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

**Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações
cosméticas contendo ácido ascórbico**

ADRIANA MOURA MAIA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2002

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

Maia, Adriana Moura
M217d Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de
formulações cosméticas contendo ácido ascórbico
Adriana Moura Maia. -- São Paulo, 2002.
117p.

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

I. Cosmetologia 2. Cosméticos : Controle de qualidade
I. T. II. Velasco, Maria Valéria Robles, orientador.

668.5 CDD

Adriana Moura Maia

Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações
cosméticas contendo ácido ascórbico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco
Orientador/Presidente

1^o Examinador

2^o Examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

A Deus , meu Mestre Superior, a Quem tudo devo em primeiro lugar.

A meus pais, Omar e Conceição por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje.

Ao Roberto, por ter sido meu companheiro em todos os momentos.

À minha orientadora Valéria, por ter dedicado um carinho de mãe.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Deus, obrigada por Seu imenso amor e por todas as dádivas: minha vida, sabedoria e capacidade para realizar meu trabalho, coragem para enfrentar os obstáculos e por todos os momentos de felicidade.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco pela amizade, paciência e valiosa orientação.

À minha família, em especial a meus pais, Omar e Conceição, pelo amor incondicional que sempre me deram; ao meu esposo Roberto pela paciência, incentivo e amor e à minha prima Patrícia pelo apoio constante e carinho.

Aos Prof(s) Dr(s) Pedro Alves Rocha Filho, Vladi Olga Consiglieri, Vera Izaac, pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos Prof(s) Dr(s) Telma Mary Sakuda, Mitsuko Taba Ohara, Humberto Gomes Ferraz e Cristina Serra pelas sugestões e apoio que deram.

À Profa. Sílvia Berlanga pelas sugestões no desenvolvimento da metodologia analítica.

Ao Prof. Dr. Wilson Yasaka que gentilmente cedeu o laboratório CEDETEM (Central de Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos) para a realização dos estudos de estabilidade química.

À Bibliotecária Leila Bonadio pela revisão das referências bibliográficas

Aos colegas do CEDETEM pelo apoio e amizade, em especial à Eunice Suenaga pela importante contribuição nos estudos de estabilidade química.

Às estagiárias Cibele, Thais, Ai Honda e Camila pela fundamental ajuda que prestaram para a realização deste trabalho.

Aos amigos Claudinéia, Carla, José, Marcelo, Janaína, Daniel, Elissa, Patrícia, Eduardo, Nilson, Letícia, Mônica, Jaqueline, Evelyn, Luciana e Lélia pelo apoio e ótimos momentos que compartilhamos.

À Bete, secretária de pós-graduação, por todos os auxílios prestados.

À professora Maria Elena Takeda pela ajuda prestada com a análise estatística dos resultados.

Aos patrocinadores ROCHE, AVON, CRODA, GIVAUDAN, COGNIS, COSMOTEC e DRAGACO que forneceram matérias-primas e literaturas fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O ácido ascórbico desempenha várias funções na pele como estímulo à síntese do colágeno, despigmentante cutâneo e ação antioxidante. Sua instabilidade química (oxidação), quando em contato com oxigênio, luz, temperaturas elevadas e metais dificultam sua incorporação em produtos cosméticos. Sendo assim, é importante a utilização de um sistema antioxidante efetivo.

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver formulações cosméticas (creme e gel fluido extemporâneo com ácido ascórbico) e avaliar sua estabilidade, utilizando a glutathione e o metabissulfito de sódio como antioxidantes, comparando com as formulações sem antioxidantes (controle). As amostras foram submetidas a três valores de temperaturas e avaliadas em intervalos de tempo pré-determinados quanto à estabilidade física, físico-química e química. Aquelas contendo glutathione ou metabissulfito de sódio mostraram-se mais estáveis do que as sem antioxidantes (controle), em todas as condições avaliadas, podendo ser utilizadas como alternativas na manipulação de produtos cosméticos contendo ácido ascórbico.

SUMMARY

The ascorbic acid plays several functions in the skin as stimulate the synthesis of the collagen, normalize pigmentation of the skin and has an antioxidant action. It is chemically instable (oxidation) and, when in contact with oxygen, light, high temperatures and metals its incorporation in cosmetic products becomes difficult. So, the use of an effective antioxidant system is important.

The objectives of this research were to develop cosmetic formulations (cream and extemporaneous fluid gel with ascorbic acid) and evaluate its stability, using glutathione and sodium metabisulfite as antioxidants, comparing them with formulations without these antioxidant substances (control). The samples were submitted to three different temperatures and evaluated according to determined intervals of time when the physical and chemical stability was observed. Those formulations with glutathione or sodium metabisulfite were considered more stable than the ones without antioxidant substances (control), in all the evaluation conditions. These formulations may be used as an alternative in the manipulation of cosmetic products with ascorbic acid.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	2
2 - REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 - PELE HUMANA	5
2.2 - ÁCIDO ASCÓRBICO	7
2.2.1 - Características físico-químicas	8
2.2.2 – Estabilidade do ácido ascórbico	9
2.2.3 - Métodos analíticos para o doseamento do ácido ascórbico	11
2.2.3.1 - Padrão interno	12
2.2.4 - Ácido ascórbico para aplicação tópica	13
2.2.4.1 - Funções na pele	14
2.2.4.2 - Penetração cutânea	18
2.2.4.3. Segurança no uso do ácido ascórbico	20
2.3- ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS	20
2.4 - FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS	22
3 - OBJETIVOS	26
4 - MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 - MATERIAL	28
4.1.1 - Solventes e reagentes	28
4.1.2 - Matérias-primas	28

4.1.2.1 - Grau de pureza analítico	28
4.1.2.2 - Grau de pureza farmacêutico	28
4.1.3 – Equipamentos	29
4.1.4 - Outros materiais	30
4.2 - MÉTODOS	31
4.2.1 - TESTES PRELIMINARES	31
4.2.1.1 – Formulações preliminares	31
4.2.1.2 - Testes preliminares de estabilidade física para o creme base	35
4.2.1.2.1 – Centrifugação	35
4.2.1.2.2 - Estresse térmico	35
4.2.1.3 - Teste de estabilidade acelerada	35
4.2.1.3.1 - Tipos de amostras	35
4.2.1.3.2 - Avaliação inicial	36
4.2.1.3.3- Condições do teste de estabilidade acelerada	36
4.2.1.3.4 - Variáveis analisadas	37
4.2.2 - TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL	37
4.2.2.1 - Tipos de amostras	38
4.2.2.2 - Avaliação inicial	38
4.2.2.3 - Condições do teste de estabilidade normal	38
4.2.2.4 - Variáveis analisadas	38
4.2.2.5 – Avaliação do ácido ascórbico por CLAE	39
4.2.2.5.1 - Fase móvel	39
4.2.2.5.2 – Condições instrumentais	39
4.2.2.5.3 - Validação da metodologia analítica	39
4.2.2.5.4 - Curva de calibração	43
4.2.2.5.5- Determinação da concentração de ácido ascórbico nas formulações creme e gel fluido extemporâneo	43
4.2.2.6 - Planejamento estatístico	44
5 - RESULTADOS	46
5.1- TESTES PRELIMINARES	46
5.1.1 – Formulações preliminares	46

5.1.2 - Testes preliminares de estabilidade física para o creme base	46
5.1.2.1 – Centrifugação	46
5.1.2.2 - Estresse térmico	46
5.1.3 - Teste de estabilidade acelerada	47
5.1.3.1 - Avaliação física e físico-química das formulações	47
5.2 – TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL	52
5.2.1 - Avaliação física e físico-química dos cremes	52
5.2.2 - Avaliação física e físico-química dos géis fluidos extemporâneos	59
5.2.3 - Avaliação química das formulações (creme e gel fluido extemporâneo)	66
5.2.3.1 - Validação da metodologia analítica	66
5.2.3.1.1 - Especificidade	66
5.2.3.1.2 - Linearidade	66
5.2.3.1.3 - Recuperação/Exatidão	67
5.2.3.1.4 - Precisão	67
5.2.3.1.5 - Limite de detecção	67
5.2.3.2 - Curva de calibração do ácido ascórbico	72
5.2.3.3 - Determinação da concentração de ácido ascórbico no creme durante o teste de estabilidade normal	74
5.2.3.4 – Análise estatística para o creme	79
5.2.3.5 - Determinação da concentração de ácido ascórbico no gel fluido extemporâneo durante o teste de estabilidade normal	82
5.2.3.6 - Análise estatística para o gel fluido extemporâneo	87
6 - DISCUSSÃO	91
7 - CONCLUSÕES	104
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos a beleza sempre foi valorizada e atualmente é considerada condição importante, não somente como parâmetro social, mas também, como fator discriminatório no mercado de trabalho.

A indústria cosmética, movida pela exigência dos consumidores cada vez mais preocupados com a aparência, tem crescido em larga escala nos últimos anos. A ampliação deste setor fez com que houvesse a necessidade de rigoroso controle de qualidade dos produtos cosméticos. A valorização de um produto é destacada inicialmente em relação à elegância, mas tem sua aprovação no mercado principalmente em função da segurança e eficácia quando do seu uso.

No desenvolvimento de produto cosmético, o conhecimento da estabilidade é de suma importância, pois avalia o período de tempo em que o produto mantém suas propriedades físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas. Neste tipo de estudo, a formulação é submetida a determinadas condições de temperatura, umidade e luminosidade que causam aumento da velocidade de degradação química de ativos e modificação física da forma cosmética e conseqüentemente alteração da qualidade microbiológica. O objetivo é monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento e uso.

Atualmente, há uma tendência de busca por produtos rejuvenescedores da pele. Para atender a essa demanda, constantes pesquisas são realizadas a fim de desenvolver novos produtos com estas características, entre eles os cosméticos contendo princípios ativos também definidos como cosmecêuticos.

O ácido ascórbico ou vitamina C tem despertado o interesse das indústrias cosméticas, principalmente em função dos seus efeitos como despigmentante, estimulante da síntese do colágeno e antioxidante no combate aos radicais livres, agindo, conseqüentemente, contra o envelhecimento cutâneo.

As pesquisas científicas revelaram que esta substância pode penetrar na pele e, portanto, exercer a atividade pretendida, considerando-se a concentração, valor de pH e veículo da formulação para sua liberação.

A utilização da vitamina C em produtos cosméticos tem sido limitada em função de sua instabilidade química. A fim de contornar esses problemas, foram

desenvolvidos derivados mais estáveis, porém verificou-se que são menos efetivos do que o ácido ascórbico na sua estrutura livre, pois a ação desejada depende da liberação dessa estrutura.

Como forma de elevar a estabilidade da vitamina C em produtos cosméticos diversos aspectos devem ser considerados, tais como exclusão do oxigênio, proteção contra luz e temperatura, manutenção do pH ácido e a utilização de um sistema antioxidante eficiente. Neste estudo foram avaliadas duas substâncias antioxidantes: a glutatona que, devido ao grupamento sulfidril livre, pode atuar como agente redutor e o metabissulfito de sódio que tem sido muito utilizado para proteção de formulações tópicas com pH ácido. O desenvolvimento de uma formulação cosmética compreende diversos parâmetros que devem ser estudados envolvendo desde matérias-primas, material de acondicionamento, técnica de preparação e o estudo da estabilidade para determinar seu prazo de validade.

Na determinação da estabilidade de produtos cosméticos contendo vitamina C, os métodos de avaliação das características físicas e físico-químicas não são suficientes para comprovar sua eficácia, sendo necessária a quantificação da substância ativa por métodos quantitativos sensíveis indicativos de sua estabilidade, diferenciando o ácido ascórbico de seu(s) produto(s) de degradação como é a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).

A cosmetologia tem evoluído e cada vez mais os produtos devem ser elaborados com rigor científico a fim de se alcançar a eficácia cosmética pretendida e garantir segurança ao usuário. Portanto, para o desenvolvimento de formulações cosméticas contendo vitamina C que sejam eficazes durante todo o prazo de validade, é importante avaliar a estabilidade das mesmas através de testes físicos e químicos.

REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - PELE HUMANA

A pele, ou tecido cutâneo, reveste e molda o corpo e assegura as relações entre o meio interior e exterior. É considerado o maior órgão do corpo humano. Compreende, aproximadamente, 5 % do seu peso corporal, com superfície de 2 metros quadrados e peso de 4,2 quilogramas em indivíduo adulto de estatura e peso mediano. Apresenta-se constituída de três camadas: a epiderme, formada por epitélio pavimentoso estratificado; a derme, por tecido conjuntivo denso e a hipoderme, rica em tecido conjuntivo adiposo (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999; PRISTA et al., 1992b; VIGLIOGLIA & RUBIN, 1991).

Figura 1 – Representação da estrutura da pele (NATURA, 2002)

Na epiderme, encontram-se quatro tipos de células diferenciadas estrutural e funcionalmente. São elas, as células epiteliais ou queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999; PRISTA et al., 1992b).

Os queratinócitos são as células epidérmicas mais numerosas e distribuem-se, da profundidade para a periferia, em seis sub-camadas: basal ou germinativa, espinhosa ou filamentosa de Malpighi, granulosa, clara ou lúcida, córnea e descamante (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999; PRISTA et al., 1992b).

A *camada basal* é formada por uma fileira de células cilíndricas dispostas sobre nítida lâmina basal que separa a epiderme da derme. Por reprodução continuada origina as camadas epidérmicas restantes (células espinhosas e granulosas), mediante processo de queratinização normal que culmina na camada córnea.

Na *camada espinhosa*, as células começam a achatarem-se e tomam formas poliédricas, unidas entre si por organóides denominados desmossomas.

A *camada granulosa* é constituída por células losangulares contendo grãos de queratoialina e de pequenos grãos laminares, os queratinossomos.

A *camada clara*, formada por células achatadas com núcleos pouco aparentes ou mesmo invisíveis, é encontrada somente nas regiões onde a camada córnea é espessa, tais como palma das mãos e planta dos pés.

A *camada córnea*, formada por células mortas, anucleadas, constituídas em sua maior parte por uma proteína fibrosa (queratina), exerce ação protetora, sendo barreira de permeabilidade que impede a entrada de microrganismos e agentes tóxicos, apresenta propriedade de retenção de água e eletrólitos. As camadas mais superficiais do extrato córneo apresentam-se em processo de descamação contínua, sendo também classificada como camada descamante (BENY, 2000; HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; PRISTA et al., 1992b).

Os melanócitos, inseridos na *camada basal germinativa*, são células de tamanho grande com prolongamentos citoplásmicos chamados dendritos e contendo vesículas, os melanossomos, responsáveis pela síntese de melanina (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

As células de Langerhans são células móveis que deslocam-se entre a derme e a epiderme. Pertencem à família dos macrófagos, intervindo como mediadores na imunidade celular (BENY, 2000; HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

As células de Merkel, localizadas entre as células epidérmicas basais, são células epiteliais modificadas que receberam uma extremidade nervosa sensitiva (PRISTA et al., 1992b).

A derme é um tecido de sustentação, compressível, extensível e elástica que atua como “almofada” do corpo frente às lesões mecânicas, protegendo diretamente as redes vasculares e as fibras nervosas. Proporciona nutrientes à epiderme e aos

apêndices cutâneos. É formada por tecido conjuntivo denso, vasos e nervos (PRISTA et al., 1992b; WILKINSON & MOORE, 1990).

As células que compõem este tecido podem ser residentes (fibroblastos, histiócitos, macrófagos e mastócitos) e migratórias (leucócitos e plasmócitos). Há, também, elementos extracelulares constituídos por substância intersticial e fibras (PRISTA et al., 1992b).

No tecido conjuntivo existem fibras de espécie variada. Entretanto, as mais importantes são as de colágeno, proteína mais abundante nos vertebrados superiores e responsável pelo tônus da pele; e as fibras elásticas, contendo a elastina como principal constituinte (PRISTA et al., 1992b).

A hipoderme é um tecido subcutâneo que une a derme aos órgãos profundos. É formada por tecido conjuntivo adiposo de espessura muito variável, conforme sua localização. Pode servir como reserva de gorduras ou conferir proteção contra traumatismos e variações térmicas (BENY, 2000; HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

Na pele, observam-se, ainda, várias estruturas anexas, que são as glândulas sebáceas, sudoríparas (écrinas e apócrinas), folículos pilosos e unhas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; PRISTA et al., 1992b; WILKINSON & MOORE, 1990).

A pele apresenta múltiplas funções, entre as quais, graças à camada córnea que reveste a epiderme, e de proteger o órgão contra a perda de água por evaporação (dessecação) e contra o atrito. Além disso, através das terminações nervosas, recebe estímulos do ambiente e por meio dos seus vasos, glândulas e tecido adiposo, colabora na termorregulação do corpo. Funciona como barreira antimicrobiana, química e contra as radiações. Suas glândulas sudoríparas participam na excreção de várias substâncias misturadas com a água (suor) (BARATA, 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; PRISTA et al., 1992b; WILKINSON & MOORE, 1990).

2.2 - ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico, também conhecido por vitamina C, tem a origem do seu nome derivada de ascorbútico, do latim *scorbutus* (escorbuto), síndrome causada pela sua deficiência (COLVEN & PINNELL, 1996). Esta doença é caracterizada pela

degeneração do colágeno e da substância basal intercelular, resultando em distúrbios no crescimento dos ossos, sangramento das gengivas e de outras partes do corpo, perda dos dentes, fragilidade capilar com conseqüente hemorragia cutânea e outras anormalidades (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

A vitamina C não pode ser sintetizada pelo homem pois falta-lhe a enzima L-gulonolactona-oxidase, sendo, portanto, necessária sua reposição através da dieta alimentar. As fontes principais são as frutas cítricas e vegetais de cor verde-escura (JACOB, 1982; DIAS & PERRY, 1994; KARLSON et al., 1982; COLVEN & PINNELL, 1996). A absorção intestinal é da ordem de 80-90 % a partir de dieta normal e ocorre ativamente por sistema dependente do sódio (COLVEN & PINNELL, 1996; PINNELL, 1995). A vitamina C é necessária em quantidades relativamente elevadas, já que é armazenada no organismo apenas em baixas quantidades e em doses maiores é excretada pela urina (KARLSON et al., 1982). Algumas células, como os leucócitos mononucleares, acumulam aproximadamente 4nM, enquanto que a pele contém concentrações mais modestas ($\approx 0,5\text{nM}$) (PINNELL, 1995).

A ação biológica mais importante do ácido ascórbico é na manutenção do potencial de oxido-redução do organismo. Além de seu papel antioxidante, como inativador de radicais livres, o ácido ascórbico age como um cofator enzimático (COLVEN & PINNELL, 1996). Participa de reações de hidroxilação (síntese do colágeno, catecolaminas, carnitina, tirosina e reações dependentes do citocromo P₄₅₀); inibe a formação de nitrosaminas e intervém no metabolismo do ferro, da histamina e em reações imunológicas (TOKGOZ, 1996).

2.2.1 - Características físico-químicas

Quimicamente o ácido ascórbico é uma α -cetolactona (COLVEN, 1996). Apresenta-se como pó cristalino, branco ou ligeiramente amarelo, inodoro e de sabor ácido agradável (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

Quanto à solubilidade, 1,0g de ácido ascórbico dissolve-se em 3,5mL de água e em cerca de 30,0mL de álcool. É solúvel em acetona e insolúvel em éter, clorofórmio, éter de petróleo e benzeno (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

Sua fórmula molecular é C₆H₈O₆. Apresenta estrutura conforme mostra a **Figura 2** com peso molecular de 176,0g. A absorvidade máxima ocorre em 245nm. (PELLETIER, 1985; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido ascórbico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

2.2.2 – Estabilidade do ácido ascórbico

O ácido ascórbico é razoavelmente estável se protegido da umidade ou quando presente em meio ácido, mas é sensível ao aquecimento e luminosidade. Em solução aquosa, é decomposto pelo oxigênio do ar e por outros agentes oxidantes, particularmente na presença de álcalis e de íons de metais pesados, tais como cobre e ferro, originando o ácido desidroascórbico e, posteriormente, o ácido dicetogulônico. Esta última oxidação é irreversível e neste ponto sua atividade fica comprometida, podendo originar, como produto final da degradação, o ácido oxálico (LOWIK et al., 1990; DE-RITTER, 1982; RUBIN et al., 1976; MACEK, 1960).

Figura 3 – Reação de decomposição da vitamina C por oxidação (OLIVEIRA & SCARPA, 2002).

Produtos contendo quantidade significativa de ácido ascórbico (maior que 3 %) escurecem com o tempo, devido à liberação de dióxido de carbono formado pela oxidação desta vitamina (OWEN, 1999, THORMAHLEN, 2000).

Para obter preparações cosméticas contendo ácido ascórbico estável, vários fatores devem ser considerados, como: exclusão do ar, ajuste do valor do pH, proteção do material de acondicionamento da luz e uso de substâncias antioxidantes (ASKER et al., 1985)

Dentre os antioxidantes citados pela literatura, o metabissulfito de sódio é dos mais utilizados em formulações cosméticas contendo ácido ascórbico, já que sua aplicação é recomendada, principalmente, em preparações ácidas (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 1994).

A glutatona reduzida, tripeptídeo formado por glicina, cisteína e ácido glutâmico, devido grupamento sulfidril livre, pode atuar como agente redutor dessa vitamina. Estudos anteriores constataram que este aminoácido diminuiu a degradação do ácido ascórbico em soluções aquosas e em amostras de sangue (TOUITOU et al., 1996; LOWIK et al., 1990; KARG et al., 1987).

Estudos anteriores investigaram o aumento da estabilidade do ácido ascórbico em solução através de agentes complexantes de metais pesados, tais como o ácido N-hidroxietilenodiaminotriacético (HEDTA) (KASSEM et al., 1971). Entretanto, este efeito depende da concentração ótima do agente quelante e da quantidade de íons de metais pesados presentes em solução, verificado experimentalmente para cada formulação (DE-RITTER, 1982).

A vitamina C pode ter sua estabilidade aumentada quando utilizada em formulações cosméticas contendo tensoativos não-iônicos (ROCHA FILHO, 1992; BLAUG & HAJRATWALA, 1974) ou veiculada em emulsões múltiplas do tipo água/óleo/água (GALLARATE et al., 1999) e em meios ácidos (MOURA et al., 1994, TOUITOU et al., 1996).

Avaliando-se a vitamina C em diferentes veículos contendo alta concentração de polióis (glicerina, propilenoglicol e sorbitol) ou cloreto de sódio, foi verificada diminuição de sua oxidação quando comparada ao controle (solução aquosa). O aumento da estabilidade nestes veículos geralmente é associado com a menor concentração de oxigênio dissolvido nos mesmos (MACEK, 1960).

Devido aos problemas de estabilidade química do ácido ascórbico, pesquisadores desenvolveram derivados como o fosfato de ascorbil magnésio ou sódio, cujas enzimas da pele desdobram suas moléculas em ácido ascórbico livre. Estes derivados são mais estáveis em soluções aquosas, porém apresentam menor capacidade de penetração cutânea quando comparadas ao ácido ascórbico utilizado na forma livre (SILVA et al., 1996).

2.2.3 - Métodos analíticos para o doseamento do ácido ascórbico

Uma variedade de procedimentos analíticos tem sido publicada desde a descoberta do ácido ascórbico, visto que produtos alimentícios, amostras biológicas e farmacêuticas requerem diferentes processos de extração e também porque novas técnicas analíticas permitem a determinação mais específica da vitamina (MOSER & BENDICH, 1991).

Para a análise do ácido ascórbico e seus produtos compostos de degradação, ácido desidroascórbico e ácido dicetogulônico, podem ser utilizados vários métodos analíticos, tais como: espectrofotométricos, eletroquímicos, enzimáticos e cromatográficos (PACHLA et al., 1985).

Um dos métodos químicos descrito na literatura para o doseamento do ácido ascórbico é baseado no processo oxidativo com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFIF). Ocorre a redução deste corante com o ácido ascórbico em solução ácida (JAFFE, 1984; BALL, 1994).

Métodos espectrofotométricos na região do UV/Visível foram desenvolvidos para a determinação do ácido ascórbico em produtos farmacêuticos e alimentícios. Dentre estes, destaca-se o método que envolve a oxidação do ácido ascórbico para ácido desidroascórbico e subsequente reação com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNFH) para formar a osazona do ácido 2,3-dioxo-l-glucônico (MOSER & BENDICH, 1991).

Atualmente, métodos analíticos envolvendo a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) estão sendo usados para o doseamento do ácido ascórbico e seus produtos de biotransformação em fluidos biológicos. São rápidos e convenientes, uma vez que as substâncias são separadas quantitativamente sem prévia derivatização.

Métodos altamente sensíveis e seletivos têm sido propostos para a determinação do ácido ascórbico e ácido desidroascórbico em bebidas, frutas e

fluidos biológicos por cromatografia a líquido com detecção no ultravioleta (300 ou 254nm) ou eletroquímica (PELLETIER, 1985). O ácido ascórbico, desidroascórbico e dicetogulônico podem ser separados, não somente de soluções puras, como também em suco de laranja e outros extratos de plantas corrigindo o pH para aproximadamente 3,5 (ARYA et al., 2000).

Pesquisadores determinaram o ácido ascórbico e ácido desidroascórbico monitorando absorbância de 254nm e 210nm para análise de alimentos, amostras biológicas e preparações farmacêuticas (ARYA et al., 2000; PELLETIER, 1985).

Para a determinação da vitamina C em urina, frutas e vegetais por CLAE são utilizadas normalmente colunas de ligação normal (não-polar) com grupo alquila ligado quimicamente a um suporte de sílica e empregam-se fases móveis ácidas. A detecção é, geralmente, feita através da medição da absorbância a 254nm ou 265nm, mas também por monitoramento eletroquímico (ARYA et al., 2000; PELLETIER, 1985).

WAGNER et al. (1979) usaram 0,8 % de ácido metafosfórico como fase móvel para determinação do ácido ascórbico na urina e não observaram interferência do ácido úrico. Determinações de ácido ascórbico em vegetais e frutas também foram obtidas utilizando ácido metafosfórico como fase móvel (ARYA et al., 2000).

2.2.3.1 - Padrão interno

Em avaliações cromatográficas de matrizes (sangue, urina ou formulações cosméticas) é recomendável a adição de um padrão interno com concentração conhecida na amostra a ser analisada. O resultado pode ser obtido relacionando-se as duas áreas obtidas. Este método é menos sensível a erros de injeção e variações instrumentais, sendo o mais adequado para análise quantitativa, apesar de ser mais trabalhoso (COLLINS et al., 1997).

Idealmente, o padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, possuir concentração e tempo de retenção próximos a esta substância, ser inerte e não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separado dos demais componentes presentes na amostra (COLLINS et al., 1997).

Várias substâncias foram utilizadas como padrão interno na quantificação do ácido ascórbico, tais como: teobromina, paracetamol, ácido p-aminobenzóico,

fenilalanina, ácido 4-hidroxibenzóico e pentanofenona (LARISH, et al., 1993; ESTEVE et al., 1997; CANTOURNET, 1994; TUAN & WYATT, 1987; TOMIS et al., 1984; RUSSEL, 1986).

CHIARI et al. (1993), na determinação de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico em suco de laranja, utilizaram o ácido ftálico como padrão interno.

No experimento de PAPADOYANNIS et al. (1997) a xantina foi utilizada como padrão interno para analisar o ácido ascórbico, o ácido nicotínico, a nicotinamida, o ácido fólico, cianocobalina, retinol, alfa-tocoferol e o acetato de alfa-tocoferol.

IRACHE et al. (1993) utilizaram o alfa-hidroxibutirato de sódio como padrão interno, em comprimento de onda de 210nm, para a análise de ácido ascórbico e antioxidantes sinérgicos (ácido l-tartárico, ácido cítrico, ácido láctico e EDTA) extraídos de alimentos gordurosos, fórmulas cosméticas e farmacêuticas.

FOTSING et al. (1997) usaram como padrão interno o ácido nicotínico para a análise de tiamina, nicotinamida, riboflavina, piridoxina, ácido ascórbico e ácido pantotênico. MARSHALL et al. (1995) também utilizaram o ácido nicotínico como padrão interno para a determinação de ácido ascórbico total em cervejas, vinhos e bebidas com origem frutífera.

2.2.4 - Ácido ascórbico para aplicação tópica

Apesar da associação do uso das vitaminas com a saúde ser conhecida há algum tempo, sua larga utilização em cosméticos é relativamente recente, devido à crença de que essas substâncias não penetravam através da epiderme e também devido ao inadequado conhecimento da atividade metabólica da pele. Com o maior entendimento da anatomia e fisiologia da pele, unhas e cabelos, a aplicação tópica das vitaminas aumentou consideravelmente, sobretudo, depois da constatação de que estas substâncias ao serem ingeridas, nem sempre são transferidas para a pele em quantidades suficientes (IDSON, 1993; RESENDE, 1996).

Na pele, o nível de ácido ascórbico na epiderme é cinco vezes maior do que o encontrado na derme. Depois da exposição aguda à luz ultravioleta, sua quantidade diminui tanto na epiderme quanto na derme e, após exposição por 45 minutos no horário do meio dia, depletam-se 80 % dos estoques de vitamina C da pele. A suplementação externa, por via oral ou aplicação tópica restaura os níveis reduzidos (VELASCO-DE PAOLA et al., 1998; PINNELL, 1995).

2.2.4.1 - Funções na pele

O ácido ascórbico tem sido utilizado em preparações cosméticas principalmente em função de sua atividade como cofator de enzimas na síntese do colágeno, como antioxidante biológico e despigmentante cutâneo, descritas a seguir.

a) Síntese do colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante nos vertebrados superiores, representando 1/3 ou mais das proteínas do corpo. Está presente em 80 % da massa de pele seca e tem a função principal de sustentação (KARLSON et al., 1982; PRISTA et al., 1992b).

O colágeno contém grande quantidade dos aminoácidos glicina (33 %), prolina (13 %) e hidroxiprolina (9 %). Sua estrutura é representada pela hélice tríplice: três cadeias ordenadas em parafusos ascendentes juntam-se por meio de pontes de hidrogênio formando uma molécula em forma de filamento retorcido muito rígido, chamada prócolágeno, que une-se formando a fibrila. A um agrupamento de fibrilas dá-se o nome de fibras e ao conjunto destas denomina-se por feixe (KARLSON et al., 1982; PRISTA et al., 1992b).

O colágeno presente na pele é sintetizado pelos fibroblastos a partir da hidroxilação da prolina em hidroxiprolina, catalisada pela peptidilprolina-hidroxilase e da lisina em hidroxilisina pela enzima peptidilisina-hidroxilase. Estas enzimas necessitam de íons Fe^{2+} e são estimuladas pelo ácido ascórbico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; KARLSON et al., 1982).

FREIBERGER et al. (1980) observaram que o ácido ascórbico estimulou a síntese de colágeno em cultura de fibroblastos de pele humana sem afetar a síntese de outras proteínas.

Em estudos mais recentes, pesquisadores avaliaram cultura de células da pele tratadas com ácido ascórbico tópico e observaram o aumento em $73,1 \pm 24,1$ % na síntese do colágeno quando comparado ao controle (THORMAHLEN, 2000).

b) Potencial antioxidante biológico (antienvelhecimento cutâneo)

Diversas teorias tentam explicar os mecanismos do envelhecimento. A dos radicais livres é a que mais se destaca em função de sua viabilidade e credibilidade (ESTEVE & KRIESTEN, 1990).

Os radicais livres são compostos altamente reativos e instáveis, que contém número ímpar de elétrons na órbita mais externa. Estes elétrons “solitários”, devido às reações químicas de natureza quântica, tendem a emparelhar-se com outros elétrons intervindo em outras reações, principalmente quando há transferência de carga, como ocorre nas oxidações (ESTEVE, 1991).

A pele humana é constantemente exposta aos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROS) tanto por fontes endógenas (enzimas, células, processos patológicos) como por exógenas (poluentes, produtos químicos, ozônio, raios ultravioleta). Os principais exemplos de EROS envolvidas neste processo são os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, hidroxila, óxido nítrico e oxigênio singlete. Entretanto, a pele dispõe de mecanismos de defesa contra a proliferação destas moléculas oxidantes de modo a limitar seus efeitos nocivos, destacando-se como mais importantes, os sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, peroxidase, dentre outras) e antioxidantes de baixo peso molecular (ascorbato, caroteno, tocoferol, glutathione, ubiquinol) (KOHEN, 1999; PODDA et al., 1998). O desequilíbrio entre a produção das EROS e os sistemas de defesa denominam-se estresse oxidativo (MAGALHÃES, 2000).

As espécies reativas de oxigênio têm como principais alvos biológicos os lipídeos, DNA e proteínas que, danificados, interferem nas funções normais das células e podem induzir a estados patológicos, como inflamação e câncer, e a processos de envelhecimento cutâneo (MAGALHÃES, 2000; KOHEN, 1999).

Em pH fisiológico, o ácido ascórbico está presente, principalmente, como ânion ascorbato (FUCHS, 1998). Devido seu alto potencial redutor age como um eficiente inativador de radicais ânion superóxido, hidroxil, oxigênio singlete e outros. Sua oxidação resulta na formação do desidroascorbato via radical ascorbil, que pode ser reciclado na presença de tióis (glutathione, lipoato) presentes na pele ou decompõe-se irreversivelmente em ácido dicetogulônico. Embora não seja capaz de inativar radicais lipofílicos diretamente, em presença da vitamina E (α -tocoferol)

reduz sinergicamente os mesmos, quando reage com o radical tocoferoxil através da doação de elétron e regenera o ativo α -tocoferol (**Figura 4**) (THIELE et al., 2000).

Figura 4 – Ativação da cadeia antioxidante pelo estresse oxidativo ambiental: O₂^{-•}, radical ânion superóxido; AGPI, ácido graxo polinsaturado; ROH•/RO•, radicais (per)oxilipídicos; ROOH/ROH, hidro(per)oxilipídicos; NAD(P)H/ NAD(P)⁺+H⁺, sistema universal de oxi-redução (THIELE et al. 2000).

Pesquisas realizadas com pele de cobaias (DARR et al., 1992) e humana (COLVEN & PINNELL, 1996; KELLER & FENSKE, 1998) demonstraram que vitamina C tópica a 10 % reduziu o eritema induzido por radiações ultravioleta A e B, quando comparado ao controle, embora não se possa dizer que tenha atuado diretamente como fotoprotetor absorvendo estas radiações, mas sim por seu efeito neutralizante de radicais livres (TRAIKOVICH, 1999).

Apesar do ascorbato ter sido reportado por suas propriedades pró-oxidantes *in vitro*, uma vez que pode se oxidar em presença de íons metálicos de transição tais

como cobre e ferro e produzir radical hidroxila, este fato não foi considerado relevante *in vivo* (THIELE et al., 2000; FUCHS, 1998). Estudos com ratos mostraram que, em presença de quantidades suficientes de vitamina E, o efeito pró-oxidante do ácido ascórbico é modificado por uma ação antioxidante (KELLER & FENSKE, 1998).

c) Despigmentante cutâneo

Além do constante interesse pelo rejuvenescimento cutâneo, a uniformidade de cor da pele é outro importante aspecto considerado como condição para sua beleza.

A melanina é o principal pigmento que dá coloração à pele. É produzida pelos melanócitos e tem a função principal de fotoproteção, filtrando os raios UV. Sua síntese química processa-se a partir de aminoácido natural, a tirosina, que é oxidada por uma enzima específica, a tirosinase com produção de diidroxifenilalanina (DOPA). A transformação deste intermediário em DOPAquinona é ainda catalizada pela tirosinase que, em presença de íons de cobre, transforma-se em melanina (eumelanina ou feomelanina) (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999; CHARLET, 1996).

Figura 5 – Esquema da síntese química das melaninas (HERNANDEZ & MARCIER-FRESNEL, 1999)

Vários fatores desencadeiam a hiperpigmentação da pele. Na maioria das vezes, as manchas castanhas e escuras são ocasionadas pela excessiva exposição solar, resultado de efeito cumulativo que tem início na infância e que aparecem, principalmente, em regiões do corpo mais expostas ao sol, como braços, rosto e colo. As manchas senis, provocadas também pela pigmentação excessiva, resultam de disfunção na produção de melanina. Muito freqüente também são os cloasmas ou melasmas, um tipo de mancha que se localiza no rosto e que aparece

principalmente em mulheres grávidas ou que fazem uso de pílulas anticoncepcionais (MAIA CAMPOS et al., 1999).

O ácido ascórbico é um dos mais antigos despigmentantes naturais utilizados. Frutas cítricas ricas em vitamina C desde há muito tempo foram utilizadas no clareamento da pele e dos cabelos (PEREIRA, 1993). Sua atividade despigmentante ocorre devido a elevada ação redutora, que interfere na síntese de melanina, realizada através da redução química da DOPAquinona à DOPA (TRENTMANN et al., 1998; TAGAWA et al., 1994).

Avaliando *in vivo* o efeito inibitório do fosfato de ascorbil magnésio tópico a 10 % na melanogênese, pesquisadores observaram que, após a aplicação deste componente ativo em áreas pigmentadas da face de 34 voluntários, duas vezes ao dia durante 3 meses, houve clareamento cutâneo em 25 indivíduos. Em outro estudo com derivados do ácido ascórbico foi observado a inibição de 75 % da tirosinase em testes *in vitro* (FOX, 1994).

2.2.4.2 - Penetração cutânea

Para que a vitamina C, aplicada topicamente na pele, torne-se eficaz é necessário que ocorra sua penetração através da camada córnea (parte menos permeável da pele) ou pelos apêndices cutâneos para as camadas mais profundas da epiderme e chegue até a derme (GRECO, 2000; PRISTA et al., 1992b; BARATA, 1991).

A pele foi considerada anteriormente como uma barreira impermeável. Entretanto, já é reconhecida sua permeabilidade relativa tanto para substâncias hidro como lipossolúveis. O processo de penetração realiza-se essencialmente da superfície até a derme, por difusão através das membranas celulares e dos espaços intercelulares (PRISTA et al., 1992b).

A penetração cutânea de princípios ativos é influenciada por diversos fatores tais como biológicos ou fisiológicos (idade, fluxo sangüíneo, hidratação, espessura, região e pH da pele); físico-químicos (baixo peso molecular ou concentração do princípio ativo, coeficiente de partição óleo/água, pH e temperatura); tipos de veículos utilizados e por fatores traumáticos (lesões ou certas afecções) (BEZERRA & REBELO, 1996, BARATA, 1991, PRISTA et al., 1992b).

A vitamina C, aplicada sob a forma de solução aquosa na pele (não ionizada), pode penetrar facilmente na barreira cutânea e acumular-se nesta última. Para permanecer não ionizada, é preciso que o pH da solução tópica de vitamina C fique abaixo do primeiro pKa de ionização, ou seja 4,2. As soluções de vitamina C com pH 3,5 ou inferior, são geralmente não ionizadas. Nessas circunstâncias, até 15 % da solução aplicada topicamente, consegue penetrar na pele em 48 horas e após atravessar as primeiras camadas da pele, ocorre sua estabilização, não podendo ser removida por lavagem ou fricção. Os níveis de ácido ascórbico tópico acumulado na pele são superiores àqueles conseguidos pela ingestão oral (PINNELL, 1995). A pele recebe aproximadamente 8 % da quantidade de vitamina C que é absorvida pelo trato gastrointestinal (GRECO, 2000).

Estudos anteriormente realizados utilizando-se metodologia *in vitro* com pele de abdômen de cobaia, demonstraram que a absorção percutânea do ácido ascórbico e seu derivado fosfato de ascorbil magnésio veiculado em diferentes formulações (gel, creme-gel e creme) mostraram-se eficazes, sendo o primeiro mais absorvido que o segundo (SILVA et al., 1996).

A liberação do ácido ascórbico tópico na pele é criticamente dependente da característica da formulação, tais como pH e presença de promotores de penetração cutânea (FUCHS, 1998). Em um estudo com pele de cobaias, PINNELL e colaboradores (2001) determinaram o valor máximo de absorção percutânea do ácido ascórbico em uma formulação com concentração máxima de 20 % e valor de pH menor que 3,5 enquanto que seus derivados, incluindo fosfato de ascorbil magnésio e ascorbil palmitato, não propiciaram níveis elevados desta vitamina na pele. SILVA & MAIA CAMPOS (2001) também obtiveram melhor penetração cutânea do ácido ascórbico em formulações com valor de pH mais ácido utilizando pele de cobaias.

Segundo DARR e colaboradores (1982) o ácido ascórbico, aplicado topicamente, é efetivo somente quando formulado em alta concentração e em veículo apropriado.

2.2.4.3. Segurança no uso do ácido ascórbico

Administrado oralmente, o ácido ascórbico é seguro em altas concentrações para uso por períodos prolongados devido, em parte, à sua solubilidade em água. Através de estudos bem controlados, não foram observados efeitos adversos em voluntários que ingeriram diariamente mais de 100 vezes a recomendação americana para esta vitamina (60mg/dia). Foi observado, ainda, que pessoas utilizando quantidades acima dessa recomendação tiveram reduzido risco de câncer, doenças cardiovasculares e catarata. (KELLER & FENSKE, 1998).

O ácido ascórbico é bem tolerado pelo sistema imunológico. Reações alérgicas são extremamente raras quando aplicado topicamente na pele. Porém, uma temporária sensação de formigamento pode ser sentida nas primeiras semanas de uso. Nestes casos, recomenda-se sua utilização em dias alternados (LORAY, 1999).

Segundo parecer Nº 03/01 de 29/06/01 emitido pela Câmara Técnica de Cosméticos (BRASIL, 2001) sobre a utilização de vitamina C em produtos cosméticos, foi recomendado que estes produtos tenham sua eficácia e segurança devidamente comprovadas (irritabilidade dérmica primária e cumulativa), bem como sua estabilidade química dentro de limites compatíveis com as finalidades de uso.

2.3 – ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS

A estabilidade de um cosmético é a capacidade apresentada pelo mesmo, num determinado período de tempo, do início ao final de sua vida útil, no material de acondicionamento adequado, de manter as mesmas propriedades e características que tinha no momento em que finalizou a sua fabricação através de procedimento padronizado. Essas propriedades não são resultados do acaso, mas sim, de projeto e desenvolvimento racional do produto e podem ser classificadas em cinco aspectos diferentes: químicas, físicas, microbiológicas, toxicológicas e de funcionalidade (D'LEON, 2001; KHURY, 2001).

Os testes de estabilidade em produtos cosméticos são dos mais importantes para garantir a qualidade, fornecendo informações confiáveis que auxiliem na determinação do prazo de validade do produto desenvolvido. Necessários, também,

para orientar no desenvolvimento de fórmulas, selecionar matérias-primas e material de acondicionamento (RIBEIRO, 2001; RIBEIRO et al., 1996; WITTERN et al., 1985).

Tendo em vista os medicamentos, os termos prazo de validade, vida de prateleira e tempo de utilização indicam o período no qual 90 % do teor do princípio ativo permanece inalterado por reação química ou física e está disponível para liberação do produto. Estas características podem ser extrapoladas para os produtos cosméticos, adicionadas de outras como, por exemplo, alteração na aparência do produto, o que indica que após este tempo o produto cosmético não deveria ser oferecido para os consumidores (CADWALLANDER, 1989; RIBEIRO et al., 1996).

Os fatores que influenciam a estabilidade do produto são classificados como extrínsecos ou externos à formulação, tais como: tempo, temperatura, luz, umidade, oxigênio e vibração e fatores intrínsecos ou relacionados à própria natureza das formulações, como interações entre os componentes da fórmula e até o material de acondicionamento que podem interferir na estabilidade do produto. As alterações podem ser de aspecto, valor de pH, viscosidade, oxidação e ou redução de substâncias, contaminação microbiológica e outros (RIBEIRO, 2001; VELASCO-DE-PAOLA, 2001; RIBEIRO et al., 1996).

O teste de estabilidade pode ser dividido em três etapas: *teste de estabilidade acelerada*; *teste de estabilidade normal* e *estudo de longa duração*.

O *teste de estabilidade acelerada* é realizado na fase de desenvolvimento do produto, auxiliando a escolha das matérias-primas apropriadas para a formulação. É considerado como teste de curta duração e orientativo. O *teste de estabilidade normal* também é realizado na fase de desenvolvimento, mas aplicado após a definição da fórmula e material de acondicionamento, em geral tem duração de noventa dias e as condições são menos extremas do que aquelas aplicadas no *teste de estabilidade acelerada*: estipula prazo de validade (preditivo). Já o *estudo de longa duração* é utilizado para avaliar o comportamento do produto, durante seu armazenamento, sendo complementar ao *teste de estabilidade normal*, tem duração média de seis meses e vai confirmar o prazo de validade inicialmente estipulado (RIBEIRO, 2001).

Os ensaios mais comumente utilizados para avaliar a estabilidade de um produto são: características organolépticas (aspecto, cor, odor), valor de pH, teor de

água, viscosidade e análise quantitativa dos componentes ativos da formulação (CLARO JUNIOR, 2001).

As condições de armazenamento das amostras, de acordo com a necessidade, disponibilidade e tipos de produtos a serem analisados podem ser: temperatura ambiente; temperatura elevada (45 °C a 50 °C); baixa temperatura (5 °C - geladeira); exposição à luz; temperaturas alternadas (estufa, *freezer* e gradiente de temperatura) (RIBEIRO, 2001; D'LEON, 2001; RIBEIRO et al., 1996; ROPKE et al., 2000; WITTERN, 1985, FERRARI, 1998).

Os testes de estabilidade são procedimentos preditivos baseados em dados obtidos para produtos armazenados sob condições, nas quais acredita-se que acelerem mudanças que possam vir a ocorrer em condições de mercado. Como todo procedimento preditivo, os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso. Essa probabilidade aumenta quando as condições do teste se aproximam das condições de mercado e quando a duração do teste é mais longa (RIBEIRO, 2001; D'LEON, 2001; KHURY, 2001).

2.4 - FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS

A escolha dos parâmetros de avaliação de uma formulação durante o teste de estabilidade dependem da forma cosmética. Dentre estas as pomadas, cremes, sistemas transdérmicos, loções e soluções tópicas são as formas farmacêuticas/cosméticas mais freqüentes, entretanto, outras preparações como pastas, pós, géis, tinturas e aerossóis também são utilizadas (ANSEL et al., 2000).

As pomadas são preparações de consistência semisólida, que aplicam-se sobre a pele ou sobre determinadas mucosas com a finalidade de obter ação local ou facilitar a penetração cutânea dos princípios medicamentosos que contenham. Apresentam aspecto externo homogêneo (HIR, 1995).

Os cremes são produtos com forma consistente e utilizados geralmente para limpeza, hidratação ou nutrição da pele. São obtidos, basicamente, por sistemas emulsionados formados por duas fases distintas, uma de natureza aquosa e outra oleosa, além de nelas figurar sempre um terceiro componente, representado pelo agente emulsificante. Apresentam, ainda, em sua composição conservantes, a fim de evitar ataque de microrganismos e podem ser adicionados de corantes,

essências e princípios ativos ou aditivos especiais. Podem ser classificados, de acordo com a fase interna e externa, em emulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). No primeiro caso a água engloba a partícula de óleo; assim, a fase externa sendo água são caracterizadas por apresentarem efeito evanescente e não engordurante. No segundo caso a fase oleosa engloba a fase aquosa, assim, a fase externa sendo óleo, os cremes apresentam efeito engordurante. No desenvolvimento ou elaboração de cremes, deverão ser consideradas a finalidade a que se destinam e as características da epiderme; facilidade de penetração e não irritantes, isto é, não ocasionar problemas para o indivíduo que as utilizam. Devem manter-se estáveis, não separando os seus componentes e serem compatíveis com os princípios ativos (BEZERRA & REBELLO, 1996; PRISTA et al., 1992a; CARMINI & JORGE, 1989).

Os sistemas transdérmicos de liberação são dispositivos que liberam a substância ativa na superfície da pele, que pode penetrar, permear e até atingir a circulação sistêmica (ANSEL et al., 2000).

As loções são preparações líquidas destinadas à aplicação externa na pele. Podem ser soluções, suspensões ou emulsões. A maioria das loções contém substâncias reduzidas a pós finos insolúveis no meio de dispersão e mantidas em suspensão com agentes suspensores. Outras possuem como fase dispersa substâncias líquidas imiscíveis no veículo e em geral são dispersadas por emulsificantes ou outros estabilizantes adequados (ANSEL et al., 2000).

As soluções são preparações líquidas que contêm uma ou mais substâncias químicas dissolvidas num solvente adequado ou numa mistura de solventes miscíveis. Aquelas de uso tópico geralmente são utilizadas como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios e vasodilatadores, entre outros (ANSEL et al., 2000).

As pastas diferem das pomadas principalmente porque contém maior porcentagem de material sólido e, conseqüentemente, são mais firmes e espessas.

Os géis são sistemas semi-sólidos que consistem na dispersão de moléculas grandes ou pequenas em um veículo líquido que adquire consistência semelhante à gelatina pela ação de uma substância a ele adicionada, como a carboximetilcelulose, gomas, polímero carbovinílico (ANSEL et al., 2000). A viscosidade destas preparações é proporcional à concentração do agente espessante, podendo tornar-

se bastante fluidas, nestes casos são denominadas, pelo mercado cosmético, por “serum.”

As formulações extemporâneas são as que se completam no momento da sua utilização e apresentam prazo de validade reduzido, em torno de 20 dias. Geralmente são utilizadas para substâncias sólidas cuja estabilidade é reduzida quando em contato demorado com a fase dispersante. Portanto, apresentam-se na forma de pó e, no momento do emprego, adiciona-se água ou veículo adequado (muitas vezes contendo tensoativos e conservantes) homogeneizando o sistema (PRISTA et al., 1992a). Na área farmacêutica, e mais recentemente na cosmética, são muito utilizadas. Encontram-se no mercado cosméticos com vitarnina C que utilizam este sistema a fim de aumentar a estabilidade desta substância ativa.

OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

3.1 - Desenvolvimento de formulações cosméticas (creme e gel fluido extemporâneo) contendo ácido ascórbico.

3.2 - Estudo da estabilidade física, físico-química e química das formulações cosméticas desenvolvidas contendo ácido ascórbico.

3.3 - Comparação do efeito antioxidante da glutatona e do metabissulfito de sódio, utilizado nas formulações cosméticas creme e gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico, em relação ao controle (formulação sem antioxidante).

MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Solventes e reagentes

- Acetonitrila, grau de pureza cromatográfico - Mallinckrodt;
- Ácido metafosfórico, grau de pureza analítico (PA) - Carlo Erba;
- Água destilada;
- Água ultra-pura MilliQ®;
- Metanol, grau de pureza cromatográfico - Mallinckrodt.

4.1.2 - Matérias-primas

4.1.2.1 - Grau de pureza analítico

- Ácido ascórbico - Roche, utilizado como padrão de referência secundário sem ulterior purificação, pureza de 99,0 %;
- Ácido nicotínico - Synth, utilizado como padrão de referência secundário (padrão interno) sem ulterior purificação, pureza de 99,0 %.

4.1.2.2 - Grau de pureza farmacêutico:

- Ácido L-ascórbico - Roche;
- Ácido oxálico - Synth;
- Álcool cetoestearílico (30:70) - Galena
- Álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE (Graxion® CS20) - Politechno;
- Butilidroxitoluol (BHT) - Galena;
- Cera auto-emulsionante não-iônica (Polawax®) - Croda;
- Essência (Cosmetic® 017) - Givaudan.
- Estearato de octila (Cetiol® 868) - Cognis;
- Fenoxietanol e parabenos (Phenoben®) - Ionquímica;
- Hidroxietilcelulose (Cellosize® QP 100 MH) - Union Carbide;
- Hidroxipropil guar (Jaguar® C-162) - Rhodia
- Imidazolidiniluréia (Unicid® U13) - Induchem;
- L-glutationa -DEG;
- Manteiga de karité - Chemyunion;

- Metabissulfito de sódio - Synth;
- Metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol (Cosmoguard®) - Cosmotec;
- Metilglicose etoxilada 20 OE (Glucan® E20) - Amerchol;
- Metilparabeno (Nipagin®) - Galena;
- Mistura de aminoácidos, lactato sódico, uréia, alantoína, álcoois polivalentes (Hidroviton®) - Dragoco;
- N-hidroxietililenodiaminotriacético - HEDTA (Dissolvine® 120) Chemyunion;
- Óleo mineral 70 - Ipiranga;
- Polímero carboxivinílico (Carbopol® 940) - Tec Pharma
- Propilparabeno (Nipazol®) - Galena;
- Silicone volátil (DC® 245) - Dow Corning;
- Sorbitol 70,0 % U.S.P. - Synth;

4.1.3 – Equipamentos

- Agitador mecânico Fisatom - modelo 713A;
- Agitador tipo Vortex - Quimis – modelo Q. 220.2;
- Aparelho MilliQ® Plus Millipore para obtenção de água ultra pura;
- Balança analítica Scientech - Quimis - modelo SA-210;
- Balança granatária Ohaus Precision Plus – modelo TP4KD;
- Balança semi-analítica Mettler P120;
- Banho-maria termostatizado - Quimis - modelo Q215-2;
- Banho ultra-sônico Brasonic 52;
- Bomba de vácuo Duo Seal modelo 1397 GE;
- Centrífuga 5412 Eppendorf;
- Centrífuga Donner - modelo CD 100;
- Coluna Phenomenex LiChrospher® 5µm, C₁₈ 250 x 4,60 mm;
- Compressor-aspirador Fanem (degaseificador);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu modelo LC-10AD acoplado ao sistema Class-LC10 Shimadzu, para obtenção dos dados e sistema de comunicação Shimadzu CBM-10A;
- Destilador de água Fabbe - modelo 106;
- Detector ultravioleta-visível Shimadzu - modelo SPD-10A;

- Estufa de cultura Fanem com gradação de temperatura até 45 °C - modelo 002CIB;
- Freezer Consul - Gram Luxo 280;
- Peagômetro / PHmetro Digimed MD 20;
- Pipetas automáticas de 200 e 1000 µL – Gilson;
- Placa aquecedora Fisatom;
- Refrigerador Boch – Ecoplus – Termostat;
- Sistema de filtração Sartorius;
- Viscosímetro Visco Star-R, agulhas TR8 e TR9 - Fungilab S.A.;

4.1.4 - Outros materiais

- Bisnagas de polietileno branco opaco tipo “picolé”, capacidade de 60 g;
- Frascos de polietileno branco opaco e de boca larga, capacidade de 60 g;
- Frascos de vidro cor âmbar, capacidade de 80mL;
- Membrana de acetato de celulose Millipore® com diâmetro 0,22µm;

4.2 – MÉTODOS

4.2.1 - TESTES PRELIMINARES

4.2.1.1 - Formulações preliminares

a) Creme

Foram preparadas 5 formulações preliminares (creme base) a fim de selecionar a de melhor aspecto sensorial através de critério pessoal (espalhamento adequado na pele e toque sedoso). Posteriormente, aquela escolhida foi submetida aos testes preliminares de estabilidade física (centrifugação e estresse térmico). A composição de cada formulação preliminar está descrita na **Tabela 1**.

Tabela 1- Formulações preliminares (cremes base).

Componente	Proporção (%p/p)				
Creme base	1A	2A	3A	4A	5A
Fase oleosa					
Polawax®	8,0	-	10,0	10,0	10,0
Cetiol® 868	5,0	3,0	3,5	3,0	3,0
Óleo mineral	8,0	-	4,5	2,0	4,0
BHT	0,1	-	0,1	-	-
Nipazol®	-	0,02	-	-	-
Manteiga de karité	-	2,0	-	-	-
Graxion® CS20	-	2,0	-	-	-
Álcool cetoestearílico (30:70)	-	6,0	-	-	-
Fase aquosa					
Glucan® E20	5,0	-	2,5	5,0	3,0
HEDTA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Nipagin®	-	0,15	-	-	-
Água destilada	q.s.p 100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Outros componentes					
DC® 245	5,0	1,0	5,0	-	-
Hidroviton®	5,0	3,0	5,0	2,5	2,5
Unicid®	0,8	0,15	0,8	0,8	-
Phenoben®	0,3	-	0,3	0,3	-
Cosmoguard®	-	-	-	-	0,15
Essência	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s

Função dos componentes:

Agentes emulsificantes - Polawax®, Graxion® CS20, álcool cetoestearílico (30:70);

Emolientes e hidratantes por oclusão da evaporação de água - Cetiol® 868, óleo mineral, manteiga de karité, Glucan® E20;

Antioxidantes - HEDTA (quelante de metal) e BHT;

Conservantes - Unicid®, Phenoben®, Cosmoguard®, Nipagin®, Nipazol®

Hidratante da pele - Hidroviton®;

Facilitador do espalhamento - DC® 245;

Aromatizante - essência;

Veículo - água destilada.

Aproximadamente 100g de emulsão foram preparadas, inicialmente, através do aquecimento dos componentes das **Fases oleosa e aquosa** a 70–75 °C em recipientes de aço inox, e posterior mistura empregando-se a técnica de inversão de fases, ou seja, a **Fase aquosa** foi vertida sobre a **Fase oleosa** de forma constante e lenta, com auxílio do agitador mecânico. Após preparo das mesmas e seu resfriamento até 35 °C, adicionaram-se os **outros componentes**, homogeneizando-se com auxílio da agitação manual.

Após avaliação sensorial de critério pessoal das formulações iniciais, selecionou-se o creme base **5A** por apresentar toque sedoso e melhor espalhamento na pele. Esta formulação foi submetida ao teste de centrifugação e de estresse térmico. Posteriormente, foram preparados 1200g desta formulação que foi subdividida em duas partes iguais. Após a incorporação de 10,0 % p/p de ácido ascórbico sob agitação manual duas novas formulações foram desenvolvidas com a adição de 1,0 % p/p de glutathione (**G1**) e 0,25 % p/p de metabissulfito de sódio (**M1**). Aproximadamente 30g de cada formulação foi acondicionada em frasco de polietileno branco opaco e de boca larga com capacidade para 60g e foram submetidas ao *Teste de Estabilidade Acelerada*.

b) Gel fluido extemporâneo

Foram preparadas 3 formulações preliminares (gel fluido extemporâneo base) a fim de selecionar a de melhor característica sensorial de critério pessoal (toque sedoso e adequado espalhamento na pele). Posteriormente, esta formulação, após adição do ácido ascórbico e antioxidantes nas mesmas proporções descritas para o creme no item anterior, foi submetida ao *Teste de Estabilidade Acelerada*. A composição de cada gel fluido extemporâneo base é descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Formulações preliminares (gel fluido extemporâneo base).

Gel fluido extemporâneo base					
Componente	Proporção (%p/p)				
	1B	2B	3B	4B	5B
Jaguar® C 162	0,5	1,0	-	-	-
Cellosize®	-	-	0,5	1,0	0,7
Nipagin®	0,2	0,2	-	0,2	0,2
HEDTA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sorbitol	5,0	4,0	4,0	5,0	5,0
Água destilada q.s.p	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Hidroviton®	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Unicid®	-	-	-	0,8	0,8
Cosmoguard®	0,15	0,15	0,15	-	-
Essência	q.s	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

Função dos componentes:

Agente gelificante e de viscosidade - Cellosize® e Jaguar® C 162

Agente umectante - sorbitol

Hidratante da pele - Hidroviton®

Antioxidante (quelante de metal) - HEDTA

Conservantes - Unicid®, Cosmoguard®, Nipagin®

Aromatizante - essência

Veículo - água destilada

As formulações foram preparadas inicialmente pela mistura e aquecimento do Cellosize® ou Jaguar a 70 °C em q.s. de água destilada. Após homogeneização da preparação, foram adicionados o Nipagin® previamente solubilizado em água destilada aquecida (**1B**, **2B**, **4B** e **5B**), HEDTA e sorbitol. Após resfriamento até 35 °C foram incorporados o Hidroviton®, Cosmoguard® (**1B**, **2B** e **3B**), Unicid® (**4B** e **5B**) e a essência. Por último, foi completado o volume com quantidade suficiente de água destilada para 100,0 % p/p.

Após alguns testes experimentais, foi adicionado ácido ascórbico aos géis fluidos base e a formulação **5B** foi selecionada por apresentar melhores características para uma preparação extemporânea, ou seja, viscosidade adequada para incorporação do componente ativo no momento do uso. A seguir, foram preparados 1200g desta suspensão. Após incorporação de 10,0 % p/p de ácido ascórbico, duas novas formulações foram desenvolvidas com a adição de 1,0 % p/p de glutatona (**G2**) e 0,25 % p/p de metabissulfito de sódio (**M2**). Aproximadamente 30g de cada formulação foram acondicionadas em frascos de vidro de cor âmbar com capacidade para 80mL e, posteriormente submetidas ao *Teste de Estabilidade Acelerada*.

4.2.1.2 - Testes preliminares de estabilidade física para o creme base

4.2.1.2.1 – Centrifugação

Dez gramas da formulação creme base **5A** foram submetidas a ciclos de rotação de 1000, 2500 e 3500rpm em centrífuga, durante quinze minutos para cada velocidade (FERRARI, 1998).

4.2.1.2.2 - Estresse térmico

A formulação creme base **5A**, acondicionada em frasco de polietileno branco opaco e de boca larga com capacidade para 80g, foi colocada em banho-maria no intervalo de temperatura entre 40 a 80 °C. Realizou-se a elevação de 10 em 10 °C, mantendo-se por trinta minutos em cada valor. A avaliação visual foi efetuada ao término da temperatura de 80 °C, após a amostra retornar à temperatura ambiente. (FERRARI, 1998).

4.2.1.3 - Teste de estabilidade acelerada

4.2.1.3.1 - Tipos de amostras

As amostras avaliadas foram creme base e gel fluido extemporâneo base, acrescidas de:

- ácido ascórbico 10,0 % (p/p) e glutatona 1,0 % (p/p), definidas como **G1** (creme) e **G2** (gel fluido extemporâneo);
- ácido ascórbico 10,0 % (p/p) e metabissulfito de sódio 0,25 % (p/p), definidas como **M1** (creme) e **M2** (gel fluido extemporâneo).

4.2.1.3.2 - Avaliação inicial

Após 24 horas do preparo, uma amostra de cada formulação (**G1, M1, G2 e M2**), antes de ser submetida às condições do teste descritas no item **4.2.1.3.3**, foi avaliada inicialmente quanto às características organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente, conforme descrito no item **4.2.1.3.4**.

4.2.1.3.3- Condições do teste de estabilidade acelerada

Após 24 horas do preparo, as formulações foram submetidas às seguintes condições e períodos de avaliação, de acordo com adaptações da literatura (RIBEIRO et al., 1996; FERRARI, 1998).

a) Temperatura ambiente

As formulações (creme e gel fluido extemporâneo) foram mantidas à temperatura ambiente (22 ± 2 °C), durante 14 dias, sendo avaliadas no 7º e 14º dias.

b) Estufa a 45°C

As formulações (creme e gel fluido extemporâneo) foram submetidas à temperatura de 45 °C em estufa, durante 7 dias, sendo avaliadas no 1º, 3º e 7º dias.

c) Ciclos gela e degela

As formulações (creme e gel fluido extemporâneo) foram submetidas a períodos de congelamento (-10 °C) por 24 horas em *freezer*, seguido de descongelamento em estufa (45 °C) por 24 horas, completando-se dessa forma um ciclo. Foram realizados 6 ciclos, sendo as amostras avaliadas no 3º (6º dia) e 6º ciclos (12º dia) (FERRARI, 1998).

d) Freezer

As formulações (creme e gel fluido extemporâneo) foram mantidas à temperatura de -10 °C em *freezer*, durante 7 dias e avaliadas no 7º dia.

e) Luz solar indireta

As formulações (creme e gel fluido extemporâneo) foram expostas à luz solar indireta (sem incidência do sol, mas com luminosidade) à temperatura ambiente (22 ± 2 °C), durante 12 dias e avaliadas no 3º, 7º e 12º dias.

4.2.1.3.4 - Variáveis analisadas**a) Características organolépticas**

As características organolépticas das amostras foram observadas, com o auxílio de placas de Petri, nas diversas condições quanto ao aspecto, separação de fases da emulsão, presença de grumos e precipitados; odor e cor. As amostras de referência (creme e gel fluido extemporâneo) foram mantidas à 5 °C (geladeira).

b) Valor de pH

As amostras foram diluídas em água recém destilada na proporção de 1:10 p/v e submetidas à leitura em PHmetro à temperatura de 25 °C (DAVIS, 1977).

c) Viscosidade aparente

Aproximadamente 15g de cada amostra foram analisadas em viscosímetro, à temperatura de 25 °C, utilizando-se para o creme e gel fluido extemporâneo agulhas TR9 (velocidade de 12rpm) e TR8 (velocidade de 30rpm), respectivamente. As leituras foram registradas após 2 minutos de estabilização do sistema para cada amostra.

4.2.2 - TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL

Após a avaliação das formulações anteriormente citadas (creme e gel fluido extemporâneo) pelo teste de estabilidade acelerada, foram preparados 3000g de creme base e 3000mL de gel fluido extemporâneo base. Aproximadamente 40g de cada formulação foram distribuídas em bisnagas de polietileno tipo “picolé” com capacidade para 60g (creme), ou em frascos de vidro cor âmbar com capacidade para 80g (gel fluido extemporâneo) e submetidas ao teste de estabilidade normal, que foi realizado em duplicata.

4.2.2.1 - Tipos de amostras

As amostras avaliadas foram creme base e gel fluido extemporâneo base, acrescidas de:

- ácido ascórbico 10,0 % (p/p) e glutatona 1,0 % (p/p), definidas como **G1** (creme) e **G2** (gel fluido extemporâneo);
- ácido ascórbico 10,0 % (p/p) e metabissulfito de sódio 0,25 % (p/p), definidas como **M1** (creme) e **M2** (gel fluido extemporâneo);
- controle: ácido ascórbico 10,0 % (p/p) (sem antioxidante), definidas como **B1** (creme) e **B2** (gel fluido extemporâneo).

4.2.2.2 - Avaliação inicial

Após 24 horas do preparo, amostra de cada formulação (**G1**, **G2**, **M1**, **M2**, **B1** e **B2**) foi avaliada inicialmente, conforme variáveis descritas no item 4.2.1.3.4 e posteriormente quantificadas quanto ao teor de ácido ascórbico, utilizando-se a cromatografia a líquido de alta eficiência, conforme descrito no item 4.2.2.5, antes de serem submetidas às condições do teste descritas no item 4.2.2.3.

4.2.2.3 - Condições do teste de estabilidade normal

Exposição das amostras às seguintes condições e períodos de avaliação, de acordo com adaptações da literatura (RIBEIRO et al., 1996):

- Luz solar indireta (sem incidência do sol, mas com luminosidade) a 22 °C;
- Estufa a 40 °C;
- Geladeira a 5 °C.

As amostras foram analisadas, após 24 horas de repouso das formulações, no 3°; 7°; 15°; 30°; 60° e 90° dias para o creme e 3°; 7°; 14°; 26° dias para o gel fluido extemporâneo.

4.2.2.4 - Variáveis analisadas

As formulações foram avaliadas quanto às características organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente citados no item 4.2.1.3.4, e quantificadas quanto ao teor de ácido ascórbico através de cromatografia a líquido de alta eficiência, conforme descrito no item 4.2.2.5.

4.2.2.5 – Avaliação do ácido ascórbico por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

4.2.2.5.1 - Fase móvel

A fase móvel escolhida foi constituída por mistura de solução de ácido metafosfórico 0,2 % em água, metanol e acetonitrila (90:8:2).

Após o preparo desta solução, determinou-se em PHmetro o valor de pH ($\cong$ 2,8). A fase móvel foi submetida a processo de filtração acoplado com membrana de acetato de celulose, com diâmetro de 0,22 μ m. Para degaseificação utilizou-se compressor-aspirador. Posteriormente, submeteu-se ao banho ultra-sônico.

4.2.2.5.2 – Condições instrumentais

As análises foram realizadas utilizando injeção de 20 μ L da amostra sob eluição e vazão de 1,0mL/min em fase móvel através de coluna Phenomenex LiChrospher® 5 μ m C₁₈ 250 x 4,6mm, temperatura ambiente (22°C $\pm$ 2°C) utilizando-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência. A detecção foi feita em comprimento de onda de 254nm através do detector ultravioleta Shimazu e o registro dos resultados e integração dos picos foi pelo Sistema Class-LC10 Shimazu.

4.2.2.5.3 - Validação da metodologia analítica

I - Especificidade

Para determinar a especificidade do método, ou seja, a capacidade de separação e identificação do ácido ascórbico e ácido nicotínico (PI), entre si e em relação aos possíveis interferentes da formulação cosmética, foram realizados os seguintes ensaios:

a) formulação controle (creme e gel fluido extemporâneo base sem ácido ascórbico e sem antioxidantes), para verificar a interferência de possíveis contaminantes;

Procedimento:

Foram pesados exatamente cerca de 250,0mg das formulações (creme e gel fluido extemporâneo base sem ácido ascórbico e sem antioxidantes) e transferidos para balões volumétricos de 50mL. Procedeu-se à homogeneização com fase móvel e completou-se o volume com a mesma. Centrifugaram-se as fases das preparações a 3000rpm durante 5 minutos e desprezaram-se os sobrenadantes. Uma alíquota de 1,0mL de cada amostra foi transferida para balões de 50mL, completando-se o volume com fase móvel e obtendo-se concentração final de 10,0µg/mL.

b) análises individuais de amostras ácido ascórbico, ácido nicotínico, antioxidantes (glutationa e metabissulfito de sódio) e do ácido oxálico (possível produto de degradação do ácido ascórbico);

Procedimento:

Foram pesados cerca de 25,0mg de cada amostra (glutathione, metabissulfito de sódio, ácido oxálico, ácido ascórbico e ácido nicotínico) e transferidos separadamente para balões volumétricos de 50mL dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel. Uma alíquota de 1,0mL de cada amostra foi transferida para balões de 50mL, completando-se o volume com fase móvel e obtendo-se concentração final de 10,0µg/mL.

c) análise da formulação (creme base contendo ácido ascórbico e glutathione) adicionado de ácido nicotínico (PI), submetida ao processo de extração.

Procedimento:

Foram pesados exatamente cerca de 250,0mg da formulação (creme), equivalentes a 25,0mg de ácido ascórbico e transferidos para balão volumétrico de 50mL. Adicionaram-se 25,0mg de ácido nicotínico, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel. Separaram-se as fases aquosa/oleosa em centrífuga a 3000rpm durante 5 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Uma alíquota de 1,0mL foi transferida para um balão de 50mL, completando-se o volume com fase móvel e obtendo-se uma concentração final de 10,0µg/mL.

II - Linearidade

Para avaliar a linearidade oferecida pelo aparelho utilizado na quantificação do ácido ascórbico foi construída a curva de calibração com concentrações de 1,0; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0µg/mL de ácido ascórbico e 20,0µg/mL de ácido nicotínico (PI).

A curva foi obtida com os resultados das análises realizadas em duplicata, colocando-se no eixo das abcissas as concentrações do padrão de ácido ascórbico e no eixo das ordenadas a relação de áreas obtidas dos picos cromatográficos do ácido ascórbico em relação à área do ácido nicotínico (PI).

Procedimento:

Foram pesados exatamente 25,0mg de ácido ascórbico e 25,0mg de PI que foram transferidos, separadamente, para balões volumétricos de 50mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel e obtendo-se soluções com concentração de 500,0µg/mL de ácido ascórbico e de PI. Utilizando-se pipetas automáticas, alíquotas de 0,1; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2mL da solução de ácido ascórbico foram transferidas para balões volumétricos de 50mL. Em cada balão foi acrescentada alíquota de 2,0mL da solução de PI com 500,0µg/mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel e obtendo-se concentrações de 1,0; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0µg/mL de ácido ascórbico e 20,0µg/mL de ácido nicotínico.

III - Recuperação/Exatidão

A recuperação do método foi calculada por comparação entre as concentrações teóricas de ácido ascórbico adicionadas ao veículo (creme e gel fluido extemporâneo) e aquelas determinadas nas análises cromatográficas após a extração das amostras (em triplicata), empregando-se uma curva de calibração com os pontos de 2,0; 6,0 e 10,0µg/mL do componente ativo.

Procedimento:

Para 3 balões volumétricos de 50,0mL adicionaram-se exatamente 50,0mg de ácido nicotínico e separadamente exatos 50,0; 150,0 e 250,0mg da formulação (creme ou gel fluido extemporâneo) equivalentes a 5,0; 15,0 e 25,0mg de padrão de ácido ascórbico, respectivamente, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel. Separaram-se as fases aquosa/oleosa em centrífuga a 3000rpm durante 5 minutos e desprezaram-se os sobrenadantes. Através de pipeta automática, alíquotas de 500,0µL foram transferidas para balões volumétricos de 25mL, obtendo-

se concentrações respectivas de 2,0; 6,0 e 10,0µg/mL de ácido ascórbico e 20,0µg/mL de ácido nicotínico.

IV- Precisão

Para a determinação do coeficiente de variação intradia do teor de ácido ascórbico nas amostras foram usadas amostras com concentração de 6,0µg/mL do componente ativo, injetadas no cromatógrafo 10 vezes ao dia, por 3 dias distintos.

Para o coeficiente de variação interdia foi injetada no cromatógrafo uma amostra de concentração de 6,0µg/mL de ácido ascórbico uma vez ao dia, durante 6 dias.

Procedimento:

Foram pesados exatamente 15,0mg de ácido ascórbico e 50,0mg de ácido nicotínico e transferidos para balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com fase móvel e obtendo-se solução com concentração de 300,0µg/mL de ácido ascórbico e 1000,0µg/mL de ácido nicotínico. Transferiu-se uma alíquota de 0,5mL desta solução para balão de 25mL, completando-se novamente o volume com fase móvel e obtendo-se solução com concentração final de 6,0µg/mL de ácido ascórbico e 20,0µg/mL de ácido nicotínico.

V - Limite de Detecção

Através desta análise foi determinada a menor concentração de ácido ascórbico, que pode ser diferenciada do ruído de base do sistema utilizado (CLAE). Foram realizadas diluições da solução de ácido ascórbico seriadas e em duplicata, no intervalo de 0,03 a 1,0µg/mL.

Procedimento:

Foram pesados exatamente 25,0mg de ácido ascórbico e transferidos para balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com fase móvel e obtendo-se solução com concentração de 500,0µg/mL de ácido ascórbico. Transferiu-se uma alíquota de 1,0mL para balão volumétrico de 50mL obtendo-se solução com concentração de 10,0µg/mL de ácido ascórbico. Desta solução foram feitas diluições em balões de 25mL, obtendo-se concentrações de 0,03; 0,05; 0,1 e 1,0µg/mL.

4.2.2.5.4 - Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida pela média aritmética de 3 leituras de cinco valores de concentrações: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0µg/mL das soluções de ácido ascórbico padrão de referência secundário, pureza de 99,0 %. Para cada amostra deste foram pesados exatamente 250,0mg da formulação (creme ou gel fluido extemporâneo sem antioxidante e sem ácido ascórbico); 50,0mg de ácido nicotínico (padrão secundário interno, pureza de 99,0 %) e transferidos para balões volumétricos de 50mL contendo soluções de ácido ascórbico nas quantidades de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0mg/mL. O volume foi completado com a fase móvel, constituída de mistura de solução de ácido metafosfórico 0,2 %, metanol e acetonitrila (90:8:2). A formulação foi dissolvida com o auxílio do banho ultra-sônico e agitador. Uma alíquota de 1,0mL de cada suspensão foi centrifugada a 3000rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Transferiu-se, de cada amostra, com auxílio de pipeta automática uma alíquota de 500,0µL para balão volumétrico de 25mL e o volume completado com a mesma fase móvel.

4.2.2.5.5- Determinação da concentração de ácido ascórbico nas formulações creme e gel fluido extemporâneo

Para a determinação da concentração de ácido ascórbico foram pesados exatamente 250,0mg de cada amostra da formulação (creme ou gel fluido extemporâneo), equivalente a 25,0mg do princípio ativo; 100,0mg de ácido nicotínico utilizado como padrão interno (PI) e transferidos para balões volumétricos de 50mL e o volume completado com a fase móvel. A amostra foi dispersada com auxílio do banho ultra-sônico e agitador. Uma alíquota de 1,0mL desta foi centrifugada a 3000rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e uma alíquota de 500,0 µL foi transferida para um balão volumétrico de 50mL e o volume completado com a mesma fase móvel, obtendo-se uma concentração final de 5,0µg/mL de ácido ascórbico e 20,0µg/mL de padrão interno. O resultado obtido foi comparado com a curva de calibração do ácido ascórbico.

4.2.2.6 – Planejamento estatístico

O planejamento estatístico das formulações contendo ácido ascórbico foi desenvolvido de acordo com o arranjo quadrado greco-latino, no qual combinam-se, pela análise estatística, a influência do tempo, temperatura e antioxidantes (BOX et al., 1978). Utilizou-se o programa Statgraphics 6,0 para tratamento matemático e estatístico dos dados experimentais (desenvolvido no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo), apresentados nas **Tabelas 17, 18, 19, 21, 22, 23 e Figuras 28, 29, 36 e 37.**

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1- TESTES PRELIMINARES

5.1.1 - Formulações preliminares

a) Creme

Considerando as formulações apresentadas na **Tabela 1**, aquelas de números **1A**, **2A** e **3A** apresentaram aspecto oleoso, deixando sensação desagradável quando aplicados sobre a pele, enquanto que a formulação **4A** apresentou-se pouco emoliente (toque seco). A formulação **5A** foi considerada mais satisfatória quanto às características sensoriais (toque sedoso e espalhamento adequado na pele), apresentando equilíbrio entre as anteriores.

b) Gel fluido extemporâneo

De acordo com a **Tabela 2**, as formulações **1B** e **3B** apresentaram-se mais fluidas, enquanto que as formulações **2B** e **4B** mostraram-se mais viscosas. Após o teste experimental onde adicionou-se o ácido ascórbico 10,0 % p/p em 50,0g da formulação **5B**, verificou-se que ocorreu uma dispersão satisfatória sob agitação manual e, portanto, esta foi considerada a mais adequada ao uso.

5.1.2 - Testes preliminares de estabilidade física para o creme base

5.1.2.1 - Centrifugação

Após centrifugação da formulação creme base **5A** (**Tabela 1**) não foi observada coalescência ou separação de fases, demonstrando estabilidade física adequada.

5.1.2.2 - Estresse térmico

A formulação creme base **5A** (**Tabela 1**) manteve-se estável, suportando as alterações de temperaturas a que foi submetida no teste de estresse térmico, não apresentando separação de fases.

5.1.3 - Teste de estabilidade acelerada

5.1.3.1 - Avaliação física e físico-química das formulações

Os resultados quanto às características organolépticas, valores de pH e viscosidade aparente das formulações avaliadas inicialmente e após exposição às condições do teste (temperatura ambiente, estufa a 45 °C, ciclos gela e degela, *freezer* e luz solar) estão apresentados nas **Tabela 3 e 4** para o creme (**G1 e M1**) e nas **Tabelas 5 e 6** para o gel fluido extemporâneo (**G2 e M2**).

Tabela 3 - Avaliação física e físico-química do creme base com 10,0 % p/p de ácido ascórbico e 1,0 % p/p de glutatona (formulação **G1**) durante o estudo de estabilidade acelerada.

		Condição de armazenamento									
		T.A.		E			C			F	L.S.
		7°	14°	1°	3°	7°	6°	12°	7°	3°	7°
tempo (dias)	t zero	7°	14°	1°	3°	7°	6°	12°	7°	3°	7°
pH	2,9	2,9	2,9	3,0	3,0	2,9	2,8	2,9	2,9	2,9	2,8
η	17300	18600	18000	17800	19200	18400	19900	18900	17100	18300	19200
aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
cor	N	N	N	N	LA	LA	N	A	N	N	N
odor	N	N	LM	N	LM	IM	LM	IM	N	N	N
											LM

Legenda:

T.A.: Temperatura ambiente (22 °C $\pm$ 2 °C); **E :** Estufa (45 °C); **C:** Ciclos gela e degela; **F:** Freezer (-10 °C); **L.S. :** Luz solar

t zero: início - 24 horas após o preparo

η : viscosidade aparente (cps), velocidade 12rpm e agulha TR9

aspecto: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

cor: N- Normal, sem alteração (branco); LA- Levemente amarelado; A- Amarelo; IA- Intensamente amarelado

odor: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

Os valores de pH e viscosidade aparente foram expressos como média de duplicatas

Tabela 4 – Avaliação física e físico-química do creme base com 10,0 % p/p de ácido ascórbico e 0,25 % p/p de metabissulfito de sódio (formulação **M1**) durante o estudo de estabilidade acelerada.

		Condição de armazenamento										
		T.A.		E			C			F	L.S.	
tempo (dias)	t zero	7°	14°	1°	3°	7°	6°	12°	7°	3°	7°	12°
parâmetros												
pH	2,9	2,9	2,9	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
η	18000	19200	18000	19500	18800	16200	20400	19200	17700	19100	18500	18300
aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
cor	N	N	LA	N	N	A	N	A	N	N	N	N
odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda:

T.A.: Temperatura ambiente (22 °C $\pm$ 2 °C); **E :** Estufa (45 °C); **C:** Ciclos gela e degela; **F:** Freezer (-10 °C); **L.S. :** Luz solar

t zero: início - 24 horas após o preparo

η : viscosidade aparente (cps), velocidade 12rpm e agulha TR9

aspecto: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

cor: N- Normal, sem alteração (branco); LA- Levemente amarelado; A- Amarelo; IA- Intensamente amarelado

odor: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

Os valores de pH e viscosidade aparente foram expressos como média de duplicatas

Tabela 5 – Avaliação física e físico-química da gel fluido extemporâneo base com 10,0 % p/p de ácido ascórbico e 1,0 % p/p de glutatona (G2) durante o estudo de estabilidade acelerada.

		Condição de armazenamento										
		T.A.		E			C		F	L.S.		
tempo (dias)	t zero	7°	14°	1°	3°	7°	6°	12°	7°	3°	7°	12°
parâmetros												
pH η aspecto cor odor	pH	3,0										
	η	390										
	aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda:

T.A.: Temperatura ambiente (22 °C $\pm$ 2 °C); **E** : Estufa (45 °C); **C**: Ciclos gela e degela; **F**: Freezer (-10 °C); **L.S.** : Luz solar

t zero: início - 24 horas após o preparo

η : viscosidade aparente (cps), velocidade 60rpm e agulha TR8

aspecto: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

cor: N- Normal, sem alteração (incolor); LA- Levemente amarelado; A- Amarelo; IA- Intensamente amarelado

odor: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

Os valores de pH e viscosidade aparente foram expressos como média de duplicatas

Tabela 6 - Avaliação física e físico-química do gel fluido extemporâneo base com 10,0 % p/p de ácido ascórbico e 0,25 % p/p de metabissulfito de sódio(**M2**) durante o estudo de estabilidade acelerada.

		Condição de armazenamento										
		T.A.		E			C			F	L.S.	
		7°	14°	1°	3°	7°	6°	12°	7°	3°	7°	12°
tempo (dias)	t zero											
pH	3,1	3,0	3,0	3,1	3,0	3,0	2,9	2,9	3,0	3,0	3,0	3,0
η	400	380	310	390	390	190	380	240	400	390	390	410
aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
cor	N	N	LA	N	N	LA	N	A	N	N	N	N
odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda:

T.A.: Temperatura ambiente (22 °C ± 2 °C); **E** : Estufa (45 °C); **C:** Ciclos gela e degela; **F:** Freezer (-10 °C); **L.S.** : Luz solar

t zero: início - 24 horas após o preparo

η: viscosidade aparente (cps), velocidade 60rpm e agulha TR8

aspecto: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

cor: N- Normal, sem alteração (incolor); LA- Levemente amarelado; A- Amarelo; IA- Intensamente amarelado

odor: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

Os valores de pH e viscosidade aparente foram expressos como média de duplicatas

5.2 – TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL

52

5.2.1 - Avaliação física e físico-química dos cremes

A seguir serão apresentados os resultados quanto às características organolépticas, valores de pH e viscosidade aparente das formulações (cremes) avaliadas inicialmente e após exposição às condições do teste: geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C) durante o estudo de estabilidade normal, conforme as Tabelas 7, 8 e Figuras 6, 7, 8, 9 e 10.

Figura 6 – Características organolépticas (aspecto e cor) do creme contendo ácido ascórbico 10 % p/p - controle (**B1**) após 24 horas do preparo, antes de ser submetido às condições do teste de estabilidade normal.

As formulações **M1** e **G1** apresentaram a mesma característica (aspecto homogêneo e cor branca) da formulação **B1** (**Figura 6**), após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste de estabilidade normal.

Inicialmente as formulações **B1** e **G1** apresentaram odor normal (característico de essência) e a formulação **M1** odor levemente ácido.

Ocorreram alterações de odor (característico de enxofre) para a formulação **G1** nas seguintes condições e tempo de armazenamento: estufa a 40 °C (após 7º dia) e luz solar (após 15º dia). Ainda quanto a estas características organolépticas, as demais formulações (**B1** e **M1**) permaneceram sem alterações.

Figura 7 - Características organolépticas (aspecto e cor) das formulações: **B1** (a, b, c) - creme contendo ácido ascórbico 10 % p/p (controle), **M1** (d, e, f) - creme contendo ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p e **G1** (g, h, i) - creme contendo ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p, submetidas às condições de geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), respectivamente para cada amostra, após **30 dias** do estudo de estabilidade normal.

Figura 8 - Características organolépticas (aspecto e cor) das formulações: **B1** (a, b, c) - creme contendo ácido ascórbico 10 % p/p (controle), **M1** (d, e, f) - creme contendo ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p e **G1** (g, h, i) - creme contendo ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p, submetidas às condições de geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), respectivamente para cada amostra, após **90 dias** do estudo de estabilidade normal.

Tabela 7 - Valor de pH das formulações B1, M1 e G1 durante o estudo de estabilidade normal.

		Condição de armazenamento																	
<div>t (dias) form.</div>	t zero	Geladeira (5 °C)						Luz solar (22 °C)						Estufa (40 °C)					
		3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90
B1	2,9	2,9	2,9	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	3,0	3,0	2,9	2,9	2,9	3,0	3,0
M1	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,8	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,8	2,9	2,9
G1	2,9	2,9	2,8	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,8	2,8	2,9

Legenda:

t: tempo

form.: formulação

t zero: avaliação das formulações, após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste

B1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p (controle)

M1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p

G1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p

Os valores de pH foram expressos como média de duplicatas

Tabela 8 - Valor da viscosidade aparente (cps) das formulações B1, M1 e G1 durante o estudo de estabilidade normal.

		Condição de armazenamento																	
<div>t (dias) form.</div>	t zero	Geladeira (5 °C)						Luz solar (22 °C)						Estufa (40 °C)					
		3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90
B1	11700	12100	12900	12450	13350	13450	14750	13450	12450	14900	13600	13500	18250	17700	18950	17800	15900	14100	12200
M1	12500	12250	12500	12800	14350	14400	16200	13450	13950	14750	14050	14650	18400	18500	18850	17550	15950	13750	14100
G1	12350	12250	12250	13200	13750	16450	13900	14800	15250	15750	14550	16250	18500	18650	19400	18450	15800	15050	13650

Legenda:

t: tempo

form.: formulação

t zero: avaliação das formulações, após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste

B1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p (controle)

M1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabisulfito de sódio 0,25 % p/p

G1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p

Os valores de viscosidade aparente foram expressos como média de duplicatas

Figura 9 - Variação de pH para as formulações: **a) B1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p - controle), **b) M1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p) e **c) G1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutathione 1,0 % p/p), quando armazenadas em geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), durante o teste de estabilidade normal.

Figura 10 - Variação da viscosidade aparente para as formulações: **a) B1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p - controle), **b) M1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p) e **c) G1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p), quando armazenadas em geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), durante o teste de estabilidade normal.

5.2.2 - Avaliação física e físico-química dos géis fluidos extemporâneos

A seguir serão apresentados os resultados quanto às características organolépticas, valores de pH e viscosidade aparente das formulações (géis fluidos extemporâneos) avaliadas inicialmente e após exposição às condições do teste: geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C) durante o estudo de estabilidade normal, conforme as **Tabelas 9,10 e Figuras 11, 12, 13, 14 e 15**.

Figura 11 - Características organolépticas (aspecto e cor) do gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico 10 % p/p - controle (**B2**) após 24 horas do preparo, antes de ser submetido às condições do teste de estabilidade normal.

As formulações **M2** e **G2** apresentaram as mesmas características (aspecto homogêneo e cor transparente) da formulação **B2** (**Figura 11**), após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste de estabilidade normal.

Inicialmente as formulações **B2** e **G2** apresentaram odor normal (característico de essência) e a formulação **M2** odor levemente ácido.

Ocorreram alterações de odor (característico de enxofre) para a formulação **G2** nas seguintes condições e tempo de armazenamento: estufa a 40 °C (após 7º dia) e luz solar (após 15º dia). Ainda quanto a estas características organolépticas, as demais formulações (**B2** e **M2**) permaneceram sem alterações.

Figura 12 - Características organolépticas (aspecto e cor) das formulações: **B2** (a, b, c) – gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico 10 % p/p (controle), **M2** (d, e, f) – gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p e **G2** (g, h, i) – gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p, submetidas às condições de geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), respectivamente para cada amostra, após 14 dias do estudo de estabilidade normal.

Figura 13 - Características organolépticas (aspecto e cor) das formulações: **B2** (a, b, c) – gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico 10 % p/p (controle), **M2** (d, e, f) – gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p e **G2** (g, h, i) – gel fluido extemporâneo contendo ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p, submetidas às condições de geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), respectivamente para cada amostra, após 26 dias do estudo de estabilidade normal.

Tabela 9 - Valor de pH das formulações **B2**, **M2** e **G2** durante o estudo de estabilidade normal.

		Condição de armazenamento											
t (dias) form.	t zero	Geladeira (5 °C)				Luz solar (22 °C)				Estufa (40 °C)			
		3	7	14	26	3	7	14	26	3	7	14	26
B2	3,0	2,9	3,0	2,9	3,0	2,9	3,0	2,9	3,0	3,0	3,0	2,9	3,0
M2	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,9	3,0	3,0	3,0	2,9	3,0
G2	3,0	2,9	2,9	2,9	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9

Legenda:

t: tempo

form.: formulação

t zero: avaliação das formulações, após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste

B2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p (controle)

M2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p

G2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutathiona 1,0 % p/p

Os valores de pH foram expressos como média de duplicatas.

Tabela 10 - Valor da viscosidade aparente (cps) das formulações **B2**, **M2** e **G2** durante o estudo de estabilidade normal.

		Condição de armazenamento											
t (dias) form.	t zero	Geladeira (5 °C)				Luz solar (22 °C)				Estufa (40 °C)			
		3	7	14	26	3	7	14	26	3	7	14	26
B2	400	390	385	335	270	335	295	175	125	210	110	35	30
M2	405	425	440	420	430	420	430	410	400	380	395	335	265
G2	410	410	430	380	375	385	385	300	245	320	270	155	40

Legenda:

t: tempo

form.: formulação

t zero: avaliação das formulações, após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste

B2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p (controle)

M2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p

G2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p

Os valores de viscosidade aparente foram expressos como média de duplicatas.

Figura 14 - Variação de pH para as formulações: **a) B2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p), **b) M2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p) e **c) G2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p), quando armazenadas em geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), durante o teste de estabilidade normal.

Figura 15 - Variação da viscosidade aparente para as formulações: **a) B2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p), **b) M2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p) e **c) G2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p), quando armazenadas em geladeira (5 °C), luz solar (22 °C) e estufa (40 °C), durante o teste de estabilidade normal.

5.2.3 –Avaliação química das formulações (creme e gel fluido extemporâneo)

5.2.3.1 - Validação da metodologia analítica

5.2.3.1.1 - Especificidade

O cromatograma das amostras (creme e gel fluido extemporâneo), sem adição de analito (controle) (**Figura 16**), demonstrou a não existência de picos interferentes, quando comparado ao perfil cromatográfico da formulação cosmética (creme) contendo ácido ascórbico, glutathione e ácido nicotínico como padrão interno, após o processo de extração (**Figura 17**).

A metodologia cromatográfica utilizada permitiu adequada separação dos picos cromatográficos, tanto do ácido ascórbico como do padrão interno (ácido nicotínico). Os tempos de retenção para identificação das substâncias analisadas foram de: 3,43min para o ácido ascórbico e 4,89min para o ácido nicotínico. (**Figura 17**).

Não houve interferência na análise, quando comparam-se amostras de ácido ascórbico com os antioxidantes (glutathione e metabissulfito de sódio) utilizados na formulação cosmética, com o padrão interno (ácido nicotínico) e com o possível produto de degradação do ácido ascórbico (ácido oxálico) (**Figura 18**).

O método analítico mostrou-se específico ao ácido ascórbico, de acordo com os cromatogramas apresentados.

5.2.3.1.2 - Linearidade

A linearidade oferecida pelo cromatógrafo a líquido no método analítico foi calculada a partir da curva de calibração sem interferência dos componentes da formulação (creme e gel fluido extemporâneo) e apresentou coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,9989, próximo a 1,0 e adequado ao método (**Figura 19**).

5.2.3.1.3 - Recuperação/Exatidão

A recuperação do método de extração do ácido ascórbico da formulação foi em média de 99,74 % para o creme (**Tabela 11**) e 98,85 % para a gel fluido extemporâneo (**Tabela 12**) e manteve-se de acordo com a literatura (GUIA DOS GENÉRICOS, 1999; USP 24 ed, 2000), com percentagem de recuperação próximo de 100,0 % e desvio padrão não excedendo a 6,0 %.

5.2.3.1.4 - Precisão

A precisão alcançou níveis adequados com coeficiente de variação intradia de 0,38 % e de 1,22 % interdia, sendo adequados à finalidade do método. **(Tabela 13)**

5.2.3.1.5 - Limite de detecção

O limite de detecção do método utilizado, que permite a diferenciação entre o pico do ácido ascórbico e o ruído da linha de base foi de 0,05µg/mL **(Tabela13)**

Figura 16: Perfil cromatográfico das formulações cosméticas (creme e gel fluido extemporâneo) sem a adição de ácido ascórbico e antioxidantes (controle). Fase móvel: mistura de solução de ácido metafosfórico 0,2%, metanol e acetonitrila (90:8:2); Coluna Phenomenex LiChrospher® 5µm C₁₈. Comprimento de onda de 254nm; Detector ultravioleta Shimazu; Aquisição dos resultados e integração dos picos, Sistema Class-LC10 Shimazu.

Figura 17: Perfil cromatográfico da formulação cosmética (creme), contendo ácido ascórbico 10 % p/p, glutathione 1,0 % p/p e ácido nicotínico 10 % p/p como padrão interno, após o processo de extração. Fase móvel: mistura de solução de ácido metafosfórico 0,2%, metanol e acetonitrila (90:8:2); Coluna Phenomenex LiChrospher® 5µm C₁₈; Comprimento de onda de 254nm; Detector ultravioleta Shimazu; Aquisição dos resultados e integração dos picos, Sistema Class-LC10 Shimazu.

Figura 18: Cromatograma das amostras de ácido ascórbico, glutathione, ácido oxálico e metabissulfito de sódio com concentrações de 10,0µg/mL. Fase móvel: mistura de solução de ácido metafosfórico 0,2%, metanol e acetonitrila (90:8:2); Coluna Phenomenex LiChrospher® 5µm C₁₈; Comprimento de onda de 254nm; Detector ultravioleta Shimazu; Aquisição dos resultados e integração dos picos, Sistema Class-LC10 Shimazu.

Figura 19: Curva de calibração representada pelo gráfico obtido da razão da área da concentração de ácido ascórbico *versus* ácido ascórbico/ ácido nicotínico (PI)

Equação 1:

$$y = 0,0732 x - 0,0141$$

$$r^2 = 0,9989$$

Onde:

x= concentração de ácido ascórbico µg/mL

y = concentração de ácido ascórbico/ácido nicotínico (PI)

r² = coeficiente de correlação linear

Tabela 11- Percentagem de recuperação/exatidão do ácido ascórbico adicionado ao creme.

Concentração de ácido ascórbico adicionado ao creme ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de ácido ascórbico obtido ($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação do ácido ascórbico (%)
2,0	$2,017 \pm 0,0409$	100,84
6,0	$5,965 \pm 0,0660$	99,42
10,0	$9,897 \pm 0,0487$	98,97

* média de três determinações para cada concentração $\pm$ desvio padrão

Tabela 12 - Percentagem de recuperação/exatidão do ácido ascórbico adicionado ao gel fluido extemporâneo.

Concentração de ácido ascórbico adicionado ao gel fluido extemporâneo ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de ácido ascórbico obtido($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação do ácido ascórbico (%)
2,0	$1,909 \pm 0,0181$	95,46
6,0	$5,972 \pm 0,0259$	99,54
10,0	$10,154 \pm 0,0510$	101,54

* média de três determinações para cada concentração $\pm$ desvio padrão

Tabela 13 - Parâmetros da validação do método utilizado para determinação e quantificação do ácido ascórbico.

Parâmetro	Valor
Limite de detecção	$0,05\mu\text{g/mL}$
Linearidade	$1,0 - 12,0\mu\text{g/mL}$
Precisão (coeficiente de variação)	
Intradia (n=10) ¹	0,38 %
Interdia (n=6) ²	1,22 %

1 – Número de replicatas no mesmo dia, média de 3 dias distintos

2 – Médias dos dados obtidos para as análise realizadas em 6 dias distintos.

5.2.3.2 - Curva de calibração do ácido ascórbico

Nas Tabelas 14 e 15 e Figuras 20 e 21 são apresentados os resultados das curvas de calibração do creme e gel fluido extemporâneo.

Tabela 14 - Dados experimentais utilizados para elaboração da curva de calibração com adição de ácido ascórbico ao creme.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Razão de área Ácido ascórbico/PI*
2,0	0,145 $\pm$ 0,0008
4,0	0,285 $\pm$ 0,0063
6,0	0,432 $\pm$ 0,0071
8,0	0,575 $\pm$ 0,0069
10,0	0,727 $\pm$ 0,0030

*média de três determinações para cada concentração $\pm$ desvio padrão

Figura 20 - Curva de calibração do ácido ascórbico (com adição do analito ao creme) – Relação de áreas da concentração de ácido ascórbico adicionado *versus* ácido ascórbico/ ácido nicotínico (P.I.)

Equação 2:

$$y = 0,0728 x - 0,0032$$

$$r^2 = 0,9998$$

Onde: **x**= concentração de ácido ascórbico $\mu\text{g/mL}$

y = concentração de ácido ascórbico/ácido nicotínico (PI)

r² = coeficiente de correlação linear

Tabela 15 - Dados experimentais utilizados para elaboração da curva de calibração com adição de ácido ascórbico ao gel fluido extemporâneo.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Razão de área ácido ascórbico/PI*
2,0	0,143 $\pm$ 0,0034
4,0	0,279 $\pm$ 0,0063
6,0	0,427 $\pm$ 0,0039
8,0	0,571 $\pm$ 0,0078
10,0	0.716 $\pm$ 0,0109

*média de três determinações para cada concentração $\pm$ desvio padrão

Figura 21 - Curva de calibração do ácido ascórbico (com adição do analito ao gel fluido extemporâneo) – Relação de áreas da concentração de ácido ascórbico adicionado *versus* ácido ascórbico/ ácido nicotínico (P.I.).

Equação 3:

$$y = 0,0719 x - 0,0041$$

$$r^2 = 0,9998$$

Onde: **x**= concentração de ácido ascórbico $\mu\text{g/mL}$

y = concentração de ácido ascórbico/ácido nicotínico (PI)

r² = coeficiente de correlação linear

5.2.3.3 - Determinação da concentração de ácido ascórbico no creme durante o teste de estabilidade normal

74

A seguir serão apresentados os resultados das formulações **B1**, **M1** e **G1** quanto à avaliação química conforme Tabela 16 e Figuras 22 a 27.

Tabela 16 - Concentração (%) de ácido ascórbico das formulações **B1**, **M1** e **G1** durante o estudo de estabilidade normal

		Condição de armazenamento																	
<div>t (dias) form.</div>	t zero	Geladeira (5 °C)						Luz solar (22 °C)						Estufa (40 °C)					
		3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90	3	7	15	30	60	90
B1	99,33	98,84	97,40	98,33	97,92	96,28	93,13	98,04	96,60	96,58	94,23	91,29	87,27	96,75	94,11	86,67	77,32	60,10	42,34
M1	99,07	98,89	99,07	98,47	97,81	96,45	95,56	98,02	96,71	96,30	96,16	93,86	90,38	97,45	95,15	95,51	85,67	67,02	47,49
G1	100,00	98,86	98,73	98,78	97,09	96,05	95,00	98,07	97,03	97,01	96,12	94,51	91,89	97,88	95,54	93,20	90,17	77,31	57,31

Legenda:

t: tempo

form.: formulação

t zero: avaliação das formulações, após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste

B1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p (controle)

M1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p

G1: creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p

Os valores da concentração de ácido ascórbico (%) foram expressos como média de duplicatas.

Figura 22 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE nas formulações **B1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p – controle), **G1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p) e **M1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetidas à temperatura de 5 °C (geladeira) durante o teste de estabilidade normal.

Figura 23 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE nas formulações **B1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p – controle), **G1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p) e **M1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetidas à luz solar a 22 °C durante o teste de estabilidade normal.

Figura 24 - Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE nas formulações **B1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p – controle), **G1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutathione 1,0 % p/p) e **M1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetidas à temperatura de 40 °C (Estufa) durante o teste de estabilidade normal.

Figura 25 - Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE na formulação **M1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetida às seguintes condições: luz solar (22 °C), estufa (40 °C) e geladeira (5 °C) durante o teste de estabilidade normal.

Figura 26 - Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE na formulação **G1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p), submetida às seguintes condições: luz solar (22 °C), estufa (40 °C) e geladeira (5 °C) durante o teste de estabilidade normal.

Figura 27 - Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE na formulação **B1** (creme base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p - controle), submetida às seguintes condições: luz solar (22 °C), estufa (40 °C) e geladeira (5 °C) durante o teste de estabilidade normal.

5.2.3.4 – Análise estatística para o creme

A seguir serão apresentados os resultados estatísticos para o creme apresentados nas Tabelas 18, 19 e Figuras 28 e 29.

Tabela 17 - Concentração de ácido ascórbico (%p/p) no creme em função das variáveis: tempo, temperatura e antioxidantes, segundo o arranjo quadrado greco-latino.

	1	2	3
I	A 100,31 98,36	B 96,76 97,42	C 96,11 95,02
	C 99,42 98,72	A 93,67 94,79	B 91,51 92,28
II	B 99,53 100,48	C 85,34 86,01	A 47,63 37,05
III			

Legenda:

Números arábicos: tempo

1: 0 dias

2: 30 dias

3: 90 dias

Números romanos: temperatura

I: 5 °C

II: 22 °C

III: 40 °C

Letras romanas: antioxidante

A: Controle

B: Glutathione

C: Metabissulfito de sódio

Tabela 18 - Análise de variância da concentração de ácido ascórbico no creme em função das variáveis: tempo, temperatura e concentração do antioxidante

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Nível de significância
t	1642,96	2	821,48	8,95	0,0049
T	1646,07	2	823,03	8,96	0,0049
Ant	1081,15	2	540,57	5,89	0,0183
Res	1010,06	11	91,82		
Total (corrigido)	5380,23	17			

Legenda: t - tempo (dias); T- temperatura (°C); ant - antioxidante (% p/p); res - resíduo

Tabela 19 - Análise do intervalo múltiplo da concentração de ácido ascórbico (% p/p) no creme em função do tempo, temperatura e antioxidante.

Variável	CREME			
	Nível	Contagem	Média	Grupos homogêneos
tempo (dias)	1 (0 dias)	6	99,47	X
	2 (30 dias)	6	92,33	X
	3 (90 dias)	6	76,6	X
	Comparação	Diferença	± Limites	
	1-2	7,14	12,18	
	1-3	22,87	12,18*	
	2-3	15,73	12,18*	
Temperatura	Nível	Contagem	Média	Grupos homogêneos
	I (5 °C)	6	97,33	X
	II (22 °C)	6	95,06	X
	III (40 °C)	6	76,00	X
	Comparação	Diferença	± Limites	
	I-II	2,26	12,18	
	I-III	21,32	12,18*	
Antioxidante	Nível	Contagem	Média	Grupos homogêneos
	A (controle)	6	78,63	X
	B (glutaciona)	6	96,33	X
	C (m. de sódio)**	6	93,43	X
	Comparação	Diferença	± Limites	
	A-B	-17,69	12,18*	
	A-C	-14,80	12,18*	
	B-C	2,89	12,18	

*denota diferença estatisticamente significativa

**metabissulfito de sódio

Figura 28 - Análise do intervalo múltiplo da concentração de ácido ascórbico (% p/p) no creme em função do tempo.

Figura 29 - Análise do intervalo múltiplo da concentração de ácido ascórbico (% p/p) no creme em função da temperatura.

5.2.3.5 - Determinação da concentração de ácido ascórbico no gel fluido extemporâneo durante o teste de estabilidade normal.

A seguir serão apresentados os resultados das formulações **B2**, **M2** e **G2** quanto à avaliação química conforme **Tabela 20** e **Figuras 30 a 35**.

Tabela 20 - Concentração (%) de ácido ascórbico das formulações **B2**, **M2** e **G2**, durante o estudo de estabilidade normal.

		Condição de armazenamento											
t (dias) form.	t zero	Geladeira (5 °C)				Luz solar (22 °C)				Estufa (40 °C)			
		3	7	14	26	3	7	14	26	3	7	14	26
B2	98,98	97,78	96,23	96,21	95,53	96,31	94,07	93,62	92,29	92,02	88,13	82,17	69,50
M2	98,02	98,15	97,42	97,51	97,57	96,64	96,26	95,46	94,54	96,06	93,71	87,48	78,69
G2	98,93	96,88	96,28	96,33	97,10	97,79	95,92	94,60	94,03	95,42	93,61	90,26	81,11

Legenda:

t: tempo

form.: formulação

t zero: avaliação das formulações, após 24 horas do preparo, antes de serem submetidas às condições do teste

B2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p (controle)

M2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p

G2: gel fluido extemporâneo base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutathione 1,0 % p/p

Os valores da concentração de ácido ascórbico (%) foram expressos como média de duplicatas.

Figura 30 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE nas formulações **B2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p - controle), **G2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutathione 1,0 % p/p) e **M2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10% p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetidas à temperatura de 5 °C (geladeira), durante o teste de estabilidade normal.

Figura 31 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE nas formulações **B2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p - controle), **G2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutationala 1,0 % p/p) e **M2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetidas à temperatura de 22 °C (Luz solar), durante o teste de estabilidade normal.

Figura 32 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE nas formulações **B2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p - controle), **G2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutationala 1,0 % p/p) e **M2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetidas à temperatura de 40 °C (Estufa), durante o teste de estabilidade normal.

Figura 33 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE na formulação **M2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e metabissulfito de sódio 0,25 % p/p), submetida às seguintes condições: luz solar (22 °C), estufa (40 °C) e geladeira (5 °C), durante o teste de estabilidade normal.

Figura 34 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE na formulação **G2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p e glutatona 1,0 % p/p), submetida às seguintes condições: luz solar (22 °C), estufa (40 °C) e geladeira (5 °C), durante o teste de estabilidade normal.

Figura 35 – Concentração média de ácido ascórbico determinado através de CLAE na formulação **B2** (gel fluido base adicionado de ácido ascórbico 10 % p/p - controle), submetida às seguintes condições: luz solar (22 °C), estufa (40 °C) e geladeira (5 °C), durante o teste de estabilidade normal.

5.2.3.6 - Análise estatística para o gel fluido extemporâneo

A seguir serão apresentados os resultados estatísticos para o creme apresentados nas Tabelas 22, 23 e Figuras 36, 37.

Tabela 21 - Concentração de ácido ascórbico (%p/p) no gel fluido extemporâneo em função das variáveis: tempo, temperatura e antioxidantes, segundo o arranjo quadrado greco-latino.

	1	2	3
	A	B	C
I	99,06	97,15	97,28
	98,91	95,42	97,86
	C	A	B
II	97,53	94,63	94,39
	98,51	93,51	93,67
	B	C	A
III	100,06	93,17	71,71
	97,80	94,26	67,30

Legenda:

Números arábicos: tempo

1: 0 dias

2: 7 dias

3: 26 dias

Números romanos: temperatura

I: 5 °C

II: 22 °C

III: 40 °C

Letras romanas: antioxidante

A: Controle

B: Glutathione

C: Metabissulfito de sódio

Tabela 22 - Análise de variância da concentração de ácido ascórbico no gel fluido extemporâneo em função das variáveis: tempo, temperatura e concentração do antioxidante.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Nível de significância
t	418,07	2	209,03	7,8	0,0078
T	347,02	2	173,51	6,5	0,0139
Ant	317,20	2	158,60	5,9	0,0180
Res	295,06	11			
Total (corrigido)	1377,35	17			

Legenda: t - tempo (dias); T - temperatura (°C); ant - antioxidante (% p/p); res - resíduo

Tabela 23 - Análise do intervalo múltiplo da concentração de ácido ascórbico (% p/p) no gel fluido extemporâneo em função do tempo, temperatura e antioxidante.

Variável	GEL FLUIDO EXTEMPORÂNEO			
	Nível	Contagem	Média	Grupos homogêneos
tempo (dias)	1 (0 dias)	6	98,64	X
	2 (7 dias)	6	94,69	X
	3 (26 dias)	6	87,03	X
	Comparação	Diferença	± Limites	
	1-2	3,95	6,58	
	1-3	11,61	6,58*	
	2-3	7,65	6,58*	
Temperatura	Nível	Contagem	Média	Grupos homogêneos
	I (5 °C)	6	97,61	X
	II (22 °C)	6	95,37	X
	III (40 °C)	6	87,38	X
	Comparação	Diferença	± Limites	
	I-II	2,24	6,58	
	I-III	10,23	6,58*	
Antioxidante	Nível	Contagem	Média	Grupos homogêneos
	A (controle)	6	87,52	X
	B (glutaciona)	6	96,41	X
	C (m. de sódio)**	6	96,43	X
	Comparação	Diferença	± Limites	
	A-B	-8,89	6,58*	
	A-C	-8,91	6,58*	
	B-C	-0,02	6,58	

*denota diferença estatisticamente significativa

**metabissulfito de sódio

Figura 36 - Análise do intervalo múltiplo da concentração de ácido ascórbico (% p/p) no gel fluido extemporâneo em função do tempo.

Figura 37 - Análise do intervalo múltiplo da concentração de ácido ascórbico (% p/p) no gel fluido extemporâneo em função da temperatura.

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

O estudo da estabilidade em formulações cosméticas tem sido muito discutido por pesquisadores e profissionais da área.

Atualmente, quando da solicitação do registro de produto cosmético, os órgãos de regulamentação exigem que as empresas apresentem os estudos de estabilidade indicativos do prazo de validade estimado do produto, que se confirmará posteriormente com a continuação do estudo (BRASIL, 2001).

Existe variabilidade e discordância quanto às condições e valores de tempo aos quais as amostras devem ser submetidas para o teste de estabilidade. Normalmente, utilizam-se temperaturas elevadas (40 a 50 °C), ambiente (22 a 25 °C) e geladeira (5 °C), no mínimo 3 condições as quais o cosmético deve ser submetido para ser avaliado. Quanto ao período de tempo, o mínimo é de 3 meses de estudo e prolonga-se durante todo prazo de validade do produto (RIBEIRO, 2001). A avaliação da estabilidade sob temperatura ambiente tenta simular a condição do mercado. Se após o vencimento o produto estiver em condições adequadas ou não de uso, será reavaliado novo prazo com aumento ou diminuição do mesmo, respectivamente. Desta forma define-se o histórico do produto que é fundamental para sua manutenção no mercado. A vida de prateleira é que define o prazo de validade real.

A vitamina C (ácido ascórbico) tem sido muito utilizada em produtos cosméticos, não somente como protetor da formulação (antioxidante), mas também como componente ativo devido as ações na pele, principalmente no combate ao envelhecimento cutâneo. Existe no mercado grande variedade de produtos, apresentados em diversas formas farmacêuticas.

Devido à reduzida estabilidade química, a vitamina C apresenta problemas de oxidação quando veiculada em formulações cosméticas. Em virtude disso surgiram derivados mais estáveis (fosfato de ascorbil magnésio ou sódio), bem como as formas vetorizadas (nanocápsulas, lipossomas e microesponjas).

A incorporação do ácido ascórbico livre na formulação tópica tem mais vantagens em relação às formas descritas acima quanto à eficácia, uma vez que apresenta maior penetração cutânea que os derivados (SILVA et al. 1996), e custo menor em relação às demais formas de apresentação. A partir do exposto, o

conhecimento de seu comportamento na formulação é essencial para a manipulação adequada e, portanto, para se alcançar os benefícios cosméticos a que se destina.

As formulações creme e gel fluido extemporâneo foram selecionados para o estudo com a vitamina C devido à melhor aceitação pelo mercado.

O creme apresenta vantagem em relação ao gel, pois esta forma cosmética permite maior penetração cutânea do princípio ativo. Como o creme é uma emulsão, neste caso do tipo Óleo/Água, é constituído por substâncias hidro e lipossolúveis, compatibilizando-se com o manto hidrolipídico da pele e, portanto, mais adequadas à mesma. A fase oleosa proporciona emoliência e hidratação por oclusão à pele, auxiliando contra o envelhecimento cutâneo (SANCTIS, 1999; RODRIGUES & SALKA, 2001).

O gel fluido normalmente é muito utilizado pelo mercado cosmético por ser uma formulação de fácil remoção, já que sua base é hidrossolúvel. Tem vantagem em relação à solução por sua maior viscosidade, facilitando na aplicação cutânea e é muito utilizado para peles oleosas. As preparações do tipo extemporâneas conferem maior estabilidade do princípio ativo. Dentre as matérias-primas gelificantes podemos citar derivados da celulose, gomas e polímeros do ácido acrílico (PRISTA et al., 1992a).

Dentre os métodos analíticos citados na literatura para a determinação do ácido ascórbico são propostos os titulométricos, espectrofotométricos, eletroquímicos, fluorimétricos, enzimáticos e cromatográficos, entre outros (ARYA et al., 2000). A espectrofotometria e a titulometria são muito utilizadas, porém não detectam os compostos de decomposição do ácido ascórbico que se formam durante o armazenamento do produto. A Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, foi utilizada por ser um método mais sensível e seletivo, atingindo os objetivos de um estudo de estabilidade (MOSER & BENDICH 1991).

Neste experimento foram testadas as seguintes fases móveis:

Coluna C8 e C18 e comprimento de onda de 254 nm

- metanol: tampão fosfato + TBA (tetrabutilamônio) (30:70)
- metanol: tampão fosfato + TBA (70:30)

Coluna C18 e comprimento de onda de 254 nm

- Solução de ácido metafosfórico a 0,2 % em água
- ácido metafosfórico 0,2 % : metanol (95:5)

- ácido metafosfórico 0,2 %: acetonitrila (95:5)
- ácido metafosfórico 0,2 % : metanol (90:10)
- ácido metafosfórico 0,2 % : acetonitrila(90:10)
- ácido metafosfórico 0,2 % : metanol: acetonitrila (90:5:5)

As fases móveis citadas anteriormente não foram selecionadas para a pesquisa por não apresentarem boa resposta quanto ao doseamento do ácido ascórbico uma vez que não identificaram o antioxidante glutathione presente nas formulações e também porque o tempo de retenção da substância ativa era muito reduzido (em torno de 1 minuto).

Segundo WAGNER et al. (1979), a determinação do ácido ascórbico por CLAE pode ser realizada utilizando-se o ácido metafosfórico 0,8 % em água como fase móvel. O tempo de retenção da substância ativa no estudo foi de 1,0 minuto. Nesta pesquisa, visando aprimorar a metodologia, foram feitas modificações na composição da fase móvel a fim de elevar o tempo de retenção do ácido ascórbico e evitar interferências do ruído de base do cromatógrafo, danificar ao mínimo a coluna cromatográfica e separar/definir os picos de todas as substâncias. Assim sendo a fase móvel composta de solução de ácido metafosfórico 0,2 %, metanol e acetonitrila (90:8:2) mostrou-se a mais satisfatória e o tempo de retenção encontrado ficou próximo de 3,5 minutos (**Figura 17 e 18**).

Diversas substâncias são usadas como padrão interno para doseamento do vitamina C (RUSSEL, 1986; TOMIS et al., 1984; TUAN & WYATT, 1987). Nesta pesquisa foi utilizado o ácido nicotínico, conforme MARSHALL (1995) e FOTSING et al. (1997), uma vez que o pico cromatográfico deste separou do pico do ácido ascórbico, demonstrando não haver interferência entre estas substâncias (**Figura 17 e 18**).

A metodologia para o doseamento de substâncias ativas em formulações envolve a validação da metodologia analítica, abrangendo a precisão, exatidão, linearidade do método e limite de detecção e quantificação (USP 24 ed, 2000).

Quanto à metodologia analítica houve especificidade para a determinação do ácido ascórbico (**Figuras 16 a 18**) em relação aos demais componentes das formulações (creme e gel fluido extemporâneo), antioxidantes (glutathione e metabissulfito de sódio), padrão interno (ácido nicotínico) e produto de degradação do ácido ascórbico (ácido oxálico).

Quanto à exatidão/recuperação, os resultados obtidos apresentaram-se conforme especificado na literatura; ou seja, próximos a 100 % e com desvio padrão inferior a 6 % (**Tabela 11 e 12**) (GUIA DOS GENÉRICOS, 1999; USP 24 ed., 2000). O limite de detecção e a precisão alcançaram níveis adequados à finalidade do método (**Tabela 13**).

A linearidade foi observada no intervalo de concentração de 1,0 a 12,0 µg/mL (**Tabela 13 e Figura 19**), sendo visualizada também pela curva de calibração elaborada para as formulações creme e gel fluido extemporâneo (**Tabelas 14 e 15; Figuras 20 e 21**, respectivamente).

A curva de calibração foi calculada com a relação de áreas da concentração de ácido ascórbico adicionado *versus* ácido ascórbico/ ácido nicotínico e gerou uma equação da reta com coeficiente de correlação muito próximo a 1 (**Figura 20 e 21; Equação 2 e 3**).

O desenvolvimento de formulações cosméticas envolve várias etapas, desde a escolha das matérias-primas e material de acondicionamento à técnica de preparação mais adequada e o estudo da estabilidade.

Nas formulações dos cremes base (formulações preliminares) (**Tabela 1**) optou-se por um creme não iônico utilizando como base emulsificante Polawax® (cera autoemulsionante não iônica) ou álcool cetoestearílico etoxilado, uma vez que a literatura indica que são menos irritantes para a pele, quando comparados aos aniônicos. Este fato é muito importante, pois a formulação final com ácido ascórbico 10 % p/p apresentou valor de pH em torno de 3,0; que é apropriado para a ação do componente ativo, mas pode causar alguma irritação à pele. Outro fator importante a ser considerado é que formulações ácidas, aquelas contendo vitamina C são mais estáveis com tensoativos não iônicos (BARATA, 1995; ROCHA FILHO, 1992; BLAUG & HAJRATWALA, 1974).

Além da base emulsificante, acrescentaram-se o Cetiol® 868 (estearato de octila), manteiga de karité, óleo mineral e o Glucan® E20, substâncias emolientes e hidratantes conferindo melhor espalhamento e toque sedoso do produto quando aplicado à pele.

O Hidroviton® (mistura de aminoácidos, lactato sódico, uréia, alantoína e álcoois polivalentes) foi incluído na fórmula, pois atua como potente hidratante da pele, auxiliando contra o envelhecimento cutâneo, podendo agir como promotor de

penetração do ácido ascórbico, já que apresenta em sua composição substância, como a uréia, citada na literatura com essa função (PRISTA et al., 1992b).

O sistema conservante Cosmoguard® para o creme e Unacid® associado ao Nipagin® para o gel fluido extemporâneo foram escolhidos em função da disponibilidade do mercado e buscando maior espectro de ação antimicrobiana.

Para reduzir o nível de oxidação do ácido ascórbico, utilizou-se como antioxidante preventivo o HEDTA, pois segundo a literatura mostra-se mais eficaz que os outros antioxidantes de ação semelhante (quelante de metais) da classe dos ácidos amino policarboxílicos (EDTA), em formulações com ácido ascórbico (KASSEM et al., 1971).

Além do mecanismo preventivo, em virtude da alta instabilidade do ácido ascórbico, considerou-se importante a escolha de um sistema antioxidante corretivo. A literatura indicou que o metabissulfito de sódio deve ser primariamente utilizado em preparações com pH ácido, sendo portanto adequado a esta pesquisa (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 1994) e a glutatona, segundo pesquisadores, foi muito eficiente como agente redutor do ácido ascórbico em soluções aquosas e amostras de sangue (TOUITOU et al., 1996; LOWIK et al., 1990).

No gel fluido extemporâneo (**Tabela 2**) foi incluído o Cellosize® (hidroxietilcelulose) agente gelificante de caráter não iônico mais adequado quando em associação ao ácido ascórbico formando produtos estáveis no pH da pesquisa (BARATA, 1995; ROCHA FILHO, 1992; BLAUG & HAJRATWALA, 1974). O sorbitol foi introduzido para conferir maior estabilidade à formulação uma vez que pode diminuir a quantidade de oxigênio dissolvido e diminuir a oxidação do ácido ascórbico (MACEK, 1960).

Neste estudo foram desenvolvidas outras formulações do tipo gel, empregando-se Carbopol® e gel-creme contendo ceras associadas ao gelificante Cellosize®.

As formulações gel-creme, a base de Polawax® (3,0 e 4,0% p/p) e Natrosol® (2% p/p) não foram adequadas ao estudo porque ficaram com toque muito pegajoso quando aplicadas na pele.

A formulação com álcool cetoestearílico etoxilado 2% p/p e cera autoemulsionante (Emulgade®) também não foi considerada adequada ao estudo,

porque quando aplicada sobre a pele deixou uma aparência muito oleosa, além da emulsão não se manter estável, ocorrendo separação de fases um dia após o preparo.

Quanto à forma cosmética gel, as formulações que empregaram Carbopol® 940 (0,5% p/p) e Cellosize® 2% p/p não foram adequadas à pesquisa, porque no primeiro caso ocorre uma incompatibilidade entre o Carbopol®, que é um polímero do ácido acrílico e para ocorrer sua gelificação necessita de pH básico (acima de 5,5) e o ácido ascórbico deve ser incorporado em formulações que se mantenham em pH ácido (inferior a 4,0) (MARTINS, S., 2000). No caso do Cellosize®, o problema ocorrido foi a sensação pegajosa que a formulação deixava quando era aplicada na pele.

De acordo com as **Tabelas 3 e 4** (creme), **5 e 6** (gel fluido extemporâneo) no estudo de estabilidade acelerada, as formulações contendo ou glutathione (**G1 e G2**) ou metabissulfito de sódio (**M1 e M2**) apresentaram-se estáveis quanto ao aspecto em todas condições analisadas. As maiores alterações de cor e odor (odor forte de enxofre) ocorreram nas condições de temperatura elevada; ou seja, a 45°C e nos ciclos gela e degela. Este comportamento era esperado porque o aumento da temperatura geralmente acelera as reações de decomposição (CADWALLAGER, 1989).

A partir dos resultados obtidos, o comportamento dos dois antioxidantes foi muito similar, exceto nas amostras contendo glutathione armazenadas na estufa e ciclos gela e degela que apresentaram odor muito desagradável de enxofre, indicando a decomposição da glutathione, já que a mesma contém este elemento em sua estrutura química.

As formulações creme e gel fluido extemporâneo com glutathione ou metabissulfito de sódio (**Tabelas 3 a 6**) mostraram-se estáveis quanto ao valor de pH em todas condições analisadas, com variação inferior a 0,2 o que indica que a luz e variação de temperatura não influenciaram nesta variável, indicando a não interferência dos antioxidantes glutathione ou metabissulfito de sódio na estabilidade das formulações.

Quanto à viscosidade aparente, os dois antioxidantes mencionados não interferiram na estabilidade da formulação creme, exceto para a condição de luz solar no creme com glutathione (**Tabelas 3 e 4**). No caso do gel fluido extemporâneo

(**Tabelas 5 e 6**) houve diminuição da viscosidade aparente das formulações sendo mais perceptíveis nas condições de estufa e ciclos gela e degela. Na condição de luz solar apenas a formulação contendo glutathione ocorreu diminuição do valor da viscosidade aparente no final do teste. De acordo com a literatura, as características do agente gelificante, no caso a hidroxietilcelulose podem ser modificadas pelas alterações de temperatura, assim como pelo valor de pH (OLIVEIRA & SCARPA, 2002).

A avaliação física e físico-química dos cremes no teste de estabilidade normal, as características organolépticas (aspecto e cor) estão apresentadas nas **Figuras 6, 7 e 8**. Para os três tipos de formulações, controle (**B1**), amostra com glutathione (**G1**) e metabissulfito de sódio (**M1**), com o decorrer do tempo sofreram alterações perceptíveis, nas condições de estufa e luz solar, variando do branco ao amarelo (90 dias) e, quanto ao aspecto mostraram-se aeradas, mais perceptíveis na amostra **B1** que não possuía antioxidantes. Os dois antioxidantes apresentaram comportamento diferenciado apenas até o 15º dia quanto à alteração da cor e odor, onde as formulações com glutathione indicaram maiores alterações que as com metabissulfito de sódio. Após esse período de tempo, as preparações com os dois tipos de antioxidantes comportaram-se de forma similar quanto às respostas. Verificou-se a importância de conduzir o teste de estabilidade até seu término e não interrompê-lo tirando conclusões precipitadas, pois as alterações das formulações seguem comportamentos diferentes.

Estes resultados são concordantes com a literatura, onde o tempo e a temperatura são fatores extrínsecos determinantes na alteração das emulsões e acrescenta-se a esse fato a degradação do ácido ascórbico que altera a cor da formulação e a formação do dióxido de carbono (CO₂) que, sendo liberado, confere o aspecto aerado ao produto (SAMPAIO, 1998; OWEN, 1999, THORMAHLEN, 2000).

As formulações creme com glutathione ou metabissulfito de sódio quanto ao valor de pH (**Tabelas 7 e Figura 9**), mantiveram-se estáveis nas condições avaliadas e durante o período de 3 meses, com variação inferior a 0,2. Este fato é importante pois o ácido ascórbico possui maior penetração na pele quando o pH da formulação possuir valor ácido (SILVA et al., 1996).

Para a avaliação da viscosidade aparente das mesmas formulações foram elaboradas a **Tabela 8 e Figura 10** e verificou-se que, para os 3 tipos de exposição

das formulações, houve aumento da viscosidade aparente nas condições de geladeira (5 °C) e luz solar (22 °C). Na temperatura de 40 °C houve diminuição do valor de viscosidade aparente para os 3 tipos de amostra, provavelmente pela instabilidade do sistema. Considerando-se os antioxidantes empregados, na condição de geladeira (5 °C), o valor da viscosidade aparente para as formulações contendo glutathione (**G1**) aproximou-se mais do valor inicial medido quando comparou-se com o metabissulfito de sódio (**M1**), enquanto que para a luz solar (22 °C) e estufa (40 °C) as respostas foram próximas.

No estudo de estabilidade normal para o gel fluido extemporâneo quanto às características organolépticas (cor e odor) as respostas foram similares às aquelas obtidas para o creme onde, com o passar do tempo, o aumento da temperatura provocou um amarelamento gradativo e odor forte de enxofre nas formulações contendo glutathione (**Figuras 11 a 13**).

Na avaliação do valor de pH (**Tabela 9 e Figura 14**) desta forma de apresentação também houve a manutenção do seu valor inicial, com variação inferior a 0,1; comportamento similar ao do creme.

Na avaliação de viscosidade aparente do gel fluido extemporâneo (**Tabela 10 e Figura 15**), o aumento da temperatura provocou sensível diminuição desta variável, principalmente no controle, seguido das amostras acrescidas de glutathione e metabissulfito de sódio.

O aumento da temperatura (calor) tem influência direta na estabilidade física de muitas formas farmacêuticas/cosméticas, tais como soluções, emulsões, pomadas, moldados, gel, dentre outras. As alterações causadas incluem, desde modificações reológicas, já que interfere significativamente na viscosidade; deformações geométricas na forma farmacêutica; contribui para a desestabilização de sistemas emulsionados ou suspensos, além de favorecer a evaporação de solventes voláteis, a qual pode causar recristalizações (OLIVEIRA & SCARPA, 2002).

Nas formulações avaliadas (**Tabela 16 e Figuras 22 a 24**), na condição de 5°C (geladeira) houve maior estabilidade do ácido ascórbico, como ocorre normalmente nas formulações mantidas a temperaturas baixas, onde a velocidade da reação de degradação é menor. Os teores de ácido ascórbico foram semelhantes

para o controle (**B1**), glutathione (**G1**) e metabissulfito de sódio (**M1**), sendo ligeiramente superiores para o **G1** no final de 90 dias de estudo.

Considerando a condição de geladeira (5 °C) e luz solar à temperatura ambiente (22 °C), o perfil de queda do teor de ácido ascórbico foi muito semelhante entre as três formulações, embora na condição de luz solar no final do teste, a concentração desta substância ativa foi inferior àquela obtida na geladeira. Isto demonstrou que não existiu influência marcante na velocidade de degradação do ácido ascórbico, entre as temperaturas de 5 °C e 22 °C com luz solar. Este resultado foi confirmado pela análise estatística, onde não se verificou diferença (nível de significância menor que 0,05) até 30 dias de estudo, mas após este período verificou-se comportamento contrário (**Tabela 18 e 19**). Pelo gráfico de tendência observou-se diminuição na concentração de ácido ascórbico em função do tempo (**Figura 28**). Como o material de acondicionamento foi frasco branco leitoso, verificou-se que foi eficaz na proteção da formulação frente à radiação luminosa, porque de acordo com a literatura o ácido ascórbico é sensível à luz (FAMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977; GALLARATE et al., 1999). Mesmo que parte dela tenha atravessado a parede do material, não foi suficiente para promover maior degradação do componente ativo mais pronunciadamente quando comparada com a temperatura da geladeira (5 °C).

Na condição de luz solar, os perfis foram semelhantes para todas as formulações como na geladeira, observando-se melhor resposta quando da presença dos antioxidantes, embora entre a glutathione e o metabissulfito de sódio não se observou diferença na atuação.

O mesmo comportamento não foi verificado com as formulações à temperatura de 40 °C, onde verificou-se acentuada degradação do teor de ácido ascórbico no decorrer do tempo. Este fato já era esperado, uma vez que o aumento da temperatura normalmente acelera a velocidade de degradação das substâncias e também porque a vitamina C é sensível a altas temperaturas (CADWALLANGER, 1989; GALLARATE, 1999). Estes resultados foram confirmados pela estatística (**Tabela 18 e 19**), onde a temperatura de 40 °C quando comparada com a de 5 °C e 22 °C demonstraram diferença estatística (nível de significância menor que 0,05). Pelo gráfico de tendência verificou-se esta afirmação onde o teor de ácido ascórbico diminuiu em função da temperatura (**Figura 29**). Comparando-se as 3 formulações,

o controle (**B1**) apresentou queda mais acentuada do teor de ácido ascórbico que as formulações com antioxidantes, sendo que a amostra contendo glutathione (**G1**) apresentou maior estabilidade na condição de 40 °C (**Figura 24**), enquanto que a 5 °C e 22 °C os perfis de decaimento foram semelhantes (**Figura 22 e 23**), concordando com as literaturas que verificaram a diminuição da velocidade de degradação do ácido ascórbico em soluções aquosas e amostras de sangue contendo a glutathione como antioxidante (TOUITOU et al., 1996; LOWIK et al., 1990).

Pela análise estatística do teor de ácido ascórbico nas formulações creme contendo antioxidantes e no controle submetidos às três temperaturas houve diferenças significativas demonstrando a importância da adição dos mesmos em formulações com ácido ascórbico, pois o teor deste princípio ativo decaiu mais lentamente na presença da glutathione e do metabissulfito de sódio (**Tabela 18 e 19**).

Entre os dois antioxidantes não ocorreram diferenças estatísticas (nível de significância menor que 0,05) (**Tabela 18 e 19**). Estes resultados estão de acordo com a literatura onde essas duas substâncias são consideradas “protetoras” do ácido ascórbico (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 1994; TOUITOU et al., 1996; LOWIK et al., 1990).

Embora na prática farmacêutica o metabissulfito de sódio seja o mais utilizado, a glutathione indica potencial de uso interessante e uma alternativa de aplicação como antioxidante na manipulação de fórmulas.

Para produtos cosméticos não são definidos limites de aceitação para as substâncias ativas incorporadas, mas devemos considerar a eficácia e segurança das formulações e, fazendo-se a comparação com os limites farmacopéicos aceitáveis para substâncias ativas incorporadas em medicamentos, podemos considerar que 10 % de queda no teor da substância ativa seria aceitável, considerando a ação cosmética do ácido ascórbico (USP 24, 2000).

Os valores de degradação do ácido ascórbico nas condições de geladeira e luz solar até 90 dias de observação mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis (mínimo 90 %) para as formulações contendo antioxidantes (glutathione ou metabissulfito de sódio) (**Tabela 16**).

Considerando-se as **Figuras 25 a 27**, onde os antioxidantes foram comparados frente às várias condições de temperatura, verificou-se que na condição

de 40 °C a velocidade de degradação foi maior para todas as formulações e mais pronunciada para o controle, sem antioxidantes. Também se observou que nas condições de geladeira e luz solar a degradação foi mais lenta que a 40 °C e similar para todas as formulações.

No estudo do gel fluido extemporâneo, nos resultados indicados pela **Tabela 20 e Figuras 30 a 32**, verificamos que o comportamento de queda do ácido ascórbico para as condições de geladeira (5 °C) e luz solar à temperatura ambiente foi semelhante ao creme e indicou boa estabilidade, com teores mínimos em torno de 92 % (controle - **B2**), no tempo de análise de 26 dias, sendo que o metabissulfito de sódio (**M2**) mostrou-se mais eficiente como antioxidante no final do teste, onde os teores de ácido ascórbico foram 97,57 e 94,54 a 5 °C e 22 °C (**Figuras 30 e 31**), respectivamente. A análise estatística confirmou estes resultados, demonstrando que não houve diferença estatística (nível de significância menor que 0,05) entre as temperaturas de 5 °C e 22 °C e com os antioxidantes entre si (**Tabela 22 e 23**). Este fato é animador, uma vez que formulações extemporâneas similares do mercado (como o Force[®] C e preparações manipuladas) preconizam que o produto contendo ácido ascórbico tem prazo de validade inferior ao estudado nesta pesquisa. Ainda analisando os resultados, o controle mostrou-se muito estável (mesmo sem conter os antioxidantes), embora a presença destes conduziu à maior estabilidade do ácido ascórbico.

Na condição de 40 °C (**Tabela 20 e Figura 32**), verificamos a mesma resposta que no creme, onde o aumento da temperatura é fator determinante na aceleração da degradação do ácido ascórbico. Este resultado foi confirmado pela estatística, onde a temperatura de 40 °C mostrou diferença considerável (nível de significância menor que 0,05) desta temperatura em relação às demais (**Tabela 22 e 23**). A presença de antioxidantes propiciou maior estabilidade do ácido ascórbico no final do teste, com teores superiores (± 10 %) para aquelas obtidas para o controle, o que também foi confirmado pela estatística conforme a (**Tabela 23**) mostrando diferença significativa do controle em relação às formulações contendo antioxidantes.

Nas **Figuras 33 a 35** temos a comparação das formulações nas diversas condições de armazenamento. O comportamento foi similar ao do creme, tanto na

temperatura de 40 °C onde ocorreu degradação mais rápida do ácido ascórbico, como a 5 °C e a 22 °C com perfis de degradação semelhantes.

Pelo gráfico de tendência observou-se diminuição na concentração de ácido ascórbico nas formulações do tipo gel fluido extemporâneo em função do tempo (**Figura 36**) e da temperatura (**Figura 37**).

Pesquisas podem ser complementadas associando-se a vitamina C com outras substâncias antioxidantes, como a vitamina E, ou utilizando-se derivados da vitamina C ou formas vetorizadas, como lipossomas, microcápsulas, ciclodextrinas, entre outras, como alternativa de uso do ácido ascórbico em produtos cosméticos.

CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste trabalho podemos concluir que:

- 1) As bases escolhidas para o creme e para o gel fluido extemporâneo mostraram-se estáveis à incorporação do ácido ascórbico nos estudos realizados.
- 2) A CLAE pode ser utilizada como método analítico no estudo de estabilidade do ácido ascórbico em formulações cosméticas como creme e gel fluido extemporâneo, pois foi validada quanto à linearidade, exatidão e precisão.
- 3) As formulações creme e gel fluido extemporâneo permaneceram mais estáveis a 5 °C, quando comparadas a 22 °C-luz solar e 40 °C.
- 4) A temperatura de 40°C acelerou a decomposição do ácido ascórbico nas formulações creme e gel fluido extemporâneo quando comparada com 22 °C e 5 °C, mesmo contendo os antioxidantes glutathione ou metabissulfito de sódio.
- 5) Considerando o teor de ácido ascórbico no creme e gel fluido extemporâneo durante o teste de estabilidade normal, o metabissulfito de sódio e a glutathione mostraram-se adequados às formulações, sem diferença estatisticamente significativa.
- 6) No gel fluido extemporâneo a durabilidade da formulação foi superior ao previsto, sendo que os teores de ácido ascórbico mantiveram-se superiores a 90 % do valor inicial nas condições de 5 °C e 22 °C, durante o período de 26 dias.
- 7) O ácido ascórbico pode ser manipulado sob forma creme e gel fluido extemporâneo, com estabilidade relativamente superior nas condições avaliadas, considerando-se o preconizado no mercado de produtos cosméticos contendo esta substância ativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000. p.261, 397-438, 493.
- ARYA, S.P.; MAHAJAN, M.; JAIN, P. Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.417, n.1, p.1-14, 2000.
- ASKER, A.F.; CANADY, D.; COBB, C. Influence of dl-methionine on the photostability of ascorbic acid solutions. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v.11, n.12, p.2109-2125, 1985.
- BALL, G.F.M. **Water soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994. p.156-158.
- BARATA, E.A.F. **A cosmetologia: princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 1995. p.13-20, 62, 105-107.
- BENY, M. Fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.12, n.2, p.44-50, 2000.
- BEZERRA, S.V.; REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. São Paulo: Senac, 1996. p.37, 61-63.
- BLAUG, S.M.; HAJRATWALA, B. Kinetics of aerobics oxidation of ascorbic acid in the presence of nonionic surfactants. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.63, n.8, p.1240-1243, 1974.

De acordo com a NBR – 6023/2001 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1999 [Cd-rom].

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters:** introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley, 1978. p.653.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Cosméticos. Câmara Técnica de Cosméticos. Parecer Técnico n 03/01 de 29/06/01. Utilização de vitamina C em produtos cosméticos. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/cosméticos/informa/parecer_vitamina.htm. Acesso em: 27 nov. 2001.

CANTOURNET, B. Food analysis: determination of vitamin C in orange juice by HPLC using ASTED. **Chromatogr. Appl.**, v.5, n.2, p.6-7, 1994.

CARMINI, M.A.; JORGE, M.C.G. Cremes e emulsões cosméticas (conceitos básicos). **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.1, n.5, p.13-22, 1989.

CHARLET, E. **Cosmética para farmacêuticos**. Zaragoza: Acribia, 1996. p.116-117.

CHIARI, M.; NESI, M.; CARREA, G.; RIGHETTI, P.G. Determination of total vitamin C in fruits by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.645, p.197-200, 1993.

CLARO Jr., N.F. Avaliação da estabilidade em cosméticos: testes físico-químicos aplicados a produtos cosméticos em estudo de estabilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2001. p.195-204.

- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BORATO, P.S., coods. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: Unicamp, 1997. p.183-238. (Série manuais).
- COLVEN, R.M.; PINNELL, S.R. Topical vitamin C in aging. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.14, n.2, p.227-234, 1996.
- D'LEON, L.F.P. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.13, n.4, p.54-64, 2001.
- DARR, D.; COMBS, S.; DUNSTON, S.; MANNING, T.; PINNELL, S.R. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.127, p.247-253, 1992.
- DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotions. In: NEWBURGER, S.H.; SENZEL, A.J. **Manual of cosmetic analysis**. 2.ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1977. p.32.
- DE-RITTER, E. Vitamins in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.71, n.10, p.1073-1096, 1982.
- DIAS, R.D.; PERRY, M.L.S. Nutrição e vitaminas. In: ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1994. p.201-230.
- ESTEVE, M.J.; FARRE, R.; FRIGOLA, A.; GARCIA-CANTABELLA, J.M. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood, plasma and serum by liquid chromatography. **J. Chromatogr., Biomed. Appl.**, Amsterdam, v.688, n.2 p.345-349, 1997.
- ESTEVE, M.M. Radicais livres: o que são, como se formam e sua incidência nos processos de envelhecimento. **Aerosol Cosmet.**, Campo Belo, v.12, n.17, p.6-12, 1991.

ESTEVE, M.M.; KRIESTEN, R.M. Estudo de um complexo ativo para prevenção do envelhecimento cutâneo. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.2, n.1, p.31-40, 1990.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p.82-83.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba**. Ribeirão Preto, 1998. 143p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

FOTSING, L.; FILLET, M.; BECHET, I.; HUBERT, P.; CROMMEN, J. Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.15, n.8, p.113-1123, 1997.

FOX, C. Advances in cosmetic science and technology. II. Topical bioactive materials: review. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.109, n.9, p.83-115, 1994.

FREIBERGER, H.; GROVE, G.; SIVARAJAH, A.; PINNELL, S.R. Procollagen I synthesis in human skin fibroblast: effects of culture on biosynthesis. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.75, p.425-430, 1980.

FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, l-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.25, n.7, p.848-873, 1998.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M.E.; TROTTA, M.; BAVO, S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.188, p.233-241, 1999.

GRECO, R.J.M.D. Topical vitamin C. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.105, n.1, p.464-465, 2000.

GUIA dos genéricos. São Paulo: Pharmacopéia (CIL) Brasil, 1999. p.24-29.

WADE, A.; WELLER, P.J., eds. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 2.ed. Washington: American Pharmaceutical Association; London: Pharmaceutical Society of Great Britain, 1994. p.451-453.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.-M. **Manual de cosmetologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p.24-30, 37-40, 190-91.

HIR, A.L. **Farmácia galênica**. 6.ed. Barcelona: Masson, 1995. p.370.

IDSON, B. Vitamins and the skin. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.108, n.6, p.79-94, 1993.

IRACHE, J.M.; EZPELA, I.; VEGA, F.A. HPLC determination of antioxidant synergists and ascorbic acid in some fatty pharmaceuticals, cosmetics and food. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.35, n.3/4, p.232-236, 1993.

JACOB, I.S. Emprego de vitaminas nos produtos cosméticos. **Aerosol Cosmet.**, Campo Belo, v.5, n.23, p.22-23, 1982.

JAFFE, G.M. Vitamin C. In: MACHLIN, L.J., ed. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.211-215. (Food science and technology, 13).

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.271-280.

KARG, G.; WILMOTT, J.; ZNAIDEN, A. Protective role of natural antioxidants. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.102, n.2, p.37-51, 1987.

KARLSON, P.; WOLFGANG, G.; GROSS, W. **Patobioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.126-127, 236-237.

KASSEM, M.A.; KASSEM, A.A.; AMMAR, H.O. Studies on the stability of injectable L-ascorbic acid solutions. III. Effect of metal-complexing agents. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v.47, p.89-97, 1971.

KELLER, L.K.; FENSKE, N.A. Uses of vitamins A, C, and E related compounds in dermatology: a review. **J. Am. Acad. Derm.**, Saint Louis, v.39, n.4, p.611-625, 1998.

KHURY, E. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 2001. p.191-192.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress: new approaches for their evaluation. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v.53, p.181-192, 1999.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALIER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.662-663.

LARISCH, B.; GROSS, U.; PISCHESTSRIEDER, M. On the reaction of L-ascorbic acid and varying amounts of propylamine under various conditions: quantification of the main products by HPLC with diode-array detection. **Z. Lebensm. Unters. Forsch. A**, Berlin, v.206, n.5, p.333-337, 1998.

LORAY, Z. Vitamina C: antioxidante e protetor de colágeno. **Rev. Cosmiatria Estet.**, São Paulo, v.7, n.4, p.15-17, 1999.

LOWIK, M.R.; SCHRIJVER, J.; WEDEL, M. Vitamin C analysis in whole blood, plasma and cells using reduced glutathione as preservative (stabilizer):

losses and redistribution. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Bern, v.61, n.1, p.43-45, 1990.

MACEK, T.J. Stability problems with some vitamins in pharmaceuticals. **Am. J. Pharm.**, Philadelphia, v.132, n.12, p.433-455, 1960.

MAGALHÃES, J. **Cosmetologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2000. p.64-65.

MAIA-CAMPOS, P.M.B.G.; BOMTEMPO, E.M.B.G.; LEONARDI, G.R. **Formulário dermocosmético 2**. São Paulo: Tecnopress, 1999. p.61-62.

MARSHALL, P.A.; TRENNERY, V.C.; THOMPSON, C.O. The determination of total ascorbic acid in beers, wines and fruit drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v.33, n.8, p.426-432, 1995.

MARTINS, S. Compatibilidades de componentes ativos em formulações cosméticas. **Rev. Racine**, São Paulo, v.58, n.5, p.50-58, 2000.

MOSER, U.; BENDICH, A. Vitamin C. In: MACHLIN, L.J., ed. **Handbook of vitamins**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. cap.5, p.195-232. (Food Science and Technology, 40).

MOURA, T.; GAUDY, D.; JACOB, M.; CASSANAS, G. pH influence on the stability of ascorbic acid spray-drying solutions. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v.69, p.77-80, 1994.

NATURA. A constituição da pele. Disponível em:

http://www.unetvale.com.br/~natura/conheca/pele/frame_pele.htm. Acesso em: 26 jun. 2002.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Alteração e conservação de medicamentos. Disponível em: <http://www.farmabrasil.hpg.ig.com.br/org2.htm>. Acesso em: 26 jun. 2002.

OWEN, D.R. Anti-aging technology for skincare 1999. **Global Cosmet. Ind.**, Duluth, v.164, n.2, p.38-43, 1999.

PACHLA, L.A.; REYNOLDS, D.L.; KISSINGER, P.T.; Analytical methods for ascorbic acid in biological samples, food products and pharmaceuticals. **J.-Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.68, n.1, p.1-12, 1985.

PAPADOYANNIS, I.N.; TSIONI, G.K.; SAMANIDOU, V.F. Simultaneous determination of nine water and fat soluble vitamins after SPE separation and RP-HPLC analysis in pharmaceutical preparation and biological fluids. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, New York, v.20, n.19, p.3203-3231, 1998.

PELLETIER, O. Vitamin C (L- ascorbic and dehydro-L-ascorbic acids) In: AUGUSTIN, J.; KLEIN, B.P.; BECKER, D.; VENUGOPAL, P.B. **Methods of vitamin assay**. 4.ed. New York, Chichester: John Wiley, 1985. p.303-341.

PEREIRA, J.C. Despigmentantes cutâneos. **Rev. Cosmiatria Med. Estet.**, São Paulo, v.1, n.2, p.6-12, 1993.

PINNELL, S.R.; YANG, H.S.; OMAR, M.; RIVIERE, N.M.; DE-BUYS, H.V.; WALKER, L.C.; WANG, Y.H.; LEVINE, M. Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies. **Dermatol. Surg.**, New York, v.27, n.2, p.137-142, 2001.

PINNELL, S.R. Vitamina C tópica. **Rev. Cosmiatria Med. Estet.**, São Paulo, v.3, n.4, p.31-36, 1995.

- PODDA, M.; TRABER, M.G.; WEBER, C.; YAN, L.J.; PACKER, L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.24, n.1, p.55-65, 1998.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992a. v.1, p.962, 1061.
- PRISTA, L.N.; BAHIA, M.F.G., VILAR, E. **Dermofarmácia e cosmética**. Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1992b. v.1, p.15-136.
- RESENDE, M.R.P.L. Vitamina C: a nova vedete do setor cosmético. **Phorma Cosmetol.**, São Paulo, v.7, n.6, 1996.
- RIBEIRO, A.M. **Desenvolvimento de produtos cosméticos: teste de estabilidade**. São Paulo: ANVISA, 2001. n.p. [Apostila].
- RIBEIRO, A.M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, São Paulo, 1996. **Anais**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 1996. p.349-375.
- ROCHA FILHO, P.A.; OLIVEIRA, A. Disponibilidade do ácido ascórbico na presença de tensoativos não iônicos e umectantes. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, São Paulo, 1992. **Anais**. São Paulo: 1992. p.82-91.
- RODRIGUES, P.C.; SALKA, B.A. Seleção de emolientes. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.13, n.3, p.64-69, 2001.
- ROPKE, C.D.; BARROS, S.; SAWADA, T.C.H.; BERNUSSO, L.C.; SILVA, V.; BARROS S.B.M. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothmorphe umbellata* L. Miq na pele. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

COSMETOLOGIA, São Paulo, 2000. **Anais.** São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2000. p.483-500.

RUBIN, S.H.; DE-RITTER, E.; JOHNSON, B. Stability of vitamin C (ascorbic acid) in tablets. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.65, n.7, p.963-968, 1976.

RUSSELL, L.F. High-performance liquid-chromatographic determination of vitamin C in fresh tomatoes. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.6, p.1567-1568, 1986.

SAMPAIO, A.C. **Preparações farmacêuticas para tratamento das discromias (hipo e hiperpigmentação) da pele.** Curitiba: Consulcon Consultoria de Cosméticos, 1998. 69p. [Apostila].

SANCTIS, D.S. Emulsões para uso externo. **Rev. Racine**, São Paulo, v.53, n.6, p.53-63, 1999.

SILVA, G.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Influence of a formulation's pH on cutaneous absorption of ascorbic acid. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.116, n.1, p.73-75, 2001.

SILVA, G.M.; SEMPRINI, M.; LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Emprego do ácido ascórbico e derivados em cosméticos; estudos de estabilidade, absorção cutânea e avaliação histopatológica. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, São Paulo, 1996. **Anais.** São Paulo, 1996. p.347-348.

TAGAWA, M.; UJI, K.; TABATA, Y. Fosfato de ascorbil magnésio em preparações dermatológicas. **Rev. Cosmiatria Med. Estet.**, São Paulo, v.2, n.2, p.36-43, 1994.

- THIELE, J.J.; DREHER, F.; PACKER, L. Antioxidant defense systems in skin. In: ELSNER, P.; MAIBACH, H.I., eds. **Cosmeceuticals: drugs versus cosmetics**. New York: Marcel Dekker, 2000. p.145-187. (Cosmetic science and technology, v.23).
- THORMAHLEN, S. Vitamins in cosmetic fomulations. a new generation of produtos. In: INTERNATIONAL FEDERATION SOCIETIES OF COSMETIC CHEMISTS, 21, Berlin, 2000. **Anais**. Berlin: IFSCC, 2000. p.459-467
- TOKGOZ, N.S. **Optimization d'une emulsion multiple H/L/H renfermant de l'acide ascorbique, étude de liberation et evaliation cosmetique**. Paris, 1996. 213p. Dissertação de Doutorado - Faculté de Pharmacie de Chatenay, Malabry - Université Paris XI.
- TOMIS, R.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of tablets containing aspirin, acetaminophen and ascorbic acid by high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.73, n.12, p.1830-1833, 1984.
- TOUITOU, E.; ALKABES, M.; MEMOLI, A.; ALHAIQUE, F. Glutathione stabilizes ascorbic acid in aqueous solution. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.133, p.85-88,1996.
- TRENTMANN, B.; BÖTTCHER, A.; WESTENFELDER, H. A stable vitamin C derivative for sophisticated skin care formulations with proven effects against free radical injury and for efficient skin whitening. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 12, São Paulo, **Anais**. São Paulo, 1998. p.50-54.
- TUAN, S.H.; WYATT, J. Separation of erythorbic acid from ascorbic acid by HPLC. **J. Micronutr. Anal.**, Barking, v.3, n.2, p.119-128, 1987.

UNITED States Pharmacopeia: 24 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000. p.2149-2152.

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

VELASCO-DE-PAOLA, M.V.R.; RIBEIRO, M.E., YAMAMOTO, J.K. Multifuncionalidade das Vitaminas. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.10, n.4, p.44-54, 1998.

VIGLIOGLIA, P.A.; RUBIN, J. **Cosmiatria II.** 2.ed. Buenos Aires: Americana de Publicaciones, 1991. p.22-74.

WAGNER, E.S.; BARRY, L.; COFFIN, R.D. High-performance liquid chromatographic of ascorbic in urine. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.163, p.25-29, 1979.

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

WITTERN, P.; ANSMANN, A.; HÜTTINGER, R.; BILLEK, D.; CHARLET, E.; HOENEN, L.; KUCZERA, K.; MOTITSCHKE, L.; QUACK, J.; SEIB, K.; UMBACH, I.; WOLFF, G. Stability testing of Cosmetic Emulsions. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v.100, n.10, p.33-39, 1985.