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

**DETERMINAÇÃO DE ALFAHIDROXIÁCIDOS POR
ELETROFORESE CAPILAR E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICÊNCIA EM PRODUTOS COSMÉTICOS**

ELIZÂNGELA ABREU DUTRA

Tese para obtenção do Grau de
DOUTOR

Orientadora
Profª Titular Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2005

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

12747

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011170

Ficha Catalográfica

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

Dutra, Elizângela Abreu

D978d Determinação de alfa-hidroxiácidos por eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência em produtos cosméticos / Elizângela Abreu Dutra. -- São Paulo, 2005. 152p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria

1. Cosméticos : Controle de qualidade 2. Eletroforese capilar : Química analítica 3. Cromatografia líquida de alta eficiência : Química analítica I. T. II. Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria, orientador.

668.55 CDD

ELIZÂNGELA ABREU DUTRA

**DETERMINAÇÃO DE ALFAHIDROXIÁCIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR
E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÊNCIA EM PRODUTOS
COSMÉTICOS**

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Titular Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
Orientadora / Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, 28 de 04 2005.

*"Lembra-te do teu Criador nos dias da tua mocidade,
antes que venham os maus dias, e cheguem os anos dos quais
venhas a dizer: Não tenho neles contentamento."*

Ec.12:31

*Agradeço ao meu Deus por mais esta conquista na minha vida!!
Por sua presença e seu amor em todo tempo, por me capacitar e
renovar as minhas forças nos momentos difíceis, não permitindo
que eu desanimasse.*

À minha querida mãe que mais uma vez, com seu grande amor e paciência, soube, apesar da distância, aliviar minhas ansiedades nos momentos difíceis dessa jornada. Meu exemplo de determinação!

Aos meus irmãos, Elisson, Enejane e Gabriel, ao meu pai, Sebastião Cristovão, ao meu padrasto Pedro Lopes, aos meus cunhados Henri e Ellen e ao meu sobrinho querido Elias Enrique, que me apoiaram e me deram força e incentivo quando mais precisei, muito obrigada!

*À Professora Titular Erika Rosa
Maria Kedor-Hackmann, pela amizade, e
por aceitar orientar-me mais uma vez,
acreditando no meu potencial de trabalho para
conclusão desta pesquisa.*

À Coordenadoria do curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Apoio ao Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido durante todo desenvolvimento da pesquisa.

À Professora Titular **Maria Inês Rocha Miritello Santoro** pela amizade, atenção e sugestões para realização deste trabalho.

À Professora Dr^a **Marina Franco Maggi Tavares** por permitir o uso do equipamento de Eletroforese Capilar no LACE (Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar), sem o qual não seria possível a realização deste trabalho, e pelas valiosas sugestões para realização deste trabalho.

À Professora Dr^a **Valentina Porta** por permitir o uso do equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência SHIMADZU[®] no Biofar.

À Professora **Vladi Olga Consigliere** pelas sugestões para finalização deste trabalho.

Ao Professor **Jorge Luiz S. Martins** pela atenção e solidariedade.

À **Francisca, Luciano e Ivan Moriconi** pela amizade e imensurável apoio, atenção e carinho que me dedicaram em todo tempo.

À **Gustavo Amadeu Micke** pela amizade e pelas idéias e sugestões para resolução de problemas encontrados em alguns momentos nesta pesquisa.

Às minhas companheiras de apartamento **Ixis Taymes, Suzana e Neide Mitsue Fujiya** pela amizade conquistada e pela paciência no período de convivência.

Aos amigos e colegas do laboratório: **Rosa Fernanda Ignácio, Manoel Roberto C. Santos, Andréia Peraro, Fátima C. Silva, Daniella Almança, Nájlá M. Kassab, Pedro Lopez, Tatiane Ramos, Tatiana Fazio e Ricardo Rezende**, pela companhia, valiosas discussões e sugestões que ajudaram a melhorar os resultados desta pesquisa.

Aos colegas do LACE, **Neide M. Fujiya, Alessandra Jarge, Fernando Tonin, Elisabete Alves, Edgar P. Moraes e Claudinei Alves** pela paciência e compreensão, quando foi necessário o uso de equipamentos.

Aos colegas do BIOFAR, **Eunice Kazue-Kano, Eder M. Benassi, Simone G. Schramm, Eunice E. Koono e Tatiana de Oliveira Souza** pela compreensão e ajuda na utilização do cromatógrafo a líquido SHIMADZU®.

À Farmácia Universitária da Universidade de São Paulo (FARMUSP), em especial à farmacêutica **Goretti Faria de Lima**, pela manipulação das amostras simuladas empregadas nesta pesquisa.

Às funcionárias **Benedita E. S. Oliveira, Celi T. Rabelo, Elaine M. Ychico, Elisabete C. S. Paiva, Iria R. da Silva, Jorge Lima, Regina M. Rojas e Susy Ramos**, pela cooperação para o bom andamento desta pesquisa.

Aos bibliotecários **Ângelo Antônio A. C. da Cruz, Adriana de Almeida e Leila Bonadio** pela atenção durante o levantamento bibliográfico e correção das referências bibliográficas.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, nas mais diferentes circunstâncias, contribuíram com eficiência e amizade para a conclusão desta pesquisa, o meu muito obrigada!!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
 I- INTRODUÇÃO.....	 01
 II- REVISÃO DA LITERATURA	
2.1- A pele.....	04
2.2- Envelhecimento cutâneo.....	07
2.3- Alfahidroxiácidos.....	08
2.3.1- Mecanismo de ação dos alfahidroxiácidos.....	09
2.4- Alfahidroxiácidos utilizados como padrão nesta pesquisa.....	11
2.5- Eletroforese capilar (CE).....	14
2.5.1- Instrumentação.....	15
2.5.2- Classificação da eletroforese capilar.....	16
2.5.2.1- Eletroforese capilar em solução livre (FSCE).....	17
2.5.2.2- Mobilidade eletroforética.....	17

2.5.2.3- Mobilidade efetiva.....	18
2.5.3- Fluxo eletrosmótico (FEO).....	19
2.5.3.1- Fatores que alteram o fluxo eletrosmótico.....	20
2.5.4- Detecção indireta na análise de compostos aniônicos.....	22
2.5.5- Introdução da amostra.....	23
2.5.6- Vantagens e limitações da CE.....	24
2.6- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
2.6.1- Técnicas de separação da CLAE.....	26
2.6.1.1- Separação de compostos ionizáveis por CLAE.....	26
2.6.2- Instrumentação.....	28
2.6.3- Vantagens e desvantagens da CLAE.....	29
2.7- Métodos de análises dos alfa-hidroxiácidos.....	29

III- OBJETIVOS..... 34

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material.....	35
4.1.1- Solventes e Reagentes.....	35
4.1.2- Equipamentos e acessórios.....	36
4.1.3- Alfa-hidroxiácidos empregados como padrão.....	37
4.1.4- Amostras.....	42
4.1.4.1- Amostras manipuladas.....	42
4.1.4.2- Amostras comerciais.....	43
4.2- Métodos analíticos.....	44
4.2.1- Eletroforese capilar (CE).....	44
4.2.1.1- Análise por eletroforese capilar em solução livre (FSCE).....	44
4.2.1.1.1- Ácidos tartárico, glicólico e láctico.....	44
4.2.1.1.1.1- Análise eletroforética.....	45
4.2.1.1.1.2- Validação do método CE por para análise dos ácidos tartárico, glicólico e láctico.....	47
4.2.2- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52

4.2.2.1- Ácidos tartárico, glicólico e lático.....	52
4.2.2.1.1- Análise cromatográfica.....	54
4.2.2.1.2- Validação do método CLAE para análise dos ácidos tartárico, glicólico e lático.....	55
4.2.2.2- Ácido Mandélico.....	62
4.2.2.2.1- Análise cromatográfica.....	63
4.2.2.2.2- Validação do método CLAE para análise do ácido mandélico.....	64
4.3- Comparação da exatidão e precisão dos métodos propostos (CE e CLAE) para determinação dos ácidos em estudo – análise estatística.....	68
4.3.1- Testes de significância.....	68
4.3.1.1- Comparação da exatidão.....	69
4.3.1.2- Comparação da precisão.....	70

V- RESULTADOS

5.1- Métodos analíticos.....	71
5.1.1- Eletroforese capilar (CE).....	71
5.1.1.1- Ácido tartárico, glicólico e lático.....	71
5.1.1.1.1- Validação do método CE para análise dos ácidos tartárico, glicólico e lático.....	74
5.1.2- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	84
5.1.2.1- Ácido tartárico, glicólico e lático.....	84
5.1.2.1.2- Validação do método CLAE para análise dos ácidos tartárico, glicólico e lático.....	90
5.1.2.2- Ácido mandélico.....	103
5.1.2.2.1- Validação do método CLAE para análise do ácido mandélico.....	106
5.1.3- Resultados obtidos na comparação da exatidão e precisão dos métodos propostos (CE e CLAE).....	112

VI- DISCUSSÃO.....	115
VII-CONCLUSÕES.....	135
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
ANEXO.....	152

RESUMO

RESUMO

Nos últimos anos vários produtos cosméticos contendo alfa-hidroxiácidos (AHAs) têm sido desenvolvidos e estão disponíveis no comércio, causando uma grande revolução em relação ao tratamento da pele fotoenvelhecida.

Com o aumento da produção desses produtos, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de novas metodologias analíticas para determinar os AHAs contidos em preparações cosméticas, tanto para o controle da qualidade do produto como para a segurança do consumidor.

Nesta pesquisa os AHAs tartárico, glicólico, lático e mandélico foram analisados simultaneamente por eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos foram validados avaliando-se os parâmetros de linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão.

A separação e determinação quantitativa por CE dos ácidos glicólico, tartárico e lático foram realizadas empregando-se um capilar de sílica fundida com comprimento total de 57 cm e 50 cm de comprimento até o detector, 75 μm d.i.; eletrólito constituído de hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; tensão aplicada de -20 kV com detecção UV indireta a 254 nm; temperatura de 35°C.

A separação e determinação quantitativa dos ácidos glicólico, tartárico e lático por CLAE foram realizadas empregando-se coluna Sinergy Hydro RP-18 Phenomenex®, fase móvel constituída de solução fosfato de amônio 15 mmol.L^{-1} , tetrabutilamônio 3 mmol.L^{-1} , pH 2,0, vazão 0,7 mL/min e detecção no UV 220 nm. Para determinação do ácido mandélico por CLAE, foi empregada coluna RP-18 Lichrospher® Merck, fase móvel constituída de solução de fosfato de amônio 15 mmol.L^{-1} / acetonitrila (80 / 20, v/v), pH 2,5, vazão 1,0 mL/min.

Os métodos propostos apresentaram boa linearidade com coeficiente de correlação (r) > 0,9999, boa especificidade, repetibilidade aceitável com desvio padrão relativo (RSD) < 1% para determinação nas amostras comerciais e exatidão com percentual de recuperação entre 99 e 101%. Os métodos propostos podem ser aplicados para determinação e quantificação de AHAs contidos em produtos cosméticos em curto espaço de tempo.

ABSTRACT

ABSTRACT

In recent years many new cosmetic products containing alpha-hydroxy acids (AHAs) have been developed and are commercially available, causing a great revolution to the treatment of the photoaging.

With the increase of the production of these products, there is a need of development and validation of analytical methods for quantitative determination of AHAs, both for quality control purposes and to avoid excessive concentrations that could cause consumers undesirable side-effects.

In this research, AHAs like tartaric, glycolic, lactic and mandelic acids were analyzed simultaneously using capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC). The methods were validated evaluating the parameters of linearity, limit of quantitation, precision and accuracy.

The separation and determination for tartaric, glycolic and lactic acids using CE involved an uncoated silica capillary with 75 μm i.d. and total length of 57 cm, 50 cm to the detector, with a solution containing 10 mmol.L^{-1} potassium phthalate as the background electrolyte and 0.5 mmol.L^{-1} cetyltrimethylammonium bromide as the electroosmotic flow modifier, pH 4.1, the applied voltage was -20 kV with indirect detection at 254 nm, the operating temperature was 35°C .

The separation and determination for tartaric, glycolic and lactic acids using HPLC involved an Sinergy Hydro RP-18 Phenomenex[®] column, a mobile phase constituted of 15 mmol.L^{-1} ammonium dihydrogen phosphate and 3 mmol.L^{-1} tetrabutylammonium bromide, pH 2.0, a flow-rate of 0.7 mL.min^{-1} and UV detection at 220 nm. For the determination of the mandelic acid using HPLC involved an LiChrospher[®] 100 RP-18 Merck column, a mobile phase constituted of 15 mmol.L^{-1} ammonium dihydrogen phosphate / acetonitrile (80/20, v/v) pH 2.5, a flow-rate of 1.0 mL.min^{-1} and UV detection at 220 nm.

The proposed methods presented good linearity with correlation coefficients more than 0.9999, good specificity, acceptable repeatability, with relative standard deviation (RSD) were less than 1% for commercial samples determination, and recoveries were between 99% and 101%. The proposed methods can be readily applied to commercially available cosmetic product for quantitative analysis with speed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da pele.....	5
Figura 2	Esquema básico de um sistema de eletroforese capilar.....	16
Figura 3	Representação da análise de ânions por detecção indireta.....	23
Figura 4	Esquema básico de um sistema de CLAE.....	28
Figura 5	Espectro de absorção do ácido glicólico em água. Concentração 800 µg/mL.....	38
Figura 6	Espectro de absorção no infravermelho do ácido glicólico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm ⁻¹	38
Figura 7	Espectro de absorção do ácido tartárico em água. Concentração 300 µg/mL.....	39
Figura 8	Espectro de absorção no infravermelho do ácido tartárico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm ⁻¹	39
Figura 9	Espectro de absorção do ácido láctico em água. Concentração 500 µg/mL.....	40
Figura 10	Espectro de absorção no infravermelho do ácido láctico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm ⁻¹	40
Figura 11	Espectro de absorção do ácido mandélico em água. Concentração 80 µg/mL.....	41
Figura 12	Espectro de absorção no infravermelho do ácido mandélico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm ⁻¹	41
Figura 13	Mobilidade efetiva em função do pH dos ácidos tartárico, glicólico e láctico e dos cromóforos hidrogenoftalato de potássio e ácido 3,5-dinitrobenzóico.....	72
Figura 14	Eletroferogramas obtidos para identificação dos padrões ácidos	

	tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L), nas concentrações de 60 $\mu\text{g/mL}$. Condições eletroforéticas: Capilar de sílica fundida, 50 cm até detector, total: 57 cm; Eletrólito: hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de Injeção: 5 s; 0,5 psi; Temperatura: 35°C; Detecção indireta a 254 nm.....	72
Figura 15	Eletroferograma obtido da mistura dos padrões ácido tartárico (T), ácido glicólico (G) e ácido láctico (L), na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$. Condições eletroforéticas: Capilar de sílica fundida, 50 cm até detector, total: 57 cm; Eletrólito: hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de Injeção: 5 s; 0,5 psi ; Temperatura: 35°C; Detecção indireta a 254 nm.....	73
Figura 16	Efeito da tensão aplicada na separação dos padrões ácido tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L) empregando eletroforese capilar. Concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$. Condições eletroforéticas: Capilar de sílica fundida, 50 cm até detector, total: 57 cm; Eletrólito: hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; Tensão: variada; Tempo de Injeção: 5 s; 0,5 psi; Temperatura: 35°C; Detecção indireta a 254 nm	73
Figura 17	Curva de calibração do ácido tartárico para o método eletroforético, concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$	75
Figura 18	Curva de calibração do ácido glicólico para o método eletroforético, concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$	75
Figura 19	Curva de calibração do ácido láctico para o método eletroforético, concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$	75
Figura 20	Eletroferograma obtido para: a) amostra A e placebo; b) padrões ácidos tartárico (T), ácido glicólico (G) e ácido láctico (L), nas concentrações de 60 $\mu\text{g/mL}$. Condições: Hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de injeção: 5 s.; 0,5 psi; Temperatura: 35°C; Detecção indireta a 254 nm.....	79
Figura 21	Eletroferograma obtido para: a) amostra B e placebo; b) padrões	

	ácidos glicólico (G) na concentração de 80 µg/mL. Condições: Hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L ⁻¹ , CTAB 0,5 mmol.L ⁻¹ , pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de injeção: 5 s.; 0,5 psi; Temperatura: 35 °C; Detecção indireta a 254 nm.....	80
Figura 22	Eletroferogramas das amostras comerciais e manipuladas A, B, E, F e G. Condições: Hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L ⁻¹ , CTAB 0,5 mmol.L ⁻¹ , pH 4,1; tensão: -20 kV; tempo de injeção: 5 s; 0,5 psi; temperatura: 35 °C; detecção indireta a 254 nm.....	82
Figura 23	Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao sistema 1 . Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH ₂ PO ₄ 25 mmol.L ⁻¹ : MetOH (80:20), pH 6,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C ; equipamento: CG 480 C.....	85
Figura 24	Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao sistema 2 . Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH ₂ PO ₄ 25 mmol.L ⁻¹ : MetOH (80:20), pH 2,5; vazão: 0,5mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C.....	85
Figura 25	Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao sistema 3 . Condições: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH ₂ PO ₄ 25 mmol.L ⁻¹ : MetOH (90:10), pH 2,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C.....	86
Figura 26	Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao sistema 4 . Condições: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH ₂ PO ₄ 25 mmol.L ⁻¹ : MetOH: TMA 10 mmol.L ⁻¹ (85:15), pH 6,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C.....	86
Figura 27	Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e	

- lático (L) referente ao **sistema 5**. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH_2PO_4 10 mmol.L⁻¹; MetOH (90:10), TMA 30 mmol.L⁻¹, pH 6,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C..... 87
- Figura 28 Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e lático (L) referente ao **sistema 6**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹, pH 6,5; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C..... 87
- Figura 29 Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e lático (L) referente ao **sistema 7**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 25 mmol.L⁻¹, pH 3,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C ; equipamento: CG 480 C..... 88
- Figura 30 Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e lático (L) referente ao **sistema 8**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 25 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C..... 88
- Figura 31 Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e lático (L) referente ao **sistema 9**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹, TBA 3 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C..... 89
- Figura 32 Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e lático (L) referente ao **sistema 10**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 15 mmol.L⁻¹, TBA 3 mmol.L⁻¹,

	pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.....	89
Figura 33	Cromatogramas dos padrões dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 15 mmol.L ⁻¹ , TBA 3 mmol.L ⁻¹ , pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: SHIMADZU®.....	91
Figura 34	Cromatogramas da mistura dos padrões dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 15 mmol.L ⁻¹ , TBA 3 mmol.L ⁻¹ , pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: SHIMADZU®.....	91
Figura 35	Curva de calibração do ácido tartárico para o método cromatográfico, concentrações de 30 a 300 μ g/mL.....	93
Figura 36	Curva de calibração do ácido glicólico para o método cromatográfico, concentrações de 80 a 800 μ g/mL.....	93
Figura 37	Curva de calibração do ácido láctico para o método cromatográfico, concentrações de 50 a 500 μ g/mL.....	93
Figura 38	Cromatogramas obtidos para: a) amostra A e placebo; b) padrões ácidos tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L), nas concentrações de 120 μ g, 300 μ g e 200 μ g/mL de solução, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 15 mmol.L ⁻¹ , TBA 3 mmol.L ⁻¹ , pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: SHIMADZU®.....	97
Figura 39	Eletroferograma obtido para: a) amostra B e placebo; b) padrão ácido glicólico (G) na concentração de 80 μ g/mL. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 15 mmol.L ⁻¹ , TBA 3 mmol.L ⁻¹ , pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L;	

	detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: SHIMADZU®.....	98
Figura 40	Cromatogramas das amostras comerciais e manipuladas A, B, C, E, F, G, H e I. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 15 mmol.L ⁻¹ , TBA 3 mmol.L ⁻¹ , pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: SHIMADZU®.....	100
Figura 41	Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao sistema 1 . Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 30 mmol.L ⁻¹ , pH 3,0 vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: CG 480 C.....	103
Figura 42	Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao sistema 2 . Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 30 mmol.L ⁻¹ : ACN (90:10), pH 6,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: VARIAN®.....	104
Figura 43	Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao sistema 3 . Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) 125mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 30 mmol.L ⁻¹ : ACN (70:30), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: VARIAN®.....	104
Figura 44	Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao sistema 4 . Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: NH ₄ H ₂ PO ₄ 30 mmol.L ⁻¹ : ACN (80:20), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 220 nm; temperatura 23°C ± 1°C; equipamento: VARIAN®.....	105
Figura 45	Curva de calibração do ácido mandélico para o método	

	cromatográfico, concentrações de 10 a 80 $\mu\text{g/mL}$	107
Figura 46	Cromatogramas obtidos para: a) amostra D e placebo; b) padrão ácido mandélico (M), na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L^{-1} : ACN (80:20), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 220 nm; temperatura $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; equipamento: VARIAN®.....	108
Figura 47	Cromatogramas das amostras manipuladas e comerciais D, J e K. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L^{-1} : ACN (80:20), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 220 nm; temperatura $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; equipamento: VARIAN®.....	111

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Resumo das características físico-químicas dos AHAs em estudo.....	13
Quadro 2	Metodologias analíticas por CE para determinação de AHAs em diferentes mostras.....	32
Quadro 3	Metodologias analíticas por CLAE para determinação de AHAs em diferentes mostras.....	33
Tabela 1	Quantidades pesadas das amostras A, B, E, F e G e suas respectivas concentrações finais para análise por eletroforese capilar.....	49
Tabela 2	Sistemas de fases móveis empregadas com coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck® para separação dos ácidos glicólico, tartárico e láctico.....	52
Tabela 3.	Sistemas de fases móveis empregadas com coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex® para separação dos ácidos glicólico, tartárico e láctico.....	53
Tabela 4	Quantidades pesadas das amostras A, B, C, E, F, G, H e I e suas respectivas concentrações finais para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.....	58
Tabela 5.	Sistemas de fases móveis empregadas com coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm para determinação do ácido mandélico.....	62
Tabela 6.	Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método eletroforético para o ácido tartárico.....	76
Tabela 7.	Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método eletroforético para o ácido glicólico.....	76
Tabela 8	Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método eletroforético para o ácido láctico.....	76
Tabela 9	Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração do ácido	

	tartárico, glicólico e lático aplicando o método eletroforético.....	77
Tabela 10	Resultados obtidos para o cálculo do limite de quantificação do método eletroforético para os ácidos tartárico, glicólico e lático.....	77
Tabela 11	Resultados das análises nas amostras A, B, E, F e G, aplicando o método eletroforético e o tratamento estatístico dos dados obtidos...	81
Tabela 12	Resultados do teste de recuperação realizado nas amostras A, B, E, F, e G para o método eletroforético.....	83
Tabela 13	Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido tartárico.....	94
Tabela 14	Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido glicólico.....	94
Tabela 15	Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido lático.....	94
Tabela 16	Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração dos ácidos tartárico, glicólico e lático aplicando o método cromatográfico.....	95
Tabela 17	Resultados obtidos para o cálculo do limite de quantificação do método cromatográfico para os ácidos tartárico, glicólico e lático.....	95
Tabela 18	Resultados das análises nas amostras A, B, C, E, F, G, H e I aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.....	99
Tabela 19	Resultados do teste de recuperação realizado nas amostras A, B, C, E, F, G, H e I aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.....	101
Tabela 20	Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido mandélico.....	107
Tabela 21	Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração dos ácidos tartárico, glicólico e lático aplicando o método cromatográfico	108
Tabela 22	Resultados obtidos para o cálculo do limite de quantificação do método cromatográfico para o ácido mandélico.....	106
Tabela 23	Resultados das análises nas amostras D, J e K aplicando o método	

	cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.....	110
Tabela 24	Resultados do teste de recuperação realizado nas amostras D, J e K aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.....	110
Tabela 25	Parâmetros estatísticos obtidos para a comparação da exatidão e precisão dos métodos CLAE e CE a partir da determinação dos ácidos tartárico, glicólico e láctico nas amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).....	113
Tabela 26	Resultados obtidos na comparação da exatidão dos métodos CLAE e CE para a determinação dos ácidos tartárico, glicólico e láctico nas amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).....	114
Tabela 27	Resultados obtidos na comparação da precisão dos métodos CLAE e CE para a determinação dos ácidos tartárico, glicólico e láctico nas amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AHAs	Alfahidroxiácidos
ACN	Acetonitrila
CTFA	Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association
CE	Capillary Electrophoresis
CGE	Capillary Gel Electrophoresis
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing
CITP	Capillary Isotacophoresis
CCE	Capillary Chromatography Electrophoresis
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
cm	Centímetro
CMC	Concentração Micelar Crítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficência
°C	Grau Celsius
FDCA	Food, Drug and Cosmetic Act
FDA	Food and Drug Administration
FSCE	Free Solution Capillary Electrophoresis
FEO	Fluxo Eletrosmótico
g	Grama
HIBA	Ácido Hidroxiisobutírico
kV	Quilovolt
MeOH	Metanol
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
mL	Mililitro
MM	Massa molecular
MECK	Micellar Electrokinetic Chromatography
NMF	Natural Moisturing Factor
nL	Nanolitro
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₄ H ₂ PO ₄	Fosfato de amônio monobásico
pH	Logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio
pKa	Logaritmo negativo da constante de dissociação
RSD	Desvio Padrão Relativo
TFA	Ácido trifluoracético

TTAB	Brometo de Tetradeciltrimetilamônio
TBA	Tetrabutilamônio
TMA	Tetrametilamônio
UV	Ultravioleta
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda
μm	Micrômetro
μ	Mobilidade iônica
μ_{ef}	Mobilidade eletroforética
μ_{ef}	Mobilidade efetiva
μL	Microlitros

INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO

A pele retrata o estado de saúde e o estilo de vida de um indivíduo, influenciando diretamente na estética e no estado psíquico das pessoas, consequentemente em suas atividades sociais e profissionais. O aspecto da pele tornou-se uma preocupação essencial, tanto para as mulheres como para os homens, seja na vida social ou particular (PEYREFITTE et al., 1998).

Tem-se demonstrado que a perda da umidade da pele proporciona o surgimento de rugas e a diminuição da elasticidade; essa redução pode dever-se a fatores extrínsecos (raios ultravioletas, temperatura, umidade, uso de compostos químicos como sabões e detergentes sintéticos) e intrínsecos (algumas afecções e ação de medicamentos) (MAGALHÃES, 2000).

O tratamento antienvhecimento tópico tem atuação em três principais alvos: proteção contra as radiações UV (fotoproteção), controle dos processos oxidativos (antioxidantes) e combate ao ressecamento (hidratação). Toda evolução no conceito de produtos hidratantes tem por base o resultado de trabalhos que avaliam a composição bioquímica e funcionalidade do estrato córneo em função do uso de agentes esfoliantes, como os alfa-hidroxiácidos (JENTZSCH et al., 2002; RAWLINGS e HARDING, 2004).

Os alfa-hidroxiácidos (AHAs) são ácidos orgânicos encontrados em plantas, frutas, vinho e leite e foram relatados para uso em cosméticos pela primeira vez em 1974 (VAN SCOTT e YU, 1974).

Os AHAs são citados como alternativa para o tratamento de ictioses, hiperqueratose folicular e outras disfunções do estrato córneo e, em altas concentrações, no tratamento de queratoses seborréicas, conhecidas como pontos senis, queratoses actínicas, verrugas e rugas. Os resultados dependem do tempo de exposição, sensibilidade da pele, entre outros. Agem como hidratantes, umectantes, clareadores de manchas, esfoliantes e rejuvenecedores da pele dependendo da concentração utilizada (ALMA, 2000; SCOTTI e VELASCO, 2003; SMITH, 1994).

As principais propriedades cosméticas dos AHAs envolvem aumento da textura, brilho, firmeza, elasticidade, hidratação, maciez e emoliência da pele. Aceleram o processo natural de descamação da pele, deixando-a mais lisa e diminuindo rugas e manchas (BERARDESCA e MAIBACH, 1995; KACOWICZ, 2000).

SARGISSON considerou que, se em cada década houvesse uma matéria-prima ou uma classe de matéria-prima como destaque, com certeza os anos 90 seriam lembrados como a década dos AHAs (SARGISSON et al., 1995).

Os AHAs mais conhecidos são os ácidos glicólico, lático, málico, cítrico, tartárico e mandélico. Mas ainda podem ser encontrados os ácidos glucônico, glicérico, tartrônico, mícico, galacturônico, glucurônico, hidroxicaprílico, hidroxicaprônico, hidroxibutírico, hidroxicaprílico e benzílico. Destes os mais utilizados são o ácido glicólico e o ácido lático.

Preparações cosméticas contendo alfa-hidroxiácidos pertencem à categoria de produtos cosmecêuticos, ou seja, cosméticos que além da ação cosmética (embelezamento) possuem uma ação terapêutica por incluírem, em sua formulação, substâncias ativas que provocam mudanças na estrutura e fisiologia da pele, devendo ser acompanhadas de bulas com especificação exata do seu conteúdo, modo de utilização e possíveis interações com outros medicamentos (GREIVE, 2002; KLIGMAN, 1994; KLIGMAN, 1998; MILLIKAN, 2001; NUNES, 2000; STEINER, 1995).

A fim de prevenir ou minimizar os efeitos do envelhecimento intrínseco ou cronológico da pele, as indústrias cosméticas começaram a desenvolver produtos contendo ativos antienvelhecimento como os alfa-hidroxiácidos. Dermatologistas têm prescrito géis e emulsões contendo AHAs para tratar cicatrizes profundas, acne e rugas, causando uma verdadeira revolução em relação ao tratamento da pele e antienvelhecimento.

Em 1989, a Food and Drug Administration (FDA) recebeu mais de 100 reclamações de consumidores que usavam produtos que continham AHAs, devido os mesmos causarem vermelhidão da face, inchaço (especialmente na área dos olhos), dermatite de contato, descoloração da pele, entre outros. Devido a grande quantidade de reclamações, a FDA considera necessário o controle das concentrações dos AHAs e de outros agentes queratolíticos presentes em produtos cosméticos (PRICE, 1996; YATES e HAVERY, 1999).

A crescente preocupação com a qualidade destes produtos, aumenta a responsabilidade dos laboratórios de controle de qualidade em desenvolver e validar metodologias analíticas para determinar a concentração dos AHAs e de outros agentes queratolíticos presentes em preparações cosméticas, tanto para garantir o controle da qualidade destes produtos como para a segurança do consumidor.

No presente estudo foram realizadas determinações quantitativas dos AHAs glicólico, tartárico, láctico e mandélico presentes em preparações cosméticas manipuladas e comerciais, empregando-se a eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

*REVISÃO DA
LITERATURA*

II- REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A PELE

A pele é o único órgão que limita o corpo com o meio ambiente, protegendo o organismo contra a perda de água por evaporação e contra o atrito.

É o único órgão que apresenta dois tipos de envelhecimento, o cronológico ou intrínseco, comum a todos os outros órgãos, relacionados com a idade, e cujos mecanismos ainda não estão bem definidos, e o envelhecimento causado pelo sol, chamado de fotoenvelhecimento. O envelhecimento causado pela idade é mais suave, causando danos estéticos muito pequenos. Porém, o fotoenvelhecimento é mais agressivo à superfície da pele, sendo responsável pela degeneração da elastina em uma massa amorfa (elastose), destruição das fibras de colágeno na derme, como também desenvolvimento de câncer de pele (PEYREFITTE et al., 1998; WILKINSON e MOORE, 1990).

A pele possui uma estrutura complexa, sendo o maior órgão do corpo humano, compreendendo 5% do seu peso total, com superfície de aproximadamente 2m² em um indivíduo adulto. É responsável por inúmeras funções, dentre elas, defesa contra elementos físicos e químicos, produção de melanina e atua como barreira para proteger o corpo da perda de água. É formada por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme, conforme Figura 1 (PEYREFITTE et al., 1998; BENY, 2000).

Figura 1. Representação esquemática da pele (<<<http://t2.technion.ac.il/~smhz/htmlfiles/background.htm>>>).

A hipoderme é considerada um isolante térmico, cuja atividade é basicamente amortizar traumas físicos ou mecânicos (WILKINSON e MOORE., 1990).

A derme é uma camada vascularizada, constituída por fibras de colágeno, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas, os quais fazem parte da matriz extracelular. Também estão presentes os nervos e anexos cutâneos (pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas). Os componentes da matriz extracelular são responsáveis pelas propriedades reológicas da pele (resistência mecânica, flexibilidade e elasticidade), hidratação, homeostase e permeabilidade da pele. É na derme que ocorre também a produção de melanina (ROBERT, 2001).

A epiderme é uma camada que não possui irrigação sanguínea direta. É formada por cinco estratos que são de dentro para fora, estrato germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, os quais possuem células que sofrem alterações durante o processo de maturação.

O estrato germinativo dá suporte à epiderme e estabelece a união com a derme. Por reprodução continuada dá origem às camadas epidérmicas restantes que terminam no estrato córneo. No estrato espinhoso estão presentes as células de Langerhans que agem como mediadores na imunidade celular. O estrato granuloso realiza síntese de proteínas responsáveis pela adequada estruturação do estrato córneo. O estrato lúcido é encontrado apenas onde a camada córnea é espessa, presente na planta dos pés e palma das mãos (BENY, 2000; HARRIS, 2003).

O estrato córneo é a camada mais fina e superficial da epiderme com função fotoprotetora. É formado por várias camadas de células anucleadas e queratinizadas, chamadas de corneócitos, que são justapostas, umas sobre as outras formando camadas que são substituídas periodicamente por outras células das camadas mais internas. Os corneócitos são conectados entre si através de desmossomos que impedem o deslizamento de uma camada sobre a outra. A hidratação da camada córnea é assegurada por um filme cutâneo denominado manto hidrolipídico, composto por água, sais minerais, enzimas, vitaminas e gorduras. A beleza e a integridade geral da pele depende de uma constante renovação celular que deve ocorrer em condições normais todos os meses (RAWLINGS e HARDING, 2003).

A renovação da pele é dada por sua queratinização, a qual é regulada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos podemos citar o equilíbrio entre mitoses da camada basal e a descamação das células mais superficiais, a ação dos hormônios, por exemplo, prostaglandinas e determinadas doenças como a ictiose. Dentre os fatores extrínsecos temos as agressões climáticas como ventos, raios solares, remoção mecânica das células mortas por uso de esfoliantes e/ou mecanismos físicos (HARDING, 2000).

Com a influência destes fatores, a camada córnea pode tornar-se rígida, frágil e quebradiça e não assegurar mais a sua função fotoprotetora. As áreas fotoexpostas, que são particularmente afetadas pela radiação ultravioleta (UV), um dos maiores responsáveis pela degeneração da pele, caracterizam-se pela ocorrência de rugas e sulcos, tornando-se opacas e

flácidas devido a perda de elasticidade. Outros aspectos importantes são a diminuição da quantidade dos lipídios de superfície, do tempo de renovação celular e do nível de hidratação transdérmica (HARDING, 2000).

Do estrato córneo se desprendem alguns componentes capazes de manter a umidade da pele, são os chamados Fatores de Hidratação Natural (NMF, do inglês Natural Moisturing Factor), responsáveis pela hidratação dos corneócitos, refletindo assim uma hidratação ótima à pele, permitindo que esta exerça sua função de proteção e barreira (BENY, 2003; FOX, 2003).

2.2. ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

O envelhecimento da pele é um processo complexo e está associado com mudanças morfológicas e químicas. Essas mudanças são consequências de um envelhecimento cronológico, mas podem ser acentuadas por fatores extrínsecos, por exemplo, o sol, sendo neste caso chamado de fotoenvelhecimento (WULF et al., 2004).

Pode-se definir envelhecimento como perda progressiva e irreversível da capacidade de adaptação do organismo às condições mutáveis do meio ambiente. O envelhecimento é um processo de decaimento de todas as funções vitais do organismo, sendo o envelhecimento cutâneo a parte visível desse processo. As causas de envelhecimento da pele estão relacionadas com a idade, fatores ambientais e modo de vida.

O sol é considerado o principal causador das alterações degenerativas na pele, as quais podem se manifestar como manchas, aspereza, rugas, flacidez etc..

Vários estudos têm sido realizados para identificar e descrever as modificações que ocorrem na pele envelhecida. Com o passar dos anos, são observadas mudanças celulares, bem como alterações quantitativas e qualitativas dos componentes da matriz extracelular (colágeno, elastina,

glicosaminoglicanos, etc.), refletindo numa perda de elasticidade e hidratação com formação de rugas (ROBERT, 2001).

Estudos recentes têm demonstrado que estas alterações podem ser minimizadas ou prevenidas pelo uso de produtos que contém ingredientes ativos protetores, nutritivos e hidratantes como filtros solares, vitaminas e alfa-hidroxiácidos (BENY, 2003; GREIVE, 2002; KACOWICZ, 2000; McCULLOUGH e SHULL., 2000).

2.3. ALFAHIDROXIÁCIDOS

Os alfa-hidroxiácidos (AHAs) são compostos orgânicos que apresentam um radical hidroxila no carbono alfa, encontrados naturalmente em frutas, leite e em outros alimentos. Dentre os mais empregados em preparações cosméticas podemos citar os ácidos glicólico, tartárico, láctico, mandélico, málico e cítrico. Destes, o mais utilizado é o ácido glicólico, por ser o AHA de menor massa molecular, o que lhe confere a capacidade de se difundir mais facilmente pelo estrato córneo, diminuindo assim a coesão entre os corneócitos e consequentemente aumentando a renovação da pele (HOWARD et al, 2002; KACOWICZ, 2000).

Em 1974, o dermatologista Van Scott percebeu o potencial dos AHAs no tratamento da ictiose, doença cutânea ligada à hiperqueratinização, caracterizada por promover uma séria escamação da pele (VAN SCOTT e YU, 1974).

Os primeiros estudos, envolvendo AHAs, concentram-se no tratamento da pele seca e muito seca. Em seguida foram verificados os efeitos dos AHAs na pele oleosa, acnêmica e manchas senis. Estes ativos também foram empregados em preparações cosméticas durante muitos anos como corretivos de pH (DRAELLOS, 2000; HOWARD et al, 2002; SARGISSON, 1995).

Ainda não estão totalmente esclarecidos os efeitos dos AHAs, sabe-se que os corneócitos epidérmicos tornam-se soltos, levando à esfoliação das células externas do estrato córneo. Soluções diluídas agem sobre o estrato córneo, enquanto soluções concentradas agem mais profundamente e causam epidermólise (FARTASCH, 1997; HARDING, 2000; KLIGMAN, 1994b).

A segurança de produtos contendo AHAs tem sido discutida por órgãos regulamentadores como a Food, Drug and Cosmetic Act (FDCA), a Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) e a FDA, os quais recomendam que a concentração de AHAs em produtos de uso diário não ultrapasse 10%, e que o pH final da formulação não seja menor que 3,5 (HEYMANN, 1997; HOWARD et al, 2002).

Existe uma preocupação com relação a fotossensibilidade provocada pelo uso contínuo de AHAs. Alguns autores consideram que esta fotossensibilidade pode ser devido à remoção contínua do estrato córneo. Por ser a primeira barreira contra os efeitos das radiações UV, a remoção desta camada provocaria uma diminuição na dose eritematogênica mínima do indivíduo, permitindo que as radiações atingissem a molécula de DNA, aumentando assim os riscos de câncer de pele (TSAI, 2000). Porém, estudos realizados mostraram que os AHAs inibem o desenvolvimento de tumores que possam ser provocados pelas radiações UV, agindo como agentes fotoprotetores (HONG et al, 2001; HOWARD et al, 2002).

2.3.1. MECANISMO DE AÇÃO DOS ALFAHIDROXIÁCIDOS

Uma das características do fotoenvelhecimento da pele é a hiperqueratinização, uma condição em que os corneócitos se aderem excessivamente, levando a um espessamento do estrato córneo.

Embora o mecanismo de ação dos AHAs não seja totalmente esclarecido, estudos realizados revelam que os AHAs diminuem a coesão de corneócitos, interferindo na formação de ligações iônicas, promovendo uma

flexibilidade à camada córnea, o que provoca um ligeiro efeito de “peeling” (BERARDESCA e MAIBACH, 1995; HOWARD et al., 2002).

Alguns autores sugerem que a aplicação tópica de AHAs pode ativar a biossíntese de glicosaminoglicanos dérmicos e de outras substâncias básicas intercelulares, como o ácido hialurônico e colágeno, que podem ser responsáveis pela erradicação das rugas finas (SMITH, 1994; BERNSTEIN et al., 2001).

Outros autores revelam que os AHAs mantêm uma absorção maior da molécula de água entre as células da pele, promovendo assim uma maior hidratação, contribuindo também para o clareamento cutâneo e a prevenção de manchas (BERARDESCA e MAIBACH, 1995; HERMITE, 1992).

A atividade dos AHAs está associada ao valor de pH da formulação, ou seja, a medida que ocorre uma diminuição do pH, aumenta a sua absorção na pele e consequentemente sua atividade esfoliante, podendo consequentemente causar irritação dérmica. Porém em baixas concentrações possuem alta capacidade hidratante (RUBIN, 1996; SMITH, 1996; HARDING et al., 2000).

A irritação provocada pelos AHAs está relacionada aos níveis de pH e à sua concentração. Recomendam-se concentrações mais altas e neutralização dos ácidos a valores de pH mais elevados para uma ação mais superficial, e valores de pH mais baixos para uma ação mais profunda, com a finalidade de estimular a síntese de glicosaminoglicanos e a deposição de colágeno (BERARDESCA e MAIBACH, 1995; RUBIN, 1996).

2.4. ALFAHIDROXIÁCIDOS UTILIZADOS COMO PADRÃO NESTA PESQUISA

a) Ácido glicólico

O ácido glicólico é um ácido monocarboxílico, hidrossolúvel, a menor molécula dos AHAs. É encontrado na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e pode ser obtido industrialmente por síntese química. Comercialmente disponível como pó branco cristalino com 99% de pureza e como solução aquosa a 70%. É usado em produtos cosméticos em concentrações de 4 a 10%, sendo que para obter os efeitos de *peeling*, sob supervisão médica, está sendo usado a 30, 50 e até 70% (COTELLESA et al., 1995; STILLER, 1996; VAN SCOTT et al, 1996).

b) Ácido tartárico

O ácido tartárico é um ácido dicarboxílico com dois grupos hidroxilas nas posições alfa do ácido, como se fossem duas moléculas de ácido glicólico. É encontrado no suco de uva e no processo de fermentação do vinho. Para fins industriais é obtido por síntese química. Usado também como aditivo em alimentos (ALMA, 2000; VAN SCOTT et al, 1996).

c) Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido monocarboxílico obtido pela fermentação ou por oxidação enzimática da lactose. Está presente no leite e sucos de tomates. Seu efeito hidratante e rejuvenescedor têm sido examinados como sendo um componente vital do fator de hidratação natural da pele (NMF), principalmente o lactato de sódio (SMITH, 1996; RAWLINGS, 2004).

É utilizado no tratamento de diversas infecções cutâneas, em concentrações de 5 a 15%, sendo que assim, como os demais AHAs, para obter efeitos de *peeling*, é necessário o uso de concentrações maiores sob supervisão médica.

d) Ácido mandélico

O ácido mandélico, também conhecido como ácido fenilglicólico, é encontrado naturalmente em amêndoas amargas. Nos últimos anos tem sido estudada sua ação sobre o fotoenvelhecimento, pigmentação irregular e acne. O ácido mandélico tem sido usado por muitos anos como um anti-séptico urinário. Nas concentrações de 35 g a 50 g / 100 L de urina, inibe *Staphylococcus aureus*, *bacillus proteus*, e *escherichia coli*. Quimicamente o ácido mandélico tem uma estrutura similar à de outros antibióticos bem conhecidos. É uma substância atóxica que após ser ingerida é excretada pela urina (TAYLOR, 1999; VAN SCOTT et al, 1996).

A concentração usual é de 2 a 10%, podendo ser combinado com o ácido retinóico. Quando comparado com o ácido glicólico, produz menos eritema e outros efeitos adversos.

Algumas características físico-químicas dos ácidos em estudo estão resumidas no Quadro 1.

Quadro 1. Resumo das características físico-químicas dos AHAs em estudo (MERC Index, 1996).

AHAs	NOME QUÍMICO	ESTRUTURA QUÍMICA	MM	ASPECTO FÍSICO	PF (°C)	SOLUBILIDADE	pK _{a1}	pK _{a2}	μ ₁ [*]	μ ₂ [*]
Ácido tartárico	ácido 2,3-dihidroxiutanodióico		150,09	Sólido branco translúcido, inodoro e higroscópico	206	Solúvel em água e álcool;	3,04	4,37	-32,6	-60,7
Ácido glicólico	ácido hidroxietanóico; ácido hidroxiaético		76,05	Sólido branco translúcido, inodoro e higroscópico	80	Muito solúvel em água, álcool e acetona;	3,89	-	-42,4	-
Ácido láctico	Ácido 2-hidroxiopropanóico		90,08	Sólido branco, inodoro e higroscópico	53	Solúvel em água e álcool;	3,86	-	-36,5	-
Ácido mandélico	Ácido α-hidroxi benzoacético		152,15	Sólido branco, inodoro e higroscópico	119	Solúvel em água e álcool;	3,37	-	-28,1	-

MM – Massa molecular

PF – Ponto de Fusão

pK_a – Constante de dissociação

μ – Mobilidade efetiva

2.5. ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A eletroforese capilar (CE, do inglês Capillary Electrophoresis) é uma técnica instrumental onde ocorre a separação de moléculas eletricamente carregadas, em meio líquido, quando submetidas à ação de um campo elétrico. A separação ocorre com base nas diferenças entre as mobilidades eletroforéticas, as quais estão relacionadas com a razão carga-massa e fatores estruturais (CAMILLERI, 1998).

No início da década de 30, Tiselius conseguiu a separação parcial de algumas proteínas constituintes do soro sanguíneo usando o método de eletroforese por fronteira móvel, no qual uma quantidade de amostra é colocada em um tubo, preenchido com solução tampão, e com a aplicação de um campo elétrico, os componentes da amostra migram com velocidade característica, dependente da mobilidade eletroforética de cada componente (TAVARES, 1996).

A maior limitação para estas separações eletroforéticas era a dissipação do calor gerado pela passagem de corrente através do meio condutor, chamado de efeito Joule. A falta de habilidade de dissipar este calor causa a formação de fluxos convectivos, os quais produzem uma dispersão de zona (TAVARES, 1996).

Para equilibrar os distúrbios causados pelo efeito Joule, na década de 60 e 70 foram realizadas pesquisas empregando-se tubos de pequeno diâmetro interno (200-500 μ m), concluindo-se que o uso destes tubos favorecia a dissipação do calor, eliminando assim a formação de fluxos convectivos (CAMILLERI, 1998).

No começo da década de 80, Jorgenson e Lukacs demonstraram que o uso de tubos com diâmetros ainda menores (< 100 μ m) produzia alta eficiência nas separações eletroforéticas (JORGENSEN e LUKACS. 1981; 1983). Por apresentarem pequeno diâmetro interno, estes tubos são denominados de capilar. Desde então, a eletroforese capilar tem conquistado grande atenção no campo científico, como uma técnica

alternativa para a separação e análise de compostos iônicos ou ionizáveis de interesse industrial, ambiental, clínico e farmacêutico (ALTRIA et al., 2003; ALTRIA e ELDER, 2004).

O interesse crescente pela CE nos últimos anos fez com que esta técnica se tornasse um método analítico bem estabelecido. A aceitação da eletroforese capilar como método analítico tem sido confirmada por vários órgãos governamentais, como por exemplo, a IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry) que estabeleceu definições para terminologia em CE (RIEKKOLA e JONSSON, 2001)., a farmacopéia americana possui métodos detalhados de CE (USP, 2003) e ainda métodos de rotina têm sido submetidos a órgãos regulatórios como o FDA (Food and Drug Administration).

2.5.1. INSTRUMENTAÇÃO

O desenvolvimento de instrumentos comerciais dotados de sistemas automáticos de injeção de amostra, detecção e aquisição de dados, tem tornado a CE uma técnica atraente para a utilização em análise de rotina.

Os componentes principais de um aparelho de CE são apresentados na Figura 2.

O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares, geralmente de sílica fundida com diâmetro interno de 15-100 μm e comprimento de 50-100 cm, eletrodos, geralmente de platina, um sistema de introdução da amostra com amostrador automático e detector apropriado conectado a um computador. Este dispõe de software para controle do equipamento, aquisição de dados e além disso registra e integra os eletroferogramas.

Figura 2. Esquema básico de um sistema de eletroforese capilar.

2.5.2. CLASSIFICAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR (RIEKKOLA e JONSSON, 2001)

A CE é constituída de técnicas especializadas com vários mecanismos de separação, os quais compreendem coletivamente a “eletroforese capilar”. De acordo com o modo de separação a CE pode ser classificada em:

- Eletroforese capilar em solução livre (FSCE; do inglês free solution capillary electrophoresis);
- Eletroforese capilar em gel (CGE; do inglês capillary gel electrophoresis);
- Focalização isoelétrica capilar (CIEF; do inglês capillary isoelectric focusing);
- Isotacoforese capilar (CITP; do inglês capillary isotachopheresis).
- Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC; do inglês micellar electrokinetic chromatography);

- Eletrocromatografia capilar (CEC; do inglês capillary electrochromatography);

Neste trabalho foi empregado o modo de eletroforese capilar em solução livre, a qual é apresentada com maior detalhe a seguir.

2.5.2.1. ELETROFORESE CAPILAR EM SOLUÇÃO LIVRE (FSCE)

É um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática. A FSCE é uma técnica útil para separação de uma grande variedade de solutos, incluindo íons inorgânicos, compostos orgânicos de baixa massa molecular e biomoléculas (ISSAQ, 2000; ISSAQ, 2002; KUHR, 1998; TAVARES, 1997).

Nesta técnica, um potencial é aplicado sobre um tubo capilar oco contendo um eletrólito, geralmente com característica tamponante. O capilar pode ser de teflon, vidro ou sílica fundida. Porém, o mais utilizado é o de sílica fundida por ser transparente na região UV/visível e dissipar eficientemente o aquecimento gerado pelo efeito Joule.

As separações eletroforéticas neste modo são baseadas nos movimentos dos íons sob ação de um campo elétrico aplicado. Este movimento está diretamente relacionado com a mobilidade eletroforética dos íons (KUHR, 1998).

2.5.2.2. MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (μ_{ef})

A mobilidade eletroforética (μ_{ef}) está relacionada com a velocidade eletroforética (V_{ef}) e o campo elétrico (E) dados pela equação 1.

$$\mu_{ef} = \frac{V_{ef}}{E} \quad \text{Equação 1}$$

A velocidade eletroforética e o campo elétrico podem ser expressos pelas equações 2 e 3, respectivamente.

$$V_{ef} = \frac{L_{det}}{t_m} \quad \text{Equação 2}$$

$$E = \frac{V}{L_{tot}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: L_{det} → distância do ponto de injeção até a posição onde está localizado o detector no capilar.

t_m → tempo de migração do íon.

V → diferença de potencial aplicada.

L_{tot} → comprimento total do capilar.

Assim, a μ_{ef} pode ser expressa pela equação 4.

$$\mu_{ef} = \frac{L_{det} \times L_{tot}}{V \times t_m} \quad \text{Equação 4}$$

2.5.2.3. MOBILIDADE EFETIVA (μ_{eff})

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica (μ_i), o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos.

A mobilidade efetiva (μ_{eff}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, na qual qualquer substância i presente em solução em diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo uma certa mobilidade efetiva dada pela equação 5:

$$\mu_{\text{eff}} = \sum (\mu_j \times \alpha_j) \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

μ_{eff} → mobilidade efetiva;

μ_j → mobilidade iônica ou eletroforética de cada espécie individual de cada espécie presente em solução;

α_j → fração molar ou função de distribuição de cada espécie individual presente em solução.

Os valores de μ_j e pK_a podem ser obtidos na compilação de HIROKAWA et al, 1983.

2.5.3. FLUXO ELETROSMÓTICO (FEO)

Quando um tampão (eletrólito) é colocado dentro do capilar, a superfície interna do capilar adquire carga. Isto pode ser causado pela ionização da superfície do capilar ou pela adsorção de íons do tampão no capilar. No caso de capilares de sílica, os grupos silanóis (Si-OH) presentes na parede interna dos capilares revestidos de sílica fundida são ionizados a grupos silanoatos (Si-O⁻) quando em contato com eletrólitos com pH acima de 3, tornando a parede interna do capilar carregada negativamente. Estes grupos silanoatos atraem cátions carregados positivamente provenientes do eletrólito formando uma camada de cátions fortemente ligada próximo à parede interna do capilar, chamada de camada fixa. Uma camada mais externa, por estar mais distante dos grupos silanoatos, não é fortemente atraída, sendo chamada de camada móvel. Quando uma tensão é aplicada, a camada móvel é puxada no sentido do cátodo (carregado negativamente) e este deslocamento gera um fluxo que bombeia efetivamente os íons ao longo do capilar, denominado de fluxo eletrosmótico. O sentido do fluxo

gerado é do ânodo para o cátodo, conforme Figura 2. Este fluxo formado origina um perfil de fluxo planar (radial), diferente do perfil de fluxo parabólico observado nos sistemas de alta pressão, como HPLC, o que contribui para a alta eficiência dos picos obtidos (BOONE et al., 1999; CAMILLERI, 1998).

Pela ação do FEO, os ânions que teoricamente migrariam para o eletrodo positivo (ânodo) são carregados para o eletrodo negativo (cátodo). A ordem de eluição será cátions, neutros e ânions. A velocidade de migração depende do tamanho dos íons e da magnitude e sinal das cargas. Cátions menores e de maior carga migrarão mais rápido do que cátions maiores e de menor carga. Enquanto que ânions menores e de maior carga eluem por último, como pode ser visto na Figura 2.

2.5.3.1. FATORES QUE ALTERAM O FLUXO ELETROSMÓTICO

A existência do FEO tem importantes implicações na CE. Nos últimos anos, várias estratégias têm sido desenvolvidas no sentido de exercer um controle apropriado do FEO, a fim de melhorar a eficiência da separação e resolução dos analitos. Por exemplo, quando se quer analisar somente ânions é desejável que ocorra uma eluição mais rápida, diminuindo o tempo de separação. Isto pode ser feito invertendo a direção do FEO, de modo que ele flua do cátodo para o ânodo. Porém, se apenas a direção do FEO é invertida, os ânions não migrarão em sentido ao detector, mas voltarão para o vial da amostra, uma vez que o sentido do FEO agora seria do detector para o vial da amostra. Torna-se então necessário reverter a polaridade da fonte de alta tensão, de modo que a extremidade do capilar que fica próximo ao detector seja o ânodo (pólo positivo), e então a ordem de eluição será invertida para ânions, neutros e cátions (COLOMBARA, 1997, BAKER. 1995).

A velocidade do FEO depende do pH, composição, concentração e força iônica do tampão. Assim, alterações de pH, composição e força iônica

da solução tampão, adição de modificadores e aditivos, temperatura, alterações na viscosidade e constante dielétrica dos solventes e aumento da voltagem têm sido praticadas satisfatoriamente (CAMILLERI, 1998).

Quanto maior o pH do tampão maior a ionização dos grupos silanóis e consequentemente maior o FEO. Quanto menor o pH do tampão menor ou nula será a ionização dos grupos silanóis e consequentemente o FEO não será significativo (KUHR, 1998; SANTORO et al., 2000).

Um aumento na força iônica do tampão, com temperatura controlada, causa uma diminuição no FEO. Mas se a temperatura não é controlada, um aumento na força iônica do tampão causaria um aumento na corrente e consequentemente um aumento na temperatura, a qual diminui a viscosidade e consequentemente aumenta o FEO. Aumentando a temperatura, diminui a viscosidade do meio e consequentemente aumenta o FEO. O FEO é diretamente proporcional à tensão aplicada, pH do tampão e temperatura e inversamente proporcional à força iônica do tampão (CAMILLERI, 1998).

Os aditivos químicos empregados para modificar o FEO são escolhidos por sua capacidade de cobrir a parede do capilar e mudar a estrutura da interface sílica / água. A direção do FEO pode ser revertida pela adição de surfactantes catiônicos ao eletrólito (por exemplo, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB)). Cada surfactante possui uma concentração micelar crítica (CMC), sendo que para inverter o FEO, geralmente são usados abaixo do valor da CMC. Quando usados em uma concentração acima da CMC ocorre formação de micelas. O valor da CMC do CTAB é de 1 mmol.L^{-1} (BECKERS e BOCEK, 2003; XIONG e LI, 1998).

A adição de solventes orgânicos pode aumentar ou diminuir o FEO, dependendo de como estes afetam a viscosidade, constante dielétrica e potencial zeta.

2.5.4. DETECÇÃO INDIRETA NA ANÁLISE DE COMPOSTOS ANIÔNICOS

Uma grande variedade de detectores pode ser aplicada em CE. Os detectores podem ser classificados em universais (medem propriedades existentes tanto no soluto como na solução) e específicos (medem uma propriedade específica do soluto). Dentre os detectores universais podemos citar os detectores de índice de refração e infravermelho, e dentre os detectores específicos podemos citar os fotodetectores (baseados na absorção na região UV/visível, fluorescência), e os eletroquímicos (amperométricos e condutância) (ISSAQ, 2002; TAVARES, 1996; SANTORO et al., 2000; SWINNEY e BORNHOP, 2000).

No modo de detecção direta, o detector monitora diretamente um componente cromóforo da amostra e, o eletrólito serve como branco. Enquanto que, na detecção indireta, o detector monitora um componente iônico do eletrólito que funciona como cromóforo.

A detecção UV indireta tem sido amplamente usada como uma técnica de detecção alternativa efetiva para ânions orgânicos e inorgânicos que apresentam uma baixa absorvidade molar na região de 200 – 900nm.

Uma revisão completa sobre detecção indireta de ânions em CE foi feita por DOBLE e HADDAO, 1999, onde são discutidos em detalhes fatores relacionados ao limite de detecção, composição de eletrólitos e determinação de íons inorgânicos, ácidos orgânicos e carboidratos.

A detecção indireta envolve a adição ao eletrólito de uma espécie que absorve fortemente na região UV (cromóforo), onde a absorbância desse cromóforo será monitorada continuamente no decorrer da análise. Quando a banda do soluto aniônico atinge o detector, o ânion do cromóforo é deslocado e o sinal da absorbância decai, retornando a posição original assim que o soluto deixa o detector, como representado na Figura 3.

Figura 3. Representação da análise de ânions por detecção indireta.

Na detecção indireta os picos no eletroferograma aparecem originalmente como picos negativos, mas podem ser revertidos a picos positivos utilizando “software” apropriados.

2.5.5. INTRODUÇÃO DA AMOSTRA

O modo pelo qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta na análise quantitativa (TAVARES, 1996). Dentre os modos de introdução da amostra em CE, os mais comuns são: injeção hidrodinâmica e injeção eletrocinética.

Na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão que pode ser estabelecido por pressurização ou à vácuo em um dos reservatórios da solução ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonagem. O volume de injeção (nL) vai depender do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida .

Na injeção eletrocinética, utiliza-se um gradiente de potencial estabelecido ao longo do comprimento do capilar por um período de tempo conhecido. A tensão aplicada provoca a migração dos íons da amostra para dentro do capilar devido à mobilidade eletroforética e eletrosmótica. O volume de injeção (nL) depende da mobilidade eletroforética dos solutos, do

fluxo eletrosmótico (FEO), da tensão aplicada, do tamanho do capilar e da concentração do soluto (CAMILLERI, 1998).

A vantagem da injeção hidrodinâmica é que a quantidade de soluto injetado é constante, independente de sua própria mobilidade, ao contrário do que acontece com a injeção eletrocinética (SANTORO et al, 2000).

O tempo necessário para que um soluto se movimente do início do capilar até o detector é denominado de tempo de migração (t_m).

2.5.6. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA CE

Dentre as vantagens podemos citar:

- Separações de alta eficiência;
- A quantificação da amostra é feita em poucos minutos;
- Geralmente, não é necessário um pré-tratamento das amostras;
- É uma técnica econômica: gastos reduzidos de reagentes e volumes de injeção de amostras na ordem de nanolitros (1 a 20 nL);
- As análises podem ser realizadas em grande intervalo de pH.
- Pouca quantidade de solventes e substâncias para descarte, diminuindo a poluição ambiental.

Dentre as limitações podemos citar:

- Baixa sensibilidade quando se usa detecção UV;

2.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia é uma técnica instrumental para separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias 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).

De acordo com a forma física do sistema de cromatografia pode-se definir a técnica geral. A fase estacionária pode ser colocada em um tubo cilíndrico ou disposta sobre uma superfície planar. Baseando-se nesta, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar, respectivamente. Considerando o estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás, a cromatografia supercrítica, onde se usa como fase móvel um vapor pressurizado em temperatura acima de sua temperatura crítica, e a cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido (SNYDER et al., 1997; SKOOG, 1992).

A cromatografia líquida em coluna 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 sistemas onde a fase estacionária, seja uma superfície sólida, líquida, uma resina de troca iônica, ou um polímero poroso, estão confinados em uma coluna e a fase móvel é forçada através da mesma sob altas pressões.

As mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que estará deixando a coluna cromatográfica é medida por um detector. Os detectores fotométricos são os mais empregados em CLAE, os

quais medem as mudanças na absorção de luz monocromática na região de 190-350nm (COLLINS et al., 1995).

2.6.1- TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO POR CLAE

A separação de compostos por CLAE envolve interação entre soluto, fase estacionária e fase móvel, as quais podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, entre outras. Os modos de separação podem então ser classificados de acordo com a natureza destas interações. São eles: cromatografia líquida em fase reversa, em fase normal, por pareamento de íons, por troca iônica e por exclusão. A escolha do modo mais adequado vai depender da natureza, massa molecular, polaridade e caráter iônico do soluto (CASS e DEGANI, 2001).

2.6.1.1- SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS INONIZÁVEIS POR CLAE

Em CLAE em fase reversa, a retenção dos analitos está relacionada à sua hidrofobicidade. Quanto mais hidrofóbico for o analito, mais retido ele fica. Quando um analito é ionizado, ele torna-se menos hidrofóbico e, entretanto, sua retenção diminui. Ácidos perdem um próton e tornam-se ionizados quando o pH aumenta e bases ganham um próton e tornam-se ionizadas quando o pH diminui.

O desenvolvimento de metodologias por CLAE para análise de compostos ionizáveis enfatizam o pH e/ou pareamento de íons como variáveis para controlar a seletividade. O pH da fase móvel determina o grau de ionização do analito ou coluna, afetando assim a retenção do analito bem como a largura e simetria do pico. Torna-se então necessário controlar o pH da fase móvel usando um tampão apropriado a fim de obter resultados reprodutíveis (DOLAN, 2002; DOLAN, 2001; SCHOENMAKERS et al, 1991).

Para controlar pH 2-3 é recomendado utilizar tampões fosfatos ou ácidos orgânicos fortes, como ácido trifluoracético (TFA). Enquanto que para controlar pH 4-5 é recomendado utilizar tampões de ácidos orgânicos como acetato ou citrato em lugar de tampões fosfatos, pois tampões fosfatos têm baixa capacidade tamponante nesta faixa de pH. A capacidade tamponante ideal ocorre quando o pH é igual ao pKa do tampão (HEYRMAN e HENRY, 2000).

Tampões fosfatos têm capacidade tamponante na faixa de pH de 2,1 a 3,1 ou 6,2 a 8,2 e, tampões acetatos têm capacidade tamponante na faixa de pH de 3,8 a 5,8. Sais de amônio são mais solúveis em misturas de solventes (ex: metanol/água) do que sais de potássio, e sais de potássio são mais solúveis do que sais de sódio (SCHELLINGER e CARR, 2004).

Dentre outros parâmetros que devem ser considerados podemos citar: força do solvente, tipo e concentração do tampão e possível adição de outros agentes (ex: pareadores iônicos). São fatores que podem afetar a seletividade e a retenção de compostos ionizáveis (SCHOENMAKERS et al, 1991).

2.6.2- INSTRUMENTAÇÃO

A CLAE possui instrumentos comerciais dotados de sistemas automático e manual de injeção, detecção e aquisição de dados, divididos em módulos que podem ser controlados individualmente ou por computador. Os componentes fundamentais de um aparelho de CLAE são representados na Figura 4.

Figura 4. Esquema básico de um sistema de CLAE.

2.6.3. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA CLAE

Dentre as vantagens podemos citar:

- alta resolução na separação;
- alta precisão nas análises quantitativas,
- ótima sensibilidade;
- versatilidade (pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como inorgânicos).

Dentre as desvantagens podemos citar:

- Alto custo da instrumentação e operação;
- Difícil análise qualitativa: o uso da CLAE para fins qualitativos não é desprezível, porém é necessário o emprego de pelo menos duas colunas com recheios diferentes e, o uso de padrões adicionados para aumentar o pico;
- Grande quantidade de fase móvel a ser descartada.

2.7. MÉTODOS DE ANÁLISES DOS ALFAHIDROXIÁCIDOS

No Brasil, a Câmara Técnica de Cosméticos (CATC) recomenda que a utilização de AHAs em produtos cosméticos deve ter sua concentração máxima permitida limitada a 10%, calculada na forma ácida em $\text{pH} \geq 3,5$ (BRASIL, 2001).

O controle da composição de produtos acabados contendo AHAs deve ser monitorado para evitar concentrações excessivas que possam causar problemas dermatológicos aos consumidores.

Alguns pesquisadores vêm contribuindo com trabalhos para determinação de alfa-hidroxiácidos em formulações cosméticas.

NICOLLETTI et al. 1998, determinaram AHAs (ácido glicólico, láctico, málico, tartárico e cítrico) empregando a CLAE em fase reversa com pareamento iônico. Foi utilizada uma coluna Altima[®] C₁₈ – 5 μm (250 mm x 2,1 mm d.i.), detector UV a 210 nm, fase móvel constituída de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH 2,2, contendo 10 mmol.L⁻¹ de cloreto de tetrabutylamônio, com uma vazão de 0,25 mL/min. A preparação das amostras envolve secagem a vácuo e resuspensão em água. Os tempos de retenção para o ácido glicólico, láctico e tartárico foram de aproximadamente 4, 6 e 10 minutos, respectivamente. O percentual de recuperação foi de 96-101%.

SCALIA et al., 1998, determinaram ácido glicólico em produtos cosméticos empregando a CLAE em fase reversa com pareamento iônico. Foi utilizada uma coluna Ultrasphere[®] ODS C₁₈ – 5 μm (150 mm x 4,6 mm d.i.) com detecção UV a 210 nm e fase móvel constituída de metanol/tampão fosfato 25 mmol.L⁻¹ pH 7,2 (2:98, v:v) contendo iodeto de tetrabutylamônio 2 mmol.L⁻¹. A vazão foi de 0,6 mL/min com temperatura constante de 32°C. As amostras foram pré-tratadas por extração em fase sólida utilizando cartuchos de troca iônica. O método foi validado e os percentuais de recuperação foram entre 92,4 e 96,2% e a precisão do método com desvio padrão relativo de 5,4%.

VILLIERS et al, 1998, propuseram uma metodologia de indicação de estabilidade por CLAE para avaliação de AHAs (ácido glicólico e lático) em formulações cosméticas. Para o referido método foi utilizada uma coluna Micro Bondapack® C₁₈ - 5µm (250 mm x 3,9 mm d.i.) e fase móvel constituída de acetonitrila/tampão fosfato 10⁻² mmol.L⁻¹, pH 2,25, (40:60, v/v). A detecção UV foi feita a 214 nm com vazão de 1 mL/min. Os tempos de retenção para o ácido glicólico e lático foram de aproximadamente 11 e 9 minutos, respectivamente.

HUANG et al, 2002, desenvolveram uma metodologia por CLAE em fase reversa para determinação de AHAs (ácido glicólico, málico, lático e cítrico) em produtos cosméticos. As análises foram feitas em uma coluna Capcell PAK® C₁₈ UG 120S – 5 µm (250 mm x 4,6 mm i.d.) com fase móvel constituída de ácido fosfórico 2% pH 2,0 e detecção UV a 210 nm. A vazão foi de 0,5 mL/min e os tempos de retenção para o ácido glicólico e lático foram de aproximadamente 6 e 9 minutos, respectivamente. O método foi validado e os percentuais de recuperação obtidos variaram de 99 a 99,2%, com desvio padrão relativo de 0,05 a 3,14 %.

CHANG e CHANG, 2003, determinaram por CLAE em fase reversa com pareamento iônico alguns agentes hidrofílicos presentes em produtos cosméticos, entre eles o ácido glicólico. Foi utilizada uma coluna Mightysil® RP-18 GP – 5 µm (250 mm x 4,6 mm i.d.) com fase móvel constituída de tampão fosfato 5 mmol.L⁻¹ contendo 10 mmol.L⁻¹ de hidróxido de tetrabutilamônio e 10% de metanol, sendo o pH ajustado a 2,5 com ácido fosfórico. A detecção UV foi feita a 220 nm com vazão de 1,1 mL/min e o tempo de retenção para o ácido glicólico foi de 3 minutos.

YATES e HAVERY, 1999, descreveram um método por CLAE para determinação de ácido lático, glicólico e outros ativos presentes em formulações cosméticas, utilizando uma coluna Phenomenex® C₈ e fase móvel constituída de ácido fosfórico e hidróxido de amônio com pH 2,5. A detecção foi feita a 210 nm. A vazão não foi relatada e o tempo de retenção para o ácido glicólico e lático foi de 5 e 8 minutos, respectivamente. O

tratamento da amostra foi feito por extração em fase sólida ou por cromatografia de troca iônica.

COUCH e HOWARDAD, 2002, quantificaram ácido glicólico em produtos cosméticos empregando CLAE em fase reversa. Foi utilizada uma coluna Phenomenex® Prodigy ODS-3 – 5 µm (250 mm x 4,6 mm d.i.) com fase móvel constituída de fosfato de amônio e acetonitrila, pH 3,0. Foi aplicado gradiente com detecção UV a 210 nm. O tempo de retenção para o ácido glicólico foi de 11 minutos. O tratamento da amostra é complexo, sendo submetida a cartuchos de troca iônica.

SHARMAN, 1997, determinou ácido láctico e poli (ácido láctico) em formulações cosméticas por eletroforese capilar com detecção UV indireta a 254 nm. Foi utilizado capilar de sílica fundida. O eletrólito de corrida foi o ácido 4-metoxibenzóico e tampão TRIS, contendo brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB) como modificador do FEO. A tensão aplicada foi de 30 kV com tempo de injeção de 3 s, 0,5 psi. O tempo de migração foi de 2 minutos. O método foi validado tendo um % RSD de 1,16 e recuperação média de 102,9%.

RANGEL et al, 2004, determinaram por espectrofotometria no UV o prazo de validade do ácido glicólico incorporado em uma emulsão não iônica. Foi utilizado como solvente o álcool isopropílico, permitindo uma melhor absorção do ácido glicólico. Porém para análises de amostras mais complexas, como as comerciais, o método não é específico devido a interferência dos excipientes mais complexos.

Outras metodologias analíticas empregando-se CE e CLAE para determinação de AHAs em diversas matrizes estão resumidas nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2. Metodologias analíticas por CE para determinação de AHAs em diferentes amostras.

AHAs	Tipo de Amostra	Modo de Separação	Eletrólito	Capilar	Deteção	Ref.
Tartárico láctico	Alimentos e bebidas	CE	Ác. 1, 2, 4, 5-benzeno-tetracarboxílico 3 mmol.L ⁻¹ + DETA ⁽¹⁾ 3 mmol.L ⁻¹ , pH 7,5	Capilar sílica fundida Polymicro Technologies®	Indireta 220nm	ARELLANO et al., 1997
Tartárico	Suco de laranja	CE	Tampão fosfato 200 mmol.L ⁻¹ pH 7,5	Capilar neutro coberto com poliacrilamida	200nm	SAAVEDRA et al., 2000
Tartárico	Chás e sucos de frutas	CE	TMA ⁽²⁾ 5 mmol.L ⁻¹ , TTAB ⁽³⁾ 1 mmol.L ⁻¹ pH 5,5	Capilar de sílica fundida Polymicro Technologies®	Indireta 220nm	WU et al., 1995
Tartárico Láctico	Resíduos sólidos de vinho	CE	Ácido benzóico 12 mmol.L ⁻¹ , histidina 10 mmol.L ⁻¹ , TTAB ⁽³⁾ 1 mmol.L ⁻¹ pH 5,0	Capilar de sílica fundida	Indireta 260nm	MALLET et al., 1999
Tartárico	Frutas	CE	Tampão fosfato 180 mmol.L ⁻¹ , CTAB ⁽⁴⁾ 1 mmol.L ⁻¹ , 15% MeOH, pH 7,2	Capilar de sílica fundida BioCAP TM	200nm	VORARAT et al., 2002
Láctico	Cervejas	CE	Ác. 4-aminobenzóico 7,5 mmol.L ⁻¹ + TBA ⁽⁵⁾ 0,12 mmol.L ⁻¹ pH 5,75	Capilar sílica fundida Thermo Bioanalysis	Indireta 254nm	KLAMPFL e KATZMAYR, 1998
Tartárico láctico	Sucos de frutas	CE	1, 2 dimetil-imidazol 4 mmol.L ⁻¹ , TMA ⁽²⁾ 1 mmol.L ⁻¹ , pH 7,5	Capilar de sílica fundida	Indireta 210nm	XIONG e LI, 1998
Tartárico Láctico	Vinagres de vinho Xerez	CE	Tetraborato 10 mmol.L ⁻¹ , TTAH ⁽⁶⁾ 0,5 mmol.L ⁻¹ , pH 9,3	Capilar de sílica fundida	185nm	CASTRO et al., 2002
Tartárico láctico	Plantas	CE	Ác. salicílico 7,5 mmol.L ⁻¹ , 15 mmol.L ⁻¹ Tris, hidróxido de dodeciltrimetilamônio 500 µM, Hidróxido de cálcio 180 µM, pH 8,3	Capilar de sílica fundida	Indireta 232nm	BAZZANELLA et al., 1997
Glicólico láctico	Água potável e amostras condensadas de ônibus espacial	CE	Solução tampão de ácido orgânicos pH 5,56, TTAB ⁽³⁾ 2 mmol.L ⁻¹ pH 5,56	Capilar de sílica fundida	Indireta 200nm	ORTA et al., 1998

(1) di-etilenotriamina

(2) tetrametilamônio

(3) brometo de tetradeciltrimetilamônio

(4) brometo de cetiltrimetilamônio

(5) tetrabutilamônio

(6) hidróxido de tetradeciltrimetilamônio

Quadro 3. Metodologias analíticas por CLAE para determinação de AHAs em diferentes amostras.

AHAs	Tipo de Amostra	Modo de Separação	Fase Móvel	Coluna	Deteção	Ref.
Lático tartárico	Vinagre	CLAE exclusão iônica	Ácido sulfúrico, pH 1,0	Aminex HPX87-H, operando a uma temperatura de 60°C	214nm	MORALES et al., 1998
Tartárico	Uvas e sucos de uvas	CLAE exclusão iônica	Ácido sulfúrico 0,01N	Aminex HPX87-H	214nm	SOYER et al., 2003
Lático tartárico	Sucos e bebidas	CLAE	Gradiente: Ácido sulfúrico 0,35 mL/min; MeOH 0-0,45 mL/min de 15 a 75 min; pH 2,5	Shim-Pack VP-ODS ⁽¹⁾ , Shimadzu	215nm	SHUI e LEONG, 2002
Lático tartárico	Solo	CLAE exclusão iônica	Ácido fosfórico 0,2%	Supelcogel C610-H a 30°C e 40°C	210nm	VAN HEES et al., 1999
Mandélico	Urina	CLAE fase reversa	Fosfato de potássio 50 mmol.L ⁻¹ em ácido acético 1% / ACN (90:10, v/v) pH 2,5	Waters® symmetry C ₁₈	225nm	LAFFON et al., 2001
Mandélico	Urina	CLAE fase reversa	Fosfato trisódico 0,01mol/L / MeOH 1. (80:20, v/v) pH 3,5 2. (95:5, v/v) pH 3,0	1. Lichrosorb® RP-18 (30°C) 2. Chromolith performance RP-18 (35°C)	220nm	SPERLINGOVÁ et al., 2004

(1) octadecilsilano

OBJETIVOS

III- OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivos:

- ✱ Separar, identificar e quantificar alfa-hidroxiácidos presentes em preparações cosméticas, empregando a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

- ✱ Validar as metodologias utilizadas para os métodos CE e CLAE, avaliando os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e especificidade.

- ✱ Comparar as duas metodologias em termos de exatidão e precisão, quando aplicadas a uma mesma amostra.

MATERIAL E MÉTODOS

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Todos os reagentes e solventes foram de grau analítico.

4.1.1. Solventes e reagentes

- ◆ Ácido glicólico 70% (Ionquímica[®]);
- ◆ Ácido orto-fosfórico (Merck[®]), grau analítico;
- ◆ Acetonitrila (Merck[®]), grau cromatográfico;
- ◆ Água MilliQ[®];
- ◆ Ácido hidroxibutírico – HIBA (Sigma-Aldrich[®]);
- ◆ Ácido 3,5 dinitrobenzóico (Sigma-Aldrich[®]);
- ◆ Brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB (Sigma-Aldrich[®]);
- ◆ Brometo de tetrabutilamônio (Merck[®]);
- ◆ Fosfato de potássio monobásico (Nuclear[®]);
- ◆ Fosfato de amônio (Merck[®]);
- ◆ Hidrogenoftalato de potássio (Merck[®]);
- ◆ Hidróxido de sódio (Merck[®]);
- ◆ Hidróxido de amônio (Merck[®]);
- ◆ Metanol (Merck[®]), grau cromatográfico;
- ◆ Soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (Digimed[®]);
- ◆ Tetrametilamônio solução hidróxido 10% (Merck[®]);
- ◆ TRIS (hidroximetil) aminometano;

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- ◆ Aparelho de Eletroforese Capilar de Alta Eficiência: BECKMAN Instruments, Inc. Modelo P/ ACE 5500;
- ◆ Aparelho de ultra-som, Thornton[®], modelo T-14;
- ◆ Agitador mecânico modelo 103 (Nova Ética[®]);
- ◆ Balança Analítica- marca Sartorius[®], capacidade 100g, precisão $\pm 0,0001$;
- ◆ Cromatógrafo a líquido modelo CG 480 C. com "loop" fixo de 20 μL , detector UV, modelo CG 435, Integrador CG modelo 200;
- ◆ Cromatógrafo a líquido modelo SHIMADZU[®] Class VP 5.032, com auto-injetor SIL-10ADVP, detector UV SPD-M 10AVP;
- ◆ Cromatógrafo a líquido Varian[®] modelo 5000 contendo válvula giratória de injeção, modelo 7125 Rheodyne[®] com "loop" fixo de 20 μL , detector UV, modelo Varian[®] 4000 e integrador Varian[®] modelo 4400.
- ◆ Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μm) 125 mm x 4,6 mm, Merck[®]
- ◆ Coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]
- ◆ Espectrofotômetro ultravioleta / visível HP modelo 8453 com software UV – Visible Chemistation, munido de cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico;
- ◆ Medidor de pH Digimed[®], modelo T-14;
- ◆ Medidor de ponto de fusão (Stuart Scientific[®]);
- ◆ Membranas HV 0,45 μm de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore[®]);
- ◆ Sistema de purificação de água MilliQ – Plus, Millipore[®] para obtenção da água;
- ◆ Tubo capilar de sílica fundida (Polymicro Technology[®]). Capilar para EC com diâmetro interno de 75 μm , diâmetro externo de 375 μm e comprimento total de 57 cm;
- ◆ Unidades filtrantes HV Millex 0,45 μm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore[®]);
- ◆ Unidades filtrantes HV Millex 0,22 μm de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore[®]);
- ◆ Vidrarias usuais de laboratório.

Estes equipamentos estão disponíveis na Faculdade de Ciências Farmacêuticas e no Instituto de Química, ambos pertencentes à Universidade de São Paulo.

4.1.3. Alfahidroxiácidos empregados como padrão

♦ Ácido glicólico (Sigma-Aldrich®)

Faixa de fusão : 73 a 77° C

Teor: 99,0%

Solúvel em água, metanol e etanol.

Os espectros de absorção do ácido glicólico no ultravioleta e infravermelho estão apresentados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

♦ Ácido tartárico (Sigma-Aldrich®)

Faixa de fusão : 205 a 209° C

Teor: 99,0%

Solúvel em água, metanol e etanol.

Os espectros de absorção do ácido tartárico no ultravioleta e infravermelho estão apresentados nas Figuras 7 e 8.

♦ Ácido láctico (Sigma-Aldrich®)

Faixa de fusão : 50 a 55° C

Teor: 99,0%

Solúvel em água, metanol e etanol.

Os espectros de absorção do ácido láctico no ultravioleta e infravermelho estão apresentados nas Figuras 9 e 10.

♦ Ácido mandélico (Sigma-Aldrich®)

Faixa de fusão : 117 a 120° C

Teor: 98,0%

Solúvel em água, metanol e etanol.

Os espectros de absorção do ácido mandélico no ultravioleta e infravermelho estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Figura 5. Espectro de absorção no ultravioleta do ácido glicólico, em água. Concentração 800 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 6. Espectro de absorção no infravermelho do ácido glicólico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

Figura 7. Espectro de absorção no ultravioleta do ácido tartárico, em água. Concentração 300 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 8. Espectro de absorção no infravermelho do ácido tartárico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

Figura 9. Espectro de absorção no ultravioleta do ácido láctico, em água. Concentração 500 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 10. Espectro de absorção no infravermelho do ácido láctico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

Figura 11. Espectro de absorção no ultravioleta do ácido mandélico, em água. Concentração 80 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 12. Espectro de absorção no infravermelho do ácido mandélico, utilizando pastilha de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.1.4. Amostras

Foram utilizadas amostras de preparações cosméticas contendo AHAs glicólico, tartárico, lático e mandélico, preparadas na Farmácia Escola da Universidade de São Paulo e adquiridas no comércio, conforme descrito a seguir:

4.1.4.1. Amostras Manipuladas

Creme base:

Cera polawax	12,0 %
Vaselina líquida	10,0 %
Óleo de silicone.....	2,0 %
Propilenoglicol.....	10,0 %
Hidroxietilcelulose.....	0,2 %
Nipagin.....	0,2 %
Nipazol.....	0,1%
Água destilada q.s.p.....	200,0 g

Gel base:

Natrozol.....	2,0%
Glicerina.....	40,0%
Chemynol®	0,2%
Água destilada q.s.p.....	100,0g

AMOSTRA A (creme para o rosto)

Ácido glicólico 70%.....	7,5 %
Ácido lático.....	5,0 %
Ácido tartárico.....	3,0 %
Hidróxido de amônio 1M.....	6,0 %
Creme base q.s.p.....	30,0 g

AMOSTRA B (gel para o rosto)

Ácido glicólico 70%.....	10,0 %
Hidróxido de amônio 1M.....	6,0 %
Creme base q.s.p.....	30,0 g

AMOSTRA C (creme para o rosto)

Ácido glicólico 70%.....	4,0 %
Hidróxido de amônio 1M.....	6,0 %
Gel de natrosol q.s.p.....	30,0 g

AMOSTRA D (creme para o rosto)

Ácido mandélico	5,0 %
Hidróxido de amônio 1M.....	6,0 %
Creme base q.s.p.....	30,0 g

4.1.4.2. Amostras Comerciais**AMOSTRA E (creme para o rosto)**

Ácido glicólico....	4,0 %
Excipientes q.s.p.....	50,0 g

AMOSTRA F (creme para as mãos)

Ácido lático.....	10,0 %
Excipientes q.s.p.....	40,0 g

AMOSTRA G (creme para os pés)

Ácido lático.....	6,0 %
Excipientes q.s.p.....	75,0 g

AMOSTRA H (creme para o rosto)

Ácido glicólico e lático.....	7,0 %
Excipientes q.s.p.....	30,0 g

AMOSTRA I (gel para o rosto)

Ácido glicólico e lático.....	10,0 %
Excipientes.....	140,0 mL

AMOSTRA J (gel para o rosto)

Ácido mandélico.....	Concentração não especificada
Excipientes q.s.p.....	30,0 mL

AMOSTRA K(creme para o rosto)

Ácido mandélico.....	Concentração não especificada
Excipientes q.s.p.....	60,0 g

4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1. ELETROFORESE CAPILAR (CE)

4.2.1.1. ANÁLISE POR ELETROFORESE CAPILAR EM SOLUÇÃO LIVRE (FSCE)

4.2.1.1.1. ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

Ensaio preliminares

a) Escolha do pH e cromóforo do eletrólito de corrida

A fim de escolher qual cromóforo e pH utilizar no eletrólito de corrida foi construída uma curva de mobilidade para os ácidos tartárico, glicólico e lático juntamente com dois cromóforos (ácido 3,5-dinitrobenzóico e hidrogenoftalato de potássio) amplamente utilizados como eletrólitos para determinação de compostos ácidos.

Foi construída uma curva de mobilidade efetiva em função do pH, empregando-se valores de mobilidades e pK_a obtidos na compilação de HIROKAWA et al, 1983.

A partir da curva de mobilidade considerou-se como cromóforo de escolha o hidrogenoftalato de potássio e pH 4,1.

b) Escolha do modo de detecção, voltagem, tempo de injeção, concentração do eletrólito e temperatura

Uma vez que os AHAs apresentam baixa absorvidade molar, o modo de detecção empregado foi a detecção indireta no UV a 254 nm.

A tensão aplicada foi variada entre 15 e 25 kV;

O tempo de injeção foi variado de 2 a 5 segundos; 0,5 psi

A temperatura foi variada entre 25 e 35°C;

Após vários experimentos foram fixados os seguintes parâmetros:

Capilar: de sílica fundida, 50 cm até detector, total: 57 cm; 75 μm d. i.

Eletrólito: Hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH:4,1

Tensão: -20 kV

Tempo de Injeção: 5 segundos, 0,5 psi

Temperatura: 35° C

Comprimento de onda: 254 nm (detecção indireta)

4.2.1.1.1- Análise eletroforética

Para realização das análises por eletroforese capilar, utilizou-se capilar de sílica de 57 cm de comprimento total e 0,2 cm de fenda óptica aproximadamente. A fenda óptica foi preparada após retirada da camada externa de poliimida com rápido aquecimento e posterior limpeza com metanol.

O capilar foi ajustado ao sistema, fixando-se a fenda óptica no detector UV do aparelho. O comprimento do capilar até o detector foi de 50 cm.

A ativação do capilar foi obtida após o seguinte tratamento:

- 1) Lavagem do capilar com hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1} , durante 30 minutos;
- 2) Lavagem do capilar com água, durante 20 minutos para a retirada do NaOH 1 mol.L^{-1} ;
- 3) Lavagem do capilar com eletrólito durante 20 minutos para início das análises.

Antes de iniciar as análises, o capilar foi lavado com NaOH 1 mol.L^{-1} durante 5 minutos, em seguida com água durante 5 minutos e então 20 minutos com o eletrólito de corrida.

Após a migração de cada amostra, o capilar foi novamente submetido à lavagem com eletrólito, durante um minuto, até introdução da amostra subsequente.

a) Preparação da solução estoque do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

Preparou-se uma solução estoque de CTAB na concentração de 10 mmol.L⁻¹. Pesou-se, analiticamente, 0,3641 g de CTAB e após solubilização completa em água, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água.

b) Preparação do eletrólito

Pesou-se, analiticamente, 0,1021 g de hidrogenoftalato de potássio e após solubilização em água, adicionou-se 2,5 mL de CTAB 10 mmol.L⁻¹, transferindo-se para balão volumétrico de 50 mL e completando-se o volume com água.

4.2.1.1.1.2- VALIDAÇÃO DO MÉTODO CE PARA ANÁLISE DOS ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

a) Curva de calibração

Preparação das soluções padrão

A partir de uma solução de 250 µg/mL de cada ácido, foram preparadas soluções contendo 10; 20; 40; 60; 80 e 100 µg/mL de ácido tartárico, ácido glicólico e ácido lático.

As curvas de calibração para cada ácido em estudo foram construídas com os valores da concentração versus a área do pico obtida. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

b) Determinação do limite de quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) utilizando a eletroforese capilar foi definido de acordo com a Farmacopéia Americana 26 ed., e foi determinado baseado no desvio padrão do intercepto (Sa) da regressão linear e a inclinação (b) da curva de calibração de cada ácido.

O cálculo para o LQ foi realizado pela equação 6:

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão da resposta}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10 \quad \text{Equação 6}$$

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

As análises foram realizadas com a solução padrão de cada ácido, dos placebos e das amostras manipuladas.

d) Aplicação do método CE nas amostras comerciais e manipuladas contendo os ácidos glicólico, tartárico e láctico - Precisão

As amostras analisadas pela metodologia desenvolvida foram as amostras manipuladas A e B e as amostras comerciais E, F e G, cujas composições podem ser vistas no item 4.1.4 (pág. 42).

♦ Preparação das soluções dos padrões

Foram utilizadas soluções padrão contendo 20; 40; 60 e 80 µg/mL dos ácidos tartárico, láctico e glicólico.

♦ Preparação das soluções das amostras

As amostras A, B, E, F e G foram pesadas e transferidas para balões volumétricos de 250 mL, dissolvendo-se e completando-se os volumes com metanol. As soluções ficaram no ultra-som por 20 min e em seguida agitadas durante 10 min em agitador mecânico. As soluções foram então filtradas em papel de filtro rejeitando-se os 10 primeiros mL. Do filtrado tomou-se uma alíquota de 5 mL, transferiu-se para balões volumétricos de 25 mL, e completaram-se os volumes com água.

Todas as amostras foram previamente filtradas em unidades filtrantes HV Millex 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore®) e então injetadas no equipamento de eletroforese capilar.

As concentrações percentuais de cada ácido nas amostras foram obtidas através da média de 10 determinações realizadas em duplicata para as amostras simulada e comercial.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

As quantidades de amostras pesadas e suas respectivas concentrações finais estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidades pesadas das amostras A, B, E, F, e G e suas respectivas concentrações finais para análise por eletroforese capilar.

AMOSTRA	QUANTIDADE PESADA (g)	EQUIVALENTE a					1ª diluição (a)			2ª diluição (b)		
		(mg)					[µg/mL] em 250mL			[µg/mL] em 25mL (c)		
		T	G	L	T	G	T	G	L	T	G	L
A	1,0	30	75	50	120	300	24	60	40			
B	1,0	-	100	-	-	400	-	80,00	-			
E	1,0	-	40	-	-	160	-	32	-			
F	1,0	-	-	100	-	-	-	-	80			
G	1,0	-	-	60	-	-	-	-	48			

T – ácido tartárico

G – ácido glicólico

L – ácido láctico

(a) 1ª diluição: quantidade pesada e diluída em 250 mL de metanol

(b) 2ª diluição: 5 mL da 1ª diluição em 25 mL de água

(c) concentração final de leitura

e) Teste de recuperação - Exatidão

O teste de recuperação foi realizado adicionando-se quantidades conhecidas de solução padrão às amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

Alíquotas das soluções das amostras e dos padrões foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL completando-se o volume com água, conforme esquemas a seguir:

Esquema 1: Amostra A

Amostra A (60:150:100 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (60:150:100 $\mu\text{g/mL}$)
T: G: L	T: G: L
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

T – ácido tartárico

G – ácido glicólico

L – ácido láctico

Esquema 2: Amostra B

Amostra B (200 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (200 $\mu\text{g/mL}$)
G	G
mL	mL
-----	5,0
5,0	1,0
5,0	2,0
5,0	3,0
5,0	-----

G – ácido glicólico

Esquema 3: Amostra E

Amostra E (80 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (150 $\mu\text{g/mL}$)
G	G
ml	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

G – ácido glicólico

Esquema 4: Amostra F

Amostra F (200 µg/mL)	Solução padrão (200 µg/mL)
L	L
mL	mL
-----	5,0
5,0	1,0
5,0	2,0
5,0	3,0
5,0	-----

L – ácido láctico

Esquema 5: Amostra G

Amostra G (120 µg/mL)	Solução padrão (120 µg/mL)
L	L
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

L- ácido láctico

A porcentagem de recuperação (%R) para cada amostra foi calculada de acordo com as normas e procedimentos preconizados pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 2002, utilizando-se a seguinte equação:

$$\%R = \frac{C_p - C_a}{P_{ad}} \times 100$$

Equação 8

Onde: C_p é a concentração da amostra adicionada de padrão

C_a é a concentração da amostra sem padrão

P_{ad} é a concentração de padrão adicionada na amostra

4.2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.2.2.1. ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

Ensaio preliminares

Com a finalidade de selecionar uma fase móvel ideal para a determinação e quantificação dos ácidos tartárico, glicólico e lático, foram estudados vários sistemas empregando-se coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®, descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sistemas de fases móveis empregadas com coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck® para separação dos ácidos glicólico, tartárico e lático.

SISTEMA ^(a)	FASE MÓVEL	pH
1	KH ₂ PO ₄ ^(b) 25 mmol.L ⁻¹ : MeOH (80:20)	6,5
2	KH ₂ PO ₄ ^(b) 25 mmol.L ⁻¹ : MeOH (80:20)	2,5
3	KH ₂ PO ₄ ^(b) 25 mmol.L ⁻¹ : MeOH (90:10)	2,5
4	KH ₂ PO ₄ ^(b) 25 mmol.L ⁻¹ : MeOH: TMA ^(c) 10mmol.L ⁻¹ (85:15)	6,5
5	KH ₂ PO ₄ ^(b) 10 mmol.L ⁻¹ : MeOH: TMA ^(c) 30mmol.L ⁻¹ (90:10)	6,5

(a) Condições fixas: Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; Detecção: 220 nm; Volume injetado: 20 µL; Vazão: 0,5 mL/min; Temperatura: 23°C ± 1°C

(b) Fosfato de potássio monobásico

(c) Tetrametilamônio solução hidróxido 10%

Posteriormente foram testados outros sistemas em coluna Sinergy Hydro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®, a qual suporta fases móvel 100% aquosa e pH na faixa de 1,0 a 8,5. Os sistemas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Sistemas de fases móveis empregadas com coluna Sinergy Hydro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex® para separação dos ácidos glicólico, tartárico e lático.

SISTEMA ^(a)	FASE MÓVEL	pH
6	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(b) 30 mmol.L ⁻¹	6,5
7	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(b) 25 mmol.L ⁻¹	3,0
8	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(b) 25 mmol.L ⁻¹	2,0
9	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(b) 30 mmol.L ⁻¹ , TBA ^(c) 3 mmol.L ⁻¹	2,0
10	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(b) 15 mmol.L ⁻¹ , TBA ^(c) 3 mmol.L ⁻¹	2,0

(a) Condições fixas: Coluna Sinergy Hydro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; Detecção: 220 nm; Volume injetado: 20 μ L; Vazão: 0,7mL/min; Temperatura: 23°C $\pm$ 1°C

(b) Fosfato de amônio monobásico

(c) Brometo de tetrabutilamônio

Após vários experimentos foram fixados os seguintes parâmetros:

- ◆ Cromatógrafo a líquido SHIMADZU®
- ◆ Coluna Sinergy Hydro RP-18 – (4 μ m) Phenomenex® 250 mm x 4,6 mm
- ◆ Fase móvel: Fosfato de amônio monobásico 15 mmol L⁻¹, brometo de tetrabutilamônio (TBA) 3 mmol L⁻¹, pH: 2,0
- ◆ Vazão: 0,7 mL/min
- ◆ Comprimento de onda para leitura: 220 nm
- ◆ Volume injetado: 20 μ L
- ◆ Temperatura: 23°C $\pm$ 1°C

4.2.2.1.1 – Análise Cromatográfica

a) Preparação da solução de fosfato de amônio 15 mmol.L⁻¹

Foram pesados, analiticamente, 3,4509 g de fosfato de amônio monobásico e, transferidos para balão volumétrico de 2 L, dissolvendo-se com água MilliQ®. O pH foi ajustado a 2,0 com ácido fosfórico antes de completar o volume com água MilliQ®.

A solução estoque de fosfato de amônio monobásico foi mantida sob refrigeração a 5°C.

b) Preparação da fase móvel

Foram pesados analiticamente, 3,4509 g de fosfato de amônio monobásico e 1,9343 g de brometo de tetrabutilamônio e, transferiu-se para balão volumétrico de 2 L, dissolvendo-se com água MilliQ® e ajustando-se o pH a 2,0 com ácido fosfórico antes de completar o volume com água MilliQ®.

A solução final foi filtrada em membrana HV 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore®) e degaseificada com auxílio de banho ultra-som por 15 min.

A fase móvel foi transferida para o frasco reservatório da bomba de fluxo e eluída nas condições do ensaio por 80 min para equilibrar a coluna cromatográfica.

4.2.2.1.2- VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE PARA ANÁLISE DOS ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

a) Curva de calibração

Preparação das soluções padrão

Foram pesados, analiticamente, 75,0 mg de ácido tartárico, 200,0 mg de ácido glicólico e 125,0 mg de ácido láctico e, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se uma solução com concentração final de 750 µg de ácido tartárico, 2000 µg de ácido glicólico e 1250 µg de ácido láctico / mL de solução.

Alíquotas de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mL da solução padrão (750:2000:1250 µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 30; 60; 120; 180; 240 e 300 µg de ácido tartárico; 80; 160; 320; 480; 640 e 800 µg de ácido glicólico e 50; 100; 200; 300; 400 e 500 µg de ácido láctico / mL de solução.

Todas as soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore®) e posteriormente injetadas no cromatógrafo a líquido no volume de 20 µL.

As curvas de calibração para cada ácido em estudo foram construídas com os valores da concentração versus a área do pico obtida. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

b) Determinação do limite de quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) utilizando a CLAE foi definido de acordo com a Farmacopéia Americana 26 ed. e foi determinado baseado no desvio padrão do intercepto (S_a) da regressão linear e a inclinação (b) da curva de calibração de cada ácido.

O cálculo para o LQ foi realizado pela equação 6 (pág. 47)

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

As análises foram realizadas com a solução padrão de cada ácido, dos placebos e das amostras manipuladas.

d) Aplicação do método CLAE nas amostras comerciais e manipuladas
- Precisão

Foram analisadas pela metodologia desenvolvida as amostras manipuladas A B e C e as amostras comerciais E, F, G, H e I cujas composições podem ser vistas no item 4.1.4 (pág.42).

◆ Preparação das soluções dos padrões

Foram utilizadas soluções padrão contendo 300; 320 e 400 μg de ácido glicólico, 120 μg de ácido tartárico e 120, 200 e 240 μg de ácido láctico / mL de solução.

♦ Preparação das soluções das amostras

As amostras A, B, C, E, F, G, H e I foram pesadas e transferidas para balões volumétricos de 200 mL, dissolvendo-se e completando-se os volumes com solução tampão fosfato de amônio 15 mmol^{-1} pH 2,5. As soluções ficaram no ultra-som por 20 min e em seguida agitadas durante 10 min em agitador mecânico. As soluções foram então filtradas em papel de filtro rejeitando-se os 10 primeiros mL. Do filtrado tomou-se uma alíquota de 10 mL, transferiu-se para balões volumétricos de 25 mL, e completaram-se os volumes com fase móvel.

Todas as amostras foram previamente filtradas em unidades filtrantes HV Millex 0,22 μm de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore®) e então injetadas no cromatógrafo.

As concentrações percentuais de cada ácido nas amostras foram obtidas através da média de 10 determinações realizadas em duplicata para as amostras simulada e comercial.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

As quantidades de amostras pesadas e suas respectivas concentrações finais estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidades pesadas das amostras A, B, C, E, F, G, H e I e suas respectivas concentrações finais para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

AMOSTRA	QUANTIDADE PESADA (g)	EQUIVALENTE a			1ª diluição ^(a)						2ª diluição ^(b)					
		(mg)			[µg/mL] em 200mL						[µg/mL] em 25mL ^(c)					
		T	G	L	T	G	L	T	G	L	T	G	L	T	G	L
A	2,0	60	150	100	300	750	500	120	300	200						
B	2,0	-	200	-	-	1000	-	-	400	-						
C	4,0	-	160	-	-	800	-	-	320	-						
E	4,0	-	160	-	-	800	-	-	320	-						
F	1,0	-	-	100	-	-	500	-	-	200						
G	2,0	-	-	120	-	-	600	-	-	240						
H ^(d)	2,0	-	140	-	-	700	-	-	280	-						
I ^(e)	2,0	-	200	-	-	1000	-	-	400	-						

T – ácido tartárico

G – ácido glicólico

L – ácido láctico

(a) 1ª diluição: quantidade pesada e diluída em 200 mL de solução tampão fosfato de amônio 15 mmol.L⁻¹, pH 2,0

(b) 2ª diluição: 10 mL da 1ª diluição em 25 mL de fase móvel

(c) concentração final de leitura

(d) amostra H contém 7% de ácido glicólico e láctico / g de creme

(e) amostra I contém 10% de ácido glicólico e láctico / g de creme

e) Teste de recuperação - Exatidão

O teste de recuperação foi executado adicionando-se quantidades conhecidas de solução padrão às amostras simuladas (A, B e C) e comerciais (E, F, G, H e I).

Alíquotas das soluções das amostras e dos padrões foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL completando-se o volume com a fase móvel, conforme esquemas a seguir:

Esquema 1: Amostra A

Amostra A (300:750:500 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (300:750:500 $\mu\text{g/mL}$)
T: G: L	T: G: L
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

T – ácido tartárico

G – ácido glicólico

L – ácido láctico

Esquema 2: Amostra B

Amostra B (1000 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (1000 $\mu\text{g/mL}$)
G	G
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

G – ácido glicólico

Esquema 3: Amostra C

Amostra C (800 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (800 $\mu\text{g/mL}$)
G	G
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

G – ácido glicólico

Esquema 4: Amostra E

Amostra E (800 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (800 $\mu\text{g/mL}$)
G	G
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

L – ácido láctico

Esquema 5: Amostra F

Amostra F (500 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (500 $\mu\text{g/mL}$)
L	L
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

L- ácido láctico

Esquema 6: Amostra G

Amostra G (600 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (600 $\mu\text{g/mL}$)
L	L
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

L- ácido láctico

Esquema 7: Amostra H

Amostra H (700:700 $\mu\text{g/mL}$)	Solução padrão (800:600 $\mu\text{g/mL}$)
G : L	G : L
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

G- ácido glicólico

L- ácido láctico

Esquema 8: Amostra I

Amostra I (1000:1000 µg/mL)	Solução padrão (800:500 µg/mL)
G : L	G : L
mL	mL
-----	10,0
10,0	1,0
10,0	2,0
10,0	3,0
10,0	-----

G- ácido glicólico

L- ácido láctico

A porcentagem de recuperação (%R) para cada amostra foi calculada de acordo com as normas e procedimentos preconizados pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 2002, utilizando-se a equação 7 (pág.51).

4.2.2.2. ÁCIDO MANDÉLICO

Ensaio preliminares

Os sistemas testados para determinação e quantificação do ácido mandélico, empregando-se coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm e Sinergy Hidro RP-18 – (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Sistemas de fases móveis empregadas com coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm para determinação do ácido mandélico.

SISTEMA ^(a)	FASE MÓVEL	pH
1 ^(b)	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(c) 30 mmol.L ⁻¹	3,0
2	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(c) 30 mmol.L ⁻¹ : ACN (90:10)	6,5
3	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(c) 30 mmol.L ⁻¹ : ACN (70:30)	2,5
4	NH ₄ H ₂ PO ₄ ^(c) 30 mmol.L ⁻¹ : ACN (80:20)	2,5

(a) Condições fixas: Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; Detecção: 220 nm; Volume injetado: 20 µL; Vazão: 0,5 mL/min; Temperatura: 23°C ± 1°C

(b) Para este sistema foi utilizada a coluna Sinergy Hydro RP-18 – (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®;

(c) Fosfato de amônio monobásico.

Após vários experimentos foram fixados os seguintes parâmetros:

- ♦ Cromatógrafo a líquido Varian®
- ♦ Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) Merck® 125 mm x 4,6 mm
- ♦ Fase móvel: Fosfato de amônio monobásico 15 mmol.L⁻¹: acetonitrila (80:20), pH: 2,5
- ♦ Vazão: 1,0 mL/min
- ♦ Comprimento de onda para leitura: 220 nm
- ♦ Volume injetado: 20 µL
- ♦ Temperatura: 23°C ± 1°C

4.2.2.2.1- Análise cromatográfica

a) Preparação da solução de fosfato de amônio 15 mmol.L⁻¹

Foi feito o mesmo procedimento descrito no item 4.2.2.1.1 a (pág 54).

b) Preparação da fase móvel

Transferiram-se 800 mL de tampão fosfato de amônio monobásico para recipiente de 2 L e posteriormente 200 mL de acetonitrila, ajustando-se o pH a 2,5 com ácido fosfórico.

A solução final foi filtrada em membrana HV 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore®) e desgaseificada com auxílio de banho ultra-som por 15 min.

A fase móvel foi transferida para o frasco reservatório da bomba de fluxo e eluída nas condições do ensaio por 60 min para equilibrar a coluna cromatográfica.

4.2.2.2- VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE PARA ANÁLISE DO ÁCIDO MANDÉLICO

a) Curva de calibração

Preparação das soluções padrão

Foram pesados, analiticamente, 50,0 mg de ácido mandélico, e transferidos para balão volumétrico de 200 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se uma solução com concentração final de 250 µg de ácido mandélico/ mL de solução.

Alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 mL da solução padrão (250 µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 10; 20; 30; 40; 60 e 80 µg de ácido mandélico / mL de solução.

Todas as soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore®) e posteriormente injetadas no cromatógrafo a líquido no volume de 20 µL.

A curva de calibração para o ácido mandélico foi construída com os valores da concentração versus a área do pico obtida. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

b) Determinação do limite de quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) utilizando a CLAE foi definido de acordo com a Farmacopéia Americana 26 ed. e foi determinado baseado no desvio padrão do intercepto (Sa) da regressão linear e a inclinação (b) da curva de calibração do ácido mandélico.

O cálculo para o LQ foi realizado pela equação 6 (pág. 47)

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

As análises foram realizadas com a solução padrão do ácido mandélico, do placebo e da amostra manipulada D.

d) Aplicação do método CLAE nas amostras comerciais e manipuladas **- Precisão**

As amostras analisadas pela metodologia desenvolvida foram as amostra manipulada D e as amostras comerciais J e K cujas composições podem ser vistas no item 4.1.4 (pág. 42).

♦ Preparação das soluções dos padrões

Foram utilizadas soluções padrão contendo 30 e 50 µg/mL de ácido mandélico.

♦ Preparação das soluções das amostras

AMOSTRA D (manipulada)

Foi pesado 1,0 g da amostra D, equivalente a 50,0 mg de ácido mandélico, transferindo-se para balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com solução tampão fosfato de amônio 15 mmol.L⁻¹ pH 2,0. A solução ficou no ultra-som por 20 min e em seguida agitada durante 10min em agitador mecânico. A solução, com concentração final de 250 µg de ácido mandélico / mL, foi então filtrada em papel de filtro rejeitando-se os 10 primeiros mL. Do filtrado tomou-se uma alíquota de 3 mL, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se concentração final de 30 µg de ácido mandélico / mL de solução.

AMOSTRA J (comercial)

Foi pesado 1,0 g da amostra J, contendo ácido mandélico, transferindo-se para balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com solução tampão fosfato de amônio 15 mmol.L⁻¹ pH 2,0. A solução ficou no ultra-som por 20 min e em seguida agitada durante 10 min em agitador mecânico. A solução foi então filtrada em papel de filtro rejeitando-se os 10 primeiros mL. Do filtrado tomou-se uma alíquota de 3 mL, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel.

AMOSTRA K (comercial)

Foram pesados 2,0 g da amostra K, contendo ácido mandélico, transferindo-se para balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com solução tampão fosfato de amônio 15 mmol.L⁻¹ pH 2,0. A solução ficou no ultra-som por 20 min e em seguida agitada durante 10 min em agitador mecânico. A solução foi então filtrada em papel de filtro rejeitando-se os 10 primeiros mL. Do filtrado tomou-se uma alíquota de 5 mL, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel.

Todas as soluções amostra foram previamente filtradas em unidades filtrantes HV Millex 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore®) e então injetadas no cromatógrafo líquido.

As concentrações percentuais de cada ácido nas amostras foram obtidas através da média de 10 determinações realizadas em duplicata para as amostras simulada e comercial.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

e) Teste de recuperação - Exatidão

O teste de recuperação foi executado adicionando-se quantidades conhecidas de solução padrão às amostras simulada e comercial.

Alíquotas das soluções das amostras e dos padrões foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL completando-se o volume com a fase móvel, conforme esquemas a seguir:

Esquema 1: Amostra D

Amostra D (250 $\mu\text{g/mL}$) M	Solução padrão (250 $\mu\text{g/mL}$) M
mL	mL
-----	3,0
3,0	1,0
3,0	2,0
3,0	3,0
3,0	-----

M- Mandélico

Esquema 2: Amostra J

Amostra B (--- $\mu\text{g/mL}^*$) M	Solução padrão (250 $\mu\text{g/mL}$) M
mL	mL
-----	3,0
3,0	1,0
3,0	2,0
3,0	3,0
3,0	-----

M- Mandélico

* concentração determinada experimentalmente

Esquema 3: Amostra K

Amostra K (--- $\mu\text{g/mL}^*$) M	Solução padrão (250 $\mu\text{g/mL}$) M
mL	mL
-----	3,0
3,0	1,0
3,0	2,0
3,0	3,0
3,0	-----

M- Mandélico

* concentração determinada experimentalmente

A porcentagem de recuperação (%R) para cada amostra foi calculada de acordo com as normas e procedimentos preconizados pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 2002, utilizando-se a equação 7 (pág.51).

4.3- COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO DOS MÉTODOS PROPOSTOS (CE e CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS EM ESTUDO – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os critérios considerados importantes na avaliação da qualidade de um método analítico são exatidão e precisão. Estes dois parâmetros determinam o erro de medidas analíticas quando comparadas com um valor de referência ou quando comparadas entre si (KARNES et al, 1993; LEE et al, 1996).

4.3.1- TESTES DE SIGNIFICÂNCIA

Os testes de significância estatística são amplamente utilizados na avaliação de resultados experimentais, servindo para verificar se a diferença entre dois resultados é devida a presença de um erro determinado em um dos métodos ou se é decorrente das flutuações associadas aos erros indeterminados.

Dentre os testes estatísticos mais importantes estão o teste “t” de Student, usado para verificar a significância de uma média ou da diferença entre duas médias, e o teste “F” de Snedecor, usado na comparação de duas variâncias (BARROS et al., 2003; MILLER, 1988; SKOOG, 1996).

4.3.1.1 – COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO

A comparação da exatidão de dois métodos pode ser feita pelo teste “t” de Student. Este teste permite avaliar se a diferença entre as médias dos valores experimentais obtidas por dois métodos distintos têm diferença significativa em determinado nível de significância (BARROS et al., 2003; BRUCE et al, 1998; MILLER e MILLER, 1988; SKOOG, 1996).

Sejam $\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ as médias obtidas das análises de uma mesma amostra, através de dois métodos diferentes (CLAE e CE, método 1 e método 2, respectivamente). O desvio padrão (s), baseado em ambos os métodos, é obtido através da variância calculada para os mesmos, conforme equação 8:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Equação 8}$$

Onde: S_1^2 é a variância da amostra pelo método 1

S_2^2 é a variância da amostra pelo método 2

n_1 é o número de determinações pelo método 1

n_2 é o número de determinações pelo método 2

O valor de t é calculado pela equação 9:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Equação 9}$$

Onde: $\bar{x}_1$ é a média da amostra pelo método 1

$\bar{x}_2$ é média da amostra pelo método 2

S é o desvio padrão, baseado em ambos os métodos, obtido a partir da raiz quadrada da variância calculada para os mesmos.

t tem $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Se o valor calculado para t exceder o tabelado, considera-se que a diferença entre a exatidão dos dois métodos é significativa, em determinado nível de significância (BARROS et al., 2003; MILLER e MILLER, 1988; SKOOG, 1996).

4.3.1.2 – COMPARAÇÃO DA PRECISÃO

A comparação da precisão de dois métodos pode ser obtida com a aplicação do teste F de Snedecor. Este teste permite comprovar se um método é mais preciso do que outro método ou se os dois métodos diferem significativamente na sua precisão (BARROS et al., 2003; MILLER e MILLER, 1988; SKOOG, 1996).

No teste F , considera-se a razão entre as variâncias amostrais dos resultados obtidos, através de métodos diferentes, para uma mesma amostra, ou seja, a razão dos quadrados dos desvios padrão de uma mesma amostra obtidas por métodos diferentes. O cálculo de F é dado pela equação 11:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}, \text{ sendo que } S_1^2 > S_2^2 \quad \text{Equação 11}$$

Onde, S_1^2 e S_2^2 são as variâncias dos resultados obtidos pelo método 1 e 2, respectivamente.

O valor de F está relacionado aos graus de liberdade de S_1^2 e S_2^2 . Se o valor calculado exceder o valor tabelado, em certo nível de significância, a diferença entre a precisão dos dois métodos é significativa.

O teste F foi aplicado para verificar se existe diferença significativa na precisão dos dois métodos propostos.

RESULTADOS

V- RESULTADOS

5.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1.1. ELETROFORESE CAPILAR (CE)

5.1.1.1. ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

Ensaio preliminar

A Figura 13 mostra a curva de mobilidade construída para os ácidos tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L) com os cromóforos ácido 3,5-dinitrobenzóico e hidrogenoftalato de potássio.

A Figura 14 representa os eletroferogramas obtidos para identificação dos padrões isolados dos ácidos tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L), em condições pré-estabelecidas.

A Figura 15 representa o eletroferograma da separação da mistura dos padrões: ácido tartárico (T), ácido glicólico (G) e ácido láctico (L), nas condições pré-estabelecidas.

Os eletroferogramas obtidos com aplicação de diferentes tensões são representados na Figura 16.

Figura 13. Mobilidade efetiva em função do pH dos ácidos tartárico, glicólico e láctico e dos cromóforos hidrogenoftalato de potássio e ácido 3,5-dinitrobenzóico.

Figura 14. Eletroferogramas obtidos para identificação dos padrões ácidos tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L), nas concentrações de 60 $\mu\text{g/mL}$. Condições eletroforéticas: Capilar de sílica fundida, 50 cm até detector, total: 57 cm; Eletrólito: hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de Injeção: 5 s; 0,5 psi; Temperatura: 35°C; Detecção indireta a 254 nm.

Figura 15. Eletroferograma obtido da mistura dos padrões ácido tartárico (T), ácido glicólico (G) e ácido láctico (L), na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$. Condições eletroforéticas: Capilar de sílica fundida, 50 cm até detector, total: 57 cm; Eletrólito: hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH:4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de Injeção: 5 s; 0,5 psi ; Temperatura: 35°C; Detecção indireta a 254 nm.

Figura 16. Efeito da tensão aplicada na separação dos padrões ácido tartárico (T)

5.1.1.1.1- VALIDAÇÃO DO MÉTODO CE PARA ANÁLISE DOS ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

a) Curva de calibração

Ácido Tartárico

A Figura 17 representa a curva de calibração do ácido tartárico. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 6.

Ácido Glicólico

A Figura 18 representa a curva de calibração do ácido glicólico. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 7.

Ácido Lático

A Figura 19 representa a curva de calibração do ácido lático. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 8.

Figura 17. Curva de calibração do ácido tartárico para o método eletroforético, concentrações de 10 a 100 μg/mL.

Figura 18. Curva de calibração para o ácido glicólico para o método eletroforético, concentrações de 10 a 100 μg/mL.

Figura 19. Curva de calibração para o ácido láctico para o método eletroforético, concentrações de 10 a 100 μg/mL.

Tabela 6. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método eletroforético para o ácido tartárico.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*	%RSD	t_m	%RSD
10	1006	0,21	2,49	1,66
20	2011	1,58	2,47	0,24
40	3992	0,26	2,46	0,24
60	6005	0,30	2,46	0,24
80	7965	0,36	2,47	0,03
100	9953	0,45	2,47	0,02

* Média de três determinações para cada concentração.

%RSD – desvio padrão relativo obtido para média de três determinações.

t_m – tempo de migração

Tabela 7. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método eletroforético para o ácido glicólico.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*	%RSD	t_m	%RSD
10	1587	2,15	2,84	0,12
20	3182	0,63	2,82	0,12
40	6357	0,59	2,81	0,21
60	9532	0,11	2,80	0,21
80	12701	0,29	2,80	0,21
100	15854	0,27	2,79	0,21

* Média de três determinações para cada concentração.

%RSD – desvio padrão relativo obtido para média de três determinações.

t_m – tempo de migração

Tabela 8. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método eletroforético para o ácido láctico.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*	%RSD	t_m	%RSD
10	1397	0,19	2,99	0,13
20	2789	0,07	2,98	0,12
40	5563	0,54	3,00	0,38
60	8363	0,86	3,01	0,19
80	11131	0,22	2,99	0,33
100	13917	0,07	3,01	0,19

* Média de três determinações para cada concentração.

%RSD – desvio padrão relativo obtido para média de três determinações.

t_m – tempo de migração

Os dados estatísticos obtidos para as curvas de calibração do ácido tartárico, glicólico e lático estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração do ácido tartárico, glicólico e lático aplicando o método eletroforético.

Parâmetro Estatístico	Ácido Tartárico	Ácido Glicólico	Ácido Lático
Inclinação (b)	99,38	158,55	139,12
Desvio padrão da inclinação (S_b)	0,164	0,116	0,086
Intercepto (a)	20,32	10,37	5,82
Desvio padrão do intercepto (S_a)	9,546	7,024	5,233
Erro padrão da estimativa (S_e)	12,787	9,03	6,727
Erro padrão da estimativa relativo (S_{er})	0,248	0,11	0,094
Significância de a (t)	2,044	1,469	1,113
Coeficiente de correlação linear (r)	0,999995	0,999998	0,9999992

b) Determinação do limite de quantificação

A Tabela 10 apresenta os dados obtidos para o limite de quantificação para os ácidos tartárico, glicólico e lático empregando-se o método eletroforético.

Tabela 10. Resultados obtidos para o cálculo do limite de quantificação do método eletroforético para os ácidos tartárico, glicólico e lático.

AHAs	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido tartárico	0,96
Ácido glicólico	0,44
Ácido lático	0,38

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Os eletroferogramas referentes às soluções amostra A (manipulada) e placebo da amostra A, estão representados na Figura 20.a.

A Figura 20.b representa o eletroferograma referente à solução padrão da mistura dos alfa-hidroxiácidos presentes na formulação.

Os eletroferogramas referentes às soluções amostra B (manipulada) e placebo da amostra B estão representados na Figura 21.a.

A Figura 21.b representa o eletroferograma referente à solução padrão do ácido glicólico presente na formulação.

d) Aplicação do método CE nas amostras manipuladas e comerciais - Precisão

Os resultados obtidos na análise das amostras A, B, E, F e G com o tratamento estatístico são apresentados na Tabela 11.

Os eletroferogramas obtidos para as amostras A, B, E, F e G são apresentados na Figura 22.

e) Teste de recuperação - Exatidão

A Tabela 12 apresenta os resultados do teste de recuperação realizado na amostra A, B, E, F e G.

Figura 20. Eletroferograma obtido para: a) amostra A e placebo; b) padrões ácidos tartárico (T), ácido glicólico (G) e ácido láctico (L), nas concentrações de 60 $\mu\text{g/mL}$. Condições: Hidroenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de injeção: 5 s.; 0,5 psi; Temperatura: 35°C; Detecção indireta a 254 nm.

Figura 21. Eletroferograma obtido para: a) amostra B e placebo; b) padrões ácidos glicólico (G) na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$. Condições: Hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} , CTAB 0,5 mmol.L^{-1} , pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de injeção: 5 s.; 0,5 psi; Temperatura: 35 $^{\circ}\text{C}$; Detecção indireta a 254 nm.

Tabela 11. Resultados das análises nas amostras A, B, E, F e G, aplicando o método eletroforético e o tratamento estatístico dos dados obtidos.

PRODUTOS	VALORES ROTULADOS (%)				VALORES ENCONTRADOS (%)				TEOR PERCENTUAL ^(a) (RSD)			
	T	G	L		T	G	L		T	G		L
Amostra A	3,0	7,5	5,0		2,98	7,43	5,01		99,28±0,17 (0,98%)	99,02±0,14 (0,33%)		100,17±0,23 (0,82%)
Amostra B	-	10,0	-		-	9,97	-		-	99,70±0,14 (0,25%)		-
Amostra E	-	4,0	-		-	4,01	-		-	100,29±0,11 (0,49%)		-
Amostra F	-	-	10,0		--	-	10,09		-	-		100,93±0,33 (0,57%)
Amostra G	-	-	6,0		-	-	6,05		-	-		100,84±0,12 (0,34%)

T, ácido tartárico

G, ácido glicólico

L, ácido láctico

(a) Média de 10 preparações independentes

p = 95%

RSD – Desvio Padrão Relativo

Figura 22. Eletroferogramas das amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G). Condições eletroforéticas: Hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L⁻¹, CTAB 0,5 mmol.L⁻¹, pH 4,1; Tensão: -20 kV; Tempo de injeção: 5 s; 0,5 psi ; Temperatura: 35 °C; Detecção indireta a 254 nm.

Tabela 12. Resultados do teste de recuperação realizado nas amostras A, B, E, F, e G para o método eletroforético.

PRODUTOS	QUANTIDADE ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)			QUANTIDADE ENCONTRADA ($\mu\text{g/mL}$) ^(a)			% RECUPERAÇÃO		
	T	G	L	T	G	L	T	G	L
Amostra A	2,40	6,00	4,00	2,38 $\pm$ 0,26	5,95 $\pm$ 0,05	3,98 $\pm$ 0,58	99,17	99,17	99,50
	4,80	12,00	8,00	4,72 $\pm$ 0,39	12,03 $\pm$ 0,21	7,98 $\pm$ 0,65	98,33	100,25	99,75
	7,20	18,00	12,00	7,19 $\pm$ 0,25	17,94 $\pm$ 0,54	11,84 $\pm$ 0,41	99,86	99,67	99,67
Amostra B	-	8,00	-	-	7,95 $\pm$ 0,15	-	-	99,38	-
	-	16,00	-	-	15,87 $\pm$ 0,16	-	-	99,19	-
	-	24,00	-	-	23,89 $\pm$ 0,51	-	-	99,54	-
Amostra E	-	6,00	-	-	5,99 $\pm$ 0,19	-	-	99,83	-
	-	12,00	-	-	11,79 $\pm$ 0,11	-	-	98,25	-
	-	18,00	-	-	17,90 $\pm$ 0,51	-	-	99,44	-
Amostra F	-	-	8,00	-	-	7,91 $\pm$ 0,13	-	-	98,88
	-	-	16,00	-	-	15,88 $\pm$ 0,35	-	-	99,25
	-	-	24,00	-	-	23,91 $\pm$ 0,20	-	-	99,67
Amostra G	-	-	4,80	-	-	4,76 $\pm$ 0,38	-	-	99,17
	-	-	9,60	-	-	9,68 $\pm$ 0,12	-	-	100,83
	-	-	14,40	-	-	14,28 $\pm$ 0,97	-	-	99,17

T, ácido tartárico

G, ácido glicólico

L, ácido láctico

(a) média de 3 determinações

p = 95%

5.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

5.1.2.1. ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

Ensaio preliminar

As Figuras de 23 a 27 são resultados da aplicação dos sistemas 1 a 5 na mistura dos padrões, ácidos tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L), nas condições pré-estabelecidas, utilizando-se coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125 mm x 4,6 mm Merck®.

As Figuras 28 a 32 são resultados da aplicação dos sistemas 6 a 10 na mistura dos padrões ácidos tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L), nas condições pré-estabelecidas, utilizando-se coluna Sinergy Hydro RP-18 (4 µm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®.

Figura 23. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 1**. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH_2PO_4 25 mmol.L⁻¹: MetOH (80:20), pH 6,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 24. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 2**. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH_2PO_4 25 mmol.L⁻¹: MetOH (80:20), pH 2,5; vazão: 0,5mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 25. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 3**. Condições: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH_2PO_4 25 mmol.L⁻¹: MetOH (90:10), pH 2,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 26. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 4**. Condições: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH_2PO_4 25 mmol.L⁻¹: MetOH: TMA 10 mmol.L⁻¹ (85:15), pH 6,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 27. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 5**. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: KH_2PO_4 10 mmol.L⁻¹; MetOH (90:10), TMA 30 mmol.L⁻¹, pH 6,5; vazão: 0,5 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 28. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 6**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹, pH 6,5; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 29. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 7**. Condições: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 25 mmol.L⁻¹, pH 3,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 30. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 8**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 25 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 31. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 9**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹, TBA 3 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 32. Cromatograma da mistura dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L) referente ao **sistema 10**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 15 mmol.L⁻¹, TBA 3 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

5.1.2.1.1- VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE PARA ANÁLISE DOS ÁCIDOS TARTÁRICO, GLICÓLICO E LÁTICO

A Figura 33 apresenta os cromatogramas obtidos para identificação dos padrões isolados dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e lático (L), em condições pré-estabelecidas.

A Figura 34 apresenta o cromatograma da separação da mistura dos padrões ácidos glicólico (G), tartárico (T) e lático (L), em condições pré-estabelecidas.

Figura 33. Cromatogramas dos padrões dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 15 mmol.L⁻¹, TBA 3 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: SHIMADZU®.

Figura 34. Cromatogramas da mistura dos padrões dos ácidos glicólico (G), tartárico (T) e láctico (L). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 15 mmol.L⁻¹, TBA 3 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamentos: SHIMADZU®.

a) Curva de calibração

Ácido Tartárico

A Figura 35 representa a curva de calibração do ácido tartárico. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 13.

Ácido Glicólico

A Figura 36 representa a curva de calibração do ácido glicólico. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 14.

Ácido Láctico

A Figura 37 representa a curva de calibração do ácido láctico. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 15.

Figura 35. Curva de calibração do ácido tartárico para o método cromatográfico, concentrações de 30 a 300 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 36. Curva de calibração do ácido glicólico para o método cromatográfico, concentrações de 80 a 800 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 37. Curva de calibração do ácido láctico para o método cromatográfico, concentração de 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 13. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido tartárico.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*	%RSD	t_r	%RSD
30,00	56131	0,74	5,57	0,05
60,00	113400	0,18	5,57	0,02
120,00	226076	0,24	5,57	0,02
180,00	334549	1,17	5,57	0,03
240,00	447581	0,02	5,57	0,02
300,00	555231	0,21	5,57	0,02

* Média de três determinações para cada concentração.

% RSD – desvio padrão relativo obtido para média de três determinações.

t_r – tempo de retenção

Tabela 14. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido glicólico.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*	%RSD	t_r	%RSD
80,00	32503	0,99	4,60	0,17
160,00	72809	0,23	4,60	0,01
320,00	154396	0,25	4,60	0,03
480,00	228289	0,08	4,60	0,03
640,00	314612	0,13	4,59	0,01
800,00	386605	0,11	4,59	0,03

* Média de três determinações para cada concentração.

% RSD – desvio padrão relativo obtido para média de três determinações.

t_r – tempo de retenção

Tabela 15. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido láctico.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*	%RSD	t_r	%RSD
50,00	30529	1,12	6,30	0,16
100,00	62220	0,44	6,30	0,03
200,00	132485	0,28	6,29	0,02
300,00	198373	0,20	6,30	0,04
400,00	268648	0,10	6,30	0,06
500,00	330465	0,06	6,29	0,02

* Média de três determinações para cada concentração.

% RSD – desvio padrão relativo obtido para média de três determinações.

t_r – tempo de retenção

Os dados estatísticos obtidos para as curvas de calibração dos ácidos tartárico, glicólico e láctico estão resumidos na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração dos ácidos tartárico, glicólico e láctico aplicando o método cromatográfico.

Parâmetros estatísticos	Ácido Tartárico	Ácido Glicólico	Ácido Láctico
Inclinação (b)	1848,67	493,99	672,30
Desvio padrão da inclinação (S_b)	7,416	5,132	5,669
Intercepto (a)	2284,47	-5982,58	-3225,45
Desvio padrão do intercepto (S_a)	1350,221	2491,610	1720,073
Erro padrão da estimativa (S_e)	1735,28	3202,171	2210,891
Erro padrão da estimativa relativo (S_{er})	0,601	1,620	1,297
Significância de a (t)	1,692	2,401	1,875
Coeficiente de correlação linear (r)	0,99997	0,99978	0,99986

b) Determinação do limite de quantificação

A Tabela 17 apresenta os dados obtidos para o limite de quantificação.

Tabela 17. Resultados obtidos para o cálculo do limite de quantificação do método cromatográfico para os ácidos tartárico, glicólico e láctico.

AHAs	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido tartárico	7,30
Ácido glicólico	50,44
Ácido láctico	25,58

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Os cromatogramas, referentes à solução amostra A (manipulada), solução placebo da amostra A e à solução padrão da mistura dos AHAs presentes na formulação, estão representados na Figura 38.

Os cromatogramas referentes à solução amostra B (manipulada), solução placebo da amostra B e à solução padrão de ácido glicólico presente na formulação, estão representados na Figura 39.

d) Aplicação do método CLAE nas amostras manipuladas e comerciais contendo os ácidos tartárico, glicólico e láctico- Precisão

Os resultados obtidos na análise das amostras A, B, C, E, F, G, H e I com o tratamento estatístico são apresentados na Tabela 18.

Os eletroferogramas obtidos para as amostras A, B, C, E, F, G, H e I são apresentados na Figura 40.

e) Teste de recuperação - Exatidão

A Tabela 19 apresenta os resultados do teste de recuperação realizado na amostra A, B, C, E, F, G, H e I.

Figura 38. Cromatogramas obtidos para amostra A, placebo e padrões ácidos tartárico (T), glicólico (G) e láctico (L), nas concentrações de 120 μg , 300 μg e 200 $\mu\text{g/mL}$ de solução, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 15 mmol.L^{-1} , TBA 3 mmol.L^{-1} , pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min ; volume de injeção 20 μL ; detecção 220 nm; temperatura $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; equipamento: SHIMADZU®.

Figura 39. Eletroferograma obtido para amostra B, placebo e padrão ácido glicólico (G) na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μm) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 15 mmol.L^{-1} , TBA 3 mmol.L^{-1} , pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min ; volume de injeção 20 μL ; detecção 220 nm; temperatura $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; equipamento: SHIMADZU®.

Tabela 18. Resultados das análises nas amostras A, B, C, E, F, G, H e I aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.

PRODUTOS	VALORES ROTULADOS (%)			VALORES ENCONTRADOS (%)			TEOR PERCENTUAL ^(a) (RSD)		
	T	G	L	T	G	L	T	G	L
Amostra A	3,0	7,5	5,0	2,99	7,45	5,03	99,67±0,27 (0,32%)	99,33±0,25 (0,12%)	100,60±0,35 (0,24%)
Amostra B	-	10,0	-	-	9,98	-	-	99,80±0,25 (0,09%)	-
Amostra C	-	4,0	-	-	4,04	-	-	101,13±0,30 (0,13%)	-
Amostra E	-	4,0	-	-	4,02	-	-	100,40±0,14 (0,06%)	-
Amostra F	-	-	10,0	-	-	10,11	-	-	100,14±0,52 (0,36%)
Amostra G	-	-	6,0	-	-	6,06	-	-	100,99±0,20 (0,11%)
Amostra H	-	*	*	-	5,10	2,03	-	72,80±0,38 (0,26%)	28,96±0,23 (0,39%)
Amostra I	-	**	**	-	6,58	3,25	-	65,82±0,65 (0,35%)	32,50±0,23 (0,25%)

(a) Média de 10 preparações independentes

RSD – Desvio padrão relativo

p = 95%

T, ácido tartárico; G, ácido glicólico; L, ácido láctico;

* 7% de ácido glicólico e ácido láctico

** 10% de ácido glicólico e ácido láctico

Figura 40. Cromatogramas das amostras comerciais e manipuladas A, B, C, E, F, G, H e I. Condições cromatográficas: coluna Synergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 15 mmol.L⁻¹, TBA 3 mmol.L⁻¹, pH 2,0; vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: SHIMADZU®.

Tabela 19. Resultados do teste de recuperação realizado nas amostras A, B, C, E, F, G, H e I aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.

PRODUTOS	QUANTIDADE ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)				QUANTIDADE ENCONTRADA ^(a) ($\mu\text{g/mL}$)				% RECUPERAÇÃO			
	T		G		L		T		G		L	
	T	G	L	T	G	L	T	G	L	T	G	L
Amostra A	12,00	30,00	20,00	12,13 $\pm$ 0,12	29,83 $\pm$ 0,32	20,32 $\pm$ 0,20	101,08	99,43	101,62	101,08	99,43	101,62
	24,00	60,00	40,00	24,43 $\pm$ 0,02	60,08 $\pm$ 0,34	40,48 $\pm$ 0,25	101,79	100,13	101,20	101,79	100,13	101,20
	36,00	90,00	60,00	36,70 $\pm$ 0,01	88,98 $\pm$ 0,52	59,94 $\pm$ 0,08	101,95	98,87	99,90	101,95	98,87	99,90
Amostra B	-	40,00	-	-	40,76 $\pm$ 0,25	-	-	101,90	-	-	101,90	-
	-	80,00	-	-	79,85 $\pm$ 0,06	-	-	99,81	-	-	99,81	-
	-	120,00	-	-	122,00 $\pm$ 0,16	-	-	101,67	-	-	101,67	-
Amostra C	-	32,00	-	-	31,63 $\pm$ 0,36	-	-	98,85	-	-	98,85	-
	-	64,00	-	-	64,72 $\pm$ 0,28	-	-	101,13	-	-	101,13	-
	-	96,00	-	-	96,37 $\pm$ 0,11	-	-	100,39	-	-	100,39	-
Amostra E	-	32,00	-	-	31,95 $\pm$ 0,18	-	-	99,86	-	-	99,86	-
	-	64,00	-	-	63,58 $\pm$ 0,14	-	-	99,34	-	-	99,34	-
	-	96,00	-	-	94,66 $\pm$ 0,13	-	-	98,61	-	-	98,61	-
Amostra F	-	-	20,00	-	-	19,84 $\pm$ 0,22	-	-	99,18	-	-	99,18
	-	-	40,00	-	-	39,57 $\pm$ 0,33	-	-	98,93	-	-	98,93
	-	-	60,00	-	-	59,11 $\pm$ 0,22	-	-	98,51	-	-	98,51

(a) Média de 3 determinações

p = 95%

T, ácido tartárico;

G, ácido glicólico;

L, ácido láctico;

Continuação Tabela 19

PRODUTOS	QUANTIDADE ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)			QUANTIDADE ENCONTRADA ^(a) ($\mu\text{g/mL}$)			% RECUPERAÇÃO		
	T	G	L	T	G	L	T	G	L
Amostra G	-	-	24,00	-	-	23,97 $\pm$ 0,11	-	-	99,88
	-	-	48,00	-	-	47,98 $\pm$ 0,30	-	-	99,96
	-	-	72,00	-	-	70,84 $\pm$ 0,26	-	-	98,39
Amostra H	-	32,00	24,00	-	31,51 $\pm$ 0,48	24,48 $\pm$ 0,07	-	98,47	101,99
	-	64,00	48,00	-	64,88 $\pm$ 0,14	47,92 $\pm$ 0,25	-	101,38	99,84
	-	96,00	72,00	-	95,48 $\pm$ 0,22	72,14 $\pm$ 0,36	-	99,46	100,19
Amostra I	-	32,00	20,00	-	31,48 $\pm$ 0,24	19,87 $\pm$ 0,21	-	98,38	99,37
	-	64,00	40,00	-	64,40 $\pm$ 0,13	39,33 $\pm$ 0,09	-	100,62	98,32
	-	96,00	60,00	-	95,61 $\pm$ 0,21	60,74 $\pm$ 0,16	-	99,59	101,24

(a) Média de 3 determinações

p = 95%

T, ácido tartárico;

G, ácido glicólico;

L, ácido láctico;

5.1.2.2 ÁCIDO MANDÉLICO

Ensaio preliminares

As Figuras de 41 a 44 são resultados da aplicação dos sistemas 1 a 4 na determinação do ácido mandélico (M), nas condições pré-estabelecidas, utilizando-se coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125mm x 4,6 mm Merck® e Sinergy Hydro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®.

Figura 41. Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao **sistema 1**. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18 – (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm Phenomenex®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹, pH 3,0 vazão: 0,7 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: CG 480 C.

Figura 42. Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao **sistema 2**. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹ : ACN (90:10), pH 6,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: VARIAN®.

Figura 43. Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao **sistema 3**. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹ : ACN (70:30), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: VARIAN®.

Figura 44. Cromatograma obtido para o padrão ácido mandélico (M) referente ao **sistema 4**. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L^{-1} : ACN (80:20), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 220 nm; temperatura $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; equipamento: VARIAN®.

5.1.2.2.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE PARA ANÁLISE DO ÁCIDO MANDÉLICO

a) Curva de calibração

A Figura 45 representa a curva de calibração do ácido tartárico. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 20.

Os dados estatísticos obtidos para a curva de calibração do ácido mandélico estão resumidos na Tabela 21.

b) Determinação do limite de quantificação

A Tabela 22 apresenta os dados obtidos para o limite de quantificação.

Tabela 22. Resultados obtidos para o cálculo do limite de quantificação do método cromatográfico para o ácido mandélico.

AHAs	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido mandélico	0,49

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Os cromatogramas referentes à solução amostra D (manipulada), solução placebo da amostra D e à solução padrão do ácido mandélico presente na formulação estão representados na Figura 46.

Figura 45. Curva de calibração do ácido mandélico para o método cromatográfico, concentrações de 10 a 80 µg/mL.

Tabela 20. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para o ácido mandélico.

Concentração de leitura µg/mL	Área*	%RSD	t _r	%RSD
10	3854	1,17	2,51	0,25
20	7605	0,60	2,51	0,32
30	11949	0,56	2,52	0,38
40	15461	0,20	2,52	0,16
60	24152	0,33	2,52	0,19
80	32103	0,26	2,52	0,20

* Média de três determinações para cada concentração.

%RSD – desvio padrão relativo obtido para média de três determinações.

t_r – tempo de retenção

Tabela 21. Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração do ácido tartárico, glicólico e lático aplicando o método cromatográfico.

Parâmetros estatísticos	Ácido Mandélico
Inclinação (b)	405,87
Desvio padrão da inclinação (S_b)	4,371
Intercepto (a)	-380,70
Desvio padrão do intercepto (S_a)	198,284
Erro padrão da estimativa (S_e)	254,864
Erro padrão da estimativa relativo (S_{er})	1,608
Significância de a (t)	1,919
Coeficiente de correlação linear (r)	0,99977

Figura 46. Cromatogramas obtidos para amostra D, placebo e padrão ácido mandélico (M), na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L^{-1} : ACN (80:20), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 220 nm; temperatura $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; equipamento: VARIAN®.

d) Aplicação do método CLAE nas amostras manipuladas e comerciais contendo ácido mandélico - Precisão

Os resultados obtidos na análise das amostras D, J e K com o tratamento estatístico são apresentados na Tabela 23.

e) Teste de recuperação - Exatidão

A Tabela 24 apresenta os resultados do teste de recuperação realizado na amostra D, J e K.

Os eletroferogramas obtidos para as amostras D, J e K são apresentados na Figura 47.

Tabela 23. Resultados das análises nas amostras D, J e K aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.

PRODUTOS	VALORES ROTULADOS (%)	VALORES ENCONTRADOS (%)	TEOR PERCENTUAL ^(a) (RSD)
	M	M	M
Amostra D	5,0	4,97	99,37±0,14 (0,63%)
Amostra J	***	7,57	7,57±0,09 (0,28%)
Amostra K	***	0,99	0,99±0,09 (0,63%)

(a) Média de 3 determinações

p = 95%

M, ácido mandélico

*** concentração não declarada

Tabela 24. Resultados do teste de recuperação realizado nas amostras D, J e K aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos

PRODUTOS	QUANTIDADE ADICIONADA (µg/mL)	QUANTIDADE ENCONTRADA ^(a) (µg/mL)	% RECUPERAÇÃO
	M	M	M
Amostra D	10,00	9,98±0,17	99,75
	20,00	20,36±0,06	101,79
	30,00	30,49±0,06	101,65
Amostra J	10,00	10,06±0,22	100,62
	20,00	20,35±0,14	101,75
	30,00	30,40±0,19	101,35
Amostra K	10,00	10,17±0,14	101,73
	20,00	20,29±0,24	101,43
	30,00	30,34±0,03	101,13

(a) Média de 3 determinações

p = 95%

M, ácido mandélico

Figura 47. Cromatogramas das amostras manipuladas e comerciais D, J e K.

Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 125 mm x 4,6 mm Merck®; fase móvel: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L⁻¹ : ACN (80:20), pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 220 nm; temperatura 23°C $\pm$ 1°C; equipamento: VARIAN®.

5.1.3. RESULTADOS OBTIDOS NA COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO DOS MÉTODOS PROPOSTOS (CE E CLAE)

A Tabela 25, apresenta os parâmetros estatísticos empregados nos cálculos para a comparação da exatidão e precisão dos dois métodos propostos (CE e CLAE) para a determinação dos ácidos glicólico, tartárico e láctico, contidos em formulações cosméticas simuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

A Tabela 26, apresenta os resultados de t obtidos na comparação da exatidão dos dois métodos propostos (CE e CLAE) para a determinação dos ácidos glicólico, tartárico e láctico, contidos em formulações cosméticas simuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

A Tabela 27, apresenta os resultados de F obtidos na comparação da precisão dos dois métodos propostos (CE e CLAE) para a determinação dos ácidos glicólico, tartárico e láctico, contidos em formulações cosméticas simuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

Tabela 25. Parâmetros estatísticos obtidos para a comparação da exatidão e precisão dos métodos CLAE e CE a partir da determinação dos ácidos tartárico, glicólico e lático nas amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

Amostra	Parâmetro estatístico	Cromatografia líquida de alta eficiência (Método 1)			Eletroforese Capilar (Método 2)		
		T	G	L	T	G	L
A	$\bar{X}$	99,51	99,27	100,52	99,28	99,02	100,17
	S	0,38	0,35	0,49	0,23	0,20	0,33
	n	10	10	10	10	10	10
B	$\bar{X}$		99,82			99,69	
	S	—	0,35	—	—	0,20	—
	n		10			10	
E	$\bar{X}$		100,40			100,29	
	S	—	0,19	—	—	0,16	—
	n		10			10	
F	$\bar{X}$			101,14			100,93
	S	—	—	0,72	—	—	0,46
	n			10			10
G	$\bar{X}$			100,99			100,84
	S	—	—	0,28	—	—	0,17
	n			10			10

T – ácido tartárico

G – ácido glicólico

L – ácido lático

$\bar{X}$ = média dos valores experimentais obtidos na determinação do teor de cada ácido em estudo por grama de creme, em % .

S = desvio padrão da amostra

n = número de determinações

Tabela 26. Resultados obtidos na comparação da exatidão dos métodos CLAE e CE para a determinação dos ácidos tartárico, glicólico e láctico nas amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

Amostra	Métodos: CLAE e CE		
	Valor calculado de t		
	Ácido tartárico	Ácido glicólico	Ácido láctico
A	1,631	1,968	1,872
B	----	1,024	----
E	----	1,392	----
F	----	----	0,778
G	----	----	1,456

Valor da Tabela t de Student para 18 graus de liberdade e para $p=95\%$ é 2,101.

Tabela 27. Resultados obtidos na comparação da precisão dos métodos CLAE e CE para a determinação dos ácidos tartárico, glicólico e láctico nas amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

Amostra	Métodos: CE e CLAE		
	Valor calculado de F		
	Ácido tartárico	Ácido glicólico	Ácido láctico
A	2,717	3,05	2,202
B	----	3,05	----
E	----	1,385	----
F	----	----	2,443
G	----	----	2,690

Valor da Tabela F de Snedecor, para 9/9 graus de liberdade e para $p = 95\%$ é 3,18.

DISCUSSÃO

VI- DISCUSSÃO

Com o avanço da tecnologia industrial e com pesquisas mais aprofundadas, o cosmético deixou de ser apenas um adorno para disfarçar imperfeições, embelezar o rosto, os olhos e a pele, e passou a ser essencial para manter a pele com aspecto jovem e saudável.

Atualmente, ser ou parecer jovem é sinônimo de saúde e beleza. E, por ser a pele responsável pela aparência externa, seu envelhecimento pode afetar a auto-estima do indivíduo e interferir no seu convívio com a sociedade. Este fato tem impulsionado os pesquisadores e indústrias cosméticas a encontrarem e desenvolverem produtos que possam reverter ou prevenir o envelhecimento cutâneo.

Os AHAs fazem parte das substâncias ativas que causaram uma grande revolução no que diz respeito ao tratamento anti-envelhecimento. Porém, quando usados em concentrações maiores do que a permitida pelos órgãos reguladores (máximo de 10% em produtos de uso diário), podem causar problemas dermatológicos ao consumidor. Assim, os órgãos reguladores como a FDA e a CTFA consideram indispensável o controle de qualidade para garantia da segurança destes produtos, sendo então necessário possuir metodologias analíticas para a identificação e quantificação destes AHAs em produtos cosméticos.

A eletroforese capilar (CE) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ocupam um lugar de grande destaque como técnicas analíticas qualitativa e quantitativa, usadas amplamente para separação de uma

grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta eficiência.

A maioria dos trabalhos voltados para análise qualitativa e quantitativa de AHAs está relacionada aos métodos eletroforese e cromatografia, porém poucos trabalhos tratam, especificamente, da determinação dos AHAs quando estão presentes em associação numa formulação cosmética e nem da validação dos métodos empregados para sua determinação e quantificação.

O objetivo principal desta pesquisa foi o desenvolvimento de metodologias analíticas por eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para identificação e quantificação dos AHAs mais utilizados em produtos cosméticos.

Os ácidos tartárico, glicólico e láctico encontram-se associados ou isolados em muitos produtos cosméticos com diferentes concentrações. Enquanto o ácido mandélico, até o presente momento, foi encontrado em produtos cosméticos isoladamente.

Inicialmente foram realizados testes de solubilidade e ponto de fusão para identificação de cada AHAs em estudo. Os AHAs foram solúveis em água, álcool e acetonitrila. Os resultados obtidos conferem com as especificações encontradas na literatura (MERCK Index, 1996). O teste de solubilidade indica quais solventes podem ser usados durante o desenvolvimento das metodologias.

Foram realizadas leituras no ultravioleta a fim de confirmar o comprimento de onda onde ocorre a máxima absorção dos AHAs em estudo. O solvente empregado foi água devido aos AHAs serem solúveis neste solvente e pela transparência do solvente (190 nm). Pode-se observar nas Figuras 5, 7, 9 e 11 que a máxima absorção foi por volta de 220 nm. Confirmando assim o que já vem sendo descrito na literatura de que os

AHAs são ácidos orgânicos fracos que possuem absorção máxima entre 210 e 220 nm (CHANG e CHANG, 2003; CHEN et al, 1996; SHARMAN, 1997).

Os espectros de absorção no infravermelho obtidos para os AHAs em estudo (Figuras 6, 8, 10 e 12;) apresentaram perfil de acordo com os encontrados na literatura (POUCHERT, 1978).

1- Análise por FSCE

1.1- Ácido tartárico, glicólico e láctico

O desenvolvimento das condições experimentais em FSCE é direcionado na composição do eletrólito de corrida. A seletividade, eficiência e velocidade de separação podem ser influenciadas pelo pH, concentração e presença de modificadores e aditivos no eletrólito.

Além da composição do eletrólito outros parâmetros típicos a serem otimizados envolvem o tipo de detecção, tensão, comprimento efetivo do capilar e modo e tempo de injeção da amostra, os quais com exceção do detector, podem ser modificados facilmente durante os experimentos.

A separação dos ácidos tartárico, glicólico e láctico foi realizada sob detecção indireta, uma vez que os AHAs em estudo apresentam baixa absorvidade na região UV/Vis. A escolha do comprimento de onda para as análises foi em função do cromóforo presente no eletrólito de corrida.

Neste estudo foram escolhidos, inicialmente dois cromóforos (ácido 3,5-dinitrobenzóico e o hidrogenoftalato de potássio) amplamente utilizados para determinação de compostos ácidos. A escolha da composição do eletrólito deve estar baseada, entre outros fatores, na proximidade de mobilidade eletroforética do ânion do eletrólito com o ânion que se quer analisar. Estudos indicam que para melhor separação e resolução de solutos compostos por ácido ou bases fracas, a mobilidade do cromóforo presente no eletrólito de corrida deve ser próxima da mobilidade dos analitos. A discrepância entre estes valores causa o efeito de dispersão de picos,

diminuindo a simetria e a eficiência dos picos obtidos, o que é indesejável para análise quantitativa. Portanto, foi construída uma curva de mobilidade efetiva para os AHAs em estudo juntamente com os dois cromóforos em função do pH para verificar a proximidade de suas mobilidades e qual pH é ideal para separação.

A Figura 13 apresenta a curva de mobilidade efetiva dos ácidos em estudo e dos dois cromóforos escolhidos. Pode-se observar que ambos os cromóforos apresentaram mobilidade próxima à dos AHAs analisados, porém foi escolhido o hidrogenoftalato de potássio por sua facilidade de preparação, sem precisar ajustar o pH, uma vez que por uma simples dissolução pode-se obter pH 4,1. E, de acordo com a curva de mobilidade (Figura 13), neste pH nenhum dos AHAs possui a mesma mobilidade e a diferença entre as mobilidades é satisfatória para permitir a separação dos compostos. O hidrogenoftalato de potássio absorve em 254 nm, comprimento de onda selecionado para as análises.

Para que a eluição dos AHAs fosse mais rápida optou-se por inverter o FEO adicionando ao eletrólito $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A polaridade da fonte de alta tensão também foi invertida, de modo que a extremidade do capilar que fica próximo ao detector foi o ânodo (pólo positivo).

Os padrões dos AHAs em estudo foram identificados isoladamente na concentração de $60 \text{ }\mu\text{g/mL}$, utilizando-se condições eletroforéticas pré-estabelecidas com eletrólito de corrida constituído de hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} e CTAB $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 4,1; tensão aplicada de -20 kV , tempo de injeção de 5 segundos e temperatura controlada de 35°C .

A Figura 14 apresenta os eletroferogramas com os tempos de migração de cada AHAs em estudo.

Em seguida, foi preparada uma solução contendo uma mistura dos 3 AHAs na mesma concentração e submeteu-se a análise. Pode-se observar

na Figura 15 que houve uma boa separação dos picos obtidos, os quais correspondem aos encontrados anteriormente na Figura 14.

A tensão aplicada foi aumentada de -20 kV para -30 kV a fim de verificar sua influência na velocidade de separação. A Figura 16 mostra que com o aumento da tensão houve uma redução no tempo de migração, porém os picos referentes ao ácido glicólico e lático saíram muito próximos. A redução da tensão causa uma diminuição no fluxo eletroosmótico proporcionando a separação dos picos, pois migrando a uma velocidade menor, as bandas que antes estavam juntas podem se separar. Então optou-se pela tensão de -20 kV, pois além da separação ser mais resolvida, a diminuição do tempo de migração quando aplicado uma tensão maior não é significativa.

Após vários experimentos considerou-se que as melhores condições analíticas na otimização do método CE para separação dos AHAs em estudo são: hidrogenoftalato de potássio 10 mmol.L^{-1} contendo $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CTAB, com pH final de 4,1, tensão aplicada de -20 kV, tempo de injeção de 5s, utilizando capilar de sílica fundida com injeção hidrodinâmica e detecção UV indireta a 254 nm, temperatura controlada a 35°C a fim de manter a solubilidade do CTAB.

2. Análise por CLAE

2.1- Ácidos tartárico, glicólico e lático

A identificação e quantificação dos AHAs em estudo por CLAE apresentaram algumas dificuldades.

Na literatura, os métodos mais empregados para determinação e separação de AHAs em produtos cosméticos, incluem técnicas de eletroforese capilar e cromatografia líquida. Esta última é geralmente baseada em mecanismos de troca iônica, exclusão iônica e fase reversa com pareamento iônico ou supressão iônica, com uso de baixo pH, apresentando muitas vezes complexidade no preparo das amostras, além de

apresentarem tempos de retenção relativamente altos para análise de rotina (BRUZZONITI et al, 1998; HAJÓS e NAGY, 1998).

A intenção da presente pesquisa foi o desenvolvimento de metodologias rápidas, simples e de baixo custo para análise de rotina no controle de qualidade de formulações cosméticas que contenha AHAs.

Os AHAs são compostos orgânicos que possuem grupos funcionais ionizáveis, com valores de pKas entre 2,9 e 4,2. A retenção destes compostos em CLAE com fase reversa vai depender principalmente do grau de ionização daqueles grupos e consequentemente do pH da fase móvel (NEUE et al, 2001).

Vários fatores podem influenciar na otimização de um método cromatográfico para análise de compostos ionizáveis. Mas, dentre os mais críticos estão a composição e o pH da fase móvel, e a composição química da fase estacionária.

A maior dificuldade encontrada nesta pesquisa foi na afinidade dos AHAs com a fase estacionária da coluna empregada. Inicialmente, a coluna utilizada para determinação dos AHAs em estudo foi coluna LiChrospher® RP-18. Estas colunas são colunas convencionais constituídas de octadecilsilano como fase ligada à fase estacionária. O grande problema é que colunas deste tipo são restritas para uso de pH na faixa de 2 a 7 ($2,0 < \text{pH} < 7,0$), onde o uso de pH no limite ou fora desta faixa diminui o tempo de vida útil da coluna, com alto risco de causar corrosão no suporte, quebra da fase ligada ou até dissolução da sílica.

A literatura deixa claro que a separação de compostos ácidos utilizando fase estacionária tradicional constituída de grupos alquílicos, tais como octadecilsilano (C_{18}), dependendo da natureza do analito, é difícil. Além da limitação do uso de pH, as colunas constituídas de fase estacionária tradicional C_{18} apresentam baixa afinidade com os grupos polares dos AHAs. Uma vez que a ionização dos grupos silanóis presentes na fase estacionária depende do pH da fase móvel. Em pH acima de 3,0 os

silanóis se ionizam e ficam carregados negativamente, o que diminui a possibilidade de compostos carregados negativamente (como é o caso dos AHAs em estudo quando ionizados), serem retidos pela fase estacionária (NEUE et al, 2001).

Com esta limitação tornou-se difícil a determinação dos AHAs em estudo. Mesmo com o ajuste de outros parâmetros como concentração e composição da fase móvel, adição de reagentes pareadores iônicos, os resultados obtidos apresentaram baixa seletividade e baixa reprodutibilidade no tempo de retenção e as áreas obtidas entre as corridas.

Foram testadas em média 30 fases móveis, variando-se composição da fase móvel, pH, concentração do tampão, tipo de tampão e adição de aditivos como pareadores iônicos, porém foram selecionadas aquelas que deram melhores resultados empregando-se as colunas LiChrospher® RP-18 Merck e Sinergy Hydro RP-18 Phenomenex®, conforme Tabelas 2 e 3, respectivamente. Para preparação das soluções tampão empregadas na fase móvel evitou-se usar sais de sódio devido à sua baixa solubilidade quando comparado com outros sais. Sabe-se que a solubilidade dos tampões segue a mesma tendência da solubilidade dos cátions em água ($\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$), e que tampões dibásicos diminuem o tempo de retenção mais do que tampões monobásicos por aumentar o efeito de exclusão (NEUE et al, 2001; SCHELLINGER e CARR, 2004). Portanto, nesta pesquisa, inicialmente foram testados tampões monobásicos de fosfato de potássio e posteriormente fosfato de amônio.

Quando foi empregada fase móvel constituída de tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 25 mmol.L⁻¹ : metanol (80:20), pH 6,5 empregando a coluna LiChrospher® (sistema 1), observa-se que houve uma co-eluição dos ácidos em estudo (Figura 23). O que pode ser explicado pelo fato de que em pH 6,5 todos os ácidos e os grupamentos silanóis da coluna estão na forma ionizada (carregados negativamente), o que leva a uma repulsão dos ácidos mais rapidamente, resultando em um valor de retenção baixo (NEUE et al, 2001).

Abaixando-se o pH e mantendo-se os demais parâmetros (sistema 2), observa-se um melhoramento na seletividade porém com uma retenção insuficiente (Figura 24).

Por razões de solubilidade, muitos compostos polares preferem uma fase móvel altamente aquosa e podem ser retidos apenas com um mínimo de concentração de solventes orgânicos, algumas vezes menos que 5% (MAJORS e PRZYBYCIEL, 2002). Pensou-se então em aumentar a quantidade de água na fase móvel (sistema 3). Pode-se observar na Figura 25 que houve um melhoramento na seletividade e tempo de retenção, porém a separação ainda não foi satisfatória. Maiores % de água e menores pH não foram testados para evitar maiores danos a coluna.

A fim de melhorar a separação foi adicionado à fase móvel (sistema 3) 10 mmol.L⁻¹ de tetrametilamônio (TMA), a um pH onde todos os AHAs estão ionizados (sistema 4), porém sob estas condições houve diminuição no tempo de análise e na resolução dos compostos (Figura 26), apresentando perfil semelhante apresentado no sistema 2 (Figura 24). Foi então aumentada a concentração de TMA para 30 mmol.L⁻¹, mantendo-se fixos os demais parâmetros (sistema 5), e a separação melhorou para o ácido láctico e tartárico, porém o ácido glicólico praticamente co-eluiu com o ácido tartárico (Figura 27).

Analitos ânionicos, como é o caso dos ácidos em estudo, são melhores retidos a um pH bem abaixo do seu pKa, ± 2 unidades, o que levaria a usar um pH de no máximo 2,0 para garantir que os ácidos em estudo estejam na forma não ionizada (forma neutra, hidrofóbica, mais apolar), e consequentemente sejam mais retidos. Utilizando-se pH com valores acima dos seus pKas os ácidos em estudos serão ionizados, tornando-se mais hidrofílicos (polares) e, consequentemente, sua retenção será reduzida na fase estacionária (apolar), pois os mesmos terão mais afinidade pela fase móvel (polar).

Portanto, em CLAE com fase reversa a retenção de moléculas ionizadas (A^-) é tipicamente menor do que para moléculas não ionizadas (HA).

Tendo em vista que um dos principais problemas para o uso da coluna LiChrospher® foi a limitação do uso de baixo pH e a necessidade de usar fases móvel contendo solventes orgânicos, uma boa alternativa para determinação dos AHAs em estudo seria o emprego de colunas com fase estacionária que suporte pH na faixa de 1,0 a 13,0, e que tenha melhor retenção hidrofílica.

Algumas colunas para fases reversas têm sido relatadas por vários pesquisadores para produzir melhor eficiência na separação de ácidos alifáticos de baixo peso molecular como os AHAs (DOLAN, 2001; KIRIDENA et al, 2003; MAJORS e PRZYBYCIEL, 2002; NAGAE et al, 2002; PHENOMENEX, 2002-2003).

Estas colunas têm empacotamentos baseados em um grupamento alquil (ex: octadecilsilano) revestido ("end-capped") com grupos polares, aumentando assim a estabilidade da fase alquil quando fases móveis 100% aquosa e / ou com pH extremos são utilizadas, melhorando a retenção de muitos compostos hidrofílicos (KIRIDENA et al., 2003; PHENOMENEX, 2002-2003)

Uma das vantagens de usar fase móvel totalmente aquosa, por exemplo fase móvel constituída de 100% de tampão, é a redução do uso de solventes orgânicos, o que implica numa redução da contaminação ambiental, diminuição do risco de intoxicação do analista e favorecimento no desenvolvimento de metodologias de baixo custo, uma vez que o custo para o processo de descartes de solventes orgânicos é tão alto quanto o custo de sua aquisição.

Após várias tentativas com a coluna Lichrospher®, foi então empregada coluna Sinergy Hydro® RP-18, a qual possui grupamentos

polares ligados próximo à base da fase ligada. Nesta coluna também foram testadas várias fases móveis, porém foram selecionadas as que apresentaram melhores resultados, conforme Tabela 4.

A Figura 28 apresenta um cromatograma obtido com uma fase móvel constituída de tampão fosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 30 mmol.L^{-1} , pH 6,5 (sistema 6). Pode-se observar que mesmo com uma fase móvel totalmente aquosa a separação dos ácidos em estudo não foi satisfatória, o que leva a concluir que o pH tem forte influência na separação destes compostos. Tanto a retenção como a seletividade para compostos ionizáveis, são em função da concentração do sal do tampão e do pH (SCHELLINGER e CARR, 2004).

A concentração e o pH do tampão foram diminuídos (sistema 7) e, pode-se observar na Figura 29 que houve uma melhor separação dos ácidos, porém os ácidos glicólico e tartárico ainda não apresentaram boa separação. Pensou-se em abaixar um pouco mais o pH mantendo os demais parâmetros (sistema 8), observa-se na Figura 30 que não houve uma mudança significativa, a não ser no tempo de retenção que foi um pouco maior.

Para tentar resolver o problema, foi adicionado à fase móvel do sistema 8, 3 mmol.L^{-1} do aditivo tetrabutilamônio (TBA) para reduzir o caráter polar das moléculas e obter uma separação aceitável (sistema 9). Pode-se observar na Figura 31 que houve uma melhor separação, porém os resultados obtidos apresentaram uma variação muito alta tanto para as áreas dos picos obtidas como para o tempo de retenção, com alto desvio padrão relativo alto ($\pm 6\%$) indicando baixa reprodutibilidade, o que não é ideal para análise quantitativa.

A quantidade de sal do tampão foi diminuída (sistema 10) e obteve-se então uma boa separação dos ácidos em estudo, tempo de análise razoável e com boa reprodutibilidade (Figura 32).

A completa resolução dos AHAs tartárico, glicólico e láctico se deu com uso de fase móvel constituída de 15 mmol.L⁻¹ de NH₄H₂PO₄ e 3 mmol.L⁻¹ de TBA, pH 2,0, em coluna Sinergy Hydro[®] RP-18. Estas condições não são teoricamente apropriadas para cromatografia de pareamento iônico, uma vez que os AHAs estão totalmente não ionizados (protonados). Porém, nestas condições, o ácido tartárico, que tem valor de pKa mais baixo do que os outros AHAs, foi mais retido do que o ácido glicólico, causando melhor resolução destes analitos do que quando na ausência de TBA (Figura 30). O fato do ácido láctico ter sido mais retido que o ácido tartárico pode ser devido ao grupamento metila em sua estrutura que torna a molécula com caráter menos hidrofílico.

A Figura 33 apresenta os cromatogramas de cada padrão dos ácidos glicólico, tartárico e láctico isoladamente, permitindo a identificação de cada pico obtido, empregando as condições estabelecidas. Na Figura 34 pode-se observar que houve uma boa separação dos picos obtidos para a mistura dos três AHAs (glicólico, tartárico e láctico), os quais correspondem aos encontrados anteriormente na Figura 33.

2.2- Ácido mandélico

Apesar do ácido mandélico ser uma substância ionizável, ele possui em sua estrutura química um grupamento aromático (Quadro 1), o que facilita sua retenção em colunas de fase reversa.

Inicialmente foi testada fase móvel constituída de NH₄H₂PO₄ 30 mmol.L⁻¹, pH 3,0 na coluna Sinergy Hydro[®], porém nestas condições a retenção do ácido mandélico foi muito alta, aproximadamente 40 minutos (Figura 41).

Optou-se, então, usar a coluna LiChrospher[®] testando diferentes fases móveis, onde as que apresentaram melhores resultados estão descritas na Tabela 5.

Aumentado-se o % de solvente orgânico em 10% a retenção do ácido mandélico foi reduzida em aproximadamente 10 vezes (Figura 42).

Na Figura 43 pode-se observar que com um aumento de 30% de fase móvel, o ácido mandélico foi rapidamente expulso da coluna. Então, após vários experimentos, considerou-se que a fase móvel que apresentou resultados com boa reprodutibilidade foi $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 mmol.L^{-1} : acetonitrila (80:20), pH 2,5, com vazão de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm. Como pode ser visto na Figura 44, houve uma retenção aceitável.

3- Validação dos métodos CE e CLAE para análise dos ácidos tartárico, glicólico, láctico e mandélico.

Para garantir que o método forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos analíticos, foram avaliados neste trabalho alguns parâmetros da validação analítica como: linearidade, limite de quantificação, especificidade, precisão (em nível de repetibilidade) e exatidão. Os critérios de validação para o método CE são similares àqueles empregados para a CLAE (KUNKEL et al., 1997; RIBANI et al., 2004; SHABIR, 2003).

Porém, fazer validação de um método analítico não implica que ele esteja isento de erros e que pode ser usado indiscriminadamente, mas permite obter informações estatisticamente confiáveis, confirmando que o método está adequado para o uso proposto.

Para a validação dos métodos empregados neste estudo foram consideradas as diretrizes descritas nos compêndios da AOAC, USP 26 e ICH (AOAC, 2002; ICH, 1995; ICH, 1997; USP 26, 2003).

O limite de detecção não foi considerado relevante para os métodos aplicados, pois segundo a literatura, é um parâmetro indicado para testes limite, como determinação de produtos de degradação e impurezas (ICH, 1995; USP 26, 2003).

A linearidade de um método analítico demonstra a capacidade do método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma variação conhecida. Pode ser determinada por meio da análise de regressão linear simples, a qual vai determinar se há uma relação linear entre a resposta instrumental e a concentração conhecida da substância presente nas amostras.

O LQ de um método analítico reflete a mais baixa concentração da substância em exame presente na amostra que pode ser exatamente e precisamente medida nas condições pré-estabelecidas. O cálculo do LQ pode ser baseado no desvio padrão da resposta (SD) e na inclinação da curva de calibração, de acordo com a equação 6 (pág 47). Onde, SD pode ser determinado baseado no desvio padrão de solução branco, no desvio padrão residual da linha de regressão ou no desvio padrão do intercepto (S_a) da linha de regressão. O LQ aceitável, segundo os órgãos reguladores, deve ser 10 vezes o valor da reação sinal-ruído do método (ICH, 1995; USP 26, 2003).

A especificidade de um método analítico expressa a capacidade que o método tem de medir exatamente e especificamente a concentração da substância em análise na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra, por exemplo excipientes.

O método mais simples de identificação dos picos em CE e CLAE é a comparação do tempo de migração e retenção, respectivamente, dos picos da amostra com os picos dos padrões analisados sob as mesmas condições (BRUZZONITI et al, 1998).

A precisão de um método analítico está relacionada com o grau de concordância entre os valores experimentais obtidos, quando o procedimento é aplicado repetidamente a uma mesma amostra homogênea, preparada independentemente, em idênticas condições experimentais.

Segundo o ICH, a precisão pode ser determinada em três diferentes níveis: em nível de reprodutibilidade, repetibilidade e precisão intermediária. A precisão em nível de reprodutibilidade corresponde ao grau de concordância entre os valores experimentais obtidos, quando o método é aplicado por diferentes analistas, equipamentos e laboratórios. A precisão em nível de repetibilidade corresponde ao grau de concordância entre os valores experimentais obtidos, quando o método é aplicado pelo mesmo analista, no mesmo dia, no mesmo laboratório. E a precisão intermediária corresponde ao grau de concordância entre os valores obtidos quando o método é aplicado pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, porém em diferentes dias. Quanto mais próximos entre si estiverem os valores obtidos, maior será a precisão do método (ICH, 1995; USP, 2003).

A precisão do método está relacionada ao Desvio Padrão Relativo (RSD; do inglês Relative Standard Desvio). Os limites sugeridos na literatura para o RSD na determinação de substâncias por métodos como CE e CLAE, variam. Para alguns autores este deve ser menor que 1% ou não deve exceder 2% (SHABIR, 2003; SCHAEFER, 2000).

Nesta pesquisa, a precisão dos métodos CE e CLAE foram determinadas em nível de repetibilidade.

A exatidão de um método analítico expressa a concordância dos valores experimentais obtidos com um valor teórico ou tido como verdadeiro. A exatidão pode ser determinada de quatro formas: 1- analisando uma amostra de concentração conhecida e comparando o valor obtido com um valor tido como verdadeiro; 2-comparando os resultados obtidos pelo novo método com os resultados de um método já validado com valores de exatidão conhecida; 3- calculando o percentual de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado em um "placebo"; 4- calculando o percentual de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado em uma amostra quando não é possível obter um placebo desta amostra (SHABIR, 2003).

Nesta pesquisa, optou-se por determinar a exatidão dos métodos CE e CLAE a partir da recuperação de uma quantidade conhecida de padrão adicionada na amostra, calculando-se em seguida o percentual de recuperação.

3.1- Validação do método CE para análise dos ácidos tartárico, glicólico e lático

a- Linearidade

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foi construída uma curva de calibração para cada AHAs (tartárico, glicólico e lático) num intervalo de 10 – 100 µg/mL (Figuras 17, 18, 19 e Tabelas 6, 7, e 8).

As curvas de calibração obtidas foram analisadas pelo Método dos Mínimos Quadrados, observando-se que cada uma das retas passa muito próximo a origem, uma vez que o valor de interseção da reta (a), analisado pelo teste t, é insignificante, indicando que o método empregado não está sujeito a erros determinados (BARROS et al., 2003). Obteve-se uma boa linearidade, com média do coeficiente de correlação de 0,999997 para os três AHAs analisados, conforme Tabela 9.

b- Limite de Quantificação (LQ)

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos para o cálculo do LQ para ácido tartárico, glicólico e lático.

Os LQ foram de 0,96 µg/mL para o ácido tartárico, para o ácido glicólico foi de 0,44 µg/mL e para o ácido lático foi de 0,38 µg/mL.

c) Pesquisa de interferentes – Especificidade

As Figuras 20 e 21 representam os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes das amostras simuladas A e B, respectivamente. Pode-se observar que os placebos das amostras não

apresentaram nenhum componente que possa interferir com o pico máximo dos AHAs tartárico, glicólico e lático. Portanto, o método pode ser aplicado à quantificação e identificação destes AHAs nessas formulações.

d) Aplicação do método CE às amostras manipuladas (A e B) e comerciais (E, F e G) – Precisão

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor dos AHAs (tartárico, glicólico e lático) nas amostras simuladas (A e B) e comerciais (E, F e G).

O % RSD foi calculado para cada amostra simulada e comercial empregando-se 10 preparações independentes. A média do % RSD obtido para os três AHAs presentes nas amostras foi de 0,54%, indicando uma boa reprodutibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

Os eletroferogramas obtidos para cada amostra manipulada e comercial estão apresentados na Figura 22, os quais podem ser confirmados pela comparação com os padrões.

Alguns autores consideram a precisão um dos problemas da CE (FALLER e ENGELHARDT, 1999; MAYER, 2001), porém a metodologia validada no presente trabalho apresentou ótima repetibilidade.

e) Teste de Recuperação – Exatidão

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação nas amostras simuladas (A e B) e comerciais (E, F e G). A média de percentuais de recuperação obtidos para o método CE foi de 99,48% para a amostra A, de 99,38% para a amostra B, de 99,17% para a amostra E, de 99,27% para a amostra F e de 99,72% para a amostra G, apresentando assim pouca dispersão. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método. E um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados obtidos apresenta

variação de $\pm 2,0\%$ do valor nominal (BRITTAIN, 1998; GARFIELD, 1991; SHABIR, 2003).

3.2- Validação do método CLAE para análise dos ácidos tartárico, glicólico e láctico

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foi construída uma curva de calibração para cada AHAs num intervalo de 30 a 300 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido tartárico (Figura 35 e Tabela 13), de 80 a 800 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido glicólico (Figura 36 e Tabela 14) e de 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido láctico (Figura 37 e Tabela 15).

Assim como para o método CE, as curvas de calibração obtidas foram analisadas pelo Método dos Mínimos Quadrados, observando-se que cada uma das retas passa muito próximo a origem, uma vez que o valor de interseção da reta (a), analisado pelo teste t , é insignificante, indicando que o método empregado não está sujeito a erros determinados (BARROS et al., 2003). Obteve-se uma boa linearidade, com um coeficiente de correlação de 0,99987 para os três AHAs analisados, conforme Tabela 16.

b- Limite de Quantificação (LQ)

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para o cálculo do LQ para ácido tartárico, glicólico e láctico.

Os LQ foram de 7,30 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido tartárico, para o ácido glicólico foi de 50,44 $\mu\text{g/mL}$ e para o ácido láctico foi de 25,58 $\mu\text{g/mL}$.

c) Pesquisa de interferentes – Especificidade

As Figuras 38 e 39 representam os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes das amostras simuladas A e B, respectivamente. Pode-se observar que os placebos das amostras não

apresentaram nenhum componente que possa interferir com o pico máximo dos AHAs tartárico, glicólico e láctico. Portanto, o método pode ser aplicado à quantificação e identificação destes AHAs nessas formulações.

d) Aplicação do método CLAE às amostras simuladas (A, B e C) e comerciais (E, F, G, H e I) – Precisão

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor dos AHAs (tartárico, glicólico e láctico) nas amostras simuladas (A, B e C) e comerciais (E, F, G, H e I).

O % RSD foi calculado para cada amostra simulada e comercial empregando-se 10 preparações independentes. A média do % RSD obtido para os três AHAs presentes nas amostras foi de 0,21% indicando uma boa reprodutibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

Os cromatogramas obtidos para as amostras comerciais e manipuladas apresentados na Figura 40, podem se confirmados pela comparação com os padrões.

e) Teste de Recuperação – Exatidão

A Tabela 19 mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação nas amostras simuladas (A, B, e C) e comerciais (E, F, G, H e I). A média de percentuais de recuperação obtidos para o método CE foi de 100,66% para a amostra A, de 101,13% para a amostra B, de 100,12% para a amostra C, de 99,27% para a amostra E, de 98,87% para a amostra F, de 99,41% para a amostra G, de 100,22% para a amostra H e de 93,31% para a amostra I. Os resultados obtidos apresentaram pouca dispersão. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método. E um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados obtidos apresenta variação de $\pm 2,0\%$ do valor nominal (BRITAIN, 1998; GARFIELD, 1991; SHABIR, 2003).

3.3- Validação do método CLAE para análise do ácido mandélico

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foi construída uma curva de calibração para o ácido mandélico num intervalo de 10 a 80 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 45 e Tabela 20).

As curvas de calibração obtidas foram analisadas pelo Método dos Mínimos Quadrados, observando-se que cada uma das retas passa muito próximo a origem, uma vez que o valor de interseção da reta (a), analisado pelo teste t , é insignificante, indicando que o método empregado não está sujeito a erros determinados (BARROS et al., 2003). Obteve-se uma boa linearidade, com um coeficiente de correlação de 0,99977, conforme Tabela 21.

b- Limite de Quantificação (LQ)

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos para o cálculo do LQ para o ácido mandélico, que foi de 0,49 $\mu\text{g/mL}$.

c) Pesquisa de interferentes – Especificidade

A Figura 46 representa os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes da amostra manipulada D. Pode-se observar que o placebo da amostra não apresentou nenhum componente que possa interferir com o pico máximo do ácido mandélico. Portanto, o método pode ser aplicado à quantificação e identificação deste ácido nessas formulações.

d) Aplicação do método CLAE às amostras simulada (D) e comerciais (J e K) – Precisão

A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor do ácido mandélico nas amostras simulada (D) e comerciais (J e K).

O % RSD foi calculado para cada amostra simulada e comercial empregando-se 10 preparações independentes. A média do % RSD obtido para o ácido mandélico presente nas amostras foi de 0,51%, indicando uma

boa reprodutibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

A Figura 47 apresenta os cromatogramas das amostras manipuladas e comerciais, os quais podem ser confirmados com comparação com os padrões.

e) Teste de Recuperação – Exatidão

A Tabela 24 mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação nas amostras simulada (D) e comerciais (J e K). A média de percentuais de recuperação obtidos para o método CE foi de 101,06% para a amostra D, de 101,24% para a amostra J, e de 101,43% para a amostra K, apresentando assim pouca dispersão. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método. E um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados obtidos apresenta variação de $\pm 2,0\%$ do valor nominal (BRITTAIN, 1998; GARFIELD, 1991; SHABIR, 2003).

4- Comparação dos métodos CE e CLAE propostos em relação à precisão e exatidão

Os métodos propostos foram comparados usando análise estatística. O teste *t* de Student foi aplicado para avaliar se havia alguma diferença significativa entre a exatidão dos dois métodos. Os resultados experimentais obtidos na análise das amostras A, B, E, F e G pelos dois métodos, não apresentaram diferença significativa. O valor de *t* calculado foi menor do que o valor de *t* tabelado (considerado valor crítico) a um nível de significância de 5% (Tabela 26), .

Para verificar se havia diferença significativa na precisão dos dois métodos em estudo, foi aplicado o teste *F* de Snedecor. Pode-se observar na Tabela 27 que os valores de *F* obtidos para as amostras A, B, E, F e G foram menores do que o valor tabelado, indicando que não há diferença significativa na precisão dos dois métodos em estudo.

CONCLUSÕES

VII- CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foram realizados o presente trabalho e com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ◆ Os AHAs tartárico, glicólico e láctico podem ser separados e quantificados em curto espaço de tempo por eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em até 3 minutos para CE e 7 minutos para CLAE. O ácido mandélico pode ser determinado por CLAE em até 3 minutos.
- ◆ Os métodos propostos (CE e CLAE) para determinação dos AHAs em produtos cosméticos apresentaram boa linearidade, especificidade, precisão e exatidão quando aplicados em amostras manipuladas e comerciais.
- ◆ A linearidade dos métodos está dentro das especificações, sendo maior que 0,9999.
- ◆ Os excipientes presentes nas amostras manipuladas não interferiram com a determinação dos AHAs em ambos os métodos.
- ◆ O método CE apresentou média de desvio padrão relativo de 0,54% e intervalo de confiança entre $99,02 \pm 0,14$ e $100,93 \pm 0,33$ quando aplicado às amostras comerciais e manipuladas contendo ácidos glicólico, tartárico e láctico, obtendo-se % de recuperação de 99,17% a 99,72%.

- ♦ Para o método CLAE obteve-se média de desvio padrão relativo de 0,21%, e intervalo de confiança entre $99,33 \pm 0,25$ e $101,14 \pm 0,52$ quando aplicado às amostras comerciais e manipuladas contendo ácidos glicólico, tartárico e láctico, com % de recuperação de 98,18% a 101,90%.
- ♦ A análise das amostras comerciais e manipuladas, contendo ácido mandélico, pelo método cromatográfico apresentou média de desvio padrão relativo de 0,51% e intervalo de confiança de $99,37 \pm 0,14$, com % de recuperação de 99,75% a 101,79%.
- ♦ A comparação estatística entre os dois métodos propostos em relação à precisão e exatidão, quando aplicados a uma mesma amostra, demonstrou que não há diferença significativa entre eles.
- ♦ Para análise dos AHAs em estudo a CE é um método mais simples, mais econômico e mais rápido do que a CLAE.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALMA, J.M. Utilização de ácidos com finalidade cosmética. **Personalité**, São Paulo, v.3, n.14, p.12-14, 2000.

ALTRIA, K.D.; CHEN, A.B.; CLOHS, L. Capillary electrophoresis as a routine analytical tool in pharmaceutical analysis. **LC GC**, Duluth, v.19, n.9, p.2-7, 2003.

ALTRIA, K.D.; ELDER, D. Overview of the status and application of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1023, p.1-14, 2004.

ARELLANO, M.; ANDRIANARY, J.; DEDIEU, F.; COUDERC, F.; PUIG, P. Method development and validation for the simultaneous determination of organic acids by electrophoresis. **J. Chromatogra. A**, Amsterdam, v.765, p.321-328, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17^a ed., Gaithersburg: AOAC, 2002. V.1, p.xxi.

BAKER, D.R. **Capillary electrophoresis**. New York, John Wiley, 1995, 244p.

* De acordo com a NBR 6023/2002 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviatura dos títulos e periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 2000

- BARROS NETO, B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2ª ed., Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2003. p. 64-70.
- BAZZANELLA, A.; LOCHAMNN, H.; MAINKA, A.; BACHMANN, K. Determination of inorganic anions, carboxylic acids and amino acids in plant matrices by capillary zone electrophoresis. **Chromatographia**, New York, v.45, p.59-62, 1997.
- BECKERS, J.L., BOCEK, P. The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. **Electrophoresis**, Weinheim, v.24, p.518-535, 2003.
- BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v.12, n.3/4, p.45-50, 2000.
- BENY, M.G. Considerações sobre a pele seca. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v.15, n.3/4, p.42-46, 2003.
- BERARDESCA, E.; MAIBACH, H. AHA mechanisms of action. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.110, n.6., p. 30-31, 1995.
- BERNSTEIN, E.F., LEE, J.; BROWN, D.B.; YU, R.J., VAN SCOTT, E. Glycolic acid treatment increases type I collagen mRNA and hyaluronic acid content of human skin. **Dermatol. Surg.**, Malden, v.25, n.5, p.429-433, 2001.
- BOONE, C.M.; WATERNAL, J.C.M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W.J.M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs – a review. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.20, p.831-863, 1999.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Câmara Técnica de Cosméticos. Parecer Técnico nº 07/01 de 28/09/2001. Utilização de alfa-hidroxiácidos em produtos cosméticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_alfa.htm (Acesso em 08 de março de 2005).
- BRITTAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharm. Technol. ed. Port.**, Marina del Rey, jun., p.4-28, 1998.
- BRUCE, P. MINKKINEN, P., RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, Áustria, v.128, p.93-106, 1998.
- BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C. Carboxylic acids: prediction of retention data from chromatographic and electrophoretic behaviours. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.717, p.3-25, 1998.
- CAMILLERI, P. **Capillary electrophoresis: theory and practice**, 2ª ed., Boca Raton, New York, 1998, 552p.
- CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de método por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. EdUFScar, São Carlos, 2001, 77p.
- CASTRO, R.; MORENO, M.U.G.; NATERA, R.; GARCIA-ROWE, F.; HERNANDEZ, M.J.; BARROSO, C.G. Comparative analysis of the organic acid content of vinegar by capillary electrophoresis and ion-exclusion chromatography with conductimetric detection. **Chromatographia**, v.56, n.1-2, p.57-61, 2002.
- CHANG, M.L.; CHANG, C.M. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.33, n.4, p.617-626, 2003.

- CHEN, H.; XU, Y.; VAN LENTE, F.; IP, M.P.C. Indirect ultraviolet detection of biologically relevant organic acids by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.679, p. 49-59, 1996.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1995, p.183-238;
- COLOMBARA, R.; TAVARES, M.F.M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Quim. Nova**, v.20, n.5, p.512-518, 1997.
- COTELLESA, C.; PERIS, K.; CHIMENTI, S. Glycolic acid and its use in dermatology. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v.5, p.215-217, 1995.
- COUCH, L.H.; HOWARDAD, P.C. Quantification of glycolic acid in cosmetic products using reversed phase high performance liquid chromatography. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.24, p.89-95, 2002.
- DOBLE, P.; HADDAO, P.R. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.834, p.189-212, 1999.
- DOLAN, J.W. Retaining polar compounds. **LC GC**, Duluth, v.19, p.1132-1135, 2001.
- DOLAN, J.W. Mobile –phase buffers, Part II – buffer selection and capacity. **LC GC**, Duluth, v.20, p.1114-1118, 2002.
- DRAELLOS, Z.D. α -hydroxy acids, β -hydroxy acids and other topical agents. **Dermatol. Ther.**, Copenhagen, v.13, p.154-158, 2000.

- FALLER, T.; ENGELHARDT, H.; How to achieve higher repeatability and reproducibility in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.853, p.83-94, 1999.
- FARTASCH, M.; TEAL, J.; MEON, G.K. Mode of action of glycolic acid on human stratum corneum: ultrastructural and functional evaluation of the epidermal barrier. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v.289, p.404-409, 1997.
- FOX, C. Claims support literature review – Part IV, Skin physiology and properties. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.118, n.3, p.36-44, 2003.
- GARFIELD, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Arlington: Association official analytical chemists, 1991. 196p.
- GUEDES, M.L.S.; GUEDES, J.S. **Bioestatística para profissionais da saúde**. Rio de Janeiro: Ao livro técnico; Brasília: CNPq, 1998, p.78-165.
- GREIVE, K. Cosmetic and life sciences: A continuing courtship. **Int. Fed. Soc. Cosmet. Chem.**, v.5, n.4, p.303-305, 2002.
- HAJÓS, P.; NAGY, L. Retention behaviours and separation of carboxylic acids by ion- exchange chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.717, p.27-38, 1998.
- HARDING, C.R.; WATKINSON, A.; RAWLINGS, A.V. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.22, p.21-52, 2000.
- HARRIS, M.I.N.C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. São Paulo: Ed. Senac, 2003, 161p.
- HERMITE, R. Aged skin, retinoids, and alpha hydroxy acids. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.107, n.7, p.63-67, 1992.

- HEYMANN, L.A. The Cosmetic / Drug Dilema. FDA regulation of alpha-hydroxy acids. **Food and Drug Law Journal**, v.52, p.357-375, 1997.
- HEYRMAN, A.N.; HENRY, R.A. Importance of controlling mobile phase pH in reversed phase hplc. **Technical Bulletin – Keystone**. http://www.hplcsupply.com/pdf/App_9.pdf (Acesso em 08 de março de 2005).
- HIROKAWA, T.; NISHINO, M.; AOKI, N.; KISO, Y.; SAWAMOTO, Y.; YAGI, T.; AKIYAMA, J. Table of isotacophoretic indices. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.271, D1-D106, 1983.
- HONG, J.T.; KIM, E.J.; AHN, K.S.; JUNG, K.M.; YUN, Y.P.; PARK, Y.K.; LEE, S.H. Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet-induced skin tumorigenesis in SKH-1 hairless mice and its mechanism of action. **Mol. Carc.**, v.31, p. 152-160, 2001.
- HOWARD, P.C.; SAMS, R.L.; DENNIS, D.A.; WAMER, W.G. Alpha-hydroxy acids: consideration of the biological effects and possible role in photocarcinogenesis. **J. Food Drug Anal.** v.10, n.4, p.258-261, 2002.
- HUANG, W.S.; LIN, C.C.; HUAN, M.C.; WEN, K.C. Determination of α -hydroxyacids in cosmetics. **J. Food Drug Anal.**, v.10, n.2, p.95-100, 2002.
- ICH – INTERNATIONAL Conference on Harmonization, Topic Q2a. Text on validation of analytical procedures: definitions and terminology, US FDA Federal Register, v.60, 1995, (CPMP/ICH/381/95). Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf> (Acesso em: 08 de março de 2005).
- ICH – INTERNATIONAL Conference on Harmonization, Topic Q2b. Validation of analytical procedures: methodology, US FDA Federal Register, v.62,

- 1997, (CPMP/ICH/381/95). Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/1320fnl.pdf>, (Acesso em: 08 de março de 2005).
- ISSAQ, H.J. A decade of capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v.21, p.1921-1939, 2000.
- ISSAQ, H.J. Thirty-five years of capillary electrophoresis: advances and perspectives. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, New York, v.25, p.1153-1170, 2002.
- JORGENSEN, J.W.; LUKACS, K.D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. **Anal. Chem.**, Washington DC, v.53, p.1298-1302, 1981.
- JORGENSEN, J.W.; LUKACS, K.D. Capillary zone electrophoresis. **Science**, Washington DC, v.222, p.266, 1983.
- JENTZSCH, A.; STREICHER, H.; ANDRÉ, V. Defending against photoaging: a new perspective for retinol. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.117, n.10, p.55-60, 2002.
- KACOWICZ, J. Os ácidos em ação. **Personalité**, São Paulo, v.3, n.10, p.1-3, 2000.
- KARNES, T.; MARCH, C. Precision, accuracy and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis. **Pharm. Res.**, New York, v.10, p.1421-1426, 1993.
- KIRIDENA, W.; POOLE, C.F.; KOZIOL, W.W. Reversed-phase chromatography on a endcapped octadecylsiloxane-bonded stationary phase with water as the mobile phase. **Chromatographia**, New York, v.57, n.11/12, p.703-707, 2003.

- KLAMPFL, C.W.; KATZMAYR, M.U. Determination of low-molecular-mass anionic compounds in beverage samples using capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect ultraviolet and conductivity detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.822, p.117-123, 1998.
- KLIGMAN, A.M. Por quê cosmecêuticos? **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v.6, n.5/6, p.18-20, 1994.
- KLIGMAN, A.M. Cosmeceuticals. The third category. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.113, n.2, p.33-40, 1998.
- KUHR, W.G. Separation of small organic molecules. p.91-133. In: **Capillary electrophoresis: theory and practice**, 2^aed., Boca Raton, New York, 552p., 1998.
- KUNKEL, A.; DEGENHARDT, M.; SCHIRM, B.; WATZIG, H. Performance of instruments and aspects of methodology and validation in quantitative capillary electrophoresis – an update. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.768, p.17-27, 1997.
- LAFFON, B.; LEMA, M.; MÉNDEZ, J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglycolic acids as indirect evaluation of styrene exposure. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.753, p.385-393, 2001.
- LEE, K.R.; McALLISTER, P.R. Helping analytical scientists apply statistics. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.22, p.891-908, 1996.
- MAGALHÃES, J. **Cosmetologia**, Rio de Janeiro: Rubio, 2000, p.61-133.
- MAJORS, R.E.; PRZYBYCIEL, M. Columns for reversed-phase LC separations in highly aqueous mobile phases. **LC GC**, Duluth, v.20, n.7, p.584-593, 2002.

- MALLET, S.; ARELLANO, M.; BOULET, J.C.; COUDERC, F. Determination of tartaric acid in solid wine residues by capillary electrophoresis and indirect UV detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.853, p.181-184, 1999.
- MAYER, B.X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.907, p.21-37, 2001.
- McCULLOUGH, J.L.; SHULL, T. Reducing wrinkles and others signs of aging. **Dermatol. Nurs.**, Pitman, v.12, p.385-390, 2000.
- MERCK Index. 12^aed., Whitehouse Station, 1996. p. 766, 911, 976, 1404, 1552.
- MILLER, J.C., MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**, 2^a ed., Chichester: Ellis Horwood, 1988, p.53-62, 216-223.
- MILLIKAN, L.E. Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: definitions and regulations. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.371-374, 2001.
- MORALES, M.L., GONZALEZ, A.G.; TRONCOSO, A.M. Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.822, p.45-51, 1998.
- NAGAE, N.; ENAMI, T.; DOSHI, S. The retention behavior of reversed-phase HPLC columns with 100% aqueous mobile phase. **LC GC**, Duluth, v.20, n.10, p.964-972, 2002.
- NEUE, U.D.; PHOEBE, C.H.; TRAN, K.; CHENG, Y.F.; LU, Z. Dependence of reversed-phase retention of ionizable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.945, p.49-67, 2001.
- NICOLLETI, I.; CORRADINI, C.; COGLIANDRO, E.; CAUAZZA, A. Determination of alpha-hydroxy acids in cosmetic products by high-

- performance liquid chromatography with a narrow bore column. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.21, p.275-284, 1998.
- NUNES J. Avaliação de segurança em produtos cosméticos e dermatológicos. **Rev. Rac.**, São Paulo, v.58, out., p.22-26, 2000.
- ORTA, D.; MUDGERR, P.D.; DING, L.; DRYBREAD, M.; SCHULTZ, J.R.; SAVER, R.L. Analysis of water from the space shuttle and mir space station by ion chromatography and capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.804, p.295-304, 1998.
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele**. 1ª ed., São Paulo: Andrei, 1998, 507p.
- PHENOMENEX COLUMN CATALOG 2002-2003, Torrance, CA, USA, p.251-255.
- POUCHERT, C.J. **The aldrich library of infrared spectra**. 2ª ed., USA, 1978, p.273; 276; 814.
- PRICE, S.N.C. FDA brings AHA safety, drug-claim concerns to CIR. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.111, n.5, p.9-10, 1996.
- RANGEL, V.L.B.I.; BOSCHETTI, V.C.; VEMA, M.K. Determinação do prazo de validade do ácido glicólico incorporado em uma emulsão não iônica. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, Ed. Brasileira, v.6, n.3, p.140-145.
- RAWLINGS A. V.; HARDING, C.R. Moisturization and skin barrier function. **Dermatol. Ther.**, Copenhagen, v.17, p.43-48, 2004.
- RAWLINGS, A. V. Advances in stratum corneum biology and understanding of dry skin. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.118, n.8, p.36-44, 2003.

- RIBANI, M.; BOTTOLI, G.B.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, São Paulo, v.27, p.771-780, 2004.
- RIEKKOLA, M.L.; JONSSON, J.A. Terminology for analytical capillary electromigration techniques. **IUPAC Recommendations 2001**. Disponível em: http://www.iupac.org/reports/provisional/abstract01/riekkola_prs.pdf. Acesso em 08 de março de 2005.
- ROBERT, L. Extracellular matrix and aging: a review of mechanisms and interventions. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.116, jan., p. 61-70, 2001.
- RUBIN, M.G. Importância do pH na determinação da segurança e eficácia dos AHAs. **Cosmiatr. Med. Estét.**, São Paulo, v.4,n.4, p.26-30, 1996.
- SAAVEDRA, L.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.881, p.395-401, 2000.
- SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Eletroforese Capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, São Paulo, v.36, n.1, p. 97-110, 2000.
- SARGISSON, S. The AHA phenomenon continues. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.156, n.3, p.34-40, 1995.
- SCALIA, S.; CALLEGARI, R.; VILLANI, S. Determination of glycolic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.795, p.219-225, 1998.

- SCHELLINGER, A.P.; CARR, P.W. Solubility of buffer in aqueous-organic eluents for reversed-phase liquid chromatography. **LCGC**, Duluth, v.22, n.6, p.545-548, 2004.
- SCHOENMAKERS, P.J.; MOLLE, S.; HAYES, C.M.G.; UUNK, L.G.M. Effects of pH in reversed-phase liquid chromatography. **Anal. Chem. Act.**, Amsterdam, v.250, p.1-19, 1991.
- SCOTTI, L.; VELASCO, M.V.R. Envelhecimento Cutâneo à luz da cosmetologia: estudo do envelhecimento cutâneo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção. São Paulo, Ed.: Tecnopress, 2003. 115p.
- SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference on harmonization. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.987, n.1-2, p.57-66, 2003.
- SHARMAN, D. C. Determination of lactic acid and poly (lactic acid)s in a dermatological formulation by capillary electrophoresis. **Analyst**, Cambridge, v.122, n.6, p.709-713, 1997.
- SHUI, G.; LEONG, L.P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.977, p.89-96, 2002.
- SKOOG, D.A. **Fundamentals of analytical chemistry**, 6.ed. Fort Worth: Saunders College, 1992, p.300-306, 329-344, 674-683, 725-750.
- SMITH, W.P. Hydroxy acids and skin aging. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.109, n.9, p.41-48, 1994.

- SMITH, W.P. Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v.35, n.3, part 1, p.338-391, 1996.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.e. New York, John Wiley, 1997, 765p.
- SOARES, L.M.V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.60, n.1, p.79-84, 2001.
- SOYER, Y.; KOCA, N.; KARADENIZ, F. Organic acid profile of turkish white grapes and grape juices. **J. Food Compos. Anal.**, San Diego, v.16, p.629-636, 2003.
- SPERLINGOVÁ, I.; DABROWSKÁ, L.; STRÁNSKÝ, V.; TICHÝ, M. A rapid HPLC method for the determination of carboxylic acids in human urine using a monolithic column. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.378, p. 536-543, 2004.
- STEINER, D.A. A cosmecêutica e a dermatologia. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v.7, n.11/12, p.28-29, 1995.
- STILLER, M.J.; BARTOLONE, J.; STERN, R.; SMITH, S.; KOLLIAS, N.; GLILLIES, R.; DRAKE, L.A. Topical 8% glycolic acid and 8% L-lactic acid creams for the treatment of photodamaged skin. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.132, n.6, p.631-636, 1996.
- SWINNEY, K.; BORNHOP, D.J. Detection in electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v.21, p.1239-1250, 2000.
- TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

- TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v.20, n.4, p.493-511, 1997.
- TAYLOR, M.B. Summary of mandelic acid for the improvement of skin conditions. **Cosmet. Dermatol.**, p.26-28, 1999.
- TSAI, T.F. Sun Damage from glycolic acid use. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.116, n.4, p.26-28, 2000.
- UNITED States pharmacopeia, 26^a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003.
- VAN HEES, P.A.W.; DAHL+EN, J.; LUNDSTRÖM, U.S.; BORÉN, H.; ALLARD, B. Determinatin of low molecular weight organic acids in soil solution by HPLC. **Talanta**, Londres, v.48, p.173-179, 1999.
- VAN SCOTT, E.J.; DITRE, C.M.; YU, R.J. Alpha- hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. **Clin. Dermatol.**, New York, v.14, p.217-226, 1996.
- VAN SCOTT, E.J.; YU, R.J. Control of keratinization with alfa-hydroxy acids and related compounds. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.110, p.586-590, 1974.
- VILLIERS, M.M.; WURSTER, D.E.; BERGH, T.; NARSAI, K. Stability indicating HPLC assay of the alph-hydroxy-acids lactic acid and glycolic acid in non-ionic creams. **Pharmazie**, v.55, n.3, p.204-205, 1998.
- VORARAT, S.; AROMDEE, C.; PODOKMAI, Y. Determination of alpha-hydroxy acids in fruits by capillary electrophoresis. **Anal. Sci.**, Tokyo, v.18, p.893-896, 2002.
- WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Cosmetologia de Harry**. Madri: Diaz de Santos, 1990, p.249-288, 747-779, 807-837.

- WULF, H.C., SANDBY-MOLLER, J., KOBAYASI, T., GNIADECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, Oxford, v.35, p.185-191, 2004.
- WU, C.H.; LO, Y.S.; LEE, Y.-H.; LIN, T. –I. Capillary electrophoretic determination of organic acids with indirect detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.716, p.291-301, 1995.
- XIONG, X.; LI, S.F.Y. Selection and optimization of background electrolytes for simultaneous detection of small cations and organic acids by capillary electrophoresis with indirect photometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.822, p.125-136, 1998.
- YATES, R.L., HAVERY, D.C. Determination of phenol, resorcinol, salicylic acid and alpha-hydroxy acids in cosmetic products and salon preparations. **J. Cosmet. Sci.**, New York, v.50, p.315-325, 1999.
- <http://www.t2.technion.ac.il/~smhz/htmlfiles/background.htm> (Acesso em 14 de maio de 2004).

ANEXO

TRABALHOS PUBLICADOS, ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO E APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1- Trabalhos publicados em periódicos

- ♦ E. A. DUTRA, D. A. G. COSTA e SILVA, E. R. M. KEDOR-HACKMANN, M. I. R. M. SANTORO. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v.40, n.3, p.381-385, 2004.
- ♦ D. A. G. COSTA e SILVA, E. A. DUTRA, E. R. M. KEDOR-HACKMANN, M. I. R. M. SANTORO. Protetores solares, radiações e pele. *Cosmetic Toiletries*, São Paulo, v.16, n.3-4, p.68-72, 2004;
- ♦ E. A. DUTRA, E. R. M. KEDOR-HACKMANN, M. I. R. M. SANTORO Validation of a high performance liquid chromatography method for sunscreen determination in cosmetic. *International Journal of Cosmetic Science*, v.24, p.97-102, 2002.
- ♦ E. A. DUTRA, E. R. M. KEDOR-HACKMANN. Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) de preparações cosméticas contendo filtros solares químicos benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila em associação utilizando a espectrofotometria no ultravioleta. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v.82, p.37-39, 2001.

2- Trabalhos enviados para publicação

- ♦ E. A. DUTRA, M. I. R. M. SANTORO, G. A. MICKE, M. F. M. TAVARES, E. R. M. KEDOR-HACKMANN. Validation of a capillary electrophoresis method for the determination of alpha-hydroxy acids in cosmetic products. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005

4- Resumos publicados em Anais de Congressos Científicos

- ♦ **118th AOAC International Annual Meeting & Exposition.** Trabalho apresentado: Validation of a capillary electrophoresis method for determination of α -hydroxy acids in cosmetic products. St. Louis, USA, período 18-22 de setembro de 2004.
- ♦ **17º Congresso Brasileiro de Cosmetologia.** Trabalho apresentado: Avaliação do fator de proteção solar (FPS) de preparações cosméticas por espectrofotometria no ultravioleta. São Paulo, período 13-15 de maio de 2003.