamente. Os pesquisadores estudaram a eficiência de dois promotores de permeação cutânea, o d-limoneno e a lecitina de soja. Como veículo, foi empregada a forma cosmética gel hidroalcoólica. Os resultados indicaram que a quercetina não apresentou elevação de permeação com a adição dos promotores utilizados; o d-limoneno aumentou significativamente a permeação da naringenina e a lecitina de soja elevou a permeação da hesperetina. Na pesquisa relatada, o veículo empregado para a incorporação dos flavonóides (gel hidroalcoólico) possuía conteúdo elevado de álcool (50% p/p), o que normalmente não é indicado para uma forma cosmética com fins de massagem, meio comumente utilizado na aplicação de cosméticos anticelulíticos (SAIJA *et al.*, 1998).

Valenta e colaboradores, 1999, verificaram a permeação de rutina, como substância química modelo, veiculada na forma cosmética gel à base de deoxicolato de sódio, hidroxietilcelulose e polímero carboxivinílico. Os veículos apresentaram valores de viscosidade aparente diferentes. Os pesquisadores empregaram membrana artificial e pele de rato para a avaliação da permeação da rutina, com quantificação posterior por CLAE, com detecção a 350 nm, e por espectrofotometria a 405 nm. Os resultados indicaram que o gel à base de deoxicolato de sódio favoreceu a permeação da rutina, atuando como veículo promotor. Os géis formulados com

hidroxietilcelulose e polímero carboxivinílico não obtiveram resultados satisfatórios comparados com os obtidos com a preparação controle (solução aquosa de rutina) (VALENTA *et al.*, 1999).

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

2.5. PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

A produção de extratos de plantas emprega tanto os vegetais silvestres, de ocorrência natural, como os cultivados. Embora exista a conscientização de que as técnicas de manejo sustentável sejam imperativas na preservação das espécies e da biodiversidade, a grande maioria dos extratos brasileiros é proveniente de processos extrativistas (OLIVEIRA, AKISUE e AKISUE, 1998; BUCHWALD-WERNER, 2003).

2.5.1. SELEÇÃO DAS PLANTAS

A seleção visa à obtenção de plantas em condições padronizadas, pois em uma população da mesma espécie podem ocorrer diferenças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

Os efeitos genéticos induzem mudanças quali e quantitativas dos princípios ativos das plantas. Indivíduos da mesma espécie, semelhantes entre si em forma e estrutura (fenotipicamente), podem ser distintos em termos de composição genética (genotipicamente). Tais plantas pertencem a variedades químicas diferentes (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

Na seleção de espécies com potencial de utilização na indústria cosmética, as características morfológicas apresentam importância reduzida, pois pode ocorrer por influência do meio ambiente. Entretanto, a seleção de

variedades (caráter genético) apresenta importância relevante (FITTER & HAY, 1987; BUCHWALD-WERNER, 2003).

2.5.2. IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

Etapa imprescindível para a padronização de um extrato vegetal, realizada pelo laudo analítico emitido por profissional habilitado na área, onde conste: a nomenclatura botânica oficial, a tradicional ou Farmacopéica; indicação da localização da região de origem; parte da planta utilizada e testes de autenticidade (caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica) (OLIVEIRA, AKISUE e AKISUE, 1998; BRASIL, 2002a; FDA, 2003).

As análises quali e quantitativa dos princípios ativos ou marcadores, quando conhecidos, e a exsicata devem estar depositadas em Herbário Oficial. Também são sugeridas informações a respeito da época de coleta da planta ou parte dela (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

2.5.3. CULTIVO

A seleção da variedade tem contribuído para a obtenção de extratos de qualidade superior. No cultivo de plantas destinadas à produção de insumos, devem ser considerados fatores que influenciam na vida vegetal e, portanto, na composição química do seu extrato e podem ser classificados em (LIST & SCHIMIDT, 1989; ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997; OLIVEIRA, AKISUE e AKISUE, 1998):

- i. **Extrínsecos:** fatores relacionados ao meio ambiente que envolvem os climáticos (radiação solar e variação de temperatura), climáticos-edáficos (água e gás carbônico) e edáficos (estrutura física do solo, arejamento, nutrientes minerais, pestes, valor de pH e microrganismos);

- ii. **Intrínsecos:** fatores hereditários e genéticos.

2.5.4. COLHEITA OU COLETA

O teor de princípios ativos de uma planta varia de acordo com o órgão, a idade, a época de colheita e o período do dia quando esta é realizada. O aspecto, os caracteres organolépticos e a qualidade das substâncias dependem da maneira como é efetuada a coleta da planta.

O coletor deve conhecer a morfologia, a fisiologia e a variabilidade dos princípios ativos que ocorrem nas plantas e os ciclos circadianos. Caso ocorra uma coleta inadequada, poderá resultar na inativação parcial ou total dos princípios ativos, assim o procedimento deve ser padronizado (CALIXTO, 2002; BABY *et al.*, 2005).

2.5.5. TRATAMENTO

Após a colheita, a planta ou parte dela deve ser preparada, isto é, deve passar por tratamento de acordo com as características de seus princípios ativos, classificados como descrito a seguir (FITTER & HAY, 1987; LIST & SCHIMIDT, 1989):

- i. **Lavagem:** processo que procura eliminar impurezas que acompanham a planta ou parte dela recém coletada;
- ii. **Mondagem:** visa retirar a camada mais externa da parte da planta coletada, para eliminar impurezas que poderiam causar destruição dos princípios ativos;
- iii. **Secagem:** tratamento mais comum e tem por objetivo eliminar certa quantidade de água da planta, reduzir o volume e facilitar sua conservação;

- iv. Estabilização:** tem por objetivo inibir a ação de enzimas que possam inativar os princípios ativos.

2.5.6. TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE

Os testes de pureza e de integridade incluem os seguintes ensaios: cinzas totais e insolúveis em ácido clorídrico, teor de umidade, pesquisa de matérias estranhas, carga microbiana e metais pesados, dentre outros (FDA, 2003).

2.5.7. CONTAMINANTES

Os produtos de origem vegetal são, freqüentemente, carreadores de microrganismos (patogênicos ou não) e podem apresentar resíduos de defensivos agrícolas que propiciam a contaminação dos estágios subseqüentes da produção.

Quando existe a necessidade de utilização de métodos para eliminar os contaminantes, deve-se verificar sua interação com os princípios ativos e a manutenção de sua integridade (BRASIL, 2002a; FDA, 2003; GARCIA *et al.*, 2003).

As plantas, parte delas ou seus extratos devem ser controlados quanto ao número de microrganismos viáveis, como bactéria, bolor, fungo e levedura e, também, metabólitos resultantes deste como aflatoxina, geralmente provenientes do solo, de contaminações pelo manuseio incorreto ou do ambiente (GARCIA *et al.*, 2003; BABY *et al.*, 2005).

O controle microbiológico abrange também a avaliação dos métodos de descontaminação e esterilização empregados no processo, como radiação gama, calor seco, microondas, entre outros; e os ensaios para a detecção dos microrganismos após a aplicação destes. A técnica empregada deve atender a peculiaridades das substâncias químicas presentes no extrato, com intuito de não causar sua degradação durante o processo.

2.5.8. CONSERVAÇÃO

A conservação dos produtos de origem vegetal envolve as operações de armazenamento, material de acondicionamento e pós-embalagem. Fatores como condições ambientais, estado de divisão da planta e sua granulometria, embalagem e tempo de armazenamento estão relacionados com a conservação da planta ou parte dela coletada (BABY *et al.*, 2005).

2.5.9. CONTROLE DE QUALIDADE

Os fatores críticos para o emprego de extratos vegetais em produtos cosméticos envolvem, principalmente, dificuldades na padronização do extrato e validação da metodologia analítica. Para se garantir a qualidade e a padronização dos produtos derivados de plantas, determinadas informações sobre o extrato vegetal e ensaios físicos, químicos, físico-químicos e microbiológicos devem ser realizados, como (LIST & SCHIMIDT, 1989; CALIXTO, 2002; FDA, 2003; GARCIA *et al.*, 2003):

- i. **Descrição quali e quantitativa do extrato vegetal acabado** (planta ou parte utilizada, solventes ou veículos presentes no extrato acabado);
- ii. **Descrição do processo empregado na produção do extrato** (técnica e tempo de extração, solventes utilizados e condições de produção);
- iii. **Avaliação da qualidade** (aparência, odor, cor, conteúdo de sólidos, identificação química por meio de marcadores, quantificação dos princípios ativos, valor de pH e de viscosidade);

- iv. **Testes microbiológicos** como contagem de microrganismos viáveis, pesquisa de patogênicos e teste de eficácia de conservantes;
- v. **Estudo da estabilidade do extrato;**
- vi. **Informações sobre dados toxicológicos, eficácia clínica e segurança de uso;**
- vii. **Compatibilidade do extrato com matérias-primas e materiais de acondicionamento** (FDA, 2003; GARCIA *et al.*, 2003; BABY *et al.*, 2005).

Os extratos vegetais podem ser obtidos por diferentes técnicas de extração, classificadas como: tinturas, extratos fluidos, moles (semi-sólidos) ou secos. A técnica de obtenção deve ser validada e os solventes ou veículos utilizados devem ser padronizados (LIST & SCHIMIDT, 1989; BRASIL, 2002a; USP, 2003).

Para assegurar a qualidade de produtos derivados de plantas, a indústria cosmética e de insumos deve desenvolver a metodologia analítica apropriada, que englobe desde a avaliação da matéria-prima nas várias etapas do processo produtivo até o produto final.

2.5.10. TENDÊNCIAS FUTURAS

Nos últimos 30 anos, os recursos presentes nas florestas brasileiras passaram a ser descobertos pelo homem moderno, despertando interesse econômico para a indústria farmacêutica e cosmética. Entretanto, como resultado ocorreu intensa destruição dessas áreas.

Inúmeras soluções estão sendo apontadas para o desenvolvimento sustentável das regiões de maior risco de desmatamento, como a utilização

planejada de recursos florestais, através de técnicas de manejo combinadas com a intensificação da agricultura, em áreas já devastadas, e o ecoturismo.

A técnica de manejo é uma estratégia para a viabilização da extração de certas plantas, ou parte delas, de maneira sustentável, mantendo a biodiversidade e elevando o valor agregado do produto. A colheita das plantas ou coleta de parte delas deve ser planejada, “ecologicamente correta” (não agredir o ambiente) e oferecer desenvolvimento e suporte sócio-econômico à comunidade local.

Considerando as dificuldades para garantir a qualidade, reprodutibilidade e padronização de extratos vegetais, a tendência vigente é o cultivo controlado de plantas – fator crucial para manter a qualidade da matéria-prima e, conseqüentemente, do produto final acabado.

Um método alternativo de cultivo de plantas envolve a produção dos princípios ativos desejados por técnicas de cultura celular e, embora possa ser utilizado em determinados casos especiais, são muitas as limitações, como crescimento lento das células, custo elevado dos meios de cultura e das instalações, baixo rendimento dos produtos de metabolização desejados e tendência dos componentes ativos permanecerem armazenados nas células, ao invés de serem secretados para o meio, sendo mais facilmente extraídos (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997; CALIXTO, 2002).

2.6. ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS

Dentre os veículos utilizados no desenvolvimento de formas cosméticas destinadas à incorporação de substâncias ativas com atividade anticelulítica, a emulsão possui boa aceitação no mercado e desempenho adequado. Porém, trata-se de um sistema termodinamicamente instável, exigindo estudo criterioso de sua estabilidade física, química e físico-química, que fornecerá indicações sobre seu comportamento e desempenho, no decorrer de determinado intervalo de tempo, conhecido como prazo de validade (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; RIEGER, 2001).

As informações obtidas no estudo de estabilidade são particularmente importantes para os veículos emulsionados, pois quando estocados podem fornecer sinais de desestabilização como: cremeação, sedimentação, floculação, coalescência e, por fim, separação das fases e a inativação de substâncias ativas e ineficácia do sistema (IDSON, 1988; WASHINGTON, 1996). As **Figuras 17, 18 e 19** ilustram os fenômenos responsáveis pelos processos de desestabilização dos sistemas emulsionados.

Figura 17. Cremeação (1) e sedimentação (2) (www.a-r-d.fr/chimie/chimie2). A cremeação e a sedimentação são os processos de separação das gotículas da fase interna, a partir da fase contínua, de sistemas emulsionados por ação da gravidade e gradiente de densidade (LOCHEEAD *et al.*, 1989).

Figura 18. Floculação (www.agsci.ubc.ca/.../fnh/410/emulsify). Tal fenômeno trata-se da adesão reversível das gotículas da fase interna, com manutenção do filme interfacial e da individualidade, sem coalescência (SILVA & SOARES, 1996).

Figura 19. Coalescência (www.agsci.ubc.ca/.../fnh/410/emulsify). É o processo de crescimento durante o qual as gotículas emulsificadas da fase interna se unem, promovendo a fusão do filme interfacial de gotículas adjacentes e aumento o diâmetro destas (SILVA & SOARES, 1996).

Vários fatores influenciam a estabilidade das formulações, dentre eles (VELASCO-DE-PAOLA, 2001):

- i. **Fatores Extrínsecos:** envolvem as condições externas que os produtos cosméticos ficam expostos, como: tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração.
- ii. **Fatores Intrínsecos:** estão relacionados com a natureza da formulação e a interação de seus componentes. Geram, principalmente, incompatibilidades físicas e químicas que podem resultar em alterações nas características organolépticas da formulação, separação de fases e redução do teor da substância ativa.

2.6.1. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos e farmacêuticos procuram fornecer informações que indiquem o grau de estabilidade relativa de um produto nas diversas condições de exposição a que possa estar sujeito, até o encerramento de seu prazo de validade (BRASIL, 2002b;

BRASIL, 2004a; BRASIL, 2004b; BRASIL, 2004c). Geram subsídios para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como: na escolha dos componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado; forma de apresentação; materiais de acondicionamento e embalagens alternativos e a confirmação do prazo de validade estimado (RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996).

Primeiramente, são avaliadas as características organolépticas (aspecto, cor e odor), o valor de pH e da viscosidade aparente das formulações. Estes parâmetros são estudados comparativamente, considerando as características iniciais do produto e suas alterações ao longo do tempo. Referente ao material de acondicionamento, pode-se utilizar o vidro neutro e/ou o utilizado para o produto embalado, isto é, o material de acondicionamento final (SILVA, 2001; ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004c).

Os estudos de estabilidade geram resultados que são avaliados comparativamente exigindo que os ensaios sejam conduzidos em paralelo com um produto de referência. Este pode ser um produto de mercado, uma formulação recém preparada ou uma amostra armazenada em condições de alteração reduzida, como refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) ou temperatura ambiente ao abrigo da luz e umidade ($22,0 \pm 0,5$ °C), que conhecidamente preserve as características físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas do produto (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2004c).

2.6.1.1. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)

A Avaliação Preliminar da Estabilidade envolve inúmeras formulações e testes que empregam condições drásticas de temperatura, efeito da gravidade e umidade aplicadas às preparações, selecionando as de melhor desempenho quanto a estabilidade física e físico-química. Usualmente, as preparações são submetidas ao ensaio de centrifugação e banho termostatzado. A Avaliação Preliminar da Estabilidade permite que o formulador escolha, dentre as várias fórmulas-teste da etapa de

desenvolvimento do produto e em concordância com os critérios estabelecidos para a aceitação ou rejeição, qual ou quais estão aparentemente estáveis (RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; BRASIL, 2004c).

O Ensaio da Centrifugação pode ser conduzido em temperatura ambiente ($22,0 \pm 0,5$ °C) com duração de tempo de 10 minutos, à velocidade de rotação de 10.000 rpm; 30 minutos a 3.000 rpm, ou 1.000, 2.500 e 3.500 rpm durante 15 minutos para cada valor de velocidade (QUACK, RENG e SKRYPZAK, 1976; WITTERN *et al.*, 1985; CADWALLADER, 1989; WASHINGTON, 1996).

O teste envolvendo o banho termostatzado é realizado sob condições controladas e com valores crescentes de temperatura, que devem ser compatíveis com a estabilidade dos componentes da formulação. O ensaio pode ser conduzido elevando-se gradativa e controladamente o valor inicial de temperatura, mantendo-se por determinado período de tempo até atingir um valor máximo. O ensaio pode ser conduzido a partir de 40 °C (temperatura inicial) até o valor de 80 °C (temperatura final), elevando-se a temperatura em intervalos de 5 ou 10 °C e mantendo 30 minutos para cada valor de temperatura (WITTERN *et al.*, 1985; CADWALLADER, 1989; MAIA, 2002).

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

2.6.1.2. TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)

O Teste de Estabilidade Acelerada é orientativo na previsão da estabilidade do produto em condições drásticas de armazenamento, e de duração reduzida de tempo. As formulações são submetidas ao armazenamento em situações de temperatura e luminosidade extremas

(temperatura ambiente, $22,0 \pm 0,5$ °C; refrigerador, $5,0 \pm 0,5$ °C; ciclos de temperatura, $-10/+45 \pm 0,5$ °C; freezer, $-10 \pm 0,5$ °C; luz solar indireta ou direta com ângulo de incidência da luz a 45° e estufa, $40,0 \pm 0,5$ °C a $50,0 \pm 0,5$ °C) e são criteriosamente avaliadas após os ensaios, selecionando as de melhor desempenho ao teste, submetidas seqüencialmente ao Teste de Estabilidade Normal. Como amostras de referência, também são mantidas preparações no refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) e à temperatura ambiente ($22,0 \pm 0,5$ °C), condições onde são esperadas as menores alterações (RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004c).

Os parâmetros avaliados envolvem as possíveis alterações físicas e físico-químicas, como: aspecto, cor, odor, valor de pH e viscosidade aparente.

O material de acondicionamento possui papel relevante na estabilidade de formulações cosméticas ou farmacêuticas, pois pode proteger o produto da exposição à luz, da umidade e dos gases atmosféricos, porém, não pode evitar o efeito da variação da temperatura do ambiente onde é armazenada (WITTERN *et al.*, 1985; CADWALLADER, 1989; RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996).

Entre os diversos problemas ocasionados às formulações pelo tipo de material de acondicionamento, considerando-se principalmente os polímeros plásticos e os vidros, tem-se: permeabilidade aos gases atmosféricos e ao vapor da água (plástico); transferência dos constituintes do recipiente para o produto (plástico e vidro); adsorção das substâncias ativas para o material de acondicionamento (plástico e vidro); passagem da radiação luminosa (plástico e vidro); e alteração do próprio recipiente durante a armazenagem (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; BABY *et al.*, 2004).

A permeabilidade do material de acondicionamento (plástico) envolve processos de solubilização e difusão. O material penetrante inicialmente se dissolve em uma superfície (externa ou interna) e difunde-se para a outra. A permeabilidade deve ser diferenciada de porosidade, condição na qual orifícios ou rachaduras diminutos estão presentes no material de

acondicionamento. Geralmente, a elevação de temperatura e pressão, bem como a utilização de aditivos na elaboração do polímero plástico tende a elevar sua permeabilidade (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000).

2.6.1.3. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (TEN)

Após o acompanhamento do TEA, as formulações de melhor desempenho serão selecionadas para o Teste de Estabilidade Normal (TEN).

Em geral, o TEN apresenta duração média de 90 a 120 dias e as condições de armazenamento são mais brandas que os testes anteriores, APE e TEA, (temperatura ambiente, $22,0 \pm 0,5$ °C; refrigerador, $5,0 \pm 0,5$ °C; luz solar indireta ou direta com ângulo de incidência da luz a 45° e estufa, $37,0 \pm 0,5$ °C a $45,0 \pm 0,5$ °C). Os resultados obtidos no TEN podem ser extrapolados, a fim de prever o tempo de vida útil do produto (prazo de validade), avaliar a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento e do teor de substância ativa remanescente na formulação ao longo do estudo (QUACK, RENG e SKRYPZAK, 1976; RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; MAIA, 2002; BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004c; PINTO, 2005).

Os parâmetros avaliados englobam as características físicas, físico-químicas e químicas, como: teor da substância ativa, presença de produtos de degradação quando conhecidos, interação entre os componentes da formulação e perda de componentes por absorção/adsorção do material de acondicionamento.

Os estudos da estabilidade pelos TEA e TEN indicam apenas o prazo de validade provável nas condições avaliadas. Quanto maior for a duração do estudo, maior a probabilidade de acerto deste intervalo de tempo (SILVA, 2001).

Os limites que definirão a adequação ou não de uma formulação ao uso dependem da natureza do tipo de parâmetro analisado (físico, químico, microbiológico e toxicológico) e dentre estes, verificam-se: características

organolépticas (aspecto, cor e odor); teor de princípio ativo; valor de pH e de viscosidade aparente; teste de eficácia de conservantes; identificação e quantificação de produtos de decomposição, entre outros; do histórico do produto (caso existam similares) e do grau de percepção do consumidor das alterações ocorridas (BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004c).

3. OBJETIVOS

- i. Desenvolver emulsões cosméticas com finalidades anticelulíticas contendo o extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss, Meliaceae, (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth, Olacaceae, padronizado em conteúdo de flavonóides totais, equivalentes em rotina;
- ii. Validar metodologia analítica para o doseamento de flavonóides totais do extrato vegetal do presente estudo, equivalentes em rotina, empregando a espectrofotometria na região do ultravioleta.
- iii. Avaliar a estabilidade física, físico-química e química das emulsões cosméticas por meio da Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE), Testes de Estabilidade Acelerada (TEA) e Teste da Estabilidade Normal (TEN).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. EQUIPAMENTOS

- i. Balança analítica *Sartorius* (BL - 210S) – Sartorius;
- ii. Balanças semi-analíticas *Mettler* (P - 120) – Mettler – e *Scientech* (SA210) – Quimis;
- iii. Banho-maria termostatzado digital, com agitação e graduação de temperatura entre 0 a 80 °C (500D) – Nova Ética;
- iv. Banho ultrassônico *Ultrasonic Cleaner* – Unique;
- v. Centrífugas *Excelsa Baby* (208N) – Fanem – e *Safety-head* (Base CT 1004) – Adams;
- vi. Destilador de água (106) – Fabbe;
- vii. Espectrofotômetro *Beckman* (DU - 640), com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm – Beckman Coulter;
- viii. Estufa, com graduação de temperatura entre 0 a 100 °C, (002CB) – Fanem e Fabbe;
- ix. *Freezer* (*Slim* 200) – Consul;
- x. Homogeneizador/dispersor *Ultra Turrax* (DI 25), com controle de velocidade variável entre 8.000 a 24.000 rpm – IKA;
- xi. Peagâmetro *Digimed* (DM 20) – Digimed;
- xii. Pipeta automática monocal 100 a 1.000 µL (4500) – Labsystems – e 500 a 5.000 µL (Série 2.100) – Eppendorf;
- xiii. Refrigerador (Ecoplus 370) – Bosch;
- xiv. Viscosímetro *ViscoStar* (R), com adaptador para avaliação de amostras de massa reduzida e agulhas TR8 e TR9 – Fungilab.

4.1.2. REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes e solventes utilizados apresentavam grau de pureza analítico.

- i. Álcool etílico absoluto 99,5% PA-ACS (Synth) – LabSynth;
- ii. Álcool etílico 95% PA-ACS (Synth) – LabSynth;
- iii. Ácido acético glacial PA (Synth) – LabSynth;

4.1.3. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

- i. Rutina padrão de referência secundário, de pureza 96,1% (NF XI, lote 02134 e validade 07/2005), sem anterior purificação – PVP.

4.1.4. MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas empregadas no desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas apresentavam grau de pureza farmacêutico (BRANDÃO, 2000; CTFA, 2000).

- i. 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol – Croda;
- ii. Ácido cítrico (solução a 10% p/p) – LabSynth;
- iii. Adipato de diisopropila – ISP;
- iv. Álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE) – Croda;
- v. Álcool cetosteárilico (e) glicosídeo cetosteárilico – Chemyunion;
- vi. Álcool cetosteárilico (e) metossulfato de berrenil trimetil amônio – Croda;
- vii. Álcool oleílico – Croda;
- viii. Butil hidroxitolueno – LabSynth;
- ix. Ciclometicone – Dow Corning;

- x. Dimeticone/crospolímero de vinil dimeticone (e) C12-14 pareth-12 – Dow Corning;
- xi. Estearato de estearoila octildodecila – ISP;
- xii. Estearato de glicerila (e) álcool berrenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) lecitina (e) álcool laurílico (e) álcool miristílico (e) álcool cetílico – ISP;
- xiii. Extrato comercial hidroglicólico de *Trichilia catigua* Adr. Juss (família *Meliaceae*) (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthham (família *Olacaceae*) com adição do flavonóide rutina, obtendo-se concentração de flavonóides totais padronizados, equivalentes em rutina de 1,02% p/p – Chemyunion – lote (CHL00150703), aparência (líquido), cor (marrom avermelhado), odor (característico), pH (7,37), conteúdo de sólidos (180 °C – 39,14% p/p) e conteúdo de flavonóides totais (rutina – 1,02% p/p) (LAUDO TÉCNICO, 2003);
- xiv. Glicerina – LabSynth;
- xv. Goma xantana – Rhodia;
- xvi. Heptanoato de sódio – Croda;
- xvii. Hidroxipropil guar – Rhodia;
- xviii. Lecitina de soja – Polytechno/lonquímica;
- xix. Neopentanoato de isoestearila – ISP;
- xx. Óleo mineral (e) álcool de lanolina – Chemyunion;
- xxi. Tetraisoestearato de pentaeritritila – Croda;
- xxii. Trietanolamina – LabSynth.

A seguir estão descritas as ações e funções cosméticas das matérias-primas que foram utilizadas nas formulações-teste (**Quadro 2**)^a.

^a As matérias-primas foram denominadas pelos nomes químicos e comerciais segundo os distribuidores/fornecedores (catálogos); Brandão, 2000; CTFA, 2000 e Consulcom, 2001.

Quadro 2. Denominações químicas, comerciais e o estudo crítico dos componentes empregados no desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas contendo o extrato comercial de *T. catigua* (e) e *P. olacoides* (BRANDÃO, 2000; CTFA, 2000; CONSULCOM, 2001; CRODA, 2003; DOW CORNING, 2003; ISP, 2003; RHODIA, 2003; CHEYUNION, 2004; IONQUÍMICA, 2004).

NOME QUÍMICO	NOME COMERCIAL	ESTUDO CRÍTICO – FUNÇÕES/PROPRIEDADES
2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol	Protectol® BN	Agente conservante. Seguro nas concentrações usuais. Efetivo em concentrações baixas de uso. Solúvel em água.
Adipato de diisopropila	Ceraphyl® 230	Emoliente. Éster de ácido e álcool não graxos. Promove sensorial seco e apresenta boa propriedade de espalhamento.
Álcool cetosteearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE)	Crodafos® CES	Cera auto-emulsionante O/A. Apresenta sensorial condicionador e substantividade à pele. Comportamento tixotrópico. Promove a liberação simultânea das fases oleosa e aquosa.
Álcool cetosteearílico (e) glicosídeo cetosteearílico	Montanov® 68	Cera auto-emulsionante de origem vegetal. Favorece a formação de cristais líquidos.
Álcool cetosteearílico (e) metossulfato de berrenil trimetil amônio	Incroquat Behenyl® TMS	Cera auto-emulsionante catiônica. Confere sensorial condicionador e possui boa compatibilidade com a pele.

Quadro 2. Denominações químicas, comerciais e o estudo crítico dos componentes empregados no desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas contendo o extrato comercial de *T. catigua* (e) e *P. olacoides* (BRANDÃO, 2000; CTFA, 2000; CONSULCOM, 2001; CRODA, 2003; DOW CORNING, 2003; ISP, 2003; RHODIA, 2003; CHEYUNION, 2004; IONQUÍMICA, 2004) – Continuação.

NOME QUÍMICO	NOME COMERCIAL	ESTUDO CRÍTICO – FUNÇÕES/PROPRIEDADES
Álcool oleílico	Crodacol® B-10	Emoliente. Apresenta boa propriedade de espalhamento. Co-solvente de substâncias lipossolúveis.
Butil hidroxitolueno	BHT	Agente antioxidante. Retarda a degradação de matérias-primas lipossolúveis frente à oxidação.
Ciclometicone	DC® 245 Fluid	Emoliente. Amaciante da pele.
Dimeticone/crospolímero de vinil dimeticone (e) C12-14 pareth-12	DC® 9509 Silicone Elastomer Suspension	Emoliente. Amaciante da pele.
Estearato de estearoila octildodecila	Ceraphyl® 847	Emoliente. Éster de ácido graxo e álcool graxo ramificado. Aumenta o tempo de aplicação do produto quando incorporado em veículos emulsionados. Promove sensorial diferenciado (<i>cushiony feel</i> ^b) à pele.

^b Efeito almofadado (KAMESHWARI & MISTRY, 1999; CONSULCOM, 2001).

Quadro 2. Denominações químicas, comerciais e o estudo crítico dos componentes empregados no desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas contendo o extrato comercial de *T. catigua* (e) e *P. olacoides* (BRANDÃO, 2000; CTFA, 2000; CONSULCOM, 2001; CRODA, 2003; DOW CORNING, 2003; ISP, 2003; RHODIA, 2003; CHEYUNION, 2004; IONQUÍMICA, 2004) – Continuação.

NOME QUÍMICO	NOME COMERCIAL	ESTUDO CRÍTICO – FUNÇÕES/PROPRIEDADES
Estearato de glicerina (e) álcool berrenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) lecitina (e) álcool laurílico (e) álcool miristílico (e) álcool cetílico	Prolipid® 141	Emulsionante primário não-iônico. Sistema lamelar multifuncional. Promove distribuição uniforme de princípios ativos na pele. Apresenta tolerância frente à valores de pH extremos e eletrólitos. Ação umectante.
Extrato de <i>Trichilia catigua</i> Adr. Juss (e) <i>Ptychopetalum olacoides</i> Bentham	Slimbuster® H1	Princípio ativo anticelulítico. Extrato comercial padronizado em flavonóides totais, equivalentes em rutina, a 1,02% (p/p).
Glicerina	Glicerina	Umectante. Retém água na superfície da pele.
Goma xantana	Rhodicare® S	Espessante hidrofílico aniônico. Apresenta compatibilidade com concentrações elevadas de sais e valores de pH extremos.
Heptanoato de sódio	Crodaquest® A300	Agente quelante/sequestrante de metais. Biodegradável e seguro nas concentrações de uso. Solúvel em água.
Hidroxipropil guar	Jaguar® HP-105	Espessante hidrofílico polimérico não-iônico. Apresenta compatibilidade com concentrações elevadas de sais, valores de pH extremos e soluções alcólicas.

Quadro 2. Denominações químicas, comerciais e o estudo crítico dos componentes empregados no desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas contendo o extrato comercial de *T. catigua* (e) e *P. olacoides* (BRANDÃO, 2000; CTFA, 2000; CONSULCOM, 2001; CRODA, 2003; DOW CORNING, 2003; ISP, 2003; RHODIA, 2003; CHEYUNION, 2004; IONQUÍMICA, 2004) – Continuação.

NOME QUÍMICO	NOME COMERCIAL	ESTUDO CRÍTICO – FUNÇÕES/PROPRIEDADES
Lecitina de soja	Aminolec® 70	Emulsionante/co-emulsionante. Fosfolípídeo empregado como agente emulsionante natural, emoliente, umectante e dispersante.
Neopentanoato de isoestearila	Ceraphyl® 375	Emoliente. Éster de viscosidade aparente baixa. Promove boa espalhabilidade. Reduz o sensorial pegajoso de emolientes com características sensoriais mais oleosas.
Óleo mineral (e) álcool de lanolina	Uniliquid®	Emoliente. Co-emulsionante não-iônico em emulsões A/O e O/A.
Tetraisoestearato de pentaeritritila	Crodamol® PTIS	Emoliente. Promove sensorial agradável e persistente à pele. Compatível com óleo mineral, óleos vegetais, ésteres e silicones de viscosidade aparente baixa.

4.1.5. MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO (EMBALAGENS PRIMÁRIAS)

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

4.2. MÉTODOS

4.2.1. FORMULAÇÕES-TESTE ANTICELULÍTICAS

O desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas abrangeu a elaboração de 14 formulações em veículos emulsionados, avaliando-se a obtenção de emulsões macroscopicamente estáveis, com valores de viscosidade aparente variados, de pH compatível com o da pele e de características organolépticas adequadas (aspecto, cor e odor), segundo critérios do formulador, mercadológicos e outros referendados pela literatura (DENAVERRE, 1993; HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

4.2.1.1. COMPONENTES

Os componentes ou matérias-primas adicionados ou não e em concentrações (% p/p) distintas caracterizaram-se como as variáveis do processo do desenvolvimento das formulações-teste.

A composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações-teste anticelulíticas está descrita nos **Quadros 3 e 4**.

Quadro 3. Composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações-teste anticelulíticas (emulsão) apresentando concentração total da cera auto-emulsionante 2,5% p/p.

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO (% p/p)					
	Nome químico	FLB	FLBM	FLG	FLGM	FLX FLXM
FASE A						
Álcool cetoestearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE)					2,5	
Adipato de diisopropila					1	
Estearato de estearoila octildodecila					2	
Tetraisoestearato de pentaeritritila					2	
Álcool oleílico					3	
Estearato de glicerila (e) álcool berrenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) lecitina (e) álcool laurílico (e) álcool miristílico (e) álcool cetílico					1	
Butil hidroxitolueno					0,1	
Lecitina de soja		-	2	-	2	- 2
FASE B						
Glicerina					6	
Hidroxipropil guar		-	-	0,3	0,3	- -
Goma xantana		-	-	-	-	0,3 0,3
Heptanoato de sódio					0,1	
2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol					0,05	
Água destilada q.s.p.					100,0	
FASE C						
Extrato de <i>Trichilia catigua</i> Adr. Juss (e) <i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth					5 ^c	
Dimeticone/crospolímero de vinil dimeticone (e) C12-14 pareth-12					1	

Legenda:

(-): componente não adicionado

FLB / FLBM / FLG / FLGM / FLX / FLXM: formulações-teste

^c Por indicação do fabricante/fornecedor (Chemyunion, Sorocaba, SP – Brasil), a concentração (% p/p) do extrato vegetal comercial de *T. catigua* Adr. Juss (e) *P. olacoides* Benth incorporado nas formulações-teste foi padronizada em 5,0%

Quadro 4. Composição quali e quantitativa (% p/p) das formulações-teste anticelulíticas (emulsão) apresentando concentração total da cera auto-emulsionante 7% p/p.

COMPONENTES Nome químico	COMPOSIÇÃO (% p/p)							
	F1	FCCG	FCCX	FC	FCG	FCX	FX	FXM
FASE A								
Álcool cetosteárico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE)	-	2,5	2,5	-	-	-	7	7
Álcool cetosteárico (e) glicosídeo cetosteárico	7	4,5	4,5	7	7	7	-	-
Neopentanoato de isoesteárico					1			
Estearato de estearoila octildodecila					2			
Tetraisoesteárico de pentaeritritila					1			
Álcool oleílico					4			
Óleo mineral (e) álcool de lanolina					2			
Álcool cetosteárico (e) metossulfato de berrenil trimetil amônio	1	0,3	-	0,3	0,3	-	-	0,3
Butil hidroxitolueno					0,1			
Lecitina de soja	-	2	2	2	2	2	2	2
FASE B								
Glicerina					6			
Hidroxipropil guar	-	0,3	-	-	0,3	-	-	-
Goma xantana	-	-	0,3	-	-	0,3	0,3	0,3
Heptanoato de sódio					0,1			
2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol					0,05			
Água destilada q.s.p.					100,0			
FASE C								
Extrato de <i>Trichilia catigua</i> Adr. Juss (e) <i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth					5			
Dimeticone/crospolímero de vinil dimeticone (e) C12-14 pareth-12					1			
Ciclometicone					2			

Legenda:

(-): componente não adicionado

F1 / FCCG / FCCX / FC / FCG / FCX / FX / FXM: formulações-teste

4.2.1.2. PROCEDIMENTO GERAL DE PREPARO DAS FORMULAÇÕES-TESTE ANTICELULÍTICAS

I. FASE A

Os componentes álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE), álcool cetosteárilico (e) glicosídeo cetosteárilico, adipato de diisopropila, neopentanoato de isoesteárilico, estearato de esteárol octildodecila, tetraisoesteárilato de pentaeritritila, álcool oleílico, estearato de glicerila (e) álcool berrenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) lecitina (e) álcool laurílico (e) álcool miristílico (e) álcool cetílico, óleo mineral (e) álcool de lanolina, álcool cetosteárilico (e) metossulfato de berrenil trimetil amônio, butil hidroxitolueno e lecitina de soja foram pesados na quantidade equivalente (% p/p) indicados nos **Quadros 3 e 4**, para elaborar de 200 g de preparação e transferidos para béquer de vidro de 200 mL.

II. FASE B

Após pesagem dos componentes glicerina, heptanoato de sódio e 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol em béquer de vidro de 300 mL, efetuou-se a solubilização em água-recém destilada, na quantidade equivalente para elaborar de 200 g de preparação. Após obtenção da solução, adicionaram-se os componentes hidroxipropil guar ou goma xantana, previamente pesados. Procedeu-se à dispersão, empregando-se agitação manual com auxílio do bastão de vidro até obtenção do gel com viscosidade aparente reduzida.

III. PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO

Realizou-se o aquecimento das FASES A e B, separadamente, à temperatura de 75 – 80 °C. A seguir, a FASE A foi adicionada lenta e constantemente à FASE B, sob agitação constante, e pelo período de

3 minutos à velocidade de 8.000 rpm, empregando-se o homogeneizador/dispersor Ultra Turrax®. Após ocorrer o processo de emulsificação pela técnica da inversão de fases (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995; BINKS, 1998; MAIA, 2002; SALAGER *et al.*, 2004; PINTO, 2005), procedeu-se à agitação manual, com auxílio da espátula de plástico flexível do tipo “pão-duro”, até o arrefecimento (35 – 40 °C).

IV. FASE C

Os componentes extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth, ciclometicone e dimeticone/crospolímero de vinil dimeticone (e) C12-14 pareth-12 foram pesados e adicionados ao veículo emulsionado resfriado (35 – 40 °C). Após 24 horas de repouso da preparação, a fim de se completar o processo de emulsificação e obtenção do valor da viscosidade (LANZET, 1993; RIEGER, 2001; TANO, 2003), realizou-se a correção do valor de pH ($5,5 \pm 1,0$) das formulações-teste com adição de trietanolamina ou solução de ácido cítrico 10% (p/p), quando necessário.

4.2.1.3. ANÁLISE DAS FORMULAÇÕES-TESTE

As formulações-teste apresentando sinais de instabilidade (cremeação ou sedimentação, floculação e separação de fases), adicionalmente às propriedades organolépticas consideradas inadequadas, segundo critérios do formulador e também referendadas pela literatura, como aspecto, cor e odor subjetivamente desagradáveis, foram rejeitadas pelo estudo do desenvolvimento das formulações (FOSTER & RYBINSKI, 1998).

4.2.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)

As formulações-teste aprovadas pelo estudo do desenvolvimento e pelos critérios estabelecidos no *item 4.2.1.3.* foram submetidas à Avaliação

Preliminar da Estabilidade. Foram empregados os **Testes da Centrifugação** e do **Estresse Térmico** (WITTERN *et al.*, 1985; RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; MAIA, 2002; BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004c; PINTO, 2005).

4.2.2.1. TESTE DA CENTRIFUGAÇÃO

Foram pesados cerca de 5 g das formulações-teste em tubos para centrífuga. Procedeu-se ao ensaio da centrifugação, em réplicas de três, nas seguintes condições laboratoriais e do equipamento: temperatura ambiente (24 ± 2 °C); velocidades de rotação de 1.000, 2.500 e 3.500 rpm (70, 440 e 863 G, respectivamente); mantendo-se por 15 minutos em cada valor de velocidade (IDSON, 1988; IDSON, 1993; BANOVA, 2002; MAIA, 2002; TANO, 2003).

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

- i. **(IM)** para intensamente modificada;
- ii. **(M)** para modificada;
- iii. **(LM)** para levemente modificada;
- iv. **(N)** para normal, sem alteração quanto ao aspecto (RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; BRASIL, 2004c).

Também foram avaliadas quanto aos valores de pH e da viscosidade aparente, após o tempo de repouso de 24 horas e após o Teste do Estresse Térmico (PINTO, 2005).

4.2.2.2. TESTE DO ESTRESSE TÉRMICO

Foram pesados cerca de 5 g das formulações-teste em tubos de ensaio. As amostras, em réplicas de três, foram submetidas ao estresse térmico, em banho-maria termostaticado, no intervalo de temperatura

controlada entre 40 – 80 °C, com progressão de elevação de 10 °C/30 minutos. As formulações-teste foram avaliadas ao término de 80 °C, após as preparações retornarem à temperatura ambiente (24 ± 2 °C).

Após o ensaio, as formulações-teste foram classificadas como descrito no *item 3.2.2.1* (RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; BANOVA, 2002; MAIA, 2002; BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004c; PINTO, 2005).

4.2.2.3. CRITÉRIOS DA ANÁLISE

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

4.2.3. TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)

Após o preparo das formulações-teste e período de repouso de 24 horas, foram submetidas ao armazenamento, sob condições extremas de temperatura e luminosidade, durante período de tempo pré-estabelecido (MACIEL, BABY e VELASCO, 2004).

Foram pesados cerca de 30 g das formulações-teste e acondicionadas em frascos de polietileno opaco de boca larga, tampa do tipo rosca e batoque, cor branca e capacidade de 50 g (amostras em réplicas de dois).

4.2.3.1. CONDIÇÕES DO TESTE

A seguir, estão descritas as condições adotadas e os dias pré-estabelecidos para as análises. As amostras mantidas sob a condição de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) foram consideradas como amostras de referência

ou padrão para este estudo (BANOV, 2002; BRASIL, 2004c). As análises foram realizadas à temperatura ambiente (24 ± 2 °C).

- i. **$-10,0 \pm 0,5$ °C (freezer)** durante 7 dias: análise no 7º dia;
- ii. **$50,0 \pm 0,5$ °C (estufa)** durante 7 dias: análises no 1º, 3º e 7º dias;
- iii. **$-10,0 \pm 0,5$ °C/24 h (freezer) e $+45,0 \pm 0,5$ °C/24 h (estufa)** alternando-se as temperaturas durante 12 dias (ciclos): análises no 6º e 12º dias;
- iv. **Exposição à luz solar indireta e direta, à temperatura ambiente (24 ± 2 °C)** durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dias;
- v. **$5,0 \pm 0,5$ °C (refrigerador)** durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dias (RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; BRASIL, 2004c).

As propriedades ou características físicas e físico-químicas avaliadas nas formulações-teste, nos dias pré-estabelecidos, foram: características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e de viscosidade aparente (MAIA, 2002; BABY *et al.*, 2004; PINTO, 2005).

4.2.3.2. VARIÁVEIS DO TESTE

I. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Foram avaliados o aspecto, cor e odor das formulações-teste e comparados com os resultados obtidos nas análises efetuadas após 24 horas do repouso (início do teste, dia 0 ou t_0) e, também, com aquelas mantidas em refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), considerada como amostra de referência (BANOV, 2002; TANO, 2003; BRASIL, 2004c).

II. VALOR DE pH

Foi determinado nas dispersões das amostras em água recém destilada, na proporção 1:10 p/p, respectivamente, em réplicas de três e à temperatura ambiente (24 ± 2 °C) (DAVIS, 1977; PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995; MAIA, 2002; TRAVERSA, 2003; PINTO, 2005).

III. VISCOSIDADE APARENTE

Foram pesados cerca de 12 g das formulações-teste e transferidas para dispositivo (compartimento) destinado a análises de pequenas amostras (massa reduzida). As condições do viscosímetro *ViscoStar* (R) foram:

- i. Emulsões contendo concentração de cera auto-emulsionante a 2,5% p/p e de viscosidade aparente reduzida: agulha TR 8 e velocidade de agitação 100 rpm;
- ii. Emulsões contendo concentração de cera(s) auto-emulsionante(s) a 7% p/p e de viscosidade aparente elevada: agulha TR 9 e 6 rpm.

O valor da viscosidade aparente foi registrado após 1 minuto de agitação, à temperatura ambiente de 24 ± 2 °C e na unidade de centiPoise (cP).

4.2.3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras avaliadas pelos Testes de Estabilidade Acelerada foram:

- i. **Aspecto:** integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento, exceto em temperaturas elevadas, *freezer* ou ciclos em que leves modificações foram aceitas;
- ii. **Cor e odor:** normais durante o armazenamento à luz solar indireta e direta à temperatura ambiente e leves modificações foram aceitas em temperaturas elevadas;
- iii. **Valor de pH:** não se admitiu variação superior a $\pm 5\%$, comparadas com o valor inicial em todas as condições de armazenamento;
- iv. **Viscosidade aparente:** admitiram-se modificações, desde que não comprometessem a percepção visual das amostras (BRASIL, 2004c).

4.2.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

4.2.4.1. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

A linearidade do método foi avaliada por meio da curva analítica (USP, 2000; BRASIL, 2003; USP, 2003; USP, 2004) de diluições seriadas do flavonóide rutina padrão secundário de referência ($T = 96,1\%$).

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg da rutina padrão secundário de referência e foi preparada uma solução de concentração de 500,0 $\mu\text{g/mL}$, empregando-se como solvente e branco de leitura espectrofotométrica a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na proporção de 99:1.

Foram realizadas diluições seriadas, nas concentrações: 5,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$ da substância química de referência.

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

Foi construída a curva analítica segundo a média das leituras das absorvâncias em função das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do flavonóide rutina padrão secundário de referência. O cálculo da equação da reta da curva analítica foi realizado pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados (MULHOLLAND & HIBBERT, 1997; LOPES *et al.*, 2003; ROLIM *et al.*, 2005). Para cada concentração foram calculados a média das absorvâncias, o desvio padrão, o desvio padrão relativo e a exatidão, obtendo-se, desse modo, o estudo do intervalo das concentrações da substância química de referência para a avaliação da adequação do intervalo de concentrações e da linearidade oferecida pelo método espectrofotométrico (BRASIL, 2003). O gráfico foi avaliado visualmente, verificando-se se houve relação linear de resposta, e pela análise estatística pertinente (FABRE *et al.*, 1993; ICH Q2B, 1996; FDA, 2000; BRASIL, 2003).

4.2.4.2. LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção é a concentração da substância em análise que possui menor valor capaz de ser detectada com adequado grau de confiabilidade, porém, não quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. É a menor concentração da amostra detectada pela metodologia instrumental da quantificação que se diferencia do ruído do equipamento na relação mínima de ruído:resposta instrumental de 1:3 (GREEN, 1996; ICH Q2B, 1996; JENKE, 1996; USP, 2000; FDA, 2001; BRASIL, 2003).

I. LIMITE DE DETECÇÃO ESTIMADO

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

$$\text{Limite de detecção} = LD = \frac{3,3 \times \sigma}{CA}$$

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

II. LIMITE DE DETECÇÃO EXPERIMENTAL

Determinou-se o limite de detecção experimental por meio das diluições seriadas do flavonóide rutina padrão secundário de referência na mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) como solvente, nas concentrações: 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 e 1,50 µg/mL.

As diluições foram submetidas à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 361,0 nm, em réplicas de três. O solvente foi utilizado como o branco de leitura.

Segundo Green, 1996, e Jenke, 1996, a concentração precedente àquela que apresentar desvio padrão relativo superior a 20% será o limite de detecção para método espectrofotométrico para a quantificação da rutina.

4.2.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação é a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores limites de precisão e exatidão adequados apresentam-se referendados pela literatura (GREEN, 1996; ICH Q2B, 1996; JENKE, 1996; USP, 2000; BRASIL, 2003; USP, 2004).

I. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO ESTIMADO

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

$$\text{Limite de quantificação} = LQ = \frac{10 \times \sigma}{CA}$$

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

II. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO EXPERIMENTAL

O limite de quantificação experimental foi obtido segundo o método descrito no *subitem II, item 4.2.4.2*. Admitir-se-á a concentração do flavonóide rutina como limite de quantificação, aquela que apresentar valor de desvio padrão relativo inferior ou igual a 5,0% e valor exatidão próximo a 100% (JENKE, 1996; BRASIL, 2003).

4.2.4.4. ESPECIFICIDADE E PESQUISA DE INTERFERENTES

A especificidade e a pesquisa de interferentes do método foram obtidas comparando-se, por meio da sobreposição dos espectros de varredura da absorbância, em réplicas de dois e no intervalo de 250,0 – 400,0 nm, o flavonóide rutina padrão de referência secundário, o extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Bentham (1,02% flavonóides totais, equivalentes em rutina) e as formulações-teste selecionadas no TEA (PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965; POLESELLO, 1997; FDA, 2001; ROLIM *et al.*, 2005).

A substância química de referência foi diluída conforme o procedimento descrito no *item 4.2.4.1*.

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg do extrato comercial de *T. catigua* Adr. Juss e *P. olacoides* Benthams (1,02% flavonóides totais, equivalentes em rutina) e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Posteriormente, a amostra foi centrifugada, a 3.500 rpm durante 5 minutos. Tomou-se alíquota do sobrenadante e procedeu-se à diluição, obtendo-se a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de flavonóides totais, equivalentes em rutina.

Foram pesados exatamente cerca de 500,0 mg das formulações-teste sem adição do referido extrato e transferidos para balões volumétricos de 25 mL. Após adição do solvente, foi realizada agitação vigorosa para completa dispersão. Posteriormente, a amostra foi centrifugada, a 3.500 rpm durante 5 minutos, para acelerar a sedimentação de possíveis substâncias insolúveis. Tomou-se alíquota do sobrenadante e procedeu-se à diluição.

As diluições dos compostos analisados por meio da sobreposição dos espectros de varredura da absorbância apresentavam as concentrações a seguir: flavonóide rutina padrão secundário de referência (10,0 $\mu\text{g/mL}$); extrato vegetal comercial de *T. catigua* Adr. Juss e *P. olacoides* Benthams (1,0 mg/mL – equivalente a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de rutina); formulações-teste, sem adição do referido extrato vegetal comercial (20,0 mg/mL). Foi utilizado como branco de leitura o solvente, isto é, a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na proporção de 99:1.

Realizados os espectros de varredura da absorbância, estes foram sobrepostos para visualização e comparação posteriores.

A obtenção da especificidade do método foi complementada por análise estatística sugerida por Feinberg e Raguènès, 1999. Elaborou-se a curva das concentrações de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no referido extrato em função das concentrações da substância química de referência, em réplicas de seis, nos valores 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 $\mu\text{g/mL}$. As diluições foram realizadas como previamente descrito. Foram determinados o coeficiente angular e a intersecção com o eixo y.

A especificidade será considerada adequada caso o coeficiente angular e a intersecção com o eixo y apresentarem valores estatisticamente

iguais a, respectivamente, 1,0 e 0,0 (zero), empregando-se o Teste t de *Student* (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999).

4.2.4.5. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO

As formulações-teste sem a incorporação do extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Benthham (1,02% flavonóides totais, equivalentes em rutina) foram adicionadas do flavonóide rutina padrão secundário de referência (T = 96,1%), na concentração 0,05% p/p das preparações.

Foram pesados exatamente cerca de 400,0; 500,0 e 600,0 mg das formulações-teste contendo a substância química de referência e transferidos para balões volumétricos de 25 mL, separadamente, e adicionou-se o solvente. O ensaio foi realizado em replicas de três. As amostras foram centrifugadas, a 3.500 rpm durante 5 minutos. Tomaram-se alíquotas do sobrenadante e procederam-se às diluições. Obtiveram-se concentrações de 8,0; 10,0 e 12,0 µg/mL do flavonóide rutina padrão secundário de referência, respectivamente.

As absorbâncias foram obtidas no comprimento de onda de 361,0 nm. O solvente foi utilizado como branco de leitura (GREEN, 1996; USP, 2000; BRASIL, 2003; TABORIANSKI, 2003).

4.2.4.6. PRECISÃO

A precisão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste, isto é, envolve a avaliação do grau de dispersão dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra (BRITAIN, 1998; BRASIL, 2003; PINTO, FERRARINI e GATTI, 2003).

Foram pesados exatamente cerca de 400,0; 500,0 e 600,0 mg das formulações-teste contendo o extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Benthham (1,02% flavonóides totais, equivalentes em rutina) e foram diluídas, obtendo-se concentrações 8,0; 10,0 e 12,0 µg/mL de flavonóides totais, equivalentes em rutina, respectivamente. Adotou-se o procedimento descrito no item 4.2.4.5. A precisão, calculada como desvio padrão relativo (DPR, %), foi realizada em réplicas de três para cada valor de concentração (FDA, 2000; BRASIL, 2003).

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

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

4.2.4.7. EXATIDÃO

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

Procedeu-se às diluições das formulações-teste incorporadas do extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Benthham como descrito no item 3.2.4.6. As absorbâncias foram obtidas no comprimento de onda 361,0 nm, empregando-se alíquotas dos sobrenadantes. O solvente foi utilizado como branco de leitura. A exatidão (%) foi realizada em réplicas de três (GREEN, 1996; JENKE, 1996; BRASIL, 2003; ROLIM *et al.*, 2005).

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

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

4.2.5. TESTE DA ESTABILIDADE NORMAL (TEN)

As formulações-teste consideradas estáveis pelos Testes de Estabilidade Acelerada (TEA), em concordância com os critérios das análises adotados, foram submetidas ao Teste da Estabilidade Normal (TEN).

Foram pesados cerca de 30 g das formulações-teste e acondicionadas em bisnagas opacas de polietileno, tampa do tipo flip-top, cor branca e capacidade de 50 g (amostras em réplicas de dois).

4.2.5.1. CONDIÇÕES DO TESTE

As formulações-teste foram avaliadas após o período de repouso de 24 horas do preparo (início do teste, dia 0 ou t_0), a fim de se completar o processo de emulsificação (LANZET, 1993; RIEGER, 2001; TANO, 2003), à temperatura ambiente de 24 ± 2 °C. As condições de armazenamento e os dias pré-estabelecidos das análises estão descritos a seguir (o TEN foi realizado nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2004):

- i. **$40,0 \pm 0,5$ °C (estufa)** durante 90 dias: análises no 3º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias;
- ii. **Exposição à luz solar indireta e direta, à temperatura ambiente (24 ± 2 °C)**, durante 90 dias: análises no 3º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias;

- iii. **$5,0 \pm 0,5$ °C (refrigerador)** durante 90 dias: análises no 3°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90° dias – condição de armazenamento de referência (amostras padrão ou de referência).

4.2.5.2. VARIÁVEIS DO TESTE

As características físicas, físico-químicas e químicas avaliadas, segundo as metodologias descritas no *item 4.2.3.2.*, nos dias pré-estabelecidos foram:

- i. Características organolépticas (aspecto, cor e odor);
- ii. Valor de pH;
- iii. Viscosidade aparente;
- iv. Teor de flavonóides totais, equivalentes em rutina, remanescente nas amostras (µg/mL) (ROLIM *et al.*, 2005).

A determinação quantitativa dos flavonóides totais foi realizada por espectrofotometria na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm (NF X, 1955; PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965), segundo adaptações da metodologia analítica validada por Rolim e colaboradores, 2005.

4.2.5.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os seguintes critérios foram adotados:

- i. **Aspecto:** integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento, exceto em temperatura elevada, condição, na qual, modificações foram aceitas;

- ii. **Cor e odor:** normais durante o armazenamento à luz solar indireta e direta, leves modificações foram aceitas em temperatura elevada;
- iii. **Valor de pH:** não se admitiu variação superior que $\pm 5\%$ comparadas com o valor inicial e com as amostras padrão ou referência, em todas as condições de armazenamento;
- iv. **Viscosidade aparente:** admitiram-se modificações, desde que não comprometessem a percepção visual das amostras (BRASIL, 2004c).
- v. **Teor remanescente de flavonóides totais, equivalentes em rutina:** A concentração ($\mu\text{g/mL}$) de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presente nas formulações-teste foi determinada espectrofotometricamente na região do ultravioleta a 361,0 nm (*item 4.2.4.*) e em comparação com a leitura da absorbância da solução padrão da substância química de referência recém-preparada a 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Admitiram-se variações de concentração de $\pm 10\%$ (p/p) comparadas com o valor inicial e com as amostras padrão ou de referência, nas condições de refrigerador ($5,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e exposição a luz solar direta e indireta, à temperatura ambiente ($24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FORMULAÇÕES-TESTE ANTICELULÍTICAS

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

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

A escolha dos componentes das formulações-teste, apresentados no **Quadro 2**, apreciou as propriedades desejadas para a preparação, conforme os comentários a seguir.

O álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE) (Crodafos[®] CES) favorece a obtenção de veículos emulsionados de aplicação e espalhabilidade adequadas devido ao comportamento tixotrópico, adicionalmente à liberação simultânea das fases oleosa e aquosa do veículo, conferir sensorial agradável e substantividade à pele. O álcool cetosteárilico (e) glicosídeo cetosteárilico (Montanov[®] 68), por ter origem semi-sintética, se apresenta como uma matéria-prima moderna, tendência atual e, sua propriedade de favorecimento da formação de cristais

líquidos, possibilita a elevação da estabilidade do veículo emulsionado, além de intensificar a capacidade de hidratação da pele doada pelo sistema lamelar (REDEKOP, 1994; POLO, 1998b; MELE, MURGIA e MONDUZZI, 2003; NIRAULA, SENG e MISRAN, 2004).

A adição dos emolientes às formulações-teste objetivou obter funções de desempenho ou performance, como: proteção e amaciamento da pele, hidratação por oclusão e retenção da água, lubrificação e espalhabilidade apropriadas (KAMESHWARI & MISTRY, 1999).

A seleção dos emolientes adipato de diisopropila (Ceraphyl® 230), neopentanoato de isoestearila (Ceraphyl® 375), estearato de estearoila octildodecila (Ceraphyl® 847), tetraisoestearato de pentaeritritila (Crodamol® PTIS), álcool oleílico (Crodacol® B-10) e óleo mineral (e) álcool de lanolina (Uniliquid®) foi realizada em concordância com as propriedades físico-químicas e a estrutura química destes.

Emolientes do tipo éster de álcoois ou ácidos graxos de cadeia carbônica curta (como o adipato de diisopropila – Ceraphyl® 230) conferem às formulações percepção sensorial denominada como fina e leve, enquanto que os ésteres de cadeia ramificada promovem atributos como fluidez e toque não oleoso, espalhabilidade elevada e elegância (neopentanoato de isoestearila – Ceraphyl® 375; estearato de estearoila octildodecila – Ceraphyl® 847). Ésteres de pentaeritritila (tetraisoestearato de pentaeritritila – Crodamol® PTIS) são passíveis de conferir à pele o efeito denominado como almofadado ou *cushiony feel*. Álcoois graxos de cadeia carbônica longa (álcool oleílico – Crodacol® B-10) promovem efeito oclusivo por deposição de película sobre o estrato córneo e conseqüentemente elevam a retenção de água, porém, possuem a desvantagem de conferir percepção sensorial oleosa quando a formulação é aplicada à pele (OBUKOWHO & WOLDIN, 2001).

A mistura proprietária estearato de glicerila (e) álcool berrenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) lecitina (e) álcool laurílico (e) álcool miristílico (e) álcool cetílico (Prolipid® 141) teve sua seleção fundamentada em suas propriedades de formação de cristais líquidos e compatibilidade

com inúmeras matérias-primas usualmente empregadas em formulações cosméticas (ECCLESTON, 1997; POLO, 1998b).

Os espessantes poliméricos, hidroxipropil guar (Jaguar® HP-105) e goma xantana (Rhodicare® S) utilizados no desenvolvimento das formulações-teste foram selecionados por possibilitar melhora da espalhabilidade e da estabilidade dos sistemas emulsionados (MALONE, APPELQVIST e NORTON, 2003).

O agente umectante glicerina foi selecionado por causar hidratação superficial à pele (POLO, 1998a) e por não oferecer resistência ao princípio ativo, flavonóide rutina presente no extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthham, de penetrar e permear no estrato córneo, exercendo sua ação anticelulítica por meio da redução da fragilidade e permeabilidade capilar (ARCT *et al.*, 2001)

A temperatura do processo de emulsificação (75 – 80 °C) e o emprego do homogeneizador/dispersor Ultra Turrax® são justificados segundo Lashmar, Richardson e Erbod, 1995, e Trotta, Pattarino e Ignoni, 2002, que descrevem em seus estudos, que a temperatura de emulsificação no intervalo de 60 a 90 °C produz emulsões com perfis de estabilidade similares e a velocidade elevada da agitação otimiza o processo de obtenção dos sistemas emulsionados.

5.1.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS FORMULAÇÕES-TESTE

As formulações-teste em desenvolvimento foram macroscopicamente analisadas, após o período de repouso de 24 horas necessário para a finalização do processo de emulsificação pelos agentes emulsionantes, verificando criteriosamente aquelas consideradas aparentemente estáveis com características organolépticas adequadas, segundo critérios do formulador e também referendados pela literatura (TANO, 2003; TADROS, 2004). A **Tabela 1** ilustra o resultado da avaliação das formulações-teste anticelulíticas.

Tabela 1. Características organolépticas (aspecto, cor e odor) e valor de pH das formulações-teste anticelulíticas desenvolvidas, após o período de repouso de 24 horas.

FORMULAÇÃO-TESTE	ASPECTO	COR	ODOR	VALOR DE pH
FLB	EF / H	Marrom avermelhada	Característico do extrato	5,5
FLBM	EF / H	Marrom avermelhada	Característico do extrato	5,5
FLG	EF / H	Marrom avermelhada	Característico do extrato	5,5
FLGM	EF / H	Marrom avermelhada	Característico do extrato	5,6
FLX	EF / H	Marrom avermelhada	Característico do extrato	6,0
FLXM	EF / H	Marrom avermelhada	Característico do extrato	5,9
FC	EV / HT	N.A.	N.A.	N.A.
FCG	EV / HT	N.A.	N.A.	N.A.
FCX	EV / HT	N.A.	N.A.	N.A.
F1	EV / H	Marrom avermelhado	Característico do extrato	6,0
FCCG	EV / H	Marrom avermelhado	Característico do extrato	4,8
FCCX	EV / HT	N.A.	N.A.	N.A.
FX	EV / HT	N.A.	N.A.	N.A.
FXM	EV / HT	N.A.	N.A.	N.A.

Legenda:

EF: emulsão fluida

EV: emulsão de viscosidade aparente (consistência) elevada

H: aspecto homogêneo

HT: aspecto heterogêneo

N.A.: formulações-teste não avaliadas

Os sistemas emulsionados considerados macroscopicamente estáveis pelo desenvolvimento das formulações-teste formaram emulsões fluidas (**FLB**, **FLBM**, **FLG**, **FLGM**, **FLX** e **FLXM**) e de viscosidade aparente elevada (**F1** e **FCCG**) (TADROS, 2004) em concordância com o aumento da concentração (% p/p) da(s) cera(s) auto-emulsionante(s) adicionada(s), no total: 2,5 ou 7% p/p.

Os sinais de incompatibilidade entre os componentes apresentados pelas formulações-teste **FC** e **FCG** foram gerados, provavelmente, pela elevada concentração do álcool cetoestearílico (e) glicosídeo cetoestearílico (7% p/p) e a presença de lecitina de soja (Aminolec® 70, 2% p/p) agente emulsionante ou co-emulsionante de origem natural (MANCONI *et al.*, 2003). A preparação **FCX** se apresentou inadequada como veículo devido à incompatibilidade do álcool cetoestearílico (e) metossulfato de berrenil trimetil amônio (Incroquat Behenyl® TMS, 0,3% p/p) cera auto-emulsionante de caráter catiônico e da goma xantana (Rhodicare® S, 0,3% p/p), espessante hidrofílico de caráter aniônico (LANZET, 1993), mesmo nas reduzidas proporções (**Quadro 4**).

A formulação-teste **FCCX** apresentou incompatibilidades como veículo emulsionado. Dentre os possíveis fatores responsáveis por este efeito, poderiam ser interpretados como descrito a seguir:

- i. Período de agitação inadequado devido à presença da lecitina de soja (2% p/p), na proporção utilizada (KNOTH, SCHERZE e MUSCHIOLIK, 2005);
- ii. Presença da lecitina de soja (2% p/p) e da concentração elevada da mistura das ceras auto-emulsionantes álcool cetoestearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE) (2,5% p/p) e do álcool cetoestearílico (e) glicosídeo cetoestearílico (4,5% p/p).

As formulações-teste **FX** e **FXM** não resultaram em sistemas emulsionados adequados (**Quadro 4** e **Tabela 1**), evidenciando sinais de

incompatibilidades entre as matérias-primas utilizadas, sendo mencionada como as possíveis causas:

- i. Presença da lecitina de soja (2% p/p) e período de agitação inadequado;
- ii. Presença da goma xantana (0,3% p/p), espessante hidrofílico de caráter aniônico, e do álcool cetosteárilico (e) metossulfato de berrenil trimetil amônio (0,3% p/p), caráter catiônico.

Knoth, Scherze e Muschiolik, 2005, observaram a tendência da lecitina de soja em formar agregados em sistemas emulsionados com elevação do valor da viscosidade. Segundo a mesma referência, prolongando-se o período de agitação, as formações de agregados das gotículas da fase dispersa da emulsão eram rompidas, obtendo a homogeneidade do sistema.

Verificou-se neste trabalho que o acréscimo da concentração das bases auto-emulsionantes corroborava com a elevação da viscosidade aparente, oferecendo maior resistência à agitação mecânica promovida pelo homogeneizador/dispersor *Ultra Turrax*®, e com a formação de agregados das gotículas da fase interna das formulações-teste em decorrência da presença da lecitina de soja e do período de homogeneização inadequado (LASHMAR, RICHARDSON e ERBOD, 1995).

A partir dos resultados obtidos, permite-se sugerir que o período de agitação, para emulsões apresentando componentes similares ao empregados nas desenvolvidas neste trabalho, bases auto-emulsionantes e lecitina de soja, deve ser prolongado para garantir a total dispersão das gotículas da fase interna do sistema emulsionado.

Os veículos emulsionados visualmente estáveis e compatíveis apresentaram cor e odor oriundos do extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth, formando emulsões da cor marrom avermelhada e odor característico. Obtiveram-se valores de pH

(4,8 a 6) compatíveis com as matérias-primas utilizadas e biocompatíveis com o da pele.

5.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE

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

Em concordância com os resultados obtidos no desenvolvimento das formulações-teste anticelulíticas, consideraram-se aptas ao estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade as seguintes formulações: **FLB, FLBM, FLG, FLGM, FLX, FLXM, F1 e FCCG**.

A **Tabela 2** descreve os resultados obtidos após a Avaliação Preliminar de Estabilidade (APE) por meio dos Testes da Centrifugação e do Estresse Térmico.

Tabela 2. Aspecto das formulações-teste no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade (Testes da Centrifugação e do Estresse Térmico).

Formulações-teste	pH	Centrifugação	Estresse térmico	pH*	η
Aspecto					
FLB	5,5	M	M	N.A.	N.A.
FLBM	5,5	M	N	N.A.	N.A.
FLG	5,5	LM	N	5,3	340
FLGM	5,6	LM	LM	N.A.	N.A.
FLX	6,0	N	N	5,7	260
FLXM	5,9	N	N	5,6	300
F1	6,0	N	LM	5,8	28300
FCCG	4,8	N	N	4,9	27000

Legenda:

N.A.: formulações-teste não avaliadas

N: aspecto normal

LM: aspecto levemente modificado

M: aspecto modificado

pH*: valor de pH após o estresse térmico

η : viscosidade aparente, em centiPoise (cP)

O valor de pH foi analisado anterior e posteriormente ao Teste do Estresse Térmico (caso o aspecto da preparação não tivesse sido alterado pela condição de temperatura drástica) e a determinação da viscosidade aparente (cP) foi realizada nas formulações-teste consideradas estáveis em ambos os ensaios da Avaliação Preliminar da Estabilidade (Estresse Térmico e Centrifugação) (**Tabela 2**).

A Avaliação Preliminar da Estabilidade possibilitou identificar sinais de instabilidade como separação de fases, alteração da cor e cremeação, representados pelas **Figuras 21, 22 e 23**, respectivamente (GIL-ALEGRE *et al.*, 2001; MACIEL, BABY e VELASCO, 2004).

A **Figura 20** ilustra o aspecto das formulações-teste **FLB**, **FLGM**, **FLG**, **FLX** e **FLXM** após a APE.

Figura 20. Aspecto das formulações-teste (1) **FLB**, (2) **FLGM**, (3) **FLG**, (4) **FLX** e (5) **FLXM** após avaliação da estabilidade pela Avaliação da Estabilidade Preliminar (Teste do Estresse Térmico).

As formulações-teste anticelulíticas **FLB** e **FLBM** (**Quadro 3** e **Figura 21**) apresentaram separação de fases devido à baixa concentração da cera auto-emulsionante (2,5% p/p) e a ausência de espessantes hidrofílicos, evidenciados no Teste da Centrifugação. Embora a presença de um co-emulsionante, a lecitina de soja (2% p/p), na formulação **FLBM**, o sistema não resultou em um melhor perfil de estabilidade, provavelmente por não ser a concentração ideal dos agentes emulsionantes e co-emulsionantes, assim, não oferecendo resistência interfacial adequada à coalescência e posterior separação de fases. A ausência de espessantes hidrofílicos corroborou com os indícios de instabilidade por não ocorrer elevação satisfatória da viscosidade aparente da fase externa dos veículos emulsionados fluidos, a fim de se manter a integridade das emulsões (CUNHA, 1970; WITTERN *et*

al., 1985; MARQUARDT & SUCKER, 1998; ROLAND *et al.*, 2003; TADROS, 2004).

Figura 21. Indício de separação de fases do sistema emulsionado das formulações-teste (1) FLB e (2) FLBM, após o Teste do Estresse Térmico. As setas indicam a separação de fases (BABY *et al.*, 2004).

A formulação-teste **FLGM**, após a Avaliação da Estabilidade Preliminar, se apresentou levemente modificada em ambos os testes (**Figuras 22 e 23**). A presença de um agente espessante hidrofílico, hidroxipropil guar, e de um agente co-emulsionante, a lecitina de soja, não possibilitaram a melhora do perfil da estabilidade, obtido por meio dos Testes da Centrifugação e do Estresse Térmico.

Figura 22. Aspecto modificado da formulação-teste **FLGM** após o Teste do Estresse Térmico. A seta indica sinais de instabilidade como indícios de cremeação e alteração da coloração (BABY *et al.*, 2004).

Figura 23. Avaliação Preliminar da Estabilidade para a formulação-teste **FLGM**. Teste do Estresse Térmico. A seta indica o processo de cremeação.

A elevação da temperatura, freqüentemente, causa redução do valor da viscosidade, o que permite às gotículas da fase interna de um sistema emulsionado colidirem com maior magnitude devido a fatores como, por exemplo: intensificação da cinética e do movimento browniano destas,

aumento da energia fornecida pelo aquecimento e resistência inadequada ao deslocamento das partículas da fase interna da emulsão em consequência da diminuição da consistência da fase contínua. A partir das condições acima descritas, o Teste do Estresse Térmico permite demonstrar mais rapidamente a tendência dos veículos emulsionados em apresentar sinais de instabilidade como a cremeação ou sedimentação e a separação de fases (CUNHA, 1970; RIEGER, 1996).

Normalmente, a presença de substâncias poliméricas e tensoativas adsorvidas nos glóbulos de um sistema emulsionado causam redução da tensão interfacial, dessa maneira, elevando a estabilidade do sistema frente à coalescência e separação de fases por mecanismos de ação diversos, porém, o efeito desejado destas classes de adjuvantes é dependente da concentração e da disponibilidade de se localizarem na interface óleo-água (WOLLENWEBER *et al.*, 2000; CAPEK, 2004).

Os valores reduzidos da viscosidade aparente de 340, 260 e 300 cP (**FLG**, **FLX** e **FLXM**, respectivamente), segundo Wood, 2001, conferem a denominação da forma cosmética de loção por se tratar de um sistema emulsionado com valor de viscosidade aparente próximo a 300 cP. Segundo a mesma referência, as formulações-teste **F1** e **FCCG** foram classificadas como creme.

As preparações consideradas aptas aos Testes de Estabilidade Acelerada, foram: **FLG**, **FLX**, **FLXM**, **F1** e **FCCG**.

5.3. TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)

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

As Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7 descrevem os perfis de estabilidade das formulações-teste **FLG**, **FLX**, **FLXM**, **F1** e **FCCG**, respectivamente, por meio da análise das características organolépticas (aspecto, cor e odor) e dos parâmetros físicos e físico-químicos (valor de pH e de viscosidade aparente) obtidos pelos Testes de Estabilidade Acelerada. Os ensaios foram conduzidos nos dias previamente estabelecidos, em condições de armazenamento de luminosidade e de temperatura extremas.

Tabela 3. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste FLG obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.

Formulação-teste FLG		Condições de Armazenamento														
		Luz solar				Refrigerador				Estufa				Ciclos		Freezer
		24 ± 2 °C				5 ± 0,5 °C				50 ± 0,5 °C				- 10/+ 45 ± 0,5 °C		- 10 ± 0,5 °C
		tempo (dias)														
Variáveis	t ₀	3	7	14	3	7	14	1	3	7	6	12	7			
pH	5,6	5,7	5,6	5,6	5,6	5,7	5,7	5,6	5,4	5,3	5,5	5,2	5,6			
% pH	-	1,8	0	0	0	1,8	1,8	0	- 3,6	- 5,4	- 1,8	- 7,1	0			
η	370	410	400	480	400	420	430	300	360	340	240	390	270			
% η	-	10,8	8,1	29,7	8,1	13,5	16,2	-18,9	- 5,4	- 8,1	- 35,1	5,4	- 27,0			
Aspecto	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	IM	IM	N	M	N			
Cor	M. A.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
Odor	C. E.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
Legenda:																

Legenda:

% pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial, t₀ / η: viscosidade aparente (em cP) / % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial, t₀ / t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo) / Hom.: aspecto homogêneo / M. A.: coloração marrom avermelhada / N: normal / IM: intensamente modificado / M: modificado / C. E.: característico do extrato

Tabela 4. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste FLX obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.

Formulação-teste FLX		Condições de Armazenamento													
		Luz solar		Refrigerador			Estufa			Ciclos			Freezer		
		24 ± 2 °C		5 ± 0,5 °C			50 ± 0,5 °C			- 10/+ 45 ± 0,5 °C			- 10 ± 0,5 °C		
		tempo (dias)													
Variáveis	t ₀	3	7	14	3	7	14	1	3	7	6	12	7		
pH	5,1	5,1	5,1	5,1	5,0	5,1	5,0	5,0	4,9	4,9	5,1	4,9	5,1		
% pH	-	0	0	0	-2,0	0	-2,0	-2,0	-3,9	-3,9	0	-3,9	0		
η	300	350	350	430	350	340	340	290	300	320	210	320	220		
% η	-	16,7	16,7	43,3	16,7	13,3	13,3	-3,3	0	6,7	-30,0	6,7	-26,7		
Aspecto	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
Cor	M. A.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
Odor	C. E.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N		
Legenda:															

Legenda:

% pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial, t₀ / η: viscosidade aparente (em cP) / % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial, t₀ / t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo) / Hom.: aspecto homogêneo / M. A.: coloração marrom avermelhada / N: normal / LM: levemente modificado / C. E.: característico do extrato

Tabela 5. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste **FLXM** obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.

Formulação-teste FLXM		Condições de Armazenamento												
		Luz solar			Refrigerador			Estufa			Ciclos			Freezer
		24 ± 2,0 °C			5 ± 0,5 °C			50 ± 0,5 °C			- 10/+ 45 ± 0,5 °C			- 10 ± 0,5 °C
		tempo (dias)												
Variáveis	t ₀	3	7	14	3	7	14	1	3	7	6	12	7	
pH	5,0	5,2	4,9	5,0	4,8	4,9	4,9	4,9	4,8	4,8	4,9	4,8	4,9	
% pH	-	4,0	-2,0	0	-4,0	-2,0	-2,0	-2,0	-4,0	-4,0	-2,0	-4,0	-2,0	
η	320	320	320	340	340	340	330	350	190	160	270	220	270	
% η	-	0	0	6,2	6,2	6,2	3,1	9,4	-40,6	-50,0	-15,6	-31,2	-15,6	
Aspecto	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Cor	M. A.	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	N	N	N	
Odor	C. E.	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	N	N	N	
Legenda:														

Legenda:

% pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial, t₀ / η: viscosidade aparente (em cP) / % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial, t₀ / t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo) / Hom.: aspecto homogêneo / M. A.: coloração marrom avermelhada / N: normal / LM: levemente modificado / C. E.: característico do extrato

Tabela 6. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste F1 obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.

Condições de Armazenamento														
Formulação-teste F1		Luz solar			Refrigerador			Estufa			Ciclos			Freezer
		24 ± 2 °C			5 ± 0,5 °C			50 ± 0,5 °C			- 10/+ 45 ± 0,5 °C			- 10 ± 0,5 °C
		tempo (dias)												
Variáveis	t ₀	3	7	14	3	7	14	1	3	7	6	12	7	
pH	6,0	5,9	5,7	5,8	6,1	5,8	5,9	6,0	5,5	5,2	5,7	5,6	5,9	
% pH	-	-1,7	-5,0	-3,3	1,7	-3,3	-1,7	0	-8,3	-13,3	-5,0	-6,7	-1,7	
η	28.300	28.400	26.200	31.000	27.300	27.000	25.200	21.100	49.400	52.700	21.000	37.200	23.000	
% η	-	0,4	-7,4	9,5	-3,5	-4,6	-11,0	-25,4	74,6	86,2	-25,8	31,4	-18,7	
Aspecto	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	N	N	
Cor	M. A.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Odor	C. E.	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	LM	

Legenda:

% pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial, t₀ / η: viscosidade aparente (em cP) / % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial, t₀ / t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo) / Hom.: aspecto homogêneo / M. A.: coloração marrom avermelhada / N: normal / LM: levemente modificado / C. E.: característico do extrato

Tabela 7. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade aparente da formulação-teste FCCG obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada.

Formulação-teste FCCG		Condições de Armazenamento														
		Luz solar					Refrigerador					Estufa				
		24 ± 2 °C					5 ± 0,5 °C					50 ± 0,5 °C				
		tempo (dias)														
Variáveis	t ₀	3	7	14	3	7	14	1	3	7	6	12	7	6	12	7
pH	4,8	4,8	4,7	4,9	4,8	4,7	5,0	4,9	4,9	4,9	4,9	4,7	4,7	4,9	4,7	4,7
% pH	-	0	- 2,1	2,1	0	- 2,1	4,2	2,1	2,1	2,1	2,1	- 2,1	- 2,1	2,1	- 2,1	- 2,1
η	26.900	22.000	23.300	29.300	23.000	23.000	23.400	26.700	69.600	94.400	27.700	46.200	25.600	27.700	46.200	25.600
% η	-	- 18,2	- 13,4	8,9	- 14,5	- 14,5	- 13,0	- 0,7	158,7	250,9	3,0	71,7	- 4,8	3,0	71,7	- 4,8
Aspecto	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	LM
Cor	M. A.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	C. E.	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N
Legenda:																

Legenda:

% pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial, t₀ / η: viscosidade aparente (em cP) / % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial, t₀ / t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo) / Hom.: aspecto homogêneo / M. A.: coloração marrom avermelhada / N: normal / LM: levemente modificado / C. E.: característico do extrato

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

Segundo os resultados da **Tabela 3**, a loção **FLG** apresentou variações reduzidas no valor de pH, exceto no 7º dia de análise na condição de estufa ($50,0 \pm 0,5$ °C) e no 12º dia, na condição dos ciclos ($- 10/+ 45 \pm 0,5$ °C), com valores percentuais excedentes (5,4 e 7,1%, negativamente) acima do limite permitido, equivalente a $\pm 5\%$. O aspecto das preparações se apresentou intensamente modificado para a condição de estufa ($50,0 \pm 0,5$ °C) e, modificado, para a condição dos ciclos ($- 10/+ 45 \pm 0,5$ °C). Tais comportamentos eram esperados pelas condições drásticas de armazenamento, pois a temperatura apresenta relação direta com a aceleração da cinética de deterioração das formas cosméticas ou farmacêuticas e dos princípios ativos (RIEGER, 1996; MAIA, VELASCO-DE-PAOLA e DAZZI, 2000).

Para as amostras expostas à condição de luz solar, em temperatura ambiente (24 ± 2 °C), e refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) a loção **FLG** contendo os componentes cera auto-emulsionante álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico (10 OE), espessante hidroxipropil guar e agente emulsionante ou co-emulsionante não-iônico estearato de glicerila (e) álcool berrenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) lecitina (e) álcool laurílico (e) álcool miristílico (e) álcool cetílico, apresentou tendência à elevação da viscosidade aparente. A mesma variável descrita acima sofreu redução percentual de seu valor ($- 8,1\%$) na condição de estufa ($50,0 \pm 0,5$ °C) no 7º dia de análise.

As leituras do valor da viscosidade aparente foram registradas no tempo de 1 minuto, pois, devido ao caráter tixotrópico da cera auto-emulsionante álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico

(10 OE) e, embora o estudo do perfil reológico não tivesse sido avaliado, a permanência da rotação da agulha (TR 8) do equipamento (Viscosímetro *ViscoStar R*) promovia consecutiva redução do valor da viscosidade aparente.

Os demais parâmetros avaliados, cor e odor, foram considerados normais para todas as condições dos TEA. De acordo com os critérios de inclusão e exclusão, *item 4.2.3.2.*, a formulação-teste **FLG** foi rejeitada pelo ensaio.

De acordo com a **Tabela 4**, a loção **FLX** apresentou alterações reduzidas das variáveis analisadas, exceto por leve modificação do odor, no 12º dia, na condição de ciclos ($-10/+45 \pm 0,5$ °C). Nas amostras expostas à luz solar (24 ± 2 °C) e refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), ocorreu elevação da viscosidade aparente (3º dia) com percentual positivo de 16,7%, evidenciando que o período de repouso adequado à obtenção total da viscosidade, pelo sistema emulsionado, seria de 48 até 72 horas após o preparo da formulação-teste. O período de repouso após o preparo dos sistemas emulsionados é necessário, pois, segundo Realdon e colaboradores, 2002, a estabilização das gotículas da fase dispersa, a disposição ou arranjo estrutural da fase contínua e as interações físicas entre ambas podem ocorrer em um período de tempo de duas até quatro semanas. Na condição de *freezer* ($-10,0 \pm 0,5$ °C), foi observada redução do valor da viscosidade no percentual de 26,7%.

Verificaram-se pelos resultados expostos nas **Tabelas 3 e 4**, nas condições de armazenamento utilizadas nos TEA, que a preparação contendo o hidroxipropil guar (0,3% p/p, **FLG**), como agente espessante hidrofílico, favoreceu a obtenção de um sistema emulsionado com valor de viscosidade aparente superior comparado com a preparação similar em composição, contendo a goma xantana (**FLX**) como espessante, na mesma proporção p/p.

A formulação-teste **FLXM** apresentou redução da viscosidade aparente para as condições de estufa ($50,0 \pm 0,5$ °C), ciclos ($-10/+45 \pm 0,5$ °C) e *freezer* ($-10,0 \pm 0,5$ °C). Os resultados experimentais obtidos para a variável

viscosidade aparente para a condição de ciclos, isto é, a alteração percentual negativa de 31,2%, contradiz com aqueles relatados por Manconi e colaboradores, 2003, os quais indicam elevação do valor da viscosidade aparente em dispersões de lecitina de soja em água quando obtidas por meio de ciclos de congelamento e descongelamento ($-40/+40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Porém, segundo os critérios adotados, as modificações ocorridas foram aceitáveis. A cor e o odor apresentaram pequenas modificações na condição de estufa ($50,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). O valor de pH não acarretou em alterações significativas durante os Testes de Estabilidade de Acelerada.

Segundo as informações obtidas pelos TEA, nas condições de armazenamento e os critérios de análises, as formulações-teste **FLX** e **FLXM** foram aprovadas pelos ensaios.

Os cremes **F1** e **FCCG** (Tabelas 6 e 7) resultaram em sistemas emulsionados com as maiores variações dos parâmetros analisados pelos TEA, exceto nas condições de luz solar ($24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e refrigerador ($5,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ambas as formulações-teste apresentaram elevação significativa da viscosidade aparente na condição de estufa ($50,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, apenas para a **FCCG**, na condição de ciclos ($-10/+45 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), possivelmente, devido à porosidade do material de acondicionamento e ao diâmetro da boca larga dos potes opacos de polietileno, que permitiram maior perda da água das preparações (DIAS, 2004).

As características organolépticas (aspecto e odor) e o valor de pH do creme **F1** (Tabela 6) foram mais susceptíveis às condições de armazenamento, acarretando alterações em temperaturas drásticas ($-10 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $50,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, apenas o odor, nos ciclos ($-10/+45 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$); e valores percentuais de pH (6,7 a 13,3% negativos) excedentes ao limite estabelecido em $\pm 5\%$, nas condições de estufa ($50,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ciclos ($-10/+45 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), respectivamente. A alteração do odor poderia ter sido causada pela temperatura elevada, o que acarretaria na decomposição acelerada dos componentes da formulação e do extrato vegetal comercial contendo *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum*

olacoides Bentham (BRASIL, 2002b; MAIA, 2002; BRASIL, 2004c; PINTO, 2005).

A redução percentual do valor de pH, verificada nas condições de armazenamento para a preparação **F1**, apresentada na **Tabela 6**, pôde ter sido originada devido à presença do álcool cetosteárilico (e) glicosídeo cetosteárilico (7% p/p). Segundo os estudos realizados por Masmoudi e colaboradores, 2005, emulsões à base da cera auto-emulsionante citada acima apresentam tendência para a redução do valor de pH durante o envelhecimento, principalmente quando armazenadas em temperaturas elevadas.

O aspecto e a cor da **FCCG (Tabela 7)** resultaram em leves modificações nas condições de estufa ($50,0 \pm 0,5$ °C) e ciclos ($-10/+45 \pm 0,5$ °C).

As formulações-teste anticelulíticas consideradas com as características mais adequadas de estabilidade, loções **FLX** e **FLXM (Tabelas 4 e 5)**, foram selecionadas como os veículos mais adequados para a incorporação do extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham; para a validação da metodologia analítica e a condução do Teste de Estabilidade Normal.

5.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

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

A validação da metodologia analítica, por se tratar de um processo contínuo, apresenta definições, segundo FDA, 1994, Jenke, 1996, ICH Q2B, 1996, Brasil, 2004, e Ribani e colaboradores, 2004, como transcritas a seguir:

- i. “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA)”;
- ii. “A validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (*Eurachem Work Group*)”;
- iii. “Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso internacional (ISO/IEC 17.025)”;
- iv. “Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado (WHO)”.

São distinguidas, dentro do âmbito geral da validação de métodos, duas vertentes, a **Validação no Laboratório** (*In House Validation*) e a **Validação Completa** (*Full Validation*).

A primeira refere-se as etapas de validação realizadas em um único laboratório, seja para validar uma nova metodologia desenvolvida localmente ou para verificar a aplicabilidade de um método consagrado. A **Validação de Laboratório** consiste em uma etapa preliminar à **Validação Completa**.

A segunda vertente envolve as características de desempenho em um estudo interlaboratorial, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia. Somente após a **Validação Completa** o método pode ser aceito como Método Oficial para uma determinada aplicação (RIBANI *et al.*, 2004).

Empregam-se, atualmente, referências bibliográficas que preconizam ou sugerem uma linha a ser seguida para o procedimento de validação de

métodos analíticos cuja execução é recomendada por órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e FDA (RIBANI *et al.*, 2004).

O registro de novos produtos farmacêuticos ou cosméticos exige a validação da metodologia analítica, bem como a acreditação ou credenciamento do método, avaliado por órgãos reguladores, que no Brasil referem-se a ANVISA e/ou do INMETRO. Adicionalmente às referências acima citadas, empregam-se os parâmetros analíticos descritos pelos Compêndios Farmacêuticos, as Farmacopéias.

A 24^a edição da *United States Pharmacopeia*, 2000, define validação da metodologia analítica como sendo o processo no qual se estabelece, experimentalmente, os parâmetros de desempenho de um método em estudo para determinada aplicação analítica, isto é, processo que fornece evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer. O **Quadro 5** ilustra os parâmetros analíticos envolvidos no processo da validação (USP, 2000).

Quadro 5. Principais parâmetros estabelecidos na validação da metodologia analítica (USP, 2000; USP, 2004).

Parâmetros Analíticos
Exatidão (E, %)
Precisão (DPR, %)
Especificidade
Limite de detecção (LD)
Limite de quantificação (LQ)
Linearidade (curva analítica)
Intervalo

A quantificação do teor de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes nas formulações-teste contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth

(Olacaceae), de denominação comercial *Slimbuster*[®] H1, foi realizada por meio da espectrofotometria na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm segundo orientações da literatura como NF X, 1955, Pharmacopée Française, 1965, e Rolim e colaboradores, 2005.

A espectrofotometria na região UV-Vis do espectro eletromagnético é uma técnica analítica amplamente utilizada, em função da robustez, custo relativamente baixo do equipamento e reagentes, conveniência analítica, rapidez na obtenção dos resultados, sensibilidade e especificidade adequadas. Os procedimentos envolvem medidas diretas de substâncias que absorvem a radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo (ROCHA & TEIXEIRA, 2004).

5.4.1. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

Na **Tabela 8**, estão apresentados os dados para a construção da curva analítica, representada pelo gráfico na **Figura 24**, que originou a equação da reta de número 5 (**Equação 5**).

A curva analítica apresenta a relação entre a resposta instrumental em função das concentrações conhecidas das amostras em análise (FDA, 2001). A linearidade é avaliada por meio da curva analítica e está relacionada com a habilidade do método em demonstrar que aqueles resultados experimentais obtidos são diretamente proporcionais à resposta instrumental ou, caso exista a necessidade, por transformações matemáticas bem definidas que comprovem a proporcionalidade da resposta perante as concentrações da substância em análise, em um intervalo especificado das concentrações (USP, 2000; SHABIR, 2003).

Segundo ICH Q2B, 1996, USP, 2000, FDA, 2001 e Brasil, 2003, recomenda-se que a linearidade seja estabelecida com a determinação de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (excluindo-se o branco da leitura instrumental) e, de acordo com Causon, 1997, a média das réplicas de seis

concentrações ou respostas instrumentais devem ser utilizadas para a elaboração da curva analítica e a determinação da linearidade.

Após a avaliação visual da curva analítica e verificação da relação linear da resposta instrumental em função das concentrações das amostras, os resultados devem ser tratados por métodos analíticos pertinentes, determinando-se: coeficiente de correlação linear, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos mínimos quadrados da regressão linear e desvio padrão relativo (ICH Q2B, 1996; BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

Tabela 8. Dados para a construção da curva analítica das diluições seriadas do flavonóide rutina padrão secundário de referência (T = 96,1%) e estudo do intervalo.

Absorbâncias ($\lambda = 361,0 \text{ nm}$)	Concentração Teórica do Flavonóide Rutina Padrão Secundário de Referência ($\mu\text{g/mL}$)					
	5,0	8,0	10,0	12,0	15,0	
A ₁	0,1623	0,2430	0,3085	0,3605	0,4538	0,9990
A ₂	0,1613	0,2459	0,3085	0,3623	0,4541	0,9996
A ₃	0,1603	0,2449	0,3071	0,3610	0,4558	0,9994
A ₄	0,1614	0,2456	0,3075	0,3608	0,4544	0,9995
A ₅	0,1609	0,2442	0,3073	0,3621	0,4547	0,9995
A ₆	0,1611	0,2459	0,3081	0,3630	0,4547	0,9997
A _{média}	0,1612	0,2449	0,3078	0,3616	0,4546	
A _{dp}	0,0007	0,0011	0,0006	0,0010	0,0007	
Estudo do Intervalo						
Concentração Calculada ($\mu\text{g/mL}$)	5,06	7,92	10,07	11,90	15,07	
Exatidão (%)	101,24	98,98	100,66	99,18	100,50	
DPR (%)	0,41	0,47	0,20	0,27	0,15	

Legenda:

A₁ a A₆: réplicas das absorbâncias (n = 6); A_{média}: média das absorbâncias; A_{dp}: desvio padrão das absorbâncias; R²: coeficiente de correlação linear das réplicas das curvas analíticas (n = 6); R²_{média}: média dos coeficientes de correlação linear (coeficiente de correlação linear da curva analítica); CV (%): coeficiente de variação do coeficiente de correlação linear; DPR (%): desvio padrão relativo. As concentrações calculadas do flavonóide rutina ($\mu\text{g/mL}$) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação da reta da curva analítica (Equação 5).

Figura 24. Curva analítica do flavonóide rutina padrão secundário de referência ($T = 96,1\%$) e coeficientes de correlação linear, R^2 ($n = 6$). As concentrações da substância química de referência foram 5,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 µg/mL. As leituras das absorbâncias ($n = 6$) foram obtidas no comprimento de onda de 361,0 nm. Empregaram-se como solvente e branco a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M na proporção de 99:1.

O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados empregado para a obtenção da curva analítica gerou a equação da reta descrita abaixo (**Equação 5**), com valores do **coeficiente angular** (inclinação da reta) e da **intersecção com o eixo y** iguais a 0,0293 e 0,0129, respectivamente, e **coeficiente de correlação linear** (R^2) igual a 0,9995.

$$y = 0,0293 x + 0,0129$$

Equação 5. Equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados. Onde: x é a concentração do flavonóide rutina padrão secundário de referência ($\mu\text{g/mL}$); y é a absorbância.

O método apresentou linearidade entre os valores das absorbâncias em função das concentrações do flavonóide rutina padrão secundário de referência em solução na mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1). Adicionalmente, com as informações ilustradas na **Tabela 8**, com a análise visual da **Figura 24**, a **Equação 5** e com o valor do coeficiente de correlação linear, R^2 (0,9995), próximo a 1, foi verificada a relação linear oferecida pelo método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm utilizado na metodologia.

A Legislação Brasileira vigente admite a linearidade de uma metodologia analítica quando o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados resulta em coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003) e 0,90 (INMETRO, 2003), segundo Ribani e colaboradores, 2004.

Um valor de coeficiente de correlação linear acima de 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos resultados obtidos pela regressão linear (MULHOLLAND & HIBBERT, 1997; RIBANI *et al.*, 2004).

O cálculo do coeficiente de variação (CV, %) para o coeficiente de correlação linear (**Tabela 8**), indicou que as réplicas de seis das curvas

analíticas geraram R^2 próximos entre si, com dispersão reduzida dos valores calculados.

A **Tabela 9** apresentou os resultados do tratamento estatístico pela análise da variância aplicado às informações obtidas experimentalmente (**Tabela 8**) para a elaboração da curva analítica.

Tabela 9. Tratamento estatístico pela Análise da Variância (ANOVA) aplicado nos resultados para a construção da curva analítica ($\alpha = 5\%$).

	gl	SQ	MQ	F	F _{crítico}
Regressão	1	0,0498	0,0498	5818,49	$4,96 \times 10^{-6}$
Resíduo	3	$2,57 \times 10^{-5}$	$8,57 \times 10^{-6}$		
Total	4	0,0499			

Legenda:

gl: graus de liberdade

SQ: soma dos mínimos quadrados

MQ: médias dos mínimos quadrados

F: valor de ANOVA-F calculado

F_{crítico}: valor de ANOVA-F tabelado (GIL-ALEGRE *et al.*, 2001)

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

O valor de F calculado (5.818,49) presente na **Tabela 9**, foi superior ao valor de F_{crítico} ($4,96 \times 10^{-6}$). Tal relação demonstrou a significância estatística do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos

quadrados para comprovação da relação linear da resposta instrumental, isto é, as medidas das absorbâncias, em função das concentrações da rotina padrão secundário de referência nas condições preconizadas pelo método espectrofotométrico utilizado (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999).

O intervalo de uma metodologia analítica é a abrangência de valores de respostas obtidas experimentalmente para concentrações mínimas e máximas especificadas da substância em análise que oferecem níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade (USP, 2000; USP, 2003; USP, 2004). O **Quadro 6** ilustra o intervalo de concentrações sugeridas para a condução deste estudo.

Quadro 6. Limites percentuais da concentração da substância em exame que devem estar contido no intervalo de linearidade (BRASIL, 2003).

Ensaio	Intervalo
Determinação quantitativa da substância em análise em matérias-primas ou formas farmacêuticas	80 a 120% da concentração teórica ou nominal da substância
Impurezas	Nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Adequação dos limites de detecção e quantificação à concentração de impurezas.
Uniformidade de conteúdo	70 a 130% da concentração teórica ou nominal da substância
Ensaio de dissolução	$\pm 20\%$

O estudo do intervalo (**Tabela 8**) evidenciou a adequação dos valores das concentrações da substância química de referência empregados para a construção da curva analítica pelos cálculos da precisão (DPR, %) (**Equação 3**) e exatidão (**Equação 4**), demonstrando aproximação dos

valores das concentrações com aqueles aceitos como reais (concentrações teóricas ou nominais) e dispersão adequada dos resultados. Os valores da exatidão localizaram-se no intervalo entre 98,98 e 101,24% e, os da precisão, calculada como desvio padrão relativo, não excederam 0,47%.

A **Figura 25** apresenta o gráfico da sobreposição dos espectros da absorbância, no intervalo de comprimento de ondas entre 250,0 e 400,0 nm, das diluições seriadas do flavonóide rutina padrão de referência secundário em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1), nos valores das concentrações teóricas presentes na **Tabela 8**, para a determinação da curva analítica. Identificou-se visualmente que a elevação da concentração da substância química de referência resultou em aumento proporcional dos espectros da absorção.

Figura 25. Sobreposição dos espectros de absorvância das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência nas concentrações 5,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 µg/mL em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) empregados para a construção da curva analítica. Para cada incremento de concentração da substância química de referência, ocorreu elevação proporcional dos valores de absorvância do espectro. *[Abs]*: absorvância; *Wavelength (nm)*: comprimento de onda.

5.4.2. LIMITE DE DETECÇÃO

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

O LD pode ser determinado por métodos como: **Método Visual**, **Método da Relação Sinal-Ruído** e **Método Baseado nos Parâmetros da Curva Analítica** (RIBANI *et al.*, 2004).

O **Método Visual** é obtido por meio da avaliação visual, método aplicável para métodos não-instrumentais, como para os instrumentais. O **Método da Relação Sinal-Ruído** é fundamentado no ruído do equipamento, porém apenas é aplicável para os procedimentos analíticos que exibem linha de base. Neste caso, o LD é aceitável para substâncias que possuem concentração tal que gerem resposta instrumental três vezes superior que a linha de base. O terceiro, o **Método Baseado nos Parâmetros da Curva Analítica**, é determinado pelo desvio padrão de resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente de correlação linear da equação, e no coeficiente angular da curva analítica (TABORIANSKI, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Feinberg e Raguènès, 1999, sugeriram o emprego da **Equação 6**, para o cálculo do LD, conforme descrito a seguir:

$$LD = \frac{b_0 + 3 \times dp_0}{CA}$$

Equação 6. Limite de detecção. Onde: b_0 : resposta instrumental do branco de leitura; dp_0 : desvio padrão do branco; CA : coeficiente angular da curva analítica.

Empregando a **Equação 1** e as informações apresentadas na **Tabela 10**, o limite de detecção estimado foi 0,09 µg/mL do flavonóide rutina padrão secundário de referência, portanto, valores de concentração da

substância química em estudo superior ou igual ao limite de detecção foram diferenciadas do ruído do equipamento (Espectrofotômetro *Beckman DU - 640*) e detectadas (BRASIL, 2003; DIAS, 2004).

A **Tabela 11** apresenta os resultados obtidos para o cálculo do limite de detecção experimental. Em concordância com o critério para a determinação do LD, desvio padrão relativo inferior ou igual a 20% (GREEN, 1996; JENKE, 1996; TABORIANSKI, 2003), obteve-se limite de detecção igual a 0,20 µg/mL.

5.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

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

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1 (RIBANI *et al.*, 2004; DUTRA, 2005).

Feinberg e Raguènès, 1999, para o cálculo do LQ, sugeriram o emprego da **Equação 7**:

$$LQ = \frac{b_0 + 10 \times dp_0}{CA}$$

Equação 7. Limite de quantificação. Onde: b_0 : resposta instrumental do branco de leitura; dp_0 : desvio padrão do branco; CA: coeficiente angular da curva analítica.

O LQ estimado foi 0,27 µg/mL para o flavonóide rutina padrão secundário de referência, conseqüentemente, valores de concentração de rutina superior ou igual ao valor estimado são provavelmente quantificadas com precisão e exatidão aceitáveis pela metodologia empregada, demonstrando a sensibilidade do método (JENKE, 1996; USP, 2000; BRASIL, 2003).

A **Tabela 10** apresentou as informações para os cálculos dos limites de detecção e quantificação estimados, utilizando as **Equações 1 e 2**.

A **Tabela 11** ilustra os resultados obtidos para o cálculo do limite de quantificação experimental. Em concordância com o critério para a determinação do LQ, desvio padrão relativo inferior ou igual a 5,0% e exatidão próxima a 100%, obteve-se limite de quantificação de 0,30 µg/mL.

Segundo os resultados do LQ estimado e experimental, é percebida a proximidade dos valores obtidos pelos diferentes cálculos utilizados, 0,27 e 0,30 µg/mL. Porém, obtiveram-se resultados de LD estimado e experimental aparentemente distintos, 0,09 e 0,20 µg/mL.

Sugere-se que os valores díspares do LD, obtidos por estimativa e experimentalmente, e a proximidade com o valor de LQ experimental foram provenientes do erro intrínseco do equipamento utilizado para a realização das leituras das absorbâncias quando empregadas concentrações reduzidas da rotina padrão secundário de referência (0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 e 1,50 µg/mL) em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1).

Tabela 10. Limites de detecção e quantificação estimados. Concentração teórica do flavonóide rutina padrão de referência, desvio padrão, desvio padrão médio e coeficiente angular proveniente da curva analítica.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	dp	σ	C. A.	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
5,0	0,0007	0,0008	0,0293	0,09	0,27
8,0	0,0011				
10,0	0,0006				
12,0	0,0010				
15,0	0,0007				

Legenda:

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

Ribani e colaboradores, 2004, sugeriram a obtenção dos limites de detecção e quantificação pelo **Método Baseado nos Parâmetros da Curva Analítica**, por serem estatisticamente mais confiáveis, no entanto, a determinação experimental abordada neste trabalho para LD e LQ propiciou respostas mais autênticas para as concentrações limites de rotina padrão secundário de referência ($\mu\text{g/mL}$) em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) em concordância com as próprias características técnicas do equipamento espectrofotométrico (Espectrofotômetro *Beckman* DU - 640), analistas e da metodologia.

Tabela 11. Limites de detecção e quantificação experimentais para o flavonóide rutina padrão de referência secundário (T = 96,1%).

Concentrações teóricas ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{médias}	dp	Concentrações calculadas ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	Exatidão	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
0,10	0,0031	0,0038	0,0018	0,0029	0,0010	0,15	35,00	146,67		
0,20	0,0037	0,0036	0,0045	0,0039	0,0005	0,18	12,87	90,37		
0,30	0,0072	0,0070	0,0073	0,0072	0,0002	0,29	2,34	96,42		
0,40	0,0098	0,0107	0,0102	0,0102	0,0005	0,39	4,47	97,42		
0,60	0,0167	0,0171	0,0160	0,0166	0,0005	0,60	3,20	100,37	0,20	0,30
0,80	0,0220	0,0231	0,0217	0,0222	0,0007	0,79	3,23	98,89		
1,00	0,0278	0,0283	0,0282	0,0281	0,0003	0,99	0,98	98,56		
1,50	0,0442	0,0442	0,0439	0,0441	0,0002	1,52	0,36	101,30		

Legenda:

Concentrações teóricas ($\mu\text{g/mL}$): concentrações teóricas do flavonóide rutina padrão secundário de referência em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1); A₁ a A₃: réplicas das absorbâncias (n = 3); A_{médias}: média das absorbâncias; dp: desvio padrão; DPR (%): desvio padrão relativo, em percentagem; LD ($\mu\text{g/mL}$): limite de detecção experimental do flavonóide rutina padrão secundário de referência, em $\mu\text{g/mL}$; LQ ($\mu\text{g/mL}$): limite de quantificação experimental do flavonóide rutina padrão secundário de referência, em $\mu\text{g/mL}$.

5.4.4. ESPECIFICIDADE E PESQUISA DE INTERFERENTES

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

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

A **Figura 26** esquematiza a sobreposição dos espectros de varredura da absorbância para o flavonóide rutina padrão de referência secundário (10,0 µg/mL), o extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Bentham (10,0 µg/mL de flavonóides totais, equivalentes em rutina) e as formulações-teste **FLX** e **FLXM** (**Quadro 3**) sem adição de padrão ou extrato (20,0 mg/mL).

Para o flavonóide rutina padrão secundário de referência verificaram-se dois picos de absorbância máxima, a 258,0 e a 361,0 nm (NF X, 1955; PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965). Em conformidade com as mesmas referências, o segundo pico de absorbância máxima para a rutina ocorreu no comprimento de onda de 362,5 nm. A pequena variação em relação ao resultado obtido experimentalmente (variação de 1,5 nm) pode ser atribuída ao equipamento utilizado, ao grau de pureza dos solventes e da substância química de referência ou dos erros sistemáticos da metodologia analítica e analistas.

No comprimento de onda de 361,0 nm ocorreu ausência ou resposta desprezível dos interferentes oriundos dos componentes das preparações selecionadas pelos Testes de Estabilidade Acelerada, como ilustrado na **Figura 26**, considerado adequado para a análise espectrofotométrica dos flavonóides totais, equivalentes em rotina, presentes nas formulações-teste **FLX** e **FLXM** (ROLIM *et al.*, 2005). O comprimento de onda de 258,0 nm não se aplicou à quantificação dos flavonóides totais devido à presença de interferentes gerados pelo extrato vegetal comercial de *T. catigua* Adr. Juss (e) *P. olacoides* Benthham e das preparações **FLX** e **FLXM** (**Figura 26**).

A **Figura 27** ilustra a especificidade do método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm por meio da idêntica sobreposição dos espectros de varredura da absorbância para concentrações equivalentes em rotina (10,0 µg/mL) para a substância química de referência e o extrato comercial *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Benthham.

Figura 26. Especificidade do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina, e estudo dos interferentes. Sobreposição dos espectros de varredura da absorbância: (1) é o extrato vegetal comercial de *T. catigua* Adr. Juss e *P. olacoides* Benth (10,0 µg/mL flavonóides totais, equivalentes em rutina); (2) é o flavonóide rutina padrão secundário de referência (10,0 µg/mL); (3) e (4) são as formulações teste **FLX** e **FLXM** (20,0 mg/mL), respectivamente. A seta indica a sobreposição idêntica do flavonóide rutina padrão secundário de referência e do conteúdo de flavonóides totais do extrato vegetal comercial, equivalentes em rutina, no comprimento de onda de 361,0 nm. *Wavelength* é o comprimento de onda (nm); *[Abs]* é a absorbância.

Figura 27. Especificidade do método e identificação qualitativa da presença de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato vegetal comercial de *T. catigua* Adr. Juss e *P. olacoides* Bentham (VELASCO *et al.*, 2004; ROLIM *et al.*, 2005). A Figura ilustra a idêntica sobreposição dos espectros de varredura da absorbância para concentrações equivalentes em rutina (10,0 µg/mL) para a substância química de referência (1) e o extrato comercial *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Bentham (2). *Wavelength* é o comprimento de onda (nm); *[Abs]* é a absorbância.

Figura 28. Relação entre as concentrações, em $\mu\text{g/mL}$, dos flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthham em função da substância química de referência (rutina padrão secundário, $T = 96,1\%$) para avaliação da especificidade do método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm. Foram utilizadas as médias das concentrações, em réplicas de seis, apresentadas na **Tabela 12**. A mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1) foi empregada como solvente e branco de leitura.

Observou-se pela **Figura 28** a relação linear de resposta entre as concentrações da amostra em função das concentrações da substância química de referência. A proporcionalidade foi confirmada pela obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação linear, representados pela **Equação 8**, empregando o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

$$y = 1,0488 x - 0,0038, R^2 = 1$$

Equação 8. Equação da reta para determinação da especificidade do método espectrofotométrico para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina. Onde: x é a concentração da rutina padrão secundário de referência ($\mu\text{g/mL}$); y é a concentração dos flavonóides totais, equivalentes em rutina, presente no extrato vegetal comercial de *T. catigua* (e) e *P. olacoides* ($\mu\text{g/mL}$); R^2 é o coeficiente de correlação linear.

Tabela 12. Dados para a elaboração da curva das concentrações dos flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato comercial de *T. catigua* (e) *P. olacoides* em função das concentrações da rutina padrão secundário de referência ($T = 96,1\%$) para determinação da especificidade do método espectrofotométrico no comprimento de onda a 361,0 nm.

Concentração nominal da substância química de referência ($\mu\text{g/mL}$)	C_{SQR}	C_A
6,0	5,57	5,84
8,0	7,73	8,10
10,0	9,54	10,00
12,0	11,92	12,50
14,0	14,04	14,72

Legenda:

C_{SQR} : média das concentrações ($n = 6$) da rutina padrão secundário de referência ($\mu\text{g/mL}$) calculadas pela **Equação 5**

C_A : média das concentrações ($n = 6$) dos flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no referido extrato ($\mu\text{g/mL}$) calculadas pela **Equação 5**

A **Tabela 13** apresentou os resultados para a avaliação da especificidade do método espectrofotométrico na região da radiação ultravioleta a 361,0 nm para flavonóides totais, equivalentes em rutina,

presentes no extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth.

Tabela 13. Especificidade da metodologia analítica espectrofotométrica calculada segundo Feinberg e Raguènès, 1999, para flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes no extrato vegetal comercial de *T. catigua* (e) *P. olacoides* ($\alpha = 5\%$).

Tratamento Estatístico	V _D	V _C
Coeficiente angular	1,0488	1,0
Desvio padrão do coeficiente angular	0,0334	-
Intersecção com o eixo y	- 0,0038	0,0
Desvio padrão da intersecção com o eixo y	0,2202	-
Número de medições	30	-
Teste t de <i>Student</i> para CA	1,4593	2,0484 *
Teste t de <i>Student</i> para I _y	0,0172	2,0484 *

Legenda:

V_D: valores determinados

V_C: valores críticos

CA : coeficiente angular

I_y : intersecção com o eixo y

*: t de *Student* tabelado

O método analítico pode ser considerado específico se os valores do coeficiente angular e da intersecção com o eixo y (para a relação das concentrações da substância em exame em função das concentrações da substância química de referência) não apresentarem diferença significativa dos valores críticos ou de referência 1,00 e 0,00 (zero), respectivamente, e valor de R^2 próximo a 1 ($R^2 = 1$, **Equação 8**), indicando excelente relação linear de resposta entre as concentrações de flavonóides totais em função

da rotina padrão secundário de referência (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999; BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2002).

Em concordância com os resultados obtidos, o método apresentou especificidade para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rotina, pois os valores calculados do Teste t de *Student* para o coeficiente angular e para a intersecção com o eixo y resultaram inferiores de t tabelado (FEINBERG & RAGUÈNÈS, 1999), denotando igualdade estatística.

5.4.5. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO

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

As **Tabelas 14 e 15** contêm os resultados obtidos na avaliação da recuperação do flavonóide rotina padrão secundário de referência para as formulações-teste **FLX** e **FLXM**. Para o cálculo da concentração real da substância química de referência nas formulações foi utilizada a solução do padrão secundário na concentração de 10,0 µg/mL do flavonóide rotina em álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M (99:1).

Tabela 14. Recuperação do flavonóide rotina padrão secundário de referência acrescida (0,05% p/p) na formulação-teste FLX.

C. T. ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{média}	Concentrações Calculadas ($\mu\text{g/mL}$)	dp	Rc (%)	R _{c médio} (%)
8,0	0,2428	0,2417	0,2424	0,2423	7,83	0,0006	97,87	
10,0	0,3083	0,3047	0,3059	0,3063	10,01	0,0018	100,14	99,38
12,0	0,3659	0,3642	0,3648	0,3650	12,02	0,0009	100,13	

Legenda: C. T. ($\mu\text{g/mL}$): concentração teórica das diluições do flavonóide rotina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLX; A₁ a A₃: réplicas das absorvâncias; A_{média}: média das absorvâncias; Concentrações calculadas ($\mu\text{g/mL}$): concentrações calculadas do flavonóide rotina ($\mu\text{g/mL}$), a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 $\mu\text{g/mL}$); dp: desvio padrão; Rc (%):recuperação do padrão (%); R_{c médio} (%): média da Recuperação do padrão (%)

Tabela 15. Recuperação do flavonóide rotina padrão secundário de referência acrescida (0,05% p/p) na formulação-teste FLXM.

C. T. ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{média}	Concentrações Calculadas ($\mu\text{g/mL}$)	dp	Rc (%)	R _{c médio} (%)
8,0	0,2483	0,2497	0,2491	0,2490	8,06	0,0007	100,74	
10,0	0,3038	0,3069	0,3066	0,3058	10,00	0,0017	99,95	99,78
12,0	0,3597	0,3592	0,3603	0,3597	11,84	0,0006	98,64	

Legenda: C. T. ($\mu\text{g/mL}$): concentração teórica das diluições do flavonóide rotina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLX; A₁ a A₃: réplicas das absorvâncias; A_{média}: média das absorvâncias; Concentrações calculadas ($\mu\text{g/mL}$): concentrações calculadas do flavonóide rotina ($\mu\text{g/mL}$), a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 $\mu\text{g/mL}$); dp: desvio padrão; Rc (%):recuperação do padrão (%); R_{c médio} (%): média da Recuperação do padrão (%)

Nas condições experimentais utilizadas, a recuperação do padrão foi próxima a 100%, gerando valores nos intervalos entre 97,87 a 100,14% (R_c médio = 99,38%) e 98,64 a 100,74% (R_c médio = 99,78) para as formulações-teste **FLX** e **FLXM**, respectivamente. Segundo os resultados da recuperação do padrão, ficou confirmada a exatidão do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina. Os valores determinados demonstraram proximidade elevada das concentrações calculadas do flavonóide rutina com os seus respectivos valores teóricos ou nominais (**Tabelas 14 e 15**).

5.4.6. PRECISÃO

A precisão de uma metodologia analítica representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra homogênea, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e padronizadas. Segundo ICH Q2B, 1996, e Brasil, 2003, a precisão é calculada como desvio padrão relativo (DPR, %) e em três diferentes níveis: **Repetibilidade** ou **Precisão Intra-Dia** (concordância entre os resultados em um período de tempo reduzido com o mesmo analista e mesma instrumentação); **Precisão intermediária** ou **Inter-Dias** (concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes); **Reprodutibilidade** ou **Precisão Interlaboratorial** (concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica).

A **Repetibilidade** do método pode ser verificada com, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear (concentrações baixa, média e alta) ou o mínimo de seis determinações a 100% da concentração empregada para conduzir o teste. A **Precisão Intermediária** pode ser realizada em um mínimo de dois dias, contemplando os intervalos de concentrações acima expostos (BRASIL, 2003).

A precisão pode ser avaliada pelo desvio padrão absoluto, que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que vinte. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente reduzido e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto.

Outro cálculo emprega o intervalo de confiança da média, isto é, um intervalo de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável (RIBANI *et al.*, 2004).

As **Tabelas 16, 17, 18 e 19** apresentam os cálculos da precisão intra e inter-dias, como desvio padrão relativo (DPR, %) (**Equação 3**), para as formulações-teste **FLX** e **FLXM**, obtidos experimentalmente.

Tabela 16. Precisão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLX.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	DPR (%)
8,0	7,96	7,88	7,93	7,92	0,04	0,51
10,0	10,05	10,04	9,96	10,02	0,05	0,50
12,0	12,11	12,15	11,98	12,08	0,09	0,75

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLX; *C₁ a C₃:* réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *DPR (%)*: precisão, desvio padrão relativo (%).

Tabela 17. Precisão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLXM.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	DPR (%)
8,0	7,99	7,78	7,72	7,83	0,14	1,79
10,0	9,93	9,73	10,00	9,89	0,14	1,42
12,0	11,93	11,84	11,88	11,88	0,04	0,34

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLXM; *C₁ a C₃:* réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *DPR (%)*: precisão, desvio padrão relativo (%).

Tabela 18. Precisão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLX.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	DPR (%)
8,0	7,92	7,87	7,91	7,90	0,03	0,38
10,0	10,02	10,06	10,18	10,08	0,08	0,79
12,0	12,08	12,00	11,79	11,96	0,15	1,25

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLX; C₁ a C₃: réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *DPR (%)*: precisão, desvio padrão relativo (%).

Tabela 19. Precisão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLXM.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	DPR (%)
8,0	7,82	7,81	7,99	7,87	0,09	1,14
10,0	10,10	10,20	9,93	10,08	0,13	1,29
12,0	12,22	12,07	11,93	12,07	0,15	1,24

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLXM; C₁ a C₃: réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *DPR (%)*: precisão, desvio padrão relativo (%).

Os valores obtidos dos desvios padrões relativos (DPR, %), para a avaliação da precisão do método, não extrapolaram o valor máximo exigido pela Legislação Brasileira de 5,0% (BRASIL, 2003). Os intervalos das precisões intra-dias para as formulações-teste **FLX** e **FLXM** foram de 0,50 a 0,75 % (**Tabela 16**) e de 0,34 a 1,79% (**Tabela 17**), respectivamente, e para as precisões inter-dias, 0,38 a 1,25% e 1,14 a 1,24%, como descritos nas **Tabelas 18 e 19**.

Segundo FDA, 1994, e TABORIANSKI, 2003, um método analítico pode ser considerado preciso se o valor do desvio padrão relativo for inferior ou igual a 1%, porém, a Legislação Brasileira exige o limite máximo de DPR (%) de 5,0%. Martin-Smith e Rudd, 1990, classificaram os intervalos de precisão de 0,5 a 1,0% como excelente e, de 1,1 a 1,5%, como bom. Partindo-se da classificação descrita, o método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rotina, resultou excelente precisão para a formulação-teste **FLX** e, adequada para a **FLXM** (BRASIL, 2003).

5.4.7. EXATIDÃO

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

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

Nas **Tabelas 20, 21, 22 e 23** são apresentados os resultados para a exatidão intra e inter-dias das formulações-teste **FLX** e **FLXM**.

Tabela 20. Exatidão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLX.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	E (%)
8,0	7,96	7,88	7,93	7,92	0,04	99,0
10,0	10,05	10,04	9,96	10,02	0,05	100,20
12,0	12,11	12,15	11,98	12,08	0,09	100,67

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLX; *C₁ a C₃:* réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *E (%)*: exatidão, em percentagem.

Tabela 21. Exatidão intra-dia avaliada para a formulação-teste FLXM.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	E (%)
8,0	7,99	7,78	7,72	7,83	0,14	97,88
10,0	9,93	9,73	10,00	9,89	0,14	98,90
12,0	11,93	11,84	11,88	11,88	0,04	99,00

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste FLXM; *C₁ a C₃:* réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *E (%)*: exatidão, em percentagem.

Tabela 22. Exatidão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLX.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	E (%)
8,0	7,92	7,87	7,91	7,90	0,03	98,79
10,0	10,02	10,06	10,18	10,08	0,08	100,85
12,0	12,08	12,00	11,79	11,96	0,15	99,65

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste **FLX**; *C₁ a C₃:* réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *E (%)*: exatidão, em percentagem.

Tabela 23. Exatidão inter-dias avaliada para a formulação-teste FLXM.

Concentrações Teóricas (µg/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	Concentrações Calculadas (µg/mL)	dp	E (%)
8,0	7,82	7,81	7,99	7,87	0,09	98,38
10,0	10,10	10,20	9,93	10,08	0,13	100,79
12,0	12,22	12,07	11,93	12,07	0,15	100,61

Legenda: *Concentrações Teóricas (µg/mL):* concentração teórica das diluições do flavonóide rutina padrão secundário de referência acrescida na formulação-teste **FLXM**; *C₁ a C₃:* réplicas das concentrações; *Concentrações calculadas (µg/mL):* concentrações calculadas (média das concentrações) do flavonóide rutina (µg/mL) a partir dos resultados experimentais em comparação com a solução padrão da substância química de referência (10,0 µg/mL); *dp:* desvio padrão; *E (%)*: exatidão, em percentagem.

Os intervalos das exatidões intra-dias das formulações-teste **FLX** e **FLXM** encontraram-se entre 99,00 a 100,67% (**Tabela 20**) e 97,88 a 99,00% (**Tabela 21**), respectivamente, e inter-dias, entre 98,79 a 100,85% (**Tabela 22**) e 98,38 a 100,79% (**Tabela 23**). Os valores calculados apresentaram-se próximos a 100%, em concordância com o limite especificado pela literatura (BRASIL, 2003). Os resultados para a exatidão evidenciaram, adicionalmente aos resultados da recuperação do padrão (*item 5.4.5.*, **Tabelas 14 e 15**), similaridade elevada entre os valores de concentrações teóricas do flavonóide rutina e daqueles calculados experimentalmente (**Tabelas 20 a 23**).

5.5. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (TEN)

As formulações-teste **FLX** e **FLXM** foram avaliadas quanto às características organolépticas, físicas, físico-químicas e químicas por meio do TEN.

As loções, após serem selecionadas pelos critérios de análise dos TEA (*item 4.2.3.2.*), apresentaram-se adequadas quanto às características ou propriedades (variáveis) avaliadas perante as condições drásticas de armazenamento, apresentando os melhores perfis de estabilidade físicas e físico-químicas.

Geralmente, o TEN é conduzido em um período médio de 90 a 120 dias, mantendo-se as amostras armazenadas em, no mínimo, três condições distintas de temperatura, umidade e luminosidade. A amostra padrão ou referência é armazenada na condição cujas características organolépticas, físicas, físico-químicas e químicas sofrem alterações desprezíveis ou reduzidas. Pode-se utilizar o material de acondicionamento final do produto e realizam-se os ensaios em réplicas de dois. Os resultados obtidos pela TEN, após interpretação e tratamento estatístico pertinente, são extrapolados, permitindo gerar informações sobre a vida útil do produto, teoricamente (BRASIL, 2004c; PINTO, 2004).

As Tabelas 24 e 25 ilustram os resultados das características organolépticas (aspecto, cor e odor) e dos parâmetros físicos, físico-químicos (valor de pH e viscosidade aparente) e químicos (teor remanescente da concentração, % p/v, de flavonóides totais, equivalentes em rutina) analisados pelo Teste de Estabilidade Normal para as loções **FLX** e **FLXM**.

Tabela 24. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valores de pH e da viscosidade aparente da formulação-teste FLX submetida ao Teste de Estabilidade Normal.

Teste de Estabilidade Normal																			
FLX		Condições de Armazenamento																	
		Ambiente (24 ± 2 °C)								Refrigerador (5,0 ± 0,5 °C)									
		tempo (dias)																	
Variáveis	t ₀	3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90
Teor (%)	99,38	97,76	99,17	98,91	97,33	96,54	96,02	98,63	99,89	98,95	99,40	98,99	98,70	95,33	92,92	87,46	81,81	75,51	65,22
pH	5,8	5,7	5,7	5,7	5,8	5,5	5,5	5,7	5,8	5,7	6,0	5,7	5,5	5,3	5,5	5,5	5,3	5,5	5,0
% pH	-	-1,7	-1,7	-1,7	0	-5,2	-5,2	-1,7	0	-1,7	3,4	-1,7	-5,2	-8,6	-5,2	-5,2	-8,6	-5,2	-13,8
η	350	430	420	460	440	480	480	370	360	410	400	360	370	220	260	350	380	310	270
% η	-	22,9	20,0	31,4	25,7	37,1	37,1	5,7	2,9	17,1	14,3	2,9	5,7	-37,1	-25,7	0	8,6	-11,4	-22,9
Aspecto	H	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	M.a.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	C.a.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N

Legenda: (-): não avaliado; η: viscosidade aparente (em cP); t₀: tempo de repouso (24 horas após o preparo); LM: levemente modificado; N: normal; % pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial, t₀; % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial, t₀; H: aspecto homogêneo (loção); M.a.: marrom avermelhado; C.a.: característico do extrato; Teor (%): concentração percentual de flavonóides totais, equivalentes em rutina, remanescente na formulação-teste FLX.

Tabela 25. Avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), valores de pH e da viscosidade aparente da formulação-teste **FLXM** submetida ao Teste de Estabilidade Normal.

Teste de Estabilidade Normal																			
FLXM		Condições de Armazenamento																	
		Ambiente (24 ± 2 °C)										Refrigerador (5,0 ± 0,5 °C)							
		tempo (dias)																	
Variáveis	t ₀	3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90
Teor (%)	96,65	96,65	96,64	95,95	95,29	92,99	90,27	97,25	97,50	98,01	95,97	96,64	95,34	94,16	91,20	84,54	78,44	67,38	61,53
pH	6,1	6,0	6,0	6,1	6,0	5,9	5,7	6,0	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	5,9	5,7	5,7	5,5	5,0	4,9
% pH	-	-1,6	-1,6	0	-1,6	-3,3	-6,6	-1,6	0	0	0	-1,6	-1,6	-3,3	-6,6	-6,6	-9,8	-18,0	-19,7
η	255	245	240	250	245	240	220	250	240	230	235	215	225	275	315	300	285	175	150
% η	-	-3,9	-5,9	-2,0	-3,9	-5,9	-13,7	-2,0	-5,9	-9,8	-7,8	-15,7	-11,8	7,8	23,5	17,6	11,8	-31,4	-40,0
Aspecto	H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
Cor	M.a.	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Odor	C.a.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	LM	N	N

Legenda: (-): não avaliado; η: viscosidade aparente (em cP); t₀: tempo de repouso (24 horas após o preparo); LM: levemente modificado; N: normal; % pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial, t₀; % η: variação percentual do valor da viscosidade aparente em relação à viscosidade aparente inicial, t₀; H: aspecto homogêneo (loção); M.a.: marrom avermelhado; C.a.: característico do extrato; Teor (%): concentração percentual de flavonóides totais, equivalentes em rutina, remanescente na formulação-teste **FLXM**.

As características organolépticas (aspecto, cor e odor), para as formulações-teste **FLX** e **FLXM**, na condição de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), não sofreram alterações perceptíveis durante o período de 90 dias de duração do Teste de Estabilidade Normal. Na condição de ambiente (24 ± 2 °C), a loção **FLX** apresentou alteração sutil do aspecto, sendo classificada como levemente modificada (LM), aos 90 dia de análise. As demais características, cor e odor, mantiveram-se normais (**Tabelas 24 e 25**).

A preparação **FLXM** se apresentou levemente modificada quanto à coloração no 60º dia de análise para a condição de ambiente (24 ± 2 °C) e, as demais características organolépticas, apresentaram-se visualmente inalteradas em relação as propriedades do veículo cosmético avaliadas após o período de repouso de 24 horas, seqüencial ao dia da preparação.

Segundo os resultados obtidos, a formulação-teste **FLX** resultou em um sistema emulsionado de estabilidade adequada, segundo os critérios de inclusão e exclusão (*item 4.2.5.3.*), para as características organolépticas na condição de armazenamento em estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C). Durante o período de armazenamento, houve modificação leve (LM) do odor no 7º dia de análise. A loção **FLXM** apresentou-se susceptível à temperatura elevada, alterando-se quanto ao aspecto (90º dia), cor (60º e 90º dias) e odor (7º e 30º dias).

Os valores de pH para a formulação-teste **FLX** (**Tabela 24**) resultaram em variações de maior relevância nas condições de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) e estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), com intervalos percentuais de variação entre 5,2 a 3,4% (negativa e positivamente) e 13,8 a 5,2% (ambos negativamente). Apesar das alterações, os valores de pH mantiveram-se compatíveis com o valor de pH fisiológico. Na temperatura elevada da condição de armazenamento em estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), eram esperadas alterações significativas no parâmetro físico-químico analisado (valor de pH), pois a elevação da temperatura possui influência direta na estabilidade físico-química e química de diversas formas cosméticas e dos princípios ativos (MAIA, 2002). Porém, a variação relevante do valor de pH na

condição de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), condição aceita como de referência ou padrão para os estudos de estabilidade dos produtos cosméticos, evidenciou a sua inadequação para este estudo, somado ao tipo de formulação e os componentes da preparação **FLX**. A condição de ambiente (24 ± 2 °C) se apresentou mais indicada para a condição padrão ou de referência para esta formulação e parâmetro (valor de pH), obtendo-se intervalo da variação percentual de - 5,2 a 0% (**Figura 29**).

A loção **FLXM** (**Tabela 25**) obteve variação reduzida do valor de pH, de intervalo percentual entre - 3,3 e 0%, na condição de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) e variação de intervalo de percentagem de - 6,6 e 0%, na condição de ambiente (24 ± 2 °C), sugerindo perfil de estabilidade diferenciado da preparação **FLX**, que obteve resultados inversos, em temperaturas reduzidas e ambientais, para a propriedade físico-química em estudo. Na condição de estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), o intervalo de variação do valor de pH, em percentagem, ocorreu entre -19,7 e -3,3%, condição que ofereceu alterações de maior relevância (**Figura 31**).

Segundo os resultados apresentados nas **Tabelas 24 e 25**, as formulações-teste **FLX** e **FLXM** possuíram tendência à redução do valor de pH (**Figuras 29 e 31**) nas condições de armazenamento em temperatura elevada ($40,0 \pm 0,5$ °C), possivelmente, devido a deterioração dos componentes do veículo e da substância ativa, o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthham, sugerido pelo Teste de Estabilidade Normal.

Os valores da viscosidade aparente da loção **FLX** (**Figura 30**) acarretaram em elevação, nas condições de armazenamento em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), obtendo-se valores percentuais de elevação para o 90º dia de 37,1 e 5,7%, respectivamente. As análises do valor da viscosidade no 3º, 7º, 15º e 30º dia, nas condições de ambiente (24 ± 2 °C) e de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) apresentaram perfil semelhante de comportamento, resultando em oscilações reprodutíveis do valor da viscosidade aparente nos dias acima mencionados.

Na condição de ambiente (24 ± 2 °C), o valor da viscosidade aparente tem indício de estabilização, mantendo-se constante na variação percentual de 37,1% nos dias 60 e 90 (**Tabela 24**).

O comportamento da viscosidade aparente para a condição de estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C) apresentou perfil diferenciado daqueles obtidos nas condições de ambiente (24 ± 2 °C) e refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C). A preparação **FLX** sofreu redução percentual do valor deste parâmetro físico-químico (- 22,9%), após ter o ápice de elevação (8,6%) no 30º dia (**Figura 30**).

Nas condições de armazenamento empregadas no Teste de Estabilidade Normal, a formulação-teste **FLXM** sofreu redução do valor da viscosidade aparente no 90º dia de análise (**Figura 32**), com redução percentual de 13,7; 11,8 e 40,0% para as condições de ambiente (24 ± 2 °C), de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) e de estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), respectivamente. Exceto no 3º, 7º, 15º e 30º dia de análise para a condição de estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), a preparação **FLXM** obteve elevação percentual de valor de viscosidade aparente de 7,8; 23,5; 17,6 e 11,8%, respectivamente. A presença da lecitina de soja (Aminolec®, 2% p/p) modificou o perfil reológico da formulação, resultando em valores de viscosidade aparente inferiores aos obtidos na **FLX**.

Os perfis das variações dos valores de pH e da viscosidade aparente obtidos no Teste de Estabilidade Normal apresentaram similaridade com os resultados apresentados nos Testes de Estabilidade Acelerada para as loções **FLX** e **FLXM** (*item 5.3. e Tabelas 4 e 5*).

Figura 29. Variação percentual do valor de pH para a formulação-teste FLX nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal.

Figura 30. Variação percentual do valor da viscosidade aparente para a formulação-teste FLX nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal.

Figura 31. Variação percentual do valor de pH para a formulação-teste **FLXM** nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal.

Figura 32. Variação percentual do valor da viscosidade aparente para a formulação-teste **FLXM** nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal.

A estabilidade química em função do flavonóide rutina nas formulações-teste **FLX** (Tabela 24) e **FLXM** (Tabela 25), foi avaliada por meio da quantificação do teor de flavonóides totais pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 361,0 nm (NF X, 1955; PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965) previamente validado (ROLIM *et al.*, 2005).

Nas condições de armazenamento em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e em refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), as preparações **FLX** e **FLXM** apresentaram degradação reduzida do conteúdo de flavonóides totais, equivalentes em rutina, comparadas com os teores obtidos após o período de repouso de 24 horas (t_0) (Tabelas 24 e 25).

A formulação-teste **FLX** (Figura 33) apresentou redução percentual dos flavonóides totais de 3,36% para a condição de ambiente (24 ± 2 °C) e 0,68% para a condição de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) após 90 dias de armazenamento. Embora tivesse ocorrido relevante variação do valor de pH na condição de refrigerador, a concentração de flavonóides totais permaneceu pouco alterada, indicando que a modificação do valor de pH no intervalo percentual de - 13,8 a - 5,2% não causou aumento da degradação do flavonóide rutina.

Para a loção **FLXM**, a redução percentual foi 6,38% e 1,31% para as condições de ambiente (24 ± 2 °C) e de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C), respectivamente (Figura 34), ao término dos 90 dias de análise. Em concordância com os critérios de inclusão e exclusão (item 4.2.5.3.), os teores remanescentes de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes nas formulações-teste mostraram-se aparentemente estáveis.

Na condição de estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), os teores de flavonóides totais tiveram deterioração devido ao efeito da temperatura elevada (COSTA *et al.*, 2002) que ocasionou aceleração da degradação química da substância ativa, para ambas as loções. Ocorreu a redução de 34,16% e de 35,12% da concentração de flavonóides totais para as formulações-teste **FLX** e **FLXM** na condição de estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), respectivamente. Justifica-se o percentual de redução do conteúdo remanescente de ativos com os relatos

de Bruneton, 1999, Friedman e Jürgens, 2000, e Zuanazzi, 2000. Segundo os autores, os flavonóides são compostos fenólicos de solubilidade moderada em água e sensíveis à presença de metais, à radiação ultravioleta, à temperatura e à hidrólise, que é acelerada direta e proporcionalmente à elevação da temperatura.

Bilia e colaboradores, 2001, avaliaram a estabilidade de flavonóis, classe dos flavonóides que pertence a rutina, como extrato seco com adição ou não da mistura de ácido ascórbico e ácido cítrico (200:1) a 2,85% em condições de armazenamento em temperatura ambiente (25 °C) e em estufa (40 °C) em um período de 90 e 45 dias, respectivamente. Os pesquisadores constataram a adequada estabilidade dos flavonóis e que a presença do sistema antioxidante não afetou a estabilidade do extrato seco padronizado. O estudo sugeriu que a ausência de um veículo ou forma farmacêutica ou cosmética contendo água, mantém a estabilidade e o teor do ativo natural, por evitar a reação de degradação por hidrólise.

Outra possível interpretação para a cinética elevada da deterioração dos flavonóides totais teria sido a presença, em concentração inadequada, do agente quelante/seqüestrante heptanoato de sódio (Crodaquest® A300, 0,1% p/p). Banov, 2002, verificou, em seu estudo, a estabilidade das formas cosméticas gel e emulsão adicionadas do extrato vegetal de *Ginkgo biloba* L., padronizado em conteúdo de flavonóides totais, e do agente quelante/seqüestrante EDTA Na₂. Os resultados indicaram a adequação deste agente na manutenção do teor dos flavonóides totais obtidos pelo Teste de Estabilidade Normal na concentração de 0,1% p/p e na condição de estufa (40,0 ± 0,5 °C).

FLX - Teste de Estabilidade Normal
Teor Remanescente de Flavonóides Totais

Figura 33. Teor remanescente de flavonóides totais, equivalentes em rotina, presentes na formulação-teste FLX, em percentagem. As determinações foram realizadas nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal.

FLXM - Teste de Estabilidade Normal
Teor Remanescente de Flavonóides Totais

Figura 34. Teor remanescente de flavonóides totais, equivalentes em rotina, presentes na formulação-teste **FLXM**, em percentagem. As determinações foram realizadas nas condições de armazenamento em refrigerador ($5,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($40,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) no Teste de Estabilidade Normal.

6. CONCLUSÕES

Considerando o procedimento geral de preparo das formulações **FCCX**, **FC**, **FCG** e **FX** contendo: álcool cetosteárilico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato cetílico 10 OE (Croda[®] CES) e/ou álcool cetosteárilico (e) glicosídeo cetosteárilico (Montanov[®] 68) na concentração total de 7% p/p, e lecitina de soja (Aminolec[®] 70) a 2% p/p, verificou-se a obtenção de sistemas emulsionados heterogêneos devido ao período de agitação inadequado (3 minutos).

Os Testes da Centrifugação e do Estresse Térmico empregados na Avaliação Preliminar da Estabilidade permitiram evidenciar mais rapidamente sinais da instabilidade dos veículos apresentados a seguir: **FLB** e **FLBM** (separação de fases); **FLGM** (alteração da cor e cremeação).

Considerando a avaliação do valor de pH para as formulações-teste **FLX** e **FLXM** nas condições de armazenamento empregadas no Teste de Estabilidade Normal, a temperatura de refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) favoreceu as variações de maior relevância para a preparação **FLX** (- 5,2 a 3,4%) e a condição de estufa ($40,0 \pm 0,5$ °C), para a **FLXM** (- 19,7 a - 3,3%).

As características organolépticas (aspecto, cor e odor) das preparações **FLX** e **FLXM** avaliadas no Teste de Estabilidade Normal permaneceram estáveis nas condições de armazenamento utilizadas.

A formulação-teste (**FLG**) contendo o hidroxipropil guar (Jaguar[®] HP-105) a 0,3% p/p apresentou valor de viscosidade aparente superior em relação à preparação similar (**FLX**), contendo goma xantana (Rhodicare[®] S), 0,3% p/p.

A presença da lecitina de soja (Aminolec[®] 70), 2% p/p, na formulação **FLXM** modificou seu perfil reológico evidenciado pelas análises do valor da

viscosidade aparente efetuadas durante o Teste de Estabilidade Normal, em relação à preparação similar **FLX**, não apresentando esta matéria-prima.

O método espectrofotométrico ($\lambda = 361,0 \text{ nm}$) apresentou linearidade, especificidade, ausência de interferentes, sensibilidade, limites de detecção e quantificação reduzidos, precisão e exatidão adequadas para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina, presentes nas formulações-teste contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth (Slimbuster® H1), empregando como solvente a mistura de álcool etílico 95% e ácido acético 0,02 M, na proporção de 99:1.

A estabilidade química das formulações-teste **FLX** e **FLXM** avaliada por meio da quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina, foi influenciada pelas condições de armazenamento, sendo que a temperatura elevada da condição de estufa ($40,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) acelerou a cinética de degradação dos flavonóides totais, promovendo redução relevante do teor do ativo ao término dos 90 dias da análise (34,16 e 35,12% para **FLX** e **FLXM**, respectivamente).

O teor de flavonóides totais presentes nas preparações **FLX** e **FLXM** sofreu decaimento inferior a 10%, após 90 dias de teste, nas condições de temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) com exposição à luz solar direta e indireta e em refrigerador ($5,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo estas as mais indicadas para o armazenamento das formulações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^d

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

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

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993. 341p.

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

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

ARAÚJO, M. Farmacoterapia nas doenças vasculares periféricas. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E., ed. **Angiologia e cirurgia vascular**: guia ilustrado. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVAS, 2003. p.1-13

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

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

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

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; DIAS, T.C.S.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V. Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.17, n.1, p.78-82, 2005.

BANOV, D. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato seco de *Ginkgo biloba* L.** São Paulo, 2002. 112p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

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

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

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

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

BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.213, n.1, p.199-208, 2001.

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

BRANDÃO, L.A. **Index ABC**: ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. 2.ed. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2000. 1 CD-ROM.

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

BRASIL. Consulta Pública n.61, de 12 de agosto de 2002a. Determina a publicação do "Regulamento Técnico para Medicamentos Fitoterápicos" (anexo). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 24 out. 2003.

BRASIL. Resolução R.E. n.485, de 19 de março de 2002b. Determina a publicação do "Guia para a realização de estudos de estabilidade" (anexo). Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5384&word>>. Acesso em: 13 set. 2004.

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

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

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

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

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

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

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

BUCHWALD-WERNER, S. Herbalia, plantactiv and alovera – high-quality plant extracts for cosmetics. **The Skin Care Forum**, n.31, 2003. Disponível em: www.scf-online.com. Acesso em: 11 jul. 2003.

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

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B., org. **Plantas medicinais sob a ótica da medicina moderna**. Chapecó: Argos Universitária, 2002. p.298-313.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, v.107, n.2/3, p.125-155, 2004.

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

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

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

CONSULCOM. **Cosmetologia 2001**: cosméticos em veículos emulsionados. São Paulo: Consulcom, 2001. pt.1, 47p.

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

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

COSTA, E.M.; BARBOSA FILHO, J.M.; NASCIMENTO, T.G.; MACEDO, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochim. Acta**, Amsterdam, v.392/393, p.79-84, 2002.

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

CTFA International Buyers' Guide. Washington: Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, 2000. v.2, 791p.

CUNHA, B.C.A. Tecnologia das emulsões. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.8, n.2, p.147-172, 1970.

DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotions. In: NEWBURGER, S.H.; SENZEL, A.J. **Manual of cosmetic analysis**. 2.ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1977. p.32.

DE NAVARRE, M.G. Emollient creams. In: _____. **The chemistry and manufacture of cosmetics**. 2.ed. Orlando: Continental Press, 1993. v.3, cap.18, p.265-281.

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

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

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

DOW CORNING. Products. Find Products by Industry. **Beauty and Personal Care.** Disponível em: <http://www.dowcorning.com/applications/Product_Finder/Products.aspx>. Acesso em: 27 set. 2003.

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

ECCLESTON, M.G. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids Surf., A**, Amsterdam, v.123/124, may, p.169-182, 1997.

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

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

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

FITTER, A.H.; HAY, R.K.M. **Environmental physiology of plants.** 2.ed. London, San Diego: Academic Press, 1987. p.3-11.

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

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

FREITAS, P.C.D. Controle de qualidade e critérios técnicos para o uso racional de extratos vegetais em cosmetologia. **Aerosol Cosmet.**, São Paulo, v.15, n.93, p.59-61, 1995.

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

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASSINI, T. **Fitoterápicos: Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. 2003. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/>>. Acesso em: 19 jan. 2003.

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

GERSMAN, A.; TARIKI, M.V.R.; PINTO, R. Celulite e gordura localizadas: tratamento com uma nova formulação de alta eficácia. **Rev. Cosmiatria Med. Estet.**, São Paulo, v.4, n.3, p.18-26, 1996.

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

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

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

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

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

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

HERMITTE, R. Cellulite. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.102, n.11, p.61-68, 1987.

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

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

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

IONQUÍMICA. Produtos. **Polytechno**. Disponível em: <<http://www.ionquimica.com/index1.asp>>. Acesso em: 07 ago. 2004.

INTERNATIONAL SPECIALTY PRODUCTS. **Skin care**. Disponível em: <<http://www.ispcorp.com/products/hairskin/index.html>>. Acesso em: 09 mar. 2003.

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

KAMESHWARI, V.; MISTRY, N.D. Sensory properties of emollients. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.114, n.1, p.45-51, 1999.

KNOTH, A.; SCHERZE, I.; MUSCHIOLIK, G. Stability of water-in-oil-emulsions containing phosphatidylcholine-depleted lecithin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.19, n.3, p.635-640, 2005.

KUREBAYASHI, A.K. Celulite. **Cosmet. Perfumes**, São Paulo, n.23, p.15-16, 2003.

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

LASHMAR, U.T.; RICHARDSON, J.P.; ERBOD, A. Correlation of physical parameters of an oil in water emulsion with manufacturing procedures and stability. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.125, n.2, p.315-325, 1995.

LAUDO TÉCNICO. **Slimbuster H1**. Sorocaba: Chemyunion, 2003. 2p.

LEONARDI, G.R.; CARVALHO, L.S.; POLACOW, M.L.O.; FIORI, J.F. Avaliação histológica da pele de suínos submetida ao tratamento tópico com tiratricol e ultra-som. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 15, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2001. 1 CD-ROM.

LIST, P.H.; SCHIMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRC Press, 1989. p.21-60, 341-359.

LOCHEEAD, R.Y.; HEMKER, W.J.; CASTAÑEDA, J.Y.; GARLEN, D.R. Novas emulsões cosméticas. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.1, n.5, p.36-44, 1989.

LOPES, P.S.; KANEKO, T.M.; TAKANO, C.Y.; LACERDA, A.C.L.O.; LATORRE, L.R.O.; KATO, M.J. Determination of diclofenac sodium in eagle's minimum essential medium with earle's balanced salt solution. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.86, n.4, p.681-684, 2003.

MACIEL, C.P.M.; BABY, A.R.; VELASCO, M.V.R. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo extrato comercial de catuaba e marapuama. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 12, 2004, Ribeirão Preto. **Resumos**. São Paulo: USP, 2004. 1 CD-ROM.

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

MAIA, A.M.; VELASCO-DE-PAOLA, M.V.R.; DAZZI, C. Influência de aminoácidos na estabilização da vitamina C em produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 14, São Paulo, 2000. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2000. p.625-636.

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

MALONE, M.E.; APPELQVIST, I.A.M.; NORTON, I.T. Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 1. Lubrication and deposition considerations. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.17, n.6, p.763-773, 2003.

MANABE, H.; SAKAGAMI, H.; ISHIZONE, H.; KUSANO, H.; FUJIMAKI, M.; WADA, C.; KOMATSU, N. Effects of catuaba extracts on microbial and HIV infection. **In Vivo**, Kapandriti, v.6, n.2, p.161-165, 1992.

MANCONI, M.; APARICIO, J.; VILA, A.O.; PENDAS, J.; FIGUERUELO, J.; MOLINA, F. Viscoelastic properties of concentrated dispersions in water of soy lecithin. **Colloids Surf., A**, Amsterdam, v.222, n.1/3, p.141-145, 2003.

MANSO, E. Massagem de drenagem linfática. **Aerosol Cosmet.**, São Paulo, v.14, n.90, p.16-18, 1994a.

MANSO, E. Recordando sobre celulite. **Aerosol Cosmet.**, São Paulo, v.14, n.88, p.28-29, 1994b.

MARQUARDT, D.; SUCKER, H. Oil-in-water-emulsion gels: determination and mathematical treatment of flow properties. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.46, n.1, p.115-124, 1998.

MARTIN-SMITH, M.; RUDD, D.R. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. **Acta Pharm. Jugosl.**, Zagreb, v.40, n.1/2, p.7-19, 1990.

MASMOUDI, H.; DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.289, n.1/2, p.117-131, 2005.

MAUL, A.A.; MAGALHÃES, J.F.; MAUL, E.Y.; EPPINGER, R.; GUILLEN, S.M.S.S.; PEREIRA, A.R.; MALDOTI, M.; KHUN, R. Extração supercrítica dos rizomas da muirapuama. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 16, São Paulo, 2002. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2002. 1 CD-ROM.

MELE, S.; MURGIA, S.; MONDUZZI, M. Monoolein based liquid crystals to form long-term stable emulsions. **Colloids Surf., A**, Amsterdam, v.228, n.1/3, p.57-63, 2003.

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

MING, L.C.; CORREA Jr., C. Geographic distribution and associated environments characterization of *Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae in Santa Catarina - Brazil. **Acta Hortic.**, Leuven, v.1, n.569, p.91-94, 2002.

MORVAN, P.Y.; MIGUEL, M.S. Lipólise – lipogênese: regulação da produção de gordura no tecido adiposo cutâneo humano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 16, São Paulo, 2002. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2002. 1 CD-ROM.

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

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

NIRAULA, B.B.; SENG, T.N.; MISRAN, M. Vesicles in fatty acid salt-free acid stabilized o/w emulsion: emulsion structure and rheology. **Colloids Surf., A**, Amsterdam, v.236, n.1/3, p.7-22, 2004.

OBUKOWHO, P.; WOLDIN, B. Selectong the right emollient ester. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.116, n.8, p.61-72, 2001

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.5-22. (Série Farmácia. Veterinária).

PAULINO, A.S.; FURLANETO, L.G.B.; ROSSA, R.; PAULINO, N. Desenvolvimento e avaliação farmacológica de produtos cosméticos contendo bioativos para o tratamento da lipodistrofia ginóide. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 16, São Paulo, 2002. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2002. 1 CD-ROM.

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

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1929. p.194-195, 591-592.

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

PINTO, T.J.A.; FERRARINI, M.; GATTI, R.M. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. **Rev. Farm. Quim.**, São Paulo, v.36, n.1, p.26-36, 2003.

POLO, K.F. Moisturizers and humectants. In: _____. **A short textbook of cosmetology**: a short guide to the development, manufacture and sale of modern skin care and skin protection smetics with an aside on the history and prehistory of cosmetics. Augsburg: Ziolkowsky, 1998a. cap.4, p.134-148.

POLO, K.F. Cosmetic emulsions. In: _____. **A short textbook of cosmetology**: a short guide to the development, manufacture and sale of modern skin care and skin protection smetics with an aside on the history and prehistory of cosmetics. Augsburg: Ziolkowsky, 1998b. cap.8, p.234-305.

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

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

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

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

REDEKOP, R. Tensoativos derivados de Glucolipídeos. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.6, n.4, p.41-43, 1994.

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

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

RIBEIRO, A.M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 10, São Paulo, 1996. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1996. p.349-375.

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

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

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. p.3-15.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Quim. Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.807-812, 2004.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.263, n.1/2, p.85-94, 2003.

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

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

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

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

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

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROCIVK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. cap.24, p.517-544.

SÁNCHEZ, C.F.; TROPPER, U.P.; BARCELÓ, R.; PACE, F.; NASI, A.; BRANDOLINO, C.; SÁNCHEZ, G.; PICKENLY, C.; ESTEBAN, J.J. Estudos anatomopatológico e termográfico da celulite. **Rev. Cosmiatria Med. Estet.**, São Paulo, v.2, n.1, p.3-13, 1994.

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

SILVA, A.L.; BARDINI, S.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Anxiogenic properties of *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Marapuama). **Phytother. Res.**, Bognor Regis, v.16, n.3, p.223-226, 2002.

SILVA, A.M.Q.R. Estudo da estabilidade de produtos cosméticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 15, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2001. p.193-194.

SILVA, E.C.; SOARES, I.D. Tecnologia de emulsões. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.8, n.5, p.37-46, 1996.

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

SIQUEIRA, I.R.; FOCESATTO, C.; SILVA, A.L.; NUNES, D.S.; BATTASTINI, A.M.; NETTO, C.A.; ELISABETSKY, E. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazon "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. **Pharmacol., Biochem. Behav.**, Orlando, v.75, n.3, p.645-650, 2003.

SIQUEIRA, I.R.; LARA, D.R.; SILVA, D.; GAIESKI, F.S.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological properties of *ptychopetalum olacoides* bentham (Olacaceae). **Pharm. Biol.**, Lisse, v.36, n.5, p.327-334, 1998.

SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.M.; SILVÉRIO, A. Morphology and anatomy of the flowers of *trichilia catigua* A. Juss, *T. elegans* A. Juss and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v.44, n.4, p.383-394, 2001.

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

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

TAKAHASHI, T., YOKOO, Y., INOUE, T., ISHII, A. Toxicological studies on procyanidin B-2 for external application as a hair growing agent. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.37, n.5, p.545-552, 1999.

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

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.53, n.2, p.203-208, 2002.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. **Guidance for industry: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology**. Rockville, 1995. (CPMP/ICH/281/95). Disponível em: <<http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2004.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Chemistry (Draft). **Analytical procedures and methods validation**: chemistry, manufacturing and controls documentation. 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/>>. Acesso em: 12 jun. 2004.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Biopharmaceutics. **Bioanalytical method validation**. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: 12 jun. 2004.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry**: Botanical Drug Products. 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: 19 jul. 2003.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Reviewer Guidance**: Validation of Chromatographic Method. 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/>>. Acesso em: 03 mar. 2003.

UNITED States Pharmacopeia: USP24; The National Formulary: NF19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.2149-2151.

UNITED States Pharmacopeia: USP26; The National Formulary: NF21. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.2092-2099, 2439-2442.

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

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

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

VELASCO-DE-PAOLA, M.V.R. Fatores que influenciam na estabilidade dos produtos cosméticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 15, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2001. p.205-206.

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

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

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

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

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

WOLLENWEBER, C.; MAKIEVSKI, A.V.; MILLER, R.; DANIELS, R. Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at interface and the effect on emulsion stability. **Colloids Surf., A**, Amsterdam, v.172, n.1/3, p.91-101, 2000.

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

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