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

**Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações
tópicas: avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica**

Andressa Costa de Oliveira

Dissertação para obtenção do
Título de **Mestre**

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

São Paulo
2021

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

**Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações
tópicas: avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica**

Andressa Costa de Oliveira

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do
Título de **MESTRE**

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

São Paulo
2021

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O48Á	<p>Oliveira, Andressa Costa de Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações tópicas: avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica / Andressa Costa de Oliveira. - São Paulo, 2021. 147 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles</p> <p>1. Ácido ascórbico. 2. Ácido cafeico. 3. Envelhecimento cutâneo. 4. Peroxidação lipídica. 5. Atividade antioxidante. I. T. II. Velasco, Maria Valéria Robles, orientador.</p>
------	--

Andressa Costa de Oliveira

**Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações tópicas:
avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco (orientadora/presidente)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2021

Andressa Costa de Oliveira

Dedicatória

Aos meus pais, Helenita e Edno que, aceitaram como seus, os meus sonhos. Desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês quanto à minha formação.

A Gustavo Gabriel, meu namorado, por todo carinho, paciência, companheirismo, e por nunca ter me deixado desistir.

Aos meus tios ...

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela bondade, força e oportunidade a mim concedidas, para que eu pudesse dar esse importante passo em minha vida.

A Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco, minha orientadora e amiga, por toda compreensão, dedicação, conselhos e apoio em me fazer crescer profissionalmente. Especialmente pela confiança em mim depositada. Muito obrigada!

Ao Prof. Assoc. André Rolim Baby pelos conselhos, por ter acreditado em mim e me conceder grandes oportunidades durante essa jornada.

A todos os professores que tive oportunidade de conviver e aprender, nas disciplinas, mas em simples conversas nos corredores. Em especial a Prof.^a Dr.^a Cristina Helena, Prof.^a Dr.^a Vladi Consiglieri, Prof. Dr. Felipe Rabello, Prof. Dr. Roberto Parisi, Prof. Dr. Paulo Chanel e Prof. Dr. José Batistuzzo.

Ao Dr. Valcinir Bedin e Dr.^a. Michelli Ferrera Dario por todo o aprendizado no Exame de Qualificação.

Aos técnicos, Claudinéia e Edgar, por todo apoio, e amizade.

*Aos amigos do **laboratório**, pela convivência, amizade, debates científicos e ideias inovadoras: **Alessandra Mari, Thamires, Nádia, Ana, Fernanda, Hannah, Amanda, Bruna, Mirela, Fabiana, Gabriela, Maíra, Paulo, Rafael, Renata.***

*Aos alunos de iniciação científica **Bianca Nicolau, Camilinha, Carolina Marçal, Lohayne Costa, Lucas Righetti, Menino Jesus e Vitinho** por todo suporte na realização dos experimentos.*

*A **Thamires Freire** pelas enormes contribuições na execução do presente trabalho e por ter sido a minha base e suporte durante o mestrado.*

*A minha amiga, **Ana Jacome**, pela amizade, companheirismo, contribuições, e todo o conhecimento intelectual e de vida que me foi proporcionado.*

*Aos colegas que atravessaram as paredes da universidade e se tornaram grandes amigos **Edilson, Frank e Tércio.***

*A minha amiga e colega de apartamento e laboratório, **Nádia Ruscinc**, por dividir tantas experiências incríveis durante esta jornada, pelo companheirismo e incentivo.*

*A **Claudinéia**, técnica, mestre, doutora, doida e minha amiga. As palavras escritas aqui não serão suficientes para expressa meu agradecimento; muito obrigada por tudo, pelo auxílio, cumplicidade, companhia, amizade e compreensão.*

*Aos funcionários da **FCF/USP**: **Dorinha**, **Seu Alexandre**, **Kelma**, **Marinalva** e **Shirley**, por todo o trabalho e apoio. Em especial ao **David**, que realmente foi um anjo em minha vida durante esta jornada.*

Aos voluntários dos estudos clínicos, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pela disponibilidade e confiança.

*As empresas **BASF**, **DINACO** e **LUBRIZOL** pelo fornecimento das matérias-primas.*

*A empresa **PORCO REI** por ter cedido os materiais biológicos no início deste projeto.*

*A **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** por todo o acolhimento, estrutura, e por ter sido uma segunda casa ao longo desses anos.*

*Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de mestrado.*

Enfim, obrigada a todos que emprestarem os ouvidos, e às vezes os pés e braços para que eu pudesse realizar as tarefas do dia-a-dia e pelos inesquecíveis momentos de diversão.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE EQUAÇÕES.....	VII
LISTA DE QUADROS.....	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES	XVI
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT.....	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Pele.....	8
3.2 Envelhecimento cutâneo	10
3.3 Atividade antioxidante e estresse oxidativo.....	11
3.4 Classificação dos antioxidantes	12
3.5 Ácido ascórbico (vitamina C)	14
3.5.1 Características.....	14
3.5.2 Reação da oxidação do ácido ascórbico	19
3.6 Ácido cafeico	19
3.7 <i>Tape stripping</i>	21
3.8 Peroxidação lipídica	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Materiais.....	27
4.1.1 Padrões secundários	27

4.1.2 Matérias-primas (<i>INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>)	27
4.1.3 Solventes e reagentes	27
4.1.4 Equipamentos e dispositivos diversos	28
4.2 Métodos	29
4.2.1 Desenvolvimento das formulações tópicas.....	29
4.2.2 Teste de estabilidade.....	32
4.2.2.1 Avaliação preliminar da estabilidade (APE)	32
4.2.2.2 Teste de estabilidade normal (TEN)	33
4.2.3 Parâmetros avaliados	34
4.2.3.1 Características organolépticas	34
4.2.3.2 pH.....	34
4.2.3.3 Análise da atividade antioxidante	35
4.2.4 Avaliação do ácido ascórbico por CLAE.....	36
4.2.4.1 Fase móvel	36
4.2.4.2 Condições instrumentais	37
4.2.4.3 Validação da metodologia analítica	37
4.2.5 Avaliação das espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	40
4.2.5.1 Preparo da solução de malondialdeído (MDA).....	41
4.2.5.2 Determinação do aducto malondialdeído – ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA).....	41
4.2.5.3 Ensaio <i>Ex vivo</i>	43
4.2.6 Análise dos resultados	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Avaliação preliminar da estabilidade (APE)	49
5.2 Teste de estabilidade normal (TEM).....	51
5.2.1 Análise organoléptica	51
5.2.2 Determinação do pH.....	60
5.3 Atividade antioxidante	64
5.3.1 Condições analíticas.....	64
5.3.2 Curva analítica de Trolox® padrão de referência secundário	64
5.3.3 Atividade antioxidante das emulsões	66
5.4 Validação de metodologia analítica AA	73
5.4.1 Especificidade	73
5.4.2 Linearidade.....	74
5.4.3 Limite de detecção e quantificação	75
5.4.4 Exatidão	75
5.4.5 Precisão	75

5.5 Quantificação do ácido ascórbico nas formulações	76
5.6 Quantificação do aducto dialdeído malônico - ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) .	80
5.6.1 Linearidade.....	80
5.6.2 Especificidade	81
5.6.3 <i>Tape stripping</i>	82
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8. ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da pele	8
Figura 2 – Reação de oxidação e degradação do ácido ascórbico (vitamina C) $C_6H_8O_6$	16
Figura 3 – Reação oxidativa do ácido ascórbico	19
Figura 4 – Estrutura molecular do ácido cafeico.....	20
Figura 5 – Esquema da técnica de <i>tape stripping</i> nas camadas da pele.....	22
Figura 6 – Formação de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), a partir da degradação de ácido graxo poli-insaturado.....	23
Figura 7 – Reação proposta para a detecção de MDA após um processo de peroxidação lipídica.....	24
Figura 8 – Área de demarcação para aplicação das formulações e fitas de <i>tape stripping</i> no antebraço.....	45
Figura 9 – Esquematização da técnica de aplicação e remoção das fitas <i>tape stripping</i> , para avaliação da peroxidação lipídica em voluntários	46
Figura 10 – Formulações após arrefecimento natural do estresse térmico à temperatura ambiente	50
Figura 11 – Características organolépticas (aspecto e cor) das formulações cosméticas	59
Figura 12 – Curva analítica de Trolox [®] padrão de referência secundário (pureza 97,0%) (n =10) em função da porcentagem de sequestro de radicais livres	65
Figura 13 - Perfil cromatográfico das formulações cosméticas aumentar	73
Figura 14 – Curva analítica de ácido ascórbico padrão secundário ($\mu\text{g/mL}$), a 254 nm	74
Figura 15 – Curva analítica do aducto MDA-TBA (n = 3)	80
Figura 16 – Cromatograma dos interferentes de TBARS	82
Figura 17 – Razão da concentração do aducto MDA-TBA da Pele Não Irradiada comparada as amostras não irradiadas no teste de TBARS via <i>ex vivo</i> (n= 10).....	84

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da porcentagem de inibição dos radicais livres (%SRL _M).....	35
Equação 2. Cálculo limite de detecção.....	39
Equação 3. Cálculo do limite de quantificação	39
Equação 4. Cálculo para determinar exatidão.....	40
Equação 5. Equação da reta que relaciona a concentração de Trolox® e %SRL _M ...	66
Equação 6. Equação da curva analítica que correlaciona (x) à concentração do ácido ascórbico padrão secundário de referência (µg/mL) e (y) a área, com R ² =0,9998 ..	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécie reativa de oxigênio (EROs).....	12
Quadro 2 – Composição quanti e qualitativa (% p/p) das formulações.	31
Quadro 3 – Condições cromatográficas na quantificação do ácido ascórbico nas formulações.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação das formulações no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade.....	49
Tabela 2 – Avaliação das formulações no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade.....	56
Tabela 3 – Avaliação física da formulação completa, durante o Teste de Estabilidade Normal.....	57
Tabela 4 – Avaliação física da associação de ácido cafeico 0,2 % p/p a formulação base, durante o Teste de Estabilidade Normal.....	58
Tabela 5 – Valores de pH (n =3) das formulações em diversas condições estudadas	63
Tabela 6 – Curva analítica de Trolox® padrão de referência (n = 10) (teor de pureza 97, 0%)	65
Tabela 7 – Atividade antioxidante da emulsão não iônica equivalente em concentração de Trolox® (n=3)	72
Tabela 8 – Exatidão do método de quantificação de ácido ascórbico na formulação cosmética	75
Tabela 9 – Concentração de ácido ascórbico no ensaio de precisão intermediária ..	76
Tabela 10 – Concentrações do ácido ascórbico no Teste de Estabilidade Normal, nas diversas condições de armazenamento e tempo	79
Tabela 11 – Linearidade	81
Tabela 12 – Parâmetros da regressão linear da curva analítica do aducto MDA-TBA	81
Tabela 13 – Concentração média de aductos MDA-TBARS obtido das amostras de <i>tape stripping</i> irradiadas e não irradiadas (n= 10).	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Correlatos
AbsM	Absorbância média
AC	Ácido cafeico
AF	Ácido ferúlico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APE	Avaliação Preliminar da Estabilidade
BC	Bege claro
BE	Bege escuro
BRÇ	Braço
CE	Concentração experimental
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CME	Concentração Média determinada Experimentalmente
CMT	Concentração Média Teórica de todas as amostras consideradas
CO₂	Dióxido de carbono
CT	Concentração teórica de ácido ascórbico
DHAA	Ácido L-deidroascórbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH	<i>2, 2-Difenil-2-Picrilhidrazila</i>
DPR%	Desvio padrão relativo
EC	Etrato córneo
EST	Estufa
FC	Formulação completa
GEL	Geladeira
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HNE	<i>4-hidroxinonenal</i>
IM	Intensamente modificado
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Irradiado
LA	Levemente amarelado
LD	Limite de detecção
LM	Levemente modificado
LPO	Lipoperoxidação lipídica
LQ	Limite de quantificação

M	Modificado
MA	Marrom
MAP	Ascorbil fosfato de magnésio
MDA	Malondialdeído
MO	Mostarda
MP	Matéria-prima
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio
NI	Não irradiado
P	Pele
PEG	Polietilenoglicol
PGE2	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	- log de Ka onde Ka é a constante de dissociação ácida
R²	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RLs	Radicais livres
Rpm	Rotação por minuto
SRL_M	Média da porcentagem de sequestro de radicais livres
T.A	Temperatura ambiente
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM	Teste de Estabilidade Normal
TS	<i>Tape stripping</i>
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
~	Aproximadamente
≥	Maior igual
±	Mais ou menos
≤	Menor igual
<	Menor
μL	Microlitro
μM	Micrômetro
μg	Micrograma
μAU	Mili Unidade de absorbância
g	Grama
mg	Miligramma
min	Minuto
F1	Base + ácido ascórbico/ AA 10% p/p
F2	Base + ácido cafeico/ AC 0,2% p/p + AA 10% p/p
F3	Base + AC 0,2 % p/p
F4	Base + AC 0,4% p/p + AA 10% p/p
F5	Base + AC 1% p/p + AA 10% p/p
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol	Molaridade
N	Normal
nm	Nanômetro
p/p	Peso/peso
v/v	Volume/volume

RESUMO

OLIVEIRA, A. C. **Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações tópicas: avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica**. 2021. 148 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Antioxidantes tópicos são eficazes na inibição dos radicais livres (RLs) e, consequentemente, previnem o envelhecimento cutâneo da pele. O ácido ascórbico (AA) é comumente empregado nas formulações cosméticas devido sua potente ação antioxidante, estimula a síntese de colágeno e de elastina, e atua como clareador de manchas. Devido à crescente demanda por produtos rejuvenescedores, este trabalho objetivou desenvolver formulações com ácido ascórbico (forma pura) a 10,0%p/p associado ou não ao ingrediente fenólico ácido cafeico (AC) 0,2%p/p e avaliou a ação antioxidante e eficácia das emulsões pela quantificação da peroxidação lipídica do extrato córneo *ex vivo*. Foram desenvolvidas duas emulsões O/A, F1 (base + AA 10%p/p) e F2 emulsão O/A (base + AC 0,2% p/p + AA 10,0% p/p). Para determinar a eficácia das formulações, foram submetidas ao Teste de Estabilidade Normal, prorrogando por 1 ano e três meses nas condições de geladeira ($5,0\pm 2,0$ °C), temperatura ambiente ($25,0\pm 2,0$ °C) e estufa ($45,0\pm 2,0$ °C), sendo avaliadas: características organolépticas, valor de pH, atividade antioxidante e doseamento do AA. O método de TBARs foi aplicado na quantificação dos peróxidos lipídicos. A condição de geladeira ($5,0\pm 2,0$ °C) foi a mais adequada para armazenamento das formulações F1 e F2. Contudo, a F1 usando apenas o AA na sua forma pura, apresentou melhor perfil de estabilidade durante todo o prazo estudado, pois perdeu apenas 10% da concentração inicial de AA no prazo de um ano, preservando e retardando a oxidação do princípio ativo, assim como, apresentou níveis mais adequados de atividade antioxidante, pH e características organolépticas. Na condição de temperatura ambiente ($25,0\pm 2,0$ °C), a atividade antioxidante de F1 se manteve constante durante 360 dias, sem alteração estatisticamente significativa, F2 reduziu 8,0%. Quando as formulações F1 e F2 foram aplicadas nas voluntárias e não exposta à radiação (NI), demonstraram ser candidatos potenciais em formulações na prevenção e tratamento do envelhecimento da pele, reduzindo 20% da concentração dos peróxidos lipídicos quando comparada com a pele não irradiada (PNI) (controle). Quando as amostras foram expostas a irradiação artificial (IR), ocorreu aumento dos peróxidos lipídicos na pele das voluntárias, principalmente F2, que continha AC, no qual, elevou a $\pm 98\%$ a produção dos peróxidos. Entende-se que é mais adequado o uso noturno ou com fotoprotetor associado as formulações estudadas.

Palavras chaves: Ácido ascórbico; Ácido cafeico; Envelhecimento cutâneo; Peroxidação lipídica; Atividade antioxidante.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. C. **Ascorbic acid associated with caffeic acid in topical formulations: evaluation of antioxidant action and lipid peroxidation**. 2021. 148 p. Dissertation (Masters) – Faculty of Pharmaceuticals Sciences, University of São Paulo, 2021

Topical antioxidants are effective in inhibiting free radicals (RLs) and, consequently, prevents cutaneous aging of the skin. Ascorbic acid (AA) is commonly used in cosmetic formulations due to its potent antioxidant action, stimulates the synthesis of collagen and elastin, and acts as a bleaching agent. Due to the growing demand for rejuvenating products, this work aimed to develop formulations with ascorbic acid (pure form) at 10.0% w / w associated or not with the phenolic ingredient caffeic acid (AC) 0.2% w / w evaluated the antioxidant action and efficacy of emulsions by quantifying the lipid peroxidation of the horny extract ex vivo. Two O / A emulsions, F1 (base + 10% w / w AA) and F2 O / A emulsion (base + 0.2% w / w AC + 10.0% w / w AA) were developed. To determine the effectiveness of the formulations, they were subjected to the Normal Stability Test, extending for 1 year and three months in refrigerator conditions (5.0 ± 2.0 °C), room temperature (25.0 ± 2.0 °C) and greenhouse (45.0 ± 2.0 °C), being evaluated: organoleptic characteristics, pH value, antioxidant activity and AA measurement. The TBARs method was applied to quantify lipid peroxides. The refrigerator condition (5.0 ± 2.0 °C) was the most suitable for storing formulations F1 and F2. However, F1 using only AA in its pure form, presented a better stability profile during the entire study period, as it lost only 10% of the initial AA concentration within one year, preserving and delaying the oxidation of the active principle, thus as, it presented more adequate levels of antioxidant activity, pH and organoleptic characteristics. At room temperature (25.0 ± 2.0 °C), the antioxidant activity of F1 remained constant for 360 days, with no statistically significant change, F2 decreased by 8.0%. When formulations F1 and F2 were applied to volunteers and not exposed to radiation (NI), they showed to be potential candidates in formulations for the prevention and treatment of skin aging, reducing 20% of the concentration of lipid peptides when compared to non-irradiated skin (PNI) (control). When the samples were exposed to artificial irradiation (IR), there was an increase in the lipid peroxides in the volunteers' skin, mainly F2, which contained AC, which increased the peroxide production to $\pm 98\%$. It is more appropriate to use at night or with sunscreen associated with the studied formulations.

Keywords: Ascorbic acid; Caffeic acid; Skin aging; Lipid peroxidation; Antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

A pele é um órgão que reveste toda a superfície do corpo humano, estabelece equilíbrio entre o meio interno e externo, é imprescindível à vida e constitui uma barreira de defesa e regulação que protege o organismo. É considerado o maior órgão em extensão do corpo humano, responsável por 16% do peso corporal e um dos mais suscetíveis às alterações clínicas visíveis, a partir da 3ª década de vida (SCOTTI; VELASCO, 2003; BARATA, 1995).

O envelhecimento cutâneo é classificado em dois tipos: intrínseco e extrínseco. No intrínseco (cronológico), a pele naturalmente é dependente de características hereditárias, estresse fisiológico e regulação hormonal (RAMOS et al., 2013). Relevantemente, é mais suave e reduz progressivamente a elasticidade, com palidez e fragilidade da pele, decorrentes da redução da espessura da epiderme e derme (DALCIN et al., 2003). No processo extrínseco, induzido por fatores ambientais, o envelhecimento é mais agressivo na superfície da pele, e surge como resultado do consumo de tabaco, poluição e, principalmente, decorre dos danos causados pela radiação ultravioleta (UV). Como consequência, temos a degradação de fibras de colágeno e elastina, ocasionando uma redução da tonicidade da pele, deixando-a menos hidratada, flácida, áspera ao toque, despigmentada, com invaginações, popularmente conhecida como “rugas” e perda de expressão facial (FRIES; FRASON, 2010; FERNANDEZ et al., 2012).

Em decorrência destes fatores, mecanismos bem elucidados na literatura afirmam que os radicais livres (RL) são os principais indutores destas mudanças na pele (SOUZA et al., 2013). Quando a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) aumenta, ou os sistemas endógenos de neutralização são ineficientes, consequentemente são produzidos peróxidos lipídicos, ocasionando a condição denominada de estresse oxidativo que resulta nos sinais de envelhecimento descritos. Na pele, a peroxidação lipídica induzida pelo UV aumenta a produção de prostaglandinas (PGE2), que desencadeiam danos significativos no decorrer da vida, propiciando a apoptose celular no DNA e pode ocasionar mutações, favorecendo o desenvolvimento de células cancerígenas (BASTOS et al., 2012; ZUSSMAN et al., 2010).

Desta forma, torna-se necessário desenvolver mecanismos que possam prevenir o desequilíbrio provocado pela produção de EROs. O uso de antioxidantes

tópicos pode ser um importante mecanismo de defesa, fornecendo proteção contra o estresse oxidativo endógeno e exógeno pela neutralização dos RLs e bloqueando os danos ocasionados (ALLEMAMM; BAUMANN, 2008; FRIES; FRASON, 2010).

Para atender esta demanda, existem diversos princípios ativos disponíveis para compor as formulações direcionadas à pele envelhecida, como: α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), coenzima Q10, resveratrol, ácido cafeico, ácido lipóico, dentre outros (RAMOS et al., 2013). Entre as vitaminas antioxidantes, o ácido ascórbico por exemplo, pode tratar as rugas existentes da pele pois, além de prevenir a sua formação, estimula a produção de colágeno, promovendo melhores resultados antienvhecimento cutâneo. O AA estabiliza a molécula de colágeno por hidroxilação, além, de estimular a produção de mRNA de colágeno pelos fibroblastos (STAMFORD, 2012; ALLEMAMM; BAUMANN, 2008; PULLAR et al., 2017).

Os demais antioxidantes podem prevenir a formação de rugas, sendo importantes em produtos cosméticos para a pele de pessoas acima de 30 anos, porém, não tratam os problemas decorrentes do envelhecimento da pele, pois não conseguem reverter a perda de elastina e de colágeno existentes (ZUSSMAN et al., 2010).

O ácido ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, atua de forma multifuncional quando aplicado topicamente. Com características hidrossolúveis, sua função não está limitada ao seu efeito antioxidante no estresse oxidativo do organismo, mas, também, é eficaz na inibição e redução dos radicais livres gerados na pele (FERREIRA, 2012). Devido seu elevado poder de regeneração, atua como protetor biológico na síntese de elastina e colágeno, responsáveis pela sustentação e firmeza da pele nas regiões de menor espessura e de maior sensibilidade, como ocorre em torno dos olhos, local em que se observam os primeiros sinais do envelhecimento cutâneo, pelos fatores intrínsecos e extrínsecos descritos anteriormente (MAIA, 2002; DALCIN et al., 2003).

A associação de outros antioxidantes ou ingredientes ativos ao ácido ascórbico é uma tendência atual do mercado, a fim de garantir um efeito sinérgico nas formulações cosméticas. Observam-se associações com α -tocoferol, ácido ferúlico, ácido hialurônico, entre outros, como inovações cosméticas. Desta forma, além de prevenir o envelhecimento precoce da pele, através da redução/inibição dos radicais

livres, a formulação pode propiciar maior elasticidade e firmeza à pele, entre outros benefícios (FRIES; FRASSON, 2010).

Outra substância ativa de destaque é o ácido cafeico (AC), composto fenólico que apresenta atividade antioxidante, capaz de prevenir o envelhecimento cutâneo pelo aumento na produção de colágeno da pele (SPAGNOL et al., 2017). Demonstra efeito protetor contra a peroxidação induzida pela radiação UV e que gera radicais livres e, também, a fosfatidilcolina, importante por estar presente nas bicamadas lipídicas das membranas celulares (MAGNANI et al., 2014). O ácido cafeico apresenta alta lipofilicidade e explica o fato de penetrar e permear facilmente através do estrato córneo.

De acordo com o caderno de tendências 2019-2020 publicado pela Associação Brasileira da indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), os produtos antienvhecimento estão sendo cada vez mais valorizados nos últimos anos. Destacam-se os cosméticos constituídos por componentes ativos antioxidantes em sua composição visando retardar o aparecimento de sinais na pele.

Frente ao exposto, este trabalho teve a finalidade de desenvolver e avaliar formulações tópicas contendo ácido ascórbico isolado e associado a outro antioxidante natural, visando evitar a peroxidação lipídica e sua ação antioxidante na pele, a fim de se obter um produto de alta eficácia no controle do envelhecimento cutâneo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver formulações com ácido ascórbico a 10,0% p/p associado ao ácido cafeico 0,2% p/p e avaliar a ação antioxidante e a lipoperoxidação do estrato córneo.

2.2 Objetivos específicos

- I. Desenvolver formulações tópicas utilizando o ácido ascórbico a 10,0% p/p associado ou não ao ácido cafeico 0,2% p/p;
- II. Analisar o perfil de estabilidade das formulações desenvolvidas em condições de temperatura diversificada e selecionar as de melhor desempenho frente às características físicas, químicas e físico-químicas;
- III. Acompanhar o perfil de estabilidade funcional do antioxidante (ácido ascórbico) por meio de método validado;
- IV. Avaliar a eficácia *ex vivo* das formulações cosméticas por meio do doseamento da lipoperoxidação do estrato córneo por *tape stripping*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pele

É um órgão de contato, que reveste praticamente toda a superfície do corpo humano, é formada basicamente por água, proteínas, lipídios, carboidratos e oligoelementos, como zinco, cobre e selênio (COSTA, 2012). Indispensável à vida, atua na primeira linha de defesa, protegendo os órgãos internos do ambiente externo e, também, impede o organismo de perda de componentes essenciais como íons, água e proteínas séricas. Executa várias funções importantes, como: regulação, excreção, absorção, termorregulação e síntese hormonal, além de atuar na síntese de vitamina D e melanina (PULLAR et al., 2017). Ademais, protege o corpo de traumatismos físicos/ térmicos e da radiação UV e/ ou agentes patogênicos (COSTA, 2012).

É considerado um dos órgãos que mais passam por modificações com o avanço da idade. Para manter a integridade cutânea da pele é importante conhecer suas camadas e seus componentes para que o organismo seja capaz de se defender das inúmeras condições ou mudanças que indivíduo esteja exposto, como fatores ambientais, mecânicos e nutricionais; e prevenir o envelhecimento cutâneo (OLIVEIRA, 2011).

A pele é composta por três camadas primárias, Epiderme, Derme e Hipoderme (**Figura 1**), constituídas por células epiteliais, mesenquimais, glandulares e neurovasculares (D'ORAZIO et al., 2013).

Figura 1 – Estrutura da pele

Fonte: Adaptação de (Enciclopédia Britânica, 2011).

A epiderme é considerada a camada mais externa, fina e avascular, composta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A função de barreira da pele encontra-se quase inteiramente na epiderme e, principalmente, em sua camada superficial, o estrato córneo (EC), além de servir como ponto de contato do corpo humano com o meio ambiente (OLIVEIRA, 2011).

Na medida em que a pele envelhece, as células da epiderme se tornam achatadas e passam a sintetizar e acumular a queratina em seu interior. Quando as células mais superficiais ficam sobrecarregadas de queratina, elas morrem e criam um revestimento rígido ao atrito. Ela também é impermeável à água, sendo conhecida como camada córnea ou estrato córneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). No entanto, a epiderme não é completamente impermeável às substâncias químicas. Assim, a investigação das funções de barreira cutânea é importante, não apenas para médicos clínicos e dermatologistas, mas também para os pesquisadores que estudam o mecanismo de transporte e a liberação de substâncias ativas.

Em contraste, a camada dérmica subjacente à epiderme propicia resistência e elasticidade à pele, em função de ser formada por um tecido conjuntivo, constituído maioritariamente de células fibroblásticas, que estão fortemente envolvidas na síntese de muitas proteínas complexas da matriz extracelular, principalmente nas fibras de colágeno e elastina, além de fornecer suporte nutricional essencial para a epiderme (COSTA, 2012; MONTANARI, 2016). O colágeno é a proteína responsável pelo alongamento e estrutura da pele, enquanto a elastina fornece tônus e elasticidade; os vasos sanguíneos removem as toxinas e liberam os nutrientes essenciais.

Os órgãos sensoriais e as terminações nervosas localizadas na derme são responsáveis pelas percepções e regulações de calor, frio, umidade, aspereza e maciez da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO; 2012). Ressaltando que, a derme é a parte vital onde muitos sinais de mudanças se manifestam. As glândulas sebáceas lubrificam e, por fim, as glândulas sudoríparas mantêm a temperatura corporal pela liberação de calor (AGUIAR et al., 2017).

Abaixo da derme, está a hipoderme, esta é a camada mais profunda da pele, constituída por adipócitos. A hipoderme sustenta a epiderme e derme e as unem aos demais órgãos, atuando como isolante térmico do corpo, bem como, concentra energia para desempenhar algumas funções biológicas. Ela também permite

importante amplitude de movimento à pele e sua espessura é modificada de acordo com a formação física de cada pessoa. Embora apresente mesma origem e características morfológicas da derme, uma nova divisão foi sugerida, em que a hipoderme é denominada tela subcutânea, não pertencendo mais à pele (HARRIS, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; AUDI et al., 2017).

A pele é essencial para saúde e bem-estar do indivíduo e seu estado, também, pode ter um impacto significativo na autoestima. Vale ressaltar que, a pele normal, contém concentração elevada de ácido ascórbico com funções importantes, como estímulo da síntese de colágeno e auxilia na proteção antioxidante contra os fotodanos induzidos pela radiação UV (PULLAR et al., 2017).

3.2 Envelhecimento cutâneo

A pele é um dos órgãos mais suscetíveis aos processos de transformação enquanto a idade avança. Outros fatores envolvidos no processo de envelhecimento são: tabagismo, desidratação, poluição ambiental e exposição à radiação solar, principalmente UV (DUARTE et al., 2000). Segundo Scotti e Velasco (2003), aproximadamente 80% dos sinais visíveis gerados no envelhecimento são formados pela exposição aos raios UV e pelos radicais livres decorrentes gerados na pele.

O envelhecimento cutâneo pode ser classificado como intrínseco e extrínseco. No intrínseco, a pele apresenta-se pálida e com redução de elasticidade, porém, envelhecida naturalmente, enquanto o extrínseco apresenta-se áspera, com invaginações e discretamente despigmentada, em virtude do fotoenvelhecimento que ocorre no interior da derme (FERNANDES et al., 2012; SCOTTI, VELASCO, 2003).

Em decorrência do aumento da expectativa de vida das pessoas e do fato de buscarem maior qualidade de vida, existe a tendência dos consumidores ao uso de produtos cosméticos e dermocosméticos com a finalidade de atenuar, retardar, prevenir e controlar o envelhecimento cutâneo, visando a eficácia na melhora da aparência (OLIVEIRA, 2009).

Como o envelhecimento cutâneo têm adquirido grande importância nas últimas décadas, as indústrias cosméticas têm demonstrado grande interesse na fabricação e na comercialização de produtos que contenham ingredientes ativos antioxidantes em sua composição, como: resveratrol, quercetina, coenzima Q10, ácido ferúlico,

vitamina C (RAMOS et al., 2013). O objetivo destas substâncias é reduzir os danos oxidativos provocados pelas EROs induzidas pela radiação UV, poluição, processos inflamatórios, dentre outros, e mantê-la nas melhores condições fisiológicas. Mas também, têm despertado o interesse de pesquisadores de buscar novas substâncias bem como o conhecimento do mecanismo de ação na atuação antienvhecimento cutâneo, não esquecendo da segurança de uso das preparações (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010; SCOTTI; VELASCO, 2003; BARATA, 1995).

3.3 Atividade antioxidante e estresse oxidativo

Nas últimas décadas, tem chamado a atenção as pesquisas sobre a importância dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que em excesso, são prejudiciais e provocam a peroxidação lipídica de membranas que agredem os tecidos e danificam o DNA (GULCIN et al., 2006; SATTLER, 2013).

A radiação UVA apresenta comprimento de onda 320 a 400 nm e é capaz de penetrar profundamente a pele e atingir a derme. Ela origina radicais livres oxidativos, que desempenham funções importantes na patogênese do envelhecimento prematuro da pele (fotoenvelhecimento ou envelhecimento actínico), ocasiona citotoxicidade dos queratinócitos, degradação de colágeno (importante componente da matriz extracelular, que fornece suporte estrutural a pele), além de contribuir no desenvolvimento de neoplasias quando existe a predisposição (ARAUJO; SOUZA, 2008; MAGNANI et al., 2014).

A radiação UVB, apresenta menor comprimento de onda (280 a 320 nm) e penetra superficialmente na pele, sendo apenas absorvida pela epiderme. É responsável pelos danos agudos e crônicos à pele que contribuem no aparecimento de eritemas, manchas, processos inflamatórios, descamação e principalmente queimaduras. Por ser altamente energética, acredita-se que o UVB tenha maior probabilidade de gerar mais neoplasias na pele que o UVA (ARAUJO; SOUZA, 2008).

Desta forma, antioxidantes têm sido incorporados em produtos cosméticos com o objetivo de reduzir os danos oxidativos na pele provocados pelas EROs induzidas pela radiação UVA e UVB (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010). Alguns radicais livres envolvidos na formação de EROs estão representados no **Quadro 1**.

Entre as principais espécies reativas de oxigênio, o $\text{OH}^\bullet$ é altamente reativo na indução de lesões moleculares; o O_2^- apresenta reduzida capacidade de oxidação e o H_2O_2 , apesar de não ser considerado um radical livre verdadeiro, pode atravessar a membrana celular e provocar sérios danos na molécula de DNA através das reações enzimáticas (GENARO-MATOS et al., 2015; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A administração tópica de antioxidantes fornece uma maneira eficiente para estabilizar ou desativar os radicais livres gerados na pele. Em baixas concentrações, retarda ou previne o processo oxidativo e fortalece o sistema endógeno de proteção cutânea, podendo ser uma estratégia bem-sucedida para minimizar os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (GENARO-MATOS et al., 2015; GULCIN et al., 2006).

Quadro 1 – Espécie reativa de oxigênio (EROs).

$\text{RO}_2^\bullet$	Peroxila ou radical peroxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
ONOO^-	Peroxinitrito
$\text{O}_2^\bullet$	Radical superóxido
$\text{OH}^\bullet$	Radical hidroxila
$\text{HO}_2^\bullet$	Radical peridroxil
$\text{Q}^\bullet$	Radical Semiquinona
$\text{NO}^\bullet$	Óxido Nítrico
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete

Fonte: Adaptação de (BIANCHINI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes, uma vez que penetram o estrato córneo e outras camadas da pele, podem permanecer ativos por vários dias. Porém, para ser considerado um bom antioxidante, é necessário que ele tenha substitutos doadores de hidrogênio no radical, devido seu elevado potencial de reduzir e deslocar do radical gerado em sua estrutura. Os metais de transição envolvidos no processo de oxidação devem ser quelados e também é necessário que o antioxidante acesse o local de ação (CHIARI et al., 2012; SUCUPIRA et al., 2015).

3.4 Classificação dos antioxidantes

Os antioxidantes são classificados como primários, secundários, mistos, quelantes, sinergistas, removedores de oxigênio, entre outros.

Os antioxidantes primários são, compostos fenólicos, que inativam ou removem os radicais livre (RLs), formados durante a iniciação ou propagação da reação, através, da doação de elétrons ou hidrogênio aos RLs, interrompendo a reação em cadeia (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes secundários retardam a reação de autooxidação através do sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, complexação com metais, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (LUZIA; JORGE, 2009).

O ácido cafeico (AC) é considerado antioxidantes multifuncional (mistos), visto que, estimulam a inativação e/ou a remoção dos radicais livres, mediante a doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila de sua estrutura aromática, que tem a capacidade de suportar o elétron desemparelhado, através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula e em alguns casos, quelam metais de transição (Cu^{+1} e Fe^{+2}), no início da reação, bem como durante a propagação do processo oxidativo (PODSEDEK, 2007; PAZINATO, 2017; KYNGMI; EBELER, 2008).

Por meio de reações químicas estáveis, os removedores de oxigênio o capturam do meio e os tornam incapazes de atuar como propagadores de auto-oxidação. Os melhores exemplos deste grupo são AA e seus derivados, porque, também, atuam como sinergista na regeneração dos antioxidantes primários (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os sinergistas são compostos com nenhuma ou reduzida ação antioxidante, como por exemplo, o BHT (butil hidroxi toluol) e BHA (butil hidroxi anisol). Eles podem elevar a atividade dos antioxidantes primários quando empregados em combinação apropriada. Contudo, alguns antioxidantes primários podem atuar sinergicamente removendo o oxigênio, quando combinados. Por exemplo, o AA além de ser removedor de oxigênio, age como sinergista na regeneração de antioxidantes primários, como por exemplo, o α -tocoferol (vitamina E), atuando como doador de elétrons para restaurar o radical tocoferoxil. Contudo, o α -tocoferol funciona primeiro como antioxidante primário que reage com um radical ascorbil livre orgânico no sistema fisiológico e, então, é convertido novamente em ascorbato através do ciclo redox. A interação do AA com um parceiro redox, como o α -tocoferol, tem se mostrado

útil em retardar sua oxidação e regenerar a forma reduzida, e neutraliza os radicais livres gerados (RAMALHO; JORGE, 2006; SHERAZ et al., 2015).

Os agentes quelantes/sequestrantes são moléculas capazes de formar complexos com cátions, tais como o cálcio (Ca^{2+}), alumínio (Al^{3+}), cobre (Cu^{2+}) e o magnésio (Mg^{2+}) interrompem a disseminação dos radicais livres no processo de peroxidação lipídica, modificam o potencial redox do meio e reparam as lesões das moléculas acometidas pelos radicais livres (KYNGMI; EBELER, 2008; SUCUPIRA et al., 2015).

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um sal quelante amplamente utilizado na indústria cosmética como estabilizador de formulações, pois formam quelatos estáveis com íons metálicos polivalentes, solúveis em água (CURY et al, 2017).

3.5 Ácido ascórbico (vitamina C)

3.5.1 Características

Ácido ascórbico (AA) ou vitamina C é um composto orgânico, cristalino branco pertencente à família dos monossacarídeos, hidrofílico e de baixa massa molar (GULCIN et al., 2006). A solubilidade em água é 0,33 g/mL; 0,02 em etanol absoluto; 0,01 em glicerol e 0,05 em propilenoglicol (KIRK et al., 2007).

Os seres humanos são incapazes de sintetizá-lo devido a deficiência da L-gulonolactona oxidase, enzima envolvida na síntese do ácido ascórbico. Assim, é necessário sintetizá-lo a partir da glicose ou extrair de certas fontes naturais, como frutas e legumes, para atender aos requisitos nutricionais de uma dieta saudável e para administração tópica de formulações (SHERAZ et al., 2015).

O uso tópico permite alcançar uma concentração cutânea de 20 a 30 vezes maior, quando comparada à suplementação oral, pois esta via não consegue atingir uma concentração suficiente na pele que ofereça a ação antioxidante frente à ação UV (AHMAD et al., 2011; MAIA, 2002; WANG et al., 2012).

O nível de AA aplicado topicamente na epiderme é 5 vezes superior ao encontrado na derme e, para que a formulação seja efetiva, é necessário transpor a função barreira conferida pelo estrato córneo (SCOTTI; VELASCO, 2003). A fim de

que uma concentração maior de AA permeie a pele humana, é necessário que a formulação possua valor de pH menor que 3,5 (pH 2,0 – 3,5); ou seja, inferior ao primeiro pKa de ionização (4,2). Desta forma, a penetração cutânea pode ser otimizada, pois maior concentração de AA estará na forma protonada (LEE et al., 2017; STAMFORD et al., 2012).

A concentração efetiva na formulação tópica varia de 5,0 a 20,0% e, acima deste valor, não se verifica maior eficácia. Pinnell e colaboradores. (2001), aplicaram formulações contendo AA nas concentrações de 5,0 a 30,0% em modelo de pele suína. Os níveis cutâneos de ácido L-ascórbico foram medidos para determinar a entrega percutânea. Os níveis teciduais de AA aumentaram e foram máximos em 20%, por razões desconhecidas, as concentrações superiores a 20% resultaram em redução dos níveis teciduais. E os derivados, ascorbil fosfato de magnésio (12,0%), ascorbil-6-palmitato (10,0%), não aumentaram significativamente os níveis de ácido L-ascórbico na pele.

Pesquisas realizadas demonstraram que o AA tópico a 5,0% é altamente eficaz como despigmentante, principalmente no tratamento de melasma, devido a capacidade de reduzir a produção de pigmentos melanínicos via inibição da enzima tirosinase (DAYAL et al., 2017), e acima de 10,0% promove firmeza e sustentação da pele, devido estimular a biossíntese de colágeno e elastina (FITZPATRICK; ROSTAN, 2002). Adicionalmente, reduz o eritema induzido pelas radiações UVA e UVB sobre a pele, fornecendo fotoproteção e redução dos EROs devido seu potencial antioxidante capaz de minimizar o processo de oxidação celular provocado pela exposição à radiação ultravioleta (UV) (FERREIRA, 2012; AHMAD et al., 2011).

O AA está envolvido, também, em todas as fases da cicatrização de lesões, sendo que na fase inflamatória é imprescindível na apoptose e depuração de neutrófilos. Durante a fase proliferativa, contribui na síntese, maturação, secreção e degradação do colágeno e a deficiência pode afetar a produção e retardar a cicatrização (MOORES, 2013).

Considerado menos tóxico e o mais potente dos antioxidantes naturais, o AA (**Figura 2**) atua como doador de hidrogênios, quelante de metais com mais de um estado de valência e sequestrador de radicais, como por exemplo, o superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (GULCIN et al., 2006). Um dos problemas

enfrentado pelos formuladores refere-se a sua estabilidade, pois é instável quando exposto ao ar, umidade, luz, temperaturas mais altas ($> 45^{\circ}\text{C}$), íons metálicos, oxigênio e bases, exigindo a adição de substâncias aditivas antioxidantes, cuidados na manipulação e armazenamento (MAIA, 2002). Apesar da grande eficiência antioxidante, o AA age, também, paradoxalmente como pró-oxidante na presença de ferro, podendo causar danos oxidativos (DE-VRIESE et al., 2008).

Sua forma reduzida é referida como ácido L-ascórbico e seu produto de oxidação inicial de ácido L-deidroascórbico (DHAA), os dois possuem atividade como vitaminas. A estrutura do ácido L-ascórbico apresenta um diol e caso sofra o processo de oxidação, origina-se o DHAA. Basicamente, quando perde um elétron, ocasiona a formação do ácido monodeidroascórbico, também denominado radical L-ascorbato intermediário, devido à produção anormal de agentes oxidantes e de mecanismos antioxidantes falhos e, quando perde o segundo elétron, é que ocorre à formação do DHAA, ou seja, para a oxidação do AA, dois prótons e dois elétrons devem ser perdidos. Entretanto, o DHAA é reversível a forma de AA e apresenta cerca de 75 a 80% de atividade antioxidante. Nos seres humanos, ambas as formas são biologicamente ativas e a atividade total do AA envolve a somatória de ambas (FORNARO; COICHEV, 1998; SATTTLER, 2014; LEES, 1975; SELIMOVIC et al., 2011).

A degradação do DHAA pode originar ácido 2,3 dicetogulônico cuja redução é irreversível e, com isto, uma variedade de produtos de degradação é originada, como: furfural, ácido oxálico e carboxílico, entre outros (HIATT et al., 2011).

Figura 2 – Reação de oxidação e degradação do ácido ascórbico (vitamina C) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para preservar a estabilidade das formulações cosméticas contendo AA, geralmente são adicionados aditivos, como: DL-metionina, glutatona, metabissulfito e ácido ferúlico (antioxidante); sorbitol, sacarose e doadores de viscosidade. Estes reduzem a degradação de AA, pois quanto maior a viscosidade do meio, menor será sua degradação, devido à mobilidade reduzida das moléculas. É importante ressaltar que a seleção cuidadosa dos componentes do excipiente/ veículo da formulação, incluindo emolientes e umectantes é relevante para a formulação de cosméticos eficazes (SHERAZ et al., 2015; AHMAD et al., 2011).

Devido à instabilidade do ácido L-ascórbico, a modificação de sua estrutura e síntese de derivados são estratégias efetivas para retardar sua degradação, ressaltando a importância de verificar a capacidade de permeação cutânea e liberação da molécula ativa para exercer a ação (GILBERT; GONZÁLEZ, 2010).

Alguns derivados do AA, como o ascorbil fosfato de magnésio (MAP) e ascorbil fosfato de sódio, podem ser convertidos em ácido L-ascórbico. O MAP apresenta estabilidade relativamente maior, porém, não favorece a função da barreira cutânea sugerindo uma diferença nas taxas de sua penetração nas camadas da pele. Em contrapartida, o ascorbil fosfato de sódio não penetra na epiderme, ou seja, apesar do AA ser instável, ele apresenta melhor resultado em comparação aos seus derivados frente às ações esperadas de sua eficácia (WANG et al., 2012).

Em um estudo é relatado que formulação com ácido ascórbico a 15% em valor de pH 3,2 apresentou resultado aproximadamente 150 vezes superior comparado com aquelas com 10,0% de palmitato de ascorbila e 12% de fosfato de ascorbil magnésio (BISSETT et al., 1990). De acordo com as pesquisas, a incorporação de AA puro em uma formulação apresenta vantagens para a eficácia dermocosmética durante todo prazo de validade do produto, o que não ocorreu com os seus derivados, como, o palmitato de ascorbila que, embora tenha penetrado a pele, foi ineficiente sua conversão em ácido L-ascórbico, forma ativa e eficaz do AA (ROSS et al., 1999). Ou seja, apesar de serem mais estáveis, topicamente os derivados não apresentaram a mesma eficácia comparada ao ácido ascórbico puro (PINNELL et al., 2001).

Para se tornar eficaz, o AA deve penetrar as diversas camadas da epiderme até atingir a derme, porém a liberação é criticamente dependente das características da formulação, como componentes e forma de apresentação (MAIA, 2002).

Formulações não iônicas favorecem a penetração cutânea do AA (SOUZA et al., 2013) e concentrações elevadas (acima de 10%) são empregadas em produtos tópicos devido sua baixa taxa de permeação cutânea e a efetividade de ação esperada. Dentre os efeitos adversos do uso do ácido ascórbico, alguns consumidores podem apresentar sensação de formigamento, irritação e vermelhidão na pele (SHERAZ et al., 2015).

Com o intuito de amenizar os efeitos indesejáveis do AA, foi descoberto que o DHAA permeia o estrato córneo em até 12 vezes mais rapidamente que o AA. Assim, concentrações inferiores de DHAA em preparações tópicas podem aumentar os níveis de AA na pele, com menor potencial para efeitos adversos. Existe no mercado lançamento de produto com associação de DHAA (2,5%) e AA (2,5%) objetivando melhor eficácia e segurança (KITT, 2012).

3.5.2 Reação da oxidação do ácido ascórbico

O AA contém 1 grupo carbonila e pelo processo oxidativo no início da reação, se reduz ao ácido deidroascórbico, que passa a conter 3 grupos carbonilas. Esta substância adquire $2H^+$ e é rapidamente convertida em ácido 2,3 - dicetogulônico, que perde 1 de dióxido de carbono (CO_2) e, 2 moléculas de água, originando como produto final de degradação, o furfural. Devido ésteres um aldeído muito ativo, sua presença indica uma tendência à polimerização e surgimento de escurecimento (**Figura 3**) (OETTERER, 2004; SELIMOVIC et al., 2011).

Figura 3 – Reação oxidativa do ácido ascórbico

Fonte: Elaborado pelo autor.

A associação de antioxidantes é benéfica no sentido de elevar a atividade da formulação com maior eficácia protetora frente à ação da radiação UV, retardando o processo de degradação, principalmente se considerando que o AA é uma molécula facilmente oxidável (STAMFORD et al., 2012). Neste trabalho, por atuar sinergicamente, foi associado o ácido cafeico como alternativa de minimizar este efeito no AA e prolongar o prazo de validade e real eficácia antioxidante da formulação.

3.6 Ácido cafeico

O ácido cafeico (AC) ou ácido 3,4-di-hidroxicinâmico é um dos metabólitos do hidroxicinamato e fenilpropanóide, que faz parte da classe dos ácidos fenólicos e é amplamente distribuído nos tecidos vegetais. É um polifenol e está presente nas bebidas de café, mirtilos, maçãs, sidra e em vários medicamentos, baseado principalmente no própolis, apresenta duas hidroxilas no anel do ácido cinâmico, nas posições 3 e 4 (ALMAJANO et al., 2007; ARAUJO, 2017).

Se comporta como um antioxidante potente, superior aos ácidos p-cumárico, sinápico e ferúlico, capaz de inibir a oxidação de 2-desoxirribose (2-DR) (ensaio aplicado na formação de radical hidroxila), quela os íons metálicos pró-oxidantes, especialmente os íons Fe (II). Além disso, apresenta atividade antimicrobiana, promissora no tratamento de doenças dérmicas (GILBERT; GONZÁLEZ, 2010; ALMAJANO et al., 2007).

Assim como o AA, o AC quando aplicado topicamente, reduz o eritema causado pela radiação UVB e previne o envelhecimento precoce da pele (GULCIN et al., 2006). No entanto, possui menor potencial de inibição da tirosinase, ou seja, inferior atividade despigmentante cutânea e poucos estudos relacionados à eficácia e segurança do AC na pele (MAGNANI et al., 2014).

Os antioxidantes fenólicos como o AC são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático. Caracterizados pela presença de um anel benzênico, uma porção de ácido carboxílico e uma ou mais moléculas de hidroxila ou metoxi na molécula (**Figura 4**), que lhe conferem propriedades antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006; MAGNANI et al., 2014).

Figura 4 – Estrutura molecular do ácido cafeico

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os produtos descarboxilados são os principais resultantes da degradação de ácidos fenólicos. Por exemplo, o 4-vinilcatecol pode ser formado pela degradação térmica e fotodegradação. No entanto, o hidroxitirosol, embora seja encontrado em quantidades moderadas, é um composto antioxidante eficaz, encontrado naturalmente no azeite de oliva (CORNWELL et al., 2008). Além disso, o aldeído

protocatecuico é considerado um dos principais produtos de oxidação do ácido cafeico no sistema de oxidação de Fenton (KHUWIJITJARU et al., 2014).

Adicionalmente, as atividades antimicrobiana e antioxidante do ácido cafeico são conferidas em emulsões cosméticas em pH ácido (3,0 a 5,0). O efeito antimicrobiano foi demonstrado frente a vários microrganismos, como: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kokuria rhizophila*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (MAGNANI et al., 2014).

3.7 Tape stripping

Várias metodologias são utilizadas para avaliar a função barreira tópica *in vivo* da pele, como: biópsia cutânea, microscopia confocal de varredura, espectroscopia de Raman, dermato-farmacocinética e *tape stripping*. A técnica de *tape stripping* é amplamente utilizada desde 1940, sendo um método muito utilizado na literatura científica e útil para investigar a penetração e retenção de substâncias aplicadas topicamente na pele. Devido sua simplicidade na determinação e custo relativamente baixo, este método está se tornando uma ferramenta útil e cada vez mais popular para dermatologistas e formuladores de produtos cosméticos (SOBIEPANEK et al., 2019; DUARTE, 2017). O teste pode ser realizado em estudos *ex vivo* na pele humana, *in vitro* em pele animal, como cobra, porco e rato.

Na Ciência Cosmética, a técnica vem sendo amplamente utilizada, a fim de determinar as propriedades do estrato córneo (EC), como: medição da massa de células do EC, função barreira, penetração transepitelial, retenção, reservatório de substâncias dérmicas ou exógenas, fisiologia do estrato córneo e secreção de substâncias ativas endógenas (ARCT, 2013).

O método é capaz de remover camadas microscópicas de 0,5 – 1,0 μm do EC, utilizando fitas adesivas aplicadas sequencialmente, baseado na interação da força da fita adesiva com as forças de coesão que ocorrem entre as células, ou seja, a pressão exercida sobre as fitas deve ser uniforme e a velocidade de retirada constante (**Figura 5**) (GONÇALVES, 2019).

Figura 5 – Esquema da técnica de *tape stripping* nas camadas da pele

Fonte: Adaptado de (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

O *tape stripping* permite a remoção parcial de células do estrato córneo por uma única ou múltipla utilização de fitas adesivas (SOBIEPANEK et al., 2019). Segundo Arct (2013), a remoção completa de todas as camadas EC só ocorre após a remoção de mais de 70 tiras. O método apresenta como restrição apenas a remoção de queratinócitos muito densos, como os encontrados em mucosa oral de porco.

O procedimento da técnica é relativamente indolor e minimamente invasivo, sendo que, somente as células mortas incorporadas na sua matriz lipídica são removidas (corneóцитos). Caso a remoção das fitas cause injúria a pele, a reparação homeostática na epiderme ocorre instantaneamente, resultando no restabelecimento rápido da função barreira (DUARTE, 2017; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

Vale ressaltar que, a decapagem com fitas adesivas pode também, ocasionar a renovação de funções perdidas da barreira da pele, aumentando a síntese lipídica epidérmica, produção e secreção de corpos lamelares no estrato granuloso, síntese de DNA e citocinas em células epidérmicas na pele (ARCT, 2013).

Os testes devem ser realizados dentro de 24 a 48 h para as células recém-colhidas ou devem ser congeladas e armazenadas à temperatura de -80 °C. Dentre os métodos mais usados na quantificação das fitas, temos: espectrofotometria UV-VIS, cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência, método de contagem de cintilação e espectroscopia UV e IR (SOBIEPANEK et al., 2019).

3.8 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) ocorre, normalmente e continuamente, em baixos níveis em todos os seres humanos. É controlada, geralmente, por mecanismos biológicos de compensação. No entanto, em descontrole, pode resultar em estresse oxidativo, tornando-se tóxica para as células e membranas celulares (LUQMAN; RIZVI, 2006; ALONSO et al., 2016). A LPO, basicamente, pode ser descrita como um processo pelo qual EROs, radicais livres ou não- radicais atacam lipídeos poli-insaturados. Estes lipídios contêm duas ou mais ligações duplas carbono-carbono ($C^2C=CH^2$), o que os tornam alvos propícios para a ação dos radicais livres. A LPO, basicamente, consiste na abstração do hidrogênio a partir de um átomo de carbono e a incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado (AGPI), resultando na formação de radicais peroxil e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). O radical hidroxila é conhecido como a EROS que inicia a peroxidação. No processo final, ocorre a propagação dos radicais lipídicos e peroxila (R-C e -ROO) (**Figura 6**), que são produzidos, até que destruam a si próprios (BARRERA et al., 2018; ARRUDA, 2014).

Figura 6 – Formação de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), a partir da degradação de ácido graxo poli-insaturado

Fonte: Adaptado de (BARRERA et al., 2018).

Em resumo, quando as EROs interagem com os ácidos graxos poliinsaturados em membranas ou lipoproteínas, o processo de peroxidação lipídica se inicia. Este

descontrole pode contribuir com danos aos lipídios, proteínas e genes, além de estar relacionada com grande variedade de doenças patológicas e no envelhecimento cutâneo da pele (GROTTO et al., 2009). O prejuízo ao tecido da pele é originado, principalmente, através das ações da radiação ultravioleta (UV), porque a peroxidação lipídica induzida por UV, aumenta a produção de prostaglandinas (PGE2), que desencadeia a reação inflamatória na pele (OLIVEIRA, 2015).

Conforme a dose, comprimento de onda, tempo de exposição e área exposta, à radiação UV pode provocar queimaduras e envelhecimento prematuro na pele e até danos no DNA das células da pele e câncer de pele (MAGNANI et al., 2014).

A medição direta do estresse oxidativo em humanos é difícil porque as espécies ativas de oxigênio e os RLs possuem vida muito curta. Assim, o ensaio de ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um dos métodos mais utilizados para estudos de estresse oxidativo em lipídeos e para quantificar os níveis de peroxidação lipídica por meio do malondialdeído (MDA). Entre os aldeídos produzidos pela peroxidação lipídica (LPO), o MDA e o 4-hidroxinonenal (HNE) foram os que ganharam mais atenção, principalmente o MDA, uma vez que, é produzido em altos níveis durante a LPO. Também, tem sido usado como um biomarcador confiável para determinar a extensão da peroxidação lipídica (ALONSO et al., 2009; BARRERA et al., 2018).

Em temperatura elevada e valor de pH baixo, o MDA participa rapidamente da reação de adição nucleofílica com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formando um aduto vermelho fluorescente 1:2 (MDA:TBA) (ALONSO et al., 2009), de acordo com a reação mostrada na **Figura 7**.

Figura 7 – Reação proposta para a detecção de MDA após um processo de peroxidação lipídica

Fonte: ALONSO et al., 2018.

O malondialdeído é um metabólito secundário originado pela peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados e tem sido indicado como principal marcador do aumento do estresse oxidativo. É um aldeído composto por três carbonos, de baixa massa molar que, também, pode ser formado pela decomposição de certos produtos de peroxidação lipídica primária, uma vez que são instáveis e tendem a degradar-se rapidamente em uma variedade de subprodutos (GROTTO et al., 2009; LUQMAN; RIZVI, 2006).

Outros marcadores de peroxidação podem ser utilizados, como: dienos conjugados, 4-hidroxinonenal (4-HNE), hidroperóxidos lipídicos isoprostanos, entre outros. Podem ser avaliados por metodologias indiretas, como espectrofotometria e diretas como cromatografia (JANERO, 1990).

A LPO na pele surge como resultado do estresse oxidativo. O acúmulo lento de dano oxidativo pode contribuir no envelhecimento cutâneo (BARRERA et al., 2018).

Desta forma, sistemas de defesa antioxidante tornam-se necessários para contrabalançar estas ações tóxicas, limitando a quantidade de peróxidos lipídicos que podem ser formados. Os agentes que são considerados antioxidantes incluem enzimas catalíticas que removem radicais como a superóxido dismutase; proteínas que reduzem a disponibilidade dos pró-oxidantes, por exemplo, transferrina, ferritina e metalotioneína; e moléculas de baixo peso molecular que capturam EROs por meio de auto-oxidação, como por exemplo, as que contêm vitaminas como AA, α -tocoferol, compostos fenólicos, β -caroteno; grupos glutathione e tiol. Desta forma, quando aplicados topicamente, são capazes de proteger a pele, reduzindo a peroxidação lipídica da membrana e a formação de proteínas carboniladas, contribuindo para o efeito protetor contra o envelhecimento cutâneo, neoplasias e outras doenças (LUQMAN; RIZVI, 2006; FERREIRA, 2012; MAGNANI et al., 2014; PERES, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Padrões secundários

- Ácido ascórbico – Sigma- Aldrich[®], utilizado como padrão de referência secundário sem ulterior purificação, pureza de 99,0%
- Ácido cafeico – Sigma- Aldrich[®], utilizado como padrão de referência secundário sem ulterior purificação, pureza de 99,0%
- Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromo-2-ácido carboxílico) - Sigma-Aldrich[®], padrão de referência secundário, teor de 97,0%.

4.1.2 Matérias-primas (*INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*)

- Ácido ascórbico (*INCI: Ascorbic acid*) - DSM[®]
- Ácido hialurônico (*INCI: Sodium Hyaluronate and water*) - DSM[®]
- Ácido cafeico (*INCI: Caffeic Acid*) – Active Pharmaceutical[®]
- Cera autoemulsionante não iônica (*INCI: Emulsifying Wax NF*) - Mapric[®]
- Ciclometicone (*INCI: Cyclopentasiloxane*) - Mapric[®]
- Conserv[®] NE (*INCI: Phenoxyethanol*)- Biovital[®]
- EDTA (*INCI: Disodium EDTA*) - Infinity Pharma[®]
- Essência (*INCI: Essence*) - WNF[®]
- Glicerina I (*INCI: Glycerin*) - Mapric[®]
- Glucan[®] E-20 (*INCI: Methyl Gluceth-20*) - DINACO[®]
- Metabissulfito de sódio (*INCI: Sodium Metabisulfite*) - Mapric[®]
- Oleato de decila (*INCI: Decyl Oleate*) - BASF[®]
- Propilenoglicol (*INCI: Propylene Glycol*) - Mapric[®]

4.1.3 Solventes e reagentes

- 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (*INCI: 1,1,3,3-Tetramethoxypropane*) - Sigma Aldrich[®]- Grau De Pureza Analítico (P.A)
- Acetonitrila (*INCI: Acetonitrile*) Merck[®] - Grau de pureza Cromatográfica
- Ácido Fosfórico (*INCI: Phosphoric acid*) - Sigma Aldrich[®]

- Ácido Metafosfórico (*INCI: Metaphosphoric acid*) - Grau De Pureza Analítico (P.A)
- Ácido Sulfúrico (*INCI: Sulfuric acid*) - Synth[®]
- Ácido tiobarbitúrico (*INCI: 2-Thiobarbituric acid*) - Merck[®]
- Água Ultra-Pura MilliQ[®]
- Álcool n-butílico (*INCI: N-butyl alcohol*) - Synth[®]
- Dpph (*INCI: 2, 2-Difenil-2-Picrilhidrazila*) - Sigma- Aldrich[®] (P.A)
- Hidroxitolueno butilado (*INCI: Butylated hydroxytoluene*) – Vital Especialidades[®]
- Metanol (*INCI: methanol*) - Merck[®] - Grau De Pureza Cromatográfica

4.1.4 Equipamentos e dispositivos diversos

- Agitador mecânico Fisatom[®] 713D
- Agitador Vortex 3 Ika[®]
- Balança analítica Shimadzu[®] AUX220
- Balança semi-analítica Mettler[®] P-120
- Banho de ultrassom Ultrasonic Clean[®] 1600 Unique
- Banho-maria com agitação interna- Nova Ética 500/3D
- Câmara de fotoestabilidade- Atlas Suntest[®] CPS+
- Centrífuga Hitachi[®] CF-RN series
- Chapa de aquecimento Ika[®] C-MAGHS7
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] LC-20AD/T
- Espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution[®] 600 UV-Vis, com cubeta de 1cm de caminho óptico
- Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica Bruker[®] EMX
- Geladeira Consul[®]
- pHmetro e eletrôdo combinado de imersão direta Quimis[®]
- Purificador de água Gehaka[®] OS10 LX
- Purificador de água Milli-q Simplicity[®] UV
- Fitas adesivas 3M[®] Scotch Magic[™] Tape
- Membrana de acetato de celulose Millipore[®], diâmetro 0,22µm
- Placa de vidro

- Pote de vidro cor âmbar, capacidade nominal de 45g
- Vial cor âmbar, 1,5mL

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento das formulações tópicas

Uma formulação cosmética deve priorizar as características sensoriais a fim de torná-las mais agradáveis, com fácil aplicação e espalhabilidade, baixa oleosidade e suavidade sobre a pele. Para que isto ocorra, é importante a escolha do tipo de formulação, sendo a emulsão muito recomendada que, além de estimular os processos de penetração e permeação cutânea do princípio ativo, possui características de baixa irritação (tensoativos não iônicos) e propiciam a eficácia cosmética (SOUZA et al., 2013; BISSETT, 2009).

Os constituintes da emulsão inicialmente proposta neste estudo (emulsão óleo em água/creme base) foram pesados em balança analítica (**Quadro 2**). As emulsões foram desenvolvidas por mistura direta da fase aquosa (A) aquecida a $70,0 \pm 2,0$ °C, vertida sobre a fase oleosa (O) aquecida a $70,0 \pm 2,0$ °C, e submetidas ao agitador mecânico Fisatom®, até completa homogeneização (PRISTA, 1996).

Após o veículo emulsionado ser resfriado a $35,0 \pm 2,0$ °C; os demais componentes da formulação foram adicionados, sob constante agitação, até homogeneização da preparação. Após 24 horas, o princípio ativo (ácido ascórbico) foi disperso em propilenoglicol q.s. e adicionado o metabissulfito de sódio à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), até a formação de uma pasta. A mistura foi transferida para a formulação lentamente, sob constante agitação do sistema emulsionado à velocidade de 1.000 rpm, com hélice do tipo centrífuga, durante 5 minutos. O conteúdo foi protegido do oxigênio atmosférico durante a mistura, posicionando o agitador no fundo do recipiente e cobrindo-o durante o processo para evitar o ar. O valor de pH ($3,5 \pm 1,0$) das formulações foram corrigidas com trietanolamina ou ácido cítrico 10,0% p/p, quando necessário (BABY et al., 2007; SHERAZ et al., 2014).

Posteriormente, o conteúdo foi transferido para potes de vidro herméticos, com capacidade nominal de 45,0 g para cada tipo de preparação protegida da luz. As

funções cosméticas dos componentes ativos e a composição qualitativa e quantitativa (% p/p) estão descritas respectivamente no **Quadro 2**.

Quadro 2 – Composição quanti e qualitativa (% p/p) das formulações.

Nome químico	INCI	Nome comercial	Composição (p/p)	Função
Fase Oleosa				
Álcool cetosteárilico(e) Estearato PEG-20	<i>Emulsifying Wax NF</i>	Polawax™	8,0	Cera auto-emulsionante O/A
Oleato de decila	<i>Decyl Oleate</i>	Cetiol V®	2,5	Emoliente e hidratante secundário (oclusão)
Glicerina	<i>Glycerin</i>	Glicerina	3,0	Umectante, emoliente, amaciante
Fase Aquosa				
Glucam™ E-20	<i>Methyl Gluceth-20</i>		3,0	Umectante superficial da pele
EDTA	<i>Disodium EDTA</i>	Uniquelan® NA2S	0,2	Quelante/sequestrante de metais
Água destilada	<i>Aqua</i>		q.s.p.	Veículo
Outros componentes				
Ciclometicone	<i>Cyclopentasiloxane</i>	DC 245®	2,0	Emoliente, umectante, aumenta viscosidade, lubrificante e volátil
Conserv NE®	<i>Phenoxyethanol / 2-Methyl-2H-Isotiazolin-3-One</i>		0,5	Conservante, ação bioestática
Ácido hialurônico	<i>Sodium Hyaluronate</i>		3,0	Hidratante profundo da pele
Ácido cafeico	<i>Caffeic acid</i>		0,2	Ativo: antioxidante, anti-irritante
Essência	<i>Essence</i>		q.s.	Corretivo do odor
Ácido ascórbico	<i>Ascorbic acid</i>	Ácido ascórbico	10,0	Ativo: antioxidante e clareadora pele
Metabissulfito de sódio	<i>Sodium Metabisulfite</i>		0,25	Antioxidante/Conservante
Propilenoglicol	<i>Propyleneglycol</i>		q.s.	Solubilizante, umectante, promotor de penetração cutânea

Legenda: (*) = INCI International Nomenclature of Cosmetic Ingredient (BATISTUZZO et al., 2011).

4.2.2 Teste de estabilidade

4.2.2.1 Avaliação preliminar da estabilidade (APE)

Após 48 h do preparo das formulações (triplicata), tempo necessário para finalização do processo de emulsificação (t_0), as amostras foram submetidas ao Teste de centrifugação e de Estresse térmico, com a finalidade de auxiliar e orientar a escolha das formulações (BRASIL, 2004).

Tipos de amostras avaliadas: base + ácido ascórbico 10,0% p/p (**F1**); base + ácido cafeico 0,2% p/p + ácido ascórbico 10,0% p/p (**F2**); base + ácido cafeico 0,2% p/p (**F3**); base + ácido cafeico 0,4% p/p + ácido ascórbico 10,0% p/p (**F4**); e base + ácido cafeico 1,0% p/p + ácido ascórbico 10% p/p (**F5**).

4.2.2.1.1 Teste de centrifugação

Em tubos de ensaio foram adicionadas quantidades de amostra, de tal forma que o conjunto pesasse, em balança granatária, o equivalente a 5,0 g. Posteriormente, foram submetidas à centrifugação até atingir a velocidade máxima de rotação a 3000 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) (BRASIL, 2004).

Após o ensaio, as amostras foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto e classificadas da seguinte maneira:

(IM) - Intensamente modificada

(LM) - Levemente modificada

(M) - Modificada

(N) - Normal, sem alteração quanto ao aspecto (BABY et al., 2007)

4.2.2.1.2 Estresse térmico

Aproximadamente 5,0 g das formulações foram aquecidas em banho termostatzado, no intervalo de temperatura controlada entre 40,0 a 80,0 °C. Realizou-se a progressão de elevação de 10 °C a cada 30 min. Após, ocorreu o arrefecimento à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) e as formulações foram avaliadas quanto às

possíveis modificações de aspecto e classificadas conforme o item 4.2.2.1.1. As amostras (triplicata) ao estresse térmico (BRASIL, 2004; MAIA, 2002).

As formulações que apresentaram modificações foram descartadas para os próximos testes a serem realizados.

4.2.2.2 Teste de estabilidade normal (TEN)

Foram acondicionadas 30,0 g de cada uma das emulsões em embalagens de vidro (capacidade nominal de 45,0 g), necessário para a realização de todos os ensaios pré-determinados. Os parâmetros avaliados envolveram possíveis alterações físicas e físico-químicas, tais como: aspecto, cor, odor (características organolépticas), valor de pH, atividade antioxidante equivalente em Trolox[®] e doseamento do ácido ascórbico (BRASIL, 2004).

Em geral, todos os parâmetros foram avaliados, conforme as condições de armazenamento descritas a seguir. Tempos de avaliação: tempo inicial (t_0) após 48h de repouso do preparo (t inicial), 7°, 15°, 30°, 60°, 90°, 120°, 360° e 450° dias, adaptado da literatura (BRASIL, 2004). Como o teste foi conduzido até 450° dias, podemos considerar que foi realizado o estudo *Teste de Prateleira* ou *Shelf Life* para estimar o comportamento da formulação durante o prazo de validade. Condições:

- Temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$) ao abrigo da luz.
- Geladeira ($5,0 \pm 2,0\text{ °C}$).
- Estufa ($45,0 \pm 2,0\text{ °C}$) (BRASIL, 2004).

A avaliação da estabilidade envolveu a determinação da atividade antioxidante das formulações, tornando-se necessário separar os componentes antioxidantes da formulação e avaliar separadamente as formulações para melhor entendimento dos resultados. As análises foram realizadas conforme os dias e parâmetros descritos anteriormente. Todos os materiais de acondicionamento foram protegidos com papel alumínio para proteção frente à luz.

4.2.3 Parâmetros avaliados

4.2.3.1 Características organolépticas

Foram seguidas como referência, as amostras recém-preparadas, pois as amostras apresentam o mínimo de alteração. Os parâmetros avaliados envolveram os seguintes critérios adotados:

Aspecto: integridade das formulações mantendo o aspecto inicial das condições de armazenamento, exceto na temperatura elevada que pequenas modificações foram aceitas.

Cor e odor: foram avaliadas por meio de percepção visual e olfativa, em bancada de fundo branco, seguindo como referência as amostras recém-preparadas. Estes índices são seguros para elucidar quanto ao estado de conservação da preparação, e que, a alteração de cor ou cheiro, são indícios de que houve alteração (BRASIL, 2004, BABY et al., 2008).

Escala para a avaliação da estabilidade:

IM - Intensamente modificada; **LM** - Levemente modificada; **M** - Modificada; **N** - Normal, sem alteração quanto ao aspecto.

4.2.3.2 pH

O pH (potencial hidrogeniônico) é um parâmetro de monitoramento importante da estabilidade das emulsões, pois sua alteração pode ser indicativa de reações químicas, degradação dos componentes e oxidação que comprometem o prazo de validade e a qualidade do produto final (MARTINI, 2005).

O pHmetro foi aferido com solução tampão pH 4,0 e 7,0; posteriormente, as amostras foram diluídas em água destilada (1:10) e submetidas à leitura em temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C). Não se admitiram variações maiores que $\pm 10,0\%$ em relação ao inicial, sob todas as condições de armazenamento (VELASCO et al., 2008).

4.2.3.3 Análise da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada com o radical 2, 2-Difenil-2-Picrilhidrazila (DPPH●), seguindo a metodologia descrita por BRAND- WILIANS et al. (1997) e DARIO (2016). Para obtenção da solução de DPPH● 100 µM, pesou-se 3,9 mg de DPPH● e diluiu-se em 100,0 mL de metanol P.A. Agitou-se em agitador Vórtex® até completa mistura e posteriormente, no ultrassom por 15 minutos.

Pesaram-se exatamente 250,0mg das nove amostras, conforme as condições de armazenamento listadas anteriormente e completou-se o volume para 25,0 mL com metanol em balão volumétrico. Posteriormente, agitou-se em vórtex até completa mistura, ultrassom por 15 min e centrifuga Hitachi® RX2 5 min a 3.000 rpm.

Novas diluições foram realizadas para obter a concentração final de 48 µg/mL. Em tubos de ensaios (triplicata) foram transferidas alíquotas de 0,5 mL de cada solução diluídas anteriormente e acrescentados 2,5 mL da solução de DPPH● 100 µM. Homogeneizou-se manualmente e incubou-se ao abrigo da luz por 30 min, à temperatura ambiente (22,0 ± 3,0 °C). As soluções foram lidas em espectrofotômetro com cubeta de 1cm, e caminho óptico a 517 nm (BRAND-WILIANS et al., 1997).

Foram utilizadas soluções controle (branco de leitura), adicionando- se 2,5mL de DPPH● 100 µM a 0,5mL de metanol P.A. O decaimento da absorbância das amostras (A_{Am}) correlacionado ao do controle (A_c) resultou na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL_M), conforme **Equação 1** (BRAND-WILIANS et al., 1997).

$$\% SRL = \frac{A_c - A_{am}}{A_c} \times 100$$

Equação 1. Cálculo da porcentagem de inibição dos radicais livres (%SRL_M).

Legenda: **A_c**= Absorbância do controle negativo; **A_{Am}**= Absorbância da amostra (BRAND-WILIANS et al., 1997).

A leitura da absorbância da mistura com caráter mais baixo é indicativo de atividade de eliminação de radicais livres mais elevadas expressas como a porcentagem de inibição de radical livre pela amostra.

A atividade antioxidante foi expressa em Trolox[®] equivalente, padrão de referência muito utilizado na prática. Para isso foi necessária a construção de curva analítica que correlacionasse o %SRL_M e a concentração deste padrão (DARIO, 2016).

Exatamente 20 mg de Trolox[®] (6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametil cromo-2-ácido carboxílico), padrão de referência secundário (grau de pureza 97,0 %), foi pesado e diluído em balão volumétrico de 100,0 mL com metanol P.A., obtendo uma solução na concentração a 800 µM. A partir desta, foram preparadas em balões volumétricos de 10,0 mL em diluições seriadas, obtendo concentrações finais de Trolox[®] de 3,22; 13,61; 31,80; 64,46; 97,70; 129,97; 159,30; 192,94; 222,86 e 255,13 µM.

Alíquotas de 0,5 mL de cada concentração de Trolox[®] foram transferidas para tubo de ensaio de vidro, em triplicata. Em seguida, foi adicionado exatamente 2,5 mL da solução metanólica de DPPH• 100 µM, seguindo-se do método descrito anteriormente. A curva analítica foi construída de acordo com os valores obtidos (DARIO, 2016).

O ensaio baseia-se na alteração da coloração roxa para amarela; ou seja, quanto mais o radical DPPH• (violeta) for reduzido para DPPH• menor será o valor da absorbância na mistura da reação a 517 nm.

4.2.4 Avaliação do ácido ascórbico por CLAE

4.2.4.1 Fase móvel

Com base na metodologia proposta por Maia et al. (2007), utilizou-se a fase móvel a mistura: ácido metafosfórico 0,2% em água, metanol e acetonitrila (90:8:2).

Posteriormente, o pH foi determinado em pHmetro no valor de pH $\pm$ 2,8 e submeteu-se a solução ao processo de filtração acoplado com membrana de acetato de celulose, em diâmetro de 0,22 µm. Para degaseificação utilizou-se o compressor-aspirador. Em seguida, foi submetido ao banho ultrassônico por 30 min. Esta solução foi previamente preparada no momento da realização das análises.

4.2.4.2 Condições instrumentais

Para realizar a quantificação ($\mu\text{g/mL}$) das formulações, o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizado, seguindo os parâmetros conforme **Quadro 3**.

Quadro 3 – Condições cromatográficas na quantificação do ácido ascórbico nas formulações.

Parâmetros	Descrição
Coluna	Phenomenex Luna C18 (150 x 4, 60 mm, 5 μm de tamanho de partícula)
Fase móvel	Ácido metafosfórico 0,2% em água, metanol e acetonitrila (90:8:2)
Fluxo	1,0 mL/ min
Volume de injeção	20 μL
Tempo de corrida	6 min
Tempo de retenção	3,47 $\pm$ 0,24 min
Deteção	Ultravioleta - 254 nm
Temperatura da análise	Temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$)

Fonte: MAIA et al. (2007).

4.2.4.3 Validação da metodologia analítica

a) Especificidade

A especificidade foi realizada a fim de verificar possíveis interferências do pico do AA com os demais componentes da formulação. Sendo realizados os ensaios:

- I) Ácido ascórbico padrão secundário 99,0%;
- II) Formulação base (controle) - isenta de ácido ascórbico (AA) e ácido cafeico (AC);
- III) Formulação com adição de AC;
- IV) Formulação completa, com adição do AA e AC.

Procedimento:

Pesaram-se 25,0 mg do ácido ascórbico e transferiu-se para um balão volumétrico de 25,0 mL. Completou-se o volume com a fase móvel. Centrifugou-se e desprezou-se os sobrenadantes. Desta solução, uma alíquota de 1,0 mL foi diluída para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se com fase móvel e obtêm-se a concentração de 100,0 µg/mL. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL para balão de 10,0 mL, com concentração final de 10 µg/mL.

Das formulações, pesaram-se 250,0 mg e transferiram-se para balões volumétricos de 25,0 mL. Homogeneizou-se com fase móvel e completou-se o volume. Centrifugou-se e desprezou-se os sobrenadantes. Novas diluições foram realizadas para obter concentrações finais de 10µg/mL.

b) Linearidade e curva analítica

A linearidade é avaliada através da curva analítica obtida e está relacionada com a capacidade de um método analítico certificar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do AA na amostra, dentro de um intervalo especificado (BABY et al., 2008; SILVEIRA,2013).

A legislação brasileira recomenda que a linearidade seja determinada com no mínimo 5 concentrações diferentes, e que o coeficiente de correlação considerado aceitável, seja maior ou igual a 0,99 com desvios inferiores a 10% (FDA, 2015; BRASIL, 2017).

Para avaliar a linearidade foi construída uma curva analítica a partir de diluições seriadas do padrão secundário de ácido ascórbico 99,0% teor de pureza (Sigma-Aldrich®), nas concentrações de 1,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; e 20,0 µg/mL.

c) Limite de detecção (LD)

Esta análise determina a menor concentração de amostra que pode ser detectada, diferenciando-se do ruído do equipamento e não necessitando que seja quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO, 2007). Foram realizadas diluições do padrão secundário (AA) em triplicata, no intervalo de 0,025 a 1,0 µg/mL.

Para determinar os valores de LD, foi realizado cálculos conforme as **Equação 2** (BRASIL, 2017; INMETRO, 2007).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC}$$

Equação 2. Cálculo limite de detecção

Legenda: **LD** = limite de detecção; **DP** = desvio padrão do intercepto com o eixo do **y** de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação, **IC** = inclinação da curva analítica.

d) Limite de quantificação (LQ)

É a menor concentração da substância que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas (INMETRO, 2007).

Foram realizadas diluições seriadas de solução do padrão secundário de ácido ascórbico em triplicata no intervalo de 0,025 a 1,0 µg/mL. Para determinar os valores de LQ, foi realizado cálculos conforme a **Equação 3** (BRASIL, 2017; INMETRO, 2007).

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Equação 3. Cálculo do limite de quantificação

Legenda: **LD** = limite de quantificação; **DP** = desvio padrão do intercepto com o eixo do **y** de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação, **IC** = inclinação da curva analítica.

e) Exatidão

Na avaliação da exatidão do método, realizou-se o teste de recuperação do padrão secundário nas concentrações de 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL em dias diferentes e em triplicatas (mesmo analista). As diluições procederam-se como no *item* 4.2.5.2.2.a.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração real determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (**Equação 4**) (BRASIL, 2017; FDA, 2015).

$$E(\%) = \frac{CME}{CMT} \times 100$$

Equação 4. Cálculo para determinar exatidão

Legenda: **E** (%) = exatidão em porcentagem; **CME** = Concentração Média Determinada Experimentalmente; **CMT** = Concentração Média Teórica de todas as amostras consideradas

f) Precisão

A precisão intercorridas (intermediária) é a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes. Este parâmetro foi avaliado em três diferentes concentrações da formulação contendo ácido ascórbico 10,0% p/p em triplicata em dias diferentes. Foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR%) dos valores das triplicatas (INMETRO, 2007).

4.2.4.4 Doseamento do ácido ascórbico na emulsão (CLAE)

Com o método validado na quantificação do AA, alíquotas de 0,250 mg das formulações **F1** e **F2** foram coletadas nas três condições de temperatura de armazenamento no Teste de Estabilidade Normal: 5,0 ± 2,0 °C; 25, 0 ± 2,0 °C e 45,0 ± 2,0 °C, totalizando seis amostras para análise. Uma análise prévia da base e da formulação **F3** foi realizada, para avaliar possíveis interferentes às demais amostras.

Posteriormente, foram realizadas diluições como descrito no *item 4.2.4.3.a*, obtendo-se a concentração de 7,5 ug/mL cada. As soluções foram transferidas para tubos de ensaio, agitado em Vortex® por 1 min, seguido por banho ultrassom 10 min, e centrifugação a 3.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e analisado por CLAE de acordo com as condições instrumentais descritas no *item 4.2.4.2*, e realizados nos dias: 1(t₀), 7, 15, 30, 60, 90, 120, 270, 360 e 450 dias de análise.

4.2.5 Avaliação das espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação dos peróxidos lipídicos foi realizada pelo ensaio de TBARS, por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), com modificações.

4.2.5.1 Preparo da solução de malondialdeído (MDA)

O MDA foi obtido por meio da reação de 22 μL de 1,1,3,3 - tetrametoxyp propane em 10 mL de solução com 1,0% de ácido sulfúrico (H_2SO_4), mantida a temperatura ambiente por 2 h protegida da luz. Uma alíquota de 17 μL da solução foi transferida para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com 1% H_2SO_4 v/v. A concentração da solução mãe foi determinada pela leitura da absorbância a 245 nm ($\epsilon_{245} = 13700$). Como branco, foi utilizado H_2SO_4 a 1% v/v.

4.2.5.2 Determinação do aducto malondialdeído – ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA)

4.2.5.2.1 Linearidade

O MDA foi obtido por meio da reação de 22 μL de 1,1,3,3 - tetrametoxyp propane em 10 mL de solução com 1,0% de ácido sulfúrico (H_2SO_4), mantida a temperatura ambiente por 2 h protegida da luz. Uma alíquota de 17 μL da solução foi transferida para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com 1% H_2SO_4 v/v. A concentração da solução mãe foi determinada pela leitura da absorbância a 245 nm ($\epsilon_{245} = 13700$). Como branco, foi utilizado H_2SO_4 a 1% v/v.

O aducto MDA-TBA foi quantificado por método TBARS, descrito a seguir, utilizando o por sistema CLAE Shimadzu® Prominence com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos modelo SPD-M20A. Os dados obtidos foram analisados no programa LC-Solution® Multi-PDA.

O sistema de eluição utilizada foi uma coluna de fase reversa C-18 (4,6 mm X 25,0 cm) da marca Shimadzu®, eluída com uma fase móvel composta por 35:65 de metanol e tampão fosfato de potássio em pH 7,0; vazão de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 532 nm para detecção do aducto MDA-TBA formado a temperatura de $30,0 \pm 1,0$ °C, com corrida de 10 min cada (OLIVEIRA, 2015; GONÇALVES, 2019; BASTOS et al., 2012).

A linearidade foi avaliada pela curva analítica preparada com diferentes concentrações de MDA-TBA com PBS (triplicata). A partir da concentração obtida da

solução-mãe (108,1 μM), foram realizadas novas diluições, a fim de obter as concentrações adequadas.

As concentrações crescentes obtidas foram: 0,0010; 0,0016; 0,0032; 0,0064; 0,0080; 0,013; 0,018 μM . Posteriormente, 1 mL das amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio, adicionados 144 μL de BHT (0,2%) e 400 μL de H_3PO_4 (0,44 M); e agitadas em vórtex por 1 min e repousaram à temperatura ambiente por 10 min.

Posteriormente, foram adicionados 600 μL de 0,6% TBA e novamente submetidos ao vórtex e, em seguida, ficaram incubados em banho-maria a 90 °C por 45 min. Após, foram resfriados à temperatura ambiente; adicionados 600 μL de n-butanol em cada tubo, agitados por 1 min e centrifugados por 10 min a 3.000 rpm. Aproximadamente 40 μL da camada de n-butanol foram filtrados em membrana de 0,22 μm e injetado no cromatógrafo. As reações foram protegidas da luz ambiente durante todas as etapas. Assim, a curva foi construída a partir da média das absorbâncias em função da concentração de MDA (GONÇALVES, 2019; BASTOS et al., 2012; BRASIL, 2017).

4.2.5.2.2 Especificidade

Foi avaliada para identificar possíveis interferências na detecção do aducto TBARS. De acordo com a agência regulatória (ANVISA), a seletividade ou especificidade é definida como um método analítico capaz de quantificar ou identificar o analito de interesse, de componentes que possam estar presentes na amostra, como impurezas, componentes da matriz (pele) e produtos de degradação (BRASIL, 2017).

As formulações **F1** e **F2** compostas de ácido ascórbico (AA) irradiado ou não (para simular possíveis processos de degradação da formulação), os reagentes que compuseram o experimento e a fita utilizada no ensaio *ex vivo* foram examinadas individualmente. Os reagentes foram inseridos nos frascos após filtração por membrana de 0,22 μm usando o CLAE com as mesmas condições cromatográficas do ensaio TBARS. As formulações antioxidantes e a fita adesiva foram diluídas em metanol com auxílio de banho ultrassônico e, em seguida, foi realizado todo o ensaio TBARS, porém sem adição do reagente TBA. Todas as amostras foram filtradas em

membrana de 0,22µm usando as mesmas condições cromatográficas do ensaio TBARS no sistema CLAE para leitura (GONÇALVES, 2019).

4.2.5.3 Ensaio *Ex vivo*

4.2.5.3.1 Aspectos legais e éticos

Para a realização dos ensaios *ex vivo* com voluntários foi necessário submeter o projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Após a aprovação do CEP (ANEXO B), regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética e Pesquisa, parecer número 3.360.258 (CONEP) os ensaios foram realizados (BRASIL, 2012).

Os participantes foram entrevistados e avaliados previamente, considerando os critérios de inclusão e exclusão exigidos pela legislação vigente. Os critérios de inclusão foram: (I) voluntários com fototipo de pele II e III, de acordo com a escala de Fitzpatrick; (II) sexo feminino; (III) faixa etária de 50 a 70 anos de idade; (IV) pele saudável e íntegra na região do teste. Os critérios de exclusão foram: (i) reações fotoalérgicas e fototóxicas (ii) histórico de câncer de pele; (iii) gestantes; (iv) presença de dermatoses; (v) queimadura solar; (vi) pele bronzada; (vii) cicatrizes; (viii) alergias conhecidas a componentes das formulações (FITZPATRICK, 1988; PERES, 2015).

Foram selecionadas 10 voluntárias e foi necessário o consentimento prévio de cada participante, que se deu por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual, todas receberam as informações e esclarecimentos necessários para a execução do mesmo.

As formulações **F1** e **F2** compostas de ácido ascórbico (AA) irradiado ou não (para simular possíveis processos de degradação da formulação), os reagentes que compuseram o experimento.

4.2.5.3.2 Técnica de *tape stripping*

A caracterização funcional *ex vivo* das formulações foi realizada por meio da técnica de *tape stripping*, conforme descrito por Gonçalves (2019), com modificações.

O antebraço foi limpo com compressa de algodão. Quatro marcações foram realizadas a partir de 2,5 cm do pulso nas dimensões 2,0 x 5,0 cm (10 cm²), com intervalo de 1,5 cm entre as regiões demarcadas.

Após a limpeza e demarcação, foram aplicadas uniformemente no antebraço dos 10 voluntários, alíquotas de 2,5 mg/ cm² da emulsão não iônica, totalizando 25 mg por área. Foi realizada a aplicação das formulações cosméticas desenvolvidas: formulação com ácido ascórbico (**F1**); formulação completa (ácido ascórbico + ácido cafeico (**F2**); e uma demarcação para a pele considerada como branco, sem a adição de formulação. Os voluntários permaneceram em temperatura ambiente de 22°C por 2 h. No antebraço direito dos voluntários foram aplicadas as formulações que, posteriormente, seriam removidas pelas fitas de *tape stripping* e irradiadas; e no antebraço esquerdo as formulações não irradiadas, após remoção das fitas, de acordo com a **Figuras 8 e Figura 9** (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Duas horas após a aplicação das formulações, a técnica de *tape stripping* removeu o estrato córneo (EC) do antebraço das voluntárias, utilizando quatro fitas do tipo Scotch Magic™ Tape (2,0 X 5,0 cm, 3M®) por área demarcada. A parte da fita demarcada com 2,0 cm foi dobrada ao meio para facilitar o manuseio e descartada após a remoção. As fitas adesivas foram colocadas na superfície da pele com uma leve pressão exercida sobre, garantindo um bom contato da fita com as células e, em seguida, puxada acentuadamente na direção ascendente. Quando as fitas foram removidas, porções do estrato córneo também foram removidas da superfície da epiderme. Posteriormente, foi realizado a quantificação da peroxidação lipídica pelo método de TBARS.

Figura 8 – Área de demarcação para aplicação das formulações e fitas de *tape stripping* no antebraço

Legenda: **F2** = formulação completa; **P** = pele (branco); **F1** = formulação com ácido ascórbico, **NI** = fita não irradiada após remoção; **IR** = fita irradiada após remoção; **Brç** = braço; **cm** = centímetro. As aplicações em todas as voluntárias seguiram as mesmas sequências.

Fonte: adaptado de (GONÇALVES, 2019)

Figura 9 – Esquematização da técnica de aplicação e remoção das fitas *tape stripping*, para avaliação da peroxidação lipídica em voluntários

Legenda: **Brço. Dir** – braço direito, **Brço. Esq** – braço esquerdo, **TS** - *Tape stripping*

Fonte: adaptado de (SOBIEPANEK; KOBIELA, 2019).

4.2.5.3.3 Ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBARS) *ex vivo*

Os peróxidos lipídicos foram quantificados através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA), por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com modificações do método de Bastos et al, e Gonçalves, 2019.

Após o banho ultrassônico, retirou-se uma alíquota de 1 mL da amostra e adicionou em outro tubo de ensaio com 144 µl de 0,2% de BHT e 400 µl de H₃PO₄ (0,44 M). As amostras foram protegidas com papel alumínio. Agitou-se no vórtex e esperou 10min em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 600 µl da solução com 0,6% TBA em H₃PO₄ (0,44 M), colocando-se no vórtex por 1 min.

Após a adição de 0,6% de TBA, os tubos foram acondicionados em banho-maria por 45 min a 90°C. Após, foram resfriados à temperatura ambiente e, em seguida, adicionaram-se 600 µl de n-butanol. Os tubos novamente foram ao vortex por 1 min e centrifugou-se por 10 min a 3.000 rpm.

Amostras de 40 µL da camada de n-butanol de cada tubo foi filtrada em membrana de 45 µm, colocadas em vials âmbar com inserts e injetadas em CLAE, usando as especificações do *item 4.2.5.2.1* Todas as etapas, desde a retirada da amostra do béquer até o preenchimento dos vials, foram protegidas da luz.

4.2.6 Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados estatisticamente, em triplicata e com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) na determinação dos resultados através da análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey. O *software* utilizado nas análises foi o MiniTab® 19 (PERES et al., 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação preliminar da estabilidade (APE)

A estabilidade das formulações antioxidantes foi avaliada por meio dos testes de centrifugação e estresse térmico, utilizados para acelerar possíveis sinais de instabilidade inerente aos sistemas emulsionados (BRASIL, 2004).

De acordo com os resultados obtidos, no teste de centrifugação, não houve nenhuma indicação de instabilidade física nas formulações estudadas, conforme indicado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Avaliação das formulações no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade

Formulações	Centrifugação	Estresse Térmico
F1	N	N
F2	N	N
F3	N	N
F4	N	M
F5	N	M

Legenda: **N** - aspecto normal; **LM** – Levemente modificado; **M**- Modificado; **IM**- Intensamente Modificado; **F1** – base + ácido ascórbico/ AA 10% p/p; **F2** – Formulação completa (base + ácido cafeico/ AC 0,2% p/p + AA 10% p/p); **F3** - base + AC 0,2 % p/p; **F4** - base + AC 0,4% p/p + AA 10% p/p; **F5**- base + AC 1% p/p + AA 10% p/p.

Não foi observado coalescência, precipitação ou separação de fases após submetê-las a agitação e força da gravidade, conforme preconizado pelo Guia de Estabilidade De Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004). Posteriormente, foi realizado o teste de estresse térmico.

As formulações-teste consideradas aptas no teste de estresse térmico (N) foram: **F1**, **F2** e **F3** foram estáveis suportando as alterações de temperaturas que foram submetidas (40,0 a 80,0 ± 2,0 °C). Não apresentaram separação de fases, alterações na cor, sedimentação e homogeneidade. Segundo Isaac et al. (2008), quando não ocorre separação de fases é indicativo de estabilidade do produto ensaiado.

A partir de 60,0 °C, as formulações reduziram sua consistência devido à elevação da temperatura. Este comportamento é esperado mediante a condição de estresse térmico imposto (ISAAC, et al., 2008; BABY et al., 2007). Entretanto, as formulações **F4** e **F5** compostas pelo antioxidante ácido cafeico (AC) a 0,4 e 1,0% p/p,

respectivamente, tiveram modificações ao longo da elevação da temperatura, com separação de fases, redução da viscosidade e alteração de cor, conforme indicado na **Figura 10**. O aumento das concentrações do princípio ativo, associado à elevação da temperatura, pode ter possibilitado aceleração da cinética de deterioração da forma cosmética.

Estudo demonstraram que elevar a temperatura acima de certos valores resulta em quantidades diminuídas de compostos fenólicos, gerando produtos de degradação, como: hidroxitirosol (*3,4-di-hidroxifeniletanol*), aldeído protocatecuico (*3,4-di-hidroxibenzaldeído*) e 4-vinilcatecol (*2-hidroxi-4- vinilfenol*) (KHUWIJITJARU et al., 2014).

Segundo Almajano et al. (2007), a solubilidade do ácido cafeico limita-se a concentração máxima a 0,4%; indicação adotada nesta pesquisa.

Em concordância com os resultados obtidos, as formulações **F4** e **F5** foram rejeitadas para o TEN.

Figura 10 – Formulações após arrefecimento natural do estresse térmico à temperatura ambiente

Legenda: **F1** – base + ácido ascórbico (AA) 10% p/p; **F2** – Formulação completa (base + ácido cafeico/AC 0,2% p/p + AA 10% p/p); **F3** - base + AC 0,2 % p/p; **F4** - base + AC 0,4% p/p + AA 10% p/p; **F5**- base + AC 1% p/p + AA 10% p/p.

5.2 Teste de estabilidade normal (TEM)

5.2.1 Análise organoléptica

Com um excelente perfil de segurança, e considerado um dos antioxidantes mais poderosos, o ácido ascórbico (AA) tornou-se um popular agente cosmecêutico.

No entanto, os estudos clínicos sobre a eficácia das formulações tópicas durante período de uso na pele permanecem limitados, em razão do AA na forma pura ser altamente instável tanto físico como quimicamente e se degradar facilmente na presença de oxigênio (ar), água, temperaturas elevadas, e luz UV (NIAIMI et al., 2017). Consequentemente, o armazenamento do produto cosmético pelo consumidor nestas condições drásticas pode reduzir a predição do prazo de validade do produto. Por isso, é desafiador encontrar e desenvolver bases farmacêuticas mais estáveis e permeáveis após a mistura com este princípio ativo para alcançar melhores resultados (NIAIMI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Desta forma, estudos criteriosos tornam-se necessários, aprimoramento das formulações, melhora da estabilidade e aspecto sensorial.

O estudo de estabilidade tem a finalidade de orientar o desenvolvimento das formulações cosméticas e do material de acondicionamento; estimar o prazo de validade; fornecer subsídios para aperfeiçoamento das formulações; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos, mesmo após serem expostas a condições drásticas (ISAAC, 2008).

É sabido que a estabilidade de um produto cosmético depende de suas características de formulação e da natureza dos ingredientes ativos. Essas características são influenciadas pela natureza e quantidade dos excipientes a serem adicionados e sua sensibilidade aos fatores ambientais aos quais essas formas de dosagem estão expostas (SPAGNOL et al., 2015; SHERAZ et al., 2015).

Pelo exposto, a seleção de ingredientes ativos foi realizada de forma criteriosa no desenvolvimento da base cosmética, incluindo agentes emulsificantes óleo em água (O/A), umectantes, emolientes, etc. Como observado no **Quadro 2**, a fim de proporcionar estabilidade física às formulações e aumentar o prazo de validade do produto final.

Desta forma, foi avaliado o aspecto, cor e odor das respectivas formulações nas condições de *Geladeira* ($5,0 \pm 2,0$ °C), *Temperatura ambiente* ($25,0 \pm 2,0$ °C) e *Estufa* ($45,0 \pm 2,0$ °C). A **Figura 11** e **Tabela 2, 3 e 4** descrevem respectivamente os resultados obtidos das emulsões **F1**, **F2** e **F3** após o Teste de Estabilidade Normal.

O teste de estabilidade de **F1** (Base + AA 10% p/p) foi realizado, com a finalidade de avaliar o comportamento do AA isolado ao ácido cafeico. A formulação **F1** apresentou os mesmos parâmetros iniciais (aspecto homogêneo, cor branca e odor normal característico da essência) durante 120 dias nas condições de *Geladeira* e *Temperatura ambiente*. Quando atingiu o tempo de 360 dias em *Geladeira*, o aspecto e odor foi levemente modificado; a cor apresentou pequena alteração, tornando-se levemente amarela, os mesmos resultados permaneceram ao atingir 450 dias. Em *Temperatura ambiente*, o aspecto e odor, também, apresentaram os mesmos resultados que na *Geladeira* (levemente amarelo), durante todo período de estudo, contudo, em 450 dias, houve alteração na cor, passando à amarela (BRASIL, 2004).

Na condição de *Estufa* ($45,0 \pm 2,0$ °C), a **F1** apresentou maior alteração, em comparação com as condições anteriores, principalmente de cor e odor a partir de 30 dias. Uma coloração marrom foi atingida a partir de 360 dias, mantendo-se até o período máximo de estudo (450 dias); e produção de gás e odor intensamente modificado, característico de enxofre.

A primeira percepção que o consumidor tem de um produto é a aparência e, portanto, a cor e o odor de um cosmético são muito importantes. A aceitação pelo consumidor pode ser alterada com o tempo, se ocorrerem alterações indesejáveis de aspecto, reações de escurecimento na formulação cosmética e modificação de odor. Desta forma, entende-se a necessidade de manter a formulação **F1** em temperaturas mais baixas, inferiores a $45,0$ °C; a fim, de garantir a segurança e eficácia do produto, assegurando a qualidade da formulação que será entregue ao consumidor.

Na literatura, relata-se que estabilidade de cremes tópicos de diferentes sistemas emulsificados contendo AA como ingrediente ativo é afetada pelo tempo e por temperaturas elevadas (acima de $45,0$ °C), em razão do AA ser instável e oxidar-se facilmente (LIN et al., 2016). O ácido 2,3 dicetogulônico e o furfural são compostos finais de degradação do AA e intermediários de furona, que ocasionam a formação de pigmentos dourado ao marrom; produção de odores estranhos, que diminuem a

qualidade geral do produto no qual o AA está inserido e forma dióxido de carbono (CO₂) que, quando liberado, confere aspecto aerado ao produto (JUTJUS et al., 2015; MAIA, 2002). Assim, a formulação cosmética pode apresentar comportamento complexo, como a formação de produtos de degradação que podem ser tóxicos ou não, quebra das bases dos cremes, instabilidade física e química (NAVEED et al., 2016; MAIA, 2002), tornando as preparações inadequadas para o uso.

É importante adotar medidas de precaução pré e pós-formulação e o acompanhamento substancial dos testes de protocolos de estabilidade, a fim de melhor controlar o fenômeno de degradação, manter a eficácia e a segurança das preparações, visto que, o consumidor pode expor o produto durante seu uso a condições adversas de armazenamento e afetar sua performance e não se alcançar os objetivos desejados.

A preparação **F2**, Formulação Completa (ácido cafeico 0,2% p/p + ácido ascórbico 10,0% p/p) em *Temperatura ambiente* e *Estufa* apresentou resposta inferior a **F1**, uma vez que, apresentou modificações de cor, odor e aspecto em um prazo de tempo relativamente menor. Na condição de *Estufa*, verificou-se acentuada degradação no decorrer do tempo e o aumento da temperatura provocou amarelamento gradativo da emulsão até o escurecimento, obtendo cor marrom e odor forte. Apesar deste resultado ser esperado devido o AA ser sensível a temperaturas elevadas (40-50 °C), esperava-se que o ácido cafeico (AC) retardasse sua degradação, tendo uma resposta melhor que **F1** nesta condição, assim como em *Temperatura ambiente*.

As combinações de antioxidantes naturais de baixa massa molar tem sido consideradas seguras, menos tóxicas e importantes na conservação da estabilidade de formulações cosméticas. Adicionalmente, fornecem proteção sinérgica significativa contra o estresse oxidativo na pele; atuando contra o fotoenvelhecimento e podem impedir o desenvolvimento de neoplasias (MONTEIRO-SILVA et al., 2020; LIN et al., 2005; MONTEIRO-SILVA et al., 2017).

Um exemplo é a comum a associação do ácido ferúlico em formulações contendo ácido ascórbico (AA). Estudos realizados por Lin et al. (2005) em voluntários, indicaram que incorporação de uma solução tópica (5% Brij® 30 e etanol

a 15%) contendo 0,5% de ácido ferúlico, 15% de AA, e 1% de a-tocoferol melhorou a estabilidade química das vitaminas.

No entanto, no presente estudo, propomos adicionar outro ingrediente ativo fenólico, o ácido cafeico, a fim de avaliar se esta associação ao AA era capaz de promover melhor estabilidade e potencialização da formulação, principalmente na condição Temperatura ambiente, que busca simular condições prováveis de armazenamento no mercado, uma vez que, é relatado na literatura que o ácido cafeico é um antioxidante com potencial maior quando comparado ao ácido ferúlico (SPAGNOL et al., 2015).

Entretanto, na condição de Geladeira, a **F2** apresentou uma excelente resposta, houve maior estabilidade do AA, viscosidade uniforme da formulação durante quase todo o período estudado, como observado na **Figura 11** e **Tabela 3**. A formulação apresentou leves modificações no aspecto, cor e odor ao atingir 360 dias, e os mesmos resultados foram mantidos ao atingir 450 dias, ou seja, a emulsão contendo AA em valor de temperatura baixo e associada ao ácido cafeico promoveu menor degradação da formulação. Pode-se dizer, que a formulação se manteve estável por aproximadamente um ano após o desenvolvimento da mesma.

Os testes de estabilidade são procedimentos preditivos. Como todo procedimento preditivo, estes resultados não são absolutos, porém, tem certa probabilidade de sucesso, visto que, as durações dos testes foram mais longas e as condições de mercado (Temperatura ambiente) apresentaram resultados superiores a outros estudos (MAIA, 2002).

A **F3** (Base + Ácido cafeico 0,2% p/p) foi elaborada, a fim de avaliar o comportamento do ácido cafeico isolado (AC) ao AA. No presente estudo, a preparação não teve alteração de cor em nenhuma condição de estresse ao longo da duração do estudo, ficando apenas mais fluída e com aspecto levemente nacarado, a partir de 360 dias em todas as condições. Com relação ao odor, em *Geladeira* e *Temperatura ambiente* mantiveram-se as características olfativas da essência escolhida durante todo o estudo, na condição de *Estufa* o odor da essência ainda era sentido, porém, em menor intensidade, a partir de 360 dias.

Segundo Spagnol (2018), o AC tem vantagem de ser mais estável que o ácido ascórbico. No entanto, como reconhece Monteiro e Silva et al. (2020), poucos estudos

publicados relataram as propriedades antioxidantes do AC em preparações, principalmente, em estudos de Estabilidade Normal e *shelf life*. Desta forma, novas pesquisas com essa perspectiva podem dar contribuição valiosa no desenvolvimento de novas formulações, contendo este componente ativo, assim como, a incorporação de outros ingredientes fenólicos, a fim de obter melhor respostas de estabilidade.

Tabela 2 – Avaliação das formulações no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade.

Condições de armazenamento da F1									
t arm (dias)/ Variáveis	t ₀	7	15	30	60	90	120	360	450
5,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	LA	LA
Odor	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
25,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	LA	A
Odor	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
45,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	LM	M	M	M
Cor	N	N	N	BC	BE	LA	MO	MA	MA
Odor	N	N	N	N	LM	M	M	IM	IM

Legenda: **F1** – Base + Ácido ascórbico 10% p/p; **t arm (dias)**: tempo de armazenamento (dias); **t₀**: 48h após o preparo da formulação; geladeira (**5,0 ± 2,0 °C**); temperatura Ambiente (**25,0 ± 2,0 °C**); estufa (**45,0 ± 2,0 °C**); *Aspecto e odor*: **N** - Normal, Sem Alterações; **LM** – Levemente Modificado; **M** – Modificado; **IM** – Intensamente Modificado; *Cor*: **N** – Normal, Sem Alterações; **BC** – Bege claro; **BE** – bege escuro; **LA** - Levemente Amarelado; **A** – Amarelo; **MO** – mostarda; **MA** - marrom.

Tabela 3 – Avaliação física da formulação completa, durante o Teste de Estabilidade Normal.

Condições de armazenamento da F2									
t arm (dias)/ Variáveis	t ₀	7	15	30	60	90	120	360	450 450
5,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	BC	BC
Odor	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
25,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	M	M
Cor	N	N	N	N	N	N	N	A	MO
Odor	N	N	N	N	N	N	N	M	M
45,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	M	M	M	M	M
Cor	N	N	N	BC	BE	MO	MA	MA	MA
Odor	N	N	N	LM	M	M	IM	IM	IM

Legenda: **F2:** Formulação Completa (ácido cafeico 0,2% p/p + ácido ascórbico 10,0% p/p); **t arm (dias):** tempo de armazenamento (dias), **t₀:** 48h após o preparo da formulação; geladeira (**5,0 ± 2,0 °C**); temperatura Ambiente (**25,0 ± 2,0 °C**); estufa (**45,0 ± 2,0 °C**); **Aspecto e odor:** **N** - Normal, Sem Alterações; **LM** – Levemente Modificado; **M** – Modificado; **IM** – Intensamente Modificado; **Cor:** **N** – Normal, Sem Alterações; **BC** – Bege claro; **BE** – bege escuro; **LA** - Levemente Amarelado; **A** – Amarelo; **MO** – mostarda; **MA** - marrom.

Tabela 4 – Avaliação física da associação de ácido cafeico 0,2 % p/p a formulação base, durante o Teste de Estabilidade Normal

Condições de armazenamento da F3									
t arm (dias)/ Variáveis	t ₀	7	15	30	60	90	120	360	450
5,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
45,0 ± 2,0 °C									
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM

Legenda: **F3:** Base+ Ácido cafeico 0,2% p/p; **t arm (dias):** tempo de armazenamento (dias); **t₀:** 48h após o preparo da formulação; geladeira (**5,0 ± 2,0 °C**); temperatura Ambiente (**25,0 ± 2,0 °C**); estufa (**45,0 ± 2,0 °C**); Aspecto e odor: **N** - Normal, Sem Alterações; **LM** – Levemente Modificado; **M** – Modificado; **IM** – Intensamente Modificado; Cor: **N** – Normal, Sem Alterações; **BC** – Bege claro; **BE** – bege escuro; **LA** - Levemente Amarelado; **A** – Amarelo; **MO** – mostarda; **MA** - marrom.

Figura 11 – Características organolépticas (aspecto e cor) das formulações cosméticas

Legenda: **F1**- emulsão contendo ácido ascórbico 10% p/p; **F2**- emulsão contendo ácido cafeico 0,2% p/p e ácido ascórbico 10% p/p; **F3**- emulsão contendo ácido cafeico 0,2% p/p; submetidas às condições de **EST** – estufa; **GEL** – geladeira; **T.A** – temperatura ambiente.

5.2.2 Determinação do pH

O ácido ascórbico (AA) por ser uma molécula hidrofílica e instável, acaba resultando em baixa penetração na pele devido ao caráter hidrofóbico do estrato córneo, e quando carregada pode limitar sua penetração (PINNEL et al., 2001, LIN et al., 2005).

O pH das formulações contendo AA pode variar de 2,5 a 5,0 (SHERAZ et al., 2015) e ácido cafeico pH 3,0 a 5,0 (ALMAJANO et al., 2007). No entanto, pH de formulações cosméticas inferior a 3,0 ou superior a 8,0 pode causar ressecamento da pele, devido à desestruturação da queratina ou remoção excessiva do sebo (BEZERRA; REBELLO, 2011).

As formulações **F1**, **F2** e **F3** foram ajustadas em pH 3,5 quando recém preparadas e avaliadas durante 450 dias. Os resultados obtidos dos valores de pH estão apresentados na **Tabelas 5**.

Na condição de *geladeira* ($5,0 \pm 2,0$ °C), as formulações **F1** e **F2** apresentaram pequenas alterações de pH ao longo do tempo, no entanto, o pH se manteve dentro da faixa aceitável para aplicação na pele (pH 3,5); visto que, as variações não foram maiores que $\pm 10,0\%$ em relação ao valor inicial.

Na condição de *temperatura ambiente* ($25,0 \pm 2,0$ °C), o valor de pH da formulação **F1** permaneceu inalterado, porém, a formulação **F2**, a partir de 1 ano não garantiu estabilidade, elevando o valor de pH em torno de $\pm 12,0\%$ até o prazo final do estudo. De acordo com AHMAD et al. (2011), o aumento do pH eleva a degradação do AA nos cremes, causando fotólise do AA e da formulação. Esta afirmação corrobora com os resultados obtidos, pois foi possível observar na **Figura 11**, que a **F2** apresentou alteração na cor maior que a **F1**.

Na condição de *estufa* em ($45,0 \pm 2,0$ °C), as formulações **F1** e **F2** foram significativamente diferentes a partir de 120 dias, com aumento do valor de pH acima de 10%. Verificou-se que a velocidade de oxidação do AA é dependente do pH, podendo concluir que a variação do pH foi indicativa de reações de degradação ou processos oxidativos, dificultando o uso dessa emulsão em valores de temperatura elevada, em função da instabilidade.

O pH ideal da formulação cosmética é 2,5 a 3,5; pois o AA se encontra na forma não ionizada e menos suscetível é a oxidação. A fotoestabilidade máxima nos cremes

contendo este princípio ativo é até o pH 4 e acima de pH 4,1 ocorre aumento do potencial redox do AA, favorecendo maior oxidação da molécula (AHMAD et al., 2011). Na literatura é relatado que a oxidação do AA ocorre rapidamente em temperaturas mais altas ($> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) e sua reação com o oxigênio é fortemente catalisada por íons metálicos, principalmente íons cúpricos e férricos (SHERAZ et al., 2015).

Os valores de pH da formulação **F3** contendo como ativo principal o ácido cafeico (AC), permaneceram inalterados nas condições de *geladeira* ($5,0 \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) e *temperatura ambiente* ($25,0 \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 60 dias como observado na **Tabela 5**. No entanto, a partir de 120 dias apresentaram alteração significativa em todas as condições de armazenamento, ocorrendo elevação de $\pm 30\%$ do pH inicial, apesar de não ter sofrido alterações de cor em nenhuma condição de armazenamento durante os 450 dias, como observado no *item 5.2.1*.

De acordo com Almajano e colaboradores (2007), em valores de pH superiores a 7, a estrutura do ácido cafeico é alterada irreversivelmente, perde sua atividade antioxidante e antimicrobiana é afetada, e ocorre rapidamente o processo oxidativo. Sabe-se que em pH básico, o ácido caféico (AC) forma dímeros após a oxidação dos grupos OH, tornando-se um novo produto sem capacidade antioxidante. Em pH ácido, o ácido cafeico é protonado (o ácido cafeico pKa é 4, 04) e a molécula é um antioxidante eficaz. No entanto, na ausência de tampão de fosfato, é provável que os íons metálicos catalisam a oxidação, apesar da presença de ácido caféico (FRIEDMAN et al., 2000; ALMAJANO et al., 2007).

Segundo Silva e Maia (2001), o ácido ascórbico possui melhor penetração na pele quando o pH da formulação possui valor ácido. Logo, aumentar a acidez do ácido L-ascórbico para valores de pH abaixo de 3,5 é um método eficaz para aumentar sua estabilidade e permeabilidade; preservando as propriedades físicas, químicas e terapêuticas do AA (NIAIMI et al., 2017). Os resultados obtidos neste estudo estão em conformidade com as afirmações dos autores citados, visto que, as formulações que mantiveram pH próximo ao valor inicial (pH 3,5), não apresentaram visualmente processos oxidativos significativos.

De acordo com Lin et al. (2005), pH abaixo de 3,5 do ácido ascórbico auxilia sua penetração na pele. É possível que a emulsão **F1** nas condições de geladeira e temperatura ambiente e **F2** na condição de geladeira, corroboram com as afirmações

dos autores, visto que não tiveram alterações estatisticamente significativas, sendo consideradas formulações estáveis na avaliação do potencial hidrogeniônico.

O pH intramelanocítico é um importante fator na regulação da função da tirosinase e na maturação dos melanossomas. De acordo com MIAO et al. (2019), a acidificação intracelular dos melanócitos induzida pelo AA reduziu o conteúdo de melanina por meio da supressão da atividade da tirosinase, assim, como resultou em reduções significativas nos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS), indicando que AA possui atividades antimelanogênicas, devido à acidificação dos melanossomas.

Desta forma, concluiu-se que ajustar o pH da formulação no valor ideal e mantê-lo estável até o prazo de validade final do produto é necessário para preservar as propriedades físicas, químicas e terapêuticas do AA e da emulsão, garantindo os efeitos benéficos em potencial na pele do consumidor.

Tabela 5 – Valores de pH (n =3) das formulações em diversas condições estudadas

T dias	Condição de armazenamento F1			Condição de armazenamento F2			Condição de armazenamento F3		
	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C
	pH								
0		3,50 ± 0,00 ^A			3,50 ± 0,00 ^A			3,50 ± 0,00 ^A	
7	3,50 ± 0,00 ^a	3,50 ± 0,00 ^A	3,50 ± 0,00 ^A	3,50 ± 0,00 ^a	3,50 ± 0,00 ^A	3,50 ± 0,01 ^A	3,50 ± 0,00 ^a	3,50 ± 0,00 ^A	3,50 ± 0,00 ^A
15	3,39 ± 0,01 ^a	3,49 ± 0,00 ^A	3,45 ± 0,01 ^B	3,47 ± 0,00 ^a	3,50 ± 0,02 ^A	3,24 ± 0,01 ^C	3,50 ± 0,00 ^a	3,50 ± 0,01 ^A	3,43 ± 0,02 ^B
30	3,46 ± 0,01 ^a	3,46 ± 0,00 ^A	3,43 ± 0,00 ^B	3,17 ± 0,01 ^b	3,43 ± 0,00 ^B	3,39 ± 0,02 ^B	3,50 ± 0,01 ^a	3,47 ± 0,02 ^A	3,35 ± 0,00 ^C
60	3,47 ± 0,03 ^a	3,47 ± 0,00 ^A	3,51 ± 0,00 ^A	3,34 ± 0,00 ^b	3,45 ± 0,02 ^B	3,53 ± 0,00 ^A	3,50 ± 0,00 ^a	3,50 ± 0,00 ^A	3,50 ± 0,00 ^A
90	3,57 ± 0,00 ^a	3,53 ± 0,01 ^A	3,68 ± 0,00 ^C	3,37 ± 0,02 ^b	3,52 ± 0,02 ^A	3,54 ± 0,01 ^A	3,57 ± 0,02 ^a	3,71 ± 0,01 ^B	3,87 ± 0,00 ^D
120	3,61 ± 0,02 ^a	3,54 ± 0,00 ^A	3,77 ± 0,02 ^D	3,38 ± 0,01 ^b	3,69 ± 0,00 ^C	3,77 ± 0,00 ^D	3,99 ± 0,01 ^a	4,02 ± 0,00 ^C	4,03 ± 0,03 ^E
270	3,62 ± 0,02 ^a	3,55 ± 0,01 ^A	3,88 ± 0,01 ^E	3,50 ± 0,00 ^a	3,76 ± 0,00 ^D	4,03 ± 0,03 ^E	4,04 ± 0,05 ^a	4,17 ± 0,02 ^D	4,17 ± 0,02 ^F
360	3,66 ± 0,03 ^a	3,57 ± 0,01 ^A	3,95 ± 0,03 ^F	3,52 ± 0,02 ^a	3,92 ± 0,02 ^E	4,28 ± 0,00 ^F	4,28 ± 0,01 ^b	4,23 ± 0,01 ^E	4,26 ± 0,01 ^G
450	3,72 ± 0,02 ^a	3,64 ± 0,02 ^A	4,10 ± 0,01 ^G	3,54 ± 0,01 ^a	3,93 ± 0,01 ^E	4,35 ± 0,00 ^G	4,46 ± 0,02 ^b	4,53 ± 0,00 ^F	4,56 ± 0,02 ^H

Legenda: **t:** tempo; **F1:** base + ácido ascórbico 10 % p/p; **F2:** formulação completa (ácido cafeico 0,2% + ácido ascórbico 10% p/p), **F3:** base + ácido cafeico 0, 2 % p/p, **t₀**= 48 h após o preparo da emulsão não iônica, **t:** dias; **geladeira:** (5,0 ± 2,0 °C); **Temperatura ambiente:** (25,0 ± 2,0 °C); **Estufa:** (45,0 ± 2,0 °C). Valores que não compartilham uma letra dentro da mesma coluna, são significativamente diferentes pela análise estatística por ANOVA seguida de Tukey (α = 0,05).

5.3 Atividade antioxidante

5.3.1 Condições analíticas

A luz, oxigênio e altas temperaturas influenciam diretamente nos resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método de DPPH●, visto que, aumenta a taxa de composição da molécula, levando a maior formação de radicais livres, provocando alterações nos valores da absorbância (OZCELIK, et al., 2003; PERES, 2015). A partir do exposto, foi realizada a padronização destas variáveis neste estudo.

O metanol foi utilizado como solvente no presente estudo, visto que, este composto, apresenta maior solubilidade, além de proporcionar maior estabilidade ao radical livre. Além disso, o ácido ascórbico é um composto polar com maior afinidade pelo metanol que o etanol (SHARMA; BHAT, 2009).

5.3.2 Curva analítica de Trolox® padrão de referência secundário

O DPPH● (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, e um dos poucos radicais estáveis e comercialmente disponíveis capaz de aceitar um elétron ou um radical de hidrogênio para se tornar uma molécula estável. Possui absorção na faixa de 515 a 520 nm e a reação é baseada na redução ou desaparecimento de sua cor violeta, quando o radical é reduzido por um agente antioxidante, ou por uma espécie radical. Desta forma, a redução do radical DPPH● é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação até chegar no platô (SUCUPIRA, 2012; DARIO, 2016; MAIA, 2002; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A atividade antioxidante do AA foi expressa em função do Trolox®, antioxidante sintético análogo à vitamina E utilizado como referência para a capacidade antioxidante de misturas complexas.

Para o cálculo da atividade antioxidante foi construída uma curva analítica de Trolox® (**Figura 12**) que correlaciona à concentração de Trolox® à porcentagem de radicais livres (SRL_M%), conforme apresentado na **Tabela 6**. As leituras da absorbância foram realizadas em triplicata.

Tabela 6 – Curva analítica de Trolox® padrão de referência (n = 10) (teor de pureza 97,0%)

Conc. Trolox® (µM)	AbsM± DP	%SRL _M ± DP
3,22	0,889 ±0,01	0,022 ± 0,01
13,61	0,859 ±0,00	3,629 ± 0,04
31,80	0,796 ±0,00	10,587 ± 0,00
64,46	0,685 ±0,00	23,083 ± 0,01
97,70	0,572 ± 0,01	35,802 ± 0,01
129,97	0,462 ± 0,00	48,148 ± 0,01
159,30	0,365 ± 0,00	59,371 ± 0,02
192,94	0,247 ± 0,00	72,241 ± 0,02
222,85	0,145 ± 0,01	83,689 ± 0,02
255,13	0,035 ± 0,01	96,034± 0,02

Legenda: **Conc:** Concentração; **DP:**Desvio Padrão; **AbsM:** Absorbância média (triplicata); **%SRL_M:** Média da porcentagem de sequestro de radicais livres.

Figura 12 – Curva analítica de Trolox® padrão de referência secundário (pureza 97,0%) (n =10) em função da porcentagem de sequestro de radicais livres

O coeficiente de determinação é simbolizado por R^2 e indica quanto da variação total é comum aos elementos que constituem os pares analisados (MORAES, 2013).

A equação que relaciona concentração de Trolox® e SRL_M encontra-se na **Equação 5**.

$$y = 1,3532 + 0,3823x$$

Equação 5. Equação da reta que relaciona a concentração de Trolox® e %SRL_M
Legenda: **y** = % sequestro de radicais livres; **x** = concentração de Trolox® (µM), com R² = 0,9999
 valor de acordo com a exigência da legislação (BRASIL, 2017).

5.3.3 Atividade antioxidante das emulsões

O uso do ensaio de DPPH fornece uma maneira rápida e fácil na triagem ou medição da atividade antioxidante da formulação por espectrofotometria, tornando-se útil para avaliar vários componentes ativos.

Devido à falta de evidências sobre qual antioxidante (ácido ascórbico ou ácido cafeico) poderia ser mais eficaz como antioxidante na formulação ou até mesmo, qual, tenha apresentado maior capacidade de eliminação de radicais livres na formulação, foi avaliado o comportamento da atividade antioxidante destes componentes ativos isolados e associados na emulsão cosmética durante 450 dias, utilizando o ensaio de radicais livres DPPH. Inicialmente, também foi avaliado se a base cosmética (**Quadro 2**) teve a capacidade de eliminação de radicais livres na formulação cosmética, visto que, na sua composição, contém metabissulfito de sódio, que apresenta propriedades conservantes e, antioxidante em menor destaque.

A redução do radical livre DPPH foi medida pela monitorização contínua do decréscimo da absorção a 517 nm. Os valores de DPPH obtidos das formulações nas diferentes condições de armazenamento foram expressos em concentração de Trolox® equivalente, apresentados na **Tabela 6**.

Foi possível observar que a base cosmética não apresentou atividade antioxidante, como esperado, e que a atividade antioxidante das matérias-primas empregadas não obteve valores diferentes do ponto de vista estatístico entre elas. Porém, o ácido cafeico mostrou-se superior, uma vez que a concentração a 0,2% p/p (96,594 ± 0,37 %SRL_M da emulsão), desenvolveu potencial antioxidante semelhante ao AA na concentração de 10% p/p (97,871 ± 0,18 %SRL_M da emulsão).

Posteriormente, as substâncias foram incorporadas nas emulsões e divididas em três grupos principais, como representado na **Tabela 7**. O primeiro grupo (**F1**) foi composto por ácido ascórbico 10% p/p adicionado à base cosmética desenvolvida, o segundo (**F2**) foi composto por ácido cafeico 0,2% + ácido ascórbico 10% p/p adicionados à base cosmética, e o terceiro grupo (**F3**) foi composto por ácido cafeico 0,2 % p/p, também, incorporado à base cosmética.

Verificou-se que, no t_0 , a formulação **F2** apresentou resposta antioxidante superior a **F1** e **F3**, concluindo que inicialmente pode ter ocorrido uma potencialização da atividade antioxidante com a associação dos dois componentes ativos.

As formulações **F1** e **F2** na condição de *geladeira* ($5,0 \pm 2,0$ °C), não apresentaram alterações significativas na atividade antioxidante das emulsões não iônicas, $95,29 \pm 0,33$ e $95,34 \pm 0,35$ %SRL_M respectivamente, durante 360 dias, conforme análise estatística realizada e observada na **Tabela 7**. O radical no DPPH foi reduzido e, conseqüentemente, as soluções de leitura mudaram de violeta para amarelo pálido. A mudança de cor resultante (roxo para amarelo) foi proporcional ao número de elétrons capturados e está relacionado à atividade antioxidante mantida durante todo o prazo de armazenamento do produto. Conseqüentemente, é recomendável o armazenamento nesta condição, a fim de prolongar a ação antioxidante na emulsão.

Na condição de *temperatura ambiente* ($25,0 \pm 2,0$ °C), a formulação **F1** garantiu resultado satisfatório durante o prazo de um ano (360 dias) e a atividade antioxidante se manteve constante, sem alteração estatisticamente significativa. Após um ano, a emulsão apresentou modificação significativa na atividade antioxidante, o decréscimo observado, apresentou redução $\pm 32,0\%$ de sua atividade antioxidante até atingir o prazo máximo de estudo, que foi 450 dias. Este resultado foi muito interessante, demonstrando elevada estabilidade do ácido ascórbico nesta condição, visto que, formulações com adição do mesmo na forma pura, não atingem longa estabilidade.

Em estudos de estabilidade de formulações cosméticas contendo AA, Santos et al. (2019), realizou *Teste de Estabilidade Normal* (90 dias), e constatou alterações nas características organolépticas das formulações cremes e géis, submetidas à temperatura ambiente e estufa após 60 dias; Arnejo et al. (2001), as emulsões do tipo O/A contendo AA teve redução de aproximadamente 35% nos 3 primeiros meses e

praticamente nulas após 7 meses. Nos estudos de Krambeck (2011), foram analisadas as características organolépticas das formulações contendo AA, por 90 dias e foi observada redução de $\pm 40\%$ em relação à concentração inicial.

Não foram observados na literatura científica estudos de estabilidade de formulações cosméticas contendo AA, com duração igual ou superior a 1 ano. De acordo, com o *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos* (2004) da ANVISA, a Avaliação da Estabilidade Normal ou Exploratória tem como finalidade, fornecer dados que prevê o prazo de validade do produto sob condições específicas. Ao estender o estudo de Estabilidade Normal, pode ser caracterizado como Teste de Prateleira, Estabilidade de Longa Duração ou *Shelf life*. Este estudo visa acompanhar o produto durante todo prazo de validade com a finalidade de comprovar os resultados obtidos no *Teste de Estabilidade Normal* e confirmar se o prazo de validade estimado do produto no mercado deva ser mantido ou readequado.

A formulação completa (**F2**) armazenada em *temperatura ambiente* ($25,0 \pm 2,0$ °C) foi estatisticamente diferente, ocorrendo redução na atividade antioxidante da formulação de aproximadamente $\pm 32,0\%$ durante todo o prazo de estudo (450 dias). Contudo, vale ressaltar que, durante o período de um ano a redução foi de $\pm 8,0\%$ e a partir deste período, uma redução mais drástica, em torno de $\pm 24,0\%$. Ainda assim, era esperada uma melhor resposta quando confrontada com **F1**, visto que, no tempo zero, a formulação **F2** apresentou resposta antioxidante superior. A associação do ácido caféico com o ácido ascórbico, contudo, não foi bem-sucedida. Esperava-se que este efeito combinado promovesse maior atividade antioxidante e, conseqüentemente, mantendo-a por longos períodos, além de biodisponibilidade adequada, permitindo assim, seu uso em um amplo espectro de aplicações cosméticas na forma pura.

O armazenamento em *estufa* ($45,0 \pm 2,0$ °C) promoveu significativa redução na atividade antioxidante das formulações **F1** e **F2** no prazo de 120 dias. Aproximadamente $62,0\%$ ($36,989 \pm 2,33$ %SRL_M da emulsão) de atividade antioxidante da **F1** foi reduzida; e $71,0\%$ ($28,459 \pm 1,25$ %SRL_M da emulsão) da formulação **F2**. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos nos ensaios de cor e pH, no qual estas amostras tiveram degradação pelo calor e pela elevação

de pH. Consequentemente, proporcionando a redução da atividade antioxidante, ocasionando oxidação na **F1** na condição de estufa.

De acordo com Lees (1975), o ácido L-ascórbico (AA) apresenta 100% de atividade antioxidante e o ácido deidroascórbico (DHAA) cerca de 75 a 80%, no qual, normalmente existe um equilíbrio entre as duas formas, sendo o teor de ácido ascórbico total resultante da somatória dos teores de ambos os ácidos. O DHAA é reversível na forma de AA, na presença de agentes redutores contendo tiol, como a cisteína, homocisteína, ditiotreitól, bromina, por enzimas e glutathione. A atividade biológica somente é perdida quando o anel da lactona do DHAA é irreversivelmente aberto, dando origem ao ácido 2,3 dicetogulônico (KALL et al., 2011; ROSA et al., 2007).

De acordo com Sheraz et al. (2015) a estabilização de AA pode ser alcançada usando antioxidantes. Segundo Gulcin et al. (2006), o ácido cafeico comporta-se como um potente antioxidante, superior aos ácidos p-cumárico e ferúlico, capaz de inibir a oxidação, extinguir radicais e oxigênio singlete. Como é comum a associação do ácido ferúlico e α -tocoferol em formulações tópicas contendo ácido ascórbico (AA) para melhor sua estabilidade (LIN et al., 2005). Neste estudo, foi incorporado o ácido cafeico visto que, a literatura científica ratifica que este apresenta maior atividade antioxidante em relação ao ácido ferúlico (AF), pois o AC apresenta dois grupos hidroxilas na posição 3 e 4 do anel benzênico, enquanto, AF tem um grupo metoxila na mesma posição 3 do anel benzênico, conforme **Figura 12** (DAMASCENO et al.; 2013). No entanto, o emprego do AC junto ao AA não evidenciou melhores resultados em longos prazos, uma vez que a formulação **F2** teve elevado processo oxidativo, principalmente em altas temperaturas, ocorrendo rápida degradação da atividade antioxidante e em potencial maior do que a formulação contendo apenas o antioxidante ácido ascórbico.

A emulsão **F3**, composta apenas pelo antioxidante ácido cafeico 0,2% p/p, apresentou drástica redução de atividade antioxidante em todas as condições de armazenamento em curto prazo, ficando praticamente nula durante o período analisado; principalmente para as formulações armazenadas em condições de estufa. Este resultado, demonstrou que o composto ativo pode ter efeitos antioxidantes limitados quando aplicados passivamente, apesar de não ter ocorrido grande

modificação de cor. Almajano e colaboradores (2007) demonstraram que o AC, foi um antioxidante ativo e sua atividade aumentou quando um tampão de fosfato foi adicionado para tamponar a amostra em pH ácido (3,0 e 5,0) e o não tamponamento, também, pode ser uma das justificativas para a resposta malsucedida.

Alguns relatos da literatura informam que o ácido cafeico atua mais eficiente na etapa de propagação em que ocorre a formação dos radicais peroxila e hidroperóxido (DAMASCENO et al., 2013). De acordo com Spagnol (2018), a atividade antioxidante do AC é superior à do ácido ascórbico frente ao DPPH•. Embora este resultado, também, tenha sido observado no t_0 quando comparado **F1** e **F2** e nos ensaios preliminares com as matérias-primas, este comportamento não ocorreu no decorrer do período de tempo estudado, degradando-se rapidamente.

Em estudos realizados por Monteiro-Silva et al. (2020), as formulações contendo a combinação de ácidos fenólicos (ácido cafeico e ferúlico) apresentaram redução significativa da atividade antioxidante após 30 dias, em todas as condições de armazenamento. Neste estudo, observou-se similaridade com o resultado do autor. No entanto, quando o autor usou esta preparação mista de ácidos fenólicos, incorporado ao ácido gálico, pode preservar a estabilidade química e a atividade antioxidante do mesmo. Esta informação pode ser particularmente útil no desenvolvimento de novas formulações, adicionando este efeito combinado de ácido cafeico e ácido ferúlico em formulações com ácido ascórbico, a fim de avaliar se exibe potencial antioxidante superior, prolongamento da sua atividade e consequentemente, redução dos processos oxidativos.

Talvez a atividade antioxidante do AC, também possa ser mantida ou preservada quando encapsulada; assim como, é provável que, na presença de tampão fosfato o AC não ocorra processo oxidativo.

Segundo Monteiro-Silva et al. (2020), os ensaios ORAC-FI e ABTS são mais adequados para o estudo da atividade antioxidante de ácidos fenólicos quando comparado ao DPPH e, de acordo com Symes et al. (2018), a atividade do DPPH pode ser afetada em função do ácido cafeico ser mais favorável à extração pelo etanol.

Com este estudo, foi possível observar que as melhores condições de armazenamento são em temperaturas abaixo de $25,0 \pm 2,0$ °C e que a formulação cosmética desenvolvida **F1**, foi capaz de manter atividade antioxidante do ácido

ascórbico durante um ano de armazenamento. Todavia, o objetivo era adicionar um ingrediente ativo inteligente capaz de veicular ao AA de forma que a intercalação elevasse a atividade antioxidante com a finalidade prevenir o envelhecimento cutâneo e minimizar os danos teciduais, além da maior estabilidade da formulação durante um longo prazo de validade, ou seja, um prazo que sobressaísse ao AA, incorporado sozinho a emulsão. Desta forma, viabilizaria seu uso em amplo espectro de aplicações cosméticas na forma pura, com maior biodisponibilidade local e efeito antienvelhecimento prolongado.

Apesar do grande avanço alcançado neste estudo, é necessária a realização de novas pesquisas, envolvendo o desenvolvimento de formulações com associação de AA a outros ativos naturais e fenólicos, e sistemas de administração para melhorar sua estabilidade.

Observa-se também que, além de aplicar o *Teste de Estabilidade Acelerada*, a realização do *Teste de Estabilidade Normal* é de suma importância, porque avalia o comportamento da formulação em determinados intervalos de tempo, frente a diferentes condições de armazenamento, indicando se o produto mantém suas características dentro dos limites previamente estabelecidos sem acelerar a velocidade de degradação química dos princípios ativos, apresentando maior segurança e confiabilidade dos resultados obtidos. Adicionalmente, o teste de *shelf life* é muito importante para as farmácias magistrais e a indústria de produtos, a fim de acompanhar o produto durante prazo de validade e garantir a eficácia cosmética com segurança aos usuários (MAIA, 2002; ANVISA, 2004).

Tabela 7 – Atividade antioxidante da emulsão não iônica equivalente em concentração de Trolox® (n=3)

t (d)	Condição de armazenamento F1			Condição de armazenamento F2			Condição de armazenamento F3		
	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C
Atividade antioxidante (%SRL_M)									
0		95,23 ± 0,18 ^A			97,17 ± 0,22 ^A			96,58 ± 0,37 ^A	
7	93,51 ± 0,83 ^A	92,81 ± 0,28 ^A	76,68 ± 0,18 ^B	97,03 ± 0,1 ^A	96,044 ± 0,33 ^A	76,59 ± 0,22 ^B	33,12 ± 0,19 ^B	31,31 ± 0,35 ^B	29,40 ± 0,09 ^B
15	93,16 ± 0,08 ^A	93,81 ± 0,11 ^A	70,02 ± 0,11 ^C	97,17 ± 0,00 ^A	94,81 ± 0,32 ^A	73,98 ± 3,87 ^B	13,71 ± 0,54 ^C	12,58 ± 0,16 ^C	10,98 ± 0,20 ^C
30	93,38 ± 2,77 ^A	93,41 ± 0,31 ^A	65,58 ± 0,8 ^C	93,45 ± 0,21 ^{AB}	94,54 ± 0,13 ^A	68,19 ± 0,41 ^C	7,31 ± 3,81 ^D	9,67 ± 2,15 ^{CD}	3,98 ± 2,91 ^D
60	94,57 ± 0,00 ^A	90,99 ± 0,17 ^A	56,58 ± 0,8 ^D	94,57 ± 0,11 ^{AB}	93,45 ± 0,21 ^A	65,80 ± 1,20 ^C	4,96 ± 0,28 ^{DE}	9,24 ± 0,02 ^{CD}	2,61 ± 0,21 ^D
90	93,85 ± 3,62 ^A	93,29 ± 0,98 ^A	42,75 ± 0,1 ^E	91,60 ± 0,28 ^B	93,84 ± 0,12 ^A	57,14 ± 0,42 ^D	4,72 ± 0,41 ^{DE}	5,37 ± 3,11 ^{DE}	2,32 ± 0,11 ^D
120	93,37 ± 0,41 ^A	93,40 ± 0,62 ^A	36,99 ± 2,3 ^E	95,66 ± 3,20 ^A	92,51 ± 3,60 ^B	28,46 ± 1,25 ^E	4,15 ± 0,62 ^{DE}	3,91 ± 3,53 ^E	2,06 ± 0,6 ^D
270	94,80 ± 0,34 ^A	94,64 ± 0,37 ^A	N.A	94,76 ± 0,07 ^{AB}	91,09 ± 0,22 ^B	N.A	4,49 ± 0,12 ^{DE}	2,88 ± 0,26 ^E	N.A
360	95,29 ± 0,33 ^A	94,59 ± 0,38 ^A	N.A	95,34 ± 0,35 ^A	89,97 ± 0,08 ^C	N.A	2,58 ± 1,41 ^E	1,88 ± 0,48 ^E	N.A
450	92,61 ± 0,45 ^A	63,22 ± 0,84 ^B	N.A	95,02 ± 0,26 ^A	65,59 ± 2,16 ^D	N.A	2,14 ± 0,36 ^E	2,44 ± 1,19 ^E	N.A

Legenda: **F1:** base+ácido ascórbico 10%p/p; **F2:** formulação completa (ácido cafeico 0,2%+ácido ascórbico 10% p/p), **F3:** base+ácido cafeico 0,2%p/p, **t**₀= 48 h após o preparo da emulsão não iônica, **t:** dias; geladeira (**5,0 ± 2,0 °C**); Temperatura ambiente (**25,0 ± 2,0 °C**); Estufa (**45,0 ± 2,0 °C**). Valores que não compartilham uma letra dentro da mesma coluna, são significativamente diferentes pela análise estatística por ANOVA seguida de Tukey ($\alpha = 0,05$).

5.4 Validação de metodologia analítica AA

5.4.1 Especificidade

Quando comparado ao perfil cromatográfico, a formulação com ácido cafeico (AC) e do branco, não apresentaram interferentes, ou seja, nenhum pico ficou próximo ou no mesmo tempo de retenção do padrão secundário do ácido ascórbico (AA).

Os resultados obtidos com o ácido ascórbico (AA) adicionado nas formulações foram muito semelhantes ao do padrão de referência, indicando que o método foi considerado adequado, apresentando o mesmo perfil cromatográfico. Os tempos de retenção na identificação do AA nas formulações **F1** e **F2** foram: 3,47min matéria-prima e 3,41min para padrão de referência secundário. A **Figura 13** representa a injeção das quatro amostras, evidenciando que os outros compostos não foram capazes de interferir na identificação do AA.

Figura 13 - Perfil cromatográfico das formulações cosméticas aumentar

Legenda: ácido ascórbico como padrão de referência secundário a 10 µg/mL, **F1**: formulação cosmética com ácido ascórbico 10% p/p; **F2**: formulação cosmética com ácido ascórbico 10% p/p e ácido cafeico 0,2% p/p, branco, **F3**: formulação com ácido cafeico (AC) sem adição de AA.

Como observado nos resultados, os demais antioxidantes utilizados na formulação cosmética (ácido cafeico e metabissulfito de sódio) não interferiram na análise quando comparada com a formulação com o ácido ascórbico.

Pelo exposto, o método analítico não apresentou interferência dos componentes da preparação, pois os demais compostos não foram capazes de interferir na identificação da substância de interesse.

5.4.2 Linearidade

O coeficiente de correlação linear (R^2) é usado para indicar o quanto pode ser considerado adequado à reta como modelo matemático (INMETRO, 2007). A linearidade foi calculada através da curva de calibração e apresentou coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,9998$, próximo de 1,0 e estando de acordo com os critérios de aceitação previsto pela ANVISA, que exigem o valor de $R^2 \geq 0,99$ (BRASIL, 2017). A equação da reta está descrita na **Equação 6**.

A **Figura 14** apresenta a curva analítica obtida, a partir das 6 concentrações do padrão secundário (99,0%) de AA, no qual os valores do coeficiente angular (inclinação da reta) e da intersecção com o eixo y igual a 40103 $\mu\text{g/mL}$ e 40025x respectivamente.

Figura 14 – Curva analítica de ácido ascórbico padrão secundário ($\mu\text{g/mL}$), a 254 nm

$$y = 40025x + 40103$$

$$R^2 = 0,9998$$

Equação 6. Equação da curva analítica que correlaciona (x) à concentração do ácido ascórbico padrão secundário de referência ($\mu\text{g/mL}$) e (y) a área, com $R^2 = 0,9998$

5.4.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção que permite a diferenciação entre o pico do ácido ascórbico e o ruído da linha de base foi 0,075 µg/mL.

A menor concentração de ácido ascórbico determinada pelo limite de quantificação no estudo foi 0,100 µg/mL, com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2017).

5.4.4 Exatidão

De acordo com os resultados obtidos na **Tabela 8**, a exatidão apresentou valores próximos de 100%. Logo, o método foi considerado satisfatório, pois está de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2017).

Tabela 8 – Exatidão do método de quantificação de ácido ascórbico na formulação cosmética

Concentração (µg/mL)	CE 1 (µg/mL)	CE 2 (µg/mL)	CE 3 (µg/mL)	Exatidão (%)
5,0	4,89	4,83	4,90	97,51
7,5	7,44	7,46	7,33	98,84
10,0	9,87	9,90	9,66	98,12

Legenda: **CE**: concentração experimental.

5.4.5 Precisão

Conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 11 de julho de 2017, os valores obtidos de DPR não foram superiores a 5%, sendo considerados precisos, como observado na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Concentração de ácido ascórbico no ensaio de precisão intermediária

	CT AA (µg/mL)	CE1 (µg/mL)	CE 2 (µg/mL)	CE 3 (µg/mL)	DP	Média	DPR
C1	5,0	4,96	4,83	4,87	0,07	4,89	1,16
C2		4,83	4,87	4,80	0,04	4,84	0,65
C3		4,90	4,89	4,92	0,14	4,90	0,23
C1	7,5	7,56	7,41	7,35	0,11	7,44	1,28
C2		7,50	7,32	7,58	0,13	7,47	1,58
C3		7,50	7,08	7,43	0,22	7,33	2,70
C1	10,0	9,95	9,79	9,87	0,08	9,87	0,70
C2		9,89	9,90	9,93	0,02	9,90	0,21
C3		9,62	9,74	9,63	0,06	96,64	0,60

Legenda: **C1**: corrida 1º dia; **C2**: 2º dia; **C3**: 3º dia; **CT**: concentração teórica de ácido ascórbico; **CE**: concentração experimental; **DP**: desvio padrão; **DPR**: desvio padrão relativo.

5.5 Quantificação do ácido ascórbico nas formulações

O teste de estabilidade é realizado para determinar a diminuição quantitativa de ingrediente ativo em qualquer forma de doseamento devido à degradação. Métodos de indicação de estabilidade são usados para medir com precisão a concentração do ingrediente ativo, independentemente da presença de impurezas e interação de excipientes ou produtos de degradação (NAVEED; SAJID, 2016).

O doseamento do ácido ascórbico foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil de estabilidade nas formulações nas diversas condições de armazenamento e ao longo do tempo. Utilizou-se a **Equação 6**, obtida da curva analítica, a fim calcular os níveis de concentração de AA obtidos do 1º ao 450º dia de análise, a partir da leitura das absorbâncias.

Constatou-se que a concentração de ácido ascórbico (AA) na **F1**, na condição de *geladeira* ($5,0 \pm 2,0$ °C), apresentou variação significativa, no qual, não permaneceu constante durante todo o tempo de avaliação. No entanto, percebe-se que, no decorrer de 360 dias, a redução da concentração inicial foi de apenas $\pm 10\%$. Este valor é aceitável, pois está dentro dos padrões farmacopeicos da UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2018) que foram considerados nesta pesquisa (90,0 – 110,0%).

A formulação armazenada à *temperatura ambiente* ($25,0 \pm 2,0$ °C) reduziu $\pm 15\%$ do teor de AA frente a concentração inicial, no período de seis meses e $\pm 18\%$ em um ano. Quando comparado a condição de *geladeira* o seu declínio foi relativamente maior, como observado na **Tabela 10**. No entanto, ao atingir 450 dias, as concentrações obtidas foram estatisticamente iguais nas duas condições de armazenamento, no qual, apresentaram concentrações de $70,82 \pm 0,05$ µg/mL (*temperatura ambiente*) e $72,43 \pm 0,04$ µg/mL (*geladeira*).

Na condição de *estufa* ($45,0 \pm 2,0$ °C) ocorreu variação do teor de AA, que demonstrou diferença significativa em relação à concentração inicial, com redução em $\pm 50,0\%$ no prazo de 90 dias. Ao atingir o prazo de 120 dias, obteve concentração de $\pm 20,0$ µg/mL, ou seja, redução de $\pm 80,0\%$ da concentração inicial de AA na formulação. A realização das análises nos demais tempos, nesta condição foi descartada, visto a drástica redução da concentração em um curto prazo de tempo.

A formulação **F2**, na condição de *geladeira*, também apresentou resposta superior quando comparada ao armazenamento em temperatura ambiente. Até o período de 270 dias a formulação esteve dentro dos limites de aceitação, no entanto formulação com ácido cafeico (AC) acrescido na formulação, não inibiu a redução do ácido ascórbico (AA) e pode ter potencializado sua degradação, visto que, na **F1** na mesma condição de *geladeira*, a redução de 10% da concentração ocorreu no prazo de um ano. No período de um ano em *temperatura ambiente* reduziu $\pm 40\%$ da concentração inicial de AA.

Na condição de *estufa*, a concentração de AA também foi inferior a **F1**, degradando-se rapidamente, visto que, em 30 dias **F1** apresentou concentração de $80,43 \pm 2,52$ µg/mL e **F2** teor de $68,17 \pm 0,15$ µg/mL de ácido ascórbico. Ao alcançar 120 dias, as formulações reduziram drasticamente o teor de AA, apresentando concentrações de $20,96 \pm 0,23$ µg/mL e $18,93 \pm 0,16$ µg/mL respectivamente, sendo consideradas estatisticamente iguais.

De acordo com a literatura, as características observadas e obtidas nesta condição de estudo, é possível ter originado o ácido 2,3 dicetogulônico, produto de degradação do DHAA, cuja redução é irreversível; e uma variedade de produtos e subprodutos de degradação é capaz de ter sido originados em subsequência, como: furfural, ácido oxálico e carboxílico, entre outros (HIATT et al., 2011).

De acordo com Segall e colaboradores (2008), os ésteres ascorbólicos ascorbil fosfato de sódio e o ascorbil fosfato de magnésio são derivados mais estáveis do AA, do que o palmitato de ascorbila e podem ser facilmente utilizados em produtos cosméticos. No entanto, sabe-se que o AA na forma pura apresenta resultado aproximadamente 150 vezes superior quando comparado aos derivados (BISSETT et al. 1990), possuindo propriedades neocolagênicas, clareadoras da pele e é um dos antioxidantes mais importantes da pele (NIAIMI et al., 2017). Porém, a rápida degradação do AA em meio aquoso ainda é um fator importante nas formulações onde está incorporado. A degradação do AA ocorre tanto pelas vias aeróbias quanto anaeróbias e depende de vários fatores, como: oxigênio, temperatura, luz, pH e condições de armazenamento (SHERAZ et al., 2015).

A partir do exposto, verificamos que controlar estes fatores desempenham um papel importante na fotoestabilidade da vitamina pura em formulações na forma creme. De acordo com Ahmad e colaboradores (2011), quanto maior a viscosidade do meio, menor é a degradação do AA; a presença de glicerina (umectante) nas emulsões, confere maior efeito estabilizador na degradação do AA devido sua viscosidade. Portanto, a cuidadosa seleção de excipientes, incluindo emolientes e umectantes, é muito importante para melhorar a estabilidade do AA (SHERAZ et al., 2015).

Os recipientes herméticos utilizados no armazenamento de cremes dificultam o acesso de ar na formulação e, conseqüentemente, favorecem a redução/inibição do processo de oxidação química do AA (AHMAD et al., 2011). Estas informações podem justificar o bom desempenho da formulação cosmética **F1**. No entanto, apesar da base cosmética ser bem-sucedida para adição do AA, quando incorporado o AC na **F2**, a resposta foi significativamente diferente e não auxiliou na menor degradação do AA.

O AA degradou-se mais quando comparado à formulação sem adição deste composto fenólico. O fato de não tamponar o AC, pode ser uma das justificativas para a resposta negativa da **F2**. Podem ser sugeridos novos estudos com adição do AC na forma encapsulada e ácido ferúlico, visando auxiliar na estabilidade do AA e potencializando sua ação na pele.

Tabela 10 – Concentrações do ácido ascórbico no Teste de Estabilidade Normal, nas diversas condições de armazenamento e tempo

Concentração do ácido ascórbico nas formulações (µg/mL)						
Tempo	F1			F2		
Dia	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C	5,0 ± 2,0 °C	25,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C
0	100,62 ± 0,06 ^A	100,62 ± 0,06 ^A	100,62 ± 0,06 ^A	100,62 ± 0,06 ^A	100,62 ± 0,06 ^A	100,62 ± 0,06 ^A
7	101,14 ± 0,03 ^A	100,15 ± 0,04 ^A	101,11 ± 0,91 ^A	100,61 ± 0,05 ^A	100,34 ± 0,32 ^A	99,59 ± 0,14 ^A
15	101,01 ± 0,11 ^A	100,27 ± 0,02 ^A	87,01 ± 1,64 ^B	95,10 ± 0,09 ^B	97,89 ± 0,10 ^A	95,50 ± 0,04 ^A
30	101,31 ± 0,03 ^A	98,20 ± 0,05 ^A	80,43 ± 2,52 ^C	95,65 ± 0,04 ^B	98,01 ± 0,52 ^A	68,17 ± 0,15 ^B
60	96,52 ± 0,14 ^{AB}	95,98 ± 0,09 ^A	59,64 ± 1,42 ^D	93,93 ± 0,02 ^B	91,20 ± 0,17 ^B	59,89 ± 0,16 ^{BC}
90	95,01 ± 0,05 ^{BC}	93,33 ± 0,01 ^B	49,98 ± 0,18 ^E	94,29 ± 0,06 ^B	91,08 ± 0,77 ^B	52,05 ± 0,11 ^C
120	93,90 ± 0,06 ^{BC}	85,16 ± 0,03 ^C	20,96 ± 0,23 ^F	90,45 ± 0,17 ^C	88,53 ± 0,02 ^B	18,93 ± 0,16 ^D
270	93,61 ± 0,24 ^{BC}	85,08 ± 0,10 ^C	N.A	90,51 ± 0,01 ^C	58,07 ± 0,04 ^C	N.A
360	90,10 ± 0,31 ^C	82,08 ± 0,11 ^D	N.A	84,45 ± 0,02 ^D	60,02 ± 0,07 ^C	N.A
450	72,43 ± 0,04 ^D	70,82 ± 0,05 ^E	N.A	60,62 ± 0,03 ^E	59,40 ± 0,10 ^C	N.A

Legenda: **F1** – formulação contendo ácido ascórbico 10% p/p, **F2** – Formulação completa (ácido ascórbico 10% p/p + ácido cafeico 0,2% p/p).

5.6 Quantificação do aducto dialdeído malônico - ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA)

5.6.1 Linearidade

A linearidade dos níveis totais de MDA-TBA foi determinada através da curva analítica. A faixa linear foi estabelecida utilizando 7 (sete) concentrações de MDA da faixa de trabalho, como observado na **Tabela 12**.

A curva analítica obtida, apresentou equação de regressão linear igual a $y = 917637x + 1842$ e coeficiente de correlação linear (R^2) = 0,9998, como observado na **Figura 15** e **Tabela 11**. A partir dos dados apresentados, se concluiu que o modelo de regressão linear é adequado, visto que, o valor de coeficiente de correlação linear está de acordo com os critérios de aceitação previsto pela ANVISA, que exigem $R^2 \geq 0,99$ e pelo INMETRO, (acima de 0,90) (BRASIL, 2017; INMETRO, 2007).

Figura 15 – Curva analítica do aducto MDA-TBA (n = 3)

Legenda: Concentrações de MDA utilizadas na construção da curva foram 0,001; 0,0016; 0,0032; 0,0064; 0,0080; 0,013; 0,018.

Tabela 11 – Linearidade

Regressão linear	
Equação da reta	$y = 917637x + 1842$ (concentração do aducto MDA-TBA μM)
Coef. Cor. Lin. (R^2)	0,9998

Legenda: x = Concentração MDA-TBA; y = Área do pico; Coef. Cor. Lin. (R^2) = coeficiente de regressão linear.

Tabela 12 – Parâmetros da regressão linear da curva analítica do aducto MDA-TBA

Ct aducto MDA-TBA (μM)	Área de picos (μAU)			
	1	2	3	$A_{\text{média}} \pm \text{DP}$
1×10^{-3}	2774	2774	2774	$2774 \pm 0,00$
$1,6 \times 10^{-3}$	3381	3381	3381	$3381 \pm 0,00$
$3,2 \times 10^{-3}$	4850	4650	4850	$4783 \pm 94,28$
$6,4 \times 10^{-3}$	7716	7716	7716	$7716 \pm 0,00$
$8,0 \times 10^{-3}$	9396	8804	8804	$9100 \pm 279,07$
$1,3 \times 10^{-3}$	12449	13891	15170	$13836 \pm 1111,51$
$1,8 \times 10^{-3}$	18038	18558	18558	$18384 \pm 245,13$

Legenda: μM = Micro Molar; μAU = Mili Unidade de absorvância $A_{\text{média}} \pm \text{DP}$ = média das áreas mais ou menos o desvio padrão. **Ct** = concentração teórica

5.6.2 Especificidade

Como observado na **Figura 16**, o método pode ser considerado específico, visto que não ocorreu sobreposição de pontos entre a formulação cosmética e os reagentes frente ao aducto MDA-TBA). Os picos dos possíveis interferentes não apareceram no mesmo tempo de retenção que o aducto MDA-TBA.

Figura 16 – Cromatograma dos interferentes de TBARS

Legenda: 1: Reação TBARS; 2: formulação F2, 3: sobreposição do cromatograma de 0,2% BHT, H_3PO_4 0,44M, 1% H_2SO_4 .

5.6.3 Tape stripping

O AA tem um grande potencial de fornecer propriedades antienvhecimento em formulações para a pele. A avaliação *in vitro* (DPPH) comprovou esta afirmativa, no entanto, foi necessário saber como a formulação age diretamente na pele do consumidor, desta forma, os estudos *ex vivo* corroboram para maior entendimento sobre sua aplicação quando incorporado nas preparações.

O método TBARS é utilizado na quantificação da peroxidação lipídica que corresponde a um dano na membrana celular causado pelos radicais livres que são formados sob estresse oxidativo (NETO et al., 2013). Um dos metabólitos oriundos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). Desta forma, sua determinação, ainda que de forma indireta, é um indicador de avaliação do grau de estresse oxidativo (KRUSE et al., 2006). Dentre os métodos de quantificação, o HPLC ou CLAE permanece como o mais indicado na determinação de MDA-TBA devido sua especificidade e sensibilidade elevada (YONNY et al., 2015).

A avaliação *ex vivo* da eficácia das formulações cosméticas **F1** e **F2** foi realizada por meio da quantificação da peroxidação lipídica, proveniente do estrato córneo removido por *tape stripping*. Seguiu-se, o proposto por Gonçalves (2019) e Alonso et al. (2009), com algumas modificações.

A quantificação da peroxidação lipídica pelo aducto MDA-TBA avaliou se as formulações cosméticas contendo ácido ascórbico (AA) associada ao ácido cafeico

(AC) seriam capazes de conter/ inibir a peroxidação lipídica na pele das voluntárias, e até mesmo, estimar o possível estresse oxidativo provocado pelas formulações antioxidantes.

Após a remoção das fitas de *tape stripping* do antebraço das voluntárias, um grupo de amostras foi exposto à irradiação solar artificial, com a finalidade de avaliar a capacidade destas formulações em proteger e prevenir a pele contra os danos causados pela exposição solar.

Dez voluntárias foram selecionadas, de acordo com os termos de inclusão e exclusão estabelecidos neste estudo; no qual as características principais seriam: fototipo de pele II e III; faixa etária de 50 a 70 anos de idade; sexo feminino, pele saudável e íntegra na região do teste, como descrito no *item 4.2.5.3.1*.

Na **Tabela 13** pode ser observado os resultados comparativos entre as diferentes formulações estudadas e as condições submetidas

Tabela 13 – Concentração média de aductos MDA-TBARS obtido das amostras de *tape stripping* irradiadas e não irradiadas (n= 10).

Formulações	Condição	Razão da Concentração (PNI)	Conc. M $\pm$ DP (μ M)
P	NI	1,00	$6,0 \times 10^{-3A}$
P	IR	1,57	$9,4 \times 10^{-3C}$
F1	NI	0,90	$5,4 \times 10^{-3B}$
F1	IR	1,55	$9,3 \times 10^{-3C}$
F2	NI	0,87	$5,2 \times 10^{-3B}$
F2	IR	1,97	$11,8 \times 10^{-3D}$

Legenda: **P** = pele sem formulação (controle ou branco); **F1** = Formulação com ácido ascórbico; **F2** = Formulação completa (ácido ascórbico + ácido cafeico); **NI** = fita não irradiada após remoção; **IR** = fita irradiada após remoção. **Conc. M + DP**= concentração média mais desvio padrão. Valores que não compartilham a mesma letra, são significativamente diferentes pela análise estatística ANOVA seguida de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tendo em vista que, a pele não irradiada (*PNI*) (considerada controle), apresentou concentração de $6,0 \times 10^{-3} \pm 0,00 \mu$ M, ambas formulações, **F1** (base + ácido ascórbico 10,0% p/p) e **F2** (base + ácido ascórbico 10,0% p/p + ácido cafeico 0,2% p/p) na condição Não Irradiada (*NI*), reduziram a peroxidação lipídica da pele, com resultados estatisticamente iguais; $5,4 \times 10^{-3} \pm 0,00$ e $5,2 \times 10^{-3} \pm 0,00 \mu$ M,

respectivamente. As formulações foram capazes de prevenir a peroxidação lipídica, inibindo a quantidade de TBARS formado. Estes resultados sugeriram que o AA pode exercer efeito antioxidante que protege as biomoléculas lipídicas essenciais no controle do envelhecimento cutâneo da pele. Apesar de valores próximos, a *F2NI* apresentou resultado indicativo de contribuição na diminuição da peroxidação lipídica, relativamente superior à *F1NI*, como pode ser observado nos valores obtidos da razão, na **Tabela 13** e **Figura 17**.

Figura 17 – Razão da concentração do aducto MDA-TBA da Pele Não Irradiada comparada as amostras não irradiadas no teste de TBARS via *ex vivo* (n= 10)

Legenda: **F1NI** = Fita não irradiada após remoção formulação com ácido ascórbico 10%p/p do estrato córneo; **F2NI** = Fita não irradiada após remoção formulação com ácido ascórbico 10%p/p + ácido cafeico 0,2%p/p do estrato córneo. Letras diferentes do mesmo parâmetro indicam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (ANOVA de uma via: $p \leq 0,05$; $n = 10$).

Também, é importante observar a diferença dos valores obtidos do controle (*PNI*), e da pele irradiada (*PIR*). Notou-se a tendência no aumento da peroxidação lipídica quando exposta a radiação, no qual, foi de $6,0 \times 10^{-3} \pm 0,00 \mu\text{M}$ para $9,4 \times 10^{-3} \pm 0,00 \mu\text{M}$. A razão da concentração elevou de 1,0 (*PNI*) para 1,57 (*PIR*) quando irradiado. A formação de radicais livres acelera o envelhecimento cutâneo, através do estresse oxidativo gerado, cujo maior dano é a peroxidação lipídica. Os peróxidos lipídicos formados, são conhecidos como produtores de perda irreversível da fluidez e elasticidade da membrana da pele, podendo levar à ruptura ou morte celular (HIRATA et al., 2004).

Quando comparado **Pele irradiada** (*PIR*) com amostra de **F1 irradiada** (*F1 IR*) verificou-se que ambas elevaram a intensidade do estresse oxidativo da pele. Devido

à estrutura dérmica, conforme, as amostras foram expostas à radiação, a quantidade de peróxidos lipídicos formados aumentou-se, no entanto, ambas não apresentaram diferença estatística significativa, as concentrações obtidas foram: $0,0094 \pm 0,00$ e $0,0093 \pm 0,00 \mu\text{M}$, respectivamente. Ou seja, a formulação com ácido ascórbico, após a exposição à radiação solar não apresenta promoveu maior proteção frente a peroxidação lipídica, mas manteve o mesmo nível de dano oxidativo. Sugerem-se novos estudos com valores maiores de AA que possam oferecer maior proteção que 10% p/p.

Quando comparado **F2** nas condições *NI* e *IR*, observou-se que, quando *não irradiado (IR)*, apresentou excelente resposta frente a peroxidação lipídica, sendo capaz de reduzir a concentração de peróxidos ($0,0052 \pm 0,00 \mu\text{M}$). Contudo, a **F2 IR** elevou a concentração de peróxidos e sobressaiu às demais amostras estudadas, tendo em vista, que a intensidade do estresse oxidativo provocado pela associação de AC ao AA ficou mais evidente quando exposta à radiação artificial, obtendo concentração média de $0,0118 \pm 0,01 \mu\text{M}$. A condição desta amostra apresentou aumento significativo na produção da lipoperoxidação por MDA, $\pm 130\%$ quando comparado com a pele não irradiada (*NI*) e aumento de $\pm 98\%$ quando comparado ao controle (*PNI*).

Os resultados obtidos demonstraram que a adição do ácido cafeico (AC) na formulação contendo ácido ascórbico (AA) não resultou em benefício quando aplicado sobre a pele e exposto à radiação, resultado não esperado. Verificou-se que a adição do AC (composto fenólico) potencializou a peroxidação lipídica, resposta prejudicial à saúde da pele, favorecendo o envelhecimento cutâneo.

Na literatura, relata-se que a luz ultravioleta (UV) produz espécies reativas de oxigênio (EROS) na pele, que acelera o envelhecimento ao danificar o DNA, proteínas, lipídios e outros constituintes celulares (POVICHIT et al., 2010). A **F2 IR** poderia ser utilizada com fotoprotetor (diurno) ou no período noturno. A preparação **F1 IR** não apresentou maiores danos a pele quando, indicando benefícios do AA a 10% sem a associação com AC.

Atualmente, produtos como protetor solar, antipoluição e antienvelhecimento reivindicam a ação antioxidante, mas é importante entender como esses produtos atuam no estrato córneo na proteção e na manutenção da qualidade da pele

(MARTINS et al., 2020) e como ocorre sua interação com o estrato córneo e como tornar as formulações mais eficazes. Neste estudo foi possível observar a melhor resposta quanto a inibição da peroxidação lipídica quando as formulações **F1** e **F2** foram aplicadas sem exposição à radiação ultravioleta. Com base nas variáveis estudadas, sugeriu-se que o AA pode formar um complexo com um radical livre, possivelmente por um efeito quelante, no qual, converte estes radicais em espécies menos reativas (NETO et al., 2013). No entanto, a exposição à radiação ultravioleta não foi capaz de aumentar seu potencial antioxidante, sendo necessária a aplicação de um fotoprotetor; ou identificá-los como produtos de uso noturno.

Mais estudos são sugeridos, para melhor elucidar os possíveis mecanismos de ação que explicam a atividade antioxidante do AA quando aplicado na pele do consumidor e exposto a radiação ultravioleta.

A respeito da segurança das formulações, foram consideradas adequadas para aplicação na pele das voluntárias, que não apresentaram nenhum sinal de hipersensibilidade ou irritação cutânea durante e após a realização do teste.

6. CONCLUSÃO

As melhores condições de armazenamento das formulações foram na geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C). No entanto, a formulação **F1** apresentou melhor eficácia, visto que, manteve a atividade antioxidante do ácido ascórbico (AA) constante durante o prazo um ano após armazenamento; aspecto e odor foi levemente modificado; a cor apresentou pequena alteração, tornando-se levemente amarela; além de reduzir apenas 10% da concentração inicial do AA na condição de *Geladeira*. Em *Temperatura ambiente*, reduziu 18% da concentração.

A inclusão do ácido cafeico (AC) junto ao AA na **F2** não elevou atividade antioxidante, quando comparado a **F1**, visto que, na condição de *Geladeira* ($5,0 \pm 2,0$ °C), as duas formulações foram estatisticamente iguais durante um ano de estudo, $95,29 \pm 0,33$ e $95,34 \pm 0,35$ %SRL_M, respectivamente. Em *Temperatura ambiente*, reduziu 8% da atividade antioxidante inicial das emulsões não iônica e 40% do teor de AA, concluindo que a, mesma não ofereceu maiores eficácia à formulação.

A **F1** constituída por ácido ascórbico 10% p/p na sua forma pura apresentou os melhores resultados, sugerindo que a mesma apresenta potencial de aplicação em formulações antienvhecimento cutâneo e de minimizar os danos teciduais. Adicionalmente, apresentou maior estabilidade que normalmente se acredita que possa apresentar as formulações manipuladas, visto que, a estimativa de prazo é estreita, de dois a três meses. A formulação desenvolvida apresentou durabilidade maior, tendo em vista que, em seis meses reduziu apenas 15% da concentração inicial e não apresentou nenhuma alteração das características organolépticas estudadas na condição de temperatura ambiente.

A **F3** contendo apenas o antioxidante ácido cafeico (AC) na concentração de 0,2%p/p na formulação cosmética apresentou comportamento complexo, com instabilidade física e química, tornando inadequado para emprego nas preparações em todas condições estudadas. Houve aumento de pH e redução da atividade antioxidante em $\pm 4,15$ % SRL_M em 120 dias de estudo em temperatura ambiente.

Outra metodologia empregada foi a do TBARS. Quando as formulações **F1** e **F2** foram aplicadas nas voluntárias e não exposta a radiação (*N*), demonstraram-se, como: forte potencial de uso na prevenção e tratamento do envelhecimento da pele (evita formação de radicais livres), com redução de 20% da concentração de

peróxidos lipídicos do estrato córneo quando comparado com a Pele não irradiada (*PNI*), considerada controle.

Comparando-se *PNI* com as amostras que foram expostas a irradiação ultravioleta (*IR*), ocorreu aumento dos peróxidos lipídicos na pele das voluntárias. Principalmente, a formulação **F2**, contemplada com a adição do *AC* na fórmula, ocorrendo substancialmente a produção de $\pm 98\%$ dos peróxidos, quando comparado ao controle (*PNI*), sugerindo que esta formulação atuou como pró-oxidante e restringindo seu uso durante a noite ou com fotoproteção adicional.

As formulações foram consideradas seguras, por não causar reação irritativa ou alérgica nas voluntárias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIHPEC. **Panorama do Setor Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.** Resultados 2019. São Paulo, 2020, p. 82. Disponível em: <<https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/CADERNO%20DE%20TENDENCIAS%202019-2020%20Sebrae%20Abihpec%20vs%20final.pdf>>. Acesso em: 25 out 2020.
- AGUIAR, R. V. S. C.; OLIVEIRA, C.; BARELLI, N.; MELO, B.; GONÇALVES, T.; FEITOSA, G. P.V. Fotoenvelhecimento nos diferentes grupos étnicos. **Revista de Iniciação Científica, Tecnológica e Artística**, v. 6, n. 5, p. 19- 30, 2017.
- AHMAD, I.; SHERAZ, M. A.; SHAIKH, R. H.; AHMED, S.; VAID, F. H. M.; KHATTAK, S. R.; ANSARI, S. A. Photostability and interaction of ascorbic acid in cream formulations. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.12, n.3, p. 917-923, 2011.
- ALLEMANN, I. B; BAUMANN, L. S. Antioxidants used in skin care formulations. **Skin Therapy Letter**, v. 13, p. 5-9, 2008.
- ALMAJANO, M. P.; CARBÓ, M. E.; DELGADO, M. E.; GORDON, M. H. Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. **Journal of Food Science**, v. 72, n.5, p. 258-263, 2007.
- ALONSO, C.; BARBA, C.; RUBIO, G.; SCOTT, S.; KILIMNIK, U. M.; CODERCH, G.; NOTARIO, J.; PARRA, J.L. An *ex vivo* methodology to assess the lipid peroxidation in stratum corneum. **Journal of Photochemistry and Phtobiology B: Biology**, v. 97, n. 2, p. 71-76, 2009.
- ARAUJO, M. O. **Preparação de derivados do ácido cafeico e avaliação das suas atividades antimicrobianas.** 2017. 129p. Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências da Saúde - Programa de Pós-Graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2017.
- ARAUJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v.4, n. 11, p. 1-7, 2008.
- ARCT, J.; KORYZA, K.; DZIERZGOWSKI. Stripping in the evaluation of dermal bioavailability of cosmetic ingredients. **Innowacyjność W Kosmetologii**, v.1, n.1, p. 91-106, 2013.
- ARNEJO, N.; GARCIA, M.C.; LORENZO, V. Obtencion de emulsiones múltiples W/S/W y su utilización como vehículo de Vitamin C. In: **Congreso Latino Americano I Ibérico de Químicos Cosméticos**, 15, 2001, Buenos Aires.
- ARRUDA, L. C. P. **Peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos submetidos à criopreservação com trolox.** Dissertação de Mestrado. 2014. 65p. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2014.

- AUDI, C.; KATAOKA, V. Y.; SILVA, G. J.; TATIKAVA, M. Y.; RODRIGUES T.; ZYCHAR, B. C. Desenvolvimento e mecanismo de ação da canície e queda capilar. **Revista de Iniciação Científica, Tecnológica e Artística**, v. 6, n. 5, p. 42-58, 2017.
- BABY, A. R.; FILHO-HAROUTIOUNIAN, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVALANTE-JUNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; AREAS, E. P. G.; KANEKO, T. M. VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n. 2, p.233-248, 2008.
- BABY, A.R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichiliacatigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalumolacoides* Bentham. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 405- 412, 2007.
- BARATA, E. A. F. **A cosmetologia princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 1995.
- BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DAGA, M.; DIAZANI, C.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G. P.; GIORDANO, G.; CUCCI, M. A.; GRAF, M.; GENTILE, F. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in agging-related disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.
- BASTOS, A. S.; LOUREIRO, A. P.; DE OLIVEIRA, T. F.; CAMINGA, R. M.; JÚNIOR, C. R.; ORRICO, S. R. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Analytical biochemistry**, v. 423, n.1, p. 141-146, 2012.
- BATISTUZZO, J. A. O.; MASAYUKI, I.; YUKIKO, E. **Formulário Médico Farmacêutico**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks; 2011. 785p.
- BEZERRA, S. V.; REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Editora Senac, São Paulo, 2001.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes na dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BISSETT, D. L. Common cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 435–445, 2009.
- BISSETT, D. L.; CHATTERJEE, R.; HANNON, D. P. Photoprotective effect of superoxiviscavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 7, p. 56-62, 1990.

- BRAND-WILLIAMS, W.; BONDET, V.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH· free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, p. 609-615, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Validação de métodos analíticos**. Resolução nº. 166, de 24 de julho de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Saúde. **Resolução nº 466**, de 12 de dezembro de 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004. v.1, 45p.
- CHIARI, B. G.; SEVERI, J. A.; PAULI-CREDENDIO, P. A.; SYLOS, C. M.; VILELAS, W.; CORRÊA, M. A.; ISSAC, V. L. B. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p.331-336, 2012.
- CORNWELL, D. G.; M. A, J. Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.1, p. 8774–8786, 2008.
- COSTA, A. **Tratado Internacional de Cosméticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. 744p.
- CURY, J. A; TENUTA, L. M. A.; TABCHOURY, C. P. M. **Bioquímica oral**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2017. 152p.
- D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecule Sciences**. v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.
- DALCIN, K. B.; SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: aplicações estabilidade. **Caderno de Farmácia**, v.19, n. 2, p. 69-79, 2003.
- DAMASCENO, S.S.; SANTOS, N.A.; SANTOS, I.M.G.; SOUZA, A.L.; SOUZA, A.G.; QUEI-ROZ, N. Ácido cafeico e ferúlico: investigação do efeito antioxidante na estabilidade do biodiesel de soja durante armazenamento. **Fuel**. v. 107, n.1. p. 641-646, 2013.
- DARIO, M. F. **Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica bioativa na proteção capilar aos danos foto-oxidativos**. 2016. 187f. Tese de Doutorado- Faculdade de C. Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, S. Paulo, 2016.
- DAYAL, S.; SAHU, P.; YADAV, M.; JAIN, V. K. Clinical Efficacy and Safety on Combining 20% Trichloroacetic Acid Peel with Topical 5% Ascorbic Acid for

- Melasma. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 11, n. 9, p. WC08-WC11, 2017.
- DE-VRIESE, A. S.; BORREY, D.; MAHIEU, E.; CLAEYS, I.; STEVENS, L.; VANHAEVERBEKE, A.; LANGLOIS, M. R. Oral Vitamin C Administration Increases Lipid Peroxidation in Hemodialysis Patients. **Nephron Clinical Practice**, v.108, n. 1, p. 28–34. 2008.
- DUARTE, M. L. **Bioequivalência tópica após dose múltipla de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (dpk)**. 2017. 72p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- ENCLOSURE. In **Encyclopedia Britannica**. 2011. Disponível em: <<https://www.britannica.com/topic/enclosure>>. Acesso em: 27 jan. 2020.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; URBAN-MORLAN, Z.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUIN-TANAR, A. The *Tape-Stripping* Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 104-130, 2008.
- FDA. **Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics: guidance for industry**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>>. Acesso em 15 Jan. 2019.
- FERNANDEZ, E; BARBA, C.; ALONSO, C.; MARTI, M.; PARRA, J. L.; CODERCH, L. Photodamage determination of human hair. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 106, p. 101-106, 2012.
- FERREIRA, G. A. **Desenvolvimento de sistemas para veiculação de vitamina C, avaliação da estabilidade química, permeação e retenção cutânea**. 2012. 94p. Dissertação Mestrado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2012.
- FITZPATRICK, R. E.; ROSTAN, E. F. Double-blind, half-face study comparing topical vitamin C and vehicle for rejuvenation of photodamage. **Dermatologic Surgery**, v. 28, n. 3, p. 231–236, 2002.
- FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869-871, 1988.
- FORNARO, A; COICHEV, N. Acido l-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 642-650, 1998.
- FRIEDMAN, M.; JURGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 1, p. 2101–2110, 2000.

- FRIES, A. T.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto e Saúde**, v. 10, p. 19, 2010.
- GENARO-MATOS, T. C.; MAURÍCIO, A. Q.; RETTORI, D.; ALONSO, A, HERMES-LIMA, M. Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron- Induced Free Radical Generation-A Chemical Approach. **Public Library of Science**, v.10, n.6, 2015.
- GILABERT, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on protection. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v.101, p. 659-672, 2010.
- GONÇALVES, P. V. **Avaliação ex vivo da inibição da peroxidação lipídica do estrato córneo promovida por filtro UVB**. 2019. 87f. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
- GROTTO, D.; MARIA, L. S.; VALENTINI J.; PANIZ, C.; SCHMITT, G.; GARCIA, S. C.; POMBLUM, V. J.; ROCHA, J. B. T.; FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, n.1, 2009.
- GULCIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n.1, 213-220, 2006.
- HARRIS, M. I. N. C. **Pele: do nascimento a maturidade**. São Paulo: Senac, 2016. 302p.
- HIATT, A. N.; FERRUZZI, M. G.; TAYLOR, L. S.; MAUER, L. J. Deliquescence Behavior and Chemical Stability of Vitamin C Forms (Ascorbic Acid, Sodium Ascorbate, and Calcium Ascorbate) and Blends. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 6, p. 1330–1348, 2011.
- INSTITUTO NACIONAL DE METODOLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2007.
- ISAAC, V. L. B.; CAFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. v. 29, n.1, p.81-96, 2008.
- HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, A. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 23, n. 3, p. 418-424, 2004.
- JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515-540, 1990.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 376 p.

- JUTKUS, R. A. L.; LI, N.; TAYLOR, L. S.; MAUE, L.J. Effect of Temperature and Initial Moisture Content on the Chemical Stability and Color Change of Various Forms of Vitamin C. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n.1, p. 862-879, 2015.
- KALL, M. A. Ascorbic acid: Properties and Determination. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 316–324, 2003.
- KHUWIJITJARU, P.; SUAYLAM, B.; ADACHI, S. Degradation of caffeic acid in subcritical water and online HPLC-DPPH assay of degradation products. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n.8, p. 1945-1949, 2014.
- KIRK, R., KROSCWITZ, OTHMER. Ascorbic acid. **Encyclopedia of Chemical Technology**. v.7, n. 26. p. 136, 2007.
- KITT, D. Q. **Topical Dehydroascorbic Acid (Oxidized Vitamin C) Permeates Stratum Corneum More Rapidly Than Ascorbic Acid**, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/225274699_Topical_Dehydroascorbic_Acid_Oxidized_Vitamin_C_Permeates_Stratum_Corneum_More_Rapidly_Than_Ascorbic_Acid>. Acesso em 28 dez 2018.
- KRAMBECK, K. **Desenvolvimento de Preparações Cosméticas contendo Vitamina C**. 96f. Dissertação de Mestrado de Tecnologia Farmacêutica - Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto, Portugal, 2011.
- KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; DALMAZ, C.; TREZZI, M. M.; SIQUEIRA, I. Oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) indicates synergism for the metribuzin clomazone combination. **Planta daninha**, v. 24, n. 2, p. 379-390, 2006.
- KYNGMI, M.S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations rele-vant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.96-104, 2008.
- LEES, R. **Food analysis and quality control methods for the food manufacturer and buyer**. London: Leonard Hill Books; 1975. 245p.
- LIN, F. H.; LIN, J. Y.; GUPTA, R. D.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; SELIM, M. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; GRICHNIK, J. M.; ZIELINSKI, J.; PINNELL, S. R. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. **Journal of Investive Dermatology**. v. 125, n. 4, p. 826–832, 2005.
- LUQMAN, S.; RIZVI, S. Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 4, p. 303-306, 2006.
- LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Antioxidant activity of lemon seed extract (*Citrus limon*) added to soybean oil in accelerated incubator-storage test. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.
- MAGNANI, C.; CHIARI, B. G.; ISAAC, V. L. B.; SALGADO, H. R. N. *In vitro* safety evaluation of caffeic acid. **Athens Journal of Health**, v.3, p. 181- 188, 2014.

- MAIA, A. M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. 2002. 129 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MAIA, A. M.; BABY, RA. R.; YASAKA, W. J.; SUENAGA, E.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Validation of HPLC pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 639-643, 2007.
- MARTINI, E. **Nanoemulsão catiônica como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico química**. 2005. 206p. Dissertação de mestrado - Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos -Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 106, 2005.
- MARTINS, T. E. A. M.; PINTO, C. A. S. O.; OLIVEIRA, A. C.; VELASCO, M. V. R.; GUTIÉRREZ, A. R. G.; RAFAEL, M. F. C.; TARAZONA, J. P. H.; RETUERTO-FIGUEROA, M. G. Contribution of Topical Antioxidants to Maintain Healthy Skin—A Review. **Scientia Pharmaceutical**, v. 88, n.1, p. 27-44, 20
- MIAO, F.; SU, M. Y.; JIANG, S.; LUO, L. F.; LEI, T. C. Intramelanocytic Acidification Plays a Role in the Antimelanogenic and Antioxidative Properties of Vitamin C and Its Derivatives. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1; n. 1, p.1-14, 2019.
- MONTANARI, T. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3ª ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2015. 229p. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodehisto>>. Acesso em: 20 abr. 2020. 229 p.
- MONTEIRO-SILVA, S. A.; CALIXTO, G. M. F.; CAJADO, J.; CARVALHO, P. C. A.; RODERO, C. F.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R. Gallic Acid-Loaded Gel Formulation Combats Skin Oxidative Stress: Development, Characterization and *Ex Vivo* Biological Assays. **Polymers**, v. 9, n. 1, p. 391, 2017.
- MONTEIRO-SILVA, S. A.; SOUZA, J. G.; MELO, P. S.; MORENO, I. A. M.; ALENCAR, S. M.; LOPEZ, R. F. V.; LEONARDI, G. R. Target-action of antioxidants using Iontophoresis. **Journal of Cosmetic Dermatology**, p.1-13, 2020.
- MOORES, J. Vitamin C: A Wound Healing Perspective. **British Journal of Community Nursing**, v. 18, n. 12, p.1-5, 2013.
- MORAES, G. H. S, MEIRELLES, F. S. **Adoção de governo eletrônico no Brasil: Perspectiva do usuário do programa Nota Fiscal Paulista**. In: EnANPAD 2014, Rio de Janeiro. XXXVIII Encontro da ANPAD, 2014. v. 38, p.1-16, 2014.
- NAVEED S, SAJID S. Degradation in Pharmaceutical Creams: Ascorbic Acid Demonstrating Phenomenon: A Review. **Journal of Bioequivalence and Availability**, v. 8, n. 1, p. 80-083, 2016.

- NETO, J. D. N.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p.125-130, 2013.
- NIAIMI, F. A.; CHIANG, N. Y. Z. Topical vitamin C and the skin: mechanisms of action and clinical application. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 10, n. 7, p. 14-17, 2017.
- OLIVEIRA, A. C.; PINTO, C, A. S. O.; BABY, A. R.; BEDIN, V.; VELASCO, M. V. R. Effects of ascorbic acid against the skin aging. **Revista BWS**, v. 1, n. 1, 2017.
- OLIVEIRA, A. Z. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico**. 2009. 100 f. Dissertação de Mestrado - Universidade do Porto, Portugal, 2009.
- OLIVEIRA, C. A. **Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina**. 2015. 190p. Tese de Doutorado – Faculdade de C. Farmacêuticas – Universidade de S. Paulo, São Paulo, 2015.
- OLIVEIRA, L. F. **Análise morfológica e imunológica da pele, de acordo com as características epidemiológicas de idosos autopsiados**. 2011. 63 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, 2011.
- OZCELIK, B.; LEE, J. H.; MIN, D. B. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Food Chemical Toxicology**, v.68,n.2,p.487-490, 2003.
- PAZINATO, D. M. M. **Capacidade antioxidante de Eugenia uniflora L. (Pitangueira) em resposta ao ambiente de mineração de calcário**. 2017. 62 f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Mineral - Universidade Federal do Pampa, Caçapava do Sul, 2017.
- PERES, D.D. **Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo***. 2015. 168 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- PINNELL, S. R, YANG, H, OMAR, H.; MONTEIRO-RIVIERE, N.; DEBUYS, H. V.; WALKER, L. C.; WANG, Y.; LEVINE, M. Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies. **Dermatologic Surgery**, v. 27, n. 2, p. 137–142, 2001.
- PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p.1-11, 2007.
- POVICHIT, N.; PHRUTIVORAPONGKUL, A.; SUTTAJIT, M.; CHAIYASUT, C.; LEELAPORNPISID, P. Phenolic content and *in vitro* inhibitory effects on oxidation and protein glycation of some thai medicinal plants. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 23, n. 4, p.403-408, 2010.

- PRISTA, L. N.; BAHIA, M. F. G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. v. 2. Lisboa: Associação Nacional das Farmácias; 1996. 239p.
- PULLAR, J. M.; CARR, A. C.; VISSERS, M. C. M. The roles of vitamin C in skin health. **Nutrients**. v. 9, n. 8, p. 866, 2017.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RAMOS, SILVA. M.; CELEM, L. R; RAMOS, SILVA. S.; FUCCI, COSTA. AP. Anti-aging cosmetics: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 6, n.1, p. 750, 2013.
- ROSA, J. S.; GODOY, R. L. O.; NETO, J. O.; CAMPOS, R. S.; MATTA, V. M.; FREIRE, C. A.; SILVA, A. S.; SOUZA, R. S. Development of a method for vitamin C analysis in food using high performance liquid chromatography and ion exclusion. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 837-846, 2007.
- ROSS, D. M. S.; QU, Z. C.; COBB, C. E.; MAY, J. M. Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 81-9, 1999.
- SAMBANDAN, D.R.; RATNER, D. Sunscreens: an overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 748-758, 2011.
- SANTOS, A. C.D.; ARAUJO, A.M., ROCHA, B. O.; ROCHA B.O.; CHAVEZ, M.F.S., COELHO, A.G. Study of the stability of topical use formulations containing vitamin C manipulated in pharmacies of the city of Teresina-Pi. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 756-767, 2019.
- SATTTLER, J. A. G. **Quantificação das vitaminas antioxidantes E (α -, β -, γ -, δ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A (α -, β -Caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil**. 2014. 140p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia**. 1. ed. São Paulo: Tecnopress; 2003. 33p.
- SEGALL, A. I.; MOYANO, M. A. Stability of vitamin C derivatives in topical formulations containing lipoic acid, vitamins A and E. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 453-458, 2008.
- SELIMOVIC, A.; SALKIC M.; SELIMOVIC, A. Direct Spectrophotometric Determination of L- Ascorbic acid in Pharmaceutical Preparations using Sodium Oxalate as a Stabilizer. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v.11, n.2, p. 106-109, 2011.

- SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemical Toxicology**, v 113, p. 1202-1205, 2009.
- SHERAZ, M. A.; AHMED, S.; AHMAD, I.; QADEER, K.; VAID, F. H. M. Photodegradation and Photostabilization of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Preparations. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 1, n. 1, p. 68-70, 2010.
- SHERAZ, M. A.; KHAN, M. F.; AHMED, S.; KAZI, S. H.; AHMAD, I. Factors affecting formulation characteristics and stability of ascorbic acid in water-in-oil creams. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n.1 p. 494-504, 2014.
- SHERAZ, M. A.; KHAN, M. F.; AHMED, S.; KAZI, S. H.; AHMAD, I. Stability and stabilization of ascorbic acid. **Household and Personal Care Today**, v.10, n.3, p. 22-25, 2015.
- SILVA, G. M.; MAIA-CAMPOS, P. M. B. G. Influence of a formulation's pH on cutaneous absorption of ascorbic acid. **Cosmetics and Toiletries**, v. 116, n.1, p.73-75, 2001.
- SILVEIRA, A. L. C. **Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos**. 2013. 83 p. Dissertação de Mestrado - Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal, 2013.
- SOBIEPANNEK, A.; KOBIELA, T. Application of the tape stripping method in the research on the skin condition and its diseases. **Review and Research on Cancer Treatment**, v. 5, n. 1, 2019.
- SOUZA, M. C.; SARTOR, C. F. P.; FELIPE, D. F. Comparação da ação antioxidante de uma formulação contendo extrato de *Pereskia aculeata* com cosméticos anti-idade presente no mercado. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 3, p. 461-477, 2013.
- SPAGNOL, C. M.; OLIVEIRA, T. S.; ISAAC, V. L. B.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Validation of caffeic acid in emulsion by UV- Spectrophotometric method. **Physical Chemistry**, v. 5, p.16-22, 2015.
- SPAGNOL, C. M.; FILIPPO, L. D. D.; ISAAC, V. L. B.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Caffeic acid in dermatological formulations: *In vitro* release profile and skin absorption. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, v. 20, n. 8, p. 675-681, 2017.
- SPAGNOL, C. M. **Micropartículas poliméricas biodegradáveis contendo ácido cafeico para aplicação tópica**. 2018. 202p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" , Araraquara, São Paulo, 2018
- STAMFORD, N. P. J. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, n. 1, p. 310-317, 2012.

- SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Methods for measuring antioxidant activity of fruits. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.
- SYMES, A.; SHAVANDI, A.; ZHANG, H.; AHMED, I.A. M.; AL-JUHAIMI, F.Y.; BEKHIT, A.E.A. Antioxidant Activities and Caffeic Acid Content in New Zealand Asparagus (*Asparagus officinalis*) Roots Extracts. **Antioxidants**, v.7, n. 4, p. 52, 2018.
- UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **The United States Pharmacopeia**. USP 41 – NF41. 36.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018.
- VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da rutina com p- metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 23-27, 2008.
- WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatology Terapy**, v. 23, n.1, p. 31-47, 2012.
- YONNY, M. E.; REINERI, P. S.; PALMA, G. A.; NAZARENO, M. A. development of an analytical method to determine malondialdehyde as an oxidative marker in cryopreserved bovine semen. **Analitical Methods**, v. 7, n. 15, p.6331–6338, 2015.
- ZUSSMAN, J.; AHDOUT, J.; KIM, J. Vitamins and photoaging: do scientific data support their use? **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 3, p. 507-525, 2010.

8. ANEXOS

Anexo A – Informações para os membros da banca julgadora

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Serviço de Pós-Graduação

Dispõe sobre a correção de Dissertações e Teses após a Defesa:

(Documento aprovado pela Comissão de Pós-Graduação em sua 525ª Sessão Ordinária realizada em 12/08/2020)

De acordo com artigo 83 § 4º do Regimento de Pós-Graduação da USP, na forma disciplinada pela Resolução CoPGr 6018/2011, de 13/10/2011, o (a) aluno (a) poderá entregar na Secretaria de Pós-Graduação uma **versão corrigida**.

A Comissão de Pós-Graduação da FCF-USP recomenda que essa versão corrigida seja solicitada pela comissão julgadora apenas em casos de constatação de erros pontuais, mas que podem comprometer a compreensão do assunto ou a reprodutibilidade de experimentos, ou, ainda, de citação ou de documento fora das diretrizes para apresentação de Teses e Dissertações da USP. Desse modo, **não serão aceitas solicitações de correção e/ou reformulação, parcial ou total, que impliquem em descaracterização ou reformulação do documento originalmente apresentado para avaliação da comissão julgadora**. Deficiências metodológicas ou conceituais importantes, e que comprometam seriamente a interpretação dos resultados e as conclusões obtidas, são elementos para a reprovação da dissertação/tese.

A recomendação de apresentação de versão corrigida implica em **detalhamento** pela comissão julgadora de **todos** os pontos que deverão ser objeto de ajuste ou correção, devidamente registrados em folha anexa à ata de defesa, não sendo aceitas orientações de natureza vaga ou genérica, sem indicação de página e parágrafo.

O prazo de entrega da versão corrigida estabelecido pela Comissão de Pós-Graduação da FCF-USP é de 30 dias após a defesa e **será de responsabilidade do presidente da comissão julgadora** a verificação de que as alterações se restringiram aos pontos registrados no documento anexo à ata de defesa.

São Paulo, 12 de agosto de 2020.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Anexo B – Parecer da comissão ética

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: Atividade antioxidante e retenção cutânea de formulação tópica contendo ácido ascórbico associado ao ácido cafeico														
Pesquisador: Maria Valéria Robles Velasco														
Área Temática:														
Versão: 2														
CAAE: 11101219.2.0000.0067														
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo														
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 3.360.258														
Apresentação do Projeto:														
<p>O envelhecimento cutâneo é classificado em dois tipos: intrínseco e extrínseco. No intrínseco (cronológico), a pele apresenta-se envelhecida naturalmente e dependente de características hereditárias, estresse fisiológico e regulação hormonal (RAMOS et al., 2013). Proeminentemente, é mais suave, e resulta na perda progressiva da elasticidade, palidez e fragilidade da pele que é oriunda da afinação da epiderme e derme (DALCIN et al., 2003). Desta forma, torna-se necessário desenvolver mecanismos que possam prevenir este desequilíbrio provocado pela produção dos EROs. O uso de antioxidantes tópicos pode ser um importante mecanismo de defesa, fornecendo proteção contra os estresses oxidativos endógenos e exógenos através da neutralização dos radicais livres e, bloqueando os danos ocasionados (ALLEMAMM & BAUMANN, 2008; FRIES & FRASON, 2010).</p> <p>O ácido ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, possui multifuncionalidade quando aplicado topicamente. Com características hidrossolúveis, a sua função não está simplesmente limitada ao seu efeito antioxidante no estresse oxidativo do organismo, que são eficazes na inibição dos radicais livres gerados na pele (FERREIRA, 2012). Devido ao elevado poder de regeneração, atua como protetor biológico na síntese de elastina e colágeno, que são responsáveis pela sustentação e firmeza da pele nas regiões com menor espessura e de maior sensibilidade como a que ocorre em torno dos olhos, local em que se observam os primeiros sinais do envelhecimento cutâneo, tanto pelos fatores intrínsecos como</p>														
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="3">Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Butantã</td> <td>CEP: 05.508-000</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SÃO PAULO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)3091-3622</td> <td>Fax: (11)3031-8986</td> <td>E-mail: cepfci@usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112			Bairro: Butantã	CEP: 05.508-000		UF: SP	Município: SÃO PAULO		Telefone: (11)3091-3622	Fax: (11)3031-8986	E-mail: cepfci@usp.br
Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112														
Bairro: Butantã	CEP: 05.508-000													
UF: SP	Município: SÃO PAULO													
Telefone: (11)3091-3622	Fax: (11)3031-8986	E-mail: cepfci@usp.br

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.360.258

extrínsecos (MAIA, 2002; DALCIN et al., 2003). Desta forma, pretende-se desenvolver formulações contendo ácido ascórbico a 10,0% p/p associado ao ácido cafeico 0,2% p/p, a fim de avaliar a ação antioxidante e o perfil de retenção cutânea em modelo ex vivo. A técnica de tape stripping (TS) é um método amplamente utilizado para examinar a localização do componente ativo e a sua concentração no estrato córneo (EC) (BETTONI, 2009).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da proposta é desenvolver formulações contendo ácido ascórbico a 10,0% p/p associado ao ácido cafeico 0,2% p/p, a fim de avaliar a ação antioxidante e o perfil de retenção cutânea em modelo ex vivo.

Como objetivos específicos, forma descritos:

- Avaliar o perfil de retenção cutânea do ácido ascórbico por método de tape stripping, em modelo ex vivo e quantificar (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).
- Avaliar a atividade antioxidante do AA após extração do estrato córneo por método de tape stripping.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios:

Avaliar as formulações em modelo ex vivo, pode garantir informações do potencial da ação antioxidante da associação entre o ácido ascórbico e ácido cafeico e estimular o desenvolvimento de preparações antienvhecimento cutâneo. O voluntário não obterá nenhum benefício financeiro. No entanto, estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia dos produtos cosméticos testados. Assim, possibilitando também, uma divulgação transparente dos benefícios do cosmético desenvolvido.

Os riscos referentes ao processo experimental foram relatados e descritos como risco mínimo. O procedimento a ser realizada pode gerar desconforto e raramente, podem incluir alergias e irritabilidade local.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta do projeto é pertinente, e de importante impacto na sociedade, com a formulação de produtos antienvhecimento de aplicação tópica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatório foram apresentados. As questões levantadas no último parecer foram respondidas.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfci@usp.br

Página 02 de 04

**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO**

Continuação do Parecer: 3.360.258

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1303299.pdf	28/05/2019 16:26:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	28/05/2019 15:19:32	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CEP.pdf	28/05/2019 15:17:51	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	28/05/2019 15:15:08	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/04/2019 12:07:57	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao.pdf	04/04/2019 11:47:47	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
Declaração de Pesquisadores	equipe.pdf	04/04/2019 11:46:42	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/04/2019 13:41:07	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIA.pdf	22/03/2019 17:00:36	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_participacao.pdf	22/03/2019 17:00:17	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito
Folha de Rosto	CAPA.pdf	21/03/2019 18:17:23	Maria Valéria Robles Velasco	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfct@usp.br

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.380.258

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 31 de Maio de 2019

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepf@usp.br

Página 04 de 04

Anexo C – Currículo lattes

Andressa Costa de Oliveira

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0118498680325557>

ID Lattes: **0118498680325557**

Última atualização do currículo em 02/01/2021

Atualmente é estudante de mestrado do programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, na área de concentração de Produção e Controle Farmacêutico. Graduada em Farmácia pelo Centro Universitário Padre Anchieta (2015), com habilitação em homeopatia. Possui experiência em gestão de pessoas e projetos, coordenando trabalhos de iniciação científica. Atua na área de Cosmetologia, principalmente nos seguintes temas: Desenvolvimento e Inovação de Produtos Cosméticos, com ênfase em caracterização, avaliação de segurança, controle de qualidade, eficácia de sistemas de liberação, antioxidantes, fotoproteção e Hair care. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Andressa Costa de Oliveira
Nome em citações bibliográficas	OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, ANDRESSA COSTA DE; DE OLIVEIRA, ANDRESSA COSTA
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/0118498680325557

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913623
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2018	Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações tópicas: avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica, Orientador: Maria Valéria Robles Velasco. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmacotécnica e tecnologia farmacêutica. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Garantia e controle de qualidade farmacêuticos. Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico; Fabricação de produtos farmacêuticos e Farmacêuticos.
2012 - 2015	Graduação em Farmácia. Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil. Título: Estudo comparativo de controle de qualidade físico-químico do extrato seco da Tribulus terrestris em farmácias magistrais de Jundiaí-SP. Orientador: Judimara Rodrigues de Moraes.

Formação Complementar

2020 - 2020	Capacita Professor. (Carga horária: 1h). Gennera, GENNERA, Brasil.
2020 - 2020	Aromaterapia Básica. (Carga horária: 4h). Vital Da Terra, VT, Brasil.
2019 - 2019	

	Extensão universitária em Fármaco de Medicamentos. (Carga horária: 2h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2019 - 2019	Introdução às diferentes técnicas cromatográficas e mecanismo de separação. (Carga horária: 3h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2019 - 2019	Princípios básicos de liofilização. (Carga horária: 2h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF, Brasil.
2018 - 2018	Extensão universitária em Tricologia aplicada com métodos invasivos e não invasivos. (Carga horária: 60h). Instituto Biológico de Ensino, IBE, Brasil.
2018 - 2018	Cabelo: Características, Propriedades e Produtos. (Carga horária: 17h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF, Brasil.
2018 - 2018	Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB. (Carga horária: 6h). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, ICB, Brasil.
2016 - 2016	Medicamentos sob controle especial e antimicrobiano em ênfase no SNGPC. (Carga horária: 8h). Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.
2015 - 2015	Farmacoterapia oncológica. (Carga horária: 8h). Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.
2013 - 2013	Extensão universitária em Homeopatia na medicina veterinária e na agronomia. (Carga horária: 2h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2013 - 2013	Extensão universitária em Endoscopia e a expressão gênica aplicada a cosmetologia. (Carga horária: 2h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2013 - 2013	Extensão universitária em Farmácia Magistral. (Carga horária: 2h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2013 - 2013	Extensão universitária em Farmacêutico em Análises Clínicas. (Carga horária: 2h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2013 - 2013	Extensão universitária em Principais doenças de verão. (Carga horária: 2h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2013 - 2013	Extensão universitária em Como combater o envelhecimento e manter a pele bonita e saudável. (Carga horária: 2h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2013 - 2013	Extensão universitária em Oficina de capacitação e aprendizagem: Postura Profissional. (Carga horária: 4h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2012 - 2012	Extensão universitária em Técnicas de Aplicação de Injetáveis. (Carga horária: 10h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2012 - 2012	Extensão universitária em Serviços farmacêuticos e atenção farmacêutica. (Carga horária: 4h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2012 - 2012	Análise Forense de DNA. (Carga horária: 8h). Renova Cursos, RC, Brasil.
2012 - 2012	Fotoproteção: tendências e segurança em formulações cosméticas. (Carga horária: 4h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2012 - 2012	Toxicologia aplicada na perícia criminal. (Carga horária: 4h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.
2012 - 2012	Atuação do farmacêutico na distribuição e transporte. (Carga horária: 4h). Centro Universitário Padre Anchieta, UniAnchieta, Brasil.

Atuação Profissional

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Cosmetologia.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Pesquisa e desenvolvimento de formulações cosméticas.
4. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Garantia de Controle de Qualidade.

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. ★ MARTINS, T. E. A.; PINTO, C. A. S. D. O.; **OLIVEIRA, A. C.**; VELASCO, M. V. R.; GUTIERREZ, A. R. G.; RAFAEL, M. F. C.; TARAZONA, J. P. H.; RETUERTO-FIGUEROA, M. G. . Contribution of Topical Antioxidants to Maintain Healthy Skin-A Review. *Scientia Pharmaceutica*, v. 88, p. 27, 2020.
Citações: WEB OF SCIENCE 4 1
2. ★ MOROCHO'JÁCOME, ANA LUCIA; FREIRE, THAMIRES BATELLO; **DE OLIVEIRA, ANDRESSA COSTA**; DE ALMEIDA, TÂNIA SANTOS; ROSADO, CATARINA; VELASCO, MARIA VALÉRIA ROBLES; BABY, ANDRÉ ROLIM . In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds - a review. *Journal of Cosmetic Dermatology* **JCR**, v. 1, p. 1, 2020.
3. FREIRE, THAMIRES BATELLO; DARIO, MICHELLI FERRERA; MENDES, OTÁVIO GIL; **OLIVEIRA, ANDRESSA COSTA DE**; VETORE NETO, ALBERTO; FARIA, DALVA LUCIA ARAÚJO DE; SILVA, VÂNIA RODRIGUES LEITE E; BABY, ANDRÉ ROLIM; VELASCO, MARIA VALÉRIA ROBLES . Nanoemulsion containing caffeine for cellulite treatment: characterization and in vitro evaluation. *BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (ONLINE)* **JCR**, v. 55, p. 1/11, 2019.
4. **OLIVEIRA, A. C.**; PINTO, C. A. S. D. O.; BABY, A. R.; BEDIN, V.; VELASCO, M. V. R. . Efeitos do ácido ascórbico no combate ao envelhecimento cutâneo. *BWS Journal*, v. 1, p. 1-7, 2018.

Capítulos de livros publicados

1. ★ **OLIVEIRA, A. C.**; MOROCHO'JÁCOME, ANA LUCIA; LIMA, C. R. C.; MARQUES, G. A.; BISPO, M. O.; BARROS, A. B.; COSTA, J. G.; ALMEIDA, T. S.; ROSADO, C.; CARVALHO, J. C. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. . Cosmetics applications. *Microalgae Edition Cultivation, Recovery of Compounds and*. 1ed.London Wall: Academic, 2020, v. 1, p. 313-332.

Artigos aceitos para publicação

1. **OLIVEIRA, A. C.**; ABELAN, U. A. S.; CACOCI, E. S. P.; MARTINS, T. E. A.; GIACON, V. M.; VELASCO, M. V. R.; LIMA, C. R. R. C. . Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: a review. *Journal of Cosmetic Dermatology* **JCR**, 2021.

Apresentações de Trabalho

1. ★ **OLIVEIRA, A. C.** . A biodiversidade a favor da fotoproteção. 2019. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 28 EADV Congress. Antioxidants as photostabilizer of chemical filters in sunscreen products. 2019. (Congresso).
2. 2nd SunScreen International Symposium. 2019. (Simpósio).
3. Seminário de Atualização em Cosmetologia.A biodiversidade a favor da fotoproteção. 2019. (Seminário).
4. Seminário de Atualização em Cosmetologia. 2019. (Seminário).
5. XX Congresso Farmacêutico de São paulo. Antioxidant as photostabilizer of the UVA/UVB filters. 2019. (Congresso).
6. ICAD BRAZIL. 2018. (Congresso).
7. International Congress of Aesthetic Dermatology and Health y Aging Medicine. Estresse oxidativo cutâneo e antioxidantes. 2018. (Congresso).
8. International Congress of Aesthetic Dermatology and Health y Aging Medicine. Peeling. 2018. (Congresso).

9. XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo, 2015. (Congresso).
10. Farmacêutico na Praça. Farmacêutico na Praça. 2013. (Encontro).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. ★ **OLIVEIRA, A. C.**; FREIRE, T. B. . Curso de Escola de Inverno: Pesquisa e Inovação em Fármacos e Medicamentos (EPIFAR). 2019. (Outro).

Educação e Popularização de C & T

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. ★ **OLIVEIRA, A. C.**; FREIRE, T. B. . Curso de Escola de Inverno: Pesquisa e Inovação em Fármacos e Medicamentos (EPIFAR). 2019. (Outro).

Outras informações relevantes

Estágio no laboratório de Toxicologia da Superintendência da Polícia Técnico-Científica de Jundiaí no período de 10/03/2014 à 13/09/2014. Com ênfase em análises cromatográficas de drogas e entorpecentes.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 05/01/2021 às 13:25:22

Anexo D – Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9139 - 10121115/2 - Andressa Costa de Oliveira

Email: andressacosta@usp.br
 Data de Nascimento: 09/01/1994
 Cédula de Identidade: RG - [REDACTED] - BA
 Local de Nascimento: Estado da Bahia
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Bacharela em Farmácia - Centro Universitário Padre Anchieta - São Paulo - Brasil - 2016

Curso: Mestrado
 Programa: Fármaco e Medicamentos
 Área: Produção e Controle Farmacêuticos
 Data de Matrícula: 05/02/2018
 Início da Contagem de Prazo: 05/02/2018
 Data Limite para o Depósito: 01/02/2021
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Valeria Robles Velasco - 05/02/2018 até o presente. Email: mvrobles@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/02/2018
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/03/2019
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 05/02/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Impresso em: 02/01/2021 19:32:04

02/01/2021

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9139 - 10121115/2 - Andressa Costa de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5830-1/1	Formulações Cosméticas e Dermatológicas: Aspectos Clínicos (1)	09/10/2017	12/11/2017	75	5	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/5	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	06/02/2018	16/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída
EDM5100-3/2	A Formação do Professor Universitário (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	06/03/2018	04/06/2018	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BMF5876-1/5	Introdução à Segurança Química de Laboratório de Pesquisa (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/04/2018	04/06/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5779-3/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	11/05/2018	13/07/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-4/1	Tópicos Gerais de Fármacos e Medicamentos	02/08/2018	14/11/2018	45	3	77	B	N	Concluída
FBA5728-4/8	Aprimoramento Pedagógico	02/04/2019	30/04/2019	60	4	100	A	S	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a)

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Impresso em: 02/01/2021 19:32:04

CHAPTER

10

Cosmetics applications

Andressa Costa de Oliveira^a, Ana Lucía Morocho-Jácome^a,
 Cibele Ribeiro de Castro Lima^b, Gabriela Argollo Marques^a,
 Maíra de Oliveira Bispo^a, Amanda Beatriz de Barros^a,
 João Guilherme Costa^c, Tânia Santos de Almeida^c,
 Catarina Rosado^c, João Carlos Monteiro de Carvalho^d,
 Maria Valéria Robles Velasco^a, and André Rolim Baby^a

^aDepartment of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil,

^bPhysics Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ^cCBIOS—Universidade Lusófona's
 Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lisbon, Portugal, ^dDepartment of Biochemical
 and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
 University of São Paulo, São Paulo, Brazil

1 Introduction

Skin is considered the major organ in the human body and its principal function is protecting body against the external environment (e.g., microorganisms and other harmful invasive agents). The more superficial skin layer is stratified to act as a protective barrier to retain water and prevent dehydration and dryness. When the *stratum corneum* is compromised, it results in transepidermal water loss (TEWL) and gradual skin dehydration (Berardesca, Loden, Serup, Masson, & Rodrigues, 2018).

The appeal for products from natural origins has been growing dramatically in the last decade, leading the cosmetic industry to look

for more natural and sustainable ways to develop cosmetic products. Thus algae extracts are promising and valuable in the cosmetic market (Khanra et al., 2018). Moreover, microalgae have compounds that can be used in the manufacture and development of cosmetics with particular beneficial properties for the prevention or treatment of skin aging (Ariede et al., 2017).

Only about 10% of microalgae species are identified and described, but a few species are produced at an industrial level (i.e., *Dunaliella salina*, *Haematococcus*, *Arthrospira*, *Chlorella*, *Aphanizomenon*) (Couteau & Coiffard, 2018). Moreover, only a very few macroalgae species have been cultivated for industrial purposes

Review

Contribution of Topical Antioxidants to Maintain Healthy Skin—A Review

Tércio Elyan Azevedo Martins ^{1,2,†}, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto ^{2,*,†} ,
Andressa Costa de Oliveira ², Maria Valéria Robles Velasco ², Arilmí Rosa Gorriti Guitiérrez ³,
Martha Francisca Cosquillo Rafael ³ , Jossimar Paúl Huamaní Tarazona ³ and
Mónica Guadalupe Retuerto-Figueroa ³

¹ Aesthetics and Cosmetics Course, Paulista University, São Paulo 04709-11, Brazil; terciomartins@usp.br

² Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; andressacosta@usp.br (A.C.d.O.); mvrobles@usp.br (M.V.R.V.)

³ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Major National University of São Marcos, Lima 15081, Peru; agorritig@unmsm.edu.pe (A.R.G.G.); martha.cosquillo@unmsm.edu.pe (M.F.C.R.); josue45602@hotmail.com (J.P.H.T.); monica.retuerto@unmsm.edu.pe (M.G.R.-F.)

* Correspondence: clausal@usp.br; Tel.: +55-11-3091-3674

† The contributions of these authors were equal.

Received: 29 February 2020; Accepted: 15 April 2020; Published: 3 June 2020

Abstract: The skin is constantly exposed to various environmental stresses, in particular to the damage caused by pollution and ultraviolet radiation (UV), and as a consequence, the horny extract can be negatively impacted by the harmful influence of some of its surface components. The mechanisms involved in the degradation processes promoted by UV radiation are driven by the direct absorption of radiation via cellular chromophores, the formation of excited states and the consequent chemical reactions, or even by the photosensitization mechanisms, in which UV light is absorbed by the sensitizers that are excited and their reactions promote the formation of reactive oxygen species (ROS). The mechanisms of polluting agents are not yet fully understood, however, they indicate that one of the main mechanisms involved is oxidative stress by lipid peroxidation, with the ability to promote damage to the composition of sebum, the quality of the *stratum corneum* and also, promote aging skin. Recent studies demonstrate the potential of antioxidant agents, with an emphasis on products of natural origin, which try to promote the maintenance of the physiological balance of the skin.

Keywords: antioxidant; permeation; pollution; solar radiation; skin

Nanoemulsion containing caffeine for cellulite treatment: characterization and *in vitro* evaluation

Thamires Batello Freire^{1*}, Michelli Ferrera Dario¹, Otávio Gil Mendes², Andressa Costa de Oliveira¹, Alberto Vetore Neto¹, Dalva Lucia Araújo de Faria², Vânia Rodrigues Leite e Silva³, André Rolim Baby¹, Maria Valéria Robles Velasco¹

¹Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Department of Fundamental Chemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Department of Exact and Earth Sciences, Institute of Environmental Sciences, Chemistry and Pharmaceuticals São Paulo, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

The Gynoid Hydrolipodystrophy (GHL), commonly known as cellulite, occurs in 80-90% of the female population after the puberty period and comes from a metabolic modification in the cutaneous adipose tissue. Caffeine has been used in topical formulations due to its lipolytic action. We studied a nanoemulsion (F3) containing caffeine with two surfactants (*oleth-3* and *oleth-20*) by emulsification method by phase inversion temperature inversion (PIT). The polydispersion indices (PDI) showed the reduced deviation of 0.1. The mean droplet size was ~40 nm. The evaluated constant of Ostwald, in the refrigerator condition was the most favorable during the stability test. In the In Raman spectroscopy assay, the caffeine bands found in F3 were compatible with those found in the caffeine solution (1337, 652.5 and 558.2 cm⁻¹). There was no interaction of caffeine anhydrous with other ingredients in nanoemulsion. In the *in vitro* safety assay the result of 1.4 ranked the F3 as slightly irritating. In the natural membrane, cutaneous permeation test (human skin) permeate concentrations did not exceed the saturation concentration of the PBS buffer (48.96 µg/3 mL). The caffeine solution and F3 permeated statistically equal, but the nanoemulsion visually and sensorially improved the caffeine precipitation.

Keywords: Cellulite. Caffeine. Gynoid hydrolipodystrophy. Nanoemulsion. Permeation.

Efeitos do ácido ascórbico no combate ao envelhecimento cutâneo.

Effects of ascorbic acid against the skin aging.

Resumo

Introdução

O uso de antioxidantes tópicos pode ser um importante mecanismo de defesa da pele ao envelhecimento extrínseco e intrínseco na pele, fornecendo proteção contra o estresse oxidativo endógeno e exógeno, dificultando sua formação e/ou bloqueando os danos ocasionados.

Objetivos

O objetivo geral do presente estudo consistiu em elencar os efeitos benéficos gerados à pele, com o emprego do ácido ascórbico incorporado em formulações de uso tópico.

Materiais / Sujeitos e Métodos

Os autores apresentam revisão de dados científicos sobre o assunto, discorrendo sobre o histórico do ácido ascórbico (vitamina C) e seus efeitos benéficos sobre a pele foto-envelhecida.

Resultados

A pele foto-envelhecida é capaz de inibir a ação dos nocivos radicais livres, melhorando e prevenindo as alterações cutâneas, por meio de sua atividade antioxidante e tratando rugas existentes devido o estímulo à produção de colágeno e elastina e ação clareadora de manchas.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nos trabalhos avaliados, pode-se concluir que o ácido ascórbico, atende aos requisitos de um ingrediente anti-envelhecimento cutâneo.

Abstract

The use of topical antioxidants can be an important defense mechanism of the skin to the extrinsic and intrinsic aging in the skin, providing protection against endogenous and exogenous oxidative stress hindering its formation and/or blocking the damages. The general objective of the present study was to list the beneficial effects generated by the skin with the use of ascorbic acid in topical formulations. The authors present a review of scientific data on the subject, discussing the history of ascorbic acid (vitamin C) and its beneficial effects on the photoaged skin, since it is able to inhibit the action of harmful free radicals, improving and preventing the skin changes, by means of its antioxidant activity and treating existing wrinkles due the stimulation to the production of collagen and elastin and reducing action of the spots. According to the results obtained in these research, it can be concluded that ascorbic acid meets the requirements of a skin anti-aging ingredient.

Autores

Andressa Costa de Oliveira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Pós Graduada
USP
Brasil

Dra. Claudinéia A. S. de Oliveira Pinto

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
USP
Brasil

Dr. André Rolim Baby

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Professor
USP
Brasil

Dr. Valcinir Bedin

Faculdades BWS
Diretor/Professor
Brasil

Dra. Maria Valeria Robles Velasco

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Professora
USP
Brasil

Palavras-chave

Ácido ascórbico. Vitamina C.
Antioxidante. Envelhecimento cutâneo.

Keywords

Ascorbic acid. C vitamin. Antioxidant.
Cutaneous aging.

Anexo F – Convites

ATHENS INSTITUTE FOR EDUCATION AND RESEARCH*A World Association of Academics and Researchers*

8 Valaoritou Str., Kifonisi, 10671 Athens, Greece.

Tel: 210-36.34.210 Fax: 210-36.34.209 Email: info@atiner.gr URL: www.atiner.gr

(ATINER)

(ATINER)

Athens, 1 April 2020

Andressa Costa de Oliveira
Master Student
University of São Paulo
Brazil

Our Ref: PHA2021/1696018

Dear Ms Costa de Oliveira,

I am very happy to inform you that the selection academic committee has decided to invite you to speak at our 8th Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences 3-6 May 2021, Athens, Greece on the topic of:

Evaluation of the Hair Shaft Damage Submitted to Chemical Treatments

Please be prepared for an oral presentation in English of 15-20 minutes including discussion. During your presentation you may use PowerPoint. More information can be found at the conference website <https://www.atiner.gr/2021pharmako>. The conference's social program is available on <https://www.atiner.gr/social-program>. These are academic events which give the opportunity to our conference participants to further discuss the issues developed during the formal sessions and establish academic collaborations with other scholars from many different countries.

If you want your paper to be considered (peer reviewed) for publication and only then, please submit your manuscript by 5 April 2021 using our website <https://www.athensjournals.gr/paper-submission> following the paper guidelines stated there. For more information, please see point 3 of our policy on <https://www.atiner.gr/policy>. Please do not submit your paper if you do not want it to be published by ATINER.

I look forward to meeting you in Athens.

Yours Sincerely,

Dr. Gregory T. Papanikos
President