UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E
MEDICAMENTOS
ÁREA DE PRODUÇÃO E CONTROLE FARMACÊUTICOS

ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS
ANTIENVELHECIMENTO COM HIDROLISADO DE PROTEÍNA DO
ARROZ (*Oryza sativa*)

Carolina Zanolini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof^a Dr^a Erika Rosa Maria Kedor- Hackmann

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E
MEDICAMENTOS
ÁREA DE PRODUÇÃO E CONTROLE FARMACÊUTICOS

ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS
ANTIENVELHECIMENTO COM HIDROLISADO DE PROTEÍNA DO
ARROZ (*Oryza sativa*)

Carolina Zanolini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof^a Dr^a Erika Rosa Maria Kedor- Hackmann

São Paulo
2011

Carolina Zanolini

Estabilidade de formulações cosméticas antienvelhecimento com
hidrolisado de proteína do arroz (*Oryza sativa*)

Comissão Julgadora
De
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profª Drª Erika Rosa Maria Kedor- Hackmann
orientador/presidente

1ºExaminador

2º Examinador

São Paulo, _____ de _____ 2011

*"Se um dia você tiver que escolher
Entre o mundo e o amor
Lembre-se: se escolher o mundo
Ficará sem o amor,
Mas se você escolher o amor,
Com ele conquistará o mundo"
(ALBERT EINSTEIN)*

*À Deus,
Pelo amor e pela minha vida.
Aos meus pais, que me ajudaram a trilhar meus caminhos, e me
ensinaram que a única herança que podiam deixar para toda vida era o
valor do estudo e da educação.
Ao meu marido, meu maior incentivador,
e cúmplice nas horas mais difíceis .
E ao meu filho Guilherme,
Que é a razão do meu viver.
Amo muito vocês.*

*À Professora Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
Obrigada pela preciosa oportunidade e orientação.
Obrigada pela chance de crescimento profissional e
Principalmente pessoal.
É grande minha admiração.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Maria Inês R. M. Santoro pelo espaço, pelos conselhos e carinho.

À Vanessa Franco Tavares, uma pessoa que se tornou essencial, por todo apoio, e fez uma grande diferença e tudo ficou mais fácil para mim. Obrigada pela amizade.

À Cibele Lima, pela amizade, apoio e aprendizado. Você se tornou mais que uma colega de mestrado, uma amiga muito importante para a minha vida.

A Drª Kátia Ribeiro, por sua amizade, que mesmo distante fez tudo o que pode para me ajudar.

A minha grande amiga Maria Eugênia Ayres, que viabilizou a manipulação das minhas formulações.

A Mariana, Debora, Túlia, Helen, Vivian e Daniele pela amizade, carinho, conselhos, muitas risadas, pela troca de experiências e por todos bons momentos.

À funcionária Iria pela amizade, carinho e apoio e aos colegas do laboratório de Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos pela amizade, troca de experiências e colaboração.

Ao querido Profº Dr. Jivaldo do Rosário Matos pela ajuda e por ceder o laboratório para tantos experimentos.

A Profªa Drª Silvia Berlanga e ao Drº Diogo Pineda Rivelli pelo o apoio e a ajuda na realização de testes no laboratório de patologia.

A Drª Maria Anita Mendes pelos conselhos e apoio na realização dos testes no laboratório Semi –Industrial da Faculdade de Engenharia Química, e ao seu técnico Rodrigo Ricardo Ramos.

A Farmácia Buenos Aires, e seus proprietários Marisa Marques e Sérgio Marques, por permitirem o uso de seus laboratórios na manipulação das minhas formulações.

Ao Programa de pós- graduação em Fármaco e Medicamento, todos os professores e funcionários pela grande oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram de alguma forma no desenvolvimento desta dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 Introdução, Objetivos e Revisão Bibliográfica

FIGURA 1: ESTRUTURA DA PELE. (HTTP://PT.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/PELE#ANATOMIA . ACESSO EM ABR/ 2009.	6
FIGURA 2: LIGAÇÃO PEPTÍDICA. (HTTP://SITES.GOOGLE.COM/SITE/SANABRIAJ/AULA2). ACESSO EM JUN/2011	12
FIGURA 3: FORMAÇÃO DA MICELA DAS EMULSÕES HTTP://REVISTAESCOLA.ABRIL.COM.BR/ENSINO-MEDIO/SEGREDO-CREMES-501911.SHTML . ACESSO EM: NOV/2010.	16
FIGURA 4: ALTERAÇÃO QUE PODEM SER PERCEBIDAS APÓS A PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES. HTTP://SPARROR.CUBECINEMA.COM/CUBE/COLA/CHEMISTRY/COLA1.HTM . ACESSO EM JUL/2010.....	17
FIGURA 5: TERMOBALANÇA TGA-50 HTTP://ALLCHEMY.IQ.USP.BR/CROMATOGRAFANDO/DESTAQUES/SINC-ANALTERM.HTML ACESSO EM: AGO/2010.	23
FIGURA 6: CÉLULA DSC 50 HTTP://ALLCHEMY.IQ.USP.BR/CROMATOGRAFANDO/DESTAQUES/SINC-ANALTERM.HTML ACESSO EM: AGO/2010.	24
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DE UM EQUIPAMENTO DE CLAE HTTP://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:HPLC.GIF ACESSO EM: OUT/2010.....	27

Capítulo 2-Estabilidade Físico-Química e Térmica.

FIGURA 1: ASPECTO DAS FORMULAÇÕES: (A) F1, (B) F2, (C) F3, (D) F1 + COLHIBIN®, (E) F1+ NUTRIPEPTIDES®, (F) F3+ NUTRIPEPTIDES® E (G) F3+ COLHIBIN® APÓS AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PELA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR (TESTE DO ESTRESSE TÉRMICO).	53
FIGURA 2: ASPECTO DAS FORMULAÇÕES: (A) F1, (B) F2, (C) F3, (D) F1+ NUTRIPEPTIDES® , (E) F1+ COLHIBIN®, (F) F3+ COLHIBIN® E (G) F3+ NUTRIPEPTIDES® , APÓS AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PELA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR (TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO).	53
FIGURA 3 : VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE (EM CP), DAS FORMULAÇÕES F1, F2 E F3 NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E ESTUFAS (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C), EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) E FREEZER (-10±0,5°C), NO ESTUDO DE TEA (CONDUZIDA EM VISCOSÍMETRO COM SPINDLE 96 (T-F)).	56

FIGURA 4 : VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE (EM CP), DAS FORMULAÇÕES F1, F1+ NUTRIPEPTIDES®, E F1+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E ESTUFAS (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C), EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) E FREEZER (-10±0,5°C), NO ESTUDO DE TEA (CONDUZIDA EM VISCOSÍMETRO COM SPINDLE 96 (T-F)).	57
FIGURA 5 : VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE (EM CP), DAS FORMULAÇÕES F3, F3+ NUTRIPEPTIDES®, E F3+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E ESTUFAS (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C), EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) E FREEZER (-10±0,5°C), NO ESTUDO DE TEA (CONDUZIDA EM VISCOSÍMETRO COM SPINDLE 96 (T-F)).	58
FIGURA 6 : VARIAÇÃO DO PH DAS FORMULAÇÕES F1, F2 E F3 NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E ESTUFAS (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C), EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) E FREEZER (-10±0,5°C), NO ESTUDO DE TEA.	59
FIGURA 7 : VARIAÇÃO DO PH DAS FORMULAÇÕES F1, F1+ NUTRIPEPTIDES®, E F1+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E ESTUFAS (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C), EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) E FREEZER (-10±0,5°C), NO ESTUDO DE TEA.	60
FIGURA 8 : VARIAÇÃO DO PH DAS FORMULAÇÕES F3, F3+ NUTRIPEPTIDES®, E F3+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E ESTUFAS (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C), EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) E FREEZER (-10±0,5°C), NO ESTUDO DE TEA.	61
FIGURA 9 : VARIAÇÃO DO VALOR DA VISCOSIDADE (EM CP), DAS FORMULAÇÕES F1, F1+ NUTRIPEPTIDES®, E F1+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E EM ESTUFAS (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C) E EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) NO TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (CONDUZIDA EM VISCOSÍMETRO COM SPINDLE 96 (T-F)).	64
FIGURA 10 : VARIAÇÃO DO VALOR DA VISCOSIDADE (EM CP), DAS FORMULAÇÕES F3, F3+ NUTRIPEPTIDES®, E F3+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E EM ESTUFAS (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C) E EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) NO TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (CONDUZIDA EM VISCOSÍMETRO COM SPINDLE 96 (T-F)).	65
FIGURA 11 : VARIAÇÃO PERCENTUAL DO VALOR DE PH DAS FORMULAÇÕES F1, F1+ NUTRIPEPTIDES®, E F1+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E EM ESTUFAS (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C) E EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) NO TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL.	66
FIGURA 12 : VARIAÇÃO PERCENTUAL DO VALOR DE PH DAS FORMULAÇÕES F3, F3+ NUTRIPEPTIDES®, E F3+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM LUZ SOLAR E EM ESTUFAS (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C) E EM REFRIGERADOR (5,0±0,5°C) NO TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL.	67

FIGURA 13: VARIAÇÃO PERCENTUAL DA MASSA DAS FORMULAÇÕES F1, F1+ NUTRIPEPTIDES®, F1+ COLHIBIN®, F2, F3, F3+ NUTRIPEPTIDES®, E F3+ COLHIBIN® NAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM CICLOS -10/+45, 0±0,5°C, LUZ SOLAR, E EM ESTUFAS (37,0±0,5°C /40,0±0,5°C/ 45,0±0,5°C), EM TEMPERATURA AMBIENTE (24,0±2,0°C) EM REFRIGERADOR 5,0±0,5°C , NOS TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA E NORMAL.....	69
FIGURA 14. - CURVAS TG E DSC DO COLHIBIN® E DO NUTRIPEPTIDES® OBTIDAS A 10°C MIN ⁻¹ , SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR SINTÉTICO (TG) E N ₂ (DSC).....	71
FIGURA 15.- CURVAS TG E DTG DA FORMULAÇÃO F1 E DA FORMULAÇÃO F1 ASSOCIADO AO COLHIBIN® OBTIDAS A 100C.MIN-1, SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR SINTÉTICO.	72
FIGURA 16.- CURVAS TG E DTG DA FORMULAÇÃO F1 E DA FORMULAÇÃO F1 ASSOCIADO AO NUTRIPEPTIDES® OBTIDAS A 10°C.MIN ⁻¹ , SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR SINTÉTICO.	73
FIGURA 17.- CURVAS TG E DTG DA FORMULAÇÃO F2 E DA FORMULAÇÃO F2 ASSOCIADA AO COLHIBIN® OBTIDAS A 100C.MIN-1, SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR SINTÉTICO.	74
FIGURA 18.- CURVAS TG E DTG DA FORMULAÇÃO F2 E DA FORMULAÇÃO F2 ASSOCIADA AO NUTRIPEPTIDES® OBTIDAS A 10°C.MIN ⁻¹ , SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR SINTÉTICO.	75
FIGURA 19.- CURVAS TG E DTG DA FORMULAÇÃO F3 E DA FORMULAÇÃO F3 ASSOCIADA AO COLHIBIN® OBTIDAS A 10°C.MIN ⁻¹ , SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR SINTÉTICO.....	76
FIGURA 20.- CURVAS TG E DTG DA FORMULAÇÃO F3 E DA FORMULAÇÃO F3 ASSOCIADO AO NUTRIPEPTIDES® OBTIDAS A 10°C.MIN ⁻¹ , SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR SINTÉTICO.	77

Capítulo 3-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas

FIGURA 1: CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE NUTRIPEPTIDES® 1:100 (v/v); CONDIÇÕES: COLUNA LICHROSPHER® 100 RP-18 , 5µm (125 x 4 MM), VOLUME DE INJEÇÃO 30µL; VAZÃO: 0,4 mL MIN-1, TAMPÃO A: ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO 0,2% (TFA) EM ÁGUA; TAMPÃO B, ACETONITRILA; GRADIENTE DE SOLVENTE, 5-55% B EM 30 MIN; DETECÇÃO A 215 NM.....	88
FIGURA 2: CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE COLHIBIN® 1:100 (v/v); CONDIÇÕES: COLUNA LICHROSPHER® 100 RP-18 , 5µm (125 x 4 MM), VOLUME DE INJEÇÃO 30µL; VAZÃO: 0,4 mL MIN-1, TAMPÃO A: ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO 0,2% (TFA) EM ÁGUA; TAMPÃO B, ACETONITRILA; GRADIENTE DE SOLVENTE, 5-55% B EM 30 MIN; DETECÇÃO A 215 NM.....	89

FIGURA 3: CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE NUTRIPEPTIDES® 1:100(v/v); CONDIÇÕES: SHIM-PACK XR ODS (2x5MM), VOLUME DE INJEÇÃO 30µL; 0,2ML MIN⁻¹, TAMPÃO A: ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO 0,2%(TFA) EM METANOL; GRADIENTE DE SOLVENTE 5-50% EM 20 MIN; DETECÇÃO A 215NM.90

FIGURA 4: CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE COLHIBIN® 1:100(v/v); CONDIÇÕES: SHIM-PACK XR ODS (2x5MM), VOLUME DE INJEÇÃO 30µL; 0,2ML MIN⁻¹, TAMPÃO A: ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO 0,2%(TFA) EM METANOL; GRADIENTE DE SOLVENTE 5-50% EM 20 MIN; DETECÇÃO A 215NM.91

Capítulo 4-Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* (DPPH e ORAC)

FIGURA 1. – CURVA DE DECAIMENTO DE ABSORBÂNCIA DO DPPH FRENTE À ADIÇÃO DE COLHIBIN®.....99

FIGURA 2. - CURVA DE DECAIMENTO DE ABSORBÂNCIA DO DPPH FRENTE À ADIÇÃO DE NUTRIPEPTIDES®.100

FIGURA 3. - ÁREA SOB A CURVA DE DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE COLHIBIN® PELO MÉTODO DE ORAC.....101

FIGURA 4. - ÁREA SOB A CURVA DE DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE NUTRIPEPTIDES® PELO MÉTODO DE ORAC.101

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Capítulo 2-Estabilidade Físico-Química e Térmica.

QUADRO 1. DENOMINAÇÕES QUÍMICAS, COMERCIAIS E A FUNÇÃO DOS COMPONENTES EMPREGADOS NO DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES-TESTE ANTIENVELHECIMENTO CONTENDO O DI, TRI PEPTÍDEO DO ARROZ (<i>ORYZA SATIVA</i>) (GALENA, 2008; SARFAM, 2008; OPÇÃOFENIX, 2009; PHARMANOSTRA, 2009; PHARMASPECIAL, 2009; VIAFARMA, 2009)	43
QUADRO 2. COMPOSIÇÃO (%P/P) DAS FORMULAÇÕES-TESTES ANTIENVELHECIMENTO ((1)NUTRIPEPTIDES®,(2)COLHIBIN®).....	45
TABELA 1: AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES NO ESTUDO DA AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO E ESTRESSE TÉRMICO)	52
TABELA 2: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS (COR E ODOR), DAS FORMULAÇÕES F1, F2, F3, F1	55

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µg mL ⁻¹	Micrograma por mililitros
µL	Microlitro
µmol	Micromol
AAPH	2,2' azobis(2-amidinopropane(dihydrochloride))
AL	Ácido Lipóico
ANTIOX	antioxidantes
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APE	Avaliação Preliminar de Estabilidade
Asc	Ácido Ascorbico
AU	Ácido Úrico
CAR	Carotenóides
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE –EM	Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas
CLAE-RMN	Cromatografia Líquida com Ressonância Magnética
-COOH	Grupo Carboxila
CoQ	Coenzima Q
DPPH	2,2' –difênol -1 - picrilhidrazil
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Derivada da Termogravimetria
EM	Espectrometria de Massas
eq	equivalente
g	grama
GSH	Lutational
GSHPX	Glutational Peroxidase
H ₂ O	água
INCI-Name	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>

MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número de amostras
N₂	Nitrogênio
-NH₂	Grupo Amina
nm	Nanômetros
ORAC	<i>Oxygen Radical Capacity Assay</i>
PRX	Peroxirredoxinas
ROS	Espécies de Oxigênio reativas
Rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
TEA	Teste de Estabilidade Acelerada
TEN	Teste de Estabilidade Normal
TFA	Ácido Trifluoroacético
TG	Termogravimetria
TGA	Análise Termogravimétrica
TMA	Análise Termomecânica
TRX	Tiorredoxinas
UV-vis	Ultravioleta Visível
v/v	Volume/ volume
α-TH	α-tocoferol

SUMÁRIO

Capítulo 1-Introdução, Objetivos e Revisão Bibliográfica.....	1
1 .Introdução	2
2. Objetivos	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1. Estrutura da Pele	5
3.1.1. Epiderme	6
3.1.2. Derme	7
3.1.3. Hipoderme.....	8
3.1.4. Fibras de Colágeno	9
3.1.5. Funções da Pele	9
3.2. Envelhecimento Cutâneo.....	10
3.3. Peptídeos	12
3.4. Estabilidade das Formulações	15
3.4.1. Estudos de Estabilidade	19
3.4.1.1. Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE).....	20
3.4.1.2. Teste de Estabilidade Acelerada (TEA).....	20
3.4.1.3. Teste de Estabilidade Normal (TEN)	21
3.5. Análise Térmica	22
3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	25
3.7. Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas.....	27

3.9. Antioxidantes	28
3.9.1. Avaliação da Atividade Antioxidante 'in vitro'	29
3.9.1.1. Determinação da atividade pela reação com DPPH (2,2' –difênil – 1 – picrilhidrazil)	30
3.9.1.2. Determinação do potencial antioxidante por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	31
4. Referências Bibliográficas	32
Capítulo 2-Estabilidade Físico-Química e Térmica.....	39
1.Introdução.....	40
2. Material e Métodos	41
2.1. Equipamentos.....	41
2.2. Matérias-primas	41
2.3. Material de acondicionamento	44
2.4 Preparo das Formulações.....	46
2.5. Avaliação preliminar da Estabilidade (APE).....	47
2.5.1. Teste de Centrifugação	47
2.5.2. Teste de Estresse Térmico	47
2.6. Teste de Estabilidade Acelerada (TEA).....	47
2.6.1. Condições dos Testes.....	48
2.7. Teste de Estabilidade Normal (TEN)	48
2.7.1. Condições do Teste.....	49
2.7.2. Critérios de Inclusão e Exclusão para TEA e TEN.....	49
2.8. Análise Estatística dos Resultados	50

2.9. Análise Térmica	51
2.9.1. Termogravimetria (TG) / Termogravimentria Derivada (DTG)	51
2.9.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
3. Resultados e Discussão	52
3.1. Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE).....	52
3.2. Teste de Estabilidade Acelerada (TEA).....	54
3.3. Teste de Estabilidade Normal (TEN)	63
3.4. Análise Térmica	71
4. Conclusão	78
5. Referências Bibliográficas	79
Capítulo 3-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas	82
1.Introdução.....	83
2. Material e Métodos	84
2.1. Ensaios cromatográficos preliminares	85
2.1.1. Preparo da fase móvel	86
3. Resultados e Discussão	88
4. Conclusão	92
5. Referência Bibliográfica	93
Capítulo 4-Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH e ORAC)	94
1.Introdução:.....	95
2. Material e Métodos	96
2.1. Equipamentos.....	96

2.2. Reagentes	96
2.3. Avaliação do potencial antioxidante in vitro das duas amostras de proteína hidrolisada de arroz	97
2.3.1. Determinação da atividade antioxidante pela reação com DPPH (2,2' – difenil – 1 – picrilhidrazil).....	97
2.3.1.1. Cálculo	97
2.3.2. Determinação do potencial antioxidante por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	98
2.3.2.1 Cálculo	98
3. Resultados e Discussão	99
3.1. Determinação da atividade antioxidante pela reação com DPPH (2,2' – difenil – 1 – picrilhidrazil).....	99
3.2.Determinação do potencial antioxidante por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	100
4.Conclusão	103
5.Referências Bibliográficas	104
Capítulo 5-Conclusão Geral e Perspectivas Futuras	105
1.Conclusão Geral.....	106
2. Perspectivas Futuras	108
Anexos	109

RESUMO

Estabilidade de formulações cosméticas antienvhecimento com hidrolisado de proteína do arroz (*Oryza sativa*)

O hidrolisado de proteína do arroz (*Oryza sativa*) apresenta à habilidade de aumentar à produção de fibroblastos e colágeno, devido a esta especificidade, cada vez mais a indústria cosmética mostra interesse em utilizar peptídeos como ativo de suas formulações. O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da estabilidade de formulações cosméticas com ou sem a presença das amostras da proteína hidrolisada do arroz por métodos físico-químico e térmico. Ainda como objetivo desenvolvimento de metodologias analíticas para a separação e identificação das amostras de hidrolisada de proteína do arroz; e a verificação de sua atividade antioxidante. Foram desenvolvidas formulações cosméticas para a incorporação destas amostras e realizou-se um estudo de estabilidade físico-química e térmica. As características físicas e organolépticas do estudo em questão foram obtidas. As formulações aprovadas apresentaram um pequena variação no valor do pH. Em seguida as formulações aprovadas foram estudadas com a incorporação dos ativos de hidrolisado de proteína do arroz e aprovadas. Para a determinação da estabilidade térmica das amostras de hidrolisado de proteína do arroz nas preparações cosméticas foi utilizada a termogravimetria/termogravimetria derivada para a pesquisa. Foi desenvolvido método para avaliação da atividade antioxidante das amostras de hidrolisado de proteína do arroz que mostrou uma variação de atividade $\pm$ de 4 vezes entre as amostras. Foram desenvolvidos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas para a separação e identificação dos peptídeos presentes no estudo nas amostras contendo hidrolisado de proteína do arroz.

Palavras- Chaves: hidrolisado de proteína do arroz, estabilidade, formulações cosméticas, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, análise térmica, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Stability of cosmetic formulations with aging hydrolyzed protein in rice (*Oryza sativa*)

The peptides are being widely used in cosmetics, since they act on specific receptors in cells and organs. In particular the hydrolyzed rice (*Oryza sativa*) protein has the ability to increase the production of fibroblasts and collagen. This study aims to assess the stability of cosmetic formulations, with or without the presence of hydrolyzed samples of rice protein, by thermal and physical-chemical methods, the development of analytical methodologies for the separation and identification of samples of hydrolyzed rice protein and the determination of the antioxidant activity of these samples. Cosmetic formulations have been developed and studies of physical and chemical stability and heat resistance were carried out. The physical and organoleptic characteristics were also studied. It was observed that the approved formulations presented small pH variation. They were then studied with the incorporation of hydrolyzed rice protein samples, and approved. To determine the thermal stability of hydrolyzed rice protein samples in cosmetic preparations, analytical techniques as thermogravimetry / derivative thermogravimetry were used in this research. A method was developed to evaluate the antioxidant activity of hydrolyzed rice protein samples, which showed a variation of activity ± 4 times between samples. Methods have been developed by high performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for separation and identification of peptides present in the studied samples containing hydrolyzed rice protein.

Key Words: Hydrolyzed rice protein, stability, cosmetics, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, thermal analysis, antioxidant activity.

Capítulo 1

Introdução, Objetivos e Revisão Bibliográfica

1. Introdução

A palavra cosmético deriva da palavra grega *καλλυντικά*, que significa “hável em adornar”. O uso de cosméticos é conhecido há centenas de anos, existem evidências arqueológicas do uso de cosméticos para embelezamento e higiene pessoal desde 4000 anos antes de Cristo. Os primeiros registros tratam dos egípcios, que pintavam os olhos com sais de antimônio, para proteger sua pele das altas temperaturas e secura do clima desértico da região. Os egípcios recorriam à gordura animal e vegetal, cera de abelhas, mel e leite no preparo de cremes para a pele. Existem registros de que a rainha Cleópatra se banhava com leite para manter pele e cabelos hidratados.

Os gregos e romanos foram os primeiros povos a produzir sabões, que eram preparados a partir de extratos vegetais muito comuns no Mediterrâneo, como o azeite de oliva e o óleo de pinho, e também a partir de minerais alcalinos obtidos a partir da moagem de rochas. Atores do teatro romano eram grandes usuários de maquiagem para poderem incorporar diferentes personagens ao seu repertório. Pastas eram produzidas misturando óleos com pigmentos naturais extraídos de vegetais (açafrão ou a mostarda) ou de rochas. Mortes por intoxicação eram comuns entre os atores, pois muitos dos pigmentos minerais da época continham chumbo ou mercúrio em sua composição.

O aumento do interesse da manutenção da eterna juventude faz a indústria cosmética buscar cada vez mais soluções para alcançá-la. Com isto sempre surgem novos princípios ativos que prometem retardar o envelhecimento cutâneo, através do combate aos radicais livres, da manutenção da viscoelasticidade e hidratação da pele. A resolução nº 79 de 28 de Agosto de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária define cosméticos como: “Preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, ou mantê-los em bom estado”. (ANVISA, 2004)

Para Bahia (1998) o cosmético deve ser visto com a função de higiene, hidratação, proteção e estimulação da pele e seus anexos. Existe também o termo “cosmecêuticos” para formulações multifuncionais, onde são veiculados diversos

ativos com funções terapêuticas diferentes. (BAHIA, 1998; KLIGMAN, 2002)

O interesse pelo arroz em uso cosmético aconteceu quando se observou que a pele das mãos das pessoas que produziam o sakê, a bebida destilada do arroz, parecia mais macia e suave. A partir disso, surgiram vários estudos para investigar as propriedades do arroz e foi descoberto que sua composição é rica em proteínas, água e amido. Essas proteínas podem ser quebradas em partes menores chamadas peptídeos, que são mais facilmente absorvidos pela pele. (WANKENNE; FANIA, 2004)

Os peptídeos têm sido amplamente usados em cosméticos por apresentarem diferentes funções: fatores liberadores de hormônios, neuropeptídeos, neurotransmissores, substratos de proteases, efeito cicatrizante, regenerador da matriz celular, reparos nas rugas, aumento do espessamento da pele e melhora de sua firmeza. (MACHADO et al., 2004; LINTNER, 2008)

Uma emulsão é constituída de dois ou mais líquidos imiscíveis, total ou parcialmente, como óleo e água, onde um líquido (a fase dispersa) existe na forma de gotículas suspenso na outra (a fase contínua). Como a superfície de cada gota é uma interface entre as moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, é inerentemente instável termodinamicamente. Além disso, a estabilidade da emulsão pode ser afetada por uma série de condições externas – ambientais. Durante o armazenamento de uma emulsão uma variedade de características poderá causar a instabilidade da emulsão ao longo do tempo. Por isso os formuladores têm recorrido à teoria e experimentações científicas que eram exclusivas ao desenvolvimento de preparações farmacêuticas. (SANTOS, 2006)

O presente trabalho investiga as diferenças físico-químicas, comportamentais e estruturais de dois ativos cosméticos comercialmente direcionados a formulações magistrais que possuem a mesma finalidade e a mesma Nomenclatura (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient- INCI Name*).

2. Objetivos

Objetivos do presente trabalho:

- Geral:

- Avaliação da estabilidade e caracterização físico e físico-química de formulações cosméticas com e sem a incorporação do ativo- hidrolisado de proteína do arroz.

- Específicos:

- Desenvolvimento das formulações cosméticas;
- Estudo da estabilidade físico-química das formulações com ou sem a incorporação do ativo - hidrolisado de proteína do arroz;
- Comportamento térmico das formulações adicionadas do ativo - hidrolisado de proteína do arroz;
- Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a separação e identificação do ativo - hidrolisado de proteína do arroz;
- Verificação da atividade antioxidante do ativo - hidrolisado de proteína do arroz.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Estrutura da Pele

A pele está estruturada em três camadas, sendo a superficial conhecida como epiderme, de espessura muito fina, como uma folha de papel, e dividida em duas faces, uma superficial e outra mais profunda. A camada média da pele é conhecida como derme, onde se encontram os anexos cutâneos, como glândulas sudoríparas, écrinas, apócrinas, pêlos, glândulas sebáceas, unhas, além de ser o tecido de sustentação, por onde passam inúmeros vasos sanguíneos e nervos. O que a separa da epiderme é a membrana basal epidérmica. A terceira camada e mais profunda é a hipoderme, constituída por uma faixa gordurosa, formada pelo tecido adiposo, que se amolda aos músculos subjacentes. (PEYREFITTE *et al*, 1998)

A pele não é apenas o maior órgão do corpo humano, mas também um dos mais complexos. Ela apresenta diferentes tipos de células na sua estrutura (além de células transitórias do sistema imune e circulatório) e desempenha diversas funções, como defesa, função sensorial, de excreção e controle da temperatura. (MENON, 2002; HARDING, 2004)

Figura 1: Estrutura da pele. (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pele#Anatomia>. Acesso em Abr/ 2009).

3.1.1. Epiderme

A face superficial apresenta o orifício pilossebáceo ou *ostia folliculares*, por onde escorre o sebo e de onde emergem os pêlos, e os poros, por onde surge o suor. Os elementos solúveis em água que se encontram na película cutânea de superfície são responsáveis pela sua acidez, o que é revelado pelo pH ácido da pele que varia entre 5 e 6. (PEYREFITTE *et al*, 1998)

Sustâncias químicas, com exceção da água, só conseguem permear a pele através das camadas lipídicas presentes entre as células. Esse mecanismo permite que essa camada seja nutrida pela derme por capilaridade, já que é uma camada avascular. (BENY, 2000; HARRIS, 2003)

Sendo avascularizada, a epiderme é suprida com nutrientes oriundos da derme. Também atua como repositório dos fatores de crescimento, enzimas, entre outros. (IOBST *et al*, 2006)

A epiderme é dividida em cinco camadas, que são definidas pela posição,

forma, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos (BOUWSTRA *et al*, 2006; HARRIS, 2003; LEONARDI, 2004): - estrato basal que contém 70% teor água e é a camada mais profunda da epiderme; - estrato espinhoso, caracterizada pela abundância de desmossomos, além de organelas típicas e de queratina, as células possuem vesículas que contém discos lipídicos compostos por fosfolipídios, colesterol e glicosilceramida; - estrato granuloso, contém grânulos de queratohialina, importante para o material citoplasmático do estrato córneo, e produz grânulos com glicosaminoglicanas, que impermeabiliza a água e outras moléculas; - estrato lúcido, característico de pele espessa (palma das mãos e plantas dos pés), ausência de núcleos celulares; - estrato córneo, camada superficial, contém 20% de água, formada por células achatadas que se “descamam” continuamente e necessitam de substituição, serve como barreira física às ondas luminosas e térmicas, aos microorganismos e à maioria dos agentes químicos. (ROSS *et al*, 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MENON, 2002; HARDING, 2004)

A epiderme possui superfície irregular, e apresenta depressões, como as rugas, que são as mais profundas e visíveis a olho nu; existe também uma rede microdepressinária de superfície, visível, sobretudo no microscópio; e as impressões digitais. A face profunda forma a junção dermoepidérmica, que é a zona de amarração da epiderme e da derme, esta junção se apresenta como uma linha ondulada. (PEYREFITTE *et al* 1998)

3.1.2. Derme

A derme está localizada abaixo da epiderme, sendo separada pela membrana basal. É formada por um tecido conjuntivo, constituído de vasos e nervos, tecido este responsável pelo suporte estrutural da pele e pela nutrição da epiderme e seus apêndices, além de proteger o corpo contra lesões mecânicas. Em seu interior, há glândulas sebáceas, raízes dos pêlos e músculos. É um tecido de sustentação da epiderme, dando a epiderme a sua consistência e seu tônus. (HERNANDEZ, FRESNEL, 1999; HARRIS, 2003; MAC-MARY, *et al*, 2006)

A derme é formada por células fixas (fibroblastos), células migratórias (macrófagos, linfócitos, granulócitos) e matriz extracelular, composta de fibras (de

colágeno, elástica) que se banham de substância fundamental, que é constituída por água, sais minerais e macromoléculas, representadas pelos glicoaminoglicanos, mucopolissacarídeos e pelas glicoproteínas de estrutura. (IOBST *et al*, 2006)

A célula fixa é o fibroblasto, que possui um corpo celular achatado, de forma estelar ou alongado como um fuso. Os fibroblastos possuem finos prolongamentos de citoplasma. Os fibroblastos sintetizam as diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz extracelular. O colágeno é fabricado no interior dos fibroblastos sob a forma de uma molécula elementar e tropocolágeno. No interior dos fibroblastos, as moléculas de tropocolágeno formam fibras de reticulina que se encontram essencialmente na derme superficial. Outro grupo de fibrilas elementares que conduz à formação das fibras de colágeno são maiores, cilíndricas e de grande comprimento, e elas se agrupam em feixes. As fibras elásticas são fibras isoladas, também produzidas pelos fibroblastos, que se organizam em uma rede constituída por uma proteína, a elastina. (PEYREFITTE *et al*, 1998)

As fibras têm a função de unir a epiderme e a derme. Fibras elásticas, formadas por elastina, interceptam as bandas de colágeno. Essa rede de fibras confere propriedades mecânicas para a pele; o colágeno fornece à pele resistência frente à força mecânica e as fibras elásticas restabelecem a forma após deformação, atuando como suporte físico e fisiológico para a epiderme, gerando firmeza, força e propriedades elásticas para a pele, garantindo suporte para as estruturas anexas, vasculares e nervosas. (HARRIS, 2003; IOBST *et al*, 2006)

3.1.3. Hipoderme

A hipoderme, também chamada de tecido subcutâneo, vascularizado, formado por tecido conjuntivo adiposo, tem a função mecânica de amortecimento, sobretudo ao nível dos órgãos internos, e função de isolante térmico, tornando-se essencial na termogênese e, conseqüentemente, na regulação homeotérmica. (STEVENS, LOWE, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999)

A hipoderme está envolvida com a lipogênese, armazenamento da gordura e lipólise, sendo influenciada por fatores nutricionais e hormonais. (HERNANDEZ, FRESNEL, 1999; HARRIS, 2003)

3.1.4. Fibras de Colágeno

A molécula básica do colágeno é uma fibra constituída por três cadeias de aminoácidos, apresentando aproximadamente 1.000 aminoácidos em cada cadeia. Esta molécula é formada por um polipeptídio, onde a glicina é o único pequeno aminoácido da molécula, e cada tipo diferente é expresso por uma sequência diferente de genes. Na pele, o colágeno encontra-se organizado basicamente em camadas laminares de fibrilas, traçado em diversos ângulos. Na membrana basal, temos principalmente o colágeno IV, disposto na forma de uma rede entrelaçada, enquanto na derme reticular, temos agrupamentos de feixes paralelos unidos transversalmente. (HARRIS, 2003; SCOTTI, VELASCO, 2003)

A forma característica do colágeno é de tripla hélice com um alongamento de uma cadeia mais ou menos rígida, formada por meio de glicina contida nessas cadeias. A rigidez, tensão e estabilidade da molécula dependem da prolina que fornece ao colágeno, resistência às proteases, com exceção da collagenase. Com o decorrer da idade, a tripla hélice se contrai e forma uma proteína sem estrutura ordenada (gelatina), e essa força de contração é maior com o decorrer da idade. (SCOTTI, VELASCO, 2003)

A síntese do colágeno depende da produção do procolágeno, um precursor insolúvel secretado pelos fibroblastos no meio intracelular, onde é degradado enzimaticamente a um monômero solúvel formando três cadeias pró-alfa. Essas cadeias diferem das cadeias finais do colágeno por possuírem resíduos polipeptídicos nas suas extremidades. (HARRIS, 2003)

A família dos colágenos é constituída por mais de 12 tipos, dos quais participam da pele os tipos: I, III, IV, V, VI e VII. (HARRIS, 2003)

3.1.5. Funções da Pele

A principal diferença entre a pele e os demais sistemas epiteliais é o fato de a pele estar exposta a um ambiente externo extremamente agressivo, enquanto os demais sistemas epiteliais estão protegidos, por exemplo, da radiação solar e das intempéries. Dessa forma, a pele pode ser encarada como a fronteira mediadora entre o organismo e o ambiente. (HARRIS, 2003)

A camada mais externa da epiderme é constituída por células mortas, imperceptíveis, designadas para resistir ao estresse mecânico. Está envolvida firmemente com células lisas, cimentadas por lipídios e proteínas que servem como uma barreira impermeável para o ambiente, garantindo a proteção da pele contra injúrias químicas e biológicas. A ação protetora contra raios solares ultravioletas, causadores do fotoenvelhecimento cutâneo é garantida pelos queratinócitos basais. (IOBST *et al*, 2006)

Sensibilidade ao toque, à dor e à temperatura representa uma função importante para a manutenção do equilíbrio fisiológico, já que a pele é a estrutura que viabiliza o contato do organismo com o meio externo. Tal propriedade permite a captação de estímulos nervosos, transmitindo-os ao sistema nervoso central, que responde ao estímulo, fornecendo ao organismo as ferramentas necessárias para reagir de acordo com determinada situação. (SHAI *et al*, 2006)

A pele ainda apresenta um mecanismo de eliminação de substâncias nocivas e tem a capacidade de se regenerar facilmente, além de apresentar ação imunológica devido à presença de células de Langerhans. (PYHN, SANTOS, 2002)

A absorção de fármacos pela camada córnea e pelos folículos pilossebáceos, permite que formulações terapêuticas cutâneas possam ser administradas com vantagem ao paciente, em formas como fitas adesivas transdérmicas. Essa absorção será influenciada pela integridade e espessura da epiderme, hidratação do estrato córneo, lipossolubilidade, vasodilatação, e ações mecânicas e elétricas. (HERNANDEZ, FRESNEL, 1999)

A má hidratação altera a função de barreira da pele, deixando-a mais vulnerável a esforços internos e externos. O rompimento da barreira de permeabilidade está associado à irritação e à inflamação da pele, em parte por causa da atração de células inflamatórias que geram radicais livres reativos. (DUPONT, *et al* 2011)

3.2. Envelhecimento Cutâneo

Existem diferentes teorias que explicam o envelhecimento. Uma das mais abrangentes é a teoria dos radicais livres, outras são a teoria do encurtamento dos telômeros e a teoria do envelhecimento mitocondrial que propõem que o envelhecimento celular seja causado pelas lesões acumuladas principalmente no

DNA mitocondrial, inviabilizando a atividade de produção de energia das células. (HARRIS, 2003)

O envelhecimento cutâneo, um fenômeno biológico complexo, consiste em dois componentes principais: um ocasionado por fatores genéticos (cronoenvelhecimento ou envelhecimento intrínseco) e outro gerado por fatores ambientais, principalmente pela exposição solar (fotoenvelhecimento, envelhecimento extrínseco ou envelhecimento actínico). Em ambos, pode-se observar a atuação dos chamados radicais livres. (HARRIS, 2003; SCOTTI, VELASCO, 2003)

O envelhecimento intrínseco é resultante do declínio “geneticamente programado” das funções vitais que garantem o bom funcionamento do organismo. Enquanto que o denominado envelhecimento extrínseco, consistem na exposição da pele a diversas agressões como radiação ultravioleta, poluição atmosférica, hábito de fumar e metabólitos de substâncias ingeridas ou inaladas. As manifestações clínicas correspondentes a essas agressões são irregularidades de pigmentação, rugas e uma variedade de lesões malignas. (ENJELKE *et al.*, 1997; STEINER, 1995; YAAR *et al.*, 2002)

Os sinais clínicos do envelhecimento incluem a perda da firmeza e elasticidade cutânea, bem como aprofundamento das linhas de expressão. As principais características histológicas são a atrofia epidérmica, o achatamento da interface derme-epiderme e atrofia dérmica, alterando assim a sua capacidade de proliferação e de reparo. (HERMITTE, 1992; GIACOMONI, D’ALESSIO, 1996)

As modificações biológicas são provocadas pela diminuição da capacidade proliferativa das células e pela redução da capacidade biosintética, diminuindo assim a síntese da matriz extracelular da derme. (HARRIS, 2003) Uma das manifestações mais importantes do envelhecimento é o achatamento da junção dérmica-epidérmica e a perda das papilas dérmicas. Este achatamento diminui as trocas nutricionais e a evacuação de subprodutos metabólicos entre a derme e a epiderme. Essa zona é constituída por vários tipos de fibrilas de ancoragem como o colágeno IV, que é essencial para a estabilidade mecânica da pele. A diminuição do colágeno IV começa a partir dos 35 anos, enfraquecendo a estrutura da pele e contribuindo para a formação de rugas. (DUPONT, *et al* 2011)

3.3. Peptídeos

A formação de um peptídeo se dá através de uma ligação, denominada ligação peptídica, que é a união do grupo amino ($-NH_2$) de um aminoácido com o grupo carboxila ($-COOH$) de outro aminoácido (FIGURA 2), através da formação de uma amida. A partir de dois aminoácidos forma-se uma molécula denominada dipeptídeo e o encadeamento de vários aminoácidos formam uma macromolécula protéica chamada de polipeptídeo ou cadeia polipeptídica.

FIGURA 2: Ligação peptídica. (<http://sites.google.com/site/sanabriaj/aula2>). Acesso em Jun/2011

Para não confundir peptídeo com proteína, deve-se lembrar que peptídeo contém menos resíduos de aminoácidos, a sua maioria não possui uma estrutura terciária definida, quando em meio aquoso. Já as proteínas possuem muitos resíduos de aminoácidos (+ de 100 aminoácidos) e massa molecular elevada (entre 15.000 e 20.000.000) (BAILEY, 1990)

Os peptídeos constituem uma classe de compostos químicos que exercem uma grande variedade de funções biológicas importantes nos organismos. São biomoléculas que contém de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Se comparados às proteínas, são quimicamente mais versáteis, pois podem ser amidados ou esterificados em suas carboxilas terminais, acetilados em seus grupos amino terminais, fosforilados ou sulfatados em um ou mais resíduos (serina, treonina ou tirosina), lineares, semi-cíclica (geralmente via uma ou mais ligações dissulfeto intra- ou intercadeias peptídicas) ou cíclicos (via ligação entre os grupos amino e carboxila dos

aminoácidos terminais). (MACHADO *et al.*, 2004)

Com a descoberta de que os peptídeos poderiam ser sintetizados, tornou-se possível a obtenção dos mesmos em quantidades suficientes para o estudo de suas propriedades biológicas e dos mecanismos de ação. (WRIGHTON *et al.*, 1996; LECONT *et al.*, 1998)

Os peptídeos podem ser uma mistura indefinidas de fragmentos de proteínas, obtidas pela hidrólise parcial do colágeno, elastina, queratina, trigo ou outras proteínas vegetais, ou serem sintetizados obtendo-se uma seqüência bem definida e característica de aminoácidos. (LINTNER, 2008)

Como são mediadores em sistemas biológicos complexos e regulados precisamente, os peptídeos possuem uma combinação de flexibilidade e funcionalidade que dão a eles um contrabalanço de propriedades de adaptabilidade e especificidade. (STRUTHERS *et al.*, 1996)

Os peptídeos são muito interessantes, especialmente aqueles com seqüência definida. A maioria desses peptídeos age em receptores precisos das células e órgãos. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, antibióticos naturais, adoçantes ou substratos de protease. Alterações nos aminoácidos que compõem os peptídeos, quase sempre, levam a alterações na potência, tipo ou duração da atividade. (LINTNER, 2008; MACHADO *et al.*, 2004.

Os peptídeos funcionam como ativadores de uma reação química. A ligação do peptídeo ao receptor deflagra alterações conformacionais nesta estrutura de transmembrana, o que leva a uma nova cascata de efeitos na bioquímica do interior da célula. Assim, o receptor age como um transistor na eletrônica: uma minúscula quantidade de sinal (peptídeo) pode levar a eventos macroscópicos, como a síntese de colágeno. (LINTNER, 2008)

Na área de cosmetologia a cada ano surgem novos produtos contendo substâncias ativas, dentre estas, proteínas e peptídeos estão sendo amplamente utilizados em produtos cosméticos com finalidades hidratante e antienvelhecimento, destacando-se a mistura de di e tripeptídeos (hidrolisado da proteína do arroz), entre outros. (ANCONI, 2008)

A mistura de di e tripeptídeos de arroz (*Oryza sativa*) tem uma estrutura otimizada (<1.355 Daltons) e apresenta a característica de ser rapidamente assimilável, estimulando as funções metabólicas das células. Os pequenos

peptídeos ganharam destaque no tratamento da pele por constituírem um novo e altamente efetivo enfoque dentro do sofisticado mercado atual de produtos para tratamento da pele, ao mesmo tempo, são livres de riscos. As limitações do uso dos peptídeos no tratamento da pele repousam na solubilidade, biodisponibilidade e características de penetração, parâmetros de estabilidade e de compatibilidade com a formulação. (LINTNER, 2008; MOREAU, *et.al*, 2003; LINTNER; PESCHARD, 2000)

A origem dos peptídeos e sua alta potência em baixa concentração, em conjunto com a rápida eliminação destes na corrente sanguínea, são de grande importância para seu uso em aplicações em seres humanos: baixa dose, pequena permanência e identificação com moléculas endógenas fazem dos peptídeos uma família de ingredientes ativos muito seguros e efetivos, especialmente no caso de cosméticos. (LINTNER, 2008)

Os peptídeos apresentam também diferentes funções, sendo que dentre elas podemos citar sua atuação como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, antibióticos naturais, adoçantes ou substratos de proteases. (MACHADO *et al.*, 2004)

Dentre as várias atividades cosméticas, propriedades e apelos dos peptídeos pode-se citar, primeiramente, seu efeito cicatrizante, regenerador da matriz celular, pois estimula a síntese de colágeno, fibronectina e glicosaminoglicana, propiciando reparos nas rugas, aumentando o espessamento da pele e assim melhorando sua firmeza. Entre outras atividades cosméticas temos a modulação da síntese de melanina nos melanócitos; o estímulo da lipólise para emagrecimento e apelos anticelulite; as propriedades antiinflamatórias produzidas pela redução da secreção da interleucina; e o estímulo ao crescimento de cabelos e/ ou a prevenção da perda de cabelos. (LINTNER, 2008)

O di, tripeptídeo de arroz (*Oryza sativa*) é um peptídeo de sinais, pois tem habilidade de aumentar a produção de fibroblastos e colágeno, inibir a collagenase, enzima responsável pela degradação de colágeno tipo I, podendo melhorar assim a aparência clínica das rugas causadas pelo crono e fotoenvelhecimento. (LUPO; COLE 2007)

A adição de peptídeos em formulações dermocosméticas requer uma série de cuidados, como por exemplo, a comparação de sua estabilidade física e efeito sensorial, devendo ser utilizados em concentrações adequadas para exercer os

efeitos esperados e em veículos que favoreçam a estabilidade do produto final. (GUARATINI *et al*, 2003)

3.4. Estabilidade das Formulações

A estabilidade é a propriedade que os produtos cosméticos apresentam em manter de forma inalterada as suas características físicas, como: cor, odor, textura, consistência, sensação ao tato e comportamento reológico. (D'LEÓN, 2001)

Estabelecendo-se as características do produto e as especificações que devem ser mantidas, são realizados os testes de controle de qualidade. A estabilidade pode ser estudada e determinada sob o ponto de vista químico, físico, microbiológico, terapêutico e toxicológico (ANSEL, *et.al*, 2000). Químico - cada ingrediente ativo deve manter a sua integridade química e potência indicada na embalagem dentro dos limites especificados; físico- é a propriedade que os produtos apresentam de manter de forma inalterada as características físicas após a sua fabricação. Dentre as características físicas a não separação das fases é fundamental, pois se isto ocorrer, todas as demais especificações de uma emulsão serão afetadas (SANCTIS, 1999). Aspectos como cor, odor, textura, consistência, sensação de tato, comportamento reológico, são consideradas propriedades físicas; microbiológico - a esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano é mantida, de acordo com os requisitos especificados; terapêutico - o efeito terapêutico permanece inalterado; toxicológico - não ocorre aumento significativo na toxicidade. Os tipos de estudos de estabilidade recomendados para os cremes são os de estabilidade físico-química, microbiológica e de eficácia. Também se recomenda o estudo das propriedades tácteis. (D'LEÓN, 2001)

A estabilidade físico-química é importante para selecionar as condições de armazenagem (temperatura, luz, umidade), escolha do material acondicionamento adequado (vidro, plástico claro, âmbar ou opaco), tipo de tampa e para prever as interações ao misturar ativos e excipientes. (ANSEL *et al*, 2000)

Para o desenvolvimento de uma formulação cosmética estável e segura, é obrigatório à escolha adequada das matérias-primas que farão parte da sua composição, ou seja, estas devem ser compatíveis entre si e com as substâncias ativas selecionadas para atender a indicação de uso do produto. (ANCONI; MAIA

CAMPOS, 2008)

As teorias clássicas de estabilidade de emulsões, segundo Ribeiro (2002), aplicam as teorias da estabilidade de colóides caracterizados como “modelos”. Invariavelmente surgem sistemas diluídos, monodispersos, bifásicos estabilizados com um simples tensoativo. O emulsionante forma um filme monomolecular na interface, onde se introduzem forças repulsivas adicionais (eletrostáticas, entéricas e de hidratação) que formam uma barreira energética, impedindo a coalescência. (RIBEIRO, 2002)

A fase oleosa de uma emulsão é composta por componentes apolares, tais como: gorduras, óleos e ceras e todos os seus derivados, incluindo alcoóis e ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos, glicerídeos e silicones. A fase aquosa é basicamente composta por água e por materiais hidrofílicos, como glicerina ou propilenoglicol. Os emulsificantes, que tornam possível a estabilização da dispersão, são normalmente moléculas que tem uma porção hidrofílica e uma porção lipofílica (Figura 3). (SCHUELLER, ROMANOWSKI, 1998)

Figura 3: Formação da micela das emulsões <http://revistaescola.abril.com.br/ensino-medio/segre-do-cremes-501911.shtml>. Acesso em: Nov/2010.

A emulsão representa um sistema instável do ponto de vista termodinâmico. Todos os líquidos possuem uma baixa energia livre de superfície devido ao fenômeno da tensão superficial e a sua divisão em pequenas gotículas representa um aumento notável desta energia. Para se obter emulsão estável, é preciso recorrer aos tensoativos com propriedades emulgentes ou agentes emulsificantes. Esses emulsificantes podem ser classificados como aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfotéricos, dependendo da natureza do grupo da porção hidrofílica da molécula de emulsificante. (SCHUELLER, ROMANOWSKI, 1998)

Os emulsificantes são utilizados para promover a emulsificação e para

controlar a estabilidade durante a vida das preparações. São moléculas constituídas por uma parte não polar (hidrocarboneto) e uma polar. Como resultado desta estrutura anfifílica, os emulsionantes atraem a fase oleosa e aquosa do sistema, residindo preferencialmente na interface. A sua presença provoca uma diminuição da tensão superficial. (RIBEIRO, 2002)

Algumas alterações podem ser percebidas logo após a preparação das formulações, evidenciadas pela coalescência, floculação e/ou cremeação do sistema. (Figura 4)

Figura 4: Alteração que podem ser percebidas após a preparação das emulsões. <http://sparror.cubecinema.com/cube/cola/chemistry/cola1.htm>. Acesso em Jul/2010.

Coalescência é um processo de aumento do tamanho das gotículas durante o qual estas se juntam para formarem gotículas maiores, e este fenômeno pode levar a separação de fases. (RIEGER, 2001).

Floculação é um fenômeno que pode ser definido como agregação reversível das gotículas da fase interna na forma de agregados tridimensionais. A floculação é influenciada pelas alterações na superfície dos glóbulos emulsionados. Na ausência de uma barreira mecânica (protetora) na interface, e se, uma quantidade insuficiente de emulsificante está presente, as gotículas da emulsão agregam-se e coalescem rapidamente. A floculação difere da coalescência, sobretudo pelo fato do filme

interfacial e as gotículas individuais permanecerem intactas. (RIEGER, 2001)

Cremação ocorre sob a influência da gravidade, as gotículas dispersas tendem a sobrenadar dependendo das diferenças de densidade específica entre as fases dispersa e dispersante, levando à cremação (RIEGER, 2001).

A presença de filmes interfaciais estáveis já não pode ser considerada como papel mais importante na estabilidade, mas outros mecanismos, como por exemplo, a formação de uma estrutura da fase contínua que forma uma barreira reológica, evita o movimento das gotículas. (RIBEIRO, 2002)

São muitos os fatores que influenciam a estabilidade dos produtos cosméticos, desde os componentes e o processo de fabricação até as formas de armazenamento e transporte. Estes fatores podem ser divididos de acordo com a sua origem, como intrínsecos e extrínsecos. (FLEITH, 2007)

Os fatores intrínsecos são determinados por fatores inerentes à formulação, ou seja, relacionados à sua própria natureza e a de seus componentes. As incompatibilidades físicas são observadas por meio de alterações como separação de fases, alteração de cor, formação de precipitados e cristalização. As incompatibilidades químicas, que podem apresentar diversas formas: oxidação (ou óxido-redução), pH, incompatibilidade entre ingredientes da formulação e material de embalagem, incompatibilidade entre componentes da formulação ou hidrólise de componentes. (FLEITH, 2007; BRASIL, 2004)

O principal fator extrínseco é o tempo, uma vez que o envelhecimento do produto pode levá-lo a alterações físico-químicas, microbiológicas e até toxicológicas. A temperatura à qual o produto está exposto é outro fator importante, pode acelerar retardar ou causar instabilidade a um produto, sendo decorrente de processo de fabricação, acondicionamento e transporte inadequados. Por isso, dentre vários tipos de análise que são empregadas para avaliar a estabilidade física de formulações cosméticas, o estresse por armazenagem em temperaturas elevadas, tem sido amplamente empregado, tanto em institutos de pesquisa, quanto em empresas da área de cosméticos. A umidade é outro fator que pode causar alterações físicas e microbiológicas ao produto, alterando seu volume, tornando-o pegajoso e amolecido. (FLEITH, 2007; MAIA CAMPOS; SILVA, 2000; BRASIL, 2004)

A presença de luz e oxigênio pode acelerar o processo oxidativo, interferindo nas características dos produtos e muitas vezes em seus ativos. A vibração, que ocorre principalmente durante o transporte, muitas vezes associada à temperatura,

pode gerar problemas como compactação, separação de fases de emulsões delicadas, e ou perda ou ganho de viscosidade. (FLEITH, 2007; BRASIL, 2004)

A embalagem deve acondicionar o produto de forma segura ao longo de sua vida, a interação produto versus material de embalagem é um fator decisivo para estabilidade do produto. (FLEITH, 2007; BRASIL, 2004)

3.4.1. Estudos de Estabilidade

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos e farmacêuticos procuram fornecer informações que indiquem o grau de estabilidade relativa de um produto nas diversas condições de exposição a que possa estar sujeito, até o encerramento de seu prazo de validade. (BRASIL, 2004)

O desejado é que se provoque a aceleração de envelhecimento, que ocorreria com o produto ao longo do tempo, gerando subsídios para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como: na escolha dos melhores componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado; forma de apresentação; materiais de acondicionamento e embalagens alternativos e a confirmação do prazo de validade estimado. (FLEITH, 2007; RIBEIRO, KHURI, GOTTARDI, 1996)

O estudo ocorre sempre na seqüência (preliminar, acelerado e normal), e tem como objetivo acompanhar o produto em etapas, buscando evidências que possibilitem concluir sobre o perfil da estabilidade do produto. (FLEITH, 2007; BRASIL, 2004)

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

Os estudos de estabilidade geram resultados que são avaliados comparativamente exigindo que os ensaios sejam conduzidos em paralelo com um produto de referência. Este pode ser um produto de mercado, uma formulação recém preparada ou uma amostra armazenada em condições de alteração reduzida,

como refrigerador ($5,0 \pm 0,5$ °C) ou temperatura ambiente ($22,0 \pm 0,5$ °C), ao abrigo da luz e umidade e que conhecidamente preserve as características físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas do produto. (BRASIL, 2004)

3.4.1.1. Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)

A Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE) envolve testes que empregam condições drásticas de temperatura, efeito da gravidade e umidade aplicadas às preparações, selecionando as de melhor desempenho quanto à estabilidade física e físico-química. As preparações são submetidas ao ensaio de centrifugação e banho termostatzado. Esta avaliação permite ao formulador escolher, dentre as várias fórmulas- teste da etapa de desenvolvimento do produto e em concordância com os critérios estabelecidos para a aceitação ou rejeição, qual ou quais estão aparentemente estáveis. (RIBEIRO *et al*, 1996; BRASIL, 2004)

O ensaio de centrifugação pode ser conduzido em temperatura ambiente ($22,0 \pm 0,5$ °C) com duração de tempo 30 minutos a 3.000 rpm. (BABY, 2005; BRASIL, 2004)

O teste envolvendo o banho termostatzado é realizado sob condições controladas e com valores crescentes de temperatura, que devem ser compatíveis com a estabilidade dos componentes da formulação. O ensaio pode ser conduzido elevando-se gradativa e controladamente o valor inicial de temperatura, mantendo-se por determinado período de tempo até atingir um valor máximo. O ensaio pode iniciar a partir de 40°C (temperatura inicial) até o valor de 80°C (temperatura final), elevando-se a temperatura em intervalos de 5 ou 10°C e mantendo 30 minutos para cada valor de temperatura. (MAIA, 2002; BABY, 2005)

3.4.1.2. Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

Ensaio de estabilidade acelerada ou triagem têm como objetivo avaliar interferências e possibilitar ao formulador a escolha de um sistema estável deve ser realização na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus

componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações. (BRASIL, 2004; FLEITH, 2007)

3.4.1.3. Teste de Estabilidade Normal (TEN)

O ensaio da estabilidade normal é também conhecido como estabilidade exploratória. Serve para estabelecer a vida útil do produto, a sua estabilidade e compatibilidade com os materiais de armazenamento. É empregado na fase de desenvolvimento, aplicado em lotes de produção em escala laboratorial e no lote piloto de fabricação, ou ocorrer nos primeiros lotes fabricados. Auxilia na estimativa do prazo de validade. Deve-se realizar sempre que ocorrer alguma mudança na produção (matérias – primas, ativos ou processos de produção), ou quando for alterado o material de acondicionamento. Geralmente tem duração de noventa dias; as formulações em teste são submetidas às condições menos extremas que no teste de estabilidade acelerada. O tempo de duração pode ser estendido por seis meses ou até um ano. O estudo consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. (RIBEIRO *et al* , 1996; MAIA, 2002; BABY *et al*, 2004; FLEITH, 2007)

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

Os limites que definirão a adequação ou não de uma formulação ao uso dependem da natureza do tipo de parâmetro analisado (físico, químico, microbiológico e toxicológico) e dentre estes, verificam-se: características organolépticas (aspecto, cor e odor); teor de ativo; valor de pH e de viscosidade aparente; teste de eficácia de conservantes; identificação e qualificação de produtos

de decomposição, entre outros; do histórico do produto (caso existam similares)(BABY *et al.*, 2004; BRASIL, 2004)

3.5. Análise Térmica

A análise térmica é definida como "grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura e sob uma atmosfera específica" (SILVA *et al.*, 2007).

O conhecimento das propriedades físico-químicas das matérias-primas é fator indispensável durante o desenvolvimento de medicamentos e cosméticos. O planejamento racional de uma formulação deve ser iniciado com a caracterização do princípio ativo em questão, de modo a aperfeiçoar parâmetros de qualidade da forma farmacêutica final (CARDOSO *et al.*, 2005).

As técnicas termoanalíticas mais utilizadas são: termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), e análise termomecânica (TMA). (SILVA *et al.*, 2007)

A TG fornece informações com relação às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura sob determinadas condições atmosféricas. Para os experimentos utiliza-se uma termobalança de alta sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa (**Figura 5**). As informações obtidas são relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. A precisão e a exatidão dos resultados podem ser influenciadas por diversos fatores instrumentais como: razão de aquecimento, atmosfera (N₂, ar, etc.), composição do cadinho entre outros. A primeira derivada da curva TG é a DTG. Nela, os “degraus” que correspondem às variações de massa da curva TG, são apresentados em forma de picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa, deixando as informações, visualmente, mais acessíveis e com melhor resolução. A curva DTG, permite a partir da altura do pico, em qualquer temperatura, obter a razão de Dm (variação de massa) naquela temperatura, obter também obter a temperatura correspondente ao início e final da reação com maior exatidão, e muitas vezes, calcular a Dm no caso de sobreposição de reações

.(RODRIGUES *et al*, 2005; VELASQUEZ *et al*, 2004)

Figura 5: Termobalança TGA-50

<http://allchemistry.iq.usp.br/cromatografando/destaques/sinc-analterm.html>

Acesso em: Ago/2010.

Utilizando apenas a TG é possível, fazer o estudo da decomposição térmica de compostos orgânicos, inorgânicos e de substâncias poliméricas; a corrosão de metais em várias atmosferas em temperaturas elevadas; reações no estado sólido; aquecimento e calcinação de minerais; destilação e evaporação de líquidos; pirólise de carvão, petróleo e madeira; determinação de hidratação, volatilização e conteúdo de cinza; determinar a velocidade de evaporação e sublimação, desidratação e higroscopicidade; análises termogravimétricas automáticas; degradação térmica oxidativa de polímeros; decomposição de material explosivo; desenvolvimento de procedimentos gravimétricos analíticos; estudos de cinética de reação, descoberta de novos compostos químicos, assim como determinações de pressão de vapor e calor de vaporização. (SILVA *et al*, 2007)

O termo Análise Termogravimétrica (TGA) é comumente empregado, particularmente em polímeros, no lugar de TG por ser seu precedente histórico e para minimizar a confusão verbal com TG, a abreviação da temperatura de transição vítrea. Problemas adicionais podem ocorrer em pesquisas computadorizadas, já que ambas as abreviaturas são aceitas pela IUPAC.

A DSC é a técnica de análise, que mede a diferença de energia fornecida à

substância e a um material de referência (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. As curvas podem ser obtidas em equipamentos com compensação de potência, no qual, a amostra e o material de referência são aquecidos em compartimentos separados em condições isotérmicas e submetidos à igual variação de potência de entrada no forno (**Figura 6**). Os eventos apresentados nesta curva são representados em forma de picos, sendo os ascendentes processos endotérmicos e os descendentes exotérmicos, ou em equipamentos com fluxo de calor, no qual, a amostra e o material de referência são colocados em cápsulas idênticas, localizadas sobre o disco termoeletrico e aquecidas por uma única fonte de calor. Os eventos também são apresentados em forma de picos, porém os ascendentes são os exotérmicos e os descendentes são os endotérmicos. (MATOS, MACHADO, 2004)

Figura 6: Célula DSC 50

<http://allchemy.iq.usp.br/cromatografando/destaques/sinc-analterm.html>

Acesso em: Ago/2010.

A associação de dados provenientes dos ensaios de TG/DTG e DSC, melhora a caracterização de materiais, visto que a TG/DTG indica eventos térmicos relacionados a variações de massa, enquanto a DSC detecta eventos associados ou não à perda de massa. Por exemplo, eventos térmicos de origem física, como mudança de estado físico (fusão), podem ser inequivocamente atribuídos a partir da

curva DSC, desde que na mesma faixa de temperatura não forem observados, nas curvas TG/DTG, eventos de perda de massa. Para melhor interpretação dos resultados e evitar possíveis equívocos é imprescindível a comparação das curvas TG/DTG e DSC obtidas nas mesmas condições experimentais. (SILVA, VELASCO, MATOS, 2007)

Na área cosmética alguns autores realizaram estudo termoanalítico (TG/DTG) de um creme anticelulite à base de *Gingko biloba*, *Centella asiática* e *Fucus vesiculosus*. A técnica os auxiliou no estudo da estabilidade térmica e da composição do produto. (MOTHÉ *et al*, 2006)

Foi também analisado o comportamento térmico das substâncias DMAE e ácido ascórbico isoladamente e incorporados em emulsões ou géis. Os autores utilizaram a DSC, a TG e DTG, e os resultados foram importantes para confirmar o grau de pureza destas substâncias, além de contribuir para os estudos de pré-formulação. Segundo os autores, a previsão da estabilidade térmica dos componentes pode auxiliar no controle dos parâmetros dos processos industriais. Isoladamente, o ácido ascórbico foi a substância que apresentou a maior estabilidade. (GUILLEN *et al*, 2006)

SILVA, 1995, avaliou por meio da análise térmica o comportamento térmico de emulsões O/A diferenciando as águas livre e interlamelar. As curvas de DSC caracterizam a liberação de água nos sistemas, mostrando-se compatíveis com as perdas de massa das curvas TG. (SILVA, 1995)

3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é um processo analítico para separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de migração em razão das afinidades relativas por duas fases: a fase móvel (líquida ou gás) e a fase estacionária ou fixa (sólido ou líquido). Os métodos cromatográficos podem ser empregados para identificação qualitativa e determinação quantitativa de espécies separadas. (SKOOG, 1992)

A descoberta da cromatografia como uma técnica analítica é atribuída ao botânico russo M. Tswett, o qual conseguiu separar pigmentos de cloroplastos

contidos em folhas de plantas utilizando um tubo de vidro preenchido com carbonato de cálcio, empregando o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna de vidro. (MORHY, 1976).

A separação cromatográfica é o resultado de interação específica entre as moléculas da amostra e a fase móvel e estacionária. Uma vez que a migração diferencial é dinâmica e depende do equilíbrio de distribuição de cada componente entre a fase móvel e a fase estacionária, a composição de ambas as fases, a temperatura de separação e o fluxo serão as variáveis que afetarão o processo. A mobilidade exibida pelo soluto é dada em função de diferenças na adsorção, partição, solubilidade, pressão de vapor, tamanho da molécula ou densidade de carga iônica. (CASS, DEGANI, 2001; USP, 2007)

Pode-se definir a técnica a partir da forma física do sistema. A fase estacionária pode estar sobre uma superfície planar ou em um tubo cilíndrico, baseando-se nesta a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia planar ou cromatografia em coluna, respectivamente. Considerando o estado físico da fase móvel, tem-se a cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido, a cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás e a cromatografia supercrítica, onde a fase móvel é um vapor pressurizado em temperatura acima de sua temperatura crítica. (SNYDER *et al*, 1997; SKOOG, 1992)

A cromatografia líquida divide-se em dois grupos: a cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde se usam colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão. (SNYDER *et al*, 1997)

A CLAE envolve um sistema onde a fase estacionária, quer seja uma superfície sólida, líquida, uma resina de troca iônica ou um polímero poroso, está retida em uma coluna e a fase móvel é forçada através da mesma sob altas pressões. Os três mecanismos mais usados para realizar a CLAE são: por troca iônica, por partição e por adsorção (Figura 7). (SNYDER *et al*, 1997)

As principais vantagens da CLAE são: alta eficiência através de picos estreitos e bem definidos, alta resolução, análises rápidas, baixos limites de detecção, versatilidade, mecanização, excelente reprodutibilidade e repetibilidade e obtenção de resultados qualitativos e quantitativos confiáveis. Esta técnica ainda pode ser melhorada com a capacidade de ser incorporada a outros sistemas de

detecção como o detector de fluorescência e o espectrômetro de massas. A CLAE possui algumas limitações, tais como o custo da instrumentação e da operação, alto consumo de solventes e necessidade de profissionais capacitados. (COLLINS *et al.*, 2006; HARRIS, 2005)

Apesar das vantagens e desvantagens, a CLAE vem sendo amplamente utilizada na área farmacêutica para análises qualitativas e principalmente quantitativas, o que pode ser confirmado pelo número de trabalhos publicados e confiança na técnica por parte das indústrias e laboratórios farmacêuticos. (HARRIS, 2005)

Figura 7. Representação de um equipamento de CLAE.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC.gif> Acesso em: Out/2010.

3.7. Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas

Os avanços tecnológicos em técnicas analíticas tornaram possíveis os acoplamentos de técnicas de separação com métodos espectroscópicos. Alguns acoplamentos de técnicas como CLAE-EM (cromatografia líquida com espectrometria de massa) e CLAE-RMN (cromatografia líquida com ressonância

magnética nuclear) apresentam muitas vantagens em relação ao isolamento clássico com a utilização de menores quantidades de amostra e o tempo menor de análise. (LEE; KERNS, 1999)

A aplicação da espectrometria de massas (EM) e o seu acoplamento com técnicas de separação em fase líquida, especialmente a cromatografia líquida (CLAE-EM), tem sido reconhecida como a técnica de separação direta mais eficiente em análises e caracterização de produtos naturais. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é capaz de realizar separações delicadas de compostos em uma grande variedade de extratos. A espectrometria de massas (EM), especialmente quando é possível a realização da fragmentação dos compostos (EM/EM), pode ser usada para detectar analitos com maior sensibilidade e seletividade, através da análise da razão massa- carga (m/z). (CHENG *et al*, 2008)

A contribuição da CLAE-EM na pesquisa de produtos naturais é ilustrada pelo incomparável desempenho em várias áreas, incluindo *screenings* preliminares, isolamento e caracterização de compostos, além de controles de qualidade, estudos fármaco- cinéticos para a obtenção de parâmetros referentes à absorção, distribuição, metabolismo e excreção de produtos naturais bioativos. (CHENG *et al*, 2008)

A CLAE-EM ganhou mais atenção na elucidação estrutural devido ao desenvolvimento de interfaces com a ionização por eletrospray. Esse tipo de técnica torna possível analisar biocompostos não voláteis e que apresentam alta massa molecular, fornecendo informação estrutural. (RODRIGUES *et. al.*, 2006)

3.9. Antioxidantes

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação desse substrato. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999)

Os antioxidantes interrompem a reação que leva a formação de uma cadeia de radicais livres. Existem duas propriedades eficientes em um antioxidante: a primeira é que o antioxidante deve reagir rapidamente com o radical livre, gerando um novo radical, a segunda é que as novas espécies de radicais devem ser não-reativas a ponto de não atrair outras moléculas ao redor. (THOMAS, 2000)

As espécies de oxigênio reativas (ROS) geralmente se relacionam à estimulação da expressão de proteínas envolvidas no controle de importantes processos fisiológicos (ciclo celular, resposta imune e neuroregulação). As espécies antioxidantes modulariam negativamente tais funções. O desequilíbrio entre as modulações positivas e negativas levaria ao aparecimento de doenças. Os antioxidantes (ANTIOX) endógenos incluem enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSHPX), peroxirredoxinas (PRX) e tioredoxinas (trx); compostos de baixo peso molecular: ácido úrico (AU); ácido lipóico (AL); coenzima Q (CoQ) e glutathione (GSH); tiol proteínas, como albumina, peroxirredoxinas e tioredoxinas, e proteínas armazenadoras/ transportadoras de íons de metais de transição. As defesas antioxidantes exógenas referem-se aos antioxidantes obtidos por meio da alimentação, sendo os mais estudados o ácido ascórbico (Asc), α -tocoferol (α -TH), carotenóides (CAR) e polifenóis. (CERQUEIRA *et al*, 2007)

Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem captadores de radicais e supressores de estados excitados; sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam ROS e a ligação de íons metálicos a proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes. (CERQUEIRA *et al*, 2007)

3.9.1. Avaliação da Atividade Antioxidante 'in vitro'

A medida da capacidade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes em um extrato ou amostra biológica proporcionando, desta forma, uma análise de parâmetros integrados. A capacidade antioxidante pode ser considerada um marcador sensível e confiável para detectar mudanças no estresse oxidativo *in vivo*, fornecendo ajuda na elucidação de fatores fisiológicos e nutricionais importantes, e ainda, suprimindo informações sobre absorção e biodisponibilidade de compostos antioxidantes. (GHISELLI *et al.*, 2000)

Contudo, é necessário enfatizar que os ensaios realizados *in vitro* são limitados e nem sempre são idênticos aos sistemas biológicos reais. (HUANG *et al.*, 2005)

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são

numerosas e podem estar sujeitas a interferências, por isso, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra. (HUANG *et al.*, 2005; PRIOR *et al.*, 2005) Segundo OU *et al.*, (2001) não é possível medir a atividade antioxidante total usando apenas um método.

3.9.1.1. Determinação da atividade pela reação com DPPH (2,2' –difênil – 1 – picrilhidrazil)

O teste de redução do radical DPPH (2,2' –difênil – 1 – picrilhidrazil) foi primeiramente sugerido em meados de 1950. Tempos depois, o método foi utilizado para determinar a atividade antioxidante de fenóis, alimentos e amostras biológicas. O radical DPPH (2,2' –difênil – 1 – picrilhidrazil) é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. (TOMEI; SALVADOR, 2007)

O método de determinação da atividade antioxidante *in vitro* pela reação com DPPH (2,2' –difênil – 1 – picrilhidrazil) foi inicialmente descrito por Brand-Williams *et al.*, 1995, e apresenta como fundamento a redução do radical (2,2' –difênil – 1 – picrilhidrazil), o qual apresenta um máximo de absorção em 517 nm. Com base no decaimento da absorbância, pode-se avaliar a presença de compostos capazes de doar H, ou seqüestrar o radical, e após o equilíbrio da reação permite calcular a quantidade de antioxidante gasto para reduzir 50% do DPPH. (BUENGER; ACKERMANN, 2006; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995)

Bonina *et al.*, 1998, avaliaram a atividade de extratos *in vitro* usando os métodos de DPPH e *in vitro* do “red orange extract” e os extratos apresentaram forte atividade antioxidante sendo uma excelente aplicação para cosméticos com finalidade antienvhecimento e pós-sol. (BONINA *et al.*, 1998)

O meio de reação é mantido em temperatura ambiente durante todo o ensaio. No esquema abaixo está representada a reação, sendo Z[•] o radical e AH o antioxidante possuidor do íon hidrogênio:

Durante a reação os antioxidantes se transformam em radicais livres que reagem entre si terminando a reação:

3.9.1.2. Determinação do potencial antioxidante por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) foi originalmente desenvolvido por CAO et al. (1993). Este método determina o potencial antioxidante por fluorescência: baseia-se na análise de solução de fluoresceína, adicionada uma solução de AAPH (2,2' azobis (2-amidinopropane (dihydrochloride)), gerador de radical livre que reage com a fluoresceína, consumindo-a. Com base na medida de intensidade de fluoresceína, obtêm-se a capacidade antioxidante da amostra, sendo que na presença de compostos antioxidantes o decaimento da fluorescência é inibido. (OU et al., 2001)

O método não mede apenas a capacidade do antioxidante em seqüestrar os radicais livres, mas leva em consideração o tempo de inibição da oxidação. (TABART et al., 2009)

O efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando-se a área formada abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra versus tempo, quando comparada ao branco, que não apresenta antioxidantes. Inicialmente, o composto fluorescente utilizado para reagir com o radical peroxila formado era a β -ficoeritrina. Mas foi observado que a β -ficoeritrina interagiu com os compostos fenólicos levando a erro. Considerando esta desvantagem, OU et al. (2001) desenvolveram e validaram uma modificação do ORAC usando a fluoresceína como composto fluorescente: esta perdendo a fluorescência inicia a reação com o radical peroxila. Além disso, a fluoresceína mostrou excelente fotoestabilidade, redução dos custos não interagindo com antioxidantes. (OU et al., 2001)

4. Referências Bibliográficas

ANCONI, G.L.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. **Avaliação da estabilidade física e performance de formulações cosméticas contendo diferentes peptídeos.** Dissertação, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

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

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

BABY, A.R; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. **Estabilidade de produtos de aplicação tópica: ensaios aplicados aos produtos cosméticos e dermatológicos emulsionados.** Int. J. Pharm. Compd. (Ed. Bras.), São Paulo, v.6, n.3, p130-139, 2004.

BAHIA M.F.G. Multifuncionalidade dos produtos cosméticos **Cosmetics & Toiletries**, são Paulo, v. 10n. 2 p 44-47, 1998

BAILEY, P.D. **An introduction to peptide chemistry.** Wiley and Sons. New York, USA, 1990, p. 1-9.

BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries**, v. 12, p.44-50, 2000.

BONINA, F.; SAIJA, A.; TOMAINO, A. LOCASCIO, R.; RPISARDA, P.; DEDEREN, J.C. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* photoprotective effect of a red Orange extract. **International Journal of Cosmetic Science**, v.20, p.331-342, 1998.

BOUWSTRA, J.A. PILGRAN, G.S.K. PONEC, M. Struture of Skin Barrier. In: ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. **Skin Barrier.** New York : Taylor & Francis, 2006. Cap. 7, p. 65-88.

BRAND-WILLIAMS W; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss.u.technol.**v. 28, p. 25-30, 1995.

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

BUENGER, J.; ACKERMANN, H. *et al.* An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. **Internacional Journal of Cosmetic Science**, v. 28, p. 135-146, 2006.

CAO, G. H.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v.14, p. 303-311, 1993.

CARDOSO, T.M.; RODRIGUES, P.O.; STULZER, H.K.; SILVA, M.A.S. Physical chemical characterization and polymorphism determination of two nimodipine samples deriving from distinct laboratories. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. V. 31, p. 631-637, 2005.

CASS, Q.B. DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Ed UFScar, 2001, 77p.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, nº. 2, p.441-449, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.U.L.; BONATO, P.S., orgs. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 453p.

CHENG KA-WING; CHEN, F.; WANG, M. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Natural Product Research** In: COLETAGE S.M.; MOLYNEUX R.J. Bioactives Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination, Second Edition, CRC Press, 245-266. 2008.

D' LEON, L. F. P. **Estudo de estabilidade de produtos cosméticos**. Cosmetic & Toiletries, Edição em Português, São Paulo, v. 13, n. 4. p. 54 – 62, 2001.

DUPONT, E.; GOMEZ, J. LÉVEILLE, C. BILODEUA, D. **A hidratação à reposição celular: uma abordagem integral da antienvelhecimento**. Cosmetic & Toiletries, Edição em Português, São Paulo,v. 23, n. 2, 36-49, 2011

ENJELKE, M.; JENSEN, J.M.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; PROKSCH, E. **Effects** of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. **Bristish Journal of Dermatology**, v. 137, p. 219-225, 1997.

FLEITH, E. A. **Estudo de estabilidade fornece informações importantes para formulação e comercialização de cosméticos**. Revista Química e Derivados. V 461, maio, p.56-60, 2007.

GIACOMONI, P.U.; D'ALESSIO, P. Open questions in photobiology. IV. Photoaging of the skin. **Journal of Photochemistry and photobiology**, v. 33, p. 2670272, 1996.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, nº 11, p. 1106-1114, 2000.

GUARATINI, T.; GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Influence of storage conditions in cosmetic stability testing by rheological studies. **Brazilian Journal Pharmacie Science**, v.39, p.97, 2003.

GUILLEN, J. S. Q.; BATISTA, I. A. S. A.; MATOS J.R. Contribuição da análise térmica na avaliação de princípios ativos empregados na prevenção do envelhecimento da pele isolados e/ou incorporados em géis e emulsões. **Cosmetics & Toiletries**, V. 18, nº2, p. 50-52, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. In: **Free Radicals in Biology & Medicine**, 3rd ed. Oxford University Press: Oxford. U.K, 1999.

HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v.17, p. 6-15, 2004.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2005. 876p.

HARRIS, M.I.N.C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3.ed. São Paulo: Senac, 2003, 165p.

HERMITTE, R. Aged skin, retinoids and alpha hydroxy acids. **Cosmetics & Toiletries**, v. 107, p. 63-67, 1992.

HERNANDEZ, M.; FRESNEL, M.M.M. **Manual de Cosmetologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1999, 353p.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – ICH. Instrument: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), November, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: mai/ 2010.

INTERNATIONAL SPECIALTY PRODUCTS. **Skin care**. Disponível em: http://online1.ispcorp.com/en-US/Pages/overview.aspx?BU=Personal_Care&l1=Skin_Care&l2=Anti-aging. Acesso em: mai/ 2008.

IOSBT, S.; SANTHANAM, U.; WEINKAUF, R. Biotechnology in Skin Care (I): Overview. In: LAD, R. **Biotechnology in Personal Care**. New York: Taylor & Francis, 2006. Cap. 5, p. 117-122.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 303-314.

KLIGMAN a. Cosmeceuticos: a terceira categoria **Cosmetics & Toiletries**, v. 14 n. 4 p. 72-76, 2002

LECONT, C.; SABATIER, J.M.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H. Synthetic peptides as tool to investigate the structure and pharmacology of potassium channel-acting-chain scorpion. **Biochimie**, p. 151-154, 1998.

LEE, M.S.; KERNS, E.H. LC/MS applications in drug development. **Mass Spectrometry Reviews**, v.18, p. 187-279, 1999.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004. 234p.

LINTNER, K. Peptídeos, Aminoácidos e Proteínas no tratamento da pele? **Cosmetics & Toiletries**, v.20, n.3, p.42-48, 2008.

LINTNER, K.; PESCHARD, O. Biological active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product. **Internatinal Journal Cosmetics Science**, v.22, n.207, p.207-218, 2000.

LUPO, M.P.; COLE A. Cosmeceutical peptides. **Dermatology. Therapy**, v. 20, p. 343-349, 2007.

MACHADO, A; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.;MIRANDA, M.T.M. Sínteses químicas e enzimáticas de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MAC-MARY, S.; CREIDI, P.; MARSAUT, D.; COURDEROT-MASUYER, C.; COCHET, V.; GHARBI, T.; GUIDICELLI-ARRANZ, D.; TONDU, F.; HUMBERT, P. Assessment of effects of a additional dietary natural water uptake on skin hydration in healthy subjects by dynamic barrier function measurements and clinic scoring. **Skin Research Technology**, v.12, n.3, p.199-205, 2006.

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

MAIA CAMOS, P.M.B.G.; SILVA, G.M. **Estrategias de formulações de shampoos**. **Cosmetic& Toiletries**, Edição em Português, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 44-50, 2000.

MATOS, J. R.; MACHADO, L. D. B. Introdução à Análise Térmica e Termogravimetria. (Cap. 11), **Caracterização de Polímeros**, Artliber editora, p. 209-228, Saõ Paulo 2004.

MENON, G.K. New insights into skin struture: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdan, v.54, p. S3-S17, 2002.

MOREAU, L.; BORDES, S.; JOUANDEAUD, M.; CLOSS, B. Cell adhesion: a new approach to tissue protection. **Cosmetic & Toiletries**, v. 118, n.1, p. 75-84, 2003.

MORHY, L. Cromatografia (I): evolução histórica: a fase antiga **Cienc. Cult.** São Paulo, v. 28, nº 10, p. 1185-1189, 1976.

MOTHÉ, C. G.; CARESTIATO, T.; BUSNARDO, N. G.; GARRIDO, J. Estudo termoanalítico do creme anticelulite à base de *Ginkgo biloba*, *Centella asiática* e *Fucus vesiculosus*. In: Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, 5, Poços de Caldas, 2006. **Livro de resumos**. Poços de Caldas: ABRATEC, p. 351, 2006.

OU, B.; WOODILL-HAMPSCH, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorecein as the Fluorescent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 49, p. 4619- 4629, 2001.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia Geral, Biologia da Pele**. S.1.: Org. Andrei Editora. Ltda, pp. 325-355, 1998.

PRIOR, R. L.; WU, X.; JACOB, R. A.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PYHN, E.G.; SANTOS, M.L. Idade **Biológica: Comportamento Humano e Renovação Celular**. 2.ed. São Paulo: Senac, 2002, p. 152-155.

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

RIBEIRO, H. M. **Teoria de estabilidade de emulsões cosméticas**. Cosmetic & Toiletries, Edição em Português, São Paulo, v.14, jul/ago, p.88-92, 2002.

RIEGER, M. Emulsões In: LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANING, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001, p. 855-906.

RODRIGUES M.V.N.; REHDER V.L.G.; SARTORATTO A.; BOAVENTURAS. J; SANTOS A.S.S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. Construindo a história dos Produtos Naturais 7, 2006.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J. R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização da pureza e cinética de degradação de zidovudina (AZT). **Acta Farm.Bonarense**, v. 24, nº3, p. 383-387, 2005.

ROSS, M.H.; REITH, E.J. ROMRELL, L.J. Histologia: texto e atlas. 2.ed. Rio de Janeiro: Panamericana, 1988, p.347-377.

SANCTIS, D. S. **Emulsões para uso externo**. Revista Racine, São Paulo, n. 53, p. 53 – 62, nov./dez. 1999.

SANTOS O.D.H. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de *Calendula Officinalis* com cristais líquidos Riberão Preto tese (doutorado) 147p Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, Universidade de São Paulo.

SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. **Understanding emulsions**. Cosmetics & Toiletries, Oak Park, v.113, n.9, p.39-44, 1998.

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R., **Envelhecimento Cutâneo à Luz da Cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

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

SHAI, A.; MAIBACH, H.I.; BARAN, R. **Handbook of Cosmetic Skin Care**. London: Martin Dunitz, 2001. 341p.

SILVA, M.A. S; Análise da influência do teor de água em cremes O/A por espalhamento de raios -X em baixos ângulos, microscopia eletrônica de transmissão e análise térmica. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, mestrado, 73p, 1995.

SILVA. E.C.; VELASCO, M.V.R.; MATOS, J. R.. Análise térmica aplicada à cosmetologia. RBCF. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 347-356, 2007.

SKOOG, D.A. **Fundamentals of analytical chemistry**, 6 ed. Fort Worth: Saunders College, 1992, p.300-306, 329-344, 674-683, 725-750.

SNYDER, L.R; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC methods development**. 2 Ed. New York: John Wiley, 1997, 765p.

STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. **Cosmetics & Toiletries**, v. 7, Jul/Ago. p. 29, 1995.

STEVENS, A., LOWE, J.S. **Histologia**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1995, p. 348-368.

STRUTHERS, M.D.; CHENG, R.P.; IMPERIALI, B. Desing of monomeric 23-residue polypeptide with defined tertiary structure. **Science**, v. 271, p. 342-344, 1996.

TABART J; KEVERS C.; PINCEMAIL J.; DEFRAIGNE J.O.; DOMMES J.; Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1226-1233, 2009.

TAVANIERS, I.; LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC, Trends in Analalytical Chemistry**, v.23, p.535-551, 2004.

TOMEI R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós- Graduação**, Universidade do Vale do Paraíba, p. 1963-1967, 2007.

THOMAS, M.J. The Role of free radicals and Antioxidants. **Nutrition**. V.16, nº 7/8, p.716-718, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convection, 2007.

VELASQUEZ A.R.M.; IJO, C.J.; COSTA, I.M.; LONGHINI, R.; PETZHOLD, C.L.; PETROVICK, P. Métodos termo-analíticos e sua aplicação nas ciências farmacêuticas. **Caderno de farmácia**, ISSN 0102-6593, v. 20, p. 29-47, 2004.

WANKENNE, M. A.; FANIA, M. O arroz como ingrediente cosmético. **Cosméticos & Perfumes**. N.30 Abr/Mai. p.32-39, 2004

WRIGHTON, N.C.; FARRELL, F.X.; CHANG, R.; KASHYAP, A.K.; BABONE, F.P. MULCAHY, L.S.; JOHNSON, D.L.; BARRETT, R.W.; JOLLIFFE, L.K.; DOWER, W.J. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. **Science**, v.273, p. 458-463, 1996.

YAAR, M.; ELLER, M.S.; GILCHREST, B.A. Fifty Years Skin Aging. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 7, n. 1, p. 51-58, 2002.

Capítulo 2

Estabilidade Físico-Química e Térmica.

1.Introdução

Sob o ponto de vista cosmético, as emulsões apresentam realçado destaque, sendo o processo de emulsificação uma das ferramentas mais úteis de aplicação cosmética. Uma emulsão é definida como uma mistura termodinamicamente instável de dois líquidos (normalmente água e óleo), praticamente imiscíveis que apresentam uma estabilidade aceitável, devido à ação de um agente emulsificante, capaz de reduzir a tensão interfacial entre dois líquidos. (IDSON, LAZARUS, 2001) Desta forma, um dos líquidos está disperso no outro na forma de gotículas, originando a fase interna (dispersa ou descontínua) e a fase externa (dispersante ou contínua) da emulsão. (SCHUELLER, ROMANOWSKI, 1998)

Dentre os veículos utilizados no desenvolvimento de formas cosméticas destinadas à incorporação de substâncias ativas com atividade antienvhecimento tanto a emulsão como o gel possuem boa aceitação no mercado. Porém como a emulsão é um sistema termodinamicamente instável, exigem um estudo criterioso de sua estabilidade físico-química, que fornecerá indicações sobre seu comportamento e desempenho, no decorrer de determinado intervalo de tempo, conhecido como prazo de validade. (ANSEL *et al*, 2000; RIEGER, 2001)

Para se desenvolver uma formulação para uso farmacêutico/cosmético existe o desafio consiste em produzir um sistema estável durante a vida útil do produto. (SCHUELLER, ROMANOWSKI, 1998)

A adição de peptídeos em formulações cosméticas pode causar instabilidade a estas, tais como diminuição da viscosidade e alteração das características reológicas das mesmas, sendo que a extensão destas alterações depende de vários fatores. Dentro da estabilidade física, estuda-se a consistência e o espalhamento dos produtos que devem ser reproduzidos de lote para lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto acabado. (BONACUCINA *et al* 2005; DI MAMBRO *et al* 2004; D'LEÓN, 2001 MAIA CAMPOS; SILVA, 2000)

2. Material e Métodos

2.1. Equipamentos

- Cadinho de Alumínio com tampa;
- Cadinho de Platina;
- Célula DSC 50 marca Shimadzu®, modelo DSC 50;
- Termobalança marca Shimadzu®, modelo TGA-50;
- Peagâmetro Digimed modelo TE-901;
- Balança Eletrônica BG-2000, marca Gehaka;
- Agitador Mecânico com hélice adaptável marca Nova Ética;
- Viscosímetro marca Brookfield modelo RVT;
- Estufas;
- Centrifuga Eppendorf modelo 5804, com regulação de velocidade, e temperatura;
- Aparelho Milliq-Plus Millipore® para obtenção de água;
- Banho-maria termostatizado Nova Ética, graduação de temperatura entre 40° a 100°C;
- Refrigerador Consul;
- *Frezzer* Consul.

2.2. Matérias-primas

- *Aqua/water*, Água destilada e deionizada;
- Amostras de hidrolisado da proteína do arroz:
 - *Hydrolyzed rice protein*, Colhibin®: constituída de *hydrolyzed rice protein* (10-25%), *aqua/water* (>50%), *glycerin* (10-25%), *phenoxyethanol* (0,1-1%), Pentapharm®;
 - *Hydrolyzed rice protein*, Nutripeptides®: constituída de uma mistura de di e tri peptídeos de arroz, Silab®;
- *Mineral Oil (and) Isopropyl Palmitate (and) Trilaureth-4 Phosphate (and) Rapeseed Oil Sorbitol ester (and) Ammonium Acryloyldimethyltaureate/VP Copolymer*, Hostacerin SAF®, Clariant®;
- *Octyl Stearate*, *Estearato de Octila*;
- *Sclerotium gum*, Amigel®, Alban Muller Internacionall®;

- *Ammonium Acryloyldimethyltaurate/ VP Copolymer, Aristoflex®*, Clariant®;
- *Cethyl Alcohol, Álcool Cetílico*;
- *Cyclopentasiloxale fluid, DC 245®*, Dow Corning®;
- *Cetearyl Olivat, Sorbitan Olivat, Olivem 1000®*, B&T Company®;
- *Propylene Glycol, Propilenoglicol*;
- *Glycerin, Glicerina*;
- *Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, Phenova®, Croda®*.

O **Quadro 1** apresenta a função das matérias primas utilizadas para o desenvolvimento das formulações estudadas.

Quadro 1. Denominações químicas, comerciais e a função dos componentes empregados no desenvolvimento das formulações-teste antienvelhecimento contendo o di, tri peptídeo do arroz (*Oryza sativa*) (GALENA, 2008; SARFAM, 2008; OPÇÃOFENIX, 2009; PHARMANOSTRA, 2009; PHARMASPECIAL, 2009; VIAFARMA, 2009)

INCI NAME	NOME COMERCIAL	FUNÇÃO
<i>Mineral Oil (and) Isopropyl Palmitate (and) Trilaureth-4 Phosphate (and) Rapeseed Oil Sorbitol ester (and) Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer</i>	Hostacerin SAF®	Base auto-emulsionante para emulsão a frio, aniônica.
<i>Octyl Stearate</i>	Estearato de Octila	Emoliente. Éster de excelente espalhamento sensação aveludada e seca à pele.
<i>Propylene Glycol</i>	Propilenoglicol	Umectante. Provém menor viscosidade as formulações
<i>Ammonium Acryloyldimethyltaurate/ VP Copolymer</i>	Aristoflex AVC®	Polímero gelificante sintético aniônico
<i>Cethyl Alcohol</i>	Alcool cetílico	Emulsionante não iônico
<i>Cyclopentasiloxale fluid</i>	DC 245®	Emoliente. Amaciante da pele.
<i>Cetearyl Olivat, Sorbitan Olivat</i>	Olivem 1000®	Cera auto-emulsionante O/A, não iônica.
<i>Sclerotium gum</i>	Amigel®	Polímero gelificante natural Não-iônico.
<i>Glycerin</i>	Glicerina	Umectante. Retém água na superfície da pele.
<i>Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben,. Isobutylparaben.</i>	Phenova®	Agente conservante. Efetivo em concentrações baixas de uso.
<i>Hydrolyzed rice protein</i>	Nutripeptides®	Prevenir o envelhecimento acelerado da pele.
<i>Hydrolyzed rice protein</i>	Colhibin®	Prevenir o envelhecimento acelerado da pele.

2.3. Material de acondicionamento

- Potes de vidro transparentes, boca larga com tampa do tipo rosca translúcida de plástico (PVC) – capacidade 100g. (BRASIL, 2004)

O **Quadro 2** apresenta a composição das formulações desenvolvidas e estudadas no presente trabalho. As formulações foram desenvolvidas a base de polímeros gelificante, goma e base hidratante.

Quadro 2. Composição (%p/p) das formulações-testes antienvhecimento ((1)Nutripeptides®,(2)Colhibin®).

COMPONENTES INCI NAME	%p/p						
	F1	F2	F3	F1 + Nutripeti des®	F3+ Nutripeti des®	F1 + Colhibin ®	F3+ Colhibin ®
<i>Mineral Oil (and) Isopropyl Palmitate (and) Trilaureth-4 Phosphate (and) Rapeseed Oil Sorbitol ester (and) Ammonium Acryloyldimethyltaureate/VP Copolymer</i>	10	-	2,5	10	2,5	10	2,5
<i>Octyl Stearate</i>	6,0	-	-	6,0	-	6,0	-
<i>Propylene Glycol</i>	3,0	-	2,5	3,0	2,5	3,0	2,5
<i>Ammonium Acryloyldimethyltaurate/ VP Copolymer</i>	-	1,4	-	-	-	-	-
<i>Cethyl Alcohol</i>	2,0	-	-	2,0	-	2,0	-
<i>Cyclopentasiloxale fluid</i>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Cetearyl Olivat, Sorbitan Olivat</i>	-	-	2,0	-	2,0	-	2,0
<i>Sclerotium gum</i>	-	1,4	-	-	-	-	-
<i>Glycerin</i>	-	3,0	2,5	-	2,5	-	2,5
<i>Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben.</i>	0,5	0,2	0,8	0,5	0,8	0,5	0,8
<i>Hydrolyzed rice protein(1)</i>				5,0	5,0		
<i>Hydrolyzed rice protein(2)</i>						5,0	5,0
<i>Aqua/Water</i>	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp

2.4 Preparo das Formulações

Formulação F1:

Fase A – adicionou-se o Hostacerin SAF®, Phenova®, DC 245® em água sob agitação;

Fase B – aqueceu-se o álcool cetílico, propilenoglicol e estearato de octila, até 75 °C;

Fase C – aqueceu-se a água até 75 °C;

Verteu-se C em B sob agitação até alcançar 40 °C. Misturou-se com a fase A, completou-se o peso final com água e agitou-se por 30 minutos.

Formulação F2:

Fase A – adicionou-se o Aristoflex AVC®, DC 245®, glicerina, Phenova® em água;

Fase B – aqueceu-se o Amigel® em água, sob agitação até a formação de um gel;

Verteu-se A sobre B completou-se o peso final com a água restante e agitou-se por 30 minutos.

Formulação F3:

Fase A – adicionou-se o Hostacerin SAF®, Phenova®, DC 245® em água sob agitação;

Fase B – aqueceu-se o Olivem 1000®, propilenoglicol e glicerina até 75 °C;

Fase C – aqueceu-se a água até 75 °C;

Verteu-se C em B sob agitação até alcançar 40 °C. Misturou-se com a fase A, completou-se o peso final com água e agitou-se por 30 minutos.

Formulações F1+ Nutripetides® e F3+ Nutripetides®:

Mesma preparação das formulações F1 e F3, porém acrescentou-se o Nutripetideo® após resfriamento.

Formulações F1+ Colhibin® e F3+ Colhibin®:

Mesma preparação das formulações F1 e F3, porém acrescentou-se o Colhibin® após resfriamento.

2.5. Avaliação preliminar da Estabilidade (APE)

2.5.1. Teste de Centrifugação

Foram pesados cerca de 5 g das formulações em tubos para centrífuga. O ensaio de centrifugações foi realizado nas seguintes condições laboratoriais e equipamentos: temperatura ambiente (25 °C); Centrífuga Eppendorf com velocidade de rotação de 3.000 rpm, por 30 minutos.

Após o ensaio as formulações foram analisadas de acordo com o aspecto e classificadas da seguinte maneira:

(IM) – intensamente modificada;

(M) – modificada;

(LM)- levemente modificada;

(N) – normal, sem alteração quando ao aspecto. (RIBEIRO, KHURY, GOTTARDI, 1996)

2.5.2. Teste de Estresse Térmico

Foram pesados cerca de 5 g das formulações em tubos de ensaio. As amostras foram submetidas ao estresse térmico, em banho-maria termostatzado Nova Ética, no intervalo de temperatura controlada entre 40 - 80 °C, com progressão de elevação de 5 °C/30 minutos.(BRACONI *et al*, 1995; MASSON *et al*, 2005)

Após o termino do ensaio, as formulações foram classificadas como no item 2.5.1..

2.6. Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

Após o preparo das formulações e o período de repouso de 24 horas, foram submetidas ao armazenamento, sob condições extremas de temperatura e luminosidade, durante período de tempo pré-estabelecido.

Foram pesadas cerca de 55g das formulações e acondicionadas em frascos de vidro transparente de boca larga, tampa do tipo rosca, de cor translúcida e

capacidade de 100g (amostras em réplicas de triplicatas).

2.6.1. Condições dos Testes

As formulações foram submetidas ao armazenamento em situações de temperatura e luminosidade extremas:

- i. **temperatura ambiente (luz indireta) - $22,0 \pm 0,5$ °C** durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dia.
- ii. **refrigerador, $5,0 \pm 0,5$ °C**, durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dia.
- iii. **ciclos de temperatura, $-10^{\circ}/+37^{\circ} \pm 0,5$ °C** (*freezer* e estufa com trocas diárias de condições), durante 12 dias: 6º e 12º dia.
- iv. ***freezer*, $-10 \pm 0,5$ °C**, durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dia.
- v. **luz solar indireta ou direta com ângulo de incidência da luz de 45º**, durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dia.
- vi. **estufa, $40 \pm 0,5$ °C**, durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dia.
- vii. **estufa $50 \pm 0,5$ °C**, durante 14 dias: análises no 3º, 7º e 14º dia (RIBEIRO *et al* ,1996; BRASIL, 2004; BABY, 2005).

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

2.7. Teste de Estabilidade Normal (TEN)

As formulações consideradas estáveis pelos Testes de Estabilidade Acelerada (TEA) foram submetidas ao Teste de Estabilidade Normal.

Foram pesadas cerca de 55g das formulações e acondicionadas em frascos de vidro transparente de boca larga, tampa do tipo rosca, de cor translúcida e capacidade de 100g, o frasco foi preenchido 2/3 com as formulações e 1/3 do frasco foi deixado vazio para possíveis trocas gasosas, (amostras em réplicas de

triplicatas). (BRASIL, 2004)

2.7.1. Condições do Teste

Condições de armazenamento:

- i. **temperatura ambiente (luz indireta), $22,0 \pm 0,5$ °C**, durante 90 dias: análises no 3°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90°dia.
- ii. **luz solar indireta ou direta com ângulo de incidência da luz à 45°**, durante 90 dias: análises no 3°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90°dia.
- iii. **estufa, $37,0 \pm 0,5$ °C**, durante 90 dias: análises no 3°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90°dia
- iv. **estufa $45,0 \pm 0,5$ °C**, durante 90 dias: análises no 3°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90°dia (RIBEIRO *et al*, 1996; BRASIL, 2004; BABY, 2005).

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

2.7.2. Critérios de Inclusão e Exclusão para TEA e TEN

Os seguintes critérios foram adotados:

- i. **Aspecto, cor e odor:** integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento, sem o aparecimento de cremeação, coalescência, floculação e separação de fases (MASSON *et al*, 2005; BOOCK *et al*, 2005; BOOCK *et al*, 2006);
- ii. **Valor do pH:** em um tubo de ensaio, diluiu-se 1,0g da emulsão em 9,0g de água destilada. As amostras foram homogeneizadas e o valor de pH determinado à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (MASSON, 2005; BOOCK *et al*, 2006);
- iii. **Viscosidade aparente:** admitiram-se modificações, desde que não comprometessem a percepção visual das amostras (BRASIL, 2004);

- iv. **Perda de massa:** admitiram-se modificações acentuadas, em temperaturas elevadas, desde que não comprometessem a percepção visual das amostras.

2.8. Análise Estatística dos Resultados

A análise estatística pode ser uma das ferramentas utilizadas na interpretação dos dados obtidos durante os estudos de estabilidade, para os diversos parâmetros avaliados, em suas diferentes etapas de realização. (BRASIL, 2004)

Os valores de pH obtidos foram submetidos à análise estatística. Os dados obtidos foram divididos em grupos em relação ao tipo de tratamento realizado (F1; F1 +Nutriptides®; F1+ Colhibin®; F2; F3; F3 +Nutriptides®; F3+Colhibin®) e em seguida comparados através de métodos estatísticos para detecção de diferença significativa entre os resultados em cada tempo. O índice de 0,1 foi utilizado como ponto mínimo de aceitação de significância estatística.

Foi utilizado o método de análise de variância “one way” ANOVA que permite a análise de amostras múltiplas. Em seguida para os dados onde foram detectadas diferenças significativas, foi utilizado o teste *t* de *Student* para duas populações, que avalia dados em pares. Os valores foram analisados utilizando o software Minitab Six Sigma Academy module® versão 2.12.

2.9. Análise Térmica

2.9.1. Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)

A caracterização termoanalítica com base nas técnicas de termogravimetria e termogravimetria derivada foi realizada em uma termobalança TGA-50 da marca Shimadzu®. As medidas foram realizadas empregando cadinhos de platina, com massa de amostra (Colhibin®; Nutriptides®; F1; F2; F3; F1 + Nutriptides®; F2 + Nutriptides®; F3 + Nutriptides®; F1 + Colhibin®; F2 + Colhibin®; F3 + Colhibin® de $\pm 15,0$ mg sob atmosfera dinâmica de ar comprimido (50ml/min), com razão de aquecimento de 10°C/min na faixa de temperatura de 25° à 200°C.

2.9.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A caracterização via calorimétrica exploratória diferencial foi realizada em uma célula DSC 50, da marca Shimadzu®. As medidas foram realizadas empregando cadinhos de alumínio com tampa, com massa de amostra (Colhibin® e Nutriptides®) de $\pm 2,0$ mg sob atmosfera dinâmica de N₂ (100ml/min), com razão de aquecimento de 10°C/min na faixa de temperatura de 25° à 200°C.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)

A **Tabela 1** apresenta os resultados obtidos após a APE por meio dos testes de centrifugação e estresse térmico.

Tabela 1: Avaliação das formulações no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade (teste de centrifugação e estresse térmico)

FORMULAÇÕES	CENTRIFUGAÇÃO	ESTRESSE TÉRMICO
ASPECTO		
F1	N	N
F2	N	N
F3	N	N
F1+ Nutripetides®	N	N
F3+ Nutripetides®	N	N
F1 + Colhibin®	N	N
F3 + Colhibin®	N	N

Legenda: N – aspecto normal; LM – levemente modificado.

O teste de centrifugação é considerado pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como teste de triagem e não deve necessariamente indicar a estabilidade física real das preparações cosméticas, porém é eficiente para pré selecionar as emulsões que devem ser submetidas ao teste de estabilidade acelerada e normal (BRASIL, 2004). A vida útil de um produto pode ser prevista através da observação de separação de fases que ocorre quando um sistema é submetido a diferentes condições gravitacionais (WITTERN *et al* 1985; IDSON, 1993). A ausência de cremação ou separação de fases frente ao teste de centrifugação supõe que esta emulsão, em condições normais de gravidade, poderá ser fisicamente estável (TADROS, 2004).

Após a centrifugação não se observou nenhuma alteração das formulações (separação ou cremação), demonstrando serem estáveis frente ao parâmetro de

estresse gravitacional.

A **Figura 1** ilustra o aspecto das formulações **F1**, **F2**, **F3**, **F1 + Nutripeptides®**, **F3 + Nutripeptides®**, **F1 + Colhibin®** e **F3+ Colhibin®** após o estresse térmico.

Figura 1: Aspecto das formulações: (a) F1, (b) F2, (c) F3, (d) F1 + Colhibin®, (e) F1+ Nutripeptides®, (f) F3+ Nutripeptides® e (g) F3+ Colhibin® após avaliação da estabilidade pela Avaliação da Estabilidade preliminar (teste do Estresse Térmico).

A **Figura 2** ilustra das formulações **F1**, **F2**, **F3**, **F1+ Nutripeptides®**, **F3+ Nutripeptides®**, **F1+ Colhibin®** e **F3+ Colhibin®**, após a centrifugação.

Figura 2: Aspecto das formulações: (a) F1, (b) F2, (c) F3, (d) F1+ Nutripeptides® , (e) F1+ Colhibin®, (f) F3+ Colhibin® e (g) F3+ Nutripeptides® , após avaliação da estabilidade pela Avaliação da Estabilidade preliminar (teste de Centrifugação).

Para o teste de estresse térmico, aplicam-se valores extremos de temperatura em períodos pré-determinados de tempo e em conjunto com o teste de centrifugação; são testes importantes para prever a estabilidade físico-química de sistemas emulsificados. (MASSON, 2005; MORAES, 2006)

Após o estresse térmico não se observou nenhuma alteração das formulações (separação), demonstrando serem estáveis frente a este parâmetro.

3.2. Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

Segundo a Legislação Brasileira, os TEA são destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação físicas de substâncias e/ou alterações na forma cosmética, empregando condições drásticas de armazenamento. O surgimento de sinais de degradação deve ser observado e analisado conforme as características específicas de cada formulação. Por corresponder a condições drásticas, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, auxilia na triagem das formulações (BRASIL, 2004).

A **Tabela 2** descreve os perfis das formulações F1, F2, F3, F1+ Nutriptides®, F1+ Colhibin®, F3+ Nutriptides® e F3+ Colhibin®, por meio da análise das características organolépticas.

As **Figuras 3, 4, 5** representam respectivamente a variação de viscosidade aparente das três formulações sem o hidrolisado de proteína do arroz (F1, F2 e F3); das formulações F1, F1+ Nutriptides® e F1+ Colhibin®; e das formulações F3, F3+ Nutriptides® e F3+ Colhibin®.

As **Figuras 6, 7 e 8** representam, respectivamente a variação de pH das três formulações sem o hidrolisado de proteína do arroz (F1, F2 e F3); das formulações F1, F1+ Nutriptides® e F1+ Colhibin®; e das formulações F3, F3+ Nutriptides® e F3+ Colhibin®. Obtidas pelos Testes de Estabilidade Acelerada. Os ensaios foram conduzidos em dias previamente estabelecidos em condições extremas de armazenamento.

Tabela 2: Avaliação das características organolépticas (cor e odor), das formulações F1, F2, F3, F1+ Nutripeptides®, F1 + Colhibin®, F3+ Nutripeptides® , F3+ Colhibin®, no estudo de TEA.

Condição	F1			F2			F3			F1+ Nutripeptides®			F1+ Colhibin®			F3+ Nutripeptides®			F3+ Colhibin®		
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Estufa 40±0,5°C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Estufa 50±0,5°C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Refrigerador 5±0,5°C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Freezer -10±0,5°C	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Luz Solar	N	LM	LM	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	N	LM	LM	N	N	N	N	N	N
Ciclos -10/+37±0,5°C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Temperatura ambiente 24±2°C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: **N** – aspecto normal; **LM** – levemente modificado

Figura 3 : Variação da viscosidade aparente (em cP), das formulações F1, F2 e F3 nas condições de armazenamento em luz solar e estufas ($40,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ / $50,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), em temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), em refrigerador ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e freezer ($-10 \pm 0,5^\circ\text{C}$), no estudo de TEA (conduzida em viscosímetro com Spindle 96 (T-F)).

Figura 4 : Variação da viscosidade aparente (em cP), das formulações F1, F1+ Nutripeptides®, e F1+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e estufas (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), em temperatura ambiente (24,0±2,0°C), em refrigerador (5,0±0,5°C) e freezer (-10±0,5°C), no estudo de TEA (conduzida em viscosímetro com Spindle 96 (T-F)).

Figura 5 : Variação da viscosidade aparente (em cP), das formulações F3, F3+ Nutripeptides®, e F3+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e estufas (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), em temperatura ambiente (24,0±2,0°C), em refrigerador (5,0±0,5°C) e freezer (-10±0,5°C), no estudo de TEA (conduzida em viscosímetro com Spindle 96 (T-F)).

Figura 6 : Variação do pH das formulações F1, F2 e F3 nas condições de armazenamento em luz solar e estufas ($40,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ / $50,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), em temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), em refrigerador ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e freezer ($-10 \pm 0,5^\circ\text{C}$), no estudo de TEA.

Figura 7 : Variação do pH das formulações F1, F1+ Nutripeptides®, e F1+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e estufas (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), em temperatura ambiente (24,0±2,0°C), em refrigerador (5,0±0,5°C) e freezer (-10±0,5°C), no estudo de TEA.

Figura 8 : Variação do pH das formulações F3, F3+ Nutripeptides®, e F3+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e estufas (40,0±0,5°C / 50,0±0,5°C), em temperatura ambiente (24,0±2,0°C), em refrigerador (5,0±0,5°C) e freezer (-10±0,5°C), no estudo de TEA.

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

Sugere-se que as alterações organolépticas visualizados na Tabela 2 devem ter sido causadas nas formulações F1, F1+ Nutripeptides®, e F1+ Colhibin®, pela presença de ceras na composição, estas tem a característica de sofrer modificações quando expostas aos raios solares, já a variação apresentada na formulação F3 e não apresentada nas formulações F3+ Nutripeptides®, e F3+ Colhibin® pode ter sido causada pela formação de cristais de gelo, e como os testes foram conduzidos em momentos diferentes, estes cristais não devem ter se formado novamente.

A variação da viscosidade foi mais acentuada na formulação F2, e sugere-se que isso se deve ao tipo de formulação que tem uma maior facilidade em perder água para o ambiente. A análise dos valores de pH durante a realização dos testes de estabilidade acelerada é importante, tanto no desenvolvimento de emulsões cosméticas quanto farmacêuticas, pois fornece informações sobre prováveis alterações que podem comprometê-las como decomposição química dos componentes ou formação de compostos indesejáveis (AZZINI, 1999). A determinação dos valores de pH também é importante para avaliar a interação entre componentes da formulação e veiculação de ativos pH dependentes. (MARUNO, 1998)

Nota-se que os valores de pH no decorrer do tempo estipulado, para as sete temperaturas de armazenamento e para as três formulações preparadas ocorre de forma significativa ($p < 0,01$)* no 12º dia do ciclo de congelamento para as três formulações – F1, F2, F3 -, e nas três medições de pH (3º, 7º e 14º dias) sob a luz solar da formulação F2. Sugere-se que reações de decomposição devem ocorrer, com maior velocidade sob efeito brusco de variação de temperatura, e no caso da formulação F2 sob o efeito dos raios solares, podendo conduzir as amostras a processos de instabilidade em função do tempo.

* Tabelas referentes aos valores estatísticos no anexo

A formulação F2 foi eliminada nesta etapa, por isso, não se incorporou os ativos do hidrolisado da proteína do arroz a esta formulação. As formulações F1 e F3 foram aprovadas, pois só apresentaram variação relevante em apenas um ponto, e a elas foram incorporados os ativos do hidrolisado da proteína do arroz.

As formulações F1+ Nutriptides®, F1+ Colhibin®, F3+ Nutriptides®, e F3+ Colhibin® não apresentaram variação relevante ($p < 0,01$) em nenhum ponto, mostrando maior estabilidade quando acrescidas do hidrolisado da proteína do arroz.

Nota-se também que a incorporação do Nutriptides® e do Colhibin®, na formulação F1, aumentou o valor inicial de pH, e na formulação F3 a diminuiu o valor inicial do pH.

3.3. *Teste de Estabilidade Normal (TEN)*

Este teste é empregado na fase de desenvolvimento do produto. Empregam-se geralmente condições menos extremas. Serve para auxiliar na determinação do prazo de validade. (BRASIL, 2004)

As formulações aprovadas pelos critérios de análise dos TEA (item 2.7.2) apresentaram-se adequadas quanto as suas características avaliadas sob condições drásticas de armazenamento, apresentando os melhores perfis de estabilidade físico e físico-químicas.

As **Figuras 9 e 10** representam as variações dos valores de viscosidade das formulações F1, F1+ Nutriptides®, e F1+ Colhibin®; F3, F3+ Nutriptides®, e F3+ Colhibin®, respectivamente, por meio da análise física.

As **Figuras 11 e 12** representam as variações dos valores de pH das formulações F1, F1+ Nutriptides®, e F1+ Colhibin®; F3, F3+ Nutriptides®, e F3+ Colhibin®, respectivamente, por meio da análise físico-química.

Os ensaios foram conduzidos em dias previamente estabelecidos em condições determinadas de armazenamento.

Figura 9 : Variação do valor da viscosidade (em cP), das formulações F1, F1+ Nutriptides®, e F1+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e em estufas (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C, em temperatura ambiente (24,0±2,0°C) e em refrigerador (5,0±0,5°C) no Teste de Estabilidade Normal (conduzida em viscosímetro com Spindle 96 (T-F)).

Figura 10 : Variação do valor da viscosidade (em cP), das formulações F3, F3+ Nutriptides®, e F3+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e em estufas (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C , em temperatura ambiente (24,0±2,0°C) e em refrigerador (5,0±0,5°C) no Teste de Estabilidade Normal (conduzida em viscosímetro com Spindle 96 (T-F)).

Figura 11 : Variação percentual do valor de pH das formulações F1, F1+ Nutripeptides®,e F1+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e em estufas (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C , em temperatura ambiente (24,0±2,0°C) e em refrigerador (5,0±0,5°C) no Teste de Estabilidade Normal.

Figura 12 : Variação percentual do valor de pH das formulações F3, F3+ Nutripeptides®,e F3+ Colhibin® nas condições de armazenamento em luz solar e em estufas (37,0±0,5°C / 45,0±0,5°C , em temperatura ambiente (24,0±2,0°C) e em refrigerador (5,0±0,5°C) no Teste de Estabilidade Normal.

A **Figura 13** representa a variação em percentagem das massa da formulação **F2** durante todo o Teste de Estabilidade Acelerado e a percentagem da perda de massa das formulações F1, F1+ Nutriptides®, F1+ Colhibin®, F3, F3+ Nutriptides®, e F3+ Colhibin® durante os Testes de Estabilidade Acelerado e Normal.

Figura 13: Variação percentual da massa das formulações F1, F1+ Nutripeptides®, F1+ Colhibin®, F2, F3, F3+ Nutripeptides®, e F3+ Colhibin® nas condições de armazenamento em Ciclos -10/+45, 0±0,5°C, luz solar, e em estufas (37,0±0,5°C /40,0±0,5°C/ 45,0±0,5°C), em temperatura ambiente (24,0±2,0°C) em refrigerador 5,0±0,5°C , nos Testes de Estabilidade Acelerada e Normal.

Os testes de estabilidade normal visaram fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. (BRASIL, 2004)

A variação da viscosidade aparente foi menos acentuada nas formulações com os ativos do hidrolisado de proteína do arroz tanto para a formulação F1 como para formulação F3, sugere-se que a adição dos ativos aumenta estabilidade para o parâmetro da viscosidade.

Nota-se que os valores de pH no decorrer do tempo estipulado, para as cinco temperatura de armazenamento e para as seis formulações preparadas ocorre de forma significativa ($p < 0,01$) no 30°, 60°, 90° dias. Sugere-se que reações de decomposição devem ocorrer, podendo conduzir as amostras a processos de instabilidade em função do tempo.

Nota-se que a incorporação do Nutripeptídes® e do Colhibin® alterou a variação de pH das formulações sem suas presenças, porém não ocorreu uma variação padrão que permiti-se afirmar que c quando presentes eles aumentam ou diminuem a estabilidade.

Nota-se que a incorporação do Nutripeptídes® e do Colhibin®, na formulação F1, aumentou o valor inicial de pH, e na formulação F3 diminuiu o valor inicial do pH, como já observado durante o Teste de Estabilidade Acelerado.

A percentagem de perda de massa se mostra acentuada quando as formulações são submetidas às condições de elevação de temperatura.

3.4. Análise Térmica

A **Figura 14** mostra as curvas TG e DSC dos ativos cosméticos Nutriptides® e Colhibin®. Observou-se que as duas amostras possuem semelhança em seu comportamento térmico relativo à TG onde as decomposições térmicas ocorreram em apenas uma etapa para ambas amostras que foram em torno de 30°C. Para o Colhibin® foi observado que a temperatura de decomposição é maior que a do Nutriptides®, sendo que acima da temperatura de 200°C o Nutriptides® apresentou um resíduo de 9% relativo à sua massa inicial, já o Colhibin® apresentou um resíduo maior, em torno de 24%.

Através da curva DSC (Figura 14) do Nutriptides®, observou-se que ocorreu uma fusão com temperatura máxima de 94°C em apenas 8.30 minutos. Para o Colhibin® (Figura 14) a fusão ocorreu em 110°C em 9.70 minutos. Sugere-se, através, desses resultados, que as amostras são diferentes e que o Colhibin® possui uma estabilidade térmica maior que o Nutriptides®.

Figura 14. - Curvas TG e DSC do Colhibin® e do Nutriptides® obtidas a 10°C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de ar sintético (TG) e N₂ (DSC).

A **Figura 15** apresenta a curva TG/DTG da formulação F1 (vide quadro 2), do Colhibin® puro e do Colhibin® incorporado à formulação cosmética F1 (50/50 (p/p)). Observou-se que após a incorporação do Colhibin® na F1, a estabilidade térmica diminui quando comparado à F1 e o ativo isolados. Este fato também foi observado quando se tratou do Nutripeptides® incorporado à mesma formulação F1 (Figura 16).

Figura 15.- Curvas TG e DTG da formulação F1 e da formulação F1 associado ao Colhibin® obtidas a 10oC.min-1, sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

Figura 16.- Curvas TG e DTG da formulação F1 e da formulação F1 associado ao Nutriptides® obtidas a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

A **Figura 17** apresenta a curva TG/DTG da formulação F2 (vide quadro 2), do Colhibin® puro e do Colhibin® incorporado à formulação cosmética F2. Observou-se que após a incorporação do ativo na formulação, foi evidenciou um deslocamento do processo de perda de massa inicial para uma temperatura mais elevada (Temperatura inicial de decomposição da F2 corresponde à 29°C e a da amostra F2 + ativo à 40°C), porém após 50°C houve uma diminuição na temperatura de decomposição da F2 + ativo em relação à F2.

Figura 17.- Curvas TG e DTG da formulação F2 e da formulação F2 associada ao Colhibin® obtidas a 10oC.min-1, sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

A **Figura 18** apresenta a curva TG/DTG da formulação F2 (vide quadro 2), do Nutripeptides® puro e do Nutripeptides® incorporado à formulação cosmética F2. Observou-se que após a incorporação do ativo na formulação, não foram observadas alterações nos perfis de ambas as curvas, porém a partir de 40°C houve uma pequena diminuição na temperatura de decomposição da F2 + ativo em relação à F2.

Figura 18.- Curvas TG e DTG da formulação F2 e da formulação F2 associada ao Nutripeptides® obtidas a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

A **Figura 19** apresenta a curva TG/DTG da formulação F3 (vide quadro 2), do Colhibin® puro e do Colhibin® incorporado à formulação cosmética F3. Foi observado que após a incorporação do ativo na formulação, houve um aumento na estabilidade térmica da formulação. Este fato pode ser explicado pela evidência de um deslocamento do processo de perda de massa inicial para uma temperatura mais elevada (ou seja, na a temperatura de 50°C , por exemplo, a F3 apresentou uma perda de massa de 10% em relação à sua massa inicial, enquanto que F3 + ativo apresentou uma perda de 5%).

Figura 19.- Curvas TG e DTG da formulação F3 e da formulação F3 associada ao Colhibin® obtidas a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

A **Figura 20** apresenta a curva TG/DTG da formulação F3 (vide quadro 2), do Nutriptides® puro e do Nutriptides® incorporado à formulação cosmética F3. Observou-se que após a incorporação do ativo na formulação, houve um aumento na estabilidade térmica da formulação. Este fato pode ser explicado pela evidência de um deslocamento do processo de perda de massa inicial para uma temperatura mais elevada (ou seja, na a temperatura de 50°C , por exemplo, a F3 apresentou uma perda de massa de 10% em relação à sua massa inicial, enquanto que F3 + ativo apresentou uma perda de 6%).

Figura 20.- Curvas TG e DTG da formulação F3 e da formulação F3 associado ao Nutripeptides® obtidas a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

4. Conclusão

A análise dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade físico química demonstrou que a formulação cosmética F2 apresentou uma faixa de variação pH acima do esperado, sendo descartada após o término do teste de estabilidade acelerada, e não sendo avaliada após a incorporação dos hidrolisados de proteína do arroz.

As formulações F1 e F3 apresentaram uma estabilidade maior na faixa de variação de pH durante todo o ensaio, e quando incorporado os hidrolisados de proteína do arroz as formulações mostraram uma menor faixa de variação de pH comparadas com as formulações sem os ativos, não apresentando nenhum valor de $p < 0,01$.

A viscosidade da formulação F1 não apresentou variação quando incorporada com os hidrolisados de proteína do arroz, porém a viscosidade da formulação F3 foi alterada quando incorporada com o ativo Colhibin®, mas também se mantiveram estável, como as demais, durante todo o ensaio.

A estabilidade térmica demonstrou que quando aos ativos foram incorporados à formulação F1, a temperatura necessária perda de massa foi diminuída, para ambas.

Já quando incorporados à formulação F2, o comportamento foi diferentes entre os ativos, para o ativo Colhibin®, inicialmente apresentou uma estabilidade maior, mas logo em seguida a temperatura necessária para perda de massa também se apresentou menor. Com o ativo Nutripeptides® a diferença de temperatura necessária para perda de massa é muito tênue.

A estabilidade térmica da formulação F3 com os ativos incorporados apresentou uma temperatura necessária perda de massa aumentada, para ambos os ativos, demonstrando uma maior estabilidade dentre as três formulações.

O estudo térmico e de mudança de estado físico dos ativos isoladamente, mostraram que o ativo Colhibin® necessita de uma temperatura maior tanto para iniciar sua perda de massa, quando para sofrer uma fusão, em relação ao ativo Nutripeptides®.

5. Referências Bibliográficas

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

AZZNI, R.G. **Desenvolvimento e avaliação “in vitro” de emulsão contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. São Paulo. 1999 dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, Universidade de São Paulo.

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

BONACUCINA, G.; PALMIERI, G.F.; CRAIG, D. **Rheologica and diellectri charaterization of monoolein/water meesophases in the presence of a peptide drug**. J. Pharm. Sci., v. 94, n. 11, November, 2005.

BOOK, K. P.; MORAIS, J.M.;MASSON, D. S.; SANTOS, O. D. H., ROCHA FILHO, P. A. Development of o/w emulsion with cupuaçu butter containing liquid crystal by the HLB system. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v. 41, supl. 1, 2005.

BOOK, K. P.; SANTOA O. D. H.; TAKEMOTO, S. A.; ROCHA FILHO, P. A. Desenvolvimento de emulsões com cristal líquido e ativos hidratantes e estudo da eficácia hidratante “in vivo”. In: *XX Congresso Brasileiro de Cosmetologia*, 2006, São Paluo, SP. **Cosmetic & Toilets**, v.18, n. 2, p. 49-50, 2006

BRACONI, F. L.; OLIVEIRA, I. S.; BARONI, M. N. F.;ROCHA FILHO, P. A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In: *XII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos*, São Paulo, 1995. **Anais**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 1995, p.6-19.

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

D’ LEON, L. F. P. **Estudo de estabilidade de produtos cosméticos**. Cosmetic & Toiletries, Edição em Português, São Paulo, v. 13, n. 4. p. 54 – 62, 2001.

DI MAMBRO, V.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; FONSECA, M.J. **Phisical and Chemical stability of different formulations with superoxide dismutase**. Pharmazie. V. 59, n. 10, p. 786-790, 2004.

GALENA Produtos Silab. Disponível em: <http://www.galena.com.br/Magistral/LinhaProdutos.aspx?CoBuscaPor=2> Acesso em Jun/2010.

IDSON, B. Stability testing of emulsions II. Drug & Cosmetic Ind. V. 151, n. 2, p. 38-43, 1993.

IDSON, B., LAZARUS, J. Semi-Sólidos. In: LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANING, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001, p.907-953.

OPÇÃO FENIX PRODUTOS. Disponível em: <http://www.opcaofenix.com.br/v02/utl/arquivos/.../Propilenoglicol.pdf> - Acesso em: JUN/ 2010.

PHARMANOSTRA PRODUTOS. Disponível em: <http://www.pharmanostra.com.br/pg-produtos.php> Acesso em: JUN/2010.

PHARMASPECIAL PRODUTOS,. Disponível em: http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/destaque1/2005_Dest_BasesDermocosm.pdf Acesso em: JUN/2010.

MAIA CAMOS, P.M.B.G.; SILVA, G.M. **Estratégias de formulações de shampoos**. Cosmetic& Toiletries, Edição em Português, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 44-50, 2000.

MARUNO, M. **Avaliação de Hidratação Cutânea a partir de Emulsão Simples e/ou Complexas contendo hidrolizado de proteína**. Ribeirão Preto, 1998. Dissertação (Mestrado)128p.- Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MASSON, D. S.; MORAIS, G. G.; MORAIS, J. M.; ANDRADE, F. F.; SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA FILHO, P. A. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence in liquid crystal formation and rheological behaviour of o/w emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 463-68, 2005.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil water nano-emulsion obtained by HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 109-15, 2006.

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

SARFAN COMERCIO IMPORTADORA Ltda. Disponível em: <<http://www.sarfam.com.br>>. Acesso em: AGO/2008

SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. Understanding emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, Oak Park, v.113, n.9, p.39-44, 1998.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science** . v. 108, p. 227-58, 2004

VIAFARMA PRODUTOS. Disponível em:
<http://www.viafarmanet.com.br/conteudo/magistral2.asp?id=244&area=1> Acesso em:
 Jun/2010.

WITTERN, K. P.; ANSMANN, A.; HUTTINGER, R.; BILLEK, D.; CHARLET, E.; HOENEN, L.; KUCZERA, K.; MOTITSCHKE, L.; QUACK, J.; SELB, K.; UMBACH, I.; WOLFF, G. Stability testing of cosmetic emulsions. **Cosmetic&Toilets**, New York, v. 100, n. 10, p. 33-39, 1985.

Capítulo 3

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas

1.Introdução

A separação de peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é classicamente realizada em fase reversa em coluna de separação C-18 ou por C-8. Eles podem ser separados de modo isocrático ou por gradiente, dependendo do tipo de peptídeo a ser separado. (MANT; HODGES,1991)

A luz ultravioleta é absorvida pelas ligações peptídicas, permitindo a determinação dos peptídeos com o uso do detector de UV-Visível, normalmente entre 210-220nm, tornando este método o mais amplamente utilizado na análise tanto de peptídeos como de proteínas, pois apresenta excelente poder de resolução, velocidade e eficiência superior aos outros métodos. (MANT; HODGES, 1991)

Além disso, a disponibilidade de solventes voláteis na fase móvel faz com que seja ideal tanto para separações analíticas como para separações preparativas; os solventes voláteis mais utilizados são metanol e acetonitrila, sempre acidificados com ácido trifluoracético ou com ácido acético. (MANT; HODGES, 1991)

2. Material e Métodos

As metodologias analíticas foram desenvolvidas nas instalações do Laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Semi-Industrial da Faculdade de Engenharia Química da Universidade de São Paulo.

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, composto por “*software*” controlador *LC Workstation Class-VP* (Shimadzu Corporation, Japão); controlador de sistema modelo SCL-10Avp (Shimadzu Corporation, Japão); degaseificador *on line* modelo DGU-14A (Shimadzu Corporation, Japão); sistema de bombeamento de solvente modelo LC-10Advp (Shimadzu Corporation, Japão); injetor automático com *loop* de 50µL modelo SIL-10 AD vp (Shimadzu Corporation, Japão); forno para controlar temperatura da coluna modelo CTO-10AC vp (Shimadzu Corporation, Japão); detector UV-VIS do tipo DAD (*diode array detector*) modelo SPD-M10Avp (Shimadzu Corporation, Japão);
- Espectrômetro de massas Shimadzu do tipo LCMS-IT-TOF (IT) *ion trap* (TOF) *time off flight* equipado com uma fonte de (ESI) *electrospray ionization*;
- Coluna Nova Pak® C18 (3,9 x 150mm), Waters®;
- Coluna Shim-pack XR ODS (2 X 50mm), Shimadzu;
- Aparelho de ultra-som, Thornton®, modelo T-14;
- Aparelho Milliq-Plus Millipore® para obtenção de água;
- Acetonitrila grau cromatográfico- MeCN, Merck®;
- Ácido Trifluoroacético – TFA, Sigma Aldrich®;
- *Hydrolyzed rice protein*, Colhibin®: constituída de *hydrolyzed rice protein* (10-25%), *aqua/water* (>50%), *glycerin* (10-25%), *phenoxyethanol* (0,1-1%), Pentapharm®;
- *Hydrolyzed rice protein*, Nutripeptides®: constituída de uma mistura de di e tri peptídeos de arroz, Silab®;
- Metanol - MeOH, Merck®.

2.1. Ensaios cromatográficos preliminares

Para ensaios preliminares por CLAE em fase reversa utilizou-se coluna C18 e solução do hidrolisado de proteína do arroz na concentração de 1:100 (v/v) preparada em água purificada. Assim sendo, uma série de experimentos iniciais foram realizados com o intuito de se definir as condições analíticas ideais para desenvolvimento da metodologia utilizando informações obtidas na revisão bibliográfica.

Na primeira etapa do desenvolvimento do método foram investigadas: natureza do modificador orgânico, tampão utilizado na fase aquosa, proporção das duas fases, os ajustes foram realizados conforme o decorrer das injeções, em sistema de duas bombas.

A definição de melhores condições analíticas foi realizada através de um planejamento fatorial *, onde utilizando seis (6) variáveis (vazão, volume de injeção, temperatura, pH, concentração da amostra e quantidade inicial de acetonitrila) realizou-se 32 combinações em duplicatas.

Para a melhor a separação dos peptídeos das duas amostras, foi utilizada as seguintes condições:

- Coluna Nova Pak® C18 (3,9 x 150 mm), Waters®;
- Fase reversa;
- Modo gradiente 5-55% B;
- Fase móvel: A - solução de água purificada com Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,2%;
- Fase móvel B - MeCN;
- Vazão: 0,4 ml/min.;
- Temperatura: 25°C ± 1°C;
- Equipamento: Cromatógrafo líquido de alta eficiência;
- Detecção no comprimento de onda 215nm;
- Volume de injeção 30µL;
- Detector: Uv-Vis;

* Tabelas referentes ao planejamento fatorial no anexo

Uma segunda etapa do desenvolvimento foi realizada experimentos no equipamento constituído por cromatógrafo à líquido acoplado ao espectrômetro de massas, e nesta etapa algumas condições foram modificadas:

- Coluna Shim-pack XR ODS (2 X 50mm), Shimazu Fase reversa;
- Modo gradiente 5-55% de B;
- Fase móvel A - solução de água purificada com Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,2%;
- Fase móvel B - solução de MeOH com Ácido Trifluoroacético (TFA);
- Vazão: 0,2 ml/min.;
- Temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Equipamento: Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas;
- Detecção no comprimento de onda 215nm;
- Volume de injeção: 30 μL ;
- Detector: UV-Vis.

2.1.1. Preparo da fase móvel

Os métodos foram desenvolvidos utilizando-se o sistema de duas bombas, sendo assim efetuada a mistura automática do tampão e do solvente para fase móvel.

O primeiro método foi programado para funcionar no modo gradiente linear de 95% fase móvel A ($\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 99,8/0,2$ (v/v)) e 5% fase móvel B (MeCN) para 45% fase móvel A ($\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 99,8/0,2$ (v/v)) e 55% fase móvel B (MeCN); fluxo: $0,4 \text{ mL min}^{-1}$; detecção UV de 215 nm.

Em um balão volumétrico de 200 mL foi adicionado 400 μL de TFA concentrada, o volume do balão foi completado com água purificada e a solução homogeneizada. No outro balão volumétrico foi adicionado 200 ml de MeCN. As misturas foram desgaseficadas e colocadas uma em cada bomba.

O segundo método foi programado para funcionar no modo gradiente linear de 95% fase móvel A ($\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 99,8/0,2$ (v/v)) e 5% fase móvel B

(MeOH/TFA = 99,8:0,2 (v/v)) para 50% fase móvel A (H₂O/TFA = 99,8:0,2 (v/v)) e 50% fase móvel B (MeOH/TFA = 99,8:0,2 (v/v)); fluxo: 0,2 mL min⁻¹; detecção UV de 215 nm.

Em um balão volumétrico de 200 mL foi adicionado 400 µL de TFA concentrada, o volume do balão foi completado com água purificada e a solução homogeneizada. No outro balão volumétrico de 200 mL foi adicionado 400 µL de TFA concentrada, o volume foi completado com MeOH e a solução homogeneizada. As misturas foram degaseficadas e colocadas uma em cada bomba.

3. Resultados e Discussão

Durante a realização dos experimentos utilizando o planejamento fatorial, utilizando-se coluna LiChrospher® 100 RP-18 , 5 μ m (125 x 4 mm), verificou-se que não houve separação dos dois ativos, pois a amostra Nutripeptides® não mostrou afinidade com a coluna utilizada, não apresentando a separação dos picos. Já a amostra Colhibin® apresentou uma separação melhor, com afinidade com a coluna, porém sem boa resolução dos picos. (Figura 1 e 2).

Figura 1: Cromatograma da solução de Nutripeptides® 1:100 (v/v); Condições: coluna LiChrospher® 100 RP-18 , 5 μ m (125 x 4 mm), volume de injeção 30 μ L; vazão: 0,4 mL min⁻¹, tampão A: ácido trifluoroacético 0,2% (TFA) em água; tampão B, acetonitrila; gradiente de solvente, 5-55% B em 30 min; detecção a 215 nm.

Figura 2: Cromatograma da solução de Colhibin® 1:100 (v/v); Condições: coluna LiChrospher® 100 RP-18 , 5 μ m (125 x 4 mm), volume de injeção 30 μ L; vazão: 0,4 mL min⁻¹, tampão A: ácido trifluoroacético 0,2% (TFA) em água; tampão B, acetonitrila; gradiente de solvente, 5-55% B em 30 min; detecção a 215 nm.

Quanto se passou para o CLAE acoplado ao espectrômetro de massas, com algumas alterações de fase móvel e principalmente com a utilização da coluna Shim-pack XR ODS (2 X 50mm), verificou-se novamente que a afinidade do Nutriptides® com a coluna não existiu, e a separação do Colhibin® ficou com uma resolução melhor, com picos mais definidos e bem separados (**Figura 3 e 4**)

Figura 3: Cromatograma da solução de Nutripeptides® 1:100(v/v); Condições: Shim-pack XR ODS (2x5mm), volume de injeção 30µL; 0,2ml min⁻¹, tampão A: ácido trifluoroacético 0,2%(TFA) em metanol; gradiente de solvente 5-50% em 20 min; detecção a 215nm.

Figura 4: Cromatograma da solução de Colhibin® 1:100(v/v); Condições: Shim-pack XR ODS (2x5mm), volume de injeção 30µL; 0,2ml min⁻¹, tampão A: ácido trifluoroacético 0,2%(TFA) em metanol; gradiente de solvente 5-50% em 20 min; detecção a 215nm.

Apesar da separação dos peptídeos do Colhibin®, a identificação dos picos pelo espectrômetro de massas não permitiu a definição da estrutura dos componentes, impedindo a identificação dos peptídeos da solução.

Devido ao diferente comportamento dos ativos durante a realização dos experimentos, sugere-se que eles sejam diferentes.

4. Conclusão

A separação pela cromatografia líquida de alta eficiência do ativo Nutripeptides® não apresentou o resultado esperado.

A separação no ativo Colhibin® foi efetiva, porém sua identificação utilizando detecção de massas foi prejudicada devido a presença de muitos fragmentos de massa molecular, como as amostras estudadas são produtos comerciais e não estão na sua forma purificada a presença de excipientes na solução, ou mesmo o procedimento utilizado pelo fabricante para produzir os peptídeos (sintetizado ou hidrolisado) pode produzir resíduos que dificultam sua identificação e conseqüente determinação.

5. Referência Bibliográfica

MANT, C. T.; HODGES, R.S. **High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: separation analysis and conformation**. Ed Boca Raton. CRC Press, 938p, 1991.

Capítulo 4

Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* (DPPH e ORAC)

1.Introdução:

Os vegetais são ricos em substâncias antioxidantes, e esse fato pode ser atribuído a uma proteção natural aos radicais livres formados pela radiação ultravioleta necessária à fotossíntese. A avaliação de extratos vegetais *in vitro*, por diferentes métodos, mostrou esta atividade antioxidante, levou o emprego destes extratos pela indústria de cosméticos, em formulações antienvhecimento e atenuadora de rugas. Estes extratos demonstrarem forte caráter protetor, impedindo os danos celulares devido aos ataques radiculares (SCOTTI, VELASCO, 2003)

Recentemente peptídeos bioativos obtidos a partir da hidrólise enzimática de proteínas de diversos alimentos, tais como soja, gelatina, glúten do trigo, têm demonstrado possuir atividade antioxidativa. (SHEIH; WU; FANG, 2009)

2. Material e Métodos

2.1. Equipamentos

- Leitor de placas Multi Detection Microplate Reader, Synergy, marca Biotek;
- Placa de 96 poços marca Fisher Scientific;

2.2. Reagentes

- AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (Wako Chemical®);
- *Hydrolyzed rice protein*, Colhibin®: constituída de *hydrolyzed rice protein* (10-25%), *aqua/water* (>50%), *glycerin* (10-25%), *phenoxyethanol* (0,1-1%), Pentapharm®;
- *Hydrolyzed rice protein*, Nutripeptides®: constituída de uma mistura de di e tri peptídeos de arroz, Silab®;
- DPPH (2,2'- *difenil-1-picrilhidrazil*) 95%, Sigma- Aldrich®
- Fluoresceína, Sigma- Aldrich®;
- Metanol;Merck
- Solução tampão fosfato 75mM, pH 7,0;
- Trolox®, Sigma- Aldrich®.

2.3. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* das duas amostras de proteína hidrolisada de arroz

2.3.1. Determinação da atividade antioxidante pela reação com DPPH (2,2' – difenil – 1 – picrilhidrazil)

A capacidade antioxidante dos hidrolisados de proteína do arroz, foi avaliada com base na sua reação com o radical DPPH (2,2' – difenil – 1 – picrilhidrazil). Primeiramente foram preparadas 6 diferentes diluições de cada amostra (Colhibin® – 3345,6; 2509,2; 1672,8; 1254,6; 1003,7; 836,4 µg/ml. Nutripeptides® – 2836,8; 1418,4; 945,6; 709,2; 472,8; 354,6µg/ml) em água destilada.

A uma placa de 96 poços adicionou-se 150 µL da solução de DPPH 100 µmol/L (metanol 80% v/v) e 50 µL da amostra ou padrão (trolox 75; 50; 37,5; 25; 12,5; 6,25 µmol/L em MeOH 80% v/v). O branco consistiu de 200 µL de metanol 80% v/v, e no controle a amostra foi substituída por MeOH 80% v/v.

Em seguida a placa foi incubada na ausência de luz à temperatura ambiente por 2 h.

A leitura foi realizada em 517nm no Leitor de placas Multi Detection Microplate Reader.

2.3.1.1. Cálculo

A concentração da amostra necessária para reduzir a absorbância em 50% (EC50) é comparada com a do padrão e o resultado expresso em equivalentes de Trolox® por grama (eq trolox/g) de material ensaiado.

2.3.2. Determinação do potencial antioxidante por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Este método mede a capacidade da amostra, de proteger a fluoresceína da oxidação causada pelos radicais peroxila no meio reacional. Para a avaliação, primeiramente foram preparadas 6 diferentes diluições de cada amostra (Colhibin® – 501,84; 386,03; 313,65; 264,13; 228,11µg/ml. Nutripeptides® -141,84; 109,11; 88,65; 74,65; 64,47µg/ml) em tampão fosfato 75mM pH 7,0.

Foram adicionados 25µL de amostra ou padrão (Trolox® 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µmol/L, diluído em tampão fosfato 75mM pH 7,0) a 150µL de solução de fluoresceína 40nM (em tampão fosfato 75mM pH 7,0) em placa de 96 poços. Após incubação a 37°C durante 30 minutos colocou-se 25 µL de solução de AAPH 153mM (em tampão fosfato 75mM pH 7,0) e agitou-se a placa em intensidade alta durante 10 segundos. A leitura foi feita a cada minuto durante uma hora com comprimento de onda de excitação 485/20nm e emissão 528/20nm (leitor de placas – Multi Detection microplate reader Synergy - BIOTEK). O branco consistiu de 200µL de tampão fosfato 75mM pH 7,0 e no controle a amostra foi substituída por 25µL de tampão fosfato 75mM pH 7,0.

2.3.2.1 Cálculo

O valor final foi calculado com base na relação entre a área sob a curva de decaimento da fluoresceína da amostra e do padrão, sendo expresso o resultado em micromols equivalentes de Trolox®/g (eq trolox/g) da amostra.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação da atividade antioxidante pela reação com DPPH (2,2' – difenil – 1 – picrilhidrazil)

Os resultados obtidos na determinação da atividade antioxidantes pela reação com DPPH estão nas **Figuras 1 e 2**, respectivamente do Colhibin® e do Nutripeptides®. O Colhibin® e o Nutripeptides® apresentaram atividade antioxidante de $33,24 \pm 1,29 \mu\text{mol eq trolox/g}$ e $138,33 \pm 0,83 \mu\text{mol eq trolox/g}$, respectivamente.

Figura 1. – Curva de decaimento de absorbância do DPPH frente à adição de Colhibin®.

Figura 2. - Curva de decaimento de absorbância do DPPH frente à adição de Nutriptides®.

3.2.Determinação do potencial antioxidante por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O valor final, calculado com base na equação de regressão linear entre a concentração de Trolox® e a área sob a curva de decaimento de fluoresceína (AUC) do Colhibin® foi de 279 ± 27 $\mu\text{mol eq trolox/g}$ e do Nutriptides® foi de 905 ± 65 $\mu\text{mol eq trolox/g}$. A **Figura 3 e 4** mostram a avaliação da determinação do potencial antioxidante do Colhibin® e do Nutriptides® obtidos pelo método de ORAC.

Figura 3. - Área sob a curva de decaimento de fluorescência em relação à concentração de Colhibin® pelo método de ORAC

Figura 4. - Área sob a curva de decaimento de fluorescência em relação à concentração de Nutriptides® pelo método de ORAC.

A diferença entre a atividade antioxidante das amostras se mostra coerente na comparação entre os dois métodos utilizados para esta avaliação. O ativo Nutripeptides® demonstrou uma atividade ± 4 vezes maior do que a atividade do ativo Colhibin®. Sugere-se que as amostras são diferentes em sua composição.

Como se trata de um ativo cosmético com função antienvelhecimento, a presença da atividade antioxidante pode ser um dos mecanismos de ação das amostras para combater a formação dos radicais livres na pele e assim retardar o envelhecimento cutâneo.

4. Conclusão

As amostras de hidrolisado de proteína de arroz apresentaram atividade antioxidante pelos dois métodos empregados.

Em ambos os métodos esta atividade foi ± 4 vezes maior no ativo Nutripeptides® em relação ao ativo Colhibin®.

5.Referências Bibliográficas

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R., **Envelhecimento Cutâneo à Luz da Cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SHEIH C.; WU T.; FANG T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**, v. 100 p. 3419–3425, 2009

Capítulo 5

Conclusão Geral e Perspectivas Futuras

1. Conclusão Geral

- A formulação cosmética F2 apresentou uma faixa de variação de pH acima do esperado.
- As formulações F1 e F3 apresentaram uma estabilidade maior na faixa de variação de pH.
- A incorporação dos hidrolisados de proteína do arroz às formulações F1 e F3 mostraram uma variação inicial de pH, porém a sua faixa de variação diminuiu, não apresentou nenhum valor de $p < 0,01$.
- A incorporação dos hidrolisados de proteína do arroz à formulação F1 não apresentou variação na sua viscosidade inicial.
- A viscosidade da formulação F3 foi alterada quando incorporada com o ativo Colhibin®, mas também se manteve estável, durante todo o ensaio.
- A temperatura necessária para a perda de massa diminuiu quando aos ativos foram incorporados à formulação F1.
- As temperaturas necessárias para a perda de massa da formulação F2 foram diferentes para os ativos.
- A temperatura necessária para a perda de massa aumentou quando aos ativos foram incorporados à formulação F3.
- O TG e DSC demonstraram que o ativo Colhibin® precisou de uma temperatura maior tanto para iniciar sua perda de massa, quando para sofrer uma fusão, em relação ao ativo Nutripeptides®.
- A separação por CLAE/CLAE/EM do ativo Nutripeptides® não ocorreu como esperado para ambos os métodos utilizados.
- A separação por CLAE/CLAE/EM do ativo Colhibin® ocorreu de forma efetiva, porém sua identificação utilizando detecção de massas foi prejudicada pela presença de excipientes, ou por não se conhecer os procedimentos utilizados pelo fabricante para produzir os peptídeos (sintetizado ou hidrolisado).

- Os ativos de hidrolisado de proteína de arroz apresentaram atividade antioxidante pelos dois métodos empregados.
- O ativo Nutripeptides® apresentou uma atividade antioxidante $\pm$ 4 vezes maior do que o ativo Colhibin®.

2. Perspectivas Futuras

O presente trabalho permitiu a obtenção de uma formulação cosmética estável na presença do hidrolisado de proteína do arroz (Nutriptides® e Colhibin®).

Comprovou-se a existência de atividade antioxidante nos ativos (Nutriptides® e Colhibin®); e separou-se os peptídeos do ativo Colhibin® por ensaio analítico CLAE/EM.

Sugere-se:

- O desenvolvimento de métodos por CLAE/EM, utilizando diferentes colunas que permitam uma separação mais efetiva e posterior identificação pelo detector de massas;
- O desenvolvimento de método de permeação cutânea para posterior comprovação da atividade dos ativos na derme, como sugerido pelos fabricantes;
- O desenvolvimento de método da atividade antioxidante dos ativos quando incorporadas as formulações cosméticas.

Tendo em vista o exposto, fica claro, portanto a importância do método desenvolvido e a continuidade deste para uma futura aplicabilidade em vários setores da indústria cosmética.

Anexos

Tabela 1: Planejamento Fatorial (32 variações em duplicata aleatórias- 6 variantes)

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	Vazão	Vol. injeção	Temperatura	pH	Amostra	Concentração inicial de MeCN
20	1	1	1	0,4	50	20	2,2	13	7
6	2	1	1	0,4	30	30	2,2	7	3
25	3	1	1	0,2	30	20	2,8	13	3
17	4	1	1	0,2	30	20	2,2	13	7
38	5	1	1	0,4	30	30	2,2	7	3
48	6	1	1	0,4	50	30	2,8	7	3
37	7	1	1	0,2	30	30	2,2	7	7
52	8	1	1	0,4	50	20	2,2	13	7
30	9	1	1	0,4	30	30	2,8	13	3
33	10	1	1	0,2	30	20	2,2	7	3
51	11	1	1	0,2	50	20	2,2	13	3
1	12	1	1	0,2	30	20	2,2	7	3
26	13	1	1	0,4	30	20	2,8	13	7
62	14	1	1	0,4	30	30	2,8	13	3
44	15	1	1	0,4	50	20	2,8	7	7
40	16	1	1	0,4	50	30	2,2	7	7
14	17	1	1	0,4	30	30	2,8	7	7
28	18	1	1	0,4	50	20	2,8	13	3
2	19	1	1	0,4	30	20	2,2	7	7
10	20	1	1	0,4	30	20	2,8	7	3
56	21	1	1	0,4	50	30	2,2	13	3
35	22	1	1	0,2	50	20	2,2	7	7
32	23	1	1	0,4	50	30	2,8	13	7
47	24	1	1	0,2	50	30	2,8	7	7
58	25	1	1	0,4	30	20	2,8	13	7
31	26	1	1	0,2	50	30	2,8	13	3
50	27	1	1	0,4	30	20	2,2	13	3
57	28	1	1	0,2	30	20	2,8	13	3
63	29	1	1	0,2	50	30	2,8	13	3
24	30	1	1	0,4	50	30	2,2	13	3
7	31	1	1	0,2	50	30	2,2	7	3
43	32	1	1	0,2	50	20	2,8	7	3
42	33	1	1	0,4	30	20	2,8	7	3
9	34	1	1	0,2	30	20	2,8	7	7
53	35	1	1	0,2	30	30	2,2	13	3
59	36	1	1	0,2	50	20	2,8	13	7
36	37	1	1	0,4	50	20	2,2	7	3
64	38	1	1	0,4	50	30	2,8	13	7
23	39	1	1	0,2	50	30	2,2	13	7
15	40	1	1	0,2	50	30	2,8	7	7
41	41	1	1	0,2	30	20	2,8	7	7

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	Vazão	Vol. injeção	Temperatura	pH	Amostra	Concentração inicial de MeCN
11	42	1	1	0,2	50	20	2,8	7	3
45	43	1	1	0,2	30	30	2,8	7	3
49	44	1	1	0,2	30	20	2,2	13	7
27	45	1	1	0,2	50	20	2,8	13	7
22	46	1	1	0,4	30	30	2,2	13	7
60	47	1	1	0,4	50	20	2,8	13	3
18	48	1	1	0,4	30	20	2,2	13	3
8	49	1	1	0,4	50	30	2,2	7	7
34	50	1	1	0,4	30	20	2,2	7	7
5	51	1	1	0,2	30	30	2,2	7	7
19	52	1	1	0,2	50	20	2,2	13	3
61	53	1	1	0,2	30	30	2,8	13	7
16	54	1	1	0,4	50	30	2,8	7	3
4	55	1	1	0,4	50	20	2,2	7	3
54	56	1	1	0,4	30	30	2,2	13	7
29	57	1	1	0,2	30	30	2,8	13	7
13	58	1	1	0,2	30	30	2,8	7	3
46	59	1	1	0,4	30	30	2,8	7	7
3	60	1	1	0,2	50	20	2,2	7	7
12	61	1	1	0,4	50	20	2,8	7	7
55	62	1	1	0,2	50	30	2,2	13	7
21	63	1	1	0,2	30	30	2,2	13	3
39	64	1	1	0,2	50	30	2,2	7	3

Tabela 2: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F1 no TEA

Formulação F1		Estufa 40±0,5°C			Estufa 50±0,5°C			Refrigerador 5±0,5°C			Freezer -10±0,5°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Média	5,9267	5,8633	5,9267	5,8634	5,8833	5,9667	5,9133	5,9567	5,9101	6,0202	5,9667	6,01	6,0233
Desvio padrão	0,0208	0,0306	0,0153	0,0153	0,0153	0,0208	0,0208	0,0306	0,265	0,0361	0,0503	0,0557	0,0404
Valor de p	-----	0,041	0,834	0,013	0,044	0,078	0,477	0,233	0,44	0,018	0,272	0,099	0,021

Formulação F1		Luz Solar			Ciclos -10/+37±0,5°C		Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	6	12	3	7	14
Média	5,9267	5,9067	5,8067	5,3667	6,0033	6,1467	5,9233	5,9567	5,8933
Desvio padrão	0,0208	0,0802	0,1106	0,2466	0,0503	0,0603	0,0306	0,0321	0,0404
Valor de p	-----	0,697	0,139	0,017	0,071	0,004	0,883	0,246	0,273

Tabela 3: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F2 no TEA

Formulação F2		Estufa 40±0,5°C			Estufa 50±0,5°C			Refrigerador 5±0,5°C			Freezer -10±0,5°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Média	5,6733	6,2000	6,2000	6,0733	6,0733	6,0500	5,8833	5,9600	5,8167	5,7567	6,0000	6,1367	5,7200
Desvio padrão	0,2658	0,3464	0,3464	0,0643	0,0643	0,0500	0,0153	0,0624	0,0950	0,0351	0,0436	0,0611	0,0200
Valor de p	-----	0,105	0,105	0,064	0,064	0,073	0,244	0,143	0,429	0,619	0,104	0,042	0,777

Formulação F2		Luz Solar			Ciclos -10/+37±0,5°C		Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	6	12	3	7	14
Média	5,6733	6,5400	6,9033	6,9133	6,1967	6,4500	6,0733	6,1967	5,8833
Desvio padrão	0,2658	0,0693	0,1002	0,1002	0,0839	0,0500	0,0643	0,0839	0,0153
Valor de p	-----	0,005	0,002	0,002	0,031	0,008	0,064	0,031	0,244

Tabela 4: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F3 no TEA

Formulação F3		Estufa 40±0,5°C			Estufa 50±0,5°C			Refrigerador 5±0,5°C			Freezer -10±0,5°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Média	6,1800	6,1867	6,1233	6,0667	5,9933	6,0167	5,8367	6,2867	6,2200	6,2433	6,1800	6,4467	6,1233
Desvio padrão	0,0265	0,0306	0,0252	0,0737	0,0862	0,0764	0,1701	0,1305	0,0265	0,0462	0,0265	0,1501	0,0252
Valor de p	-----	0,789	0,055	0,066	0,023	0,025	0,026	0,238	0,138	0,108	1,000	0,039	0,055

Formulação F3		Luz Solar			Ciclos -10/+37±0,5°C		Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	6	12	3	7	14
Média	6,1800	6,1467	6,0500	6,2200	6,1233	6,5167	6,6633	6,5300	6,1467
Desvio padrão	0,0265	0,0208	0,0500	0,0265	0,0252	0,0950	0,2511	0,2390	0,0252
Valor de p	-----	0,161	0,016	0,138	0,055	0,004	0,029	0,065	0,189

Tabela 5: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F1 + Nutripeptides® no TEA

Formulação F1 + Nutripeptides®		Estufa 40±0,5°C			Estufa 50±0,5°C			Refrigerador 5±0,5°C			Freezer -10±0,5°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Média	5,9667	5,9133	5,9100	5,9100	5,9000	5,8500	5,7800	5,9900	5,9733	5,9667	5,9667	5,9367	5,9900
Desvio padrão	0,0208	0,0208	0,0265	0,0200	0,0700	0,0500	0,1212	0,0529	0,0321	0,0208	0,0208	0,1007	0,0400
Valor de p	-----	0,035	0,043	0,027	0,189	0,020	0,058	0,516	0,778	1,000	1,000	0,640	0,421

Formulação F1 + Nutripeptides®		Luz Solar			Ciclos -10/+37±0,5°C		Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	6	12	3	7	14
Média	5,9667	5,9167	5,9367	5,6533	6,0033	5,9133	5,9367	5,9067	5,8933
Desvio padrão	0,0208	0,0153	0,1007	0,1242	0,0503	0,0208	0,1007	0,0802	0,0404
Valor de p	-----	0,028	0,640	0,013	0,308	0,035	0,640	0,278	0,049

Tabela 6: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F1 + Colhibin® no TEA

Formulação F1 + Colhibin®		Estufa 40±0,5°C			Estufa 50±0,5°C			Refrigerador 5±0,5°C			Freezer -10±0,5°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Média	6,0167	6,0433	5,9733	6,0267	6,0000	5,7500	5,9667	6,0733	6,0167	6,0500	6,1233	5,7000	6,0567
Desvio padrão	0,0764	0,0404	0,0503	0,0737	0,0500	0,1136	0,0503	0,0473	0,0764	0,0500	0,0252	0,1400	0,0603
Valor de p	-----	0,621	0,458	0,878	0,768	0,028	0,397	0,336	1,000	0,561	0,083	0,026	0,516

Formulação F1 + Colhibin®		Luz Solar			Ciclos -10/+37±0,5°C		Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	6	12	3	7	14
Média	5,8833	5,8667	5,7867	5,6267	5,8900	5,8700	5,8900	5,8067	5,8767
Desvio padrão	0,0153	0,0153	0,1234	0,1002	0,0265	0,0361	0,0557	0,1106	0,0850
Valor de p	-----	0,252	0,249	0,012	0,725	0,587	0,851	0,300	0,900

Tabela 7: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F3 + Nutripeptides® no TEA

Formulação F3 + Nutripeptides®		Estufa 40±0,5°C			Estufa 50±0,5°C			Refrigerador 5±0,5°C			Freezer -10±0,5°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Média	5,8833	5,8633	5,8067	5,8733	5,8333	5,7800	5,7233	5,8833	5,8067	5,8533	5,8567	5,8067	5,8833
Desvio padrão	0,0153	0,0208	0,1106	0,0306	0,1007	0,1249	0,0833	0,0058	0,1106	0,0153	0,0321	0,1106	0,0351
Valor de p	-----	0,251	0,300	0,639	0,443	0,228	0,031	1,000	0,300	0,074	0,264	0,300	1,000

Formulação F3 + Nutripeptides®		Luz Solar			Ciclos -10/+37±0,5°C		Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	6	12	3	7	14
Média	5,8833	5,8667	5,7867	5,6267	5,8900	5,8700	5,8900	5,8067	5,8767
Desvio padrão	0,0153	0,0153	0,1234	0,1002	0,0265	0,0361	0,0557	0,1106	0,0850
Valor de p	-----	0,252	0,249	0,012	0,725	0,587	0,851	0,300	0,900

Tabela 8: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F3 + Colhibin® no TEA

Formulação F3 + Colhibin®		Estufa 40±0,5°C			Estufa 50±0,5°C			Refrigerador 5±0,5°C			Freezer -10±0,5°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Média	6,0767	6,0500	5,9667	5,9633	6,0500	5,8533	5,7400	6,0633	6,0300	6,0100	6,0733	5,8400	6,0667
Desvio padrão	0,0503	0,0500	0,0503	0,0651	0,0500	0,1026	0,1500	0,0404	0,0300	0,0436	0,0493	0,0872	0,0764
Valor de p	-----	0,551	0,055	0,075	0,551	0,028	0,021	0,739	0,240	0,158	0,939	0,015	0,859

Formulação F3 + Colhibin®		Luz Solar			Ciclos -10/+37±0,5°C		Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	6	12	3	7	14
Média	6,0767	6,0567	6,0233	5,9233	5,9600	6,0533	6,0533	6,0167	6,0400
Desvio padrão	0,0503	0,0603	0,0404	0,1137	0,0693	0,0451	0,0351	0,0416	0,0361
Valor de p	-----	0,682	0,226	0,100	0,078	0,582	0,546	0,187	0,363

Tabela 9: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F1 no TEN

Formulação F1		Estufa 37±0,5°C						Estufa 45±0,5°C					
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	30	60	90	3	7	14	30	60	90
Média	5,9267	5,7567	5,9700	5,9067	5,850	0,1106	5,7567	5,8067	5,9268	5,8367	5,7567	5,6900	5,3767
Desvio padrão	0,0208	0,0611	0,0458	0,105	0,0557	0,1106	0,0611	0,1106	0,0208	0,0551	0,0611	0,0557	0,0473
Valor de p	-----	0,010	0,210	0,763	0,089	0,139	0,010	0,139	1,000	0,057	0,010	0,002	0,000
Formulação F1		Luz Solar *			Refrigerador 5±0,5°C *			Temperatura ambiente * 24±2°C					
Variáveis (dias)	t0	30	60	90	30	60	90	30	60	90			
Média	5,9267	5,5600	5,3133	5,5100	6,0200	6,0190	5,9700	5,7567	5,9233	5,8600			
Desvio padrão	0,0208	0,0700	0,0681	0,0985	0,0361	0,0362	0,0436	0,0611	0,0306	0,0529			
Valor de p	-----	0,001	5,5600	0,002	0,018	0,018	0,195	0,010	0,883	0,112			

*Valores de 3°, 7° e 14° das condições luz solar, temperatura ambiente e refrigerador, vide **Tabela 2**

Tabela 10: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F3 no TEN

Formulação F3		Estufa 37±0,5°C						Estufa 45±0,5°C					
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	30	60	90	3	7	14	30	60	90
Média	6,1800	6,1467	6,2200	6,2189	6,1933	6,1467	5,9233	6,2200	6,3300	6,2433	6,0233	5,5333	5,5267
Desvio padrão	0,0265	0,0208	0,0265	0,0264	0,1115	0,0208	0,0709	0,0265	0,1058	0,0462	0,0451	0,0666	0,0929
Valor de p	-----	0,161	0,138	0,138	0,850	0,161	0,004	0,138	0,076	0,108	0,007	0,00	0,000
Formulação F1		Luz Solar			Refrigerador 5±0,5°C			Temperatura ambiente 24±2°C					
Variáveis (dias)	t0	30	60	90	30	60	90	30	60	90			
Média	6,1800	5,8800	5,8000	5,6600	6,2733	6,2767	6,2768	6,1267	6,1000	5,9900			
Desvio padrão	0,0265	0,0656	0,0529	0,050	0,0950	0,1464	0,1168	0,0503	0,0458	0,0781			
Valor de p	-----	0,002	0,000	0,000	0,177	0,323	0,235	0,180	0,059	0,016			

*Valores de 3°, 7° e 14° das condições luz solar, temperatura ambiente e refrigerador, vide **Tabela 4**

Tabela 11: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F1+ Nutripeptides® no TEN

Formulação F1 + Nutripeptides®		Estufa 37±0,5°C						Estufa 45±0,5°C					
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	30	60	90	3	7	14	30	60	90
Média	5,9667	5,9033	5,8933	5,9033	5,6800	5,0167	5,5167	5,8933	5,8867	5,8200	5,5600	5,5733	5,2300
Desvio padrão	0,0208	0,0551	0,0306	0,0551	0,050	0,0764	0,0764	0,036	0,0451	0,0529	0,050	0,0874	0,0436
Valor de p	-----	0,136	0,026	0,136	0,001	0,005	0,001	0,026	0,049	0,011	0,000	0,002	0,000

Formulação F1+ Nutripeptides®		Luz Solar			Refrigerador 5±0,5°C			Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Média	5,9667	4,9667	4,3900	4,033	5,8200	5,9367	5,8100	5,7700	5,8200	5,7700
Desvio padrão	0,0208	0,0208	0,0854	0,0451	0,0529	0,1007	0,0700	0,1253	0,0529	0,070
Valor de p	-----	0,000	0,000	0,000	0,011	0,640	0,021	0,055	0,011	0,010

*Valores de 3°, 7° e 14° das condições luz solar, temperatura ambiente e refrigerador, vide **Tabela 7**

Tabela 12: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F1+ Colhibin® no TEN

Formulação F1 + Colhibin®		Estufa 37±0,5°C						Estufa 45±0,5°C					
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	30	60	90	3	7	14	30	60	90
Média	6,0167	6,0600	5,9333	6,0168	5,8233	5,8467	5,6600	6,0600	5,9133	6,030	5,7133	5,700	5,4233
Desvio padrão	0,0764	0,0361	0,1250	0,0765	0,0907	0,1102	0,050	0,0361	0,1250	0,0608	0,1007	0,0954	0,0907
Valor de p	-----	0,424	0,380	1,000	0,048	0,093	0,002	0,424	0,289	0,825	0,014	0,011	0,001

Formulação F1+ Colhibin®		Luz Solar			Refrigerador 5±0,5°C			Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Média	6,1800	5,2633	4,9633	4,6367	5,7767	6,0333	5,7768	5,8067	5,9800	5,7900
Desvio padrão	0,0265	0,0416	0,0513	0,0513	0,1159	0,0702	0,1158	0,0929	0,0954	0,1300
Valor de p	-----	0,000	0,000	0,000	0,040	0,795	0,041	0,039	0,631	0,060

*Valores de 3º, 7º e 14º das condições luz solar, temperatura ambiente e refrigerador, vide **Tabela 6**

Tabela 13: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F3+ Nutripeptides® no TEN

Formulação F3 + Nutripeptides®		Estufa 37±0,5°C						Estufa 45±0,5°C					
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	30	60	90	3	7	14	30	60	90
Média	5,8833	5,8835	5,7867	5,8667	5,7300	5,6267	5,6600	5,8835	5,7867	5,8100	5,8033	5,7867	5,4367
Desvio padrão	0,0153	0,0154	0,1234	0,0152	0,0600	0,1002	0,0500	0,0153	0,1234	0,0794	0,0777	0,1234	0,0643
Valor de p	-----	1,000	0,249	0,252	0,013	0,012	0,002	1,000	0,249	0,191	0,155	0,249	0,000
Formulação F3+ Nutripeptides®		Luz Solar			Refrigerador 5±0,5°C			Temperatura ambiente 24±2°C					
Variáveis (dias)	t0	30	60	90	30	60	90	30	60	90			
Média	5,883	5,3667	4,6700	4,5200	5,7667	5,8100	5,7033	5,7300	5,6133	5,6267			
Desvio padrão	0,0153	0,0586	0,0700	0,0458	0,1135	0,0794	0,0351	0,0600	0,1115	0,1002			
Valor de p	-----	0,000	0,000	0,000	0,153	0,191	0,001	0,013	0,014	0,012			

*Valores de 3°, 7° e 14° das condições luz solar, temperatura ambiente e refrigerador, vide **Tabela 5**

Tabela 14: Valores da média, desvio padrão e valor de p dos valores pH da formulação F3+ Colhibin® no TEN

Formulação F3 + Colhibin®		Estufa 37±0,5°C						Estufa 45±0,5°C					
Variáveis (dias)	t0	3	7	14	30	60	90	3	7	14	30	60	90
Média	6,0767	6,0567	5,9733	5,9233	5,7567	5,7568	5,5367	6,0567	5,9733	5,9400	5,800	5,7933	5,5467
Desvio padrão	0,0503	0,0603	0,0737	0,1137	0,0737	0,0723	0,0551	0,0603	0,0737	0,1136	0,0954	0,0814	0,0404
Valor de p	-----	0,682	0,115	0,100	0,003	0,003	0,000	0,682	0,115	0,129	0,011	0,007	0,000

Formulação F3+ Colhibin®		Luz Solar			Refrigerador 5±0,5°C			Temperatura ambiente 24±2°C		
Variáveis (dias)	t0	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Média	6,0767	5,6333	5,0733	4,6467	5,8800	5,7933	5,8600	5,880	5,7933	5,7567
Desvio padrão	0,0503	0,1021	0,1650	0,0643	0,0500	0,0814	0,050	0,050	0,0814	0,0737
Valor de p	-----	0,003	0,001	0,000	0,009	0,007	0,006	0,009	0,007	0,003

*Valores de 3º, 7º e 14º das condições luz solar, temperatura ambiente e refrigerador, vide **Tabela 8**

Artigos aceitos para publicação

1. TAVARES, G. D., ISHIKAWA, G.M, Monteiro, T.F, ZANOLINI, C., KEDOR-HACKMANN, E.R.M., BOU-CHACRA, N. A., CONSIGLIERI, V. O. DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF ACYCLOVIR IN POLYMERIC NANOPARTICLES. *Química Nova (Online)*. , 2011.

Trabalhos Publicados em anais de eventos

1 . ALMEIDA, M. M., D.CONTE, J., BOU-CHACRA, N. A., QUENCA-GUILLEN, J. S., LIMA, C. R. R. C., ZANOLINI, C., BOTELHO T.S., BABY R. A., KANEKO T.M.,VELASCOM.V.R. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIES CONTAINING URSOLIC ACID In: Workshop de Nanotecnologia Aplicada, 2011, São Paulo. **Fármacos e MEDICAMENTOS**. São Paulo: RCN editora, 2011. v.65.

2. ALMEIDA, M. M., BOU-CHACRA, N. A., QUENCA-GUILLEN, J. S., LIMA, C. R. R. C., ZANOLINI, C., BOTELHO T.S., BABY R. A., KANEKO T.M., VELASCO M.V.R. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC NANOCAPSULES CONTAINING URSOLIC ACID In: Workshop de Nanotecnologia Aplicada, 2011, São Paulo. **Fármacos e Medicamentos**. São Paulo: RCN editora, 2011. v.65.

3. ALMEIDA, M. M., BOU-CHACRA, N. A., QUENCA-GUILLEN, J. S., LIMA, C. R. R. C., ZANOLINI, C., BOTELHO T.S., MERCURI, L. P., MATOS, J.R., VELASCO M.V.R.AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DAS ARGILAS EM FILTRO SOLAR EMPREGANDO TÉCNICAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC), TERMOGRAVIMETRIA (TG) E TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG). In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA, 2010, São Pedro. **VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA**, 2010.

4. LIMA, C. R. R. C., TAVARES V.F., ALMEIDA, M. M., BOTELHO T.S., ZANOLINI, C., QUENCA-GUILLEN, J. S., PRADO M.S.A., SANTORO M.I.R.M., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. CAPILLARYELECTROPHORETIC DETERMINATION OF FATTY ACIDS IN COSMETICS CONTAINING BRAZIL NUT OIL In: 26th IFSCC, 2010, BUENOS AYRES. **26th IFSCC**. , 2010.

5. ZANOLINI, C., ALMEIDA, M. M., TAVARES V.F., MATOS, J.R., SANTORO M.I.R.M.,KEDOR-HACKMANN,E.R.M. COMPORTAMENTO TÉRMICO DE DUAS AMOSTRAS DE HIDROLISADO DE PROTEÍNA DE ARROZ ISOLADAS E ASSOCIADAS A UMA FORMULAÇÃO COSMÉTICA In: 24º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2010, SÃO PAULO. **24º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**. , 2010.

6. LIMA, C. R. R. C., TAVARES V.F., ALMEIDA, M. M., BOTELHO T.S., QUENCA-GUILLEN, J. S., ZANOLINI, C., MATOS, J.R., SANTORO M.I.R.M., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. CONTRIBUTION OF THERMAL ANALYSIS FOR STABILITY EVALUATION OF THE BRAZIL NUT OIL IN COSMETIC FORMULATION In: 26th IFSCC, 2010, BUENOS AYRES. **26th IFSCC.** , 2010.
7. ALMEIDA, M. M., BOU-CHACRA, N. A., QUENCA-GUILLEN, J. S., LIMA, C. R. R. C., ZANOLINI, C., BABY R. A., KANEKO T.M., VELASCO M.V.R. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC NANOCAPSULES CONTAINING URSOLIC ACID In: 24º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2010, SÃO PAULO. **24º Congresso Brasileiro de Cosmetologia.** , 2010.
8. ALMEIDA, M. M., BOU-CHACRA, N. A., QUENCA-GUILLEN, J. S., LIMA, C. R. R. C., ZANOLINI, C., BABY R. A., KANEKO T.M., VELASCO M.V.R. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC NANOCAPSULES CONTAINING URSOLIC ACID In: 26th IFSCC, 2010, BUENOS AYRES. **26th IFSCC.** , 2010.
9. LIMA, C. R. R. C., ALMEIDA, M. M., ZANOLINI, C., QUENCA-GUILLEN, J. S., MERCURI, L. P., MATOS, J.R., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO DO ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS UTILIZANDO A ANÁLISE TÉRMICA In: VII CBRATEC, 2010, São Pedro. **VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA.** , 2010.
10. ZANOLINI, C., ALMEIDA, M. M., LIMA, C. R. R. C., TAVARES V.F., MATOS, J.R., SANTORO M.I.R.M., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. THERMAL BEHAVIOR OF ISOLATED HYDROLYZED RICE PROTEIN AND MIXTURED IN A COSMETIC FORMULATION In: 26th IFSCC, 2010, BUENOS AYRES. **26th IFSCC.** , 2010.