



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da formulação dermocosmética na permeação de substâncias
ativas para o controle de hiperpigmentações cutâneas**

Rodolfo Scarpino Barboza Franco

**Ribeirão Preto
2020**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da formulação dermocosmética na permeação de substâncias ativas
para o controle de hiperpigmentações cutâneas**

Rodolfo Scarpino Barboza Franco

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Rodolfo Scarpino Barboza Franco

**Influência da formulação dermocosmética na permeação de substâncias ativas
para o controle de hiperpigmentações cutâneas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maria
Berardo Gonçalves Maia Campos

Ribeirão Preto

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Scarpino Barboza Franco, Rodolfo

Influência da formulação dermocosmética na permeação de ativos para o controle de hiperpigmentações cutâneas. Ribeirão Preto, 2020.

119 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

1. Clareadores. 2.Dermocosméticos. 3.Permeação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Rodolfo Scarpino Barboza Franco

Título: Influência da formulação dermocosmética na permeação de ativos para o controle de hiperpigmentações cutâneas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que são os meus heróis e exemplos de vida, por todo o amor, apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos pela oportunidade, confiança e aprendizados.

A todos do NEATEC que apoiaram e colaboraram com o meu trabalho.

Aos meus amigos (Camila, Mariana, Gabriel, Leonardo, Fabio, Vitor, Martin e Marina) por todo apoio.

Aos meus pais Wilson e Fabiana por sempre me apoiarem em tudo nesta passagem.

À minha parceira e amiga Letícia por todo apoio e por sempre acreditar no meu desenvolvimento.

À minha irmã Camila pelo apoio.

Ao meu amigo e querido Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal pela confiança, aprendizados e disponibilizar o uso do laboratório para a realização dos experimentos de permeação e quantificação por CLAE - EM/EM

À Prof^a. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro pela parceria no estudo de citotoxicidade e fototoxicidade.

À Prof^a. Maria José Vieira Fonseca pela confiança e oportunidade de disponibilizar o uso do laboratório para a realização dos estudos de permeação cutânea.

À empresa Galena que gentilmente forneceu matérias-primas utilizadas neste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – docentes, discentes e servidores, pela oportunidade e apoio para este trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa no laboratório e pela bolsa de mestrado concedida.

E à CAPES pela bolsa inicialmente concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A educação é um elemento importante na luta pelos direitos humanos. É o meio de ajudar nossos filhos e nosso povo redescobrir sua identidade e, assim, aumentar seu respeito próprio. A educação é o nosso passaporte para o futuro, pois o amanhã pertence apenas ao povo que se prepara para isso hoje”.

Malcolm X (June 28,1964)

RESUMO

Scarpino Barboza Franco, R. **Influência da formulação dermocosmética na permeação de ativos para o controle de hiperpigmentações cutâneas**. 2020. 119 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

No mercado cosmético há várias formulações disponíveis com propriedades clareadoras, porém, ainda é pouco estudado a influência da formulação dermocosmética na permeação e eficácia de substâncias ativas clareadoras. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar a influência da composição de diferentes formulações como creme, gel creme e emulsão transdérmica na permeação de substâncias ativas clareadoras. Para tal, foram desenvolvidas formulações de creme, gel creme e emulsão transdérmica, acrescidas ou não das substâncias ativas tetraisoplamitato de ascorbilo (TIPA) e hidroxitiroso, as quais foram submetidas à determinação do comportamento reológico e perfil de textura. A seguir, foi realizado um estudo de permeação com as formulações acrescidas de TIPA utilizando o modelo de células de difusão de Franz modificada. A extração da substância ativa foi feita na epiderme viável + derme e a determinação quantitativa por meio de cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM). Os resultados obtidos mostraram que as formulações apresentaram comportamento reológico não newtoniano do tipo pseudoplástico, e em relação as propriedades de textura e sensoriais a emulsão transdérmica apresentou os melhores resultados quando comparada às demais formulações estudadas. A emulsão transdérmica permitiu uma maior retenção da substância ativa TIPA no estrato córneo e epiderme viável + derme quando comparada com as formulações creme e gel creme. Em conclusão, a emulsão transdérmica pode ser sugerida como um bom carreador para a substância ativa TIPA, pois promoveu uma maior permeação comparada às outras formulações objeto de estudo. Além disso, mostrou perfil de textura compatível às finalidades propostas.

Palavras-chave: Clareadores, Dermocosméticos, Permeação, derivado lipossolúvel de vitamina C, propriedades físico-mecânicas

ABSTRACT

Scarpino Barboza Franco, Rodolfo. **Influence of the dermocosmetic formulation on the permeation of whitening substances for the treatment of hyperchromias.** 2020. 119 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

In the cosmetic market there are several formulations available with whitening properties, however, the influence of the dermocosmetic formulation on the permeation and efficacy of whitening substances is still poorly studied. In this context, the aim of the present study was to develop and evaluate the influence of the composition of different formulations such as cream, cream gel and transdermal emulsion on the permeation of whitening substances. For that, formulations of cream, cream gel and transdermal emulsion were developed, with or without the active substances ascorbyl tetraisoplamate (TIPA) and hydroxytyrosol, which were subjected to the determination of the rheological behavior and texture profile. Next, a permeation study was carried out with the formulations added with TIPA using the modified Franz diffusion cell model. The extraction of the active substance was done in the viable epidermis + dermis and the quantitative determination by means of high performance liquid chromatography associated with mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The results obtained showed that the formulations showed non-Newtonian rheological behavior of the pseudoplastic type, and in relation to the texture and sensory properties, the transdermal emulsion presented the best results when compared to the other studied formulations. The transdermal emulsion allowed greater retention of the active substance TIPA in the stratum corneum and viable epidermis + dermis when compared to the cream and gel cream formulations. In conclusion, the transdermal emulsion can be suggested as a good carrier for the active substance TIPA, as it promoted greater permeation compared to the other formulations studied. In addition, it showed a texture profile compatible with the proposed purposes.

Keywords: Whitening substances, Dermocosmetics, Permeation, vitamin C liposoluble derivative, physical-mechanical properties

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das camadas da pele.	5
Figura 2. Rota biossintética da produção dos pigmentos de eumelanina e feomelanina	9
Figura 3. Estrutura química do derivado lipossolúvel de vitamina C – tetraisopalmitato de ascorbila (TIPA).....	10
Figura 4. Estrutura química do hidroxitirosol nos extratos aquoso e seco de oliva. .	11
Figura 5. Comportamento de fluidos não newtonianos	14
Figura 6. Representação esquemática da análise do perfil de textura – back extrusion.	16
Figura 7. Representação esquemática do gráfico obtido pelo software Texture Exponent 3.0.5.0 na análise de textura.	16
Figura 8. Representação esquemática da análise de espalhabilidade – <i>back extrusion</i>	17
Figura 9. Representação prática da análise de espalhabilidade da formulação emulsão transdérmica (T1) – <i>back extrusion</i>	18
Figura 10. Representação esquemática do gráfico obtido pelo software Texture Exponent 3.0.5.0 na análise de espalhabilidade.	18
Figura 11. Fluxograma das formulações desenvolvidas.....	23
Figura 12. Fluxograma do estudo permeação e penetração <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> do TIPA nas formulações C3, CG3 e T3	29
Figura 13. Amostra de pele humana obtida por abdominoplastia. À esquerda pele composta por todas as camadas, ao centro processo de limpeza manual, e à direita pele previamente limpa para armazenamento em freezer – 80°C.	30
Figura 14. Representação ilustrativa da aplicação das formulações objeto do estudo para o <i>tape-stripping test</i>	31
Figura 15. Representação do <i>tape-stripping test</i>	32
Figura 16. Propriedades sensoriais (a) Frequência dos resultados obtidos durante a aplicação das formulações C1, C2, C3, C4, C5 e C6, (b) a frequência dos resultados após cinco minutos da aplicação <i>Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6)</i>	39

Figura 17. Propriedades sensoriais (a) Frequência dos resultados obtidos durante a aplicação das formulações GC1, GC2, GC3, GC4, GC5 e GC6, (b) frequência dos resultados referentes após cinco minutos da aplicação das mesmas. .
Legenda: Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6);40

Figura 18. Propriedades sensoriais (a) frequência dos resultados obtidos durante a aplicação das formulações T1, T2, T3, T4, T5 e T6, e em (b) a frequência dos resultados referentes após cinco minutos da aplicação das mesmas. *Legenda:* Veículo transdérmico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).....41

Figura 19. Taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das formulações desenvolvidas na formulação creme (a), gel creme (b) e transdérmica (c) 24 horas após o preparo e armazenadas a temperatura ambiente (valores plotados correspondentes a média sendo n=3). *Legenda:* Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdérmico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).....44

Figura 20. Área de histerese das formulações desenvolvidas. Não foi observado diferença significativa entre elas. (Kruskal Wallis; $P < 0,05$); n=3. *Legenda:* Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdérmico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).45

Figura 21. (a) Índice de fluxo das formulações em relação a concentração das substâncias ativas. Diferença significativa entre as formulações creme e transdérmica. (b) Índice de consistência das formulações em relação a concentração das substâncias ativas. Diferença significativa entre a formulação gel creme e formulação

(c) viscosidade mínima aparente das formulações em relação a concentração de substâncias ativas. Diferença significativa entre a formulação creme e a formulação gel creme (Kruskal Wallis; $P < 0,05$) $n=3$46

Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdérmico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).....46

Figura 22. (a) Parâmetro firmeza das formulações em relação a concentração das substâncias ativas. Diferença significativa entre as formulações creme e transdérmica.

(b) Parâmetro consistência das formulações em relação a concentração das substâncias ativas (c) Parâmetro coesividade das formulações em relação a

concentração de substâncias ativas. (d) índice de viscosidade das formulações em relação a concentração de substâncias ativas. (e) Trabalho de cisalhamento das

formulações em relação a concentração de substâncias ativas. Diferença significativa entre a formulação creme e a formulação gel creme (Kruskal Wallis; $P < 0,05$) $n=3$. .

Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdérmico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).....51

Figura 23. *Loading plot* da PC1 X PC2 das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6 em relação aos parâmetros de textura e reologia.....55

Figura 24. Score plot PC1 X PC2 das amostras das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6.....56

Figura 25. *Loading plot* da PC1 X PC3 das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6 em relação aos parâmetros de textura e reologia.....57

Figura 26. Score plot PC1 X PC3 das amostras das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6.....	59
Figura 27. Curva dose-resposta do controle NOR quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV	61
Figura 28. Curva dose-resposta da substância ativa HC quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV	61
Figura 29. Curva dose-resposta da substância ativa HN quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV.	62
Figura 30. Curva dose-resposta da substância ativa TIPA quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV.	62
Figura 31. Cromatogramas representando a seletividade do método analítico desenvolvido para a identificação do analito tetraisopalmitato de ascorbila. O cromatograma superior sinaliza a análise da amostra sem a presença do analito e o seguinte o analito presente na matriz. Tempo de retenção do analito 7,94 minutos.	63
Figura 32. Espectro de massas do analito tetraisopalmitato de ascorbila, representando M/Z 1130 > 891 e 636, para as moléculas filho de identificação e quantificação, respectivamente.	64
Figura 33. Curva analítica plotado para avaliação da linearidade, sendo Y = resposta e X = concentração	65
Figura 34. Gráficos de distribuição de resíduos.	66
Figura 35. Quantificação da TIPA no estrato córneo – <i>tape-stripping</i> resultante da aplicação das formulações C3 e T3. (n≥4).....	70
Figura 36. Quantificação da TIPA na epiderme viável + derme resultante da aplicação das formulações C3 e T3. (n≥4).....	71
Figura 37. Quantificação da TIPA no estrato córneo – <i>in vivo tape-stripping</i> resultante da aplicação das formulações C3, GC3 e T3. (n=13). ** Significante em relação a GC3 ***Significante em relação a GC3.....	71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição lipídica média da epiderme humana durante o processo de diferenciação e cornificação.5
- Tabela 2.** Gradiente utilizado na metodologia de determinação de TIPA. Legenda: Solução A: Ac. Fórmico 0,5% e Solução B: 0,5% de ácido fórmico em metanol.333
- Tabela 3.** Parâmetros avaliados nos testes de textura e espalhabilidade das formulações creme após 24 horas do repara das formulações (n=3). 49**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 4.** Parâmetros avaliados nos testes de textura e espalhabilidade das formulações gel creme após 24 horas do repara das formulações (n=3).....50
- Tabela 5.** Parâmetros avaliados nos testes de textura e espalhabilidade das formulações do transdérmica após 24 horas do repara das formulações (n=3).50**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 6.** Resultados de precisão intradia da TIPA. .. **Erro! Indicador não definido.**6
- Tabela 7.** Resultados de precisão interdia da TIPA. .. **Erro! Indicador não definido.**7
- Tabela 8.** Resultados do teste de exatidão para quantificação de TIPA. **Erro! Indicador não definido.**7
- Tabela 9.** Resultados obtidos na eficiência de extração. **Erro! Indicador não definido.**8
- Tabela 10.** Quantificação da TIPA na epiderme viável + derme resultante da aplicação das formulações C3, GC3 e T3. (n=5)..... **Erro! Indicador não definido.**8
- Tabela 11.** Quantificação da TIPA no estrato córneo – tape-stripping resultante da aplicação das formulações C3, GC3 e T3. (n=5). **Erro! Indicador não definido.**8

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHI	Di-hidroxi-indol
DHICA	Ácido di-hidroxi-indol carboxílico
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>Electrospray</i>
HC	Extrato hidroglicólico padronizado em 20% de hidroxitirosol
HN	Extrato seco padronizado em 3% de hidroxitirosol
CLAE - EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a espectrometria de massas / espectrometria de massas
MPE	<i>Mean photo effect</i> (Fotofeito médio)
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
NMF	<i>Natural moisturizer fator</i> (Fator natural de hidratação)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
pH	Potencial hidrogeniônico
PIF	<i>Photo irritation fator</i> (Fator de fotoirritação)
rpm	Rotações por minuto
SVD	<i>Singular value decomposition</i> (Decomposição do valor singular)
TEWL	<i>Transepidermal water loss</i> (Perda transepidérmica de água)
TIPA	Tetraisopalmitato de ascorbila
TRP-2	Dopacromo tautomerase
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Contextualização.....	2
1.2 Morfologia e fisiologia da pele.....	4
1.3 Melanogênese e despigmentantes.....	7
1.4 Permeação e penetração cutânea.....	11
1.5 Propriedades reológicas e de textura.....	12
1.5.1 Propriedades reológicas.....	12
1.5.2. Propriedades de textura.....	15
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Desenvolvimento das formulações.....	22
3.2 Avaliação sensorial.....	24
3.3 Avaliação da estabilidade das formulações.....	24
3.3.1 Centrifugação, pH e Caracterização organoléptica	24
3.4 Determinação do comportamento reológico e estabilidade das formulações	25
3.5 Determinação do perfil de textura das formulações	26
3.6 Avaliação do potencial de citotoxicidade e fototoxicidade das substâncias ativas	26
3.7 Análise estatística	27
3.7.1 Comparação múltipla dos resultados	27
3.7.2 Análise dos componentes principais (PCA)	27
3.8 Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da permeação e penetração do derivado lipossolúvel da vitamina C – tetraisopalmitato de ascorbilo – TIPA.....	28
3.8.1 Estudo <i>in vitro</i> de permeação e penetração	29
3.8.2 Estudo <i>in vivo</i> de permeação - <i>Tape-stripping test</i>	31
3.8.3 Extração das substâncias ativas da epiderme viável e derme.....	32
3.8.4 Método analítico para a quantificação da TIPA.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Desenvolvimento das formulações.....	36

4.2 Avaliação da estabilidade das formulações	36
4.2.1 Centrifugação, pH e caracterização organoléptica	36
4.3 Propriedades sensoriais.....	37
4.4 Determinação do comportamento reológico e estabilidade das formulações	42
4.5 Determinação do comportamento de textura.....	48
4.6 Análise PCA entre as propriedades de textura e reologia	54
4.7 Avaliação do potencial de citotoxicidade e fototoxicidade das substâncias ativas	60
4.8 Validação metodologia analítica	63
4.8.1 Seletividade.....	63
4.8.2 Linearidade.....	64
4.8.3 Precisão.....	66
4.8.4 Exatidão.....	67
4.8.5 Eficiência do processo de extração.....	67
4.9 Estudo de permeação e penetração de TIPA.....	68
4.9.1 Estudo <i>In vitro</i> – Modelo pele de orelha de porco.....	68
4.9.2 Estudo <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> – Modelo pele humana.....	69
5. CONCLUSÕES	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICE A. Certificado de análise das substâncias ativas objeto de estudo e emulsão transdérmica	84
APÊNDICE B. Composição (%) das formulações	92
APÊNDICE C. Ficha de avaliação sensorial	94
APÊNDICE D. Reograma das formulações creme entre os tempos t = 0 e t = 28 dias, nas temperaturas T = amb, T = 37° C e T = 45° C. Sendo a formulação C1 = Veículo, C2 = formulação com 3 % de TIPA, C3 = formulação com 10% de TIPA, C4 = formulação com 0,5% de HC, C5 = formulação com 1,0% de HC e C6 = formulação com 1,0% de HN.	97
APÊNDICE E. Reograma das formulações gel creme entre os tempos t = 0 e t = 28 dias, nas temperaturas T = amb, T = 37° C e T = 45° C. Sendo a formulação GC1 = Veículo, GC2 = formulação com 3 % de TIPA, GC3 = formulação com 10% de TIPA, GC4 = formulação com 0,5% de HC, GC5 = formulação com 1,0% de HC e GC6 = formulação com 1,0% de HN.....	98
APÊNDICE F. Reograma das formulações transdérmica entre os tempos t = 0 e t = 28 dias, nas temperaturas T = amb, T = 37° C e T = 45° C. Sendo a formulação T1 = Veículo, T2 = formulação com 3 % de TIPA, T3 = formulação com 10% de TIPA, T4 =	

formulação com 0,5% de HC, T5 = formulação com 1,0% de HC e T6 = formulação com 1,0% de HN.99

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

Há poucos estudos relatados na literatura que descrevem como o veículo utilizado em formulações dermocosméticas influencia na permeação de substâncias ativas clareadoras e, conseqüentemente, na eficácia e segurança do tratamento de hiperpigmentações cutâneas.

Além do mecanismo de ação das substâncias ativas clareadoras prescritas nos tratamentos para hiperpigmentação cutânea, a formulação desempenha papel fundamental na eficácia dessas, pois sua liberação nas camadas epidérmicas é promovida por formulações com aplicação dermocosmética como as emulsões - cremes, géis cremes e transdérmicos, ou a partir de polímeros para a formação de géis (MAIA CAMPOS et al., 2014). O desenvolvimento dessas formulações busca melhorar a liberação da substância ativa no alvo desejado, mas este é um processo complexo que depende de diversos fatores físico-químicos e fisiológicos (ATTWOOD et al., 2003; PETRILLI et al., 2016; MARTO et al., 2016).

Neste contexto, estudos de permeação cutânea são de grande relevância, uma vez que as formulações necessitam liberar a substância ativa com propriedades clareadoras nas camadas mais profundas da epiderme, pois é na camada basal, entre os queratinócitos, que estão localizados os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina (GRANDAHN et al., 2018; PRAÇA et al., 2018).

O processo de penetração do veículo com a substância ativa é dependente das propriedades físico químicas das substâncias ativas, e, também, da própria composição formulação veículo.

Além disso, como citado anteriormente, as características da pele são importantes no processo de permeação cutânea. Fatores como: espessura e integridade da epiderme, composição de macromoléculas (alta concentração de lipídeos no estrato córneo), região da aplicação, idade, fluxo sanguíneo e pH da pele interferem na liberação das substâncias ativas carregadas pelos diferentes tipos de formulações. Podemos destacar também a influência da hidratação da pele, pois, uma pele mais hidratada promove tumefação das estruturas compactas da camada cornificada da epiderme diminuindo a resistência da mesma e aumentando a

penetração de algumas substâncias ativas (ATTWOOD et. al., 2003; LANE, 2013; LOPES et al., 2015; LEMOS et al., 2018). Além da influência da composição do veículo na permeação e eficácia de formulações clareadoras, elas também são dependentes de outras características como as propriedades físico-químicas e físico-mecânicas, refletindo no comportamento reológico e nas propriedades de textura de formulações cosméticas, respectivamente (CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017; RISALITI et al., 2018).

Estudos de penetração cutânea de formulações dermocosméticas são de fundamental importância, pois a penetração cutânea pode influenciar na eficácia dos produtos dermocosméticos, como os clareadores, que contém, dentre outros, antioxidantes, os quais atuam principalmente na camada basal da epiderme (TSAI et al., 2010; LU et al., 2019).

Estudos preliminares em pele de orelha de porco por meio da técnica de célula de Franz são utilizados para avaliar a penetração de diferentes tipos de substâncias ativas, porém a pele humana apresenta características fisiológicas diferentes que influenciam na penetração destas formulações (CHOE, et al., 2015; RANAMUKHAARACHCHI, et al., 2016; SILVA MEIRA, et al., 2020).

No Brasil, o uso de pele humana para avaliar a penetração de formulações dermocosméticas ainda é recente, porém apresenta um crescimento acelerado devido a necessidade do desenvolvimento de metodologias que não utilizem animais (*cruelty-free*) na avaliação de formulações cosméticas e dermocosméticas.

Além disso, estudos de penetração com pele humana obtida de abdominoplastia, entre outras e com voluntários sadios (CHOE, et al., 2015; RANAMUKHAARACHCHI, et al., 2016), por meio de técnicas *ex vivo* e *in vivo*, são importantes para obtenção de resultados mais fidedignos, pois, mimetizam as condições reais de aplicação das formulações e representam, portanto, um avanço para a redução do uso de animais.

Nesse contexto, considerando que a hiperpigmentação e outras alterações pigmentares são uma das principais queixas em consultórios dermatológicos no Brasil, representando grande importância dermocosmética (SCHAEFER, 2018), o presente estudo comparou diferentes formulações com aplicações dermocosméticas em relação à permeação de substâncias ativas clareadoras e às propriedades

reológicas e de textura, contribuindo para o desenvolvimento de formulações clareadoras mais eficazes.

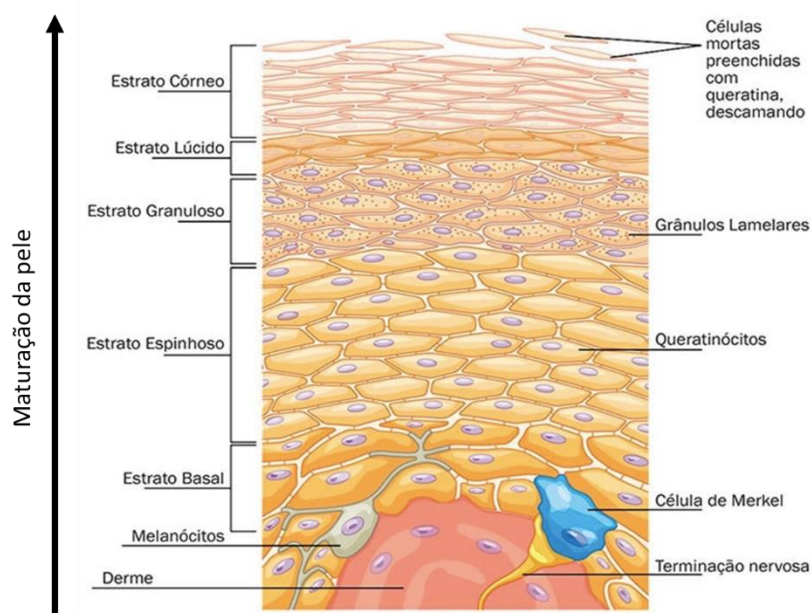
1.2 Morfologia e fisiologia da pele

A pele é um sistema epitelial que tem como uma de suas principais funções isolar as estruturas internas, delimitando e protegendo-as contra agressões do meio externo. Com isso, a pele atua como uma fronteira limitante entre o organismo e o ambiente, protegendo-o, assim, frente ao exossoma (MILLER & JONES, 2014; DENNIS, et. al., 2016; KRUTMANN, et. al., 2017; KABASHIMA, et. al., 2018). Além disso, a pele, devido à sua composição e estrutura complexa, exerce funções como a manutenção da sua própria integridade e da integridade do organismo, absorção e secreção de fluidos, controle do pH e temperatura corporal, metabolismo de vitamina D e funções estéticas e sensoriais (DHARADHAR, et al, 2019; PARIKH, et al, 2019).

A camada mais externa é a epiderme e ela não possui sistema de irrigação sanguínea direta, então, os nutrientes são transportados através da capilaridade. Essa camada atua como uma barreira protetora, contra o ambiente externo e, ao mesmo tempo, retendo o conteúdo interno, principalmente água, nutrientes e eletrólitos. Um dos principais componentes da epiderme são os queratinócitos, que são células especializadas produtoras de queratina e, quando sofrem o processo de estratificação, gera os corneócitos. Além disso, essa camada é composta por outros tipos de células especializadas como os melanócitos, células de Merkel e as células de Langerhans. Também, ela é transpassada pelos anexos invaginados na derme, como os folículos pilosos, sebáceos e glândulas sudoríparas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; NIKOLAKIS, MAKRANTONAKI, ZAUBOULIS, 2016).

A epiderme é constituída por diversas subcamadas: o estrato córneo, ou manto hidrolipídico da pele, o qual é composto diferentes lipídeos (Tabela 1), estrato lúcido (presente apenas em peles espessas, como a sola dos pés e das mãos), estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal. Os queratinócitos que as compõem sofrem o processo de maturação, quando passam de uma camada para outra, até serem eliminados (Figura 1) (BRAGAZZI, et al, 2019).

Figura 1. Representação esquemática das camadas da pele.



Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013

Tabela 1. Composição lipídica média da epiderme humana durante o processo de diferenciação e cornificação.

Componente	Estrato basal e	Estrato	Estrato córneo	
	espinhoso	granuloso	Total	Externo
	%	%	%	%
Lipídios polares	44.5	25.3	4.9	2.3
Sulfato de colesterol	2.4	5.5	1.5	3.4
Lipídeos neutros	51.0	56.5	77.7	68.4
Esteróis livres	11.2	11.5	14.0	18.8
Ácidos graxos livres	7.0	9.2	19.3	15.6
Triglicerídeos	12.4	24.7	25.2	11.2
Ésteres de colesterol/graxos	5.3	4.7	5.4	12.4
Esqualeno	4.9	4.6	4.8	5.6
N-alcano	3.9	3.8	6.1	5.4
Esfingolipídios	7.3	11.7	18.1	26.6
Glucosilceramidas I	2.0	4.0	Traços	Traços
Glucosilceramidas II	1.5	1.8	Traços	Traços
Ceramidas I	1.7	5.1	13.8	19.4
Ceramidas II	2.1	3.7	4.3	7.2

Fonte: Adaptado de Franz & Lehman, 2000.

A camada basal é constituída por células proliferativas, cuja função é se multiplicar gerando novas células diferenciadas ou proliferativas, para dar continuidade ao ciclo. Após algumas replicações, essas células começam a se diferenciar, formando as camadas da epiderme (HOUBEN, DE PAEPE; ROGIERS, 2007). Além disso, é nessa camada onde encontram-se as células de Langerhans, responsáveis pela defesa imunológica da pele, as células de Merkel, que atuam como receptores mecânicos na percepção tátil e os melanócitos, que são células dendríticas, produtoras de melanina e responsáveis pela pigmentação da pele (GANDOLFI, IANNELLI, MARINOSCHI, 2020).

O estrato espinhoso é composto por células espinhosas poligonais. É nesse estágio que se inicia o processo de queratinização, onde as células unem-se às suas vizinhas, através de pequenos filamentos de queratina, os desmossomos. Também, é nessa camada que ocorre o início da formação de grânulos de queratohialina e subestruturas lamelares – os corpos lamelares, os quais serão, posteriormente, responsáveis pela formação do manto hidrolipídico da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; MENON, LEE, & LEE, 2018).

O estrato granuloso é caracterizado pela grande presença de grânulos de queratina nas células. Quando acontece a maturação das células espinhosas, ocorre perda do núcleo e o achatamento dos queratinócitos, formando as placas de queratina. Além disso, o estrato granuloso é composto por estruturas filtrantes, os corpos lamelares. Estes possuem, em sua composição, uma mistura de lipídios – fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol. Essas estruturas liberam, por exocitose, a mistura de lipídios no espaço intercelular do estrato córneo, formando o manto hidrolipídico (ELIAS, et al, 1979; MENON, LEE, & LEE, 2018; USUI, et al, 2019).

O estrato lúcido é formado por células mortas, achatadas, ricas em queratina e anucleadas. É encontrado entre o estrato córneo e o estrato granuloso. Porém, essa camada está presente apenas em regiões mais espessas, como as pontas dos dedos, palma das mãos e sola dos pés. Ela é originada pela fricção e exerce função de proteção mecânica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; BRAGAZZI, et al, 2019).

A camada mais externa, o estrato córneo, é composto por intercalações entre os corneócitos e as estruturas lipídicas lamelares. Com isso, as substâncias químicas que não são água, só conseguem permear a pele através das camadas lipídicas intercelulares, ao contrário da água que, ao passar pelos corneócitos, ela será retida

pelas fibras de queratina que são altamente hidrofílicas (HOUBEN; DE PAEPE; ROGIERS, 2007; BRAGAZZI, et al, 2019). Os corneócitos são preenchidos por uma rede amorfa de fibrilas que lhes confere resistência mecânica, principalmente ao estiramento vertical e menos ao estiramento longitudinal. Em uma pele saudável, os corneócitos apresentam alto fator natural de hidratação (NMF - *Natural moisturizer factor*), que são compostos por moléculas de baixo peso molecular, higroscópicas e que se ligam a água. Especificamente, o NMF é composto, principalmente, por ácido carboxílico da pirrolidona (PCA), ácido urocânico, lactato, uréia, serina, glicina, arginina, ornitina, citrulina, alanina, histidina e fenilalanina (HARDING, et al, 2000; FOWLER, 2012; AREZKI et al., 2016).

Abaixo da epiderme, encontra-se a derme, que é composta por tecido conjuntivo, vascularizada, e fibroelástica que nutre a epiderme. Nela encontram-se os apêndices da epiderme - os folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas - e, também as terminações nervosas, vasos sanguíneos, entre outros. Além disso, a derme apresenta células como fibroblastos e fibras de colágeno e elastina, onde o colágeno é responsável por fornecer a sustentação e prevenir o estiramento excessivo, enquanto a elastina permite a volta da pele após o estiramento (MENON E KLIGMAN, 2009; EDWARDS e MARKS, 1995). A derme pode ser subdividida em derme papilar - fina e constituída por tecido conjuntivo frouxo e papilas - e derme reticular – espessa, irregular e constituída por tecido conjuntivo denso que garante a força e elasticidade da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Sendo assim, conhecer a biologia e bioquímica da pele é fundamental para o desenvolvimento de produtos cosméticos de uso tópico para que a formulação, junto com a substância ativa, seja direcionada e atue na manutenção da homeostase cutânea, desta forma contribuindo para a saúde e beleza da pele.

1.3 Melanogênese e despigmentantes

Os melanócitos são células dendríticas localizadas na epiderme e na derme e possuem a função de produzir melanina. Esta é a substância responsável pela pigmentação da pele, pelos e cabelos e, quando em excesso, originam as manchas (SERRE et al., 2018; FU et al., 2020).

Além disso, a melanina é fundamental para a proteção celular, especialmente para o DNA nuclear, pois protege as células contra a radiação solar (SERRE et al., 2018). A célula ao receber a radiação ultravioleta é protegida pela melanina, que reduz os efeitos deletérios consequentes à exposição, pois a melanina sintetizada é oxidada pela radiação, ao invés das outras biomoléculas, assim protegendo todo o conteúdo celular (VIDEIRA et al., 2013; SERRE et al., 2018; FU et al., 2020).

A síntese de melanina (melanogênese) é um processo complexo, que ocorre nos melanócitos, tendo como principal precursor a L-tirosina. Este aminoácido, produzido no citosol pela hidroxilação da L-fenilalanina, é transportada para dentro dos melanócitos, dando início à melanogênese (VIDEIRA et al., 2013; SERRE et al., 2018).

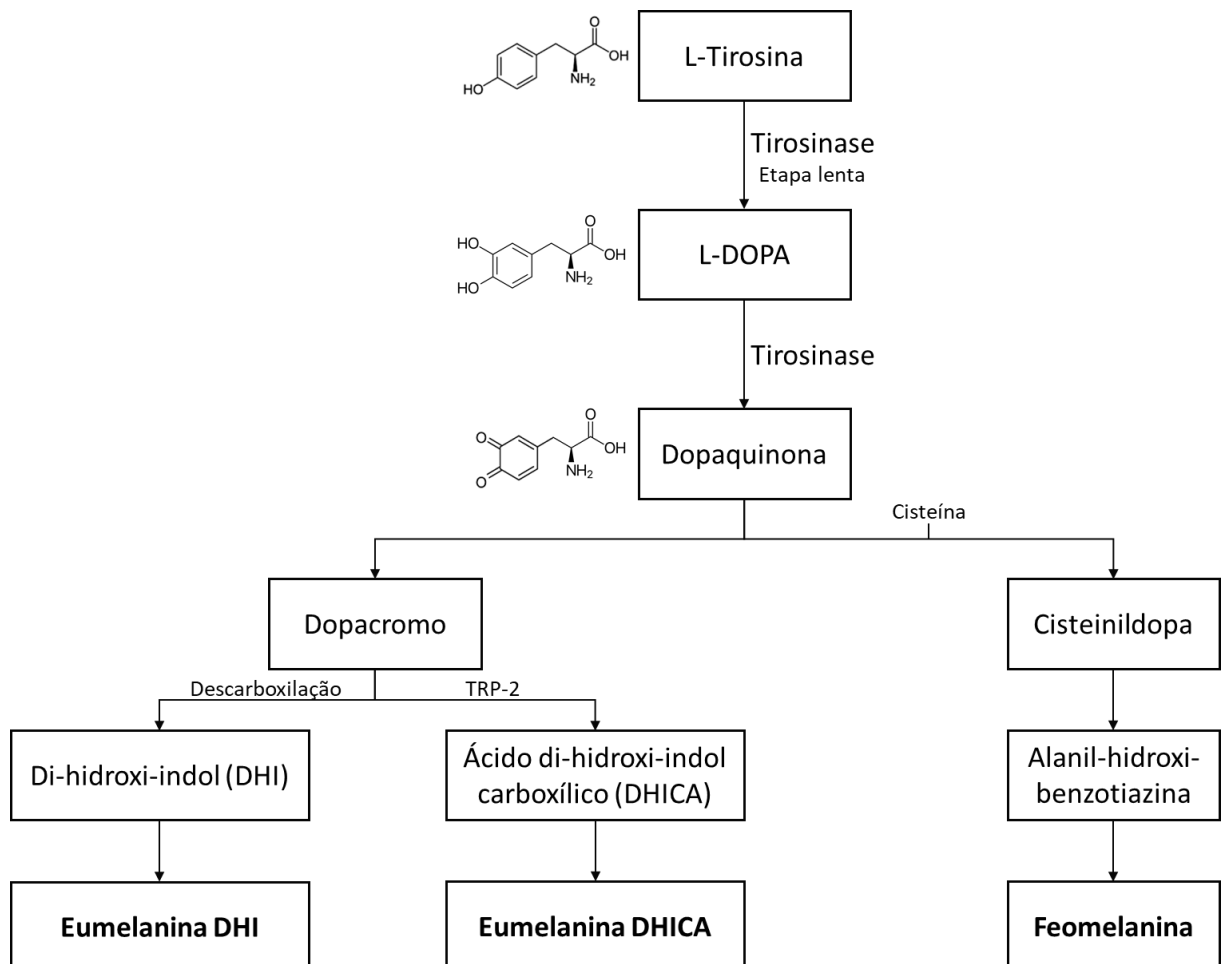
Então, a L-tirosina é convertida a L-Dopa pela ação da tirosinase (etapa lenta e determinante da velocidade do processo) e, em seguida é convertida a dopaquinona pela ação da mesma enzima, a tirosinase (SIMON et al., 2009). A partir desse ponto, a reação pode seguir dois caminhos. O primeiro, é a conversão da dopaquinona em cisteinildopa, em seguida forma-se a alanil-hidroxi-benzotiazina e, por fim, é formado a feomelanina – tons amarelados e vermelhos. O segundo caminho é a conversão da dopaquinona em dopacromo (OHBAYASHI e FUKUDA, 2020). Neste ponto, o dopacromo se decompõe espontaneamente, por descarboxilação em pH neutro, para formar a eumelanina DHI (di-hidroxi-indol), que promove tons de preto. Porém, se há a ação da dopacromo tautomerase (TRP-2), o dopacromo sofre tautomerização e há a formação da eumelanina DHICA (ácido di-hidroxi-indol carboxílico), responsável por tons de marrom (Figura 2) (VIDEIRA et al., 2013; SERRE et al., 2018; QIAN et al., 2020).

Então, as eumelaninas são biopolímeros nitrogenados polimorfos, DHI e DHICA, que apresentam tonalidades do marrom ao preto. Elas são o principal tipo em indivíduos com pele e cabelos escuros e é mais eficiente na fotoproteção que, por apresentarem uma subunidade semiquinona, participam de reações redox interagindo com espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres (SLOMINSKI et al., 2004; OHBAYASHI e FUKUDA, 2020). Com isso, esses biopolímeros, além de proporcionar a cor, atuam na proteção das células basais da epiderme contra a radiação ultravioleta (UV). Consequentemente, os indivíduos que produzem mais

melanina são menos propensos a queimaduras solares e câncer de pele (SIMON et al., 2009; VIDEIRA et al., 2013; QIAN et al., 2020).

Por outro lado, a feomelanina apresenta tonalidades do amarelo ao vermelho - formado pela conjugação de cisteína ou glutatona – e é encontrada predominantemente em indivíduos com cabelos ruivos e de pele clara. Ao contrário da eumelanina, ela exibe comportamento pró-oxidante fototóxico nos quais os indivíduos são mais propensos a apresentarem câncer de pele e queimaduras solares (SIMON et al., 2009; VIDEIRA et al., 2013; QIAN et al., 2020; OHBAYASHI e FUKUDA, 2020).

Figura 2. Rota biossintética da produção dos pigmentos de eumelanina e feomelanina



Fonte: Acervo pessoal (SIMON et al., 2009; VIDEIRA et al., 2013; SERRE et al., 2018).

Considerando que a melanogênese envolve um processo de oxidação, antioxidantes podem ser utilizados para inibir a produção de melanina. Dessa forma, alguns antioxidantes como o ácido ascórbico e derivados e o hidroxitirosol vem sendo propostos para aplicação em formulações dermocosméticas com propriedades despigmentantes

O derivado lipossolúvel da vitamina C, tetraisopalmitato de ascorbila, apresenta atividade antioxidante, protegendo os danos da radiação UVA/UVB, bem como atua sobre os melanócitos reduzindo a atividade da tirosinase (Figura 3) (MAIA CAMPOS et al., 2012; JEON, et al., 2016; NARDA, et al., 2020; GOLDBERG, et al., 2020).

O hidroxitirosol, de caráter hidrofílico, que possui ação inibitória em diversas etapas na síntese de melanina, promove proteção frente a exposição UVA/UVB, estimula a renovação celular e atua nos melanócitos, o que resulta em benefícios para a pele devido ao seu alto potencial antioxidante (Figura 4) (HU et al., 2014; OMAR, et al., 2018; RODRIGUES, et al., 2018; MAHESH, et al., 2019).

Figura 3. Estrutura química do derivado lipossolúvel de vitamina C – tetraisopalmitato de ascorbila (TIPA).

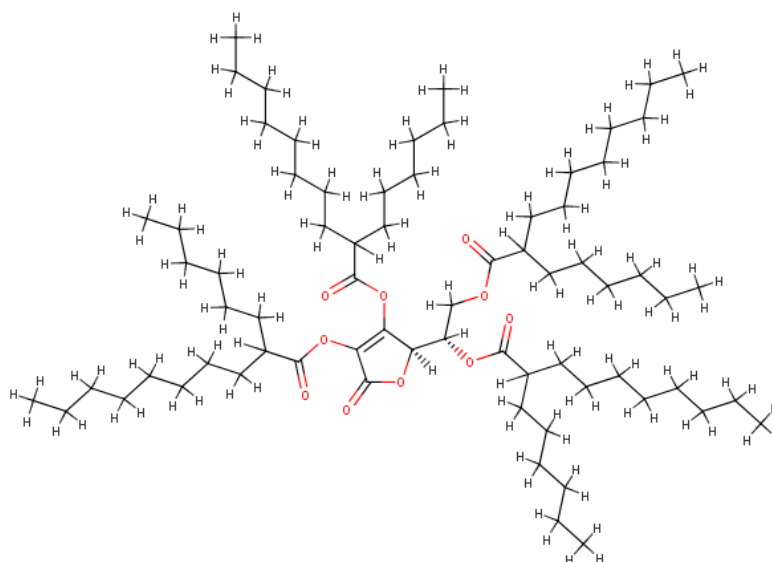
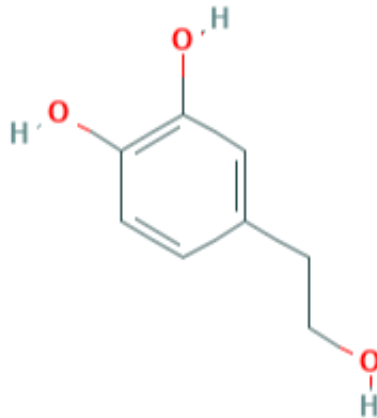


Figura 4. Estrutura química do hidroxitirosol nos extratos aquoso e seco de oliva.



1.4 Permeação e penetração cutânea

A permeação e penetração de substâncias ativas pode ocorrer por duas vias sendo a transepidérmica e a transfolicular. Ambas as vias apresentam suas especificidades, que dentre elas facilitam a permeação de substâncias ativas de acordo com a lipofilicidade, tamanho molecular, carga e estrutura destas (LANE, 2013; ALKILANI, et al., 2015; SILVA MEIRA, et al., 2020).

Substâncias lipofílicas devido a sua natureza química tendem a penetrar na pele pelo caminho intercelular, no qual a substância se difunde na pele por meio da bicamada lipídica do estrato córneo. Já substâncias hidrofílicas e/ou de baixo peso molecular realizam o caminho intracelular, desta forma, penetrando entre as células e se difundindo para as camadas mais profundas da pele. Além disso, estas substâncias também apresentam facilidade de penetração pelo caminho transfolicular, no qual as substâncias se difundem diretamente para a derme através do folículo piloso(LANE, 2013; ALKILANI, et al., 2015; SILVA MEIRA, et al., 2020).

A permeação e penetração de substâncias é dependente de diversos fatores como a integridade do estrato córneo, hidratação dos corneócitos, peso molecular, solubidade e concentração das substâncias, e do sistema de entrega das substâncias os quais atuam melhorando e otimizando a entrega das substâncias ativas à partir da desestruturação do manto hidrolipídico da pele(LANE, 2013; ALKILANI, et al., 2015; SILVA MEIRA, et al., 2020).

1.5 Propriedades reológicas e de textura

1.5.1 Propriedades reológicas

Para garantir a estabilidade de um produto cosmético, é preciso submetê-lo, durando o processo de desenvolvimento, em condições que acelerem seu processo de degradação. Para tal, o acondicionamento desses produtos em temperaturas extremas, por exemplo, é uma maneira de acelerar a desestabilização química da formulação. Além disso, a análise de pH, alteração de cor, odor, uniformidade e viscosidade são necessárias para garantir a estabilidade dos cosméticos ao longo do tempo (ANVISA, 2004).

Diversos motivos podem levar a essa instabilidade, como os componentes de uma formulação ou até mesmo a adição de ingredientes ativos, bem como suas concentrações. Então, essas alterações físicas também podem ser avaliadas pela análise do comportamento reológico (GARBOSA; MAIA CAMPOS, 2016).

Essa análise é definida como estudo o estudo do comportamento de fluxo e deformação da matéria, onde a formulação é cisalhada formando uma curva ascendente composta pelos eixos “Taxa de cisalhamento” *versus* “Tensão de cisalhamento” (CALIXTO E MAIA CAMPOS, 2017). A partir do gráfico, é possível determinar o índice de fluxo das formulações, onde os fluidos, dependendo do valor, podem ser classificados em newtonianos ou não newtonianos (CALIXTO E MAIA CAMPOS, 2017).

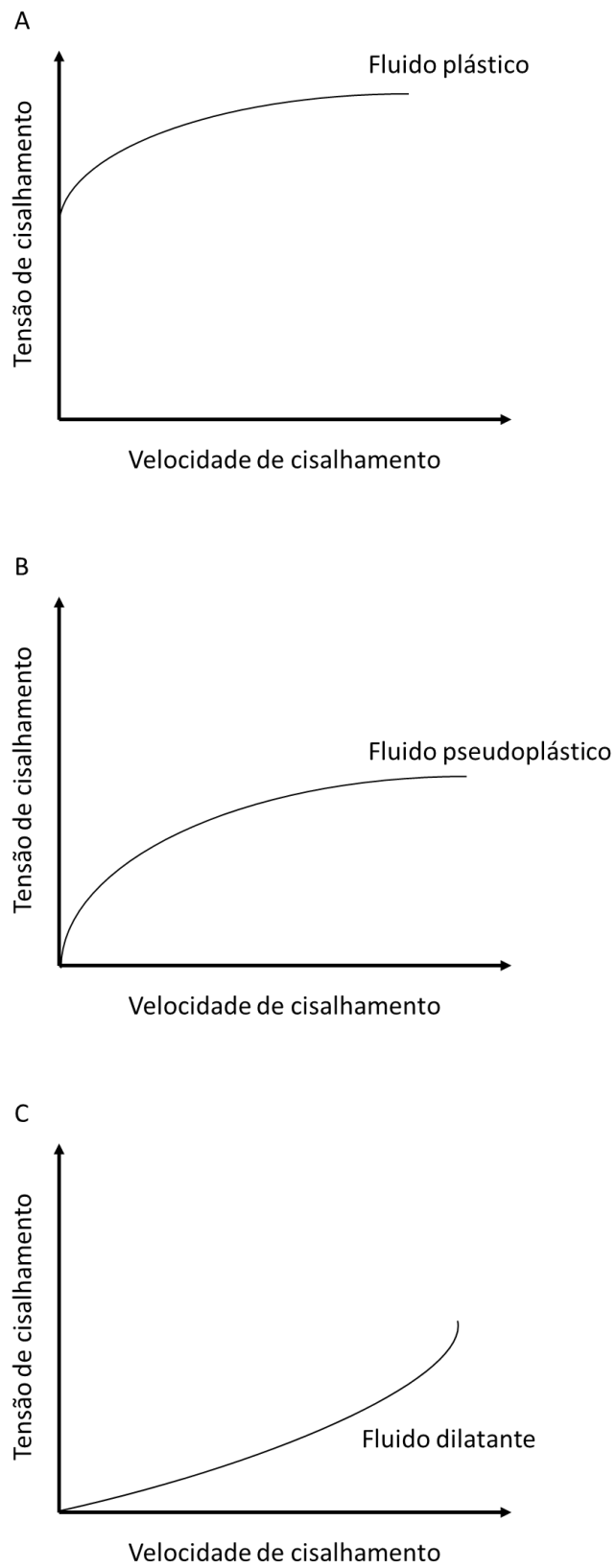
Os fluidos newtonianos apresentam deformação de fluxo diretamente proporcional a tensão de cisalhamento, sem que haja alteração da sua viscosidade. Por outro lado, os fluidos não newtonianos apresentam alteração da sua viscosidade dependendo da tensão de cisalhamento (MARRIOTT, 2008; MAIA CAMPOS, et al, 2012). Os fluidos são classificados de acordo com o tempo, em reopéticos e tixotrópicos (MARRIOTT, 2008), onde a viscosidade é alterada em função do tempo de cisalhamento. Os tixotrópicos perdem viscosidade e os reopéticos ganham viscosidade de acordo com o tempo de cisalhamento (SHIROMA, 2012).

Os fluidos não newtonianos também podem ser classificados de acordo com as suas propriedades de fluxo. Quando a viscosidade diminui com a força aplicada – cisalhamento, o fluxo é plástico ou pseudoplástico e quando ele aumenta, o fluxo é

dilatante (Figura 5). Os materiais plásticos são aqueles que precisam de uma tensão inicial para começarem a fluir, apresentando curva de fluxo com início em um ponto diferente da origem, esse ponto é denominado ponto de cedência (Figura 5) (CALIXTO E MAIA CAMPOS, 2017; Eudier, et al., 2019; Faucheux, et al., 2020), enquanto que os materiais pseudoplásticos apresentam em geral curva de fluxo passando pela origem (Figura 5). Também, o fluxo pseudoplástico é o mais comum e o mais aplicado para produtos cosméticos, pois apresentam viscosidade compatíveis com a grande maioria das preparações cosméticas, como géis, emulsões e shampoos, além de permitirem um bom espalhamento, formando uma cobertura sobre a pele (MAIA CAMPOS, et al, 2012). O mesmo resultado não ocorre com fluidos newtonianos devido ao rápido escoamento sobre a pele, formando uma distribuição não uniforme (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993, Eudier, et al., 2019).

Além disso, o fluxo pseudoplástico pode apresentar a tixotropia, o que facilita ainda mais a espalhabilidade e até mesmo a penetração de substâncias ativas. A tixotropia é calculada por meio da área formada entre a curva ascendente e descendente do reograma. Esse resultado indica a capacidade de uma formulação cosmética de reconstituir sua estrutura após a aplicação de uma força.

Figura 5. Comportamento de fluidos não newtonianos



Fonte: Acervo pessoal.

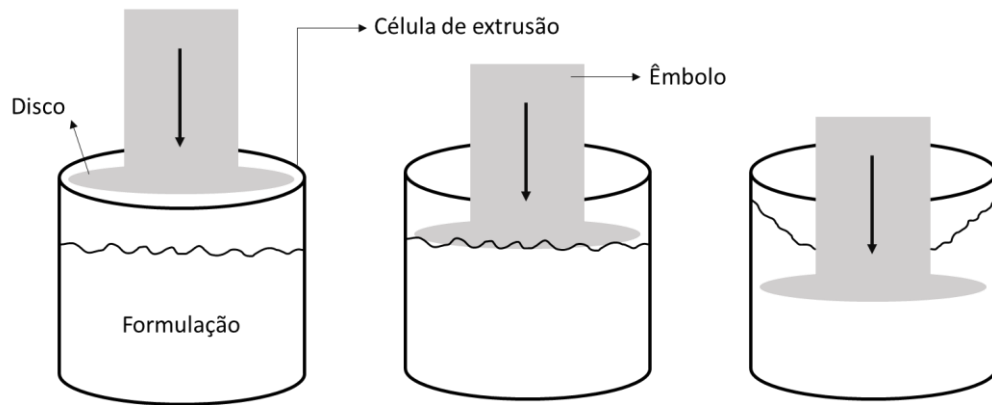
1.5.2. Propriedades de textura

A textura, que pode ser definida como a resposta tátil a um estímulo físico gerado por meio de um contato entre a pele e um produto (BOURNE, 2012). Essa análise permite avaliar parâmetros como a consistência, firmeza, espalhabilidade, coesividade, entre outros, que podem ser relacionados e predizer as características sensoriais de uma formulação. Durante o desenvolvimento de novos produtos cosméticos, o sensorial é um parâmetro que deve ser fortemente considerado a fim de obter um produto que seja agradável ao toque e, conseqüentemente, fidelizando o consumidor. Então, em paralelo ao desenvolvimento, a avaliação sensorial deve ser executada em conjunto (PENSÉ-LHÉRITIER, 2015; CALIXTO E MAIA CAMPOS, 2017).

Nesse contexto, a análise do perfil de textura pode predizer as características sensoriais de uma formulação, facilitando, assim, o desenvolvimento de cosméticos com o sensorial desejado. Então, a análise *back extrusion* consiste na aplicação de uma força sobre a formulação, de forma que esta seja deformada e escorra para as laterais da célula de extrusão (Figura 6).

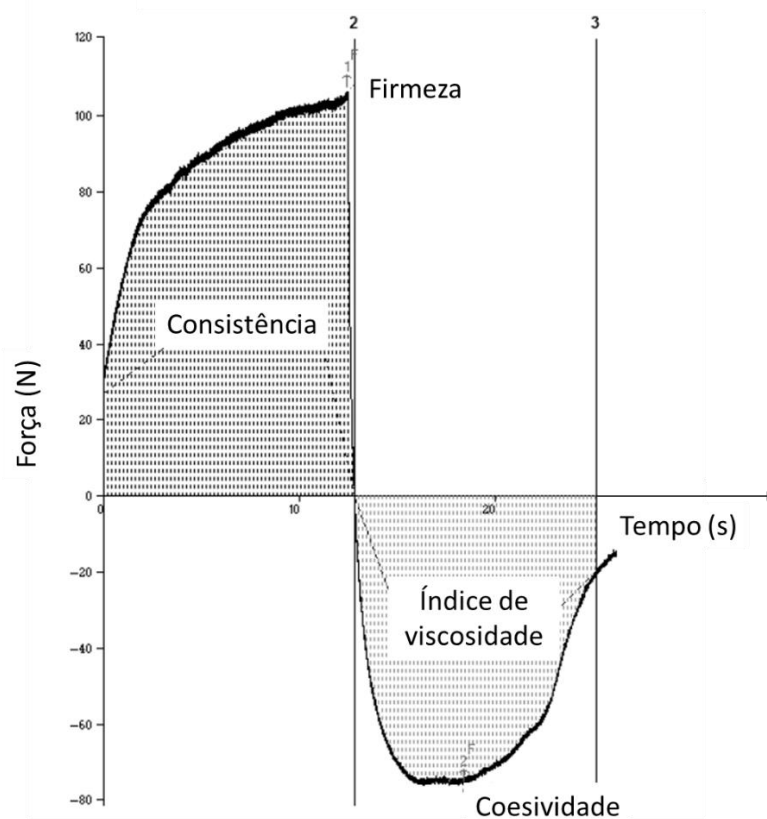
No caso do perfil de textura, o êmbolo, que aplica a força, é um disco plano e a célula de extrusão, onde a formulação é acondicionada é um copo cilíndrico. Ao iniciar a análise, o ponto mais alto da curva durante a compressão, indica o grau de firmeza da formulação e a área sobre essa curva, indica seu índice de consistência. Quando o êmbolo inicia o movimento inverso, ou seja, de descompressão da formulação, o ponto mais alto da curva inversa indica a coesividade e a área sob essa curva indica o índice de viscosidade (Figura 7). Então, a firmeza é a força máxima que o êmbolo precisa fazer para penetrar na formulação e a coesividade é a força que ele executa para romper a força de coesão entre a formulação e o fundo da célula de extrusão (TAI, et al, 2014; CALIXTO E MAIA CAMPOS, 2017).

Figura 6. Representação esquemática da análise do perfil de textura – back extrusion.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 7. Representação esquemática do gráfico obtido pelo software Texture Exponent 3.0.5.0 na análise de textura.

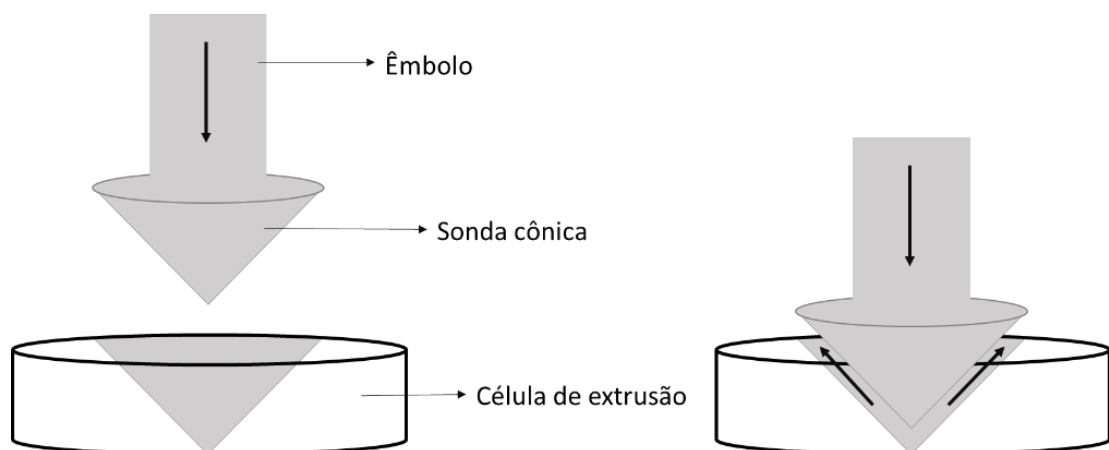


Adaptado: CALIXTO e MAIA CAMPOS, 2017.

A análise de espalhabilidade segue o mesmo princípio de *back extrusion*, a diferença está no formato da extremidade do êmbolo, que no outro teste era um disco e nesse é cônico – sonda cônica - com ângulo de 45° e a célula de extrusão acompanha esse formato cônico, para que se encaixe com o êmbolo perfeitamente (Figura 8 e 9). Com isso, o parâmetro obtido por essa técnica é o trabalho de cisalhamento. Este é obtido durante a deformação da formulação quando o êmbolo aplica uma força sobre ela (Figura 10), sendo que esse parâmetro é inversamente proporcional a espalhabilidade, ou seja, quanto menor trabalho de cisalhamento, melhor é a espalhabilidade de uma formulação (CALIXTO E MAIA CAPOS, 2017).

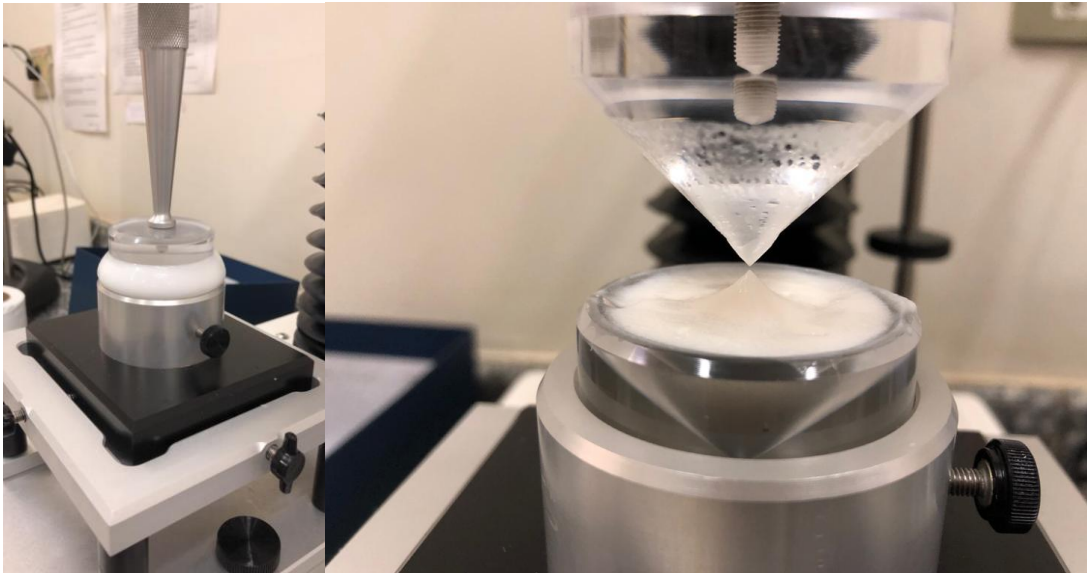
Assim, podemos dizer que a análise do perfil de textura determina um conjunto de propriedades físicas de uma formulação - gerados pela estrutura interna do material que é determinado pelas interações moleculares dos seus constituintes - que podem ser correlacionadas com o sensorial (CALIXTO & MAIA CAMPOS, 2017). Sendo assim, a importância desse teste está em poder caracterizar e prever as propriedades sensoriais que deverão ser apresentadas na formulação final, de acordo com a finalidade proposta.

Figura 8. Representação esquemática da análise de espalhabilidade – *back extrusion*.



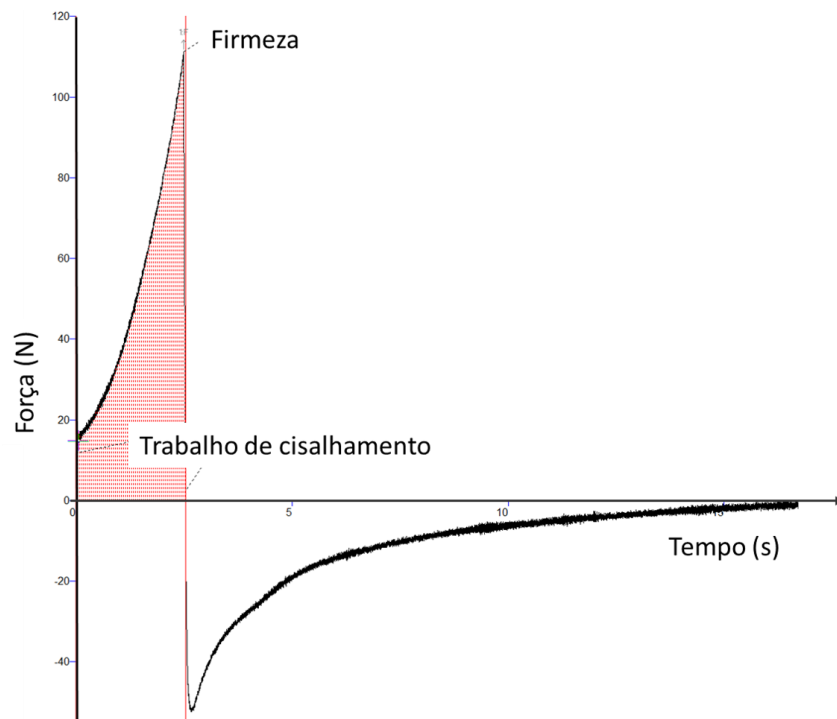
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 9. Representação prática da análise de espalhabilidade da formulação emulsão transdérmica (T1) – *back extrusion*



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 10. Representação esquemática do gráfico obtido pelo software Texture Exponent 3.0.5.0 na análise de espalhabilidade.



Fonte: software *Texture Exponent 3.0.5.0* na análise de espalhabilidade.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da composição de formulações dermocosméticas creme, gel creme e emulsão transdérmica, na permeação de substâncias ativas clareadoras.

Os objetivos específicos foram:

a) Desenvolver formulações dermocosméticas creme (emulsão O/A), gel creme (emulsão estabilizada por colóide hidrofílico) e emulsão transdérmica contendo 3 e 10% da substância ativa clareadora tetraisopalmitato de ascorbila e o extrato natural de oliva, seco e hidroglicólico, padronizados em hidroxitirosol a 3% e 20%, respectivamente.

b) Avaliar as propriedades reológicas das formulações desenvolvidas;

c) Avaliar as propriedades de textura e sensoriais das formulações;

d) Avaliar o potencial de citotoxicidade e fototoxicidade das substâncias ativas objeto de estudo;

e) Avaliar a permeação e penetração cutânea das formulações creme, gel creme e emulsão transdérmica contendo 10% do derivado lipossolúvel da vitamina C – tetraisopalmitato de ascorbila pelo modelo de célula de Franz modificada utilizando o modelo de pele de orelha de porco e pele humana;

f) Validação do método analítico empregado para quantificação de tetraisopalmitato de ascorbila em matriz biológica – pele humana e orelha de porco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento das formulações

Inicialmente foi realizada uma pesquisa na literatura sobre informações e especificações técnicas referentes as substâncias ativas objeto de estudo afim de identificar possíveis incompatibilidades em relação a adição das mesmas em diferentes tipos de formulações de aplicação cosmética. Desta forma, avaliou-se o pH de estabilidade das substâncias ativas, incompatibilidade com outras matérias-primas e o processo de incorporação nos veículos.

As matérias-primas utilizadas no presente estudo foram:

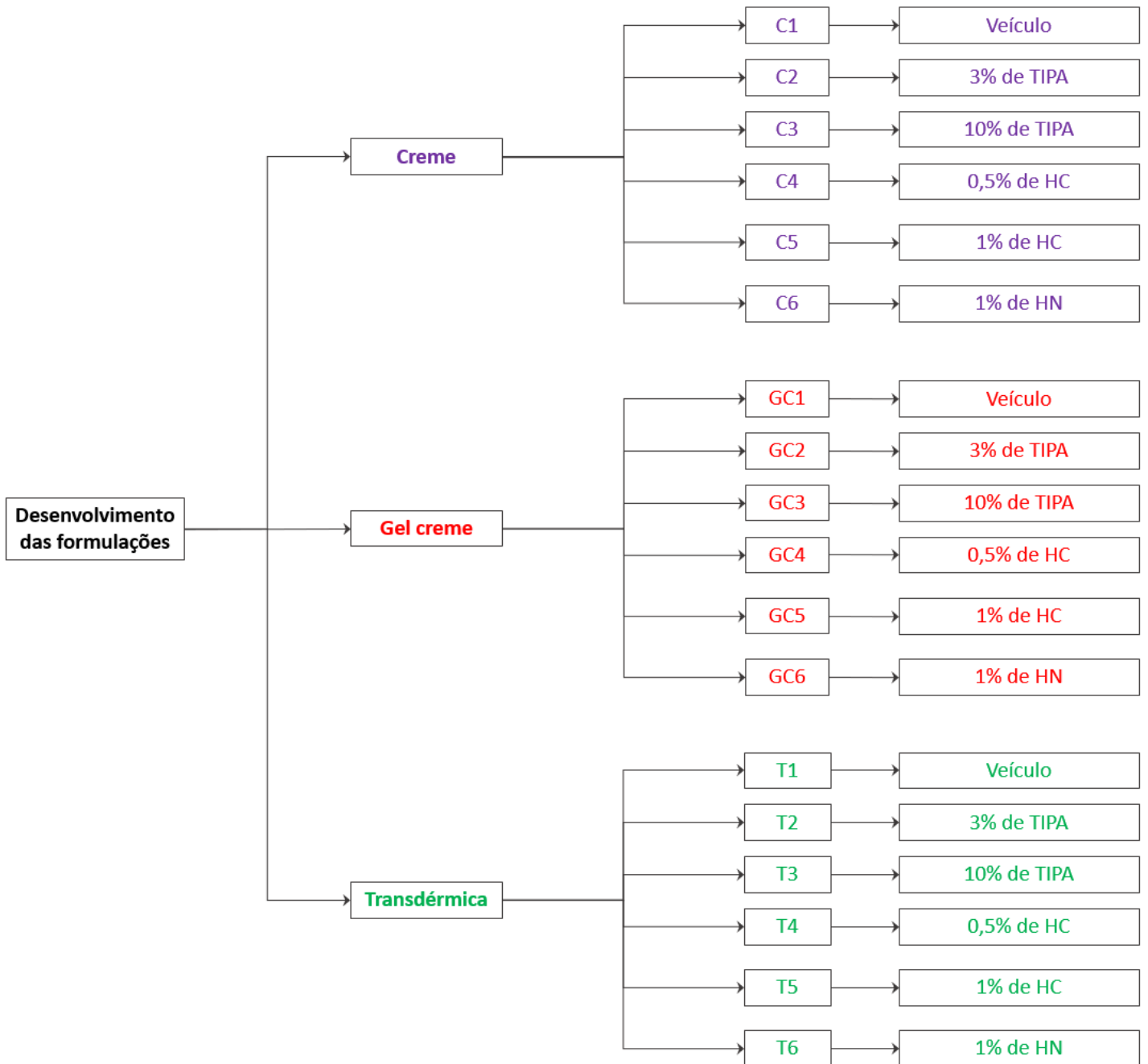
- Substâncias ativas: Tetraisopalmitato de ascorbila (TIPA) (NIKKOL GROUP, JAPÃO), Olea Europaea Fruit Extract – extrato seco padronizado em 3% de hidroxitirosol (HN) (Nexira Health, França) e Olea Europaea Fruit Extract – extrato hidroglicólico padronizado em 20% de hidroxitirosol (HC) (Cobiosa, Espanha).
- Composição do veículo creme e gel creme: Cetearyl Alcohol, Dicetyl Phosphate e Ceteth-10 Phosphate (Crodafos CES); C13-15 Alkane (Neossance® Hemisqualane); Carbomer (Carbopol® Ultrez 10 Polymer); ButylhydroxyToluene (BHT); Disodium Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA); Parfum (Naticide®); Glycerin e Aqua.
- Composição do veículo transdérmico comercial - VersaPro™ (Medisca, Canadá): Aloe Barbadensis Leaf Juice, Cyclopentasiloxane, Disodium EDTA, Emulsifying Wax NF, Ethylhexyl Stearate, Methychloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone, Sorbitol, Tocopheryl Acetate.

Os certificados de análises das substâncias ativas objeto de estudo e da emulsão transdérmica encontram-se disponíveis no apêndice A.

A seguir, foram desenvolvidas duas formulações dermocosméticas na forma de creme, sendo a primeira uma emulsão do tipo óleo em água, e a segunda um gel creme. Essas formulações foram adicionadas ou não (veículo) das substâncias ativas objeto de estudo separadamente e em diferentes concentrações, totalizando 12 formulações (Figura 11 e Tabela 2). Em uma terceira formulação de aplicação transdérmica incorporou-se, separadamente, apenas as substâncias ativas em diferentes concentrações, totalizando a preparação de 6 formulações (Figura 11). A tabela de composição das formulações desenvolvidas está disponível no apêndice B.

Figura 11. Fluxograma das formulações desenvolvidas

Legenda: Creme veículo (C1), creme contendo 3% de TIPA (C2), creme contendo 10% de TIPA (C3), Creme contendo 0,5% de HC (C4), Creme contendo 1% de HC (C5) e Creme contendo 1% de HN (C6); Gel creme veículo (GC1), gel creme contendo 3% de TIPA (GC2), gel creme contendo 10% de TIPA (GC3), gel creme contendo 0,5% de HC (GC4), gel creme contendo 1% de HC (GC5) e gel creme contendo 1% de HN (GC6); emulsão transdérmica (T1), emulsão transdérmica 3% de TIPA (T2), emulsão transdérmica contendo 10% de TIPA (T3), emulsão transdérmica contendo 0,5% de HC (T4), emulsão transdérmica contendo 1% de HC (T5) e emulsão transdérmica contendo 1% de HN (T6).



3.2 Avaliação sensorial

Foi realizada uma análise sensorial com 20 participantes do sexo feminino para avaliar os seguintes descritores: espalhabilidade, suavidade, hidratação, oleosidade e sensação ao toque durante e após 5 minutos da aplicação das formulações (MARCON *et al.*, 2014; FOSSA; MAIA CAMPOS, 2015; CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

A referida análise sensorial foi realizada por meio da aplicação do questionário CATA (Check All That Apply), o qual consiste de diversas questões de múltipla escolha - constituindo uma lista-, onde as participantes assinalaram todos os parâmetros que melhor caracterizam o produto (DOOLEY *et al.*, 2010; VALENTIN *et al.*, 2012). O questionário sensorial aplicado encontra-se disponível no apêndice B.

3.3 Avaliação da estabilidade das formulações

3.3.1 Centrifugação, pH e Caracterização organoléptica

Centrifugação

Durante 30 dias, 3 g das formulações desenvolvidas foram submetidas a 3 ciclos de centrifugação a velocidade de 800 G (equivalente a 3000 rpm), por 30 minutos nos tempos 24 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após a formulação das mesmas. Utilizou-se a centrífuga Excelsa Baby II modelo 206-R.

Determinação do pH

A medida de pH foi realizada em todas as formulações desenvolvidas utilizando-se amostras diluídas em água destilada (10%), realizadas 24 horas após a formulação das mesmas e também nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias, em peagâmetro Tecnal modelo TEC3-MPq.

Caracterização organoléptica

Para este estudo foram avaliadas as seguintes alterações das formulações desenvolvidas: cor, odor, ocorrência de coalescência e homogeneidade, durante 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias após a formulação das mesmas. (GIANETI, 2013; ANVISA, 2004; GARBOSSA; MAIA CAMPOS, 2016).

3.4 Determinação do comportamento reológico e estabilidade das formulações

Para este estudo foi utilizado o reômetro Brookfield DV3T (Brookfield, EUA) tipo cone e placa equipado com um spindle CP-52 e acoplado ao software RHEOCALCT®. Em cada análise, $0,50 \pm 0,01$ g de formulação foi depositada na placa. A velocidade de rotação foi progressivamente aumentada de 0 a 10 rpm com 5 segundos entre cada velocidade, formando uma curva ascendente composta pelos eixos “Taxa de cisalhamento” versus “Tensão de cisalhamento”, e em seguida uma curva descendente foi gerada com a diminuição inversa da velocidade (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

Após o preparo das formulações as mesmas foram mantidas à $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ por 24 horas para a determinação do comportamento reológico. Posteriormente, foram separadas em alíquotas de $30,00 \pm 0,01$ g e acondicionadas em frascos separados e hermeticamente fechados para avaliar a estabilidade das mesmas nas seguintes condições de armazenamento: à $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ - ambiente, $37,0$ e $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (estufa com controle de umidade relativa a 70%) para consequente avaliação dos parâmetros reológicos após 7, 14, 21 e 28 dias. (SOUZA; MAIA CAMPOS, 2017).

A integração numérica das curvas dos reogramas assim obtidos foi realizada no *Software Microcal Origin* e a área sob a curva foi obtida para o cálculo da área de histerese. A viscosidade mínima aparente foi obtida a partir do reograma adquirido e as curvas foram ajustadas de acordo com o modelo de Ostwald para obtenção do índice de fluxo e índice de consistência (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

Para melhor visualização dos resultados obtidos ao longo dos experimentos referentes aos seguintes parâmetros reológicos os valores de viscosidade aparente, índice de consistência e índice de fluxo, foram plotados em gráficos com auxílio do *software GraphPad Prism5*. Todas as aferições foram realizadas em triplicata.

$$\text{Equação Modelo de Ostwald: } \tau = K (\dot{\gamma})^n$$

Onde, τ = tensão de cisalhamento (D/cm²); $\dot{\gamma}$ = gradiente de cisalhamento (1/Sec);

K = índice de consistência; n = índice de fluxo

3.5 Determinação do perfil de textura das formulações

A análise de textura foi realizada utilizando o analisador de textura TA.XT plus (Stable Microsystems, Reino Unido). As análises foram realizadas 24h após desenvolvimento das formulações e as propriedades de textura das formulações foram calculadas através do software do instrumento Texture Exponent 3.0.5.0 (VITORINO, *et al.*, 2013; CALIXTO *et al.*, 2018).

A análise de espalhabilidade foi realizada com a sonda TTC HDP/SR e avaliou o trabalho de cisalhamento (*Work of shear*) das formulações, obtido a partir da área sob a curva positiva. Para isso, a distância de retorno utilizada foi de 25 mm, a velocidade de retorno foi de 20 mm/seg e a força de contato foi de 30g. A quantidade de formulação utilizada na avaliação foi entre 30g a 40g (CALIXTO; MAIA CAMPOS 2017).

O segundo teste avaliou textura das formulações com auxílio da sonda de extrusão A/BE 35 mm com base nos parâmetros: índice de viscosidade, consistência (força necessária para atingir uma determinada deformação), firmeza e coesão (razão da área sobre o tempo de força em curva produzida por uma segunda compressão) (TAI *et al.*, 2014; CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

Os dados obtidos da curva negativa foram analisados como valores absolutos. Em um recipiente de 125 mL com 50 mm de diâmetro e preenchido em 75% de sua capacidade. As condições da sonda foram: distância de retorno de 100 mm, velocidade de retorno de 20 mm/seg e força de contato de 30 g (BASU, *et al*, 2010; CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017). Todas as aferições foram realizadas em triplicata.

3.6 Avaliação do potencial de citotoxicidade e fototoxicidade das substâncias ativas

O teste de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos (3T3 NRU) por determinação da viabilidade celular, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro, conforme protocolo OECD nº 432 (2004). Após a avaliação da sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA, foram utilizadas 2 microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações das substâncias ativas do presente estudo, uma para a determinação da citotoxicidade e a outra para a determinação da fototoxicidade. Para tal, após a incubação de uma suspensão dos

fibroblastos no meio de cultura, foram adicionadas em sextuplicata, 8 diferentes concentrações de cada substância ativa. Após período de incubação, uma das microplacas foi submetida à radiação UVA por 31 minutos e outra foi mantida em uma caixa escura (controle para a determinação da citotoxicidade).

Após, o período de incubação foi adicionado uma solução do corante vital vermelho neutro e após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para tal, foi realizada a leitura das soluções resultantes das microplacas, submetidas e não submetidas à radiação UVA, a 540 nm e os dados analisados por meio do Software Phototox versão 2.0 (obtido pelo ZEBET, Alemanha) para o cálculo do PIF (“photo irritation factor” - fator de fotoirritação) - e do MPE (“mean photo effect” - fotoefeito médio), para previsão do potencial fototóxico. Uma substância que apresenta PIF entre 2 e 5 ou MPE entre 0,1 e 0,15 pode ser classificada como “provavelmente fototóxica” (KAWAKAMI; GASPAR, 2015).

3.7 Análise estatística

3.7.1 Comparação múltipla dos resultados

Os dados experimentais obtidos nos estudos foram submetidos à análise estatística com o auxílio dos softwares Prism 8 e Oringin 8.

De acordo com os resultados dos testes de normalidade, foram aplicados os testes ANOVA com o pós-teste de Tukey para os dados que aderiram a curva normal e o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com pós teste de Dunns, para os dados que não aderiram a curva não.

Além disso, os resultados foram apresentados em forma de tabelas e figuras e com discussão baseada nos dados da literatura.

3.7.2 Análise dos componentes principais (PCA)

A análise por componentes principais (PCA) é um dos métodos estatísticos de múltiplas variáveis mais simples (AMIGO *et al.*, 2008), sendo muito utilizada pela sua capacidade de reconhecimento de padrões e suas correlações. A PCA analisa inter-relações de muitas variáveis e as explica em termos de suas dimensões inerentes (componentes). Com isso, o objetivo dessa técnica é condensar a informação contida nessas variáveis originais em um conjunto menor de variáveis estatísticas

(componentes) com mínima perda de informação (SABIN *et al.*, 2004; QUINTELAS *et al.*, 2019).

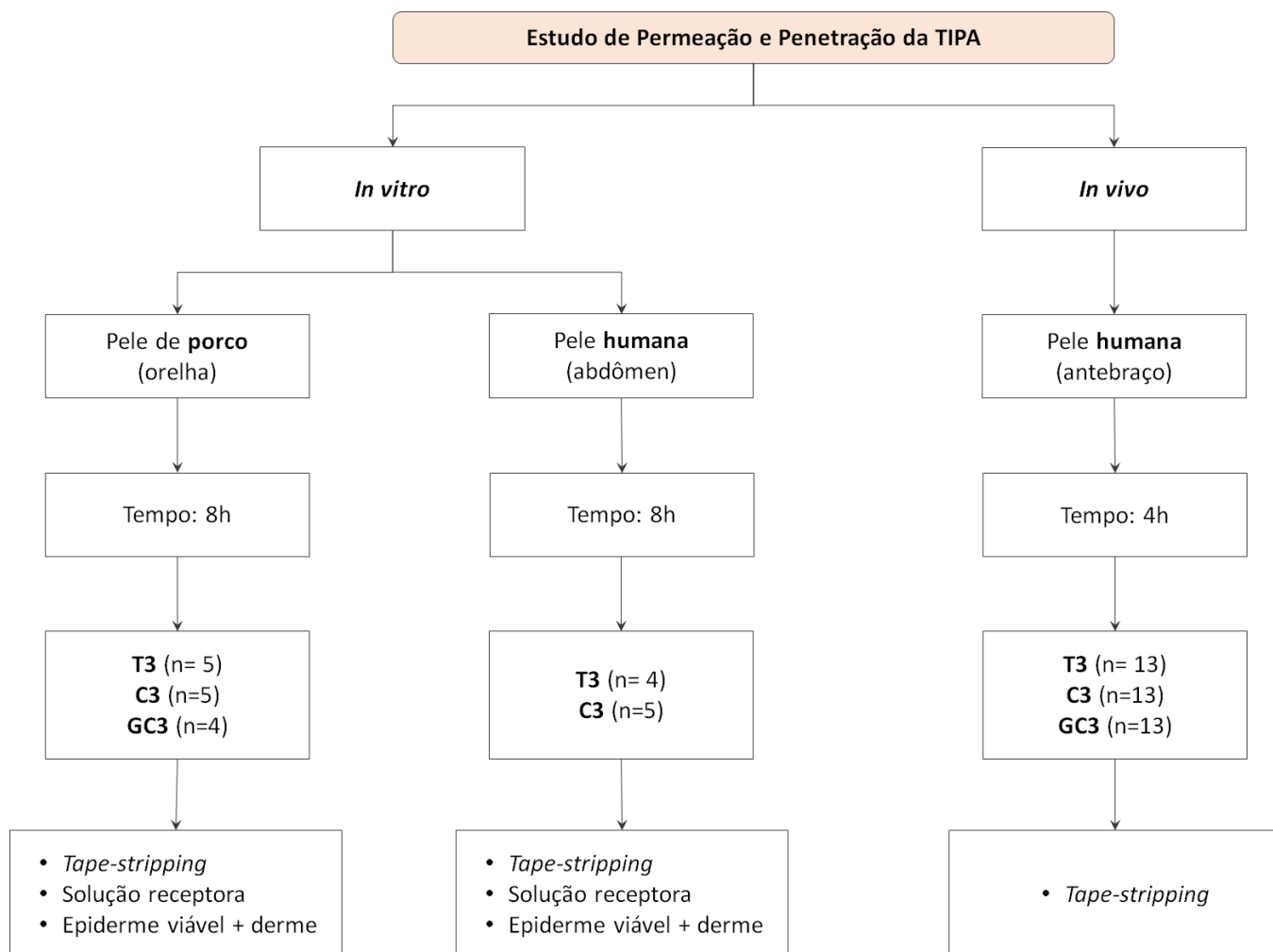
Neste estudo, foi utilizado o aplicativo Chemoface® para avaliar a relação entre os parâmetros obtidos pela determinação do comportamento reológico e análise do perfil de textura de todas as formulações em estudo.

Muitos aplicativos utilizam a técnica de decomposição do valor singular (SDV) para obtenção das componentes principais, sendo, neste caso, a primeira componente principal (CP1) definida na direção (eixo) de maior variância do conjunto de variáveis originais. As demais componentes, são decrescentes em termos de variação, porém, elas serão ortogonais a CP1 e entre si (AMIGO *et al.*, 2008; SHAHDOOSTI e GHASSEMIAN, 2016; QUINTELAS *et al.*, 2019). Nesse caso, o sistema foi reduzido a 3 componentes principais, sendo elas CP1, CP2 e CP3. Elas se assemelham ao sistema cartesiano de coordenadas, onde os três eixos são linearmente independentes entre si.

3.8 Estudo *in vitro* e *in vivo* da permeação e penetração do derivado lipossolúvel da vitamina C – tetraisopalmitato de ascorbila – TIPA

Avaliou-se a permeação das formulações desenvolvidas compostas pela TIPA (C3, GC3, T3) (Figura 12) (CAAE: 00669818.7.0000.5403). O estudo *in vitro* foi realizado por meio de células de difusão de Franz modificadas utilizando pele de orelha de porco não escaldada e pele humana obtida por abdominoplastia (Figura 13). E para o estudo *in vivo* realizou na pele de antebraço de participantes sadios avaliando a permeação no estrato córneo por *tape-stripping test* (Figura 14).

Figura 12. Fluxograma do estudo permeação e penetração *In vitro* e *In vivo* do TIPA nas formulações C3, CG3 e T3



3.8.1 Estudo *in vitro* de permeação e penetração

A pele de orelha de porco foi fornecida pelo abatedouro Fribordogue (Bariri, SP) e a pele de abdômen obtida por abdominoplastia em parceria com o laboratório coordenado pela Prof^a Maria José Vieira Fonseca.

Ambas as foram cuidadosamente dissecadas com auxílio de bisturi e tesoura para a remoção do tecido subcutâneo. As amostras de pele, livres do tecido subcutâneo, foram armazenadas a -80°C e utilizadas dentro do período de 60 dias. No dia do experimento a pele foi descongelada, limpa para retirada eventual de tecido adiposo, pelos cortados manualmente e posicionada nas células de Franz com a

região da derme voltada para a solução receptora e o estrato córneo voltado para o compartimento superior com área de difusão de 1,77 cm².

A integridade da membrana foi determinada pelas medidas de resistência elétrica por meio da membrana da pele de orelha e porco e medida da perda transepidérmica de água (TEWL) para pele humana. Em seguida, as formulações objeto de estudo foram pesadas, e aplicadas sobre a pele.

O compartimento receptor (12mL) foi preenchido com solução composta por água e etanol na proporção 50:50. Aplicou-se sobre elas 250 mg das formulações contendo ou não a substância ativa objeto de estudo – C1, C3, GC1, GC3, T1 e T3. O experimento foi conduzido em réplicas de acordo com a quantidade de pele disponível, sob agitação constante de 300 rpm por um período de 4 ou 8 horas a 32,0 ± 0,5°C. Após esse período a camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo, foi retirada utilizando 20 fitas adesivas do tipo durex, com área de aproximadamente 3 cm², em seguida as peles remanescentes (epiderme viável + derme) passaram por um processo de extração para a quantificação do ativo por meio da cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM).

Figura 13. Amostra de pele humana obtida por abdominoplastia. À esquerda pele composta por todas as camadas, ao centro processo de limpeza manual, e à direita pele previamente limpa para armazenamento em freezer – 80°C.



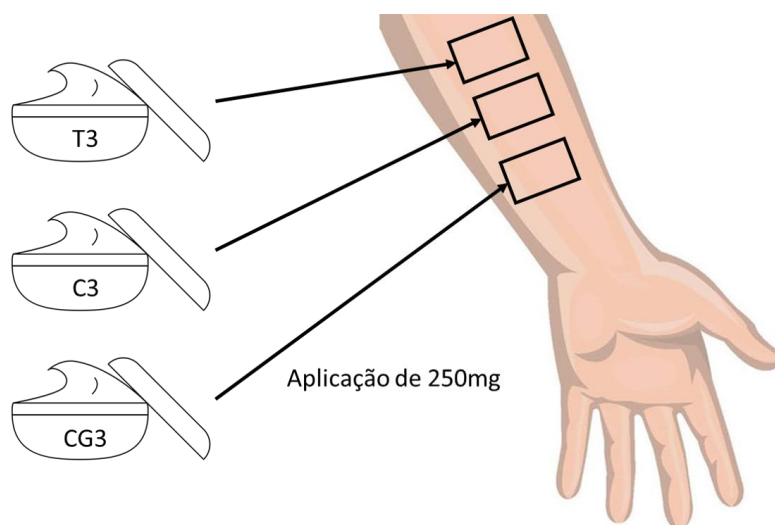
Acervo pessoal

3.8.2 Estudo *in vivo* de permeação - *Tape-stripping test*

O *Tape-stripping test* foi realizado em 13 participantes – 8 mulheres e 5 homens, fototipos II e III (Pathak e Fitzpatrick, 1993), com idade entre 20 a 30 anos e com TEWL entre 10 a 15 g.m².h⁻¹ para monitorar a integridade da função barreira. E os critérios de não inclusão: grávidas, fumantes, lactantes, indivíduos em uso de medicamentos controlados ou passíveis de produzir resposta cutânea anormal, indivíduos com presença ou histórico de doenças de pele, irritação e sensibilidade aos componentes da formulação.

Os testes se iniciaram após 20 minutos de aclimação em ambiente com controle de temperatura (20-22°C) e de umidade relativa do ar (45-55%) (Dal’Belo, et. al., 2006). Após aclimação foram aplicadas 250 mg das formulações C1, C3, GC1, GC3, T1 e T3 (Figura 14).

Figura 14. Representação ilustrativa da aplicação das formulações objeto do estudo para o *tape-stripping test*

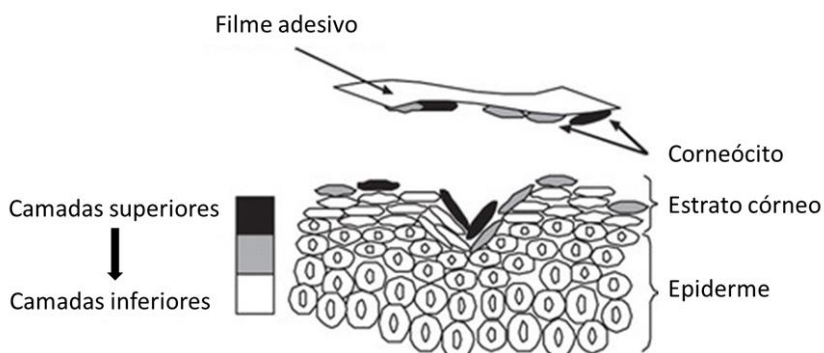


Acervo pessoal

Os participantes permaneceram por 4 horas no ambiente controlado, e em seguida nas regiões de aplicação foi realizado o *tape-stripping test*, no qual aplicou-se fita adesiva (48 mm x 100 mm – Durex^{MR} 3M) por 20 vezes para a retirada do estrato córneo (Figura 15).

A aplicação da fita é um procedimento minimamente invasivo para a retirada do estrato córneo via aplicação e remoção sequencial de uma fita adesiva na superfície da pele permitindo a coleta de camadas microscópicas - 0,2 - 1µm do estrato córneo (Figura 15) (LADEMANN *et al.*, 2008; PAILLER-MATTEI *et al.*, 2011).

Figura 15. Representação do *tape-stripping test*



Adaptado: PAILLER-MATTEI *et al.*, 2011

3.8.3 Extração das substâncias ativas da epiderme viável e derme

Para a avaliação da permeação da substância ativa TIPA foi realizado o seguinte procedimento de extração: 1. Adição de 2 mL de acetato de etila; 2. Trituração da pele remanescente (epiderme viável + derme); 3. Vórtex durante 1 minuto e em seguida banho de ultrassom por 10 minutos; 4. Diluição 1:10 em metanol acidificado a 0,5% de ácido fórmico seguida de diluição 1:10 em ácido fórmico a 0,5%, filtração e injeção no sistema CLAE-EM/EM.

3.8.4 Método analítico para a quantificação da TIPA

Equipamentos:

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à um espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM). O sistema cromatográfico utilizado é formado por duas bombas LC10AD, um sistema controlador SLC 10A, um forno de coluna CTO 10AS e um injetor automático modelo SIL-20A, ambos equipados pela Shimadzu (Japão). O espectrômetro de massas utilizado é um triplo quadrupolo *Quattro LC, Micromass* (Reino Unido), enquanto a fonte de ionização é o *Electrospray*

(ESI). A aquisição e o processamento de dados foram realizados pelo *software Micromass Mass Lynx* versão 4.1.

Configuração do sistema CLAE-EM/EM:

No sistema cromatográfico foi utilizada uma coluna analítica LiChroCART® 125-4 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta pela fase A: 0,5% de ácido fórmico em água ultrapurificada e pela fase B: 0,5% de ácido fórmico em metanol, em modo de gradiente de concentração, e com vazão de 0,40 mL min⁻¹. A temperatura do forno da coluna foi mantida em 40 °C. No espectrômetro de massas, a fonte de ionização foi operada em modo positivo (ESI+), com temperatura de 100 °C e a temperatura do gás de solvatação em 350 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação, com vazões de 60 L h⁻¹ e 390 L h⁻¹, respectivamente. Como gás de colisão, foi utilizado o argônio. Por meio do modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) dos íons das moléculas protonadas [M+H]⁺ e seus respectivos fragmentos, as transições monitoradas do tetraisopalmitato de ascorbila (TIPA) foram 1130>636 para quantificação e 1130>891 para confirmação, a voltagem do cone empregada foi de 32 V e a energia de colisão foi de 20 eV (Tabela 2).

Tabela 2. Gradiente utilizado na metodologia de determinação de TIPA. *Legenda: Solução A: Ac. Fórmico 0,5% e Solução B: 0,5% de ácido fórmico em metanol.*

Tempo (min)	% Solução A	% Solução B
0,0	60	40
2,5	0	100
6,0	0	100
7,0	60	40
13,0	60	40

Validação:

O método analítico foi validado seguindo as orientações da RDC 166 e Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA.

Especificidade / Seletividade: A especificidade / seletividade do método foi confirmada pela ausência de pico interferente na pele amostra branco no tempo de retenção do tetraisopalmitato de ascorbila.

Linearidade: A linearidade foi avaliada através do cálculo do coeficiente de correlação (r) da curva trabalho em matriz com cinco pontos de concentração em triplicata, no intervalo de 50; 100; 200; 400 e 800 ng mL⁻¹ que representa as seguintes concentrações de TIPA na amostra analisada 5,65; 11,30; 22,60; 45,20 e 90,40 µg de TIPA / cm² de pele.

Precisão: Os resultados da precisão *intradia* e *interdia* foram expressos através do coeficiente de variação (CV, %) dos resultados obtidos com 3 réplicas, sendo cada réplica injetada em triplicata, em 3 níveis de concentração (50, 100 e 150%, em relação ao ponto intermediário da curva). Os níveis de concentração analisados foram: 100; 200 e 400 ng mL⁻¹ que representa as seguintes concentrações de TIPA na amostra analisada 11,30; 22,60 e 45,20 µg de TIPA / cm² de pele.

Exatidão: A exatidão do método foi avaliada mediante o ensaio de recuperação utilizando-se rações fortificadas com TIPA em 3 níveis de concentração correspondentes a 100; 200 e 400 ng mL⁻¹ que representa as seguintes concentrações de TIPA na amostra analisada 11,30; 22,60 e 45,20 µg de TIPA / cm² de pele.

Eficiência de extração: A eficiência de extração foi avaliada através das respostas encontradas entre soluções de TIPA puro diluído em solvente e soluções de TIPA em matriz fortificada, visto que foi avaliado a inexistência de efeito matriz. Os níveis de concentração analisados foram: 100; 200 e 400 ng mL⁻¹ que representa as seguintes concentrações de TIPA na amostra analisada 11,30; 22,60 e 45,20 µg de TIPA / cm² de pele.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento das formulações

Foram desenvolvidas formulações minimalistas, ou seja, formulações compostas apenas com as matérias-primas essenciais para o preparo das mesmas em suas diferentes formas farmacêuticas como o creme e o gel creme. A formulação emulsão transdérmica utilizada no presente estudo foi de origem comercial, pois formulações com aplicação transdérmica apresentam uma maior complexidade de composição.

Além disso, as matérias-primas utilizadas foram previamente escolhidas considerando uma boa compatibilidade das mesmas com a pele e que não fossem comedogênicas ou irritantes para assim assegurar o desenvolvimento de formulações biocompatíveis.

Neste contexto, utilizou-se preferencialmente matérias-primas de origem natural, adequando-se ao atual direcionamento do desenvolvimento de produtos cosméticos que buscam por formulações minimalistas, naturais e menos agressivas para a pele e meio ambiente.

As formulações compostas pelos veículos creme e gel creme foram desenvolvidas com a mesma composição de matérias-primas, variando apenas a concentração de cada matéria-prima, com o propósito de restringir interferentes nas medidas realizadas e para avaliar uma possível correlação da permeação das substâncias ativas objeto de estudo com as propriedades reológicas e de textura delas.

4.2 Avaliação da estabilidade das formulações

4.2.1 Centrifugação, pH e caracterização organoléptica

Centrifugação: Todas as formulações desenvolvidas não apresentaram o fenômeno de coalescência, cremação ou floculação durante 24 horas, 7,17,21 e 28 dias após o preparo, uma vez que não mostraram separação de fases no teste de centrifugação.

pH: Todas as formulações desenvolvidas apresentaram valores de pH entre 4,8 a 5,5 durante 24 horas, 7,17,21 e 28 dias após o preparo, valores compatíveis com o pH da pele que é na faixa de 4,5 – 6,5 (PROKSCH, 2018).

Caracterização organoléptica: As formulações desenvolvidas não apresentaram alterações como cor, odor, ocorrência de coalescência e homogeneidade, durante 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias após o preparo das mesmas.

De acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares de estabilidade as formulações desenvolvidas foram estáveis, pois não ocorreu separação de fases não apresentaram variações no pH.

4.3 Propriedades sensoriais

As formulações desenvolvidas apresentaram propriedades sensoriais consideradas muito boas, pois, foram bem avaliadas nos parâmetros sensação ao toque, espalhabilidade e suavidade, fundamentais para aceitabilidade durante a aplicação bom como após 5 minutos de aplicação das mesmas (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

Dentre os parâmetros analisados observou-se uma maior preferência das participantes nos parâmetros sensoriais: fácil de espalhar, facilmente absorvida, suavidade, sensação de pele macia e pele hidratada.

Algumas das formulações desenvolvidas apresentaram características pontuais que poderiam diminuir a aceitação das mesmas, porém quando avaliada a intenção de compra obteve-se resultados favoráveis.

A formulação C1 apresentou segundo os participantes um sensorial oleoso durante a aplicação e também, resíduo oleoso após cinco minutos da aplicação. Essa característica é resultante da composição da formulação, pois a mesma é uma emulsão óleo em água com uma concentração de componentes graxos elevada, porém a adição das substâncias ativas nessa formulação não aumentou esta percepção de oleosidade da formulação.

Ao comparar as formulações C1 e GC1 observa-se que a diminuição da carga oleosa resulta na redução da percepção de oleosidade, em razão de a formulação GC1 apresentar um carbômero em sua composição e redução da concentração de componentes graxos (Figuras 16 e 17) (JAMSHIDIAN, et al., 2014; TERESCENCO, et al., 2018).

Porém, ao avaliarmos os resultados referentes a percepção de oleosidade das formulações GC1, GC2 e GC3, observa-se que GC2 e GC3 apresentam melhores resultados, especialmente a GC3 (Figura 18). Dessa maneira, a adição da substância

ativa TIPA ocasionou alteração na percepção sensorial, ou seja, a adição da TIPA, lipossolúvel, aumentou a sensação de oleosidade e a percepção de resíduo oleoso para a formulação GC3, a qual apresenta uma maior concentração de TIPA (GORE, et al., 2018).

Em relação às formulações desenvolvidas com o veículo transdérmico, as formulações T3 e T6 apresentaram melhores resultados no parâmetro pegajosidade quando comparado às outras formulações compostas pelo mesmo veículo. Além disso, os participantes relataram a presença de resíduo oleoso após a aplicação da formulação T3, o que é devido presença das substâncias ativas. A formulação T3 apresenta uma concentração elevada de TIPA, a qual apresenta caráter lipofílico. A formulação T6 foi acrescida de uma substância ativa na forma de pó altamente higroscópico, o que alterou a percepção sensorial quando comparada as outras formulações do mesmo veículo (Figura 19).

Considerando as formulações desenvolvidas observa-se que a emulsão transdérmica apresentou resultados melhores em comparação as outras formulações objeto de estudo, pois a adição das substâncias ativas impactou menos nas propriedades sensoriais. O melhor desempenho das propriedades sensoriais da emulsão transdérmica está intimamente relacionado com as propriedades de textura e do comportamento reológico. O que influencia na estabilidade e performance da formulação durante sua aplicação. (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017; EUDIER, et al. 2019; FAUCHEUX, et al., 2020).

Figura 16. Propriedades sensoriais (a) Frequência dos resultados obtidos durante a aplicação das formulações C1, C2, C3, C4, C5 e C6, (b) a frequência dos resultados após cinco minutos da aplicação *Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6).*

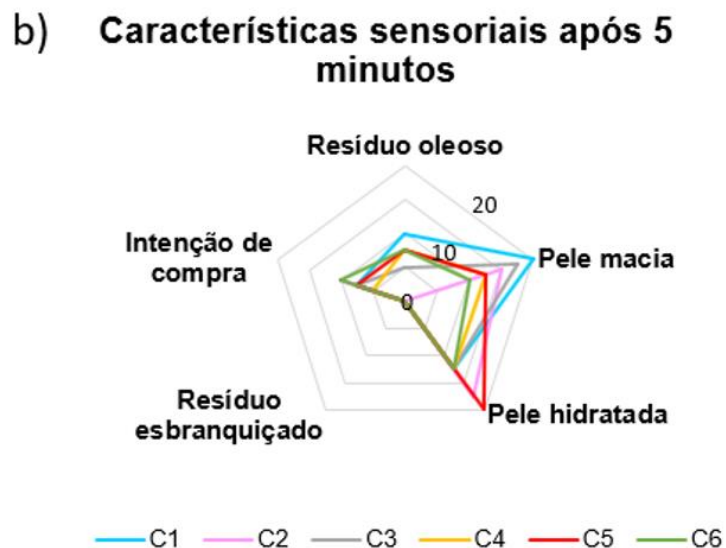
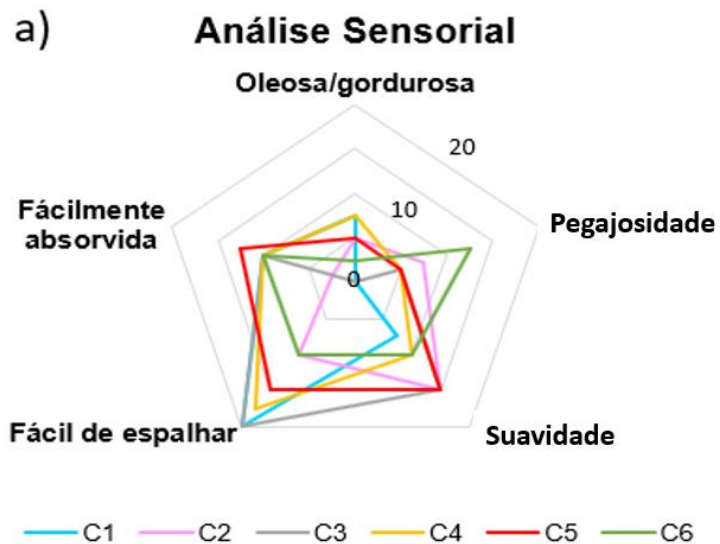


Figura 17. Propriedades sensoriais (a) Frequência dos resultados obtidos durante a aplicação das formulações GC1, GC2, GC3, GC4, GC5 e GC6, (b) frequência dos resultados referentes após cinco minutos da aplicação das mesmas. .
Legenda: Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6);

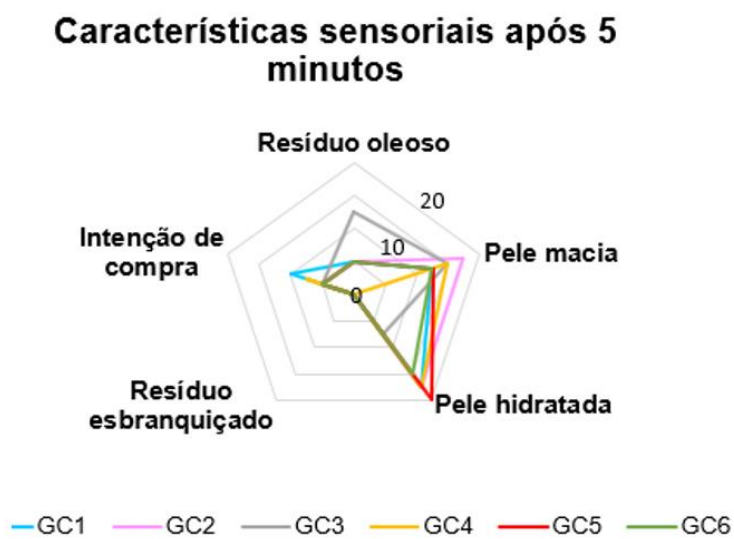
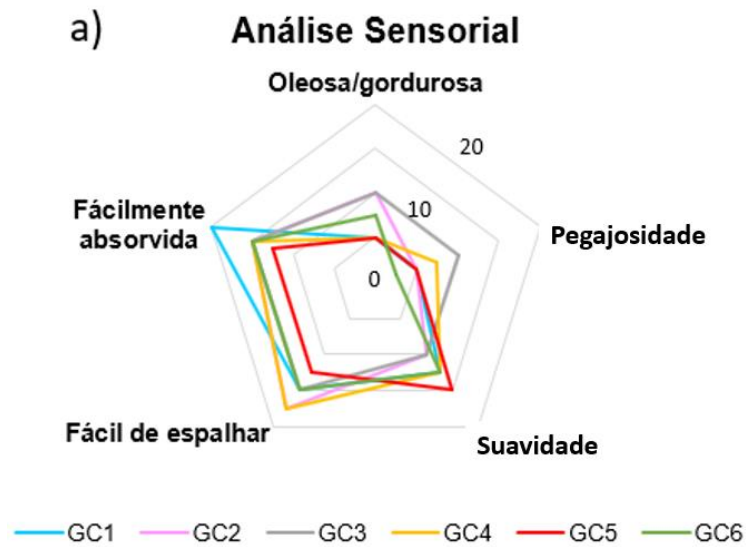
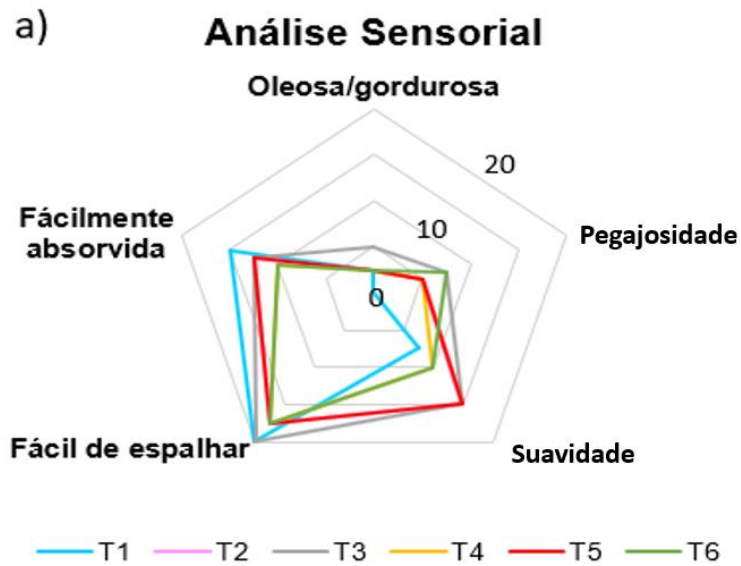


Figura 18. Propriedades sensoriais (a) frequência dos resultados obtidos durante a aplicação das formulações T1, T2, T3, T4, T5 e T6, e em (b) a frequência dos resultados referentes após cinco minutos da aplicação das mesmas. *Legenda: Veículo transdérmico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).*



b) **Percepção sensorial após 5 minutos da aplicação**



4.4 Determinação do comportamento reológico e estabilidade das formulações

As formulações desenvolvidas apresentaram comportamento reológico do tipo não newtoniano pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, com o aumento da taxa de cisalhamento a viscosidade mínima aparente diminui. Além disso, todas as formulações contendo a substância ativa, quando comparadas com suas respectivas bases – veículos, apresentaram semelhança no perfil reológico (Figura 19), mostrando que a adição das substâncias ativas não influenciou de forma considerável o comportamento reológico da formulação. A alteração na estrutura organizacional do veículo poderia resultar na instabilidade física da mesma levando a sua coalescência imediata, ou a longo prazo (KIM *et al.*, 2003; LEE, 2009; RISALITI *et al.*, 2018).

É descrito na literatura que as propriedades de fluxo das formulações farmacêuticas podem impactar na eficácia das mesmas, pois, contribui no tempo de interação entre a pele e formulação (SAMCZEWSKA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2009). De acordo com estudos relatados na literatura, o perfil reológico de uma formulação, especialmente as tixotrópicas com uma elevada área de histerese, aumentam a estabilidade física de substâncias ativas, conseqüentemente, refletindo na eficácia das mesmas (LEE *et al.*, 2009, LUCERO *et al.*, 2016).

Em relação à área de histerese, as formulações creme e emulsão transdérmica apresentaram os maiores valores (Figura 20), sinalizando novamente para um possível melhor desempenho das mesmas em relação à permeação cutânea (LEE, 2009; RISALITI *et al.*, 2018). No presente estudo avaliou-se o comportamento reológico das formulações desenvolvidas entre os períodos 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias e foi observado uma semelhança nos parâmetros reológicos das mesmas nos diferentes tempos avaliados, desta forma predizendo que as formulações desenvolvidas são estáveis (apêndice C) (GIANETI *et al.*, 2012; RISALITI *et al.*, 2018).

Nas formulações fotoprotetoras a área de histerese pode influenciar no FPS – Fator de Proteção Solar, em função da formação de um filme mais homogêneo sobre toda área da pele de forma uniforme (HEWITT; DAHMS, 1996; HERZOG; OSTEWALDER, 2015; TAMPUCCI *et al.*, 2018). Assim a proteção UV promovida por uma formulação fotoprotetora depende também do seu perfil reológico, pois, formulações com altos valores de tixotropia em geral possuem valores mais baixos de FPS e formulações com baixa área de histerese tendem a apresentar valores maiores de FPS. Além disso, pode ocorrer uma menor penetração dos ingredientes ativos da

formulação, aspecto esperado para os filtros solares, e um melhor rearranjo da microestrutura da formulação de forma mais homogênea sobre a pele (HERZOG; OSTEWALDER, 2015).

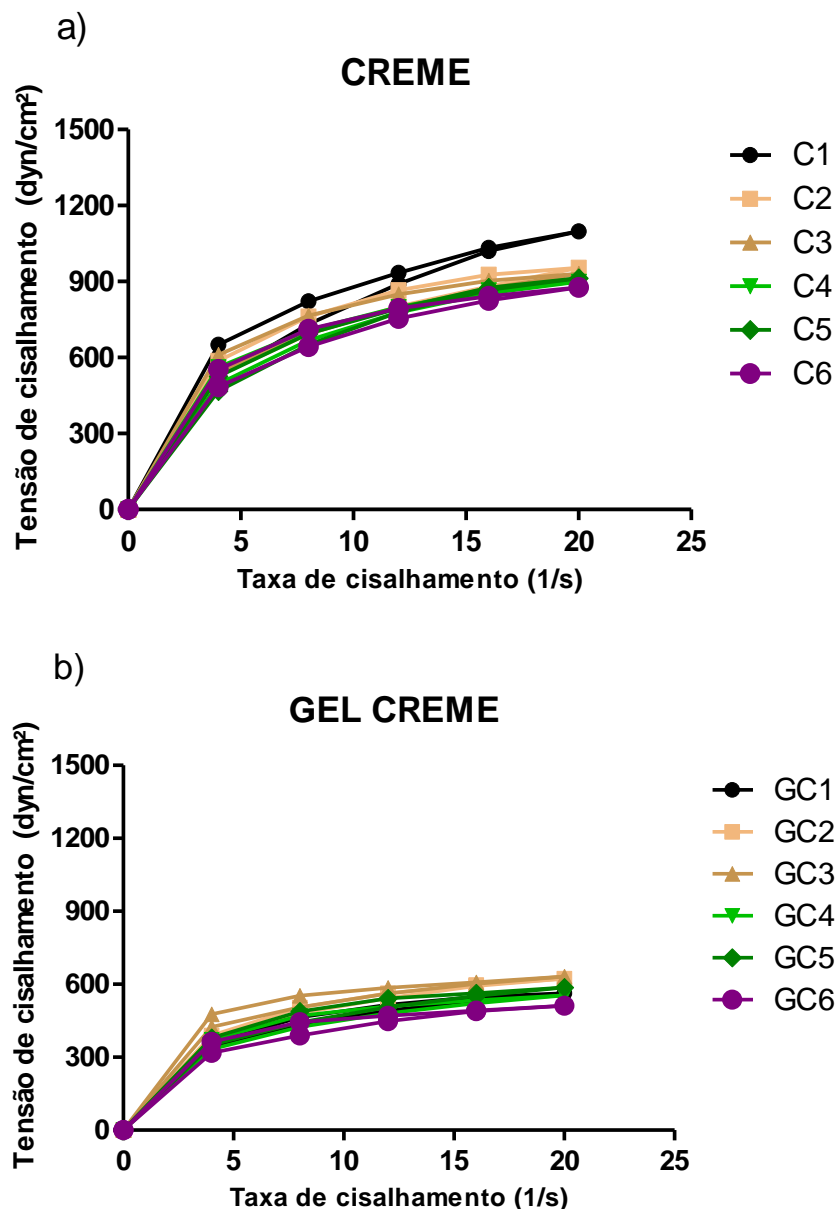
Além disso, as propriedades de fluxo das formulações, em destaque as cosméticas, estão intimamente relacionadas com as propriedades sensoriais das mesmas, especialmente a influência da viscosidade e do índice de consistência (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

Dessa forma, uma vez que a emulsão transdérmica (T1 a T6) e emulsão a base de fosfato (C1 a C6) apresentaram maiores valores de tixotropia, e valores semelhantes no índice de fluxo, consistência e viscosidade mínima aparente em relação aos seus respectivos veículos, há uma melhor organização da microestrutura da formulação, o que pode influenciar nas propriedades sensoriais e, também, na permeação, pois modulam a interação entre pele e formulação, a qual é resultante da homogeneidade da formulação sobre a pele.

As formulações transdérmica e creme apresentaram menores variações do índice de fluxo e de consistência após a adição das substâncias ativas nas diferentes concentrações quando comparadas às formulações gel creme (Figura 21). A estabilidade frente às substâncias ativas com diferentes características físico-químicas pode auxiliar na permeação das mesmas, pois, favorece a interação pele e formulação, o que influencia na permeação das substâncias ativas e também na estabilidade das mesmas.

As formulações transdérmica apresentaram os menores valores de índice de fluxo e os maiores de consistência, demonstrando que as mesmas necessitam da aplicação de uma força maior para a desestruturação da microestrutura, a qual apresenta uma maior coesividade (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017). Essa diferença entre as formulações objeto de estudo é resultante da interação entre os componentes da formulação, alterando a microestrutura e influenciado nas propriedades de fluxo (Jamshidian, et al., 2014; Terescenco, et al., 2018). Dessa forma, uma vez que a emulsão transdérmica mostrou menores variações nos parâmetros com a adição das substâncias ativas, essa formulação apresenta estabilidade física, especialmente em longo prazo, demonstrando que a microestrutura da formulação se mantém semelhante durante o tempo.

Figura 19. Taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das formulações desenvolvidas na formulação creme (a), gel creme (b) e transdémica (c) 24 horas após o preparo e armazenadas a temperatura ambiente (valores plotados correspondentes a média sendo $n=3$). *Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdémico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).*



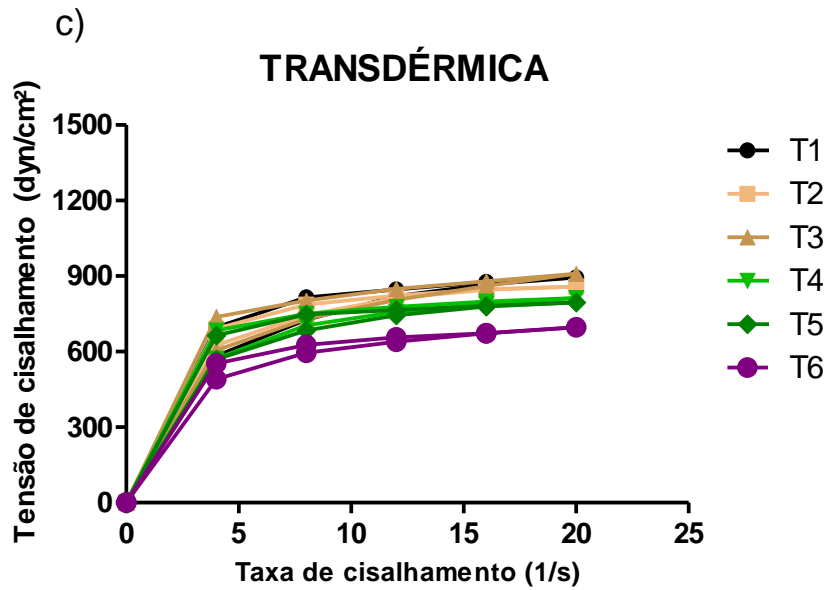


Figura 20. Área de histerese das formulações desenvolvidas. Não foi observado diferença significativa entre elas. (Kruskal Wallis; $P < 0,05$); $n=3$. *Legenda:* Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdérmico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).

Avaliação da Tixotropia

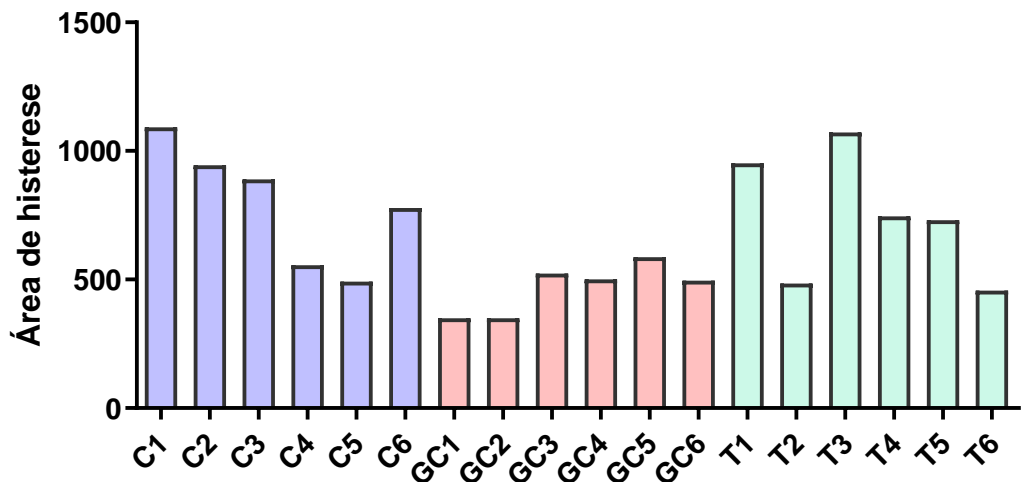
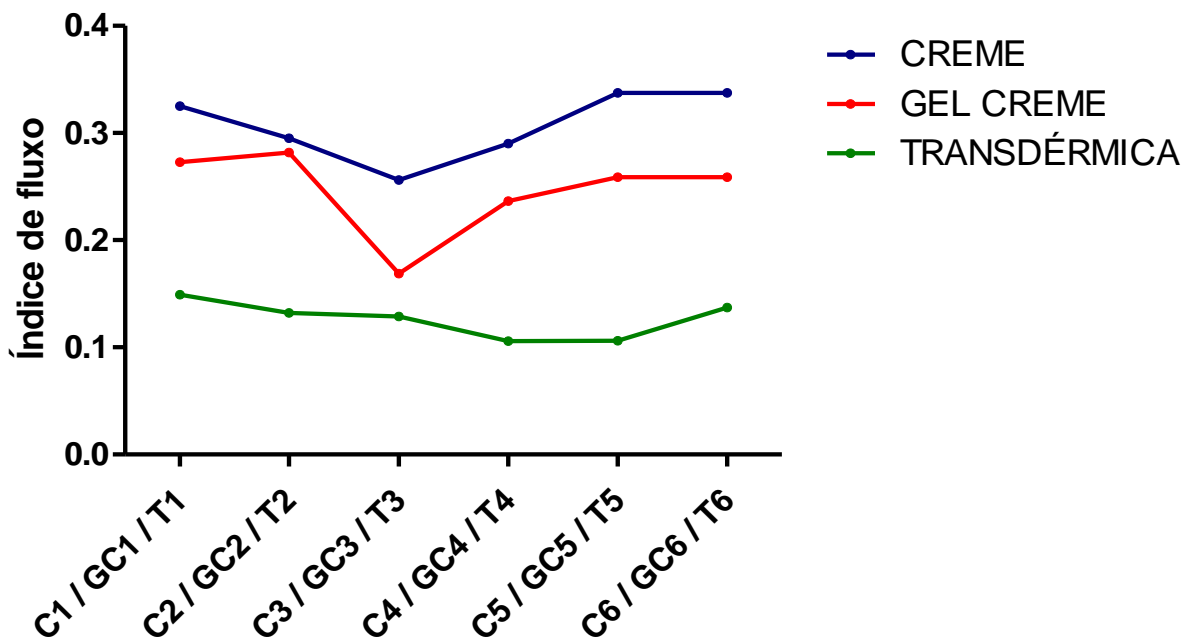


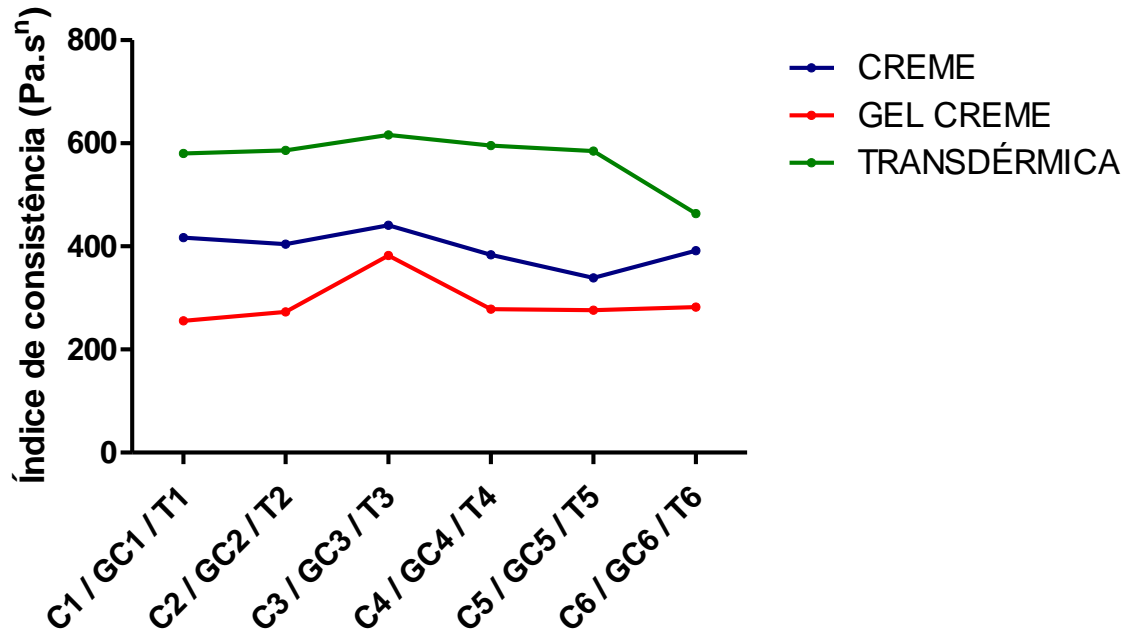
Figura 21. (a) Índice de fluxo das formulações em relação a concentração das substâncias ativas. Diferença significativa entre as formulações creme e transdémica. (b) Índice de consistência das formulações em relação a concentração das substâncias ativas. Diferença significativa entre a formulação gel creme e formulação (c) viscosidade mínima aparente das formulações em relação a concentração de substâncias ativas. Diferença significativa entre a formulação creme e a formulação gel creme (Kruskal Wallis; $P < 0,05$) $n=3$.

Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdémico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).

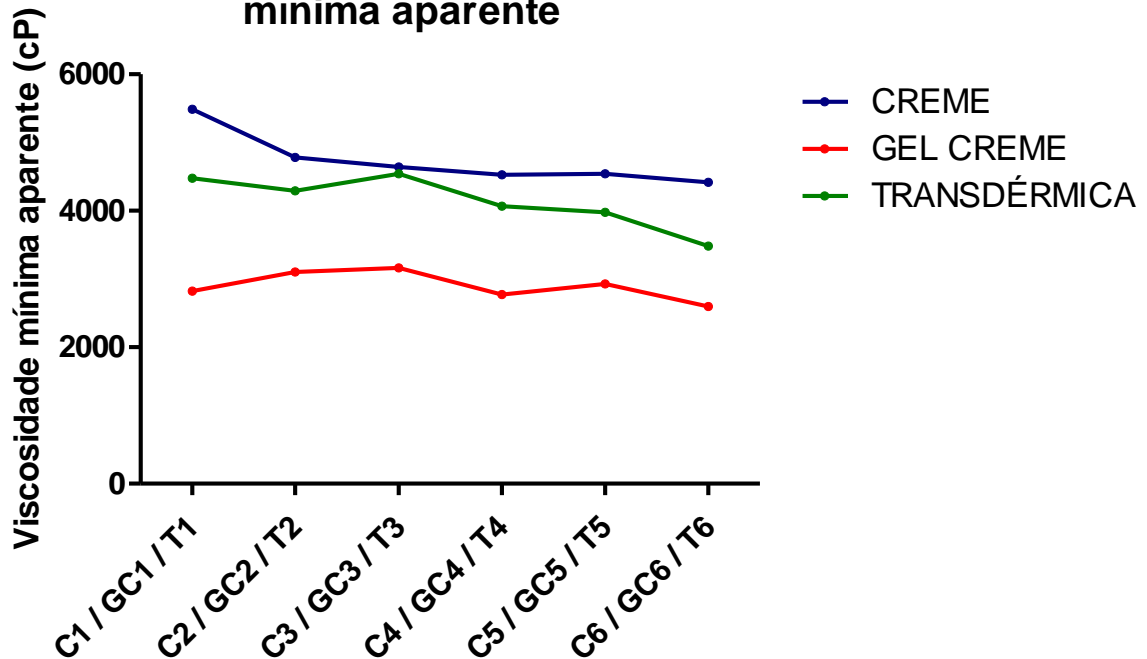
a) Comportamento do índice de fluxo das formulações desenvolvidas



b) Comportamento do índice de consistência das formulações desenvolvidas



c) Comportamento da viscosidade mínima aparente



4.5 Determinação do comportamento de textura

A análise de textura é definida como uma combinação de características mecânicas, geométricas e superficiais de um produto percebido por meio de receptores mecânicos. Trata-se de uma ferramenta útil para a análise de formulações tópicas, pois possibilita que o formulador entenda qual a contribuição de determinados componentes na formulação quanto à suas propriedades físicas para a escolha da formulação com menores valores tanto de consistência quanto de trabalho de cisalhamento, o que é desejável para formulações cosméticas com sensorial agradável (BAYARRI *et al.*, 2012; TAI *et al.*, 2014, CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2018).

A análise de textura é relevante e adequada para a caracterização mecânica de formulações semi-sólidas farmacêuticas, a fim de determinar interações entre componentes de formulação, sendo um bom complemento para as informações reológicas (MARTO *et al.*, 2016). Deste modo, as características de rigidez (parâmetros de firmeza e consistência) e adesividade (parâmetros de coesividade e índice de viscosidade) podem ser comparadas entre si e com os dados obtidos da análise sensorial (LUKIC *et al.*, 2011; TAI *et al.*, 2014; SHIRATA; MAIA CAMPOS, 2016).

É importante destacar que o sensorial está intimamente relacionado com os parâmetros físico-mecânicos. A coesividade, por exemplo, nos mostra o quão estruturada uma fórmula está. Quanto maiores seus valores, maior a viscosidade que ela apresentará e, desta forma, mais difícil será sua aplicação correta e agradável do produto cosmético, assim consequentemente durante a análise sensorial os valores referentes a espalhabilidade serão maiores (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

É descrito na literatura que os parâmetros de textura como índice de viscosidade, consistência, coesividade e trabalho de cisalhamento apresentam uma correlação linear proporcional, porém são inversamente proporcionais quando comparadas ao parâmetro de espalhabilidade obtido em análises sensoriais.

A formulação C3 mostrou diferenças significantes (Kruskal Wallis; $P < 0,05$) quando comparada com as formulações creme, no qual a C3 apresentou menores valores em relação a C1 nos parâmetros de firmeza, índice de viscosidade, e especialmente a coesividade, este resultado pode ser consequente da adição da substância ativa TIPA, a qual aumenta a proporção graxa da formulação C3 desestruturando a mesma em relação a C1, especialmente devido à disposição

espacial e o volume eletrônico da TIPA, assim, conseqüentemente alterando os parâmetros citados anteriormente (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros avaliados nos testes de textura e espalhabilidade das formulações creme após 24 horas do preparo das formulações (n=3).

	CREME				
	Firmeza (g)	Consistência (g.s)	Coesividade (g)	Índice de viscosidade (g.s)	Trabalho de cisalhamento (g.s)
C1	185.3 ± 0.9	699.9 ± 3.9	124.6 ± 1.1	1031.1 ± 5.1	101.2 ± 1.4
C2	157.7 ± 0.3	623.6 ± 2.0	109.8 ± 0.4	903.9 ± 0.5	98.8 ± 3.0
C3	147.8 ± 1.7	591.4 ± 5.4	100.2 ± 2.5	823.0 ± 4.2	105.4 ± 1.4
C4	150.0 ± 1.4	571.0 ± 4.2	102.9 ± 1.5	861.1 ± 4.0	102.6 ± 3.7
C5	149.3 ± 0.6	594.0 ± 3.7	102.8 ± 1.3	837.3 ± 3.5	96.5 ± 2.6
C6	160.8 ± 0.9	658.9 ± 1.4	110.6 ± 1.7	909.6 ± 1.9	99.7 ± 1.6

A formulação GC5, apresentou diferenças significantes (Kruskal Wallis; $P < 0,05$) quando comparada com as formulações gel creme, no qual a GC5 apresentou menores valores em relação a GC1 nos parâmetros de firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade.

A substância ativa HC apresenta-se na concentração máxima (1%) em CG5 e por ser um extrato glicólico favoreceu uma possível desestruturação da formulação devido à complexidade de metabolitos secundários presentes no extrato reduzindo, conseqüentemente, os parâmetros de textura citados anteriormente. Porém, ao se analisar a formulação CG4 que apresenta a substância ativa em uma concentração intermediária (0,5%) a mesma não apresentou diferenças significantes, mostrando que o aumento da concentração da substância ativa HC modifica as propriedades de textura da formulação (Tabela 3).

Estas alterações promovidas pela adição de HC em uma maior concentração corroboram com os dados obtidos na análise sensorial, pois nos parâmetros espalhabilidade e sensação de absorção a formulação CG5 apresentou menor frequência quando comparada com as outras formulações gel creme (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros avaliados nos testes de textura e espalhabilidade das formulações gel creme após 24 horas do repara das formulações (n=3).

GEL CREME					
	Firmeza (g)	Consistência (g.s)	Coesividade (g)	Índice de viscosidade (g.s)	Trabalho de cisalhamento (g.s)
GC1	101.9 ± 0.6	424.5 ± 08	68.1 ± 3.0	541.5 ± 1.1	98.4 ± 4.4
GC2	99.5 ± 0.3	417.4 ± 1.1	66.5 ± 2.2	531.4 ± 2.2	101.8 ± 1.1
GC3	93.2 ± 1.1	381.9 ± 1.8	60.4 ± 2.1	478.3 ± 2.1	106.1 ± 6.9
GC4	95.8 ± 0.4	403.11 ± 1.0	62.5 ± 0.8	502.1 ± 0.8	101.1 ± 1.0
GC5	80.9 ± 0.6	349.4 ± 1.0	51.1 ± 1.3	383.6 ± 0.5	105.0 ± 2.8
GC6	92.6 ± 0.6	387.0 ± 1.6	60.7 ± 1.2	486.5 ± 1.2	105.7 ± 7.8

As formulações transdérmicas não apresentaram diferenças significativas (Kruskal Wallis; $P < 0,05$) quando adicionadas de substâncias ativas. Houve alteração significativa apenas quando comparado a formulação T2 com T6, as quais apresentam as substâncias ativas TIPA (3%) e HN (1%), respectivamente, nos parâmetros de coesividade e índice de viscosidade. No entanto, a alteração conjunta nesses dois parâmetros corroboraram com a alta correlação de ambos como descrito na literatura (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017), uma vez que, apresentaram um coeficiente de correlação próximo a 1 no ranking de Spearman's e Pearson

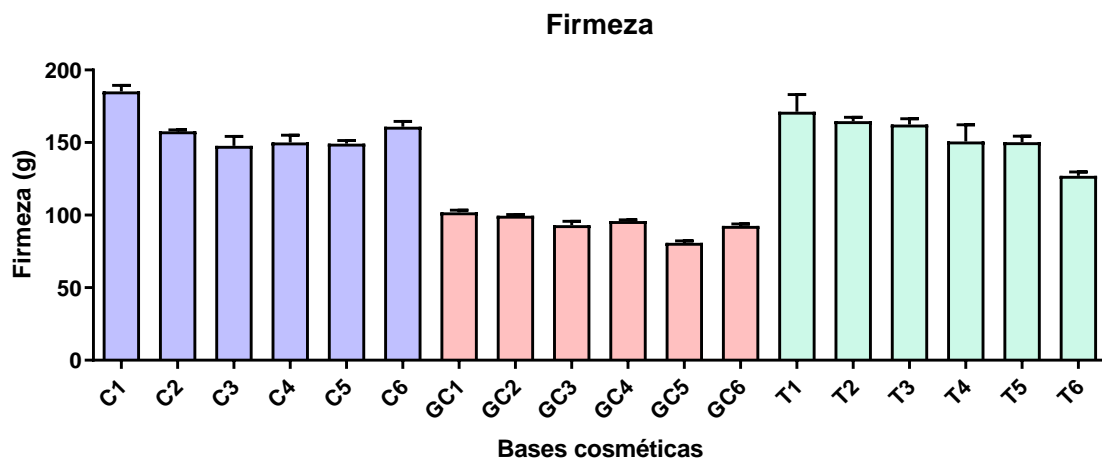
Além disso, todas as formulações não apresentaram diferença significativa no parâmetro trabalho de cisalhamento. Esse parâmetro é inversamente proporcional ao parâmetro espalhabilidade na análise sensorial e, como os valores de trabalho de cisalhamento são próximos ao resultado da espalhabilidade na análise sensorial, nas formulações transdérmicas esses valores também foram próximos (Figura 22).

Tabela 5. Parâmetros avaliados nos testes de textura e espalhabilidade das formulações do transdérmica após 24 horas do repara das formulações (n=3).

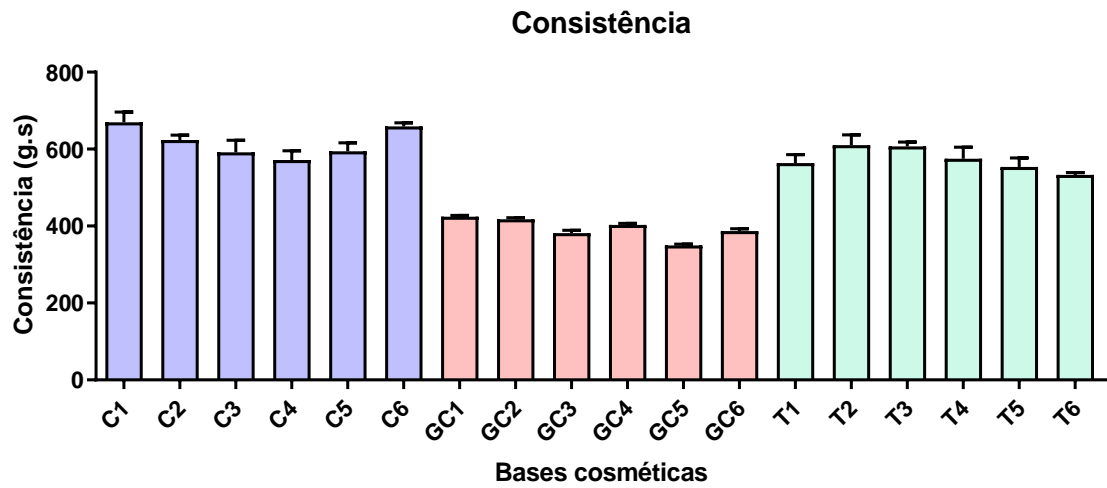
TRANSDÉRMICA					
	Firmeza (g)	Consistência (g.s)	Coesividade (g)	Índice de viscosidade (g.s)	Trabalho de cisalhamento (g.s)
T1	171.2 ± 2.8	564.0 ± 3.9	108.2 ± 6.6	816.6 ± 4.9	95.1 ± 3.4
T2	164.8 ± 0.7	610.2 ± 4.4	113.5 ± 2.7	902.3 ± 3.8	94.6 ± 2.6
T3	162.4 ± 1.0	607.3 ± 1.9	110.9 ± 2.5	875.0 ± 1.0	97.7 ± 1.6
T4	150.7 ± 3.1	575.2 ± 5.2	103.3 ± 4.0	829.6 ± 3.2	87.7 ± 6.6
T5	150.2 ± 1.1	553.5 ± 4.2	105.1 ± 1.8	786.6 ± 4.1	94.5 ± 2.9
T6	127.0 ± 0.9	532.7 ± 1.2	87.0 ± 1.8	698.0 ± 0.7	93.2 ± 2.2

Figura 22. (a) Parâmetro firmeza das formulações em relação a concentração das substâncias ativas. Diferença significativa entre as formulações creme e transdémica. (b) Parâmetro consistência das formulações em relação a concentração das substâncias ativas (c) Parâmetro coesividade das formulações em relação a concentração de substâncias ativas. (d) índice de viscosidade das formulações em relação a concentração de substâncias ativas. (e) Trabalho de cisalhamento das formulações em relação a concentração de substâncias ativas. Diferença significativa entre a formulação creme e a formulação gel creme (Kruskal Wallis; $P < 0,05$) $n=3$. .
 Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); Veículo transdémico (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).

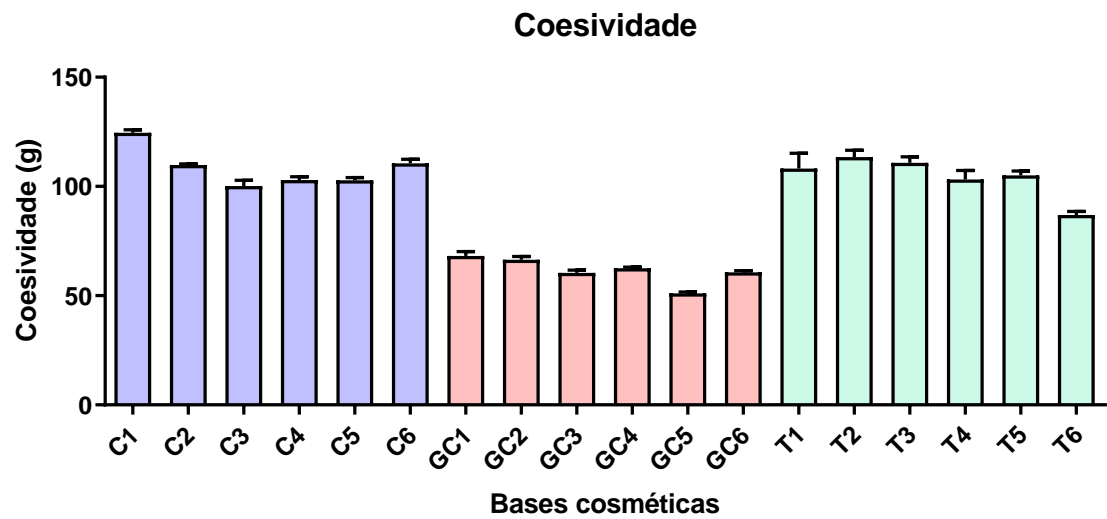
A)



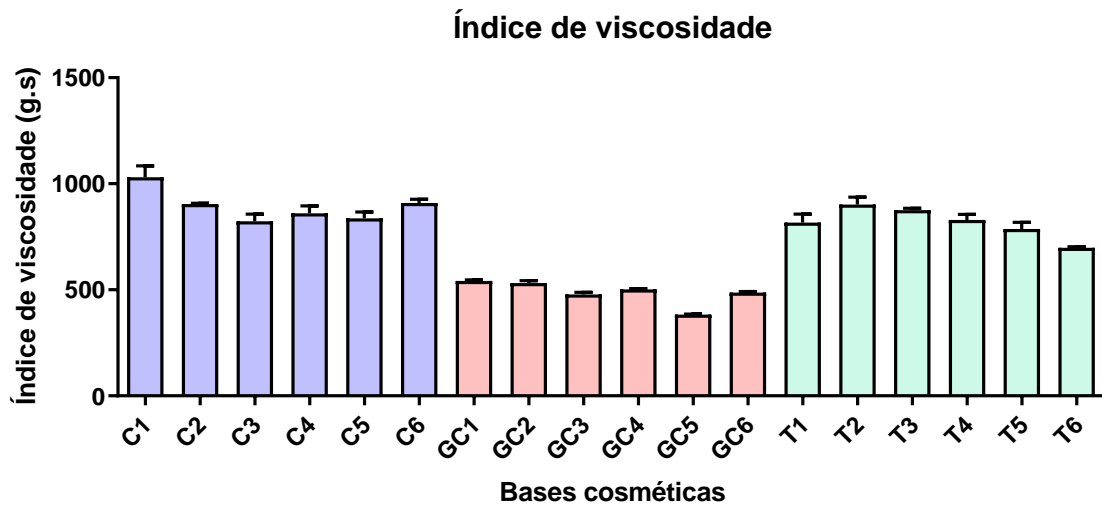
B)



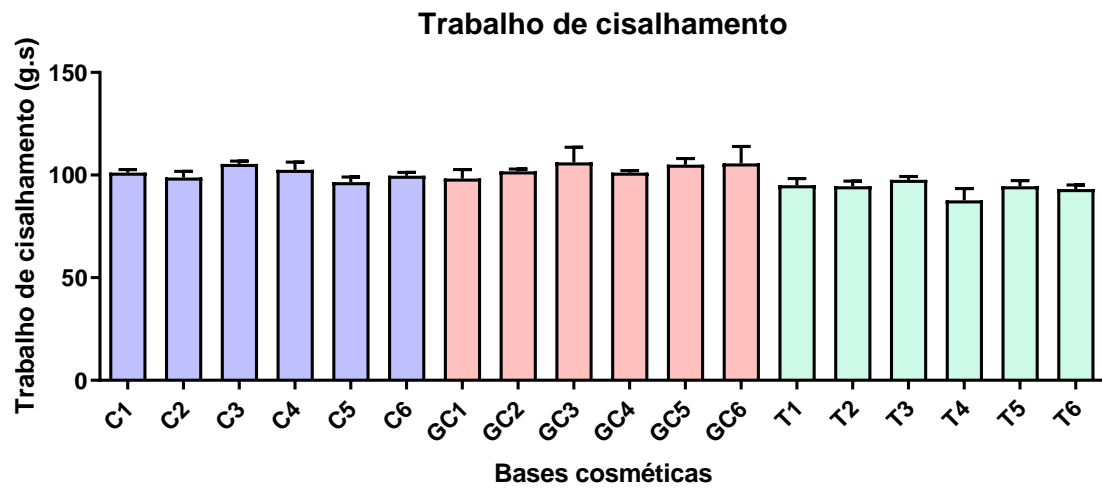
C)



D)



E)



4.6 Análise PCA entre as propriedades de textura e reologia

Os resultados obtidos nos parâmetros de textura e reologia avaliados foram submetidos a análise estatística PCA para compilar os dados em componentes principais, assim identificando quais fatores mais influenciam e se inter-relacionam em relação as propriedades de textura e reologia das formulações objeto de estudo.

A partir dos resultados obtidos observou-se que as 3 primeiras componentes principais representam mais de 95% da variabilidade das amostras, na qual PC1 representa 68,43%, PC2 20,72% e PC3 7,68% (Figuras 23 e 25).

A partir do loading plot podemos observar que PC1 e PC2 representam mais de 50% da variabilidade dos dados – aproximadamente 89%, desta forma, possuem alta influência e intercorrelação nos resultados obtidos. Pode-se verificar que os parâmetros de textura coesividade, firmeza, consistência e índice de viscosidade são fortemente influenciáveis e se inter-relacionam com os parâmetros tixotropia e viscosidade mínima aparente obtidos a partir da análise de reologia. Ou seja, dada a disposição destes elementos no plano cartesiano do loading plot quando ocorre uma alteração em alguns destes parâmetros todo o conjunto também sofrerá alguma alteração, devido a sua correlação positiva.

A análise PCA também nos permite avaliar a semelhança das amostras, desta forma, de acordo com o *score plot* (Figura 24) de PC1 e PC2, observa-se como as alterações nas formulações influenciam nas propriedades de textura e reologia das formulações veículos, porém em um aspecto geral cada tipo de formulação se mantém agrupada, desta forma demonstrando que as formulações apresentam alterações pontuais de acordo com a substância ativa presente conforme discutido no item 4.5.

Em relação a PC1 e PC3, a relação de ambas representa aproximadamente 76 % da variabilidade dos dados, desta relação podemos destacar a inter-relação entre os parâmetros de textura coesividade, consistência, firmeza e índice de viscosidade, pois estes aparecem agrupados corroborando com os dados obtidos na análise de PC1 e PCA (Figura 26).

Figura 23. *Loading plot* da PC1 X PC2 das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6 em relação aos parâmetros de textura e reologia.

Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); emulsão transdérmica (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).

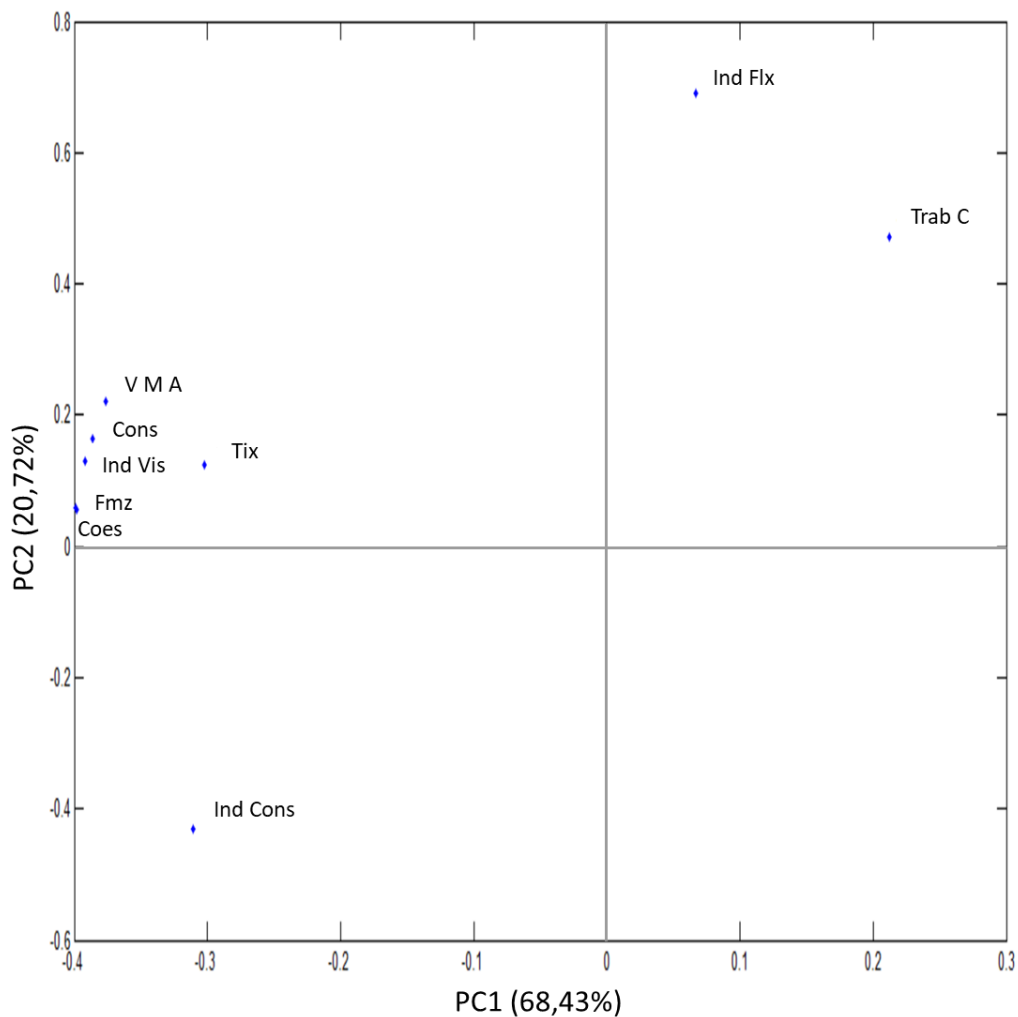


Figura 24. Score plot PC1 X PC2 das amostras das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6.

Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); emulsão transdérmica (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).

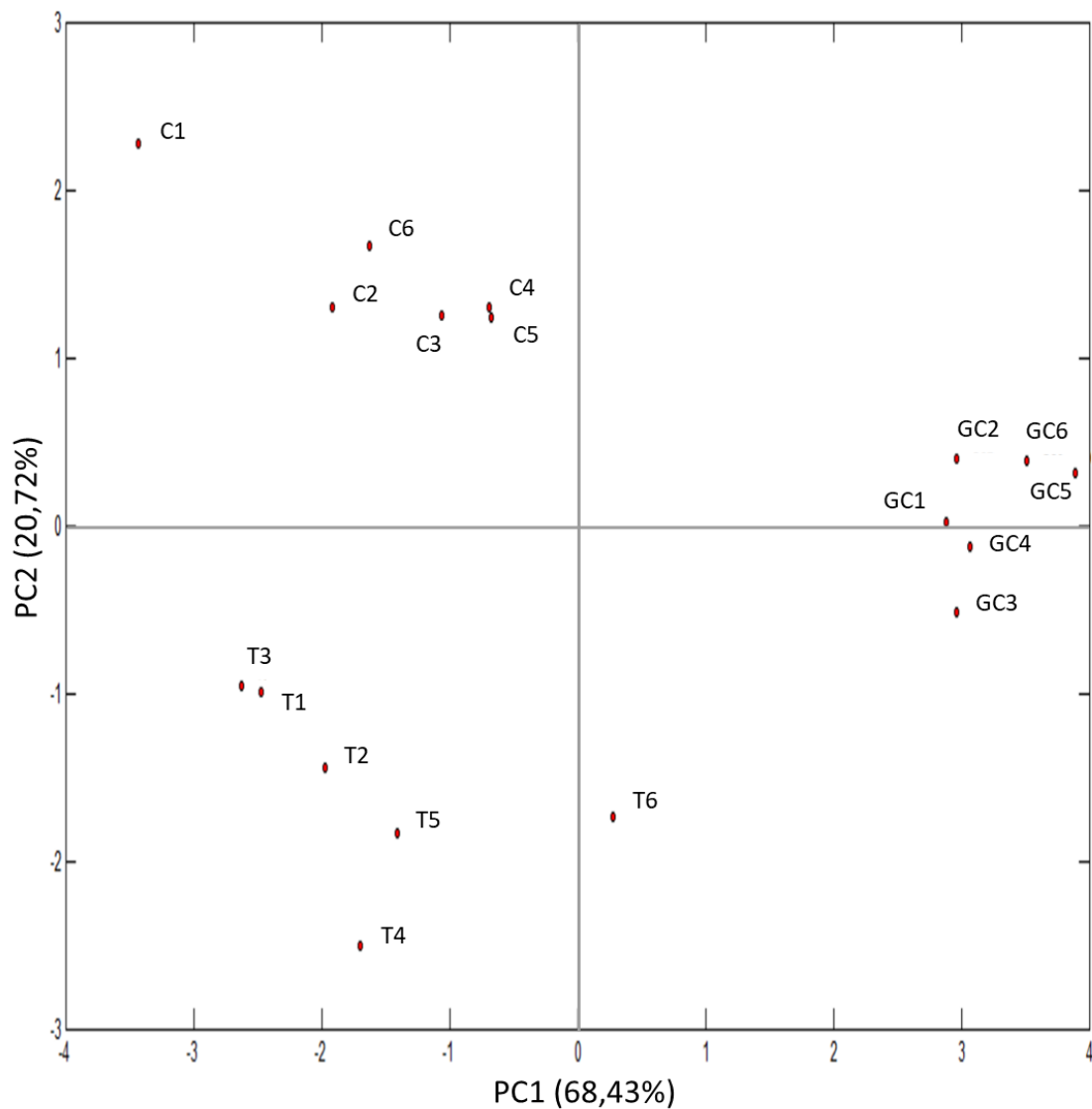
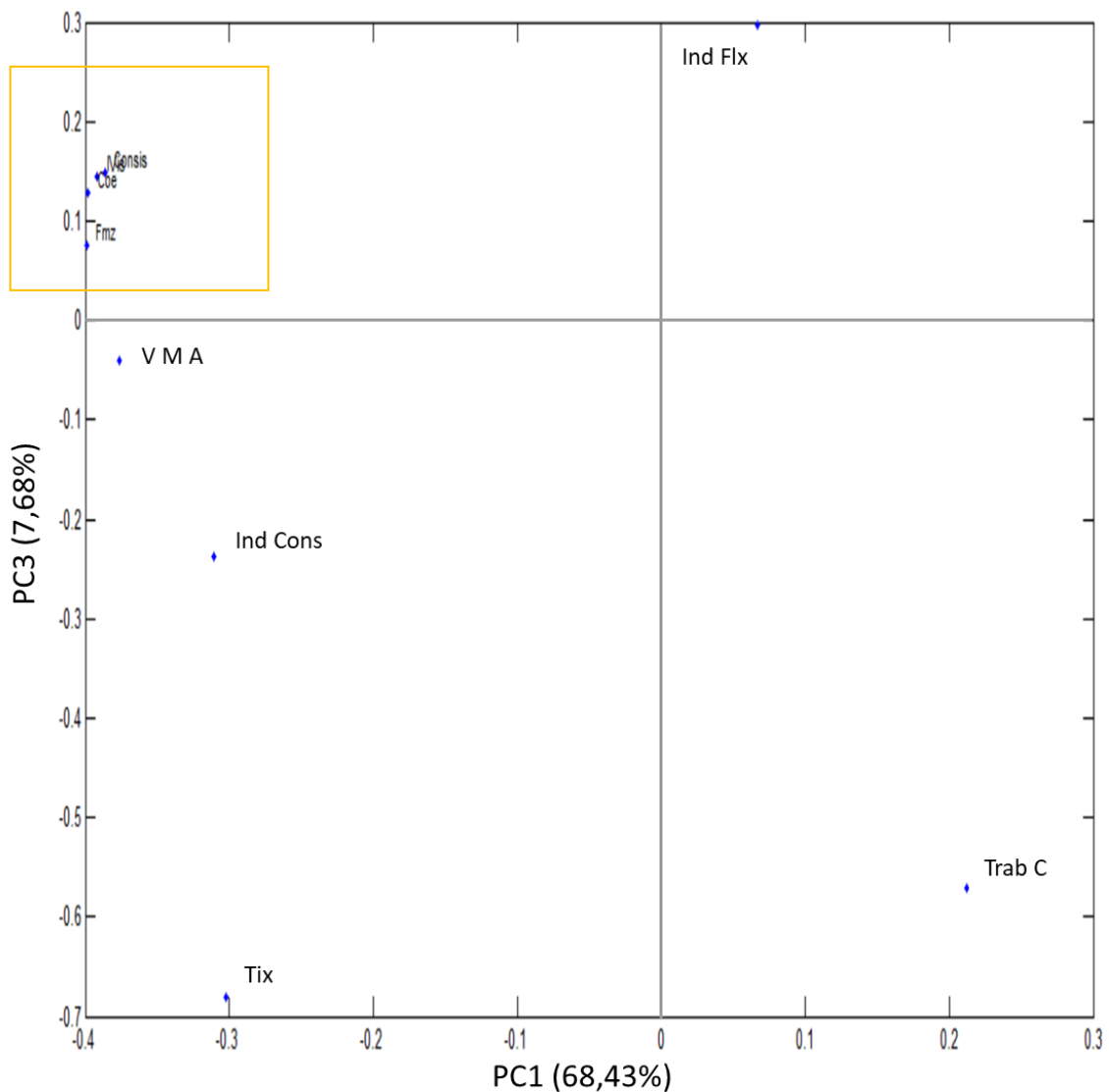


Figura 25. Loading plot da PC1 X PC3 das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6 em relação aos parâmetros de textura e reologia.

Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); emulsão transdérmica (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).



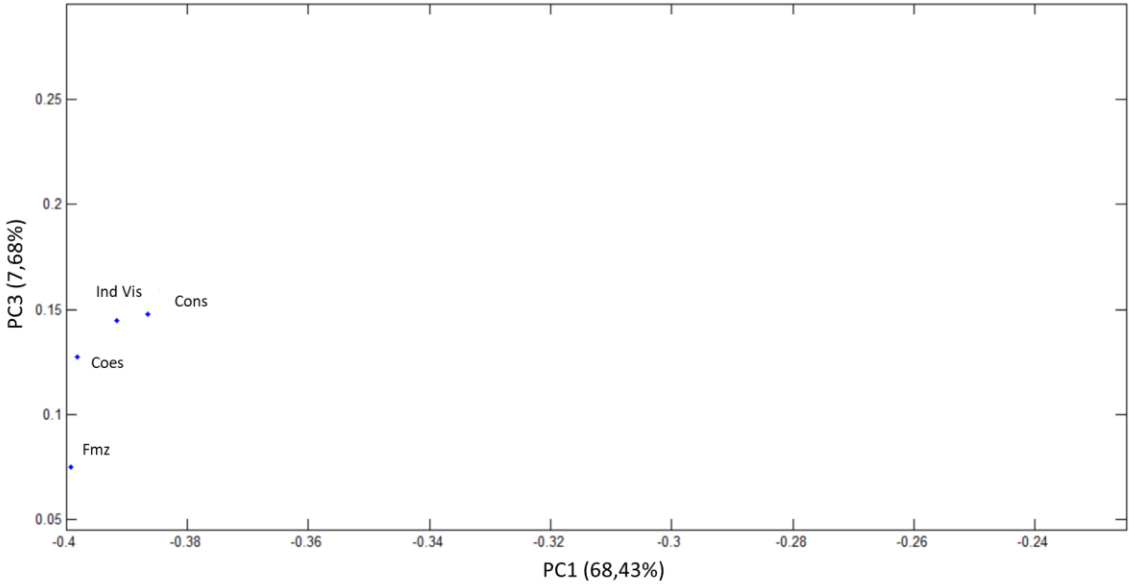
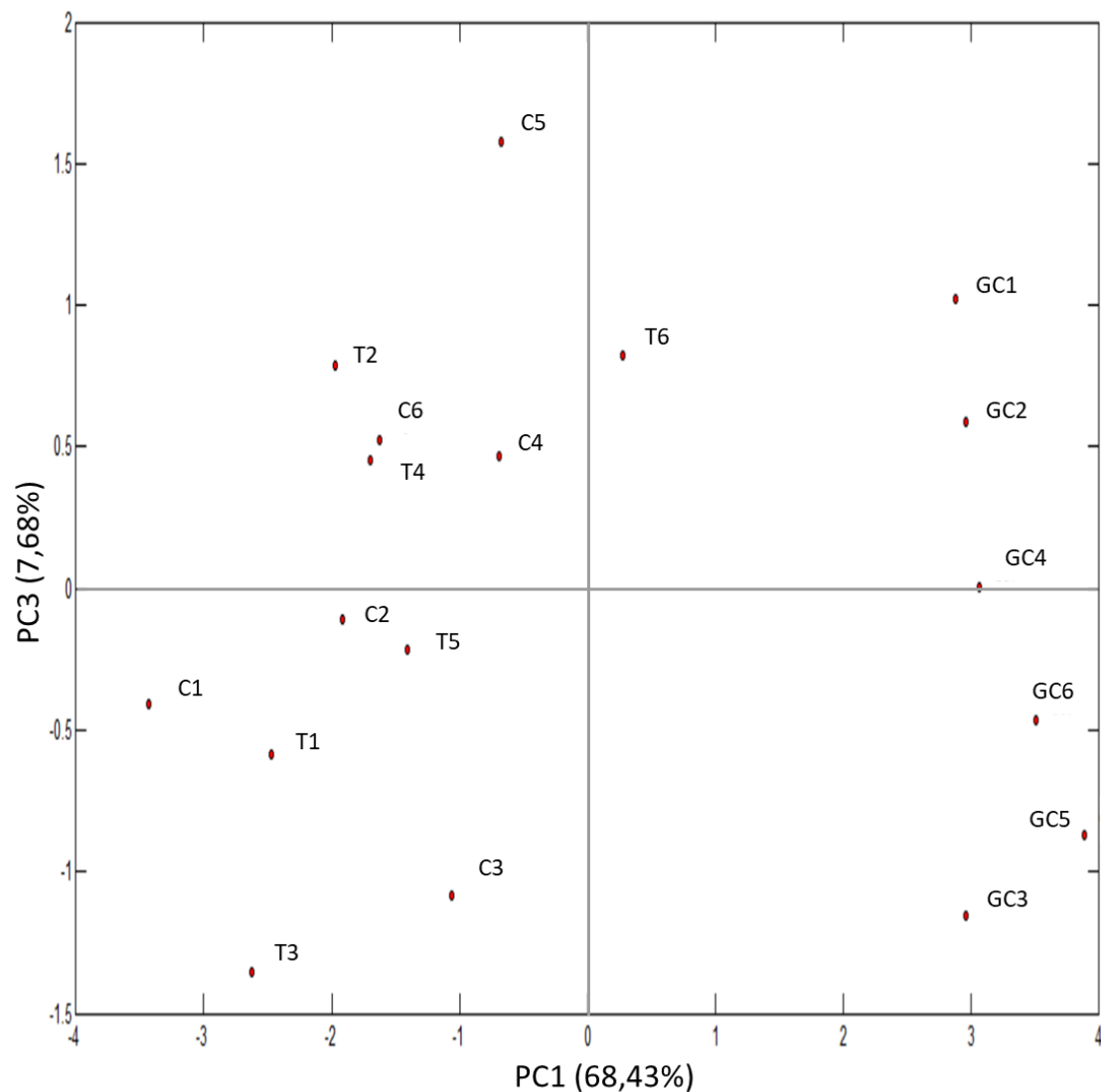


Figura 26. Score plot PC1 X PC3 das amostras das amostras de C1, C2, C3, C4, C5, C6, GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, T1, T2, T3, T4, T5 e T6.

Legenda: Veículo creme (C1), C1 com 3% de TIPA (C2), C1 com 10% de TIPA (C3), C1 com 0,5% de HC (C4), C1 com 1% de HC (C5) e C1 com 1% de HN (C6). Veículo gel creme (GC1), GC1 com 3% de TIPA (GC2), GC1 com 10% de TIPA (GC3), GC1 com 0,5% de HC (GC4), GC1 com 1% de HC (GC5) e GC1 com 1% de HN (GC6); emulsão transdérmica (T1), T1 contendo 3% de TIPA (T2), T1 contendo 10% de TIPA (T3), T1 contendo 0,5% de HC (T4), T1 contendo 1% de HC (T5) e T1 contendo 1% de HN (T6).



4.7 Avaliação do potencial de citotoxicidade e fototoxicidade das substâncias ativas

Foram determinados o potencial de citotoxicidade e fototoxicidade das substâncias ativas HC, HN e TIPA. A substância ativa HC não apresentou potencial de fototoxicidade, obtendo-se um valor de MPE (fotoefeito médio) equivalente a 0,007. O valor de MPE é obtido a partir da comparação das curvas de dose-resposta referentes a faixa de concentração da substância analisada quando UV irradiadas e não irradiadas. Não foi possível determinar o IC50, e conseqüentemente o potencial de citotoxicidade, da substância ativa HC nas concentrações avaliadas, pois na faixa de 10 – 100 mg/L da substância ativa não foi observado diminuição da viabilidade celular (Figura 28), ou seja, na concentração avaliada HC não apresenta potencial de citotoxicidade.

Em relação a HN obteve-se um MPE equivalente a -0,013. Assim, HN também não apresentou potencial de fototoxicidade, e também para HN, não foi possível determina o IC50 dela, dessa forma não apresentando potencial de citotoxicidade na faixa e concentração avaliada (Figura 29).

Por fim, em relação a TIPA obteve-se um MPE equivalente a -0,008. Assim, a TIPA não apresentou potencial de fototoxicidade, e também, não foi possível determina o IC50 dela, dessa forma não apresentando potencial de citotoxicidade na faixa e concentração avaliada (Figura 30).

Neste tipo de experimento valores entre 0,1 e 0,15 para MPE indicam um potencial de fototoxicidade da substância avaliada. Como controle positivo utilizou-se a substância norfloxacin - NOR que apresentou um MPE de 0,390 (Figura 27) (KAWAKAMI, GASPAR; 2015).

Os resultados obtidos mostraram que as substâncias ativas objeto de estudo não apresentam potencial de citotoxicidade ou fototoxicidade, o que é fundamental para a aplicação segura dessas substâncias, as quais precisam permear na epiderme viável para atuar sobre os melanócitos.

Figura 27. Curva dose-resposta do controle NOR quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV

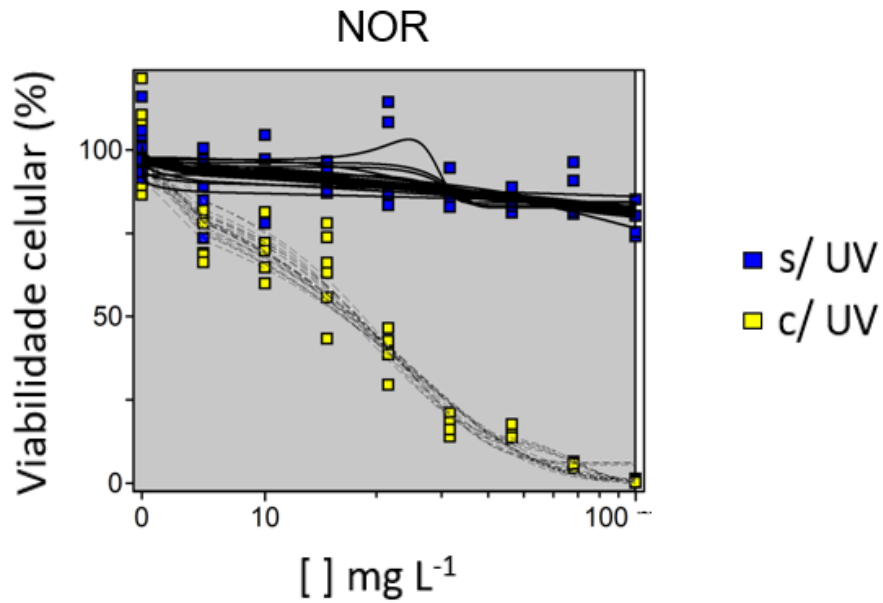


Figura 28. Curva dose-resposta da substância ativa HC quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV

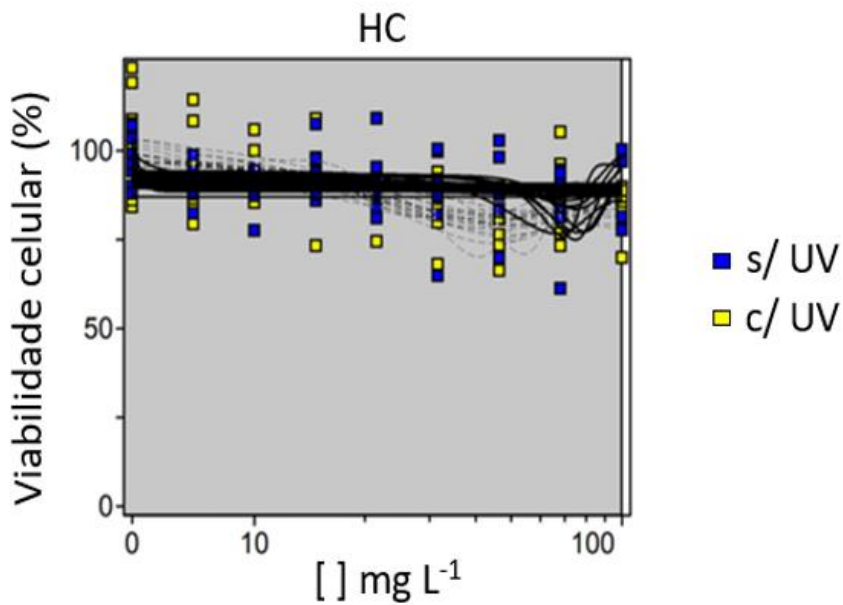


Figura 29. Curva dose-resposta da substância ativa HN quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV.

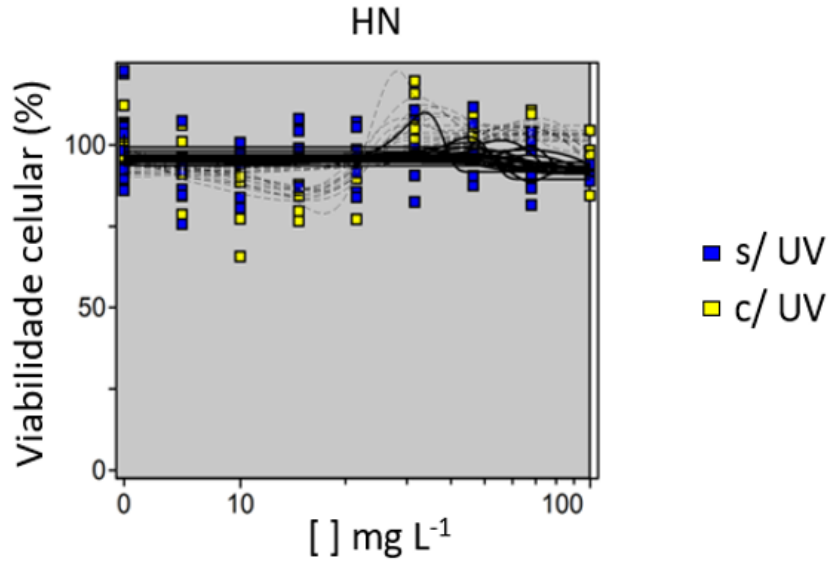
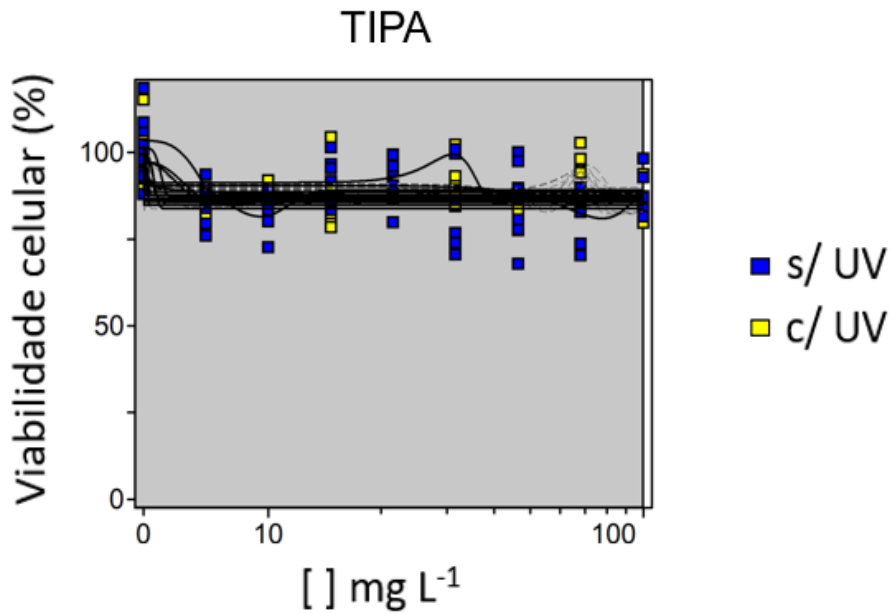


Figura 30. Curva dose-resposta da substância ativa TIPA quando exposta – pontos amarelos e não exposta – pontos azuis a radiação UV.



4.8 Validação metodologia analítica

O método de espectrometria de massas aplicado na metodologia analítica é inédito para a quantificação do derivado lipossolúvel de vitamina C.

A metodologia aplicada foi seletiva para a quantificação de TIPA na matriz biológica pele de orelha e porco e pele humana. Além disso, a faixa de concentração avaliada apresentou correlação linear, exata e precisa. Assim, o método analítico foi validado e, desta forma, garantindo uma maior confiança dos resultados obtidos no estudo de permeação.

Os resultados da validação do método analítico estão apresentados nas Figuras 31 a 34 e nas Tabelas 6 a 9.

4.8.1 Seletividade

A especificidade / seletividade do método foi confirmada pela ausência de pico interferente nas diferentes matrizes no tempo de retenção da TIPA.

Figura 31. Cromatogramas representando a seletividade do método analítico desenvolvido para a identificação do analito tetraisopalmitato de ascorbila. O cromatograma superior sinaliza a análise da amostra sem a presença do analito e o seguinte o analito presente na matriz. Tempo de retenção do analito 7,94 minutos.

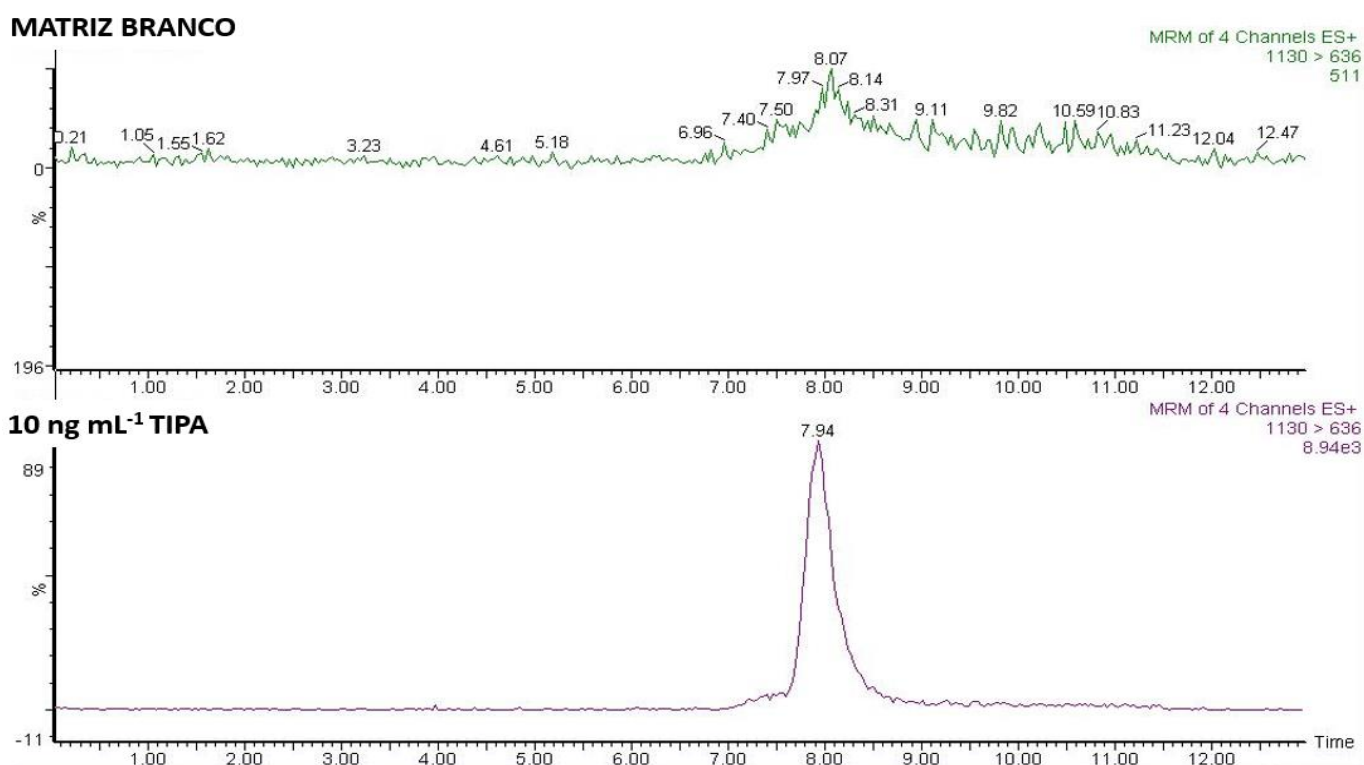
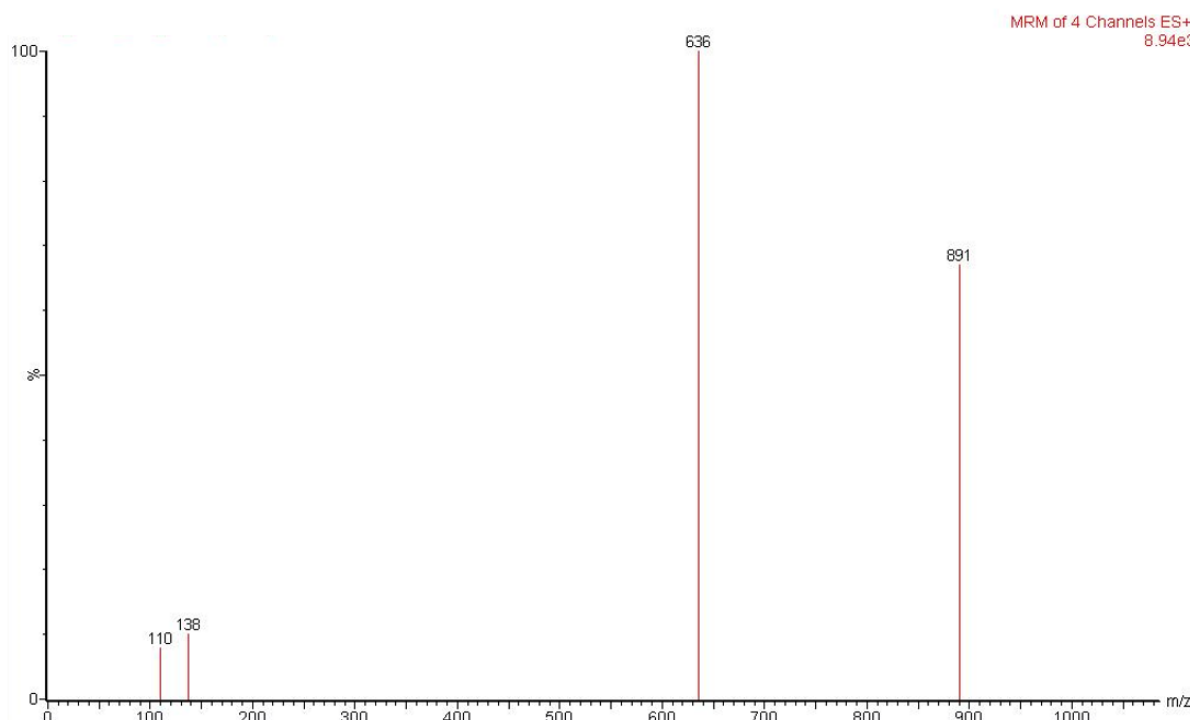


Figura 32. Espectro de massas do analito tetraisopalmitato de ascorbila, representando M/Z 1130 > 891 e 636, para as moléculas filho de identificação e quantificação, respectivamente.



4.8.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do cálculo do coeficiente de correlação (r) da curva na matriz construída com 5 pontos de concentração, no intervalo de 50; 100; 200; 400 e 800 ng mL⁻¹ que representa as seguintes concentrações de TIPA na amostra analisada 5,65; 11,30; 22,60; 45,20 e 90,40 µg de TIPA / cm² de pele. O valor obtido foi de $r = 0,99$ e $r^2 = 0,99$, o qual atende ao critério mínimo aceitável recomendado pela ANVISA ($r = 0,99$). O teste estatístico F (Fisher-Snedecor) foi utilizado para verificação do comportamento homocedástico dos dados observando-se um F calculado menor que o F crítico (tabelado).

Figura 33. Curva analítica plotado para avaliação da linearidade, sendo Y = resposta e X = concentração

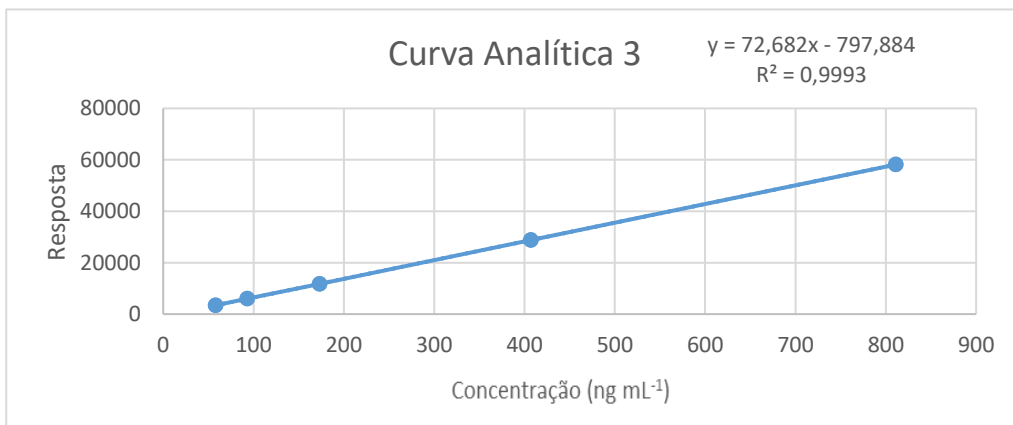
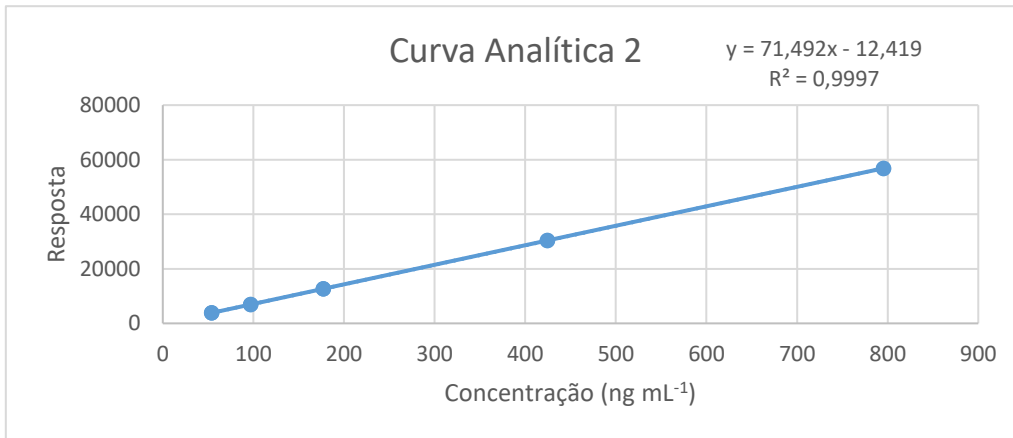
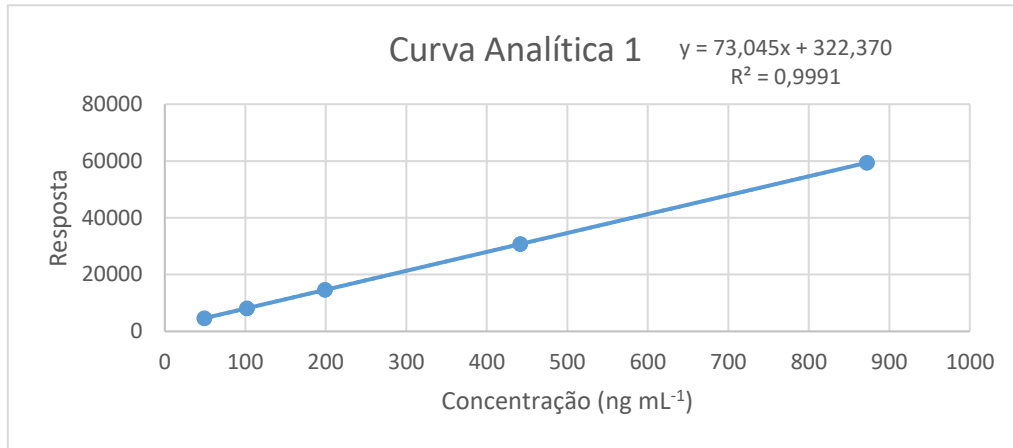
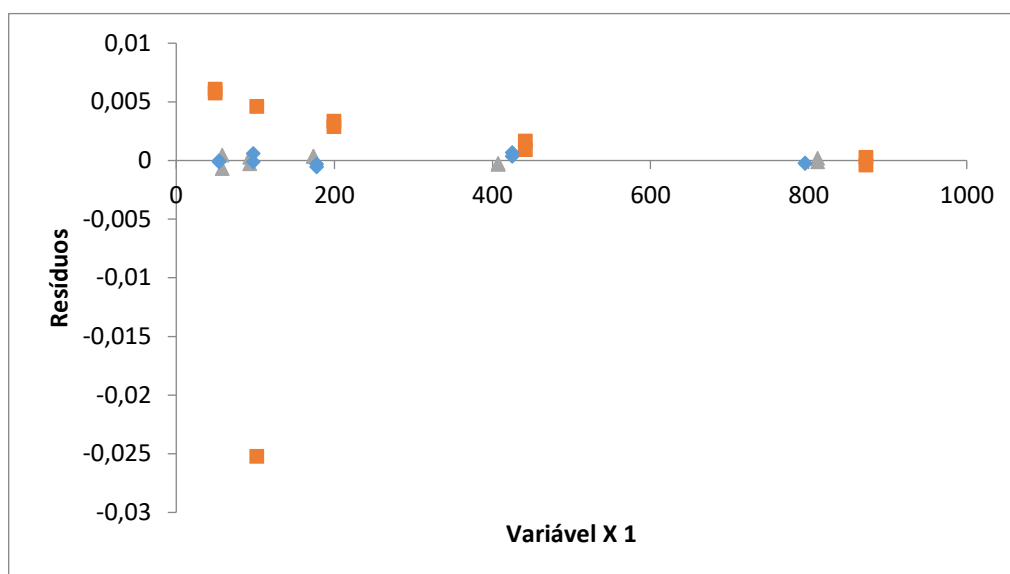


Figura 34. Gráficos de distribuição de resíduos.

4.8.3 Precisão

Os resultados da precisão intradia e interdias foram expressos através do coeficiente de variação (CV, %) dos resultados obtidos com 3 réplicas em 3 níveis de concentração (50, 100 e 150%) para a precisão intradia e do coeficiente de variação (CV %) dos resultados obtidos com 3 réplicas em 3 níveis de concentração (50, 100 e 150%) realizados em 3 dias consecutivos para a precisão interdia. O guia de validação de métodos bioanalíticos recomenda que em condições de precisão intradia e interdia do coeficiente de variação (%CV) não exceda 5%.

Tabela 06. Resultados de precisão intradia da TIPA

Analito	Concentração média (ng mL ⁻¹) teórica	CV (%)
TIPA	100	2,76
	200	3,92
	400	1,16

Tabela 07. Resultados de precisão interdia da TIPA.

Analito	Concentração média (ng mL ⁻¹) teórica	CV (%)
TIPA	100	3,61
	200	4,83
	400	4,05

4.8.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada mediante o ensaio de recuperação utilizando-se matriz com TIPA em 3 níveis de concentração correspondentes a 50, 100 e 150 % do valor esperado, o que correspondeu à concentrações de 100; 200 e 400 ng mL⁻¹ que representa as seguintes concentrações de TIPA na amostra analisada 11,30; 22,60 e 45,20 µg de TIPA / cm² de pele. De acordo com o guia de métodos bioanalítico, esses valores estão dentro da faixa de aceitação preconizada para este teste (95%-105%).

Tabela 08. Resultados do teste de exatidão para quantificação de TIPA

Analito	Concentração média (ng mL ⁻¹) teórica	Fator de Recuperação (%)	CV (%)
TIPA	100	97,33	3,30
	200	96,49	4,12
	400	104,10	3,62

4.8.5 Eficiência do processo de extração

Comparando amostras de analito puro diluído em solução diluente e analito em amostra de matriz fortificada, em três níveis de concentração, a eficiência de extração média para a TIPA é de 99,59%.

Tabela 09. Resultados obtidos na eficiência de extração.

Analito	Concentração média (ng mL ⁻¹) teórica	Eficiência de Extração (%)	Média (%)
TIPA	100	97,81	99,59
	200	101,32	
	400	99,65	

4.9 Estudo de permeação e penetração de TIPA

4.9.1 Estudo *In vitro* – Modelo pele de orelha de porco

Avaliou-se a permeação da substância ativa TIPA presente nas seguintes formulações C3, GC3 e T3, todas apresentando 10% de TIPA na formulação (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Quantificação da TIPA na epiderme viável + derme resultante da aplicação das formulações C3, GC3 e T3. (n=5)

Formulação	[] µg / cm ²	CV (%)
T3	28,9	9,3
C3	12,1	0,6
GC3	12,7	7,8

Tabela 11. Quantificação da TIPA no estrato córneo – *tape-stripping* resultante da aplicação das formulações C3, GC3 e T3. (n=5)

Formulação	[] µg / cm ²	CV (%)
T3	18,3	7,1
C3	11,4	2,3
GC3	10,7	3,8

A formulação T3 apresentou uma maior concentração de TIPA no estrato córneo e epiderme viável + derme quando comparada com as formulações C3 e GC3. A composição da formulação T3 facilitou a permeação da TIPA, está maior penetração

pode ser consequente da combinação sinérgica das matérias-primas que compõem ela, especialmente o agente emulsificante presente na mesma.

Agentes emulsificantes apresentam em sua composição tensoativos, as quais são substâncias que possuem a capacidade de diminuir a energia termodinâmica do sistema coloidal e influenciam na penetração e permeação de substâncias pois, aumentam a fluidez das bicamadas lipídicas do estrato córneo, a interação com proteínas intercelulares, promovem a ruptura ou extração de lipídios intercelulares, aumento da atividade termodinâmica da droga e aumento na hidratação do estrato córneo (LANE, 2013; ALKILANI, et al., 2015).

Em T3 observa-se a presença do agente emulsificante Emulsifying Wax NF sendo este composto pelo tensoativo não iônico Polysorbate 60 e pelo agente de consistência/coemulsificante Cetearyl Alcohol, entretanto nas formulações C3 e GC3 são compostas pelos tensoativos Dicetyl Phosphate e Ceteth-10 Phosphate ambos aniônicos, e a mesma também apresenta o Cetearyl Alcohol. Na literatura é descrito que tensoativos aniônicos provocam danos na função barreira da pele e, conseqüentemente, favorecem a permeação de substâncias ativas, já os não iônicos possuem a capacidade de desestruturar o manto lipídico de uma forma menos agressiva quando comparados aos tensoativos iônicos (LANE, 2013; ALKILANI, et al., 2015).

Assim nas presentes condições de estudo utilizando o modelo de pele de orelha de porco o tensoativo não iônico em sinergia aos outros componentes da formulação T3 promoveu de forma mais eficiente a permeação da substância ativa TIPA quando comparada as outras formulações.

4.9.2 Estudo *In vitro* e *In vivo* – Modelo pele humana

Ao se avaliar a permeação e penetração da substância ativa TIPA presente nas formulações C3, GC3 e T3 utilizando o modelo de pele humana *in vivo* e *in vitro*, observa-se resultados que corroboram com o modelo de orelha de porco, porém com algumas observações.

A formulação GC3 apresentou resultado semelhante na retenção da TIPA no estrato córneo no modelo de pele de orelha de porco e humana, desta forma,

demonstrado que a redução da concentração do sistema emulsionante e a presença do polímero de acrilato impactaram na permeação da TIPA quando comparada a C3 e T3.

Este menor desempenho pode ser resultante da ineficiência da formulação em desestabilizar o estrato córneo e, além disso, associado as propriedades de textura e reologia desta formulação, pois parâmetros como a espalhabilidade, índice de viscosidade e coesividade influenciam na distribuição e deposição uniforme da formulação sobre a pele, assim influenciando na permeação da TIPA pela alteração da interação entre a pele e formulação (LANE, 2013; ALKILANI, et al., 2015; EUDIER, et al. 2019; FAUCHEUX, et al., 2020).

Figura 35. Quantificação da TIPA no estrato córneo – *tape-stripping* resultante da aplicação das formulações C3 e T3. (n≥4)

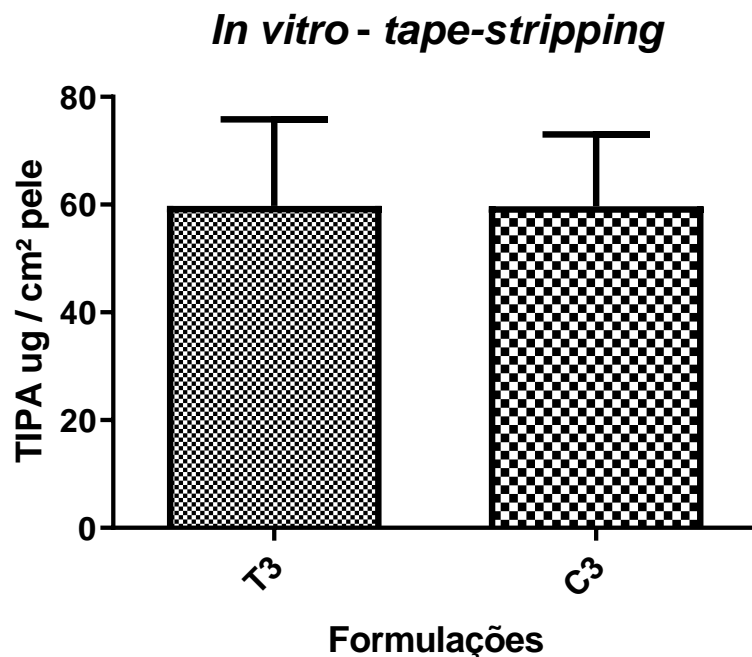


Figura 36. Quantificação da TIPA na epiderme viável + derme resultante da aplicação das formulações C3 e T3. (n≥4)

Permeação *In vitro* na Epiderme viável + Derme

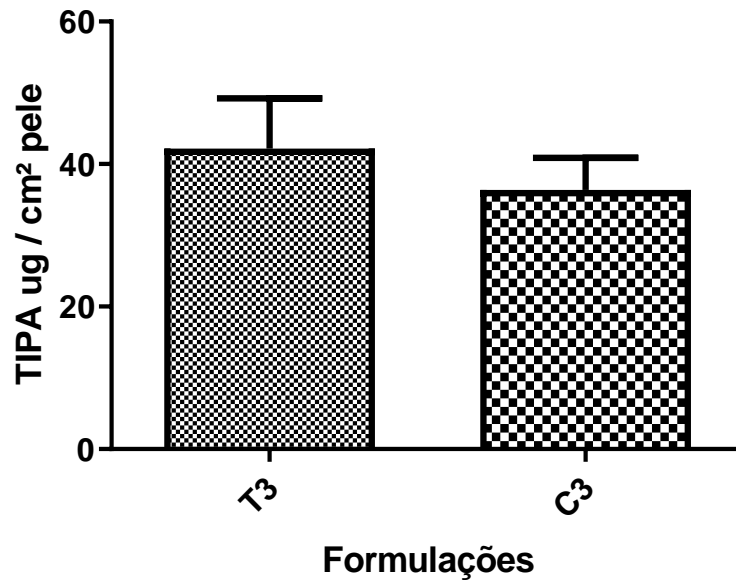
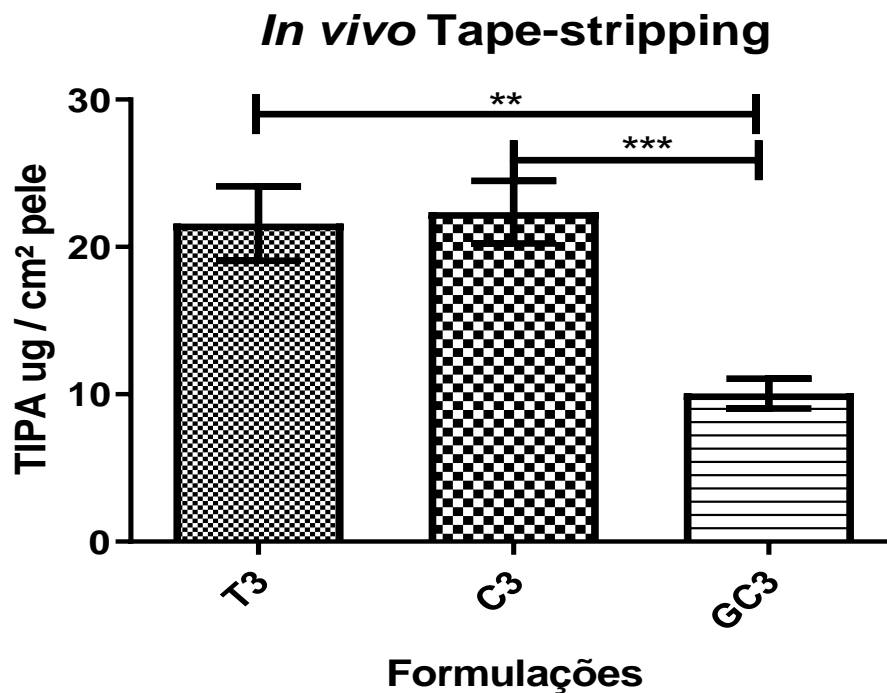


Figura 37. Quantificação da TIPA no estrato córneo – *in vivo* tape-stripping resultante da aplicação das formulações C3, GC3 e T3. (n=13). ** Significante em relação a GC3
***Significante em relação a GC3



A formulação C3 no modelo de pele humana apresentou maior permeação nos testes *in vivo* e *in vitro* quando comparado com o modelo de orelha de porco. A pele de orelha de porco estruturalmente é semelhante a pele humana, sendo amplamente utilizada como de modelo de permeação e retenção (KHIAO, et al., 2019). Porém em relação à composição a pele humana apresenta diferenças que influenciam na penetração de substâncias ativas. Diversos estudos demonstram que qualitativamente o estudo de permeação em ambas são iguais, porém quantitativamente os resultados são diferentes (CHOE, et al., 2015; RANAMUKHAARACHCHI, et al., 2016). Além disso, estudos com pele humana mimetizam melhor as reais condições de aplicação de formulações tópicas, especialmente, dermocosméticas e contribuem para a redução do uso de animais.

Andega e colaboradores (2001) demonstraram que substâncias alcoólicas com cadeia alifáticas longas apresentaram maior permeação em pele humana quando comparada a pele de orelha de porco. Desta forma, a presença de longas cadeias alifáticas na TIPA (isopalmitato) podem influenciar na maior permeação no modelo de pele humana comparado ao modelo de pele de orelha de porco.

Em relação à formulação T3, observa-se que em ambos os modelos os resultados mostraram que a emulsão transdérmica apresentou um melhor desempenho como veículo para a permeação da TIPA, tanto no estrato córneo como na epiderme viável e derme, o que pode ser resultante do sistema emulsionante composto pelo tensoativo não iônico Polysorbate 60 e pelo agente de consistência/coemulsificante Cetearyl Alcohol. Além disso, as propriedades de textura e reológicas influenciam na homogeneidade da formulação sobre a pele (RODRIGUES, et al., 2016; TAKAHASHI, et al., 2018; EUDIER, et al. 2019; FAUCHEUX, et al., 2020).

As formulações T3 e C3 apresentaram um bom desempenho na permeação da TIPA comparadas com GC3 e com T3, mostrando uma performance levemente superior à C3, o que pode ser devido às propriedades de textura e reológicas semelhantes, pois, esses parâmetros influenciam na interação entre pele e formulação. Essa interação é resultante da homogeneidade da formulação sobre a pele, uma vez que, parâmetros como espalhabilidade, tixotropia e índice de viscosidade modulam a distribuição e deposição da formulação no microrrelevo da pele (EUDIER, et al. 2019; FAUCHEUX, et al., 2020).

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais desse estudo foi possível concluir que:

As substâncias ativas objeto de estudo não apresentam potencial de citotoxicidade e fototoxicidade, sendo consideradas seguras.

As formulações desenvolvidas foram estáveis e apresentaram comportamento reológico não newtoniano do tipo pseudoplástico.

As formulações com maior carga oleosa – emulsão transdérmica e creme, apresentaram resultados de perfil de textura e propriedades sensoriais semelhantes, porém a emulsão transdérmica obteve melhores resultados nos parâmetros avaliados.

O método analítico proposto apresentou conformidade para a quantificação do derivado lipossolúvel de vitamina C.

O modelo de pele humana apresentou resultados de permeação no estrato córneo e epiderme viável + derme, os quais mimetizam melhor as reais condições de aplicação das formulações dermocosméticas contendo o derivado lipossolúvel de vitamina C.

A emulsão transdérmica apresentou os melhores resultados no estudo de permeação tanto no modelo de pele de orelha de porco e pele humana *in vivo* e *in vitro* sendo, portanto, sugerida como uma nova abordagem no tratamento de hiperpigmentações cutâneas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Vol. 1, 2014.
http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-

[1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=108217&_101_type=document](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=108217&_101_type=document). < Acessado as 21:59 horas horário de Brasília em 19 de junho de 2019 >.

AREZKI, N. R.; WILLIAMS, A. C.; COBB, A. J. A.; BROWN, M. B. Design, synthesis and characterization of linear unnatural amino acids for skin moisturization. **International journal of cosmetic science**, v.31, p.72-82, 2016.

ATTWOOD, DAVID; FLORENCE, ALEXANDER TAYLOR; ROTHSCCHILD, ZULEIKA. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Vol. 4. Edusp, cap. 7, pág. 345-411, 2003.

BASU, S.; SHIVHARE, U.S. Rheological, textural, micro-structural and sensory properties of mango jam. **Journal of food engineering**. v.100, n.2, p.357-365, 2010.

BAYARRI, S.; CARBONELL, I.; COSTELL, E. Viscoelasticity and texture of spreadable cheeses with different fat contents at refrigeration and room temperatures. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 12, p. 6926-6936, 2012.

Bragazzi, N. L.; Sellami, M.; Salem, I.; Conic, R.; Kimak, M.; Pigatto, P. D. M.; & Damiani, G. Fasting and its impact on skin anatomy, physiology, and physiopathology: A comprehensive review of the literature. **Nutrients**, 11(2), 249, 2019.

CALIXTO, L. S.; INFANTE, V. H. P.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements; **American association of pharmaceutical scientists**, V.19, n.4, p.1512–1519, 2018.

CALIXTO, L. S.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Physical Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and

sensorial properties. **International journal of cosmetic science**, v. 39, p. 527-534, 2017.

CAMPOS, P. M. B. G.; GIANETI, M. D.; CAMARGO JR, F. B.; & GASPAR, L. R. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, 82(3), 580-586. 2012.

COBIOISA, HidrOlive+ - Technical Information, 2016.

DENNIS, K. K.; AUERBACH, S. S.; BALSHAW, D. M.; CUI, Y.; FALLIN, M. D.; SMITH, M. T.; & MILLER, G. W.. The importance of the biological impact of exposure to the concept of the exposome. **Environmental health perspectives**, 124(10), 1504, 2016.

DHARADHAR, S.; MAJUMDAR, A.; DHOBLE, S.; & PATRAVALE, V. Microneedles for transdermal drug delivery: a systematic review. **Drug development and industrial pharmacy**, 45(2), 188-201, 2019.

DOOLEY, L.; LEE, Y. S.; & MEULLENET, J. F. The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. **Food quality and preference**, 21(4), 394-401, 2010.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in dermatology**, v. 13, n. 4, p. 375–380, 1995.

ELIAS, P. M.; BROWN, B. E.; FRITSCH, P.; GOERKE, J.; GRAY, G. M.; & WHITE, R. J. Localization and composition of lipids in neonatal mouse stratum granulosum and stratum corneum. **Journal of investigative dermatology**, 73(5), 339-348, 1979.

FOWLER, J. Understanding the role of natural moisturizing factor in skin hydration. **Pract Dermatol**, 9, 36-40, 2012.

FRANZ, T. J.; & LEHMAN, P. A. The skin as a barrier: structure and function. In *Biochemical Modulation of Skin Reactions: Transdermals, Topicals, Cosmetics* (pp. 15-33). **CRC Press Boca Raton, FL**, 2000.

FU, C.; CHEN, J.; LU, J.; YI, L.; TONG, X.; KANG, L.; ... & ZHAO, X. Roles of inflammation factors in melanogenesis. **Molecular Medicine Reports**, 21(3), 1421-1430, 2020.

GANDOLFI, A.; IANNELLI, M.; & MARINOSCHI, G. The Basal Layer of the Epidermis: A Mathematical Model for Cell Production Under a Surface Density Constraint. **SIAM Journal on Applied Mathematics**, 80(1), 543-571, 2020.

GARBOSSA, W. A. C.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Euterpe oleracea, Matricaria chamomilla, and Camellia sinensis as promising ingredients for development of skin care formulations. **Industrial Crops and Products** 83: 1-10, 2016.

GIANETI, M. D.; GASPAR, L. R.; BUENO DE CAMARGO JÚNIOR, F.; & BERARDO GONÇALVES MAIA CAMPOS, P. M. Benefits of combinations of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetic formulations. **Molecules**, 17(2), 2219-2230, 2012.

GOLDBERG, D. J.; MRAZ-ROBINSON, D.; & GRANGER, C. Efficacy and safety of a 3-in-1 antiaging night facial serum containing melatonin, bakuchiol, and ascorbyl tetraisopalmitate through clinical and histological analysis. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 19(4), 884-890. (2020).

GRANDAHL, K.; ERIKSEN, P.; IBLER, K. S.; BONDE, J. P.; & MORTENSEN, O. S. Measurements of solar ultraviolet radiation exposure at work and at leisure in Danish workers. **Photochemistry and photobiology**, 94(4), 807-814, 2018.

HARDING, C.R.; LONG, S.; RICHARDSON, J.; ROGERS, J.; ZHANG, Z.; BUSH, A.; RAWLINGS, A.V. The cornified cell envelope: an important marker of stratum corneum maturation in healthy and dry skin. **International Journal of Cosmetic Science**. v.25, n.4, p.157-67, 2000.

HERZOG, BERND; OSTERWALDER, ULI. Simulation of sunscreen performance. **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9-10, p. 937-951, 2015.

HEWITT, Julian; DAHMS, G. H. Rheology-its effect on physical SPF's. **Soap Perfumery and Cosmetics**, v. 69, n. 3, p. 23, 1996.

Houben, E.; De Paepe, K.; Rogiers, V. A Keratinocyte's Course of Life. **Skin pharmacology and physiology**, v. 20, n.3, p. 122-132, 2007.

Hu, T.; He, X. W.; Jiang, J. G.; & Xu, X. L. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(7), 1449-1455, 2014.

Ikeuchi-Takahashi, Y.; Kobayashi, A.; Ishihara, C.; Matsubara, T.; Matsubara, H.; Onishi, H. Influence of Polysorbate 60 on Formulation Properties and Bioavailability of Morin-Loaded Nanoemulsions with and without Low-Saponification-Degree Polyvinyl Alcohol. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 41(5), 754-760. (2018).

Jeon, J. S.; Kim, H. T.; Kim, M. G.; Oh, M. S.; Hong, S. R.; Yoon, M. H.; ... & Abd El-Aty, A. M. Simultaneous detection of glabridin, (-)- α -bisabolol, and ascorbyl tetraisopalmitate in whitening cosmetic creams using HPLC-PAD. **Chromatographia**, 79(13-14), 851-860. (2016).

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. Pele e anexos. *Histologia Básica*, ed, v. 12, p. 303–309, 2013.

Kabashima, K.; Honda, T.; Ginhoux, F.; & Egawa, G. The immunological anatomy of the skin. **Nature Reviews Immunology**, 1, 2018.

Kawakami, C. M.; & Gaspar, L. R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 239-247, 2015.

Khiao In, M.; Richardson, K. C.; Loewa, A.; Hedtrich, S.; Kaessmeyer, S.; & Plendl, J. Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. **Anatomia, histologia, embryologia**, 48(3), 207-217. (2019).

Kim, J. Y.; Song, J. Y.; Lee, E. J.; Park, S.K. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel networks system. **Colloid and Polymer Science.**, v.281, p.614-623, 2003.

KRUTMANN, J.; BOULOC, A.; SORE, G.; BERNARD, B. A.; & PASSERON, T. The skin aging exposome. **Journal of dermatological science**, 85(3), 152-161, 2017.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International journal of pharmaceutics**, 447(1-2), 12-21, 2013.

LEE C.H.; MOTURI, V.; LEE, Y.; Thixotropic property in pharmaceutical formulations, **Journal of Controlled Release**, v.136 p.88–98, 2009.

LEMOS, C. N.; PEREIRA, F.; DALMOLIN, L. F.; CUBAYACHI, C.; RAMOS, D. N.; & LOPEZ, R. F. Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization. **Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs** (pp. 187-248). William Andrew Publishing, 2018.

LOPES, L. B.; J GARCIA, M. T.; & LB BENTLEY, M. V. Chemical penetration enhancers. **Therapeutic delivery**, 6(9), 1053-1061, 2015.

LUCERO, M. J.; FERRIS, C.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, C. A.; JIMENEZ-CASTELLANOS, M. R.; & DE-PAZ, M. V. Novel aqueous chitosan-based dispersions as efficient drug delivery systems for topical use. Rheological, textural and release studies. **Carbohydrate polymers**, 151, 692-699, 2016.

LUKIC, M.; JAKSIC, I.; KRSTONOSIC, V.; CEKIC, N.; & SAVIC, S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and in vivo skin performance. **International journal of cosmetic science**, 34(2), 140-149, 2012.

MAHESH, S. K.; FATHIMA, J.; & VEENA, V. G. Cosmetic potential of natural products: industrial applications. **In Natural Bio-active compounds** (pp. 215-250). Springer, Singapore. (2019).

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; MERCURIO, D. G. Formas Cosméticas. **Cosmetics & Toiletries** (Ed. português), v. 26, p. 1-5, 2014.

MARCON, A. F. V. S.; WAGEMAKER, T. A.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheology, clinical efficacy and sensorial of a silicone-based formulation containing pearl extract. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, 11(2), 247-55, 2014.

MARTO, J.; ASCENSO, A.; SIMOES, S.; ALMEIDA, A. J.; RIBEIRO, H. M. Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. **Expert opinion on drug delivery**, 13(8), 1093-1107, 2016.

MENON, G. K.; LEE, S. E.; & LEE, S. H. An overview of epidermal lamellar bodies: novel roles in biological adaptations and secondary barriers. **Journal of dermatological science**, 92(1), 10-17, 2018.

MENON, G. K.; KLIGMAN, A. M. Barrier functions of human skin: a holistic view. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 4, p. 178–189, 2009.

MILLER, G. W.; JONES, D.P. The Nature of Nurture: Refining the Definition of the Exposome. **Toxicological Sciences** 137 (1): 1–2. January, 2014.

NARDA, M.; BROWN, A.; MUSCATELLI-GROUX, B.; GRIMAUD, J. A.; GRANGER, C. Epidermal and Dermal Hallmarks of Photoaging are Prevented by Treatment with Night Serum Containing Melatonin, Bakuchiol, and Ascorbyl Tetraisopalmitate: In Vitro and Ex Vivo Studies. **Dermatology and Therapy**, 10(1), 191-202. (2020)

NEXIRA, Oli-Ola - Technical Information, 2016.

NIKKOL, Nikkol VC-IP - Technical Information, 2017.

NIKOLAKIS, G.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. Aging Skin: A Window to the Body. **Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases**, 200-228, 2016.

OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (Original Guideline, adopted 13th April 2004), <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd432-508.pdf>>, 2018.

OHBAYASHI, N.; FUKUDA, M. Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. **F1000Research**, 9, 2020.

OMAR, S. H.; SCOTT, C. J.; HAMLIN, A. S.; OBIED, H. K. Biophenols: Enzymes (β -secretase, Cholinesterases, histone deacetylase and tyrosinase) inhibitors from olive (*Olea europaea* L.). **Fitoterapia**, 128, 118-129. (2018).

PATHAK, M.A; FITZPATRICK, T.B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T.B.; EILSEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.M.; AUSTEN K.F. 4th ed. *Dermatology in General Medicine*, 4th ed., New York: McGraw-Hill, cap.137, p.1689-1716. 1993.

PARIKH, S. A.; KELSEY, A.; FINCH, J.; GRANT-KELS, J. M. Skin Health and Healthy Aging: Skin Cosmetics. **Healthy Aging** (pp. 105-113). Springer, Cham, 2019.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; PRAÇA, F. S. G.; DEL CIAMPO, J. O.; FANTINI, M. A. C.; FONSECA, M. J. V.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline nanodispersions functionalized with cell-penetrating peptides for topical delivery of short-interfering RNAs: a proposal for silencing a pro-inflammatory cytokine in cutaneous diseases. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 12, n. 5, p. 1063-1075, 2016.

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; CAMPOS, P. M.; ASCENSO, A.; & BENTLEY, M. V. L. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121-132, 2018.

PROKSCH, E. pH in nature, humans and skin. **The Journal of Dermatology**, 45(9), 1044-1052. (2018).

QIAN, W.; LIU, W.; ZHU, D.; CAO, Y.; TANG, A.; GONG, G.; & SU, H. Natural skin-whitening compounds for the treatment of melanogenesis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 20(1), 173-185, 2020.

RANAMUKHAARACHCHI, S. A.; LEHNERT, S.; RANAMUKHAARACHCHI, S. L.; SPRENGER, L.; SCHNEIDER, T.; MANSOOR, I.; ... & STOEBER, B. A micromechanical comparison of human and porcine skin before and after preservation by freezing for medical device development. **Scientific reports**, 6(1), 1-9. (2016).

RISALITI, L.; PIAZZINI, V.; DI MARZO, M. G.; BRUNETTI, L.; CECCHI, R.; LENCIONI, P.; ... & BERGONZI, M. C. Topical formulations of delta-aminolevulinic acid for the treatment of actinic keratosis: Characterization and efficacy evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, p. 345-351, 2018.

RODRIGUES, F.; ALVES, A. C.; NUNES, C.; SARMENTO, B.; AMARAL, M. H.; REIS, S.; & OLIVEIRA, M. B. P. Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option?. **International Journal of Pharmaceutics**, 513(1-2), 496-503. (2016).

RODRIGUES, F.; DE LA LUZ CÁDIZ-GURREA, M.; NUNES, M. A.; PINTO, D.; VINHA, A. F.; LINARES, I. B.; ... & CARRETERO, A. S. **Cosmetics. In Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications** (pp. 393-427). Woodhead Publishing. (2018).

SAMCZEWSKA, G.; PIECHOTA-URBAŃSKA, M.; & KOŁODZIEJSKA, J. Polyoxyethylene fatty acid esters as potential promoters of transdermal absorption for morphine hydrochloride and sulphate. **Polymers in medicine**, v. 36, n. 2, p. 17-32, 2006.

SCHAEFER, L. V. Estudo proteômico do melasma facial em mulheres. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina (FMB), Botucatu. pág. 7, 2018.

SERRE, C.; BUSUTTIL, V.; & BOTTO, J. M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. **International journal of cosmetic science**. 40(4), 328-347, 2018.

SHIRATA, M.M.F.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Importance of texture and sensory profile in the development of cosmetic formulations. **Surgical & Cosmetic Dermatology**. v.8, n.3, p.223-320, 2016.

SILVA, A. P.; SEGADÃES, A. M.; PINTO, D. G.; OLIVEIRA, L. A.; & DEVEZAS, T. C. Effect of particle size distribution and calcium aluminate cement on the rheological behaviour of all-alumina refractory castables. **Powder technology**, v. 226, p. 107-113, 2012.

SIMON, J. D.; PELES, D.; WAKAMATSU, K.; & ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment cell & melanoma research**, 22(5), 563-579, 2009.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; & WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological reviews**, 84(4), 1155-1228, 2004.

SOUZA, C.; DE FREITAS, L. A. P.; & CAMPOS, P. M. B. G. M. Topical formulation containing beeswax-based nanoparticles improved in vivo skin barrier function. **Aaps Pharmscitech**. v. 18, n. 7, p. 2505-2516, 2017.

TAI, A.; BIANCHINI, R.; JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. **International journal of cosmetic science**. v.36, n.4, p.291-304, 2014.

TAMPUCCI, S.; BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; & MONTI, D. Cutaneous Permeation and Penetration of Sunscreens: Formulation Strategies and In Vitro Methods. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

USUI, K.; KADONO, N.; FURUICHI, Y.; SHIRAGA, K.; SAITOU, T.; KAWASAKI, H.; ... & MATSUI, T. 3D in vivo imaging of the keratin filament network in the mouse stratum granulosum reveals profilaggrin-dependent regulation of keratin bundling. **Journal of dermatological science**, 94(3), 346-349, 2019.

VALENTIN, D.; CHOLLET, S.; LELIÈVRE, M.; & ABDI, H. Quick and dirty but still pretty good: A review of new descriptive methods in food science. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 8, p. 1563-1578, 2012.

VIDEIRA, I.F.D.S.; MOURA, D.F.L.; & MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais brasileiros de dermatologia**, 88(1), 76-83, 2013.

APÊNDICE A. Certificado de análise das substâncias ativas objeto de estudo e emulsão transdérmica



Certificado de Análise

Nr.Ctrl.: 0000083/202001G020415801

NIKKOL VC-IP LIPOSSOLUVEL (NIKKOL) - 0,100 KG

Página: 01

Data de Fabricação: 09/08/2019	Lote de Fabricação: 9518
Data de Validade: 07/08/2022	País de Origem: JAPAO
Lote Galena (CIQ): 2009014803	Ordem/Data de Fracionamento: 03056402002/11/09/2020
CAS: 183476-82-6	DCB: -
Fórmula Molecular: -	Peso Molecular: -
Nome Químico: -	
Informações Complementares: Nome INCI: Ascorbyl Tetraisopalmitate	

ENSAIOS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
LABORATORIO FISICO-QUIMICO		
- METAIS PESADOS * (0)	Nao mais que 20 ppm	Conforme
- ARSENIUM * (0)	Nao mais que 2 ppm	Conforme
- INDICE DE REFRACAO (0)	1,459 a 1,465	1,47
- COR APHA, HAZEN * (0)	Não mais que 100	40,00
- GRAVIDADE ESPECIFICA (0)	0,930 g/mL a 0,943 g/mL	0,93 g/mL
- ASPECTO (0)	Liquido	Liquido
- COR (0)	Incolor a amarelo claro	Amarelo claro
- ODOR (0)	Característico	Característico
- IDENTIFICACAO * (0)	Positivo	Conforme
- IDENTIFICACAO COLORIMETRICA * (0)	Positivo	Conforme
- DOSEAMENTO (AS IS) * (0)	Não menos que 95,0 %	97,60 %

Referências:

(0) Conforme Metodologia Propria do Fabricante;

Observações

- * - Análises de acordo com o certificado de análise do fabricante.
- As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.
- Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Condições de Armazenamento: Armazenar sob refrigeração, em embalagem fechada, protegida da luz

Higroscópico: () Sim (X) Não Fotosensível: (X) Sim () Não

Conclusão: (X) Aprovado () Reprovado

Data de emissão do Certif: 11/09/2020



Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda CNPJ: 57.442.774/0001-90
 Endereço: Rua Pedro Stancato, 860, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.092-050
 Fone: +55 19 3746-770 SAC: 0800 771 4270 E-Mail: sac@galena.com.br
 Site: www.galena.com.br



**Certificado de Análise**

Nr.Ctrl.: 0000083/202001G020415801

NIKKOL VC-IP LIPOSSOLUVEL (NIKKOL) - 0,100 KG

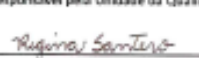
Página: 02

UQG - Unidade da Qualidade Galena

Responsável pelo Fracionamento


Lúcia Eli Scarelli
Farmacêutica responsável
CRF/SP 16.148

Responsável pela Unidade da Qualidade


Regina Carla Santero
Farmacêutica co-responsável
CRF/SP 28.236

Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda **CNPJ:** 57.442.774/0001-90
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.082-050
Fone: +55 19 3746-770 **SAC:** 0800 771 4270 **E-Mail:** sac@galena.com.br
Site: www.galena.com.br




Certificado de Análise

Nr.Ctrl.: 06G021048000

HYDROLIVE + (COBIOSA) - 0,020 KG

Página: 01

Data de Fabricação: 02/07/2019 **Lote de Fabricação:** IA19515-R
Data de Validade: 21/03/2022 **País de Origem:** ESPANHA
Lote Galena (CIQ): 2009014702 **Ordem/Data de Fracionamento:** 03056302002/11/09/2020
CAS: - **DCB:** -
Fórmula Molecular: - **Peso Molecular:** -
Nome Químico: -
Informações Complementares: Descrição Química: extrato complexo de origem natural
 Nome INCI: Olea europea (Olive) Fruit extract; Glycerin; Water (Aqua)

ENSAIOS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
LABORATORIO FISICO-QUIMICO		
- MATERIA SECA (0)	70,00 % a 80,00 %	70,54 %
- DENSIDADE ESPECIFICA (0)	1,180 g/mL a 1,220 g/mL	1,19 g/mL
- ASPECTO (0)	Líquido xaroposo	Líquido xaroposo
- COR (0)	Marron escuro	Marron escuro
- ODOR (0)	Característico	Característico
- IDENTIFICACAO POR INFRAVERMELHO * (0)	Positivo	Conforme
- IDENTIFICACAO POR ULTRAVIOLETA * (0)	Conforme	Conforme
- HIDROXITROSOL * (0)	Nao menos que 20 %	21,5%
LABORATORIO MICROBIOLOGICO		
- CONTAGEM TOTAL (0)	Nao mais que 50000 UFC/g	Menor que 10 UFC/g
- PATOGENOS (0)	Ausentes	Ausentes

Referências:

(0) Conforme Metodologia Propria do Fabricante;

Observações

- * - Análises de acordo com o certificado de análise do fabricante.
- As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.
- Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Condições de Armazenamento: Armazenar sob refrigeração, em embalagem fechada, protegida da luz

Higroscópico: () Sim (X) Não **Fotosensível:** () Sim (X) Não

Conclusão: (X) Aprovado () Reprovado **Data de emissão do Certif:** 11/09/2020

Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda **CNPJ:** 57.442.774/0001-90
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.082-050
Fone: +55 19 3746-770 **SAC:** 0800 771 4270 **E-Mail:** sao@galena.com.br
Site: www.galena.com.br





Certificado de Análise

Nr.Ctrl.: 05G021048000


HYDROLIVE + (COBIOSA) - 0,020 KG

Página: 02



UQG - Unidade da Qualidade Galena

Responsável pelo Fracionamento


Lúcia Eli Scaramelli
Farmacêutica responsável
CRF/SP 16.148

Responsável pela Unidade da Qualidade


Regina Carla Santero
Farmacêutica co-responsável
CRF/SP 28.236

Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda CNPJ: 57.442.774/0001-90
Endereço: Rua Pedro Stancato, 660, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.082-050
Fone: +55 19 3746-770 SAC: 0800 771 4270 E-Mail: sac@galena.com.br
Site: www.galena.com.br





Certificado de Análise

Nr.Ctrl.: 0000629/202012G060694202

OLI OLA (NEXIRA HEALTH) - 0,020 KG

Página: 01

Data de Fabricação: 28/02/2020

Data de Validade: 28/02/2022

Lote Galena (CIQ): 2008040901

CAS: 84012-27-1

Fórmula Molecular: -

Nome Químico: -

Informações Complementares: Nome botânico: *Olea europaea* L. padronizado em no mínimo 3% de hidroxitirosol e tirosol. Rico em oleuropelina e verbascosídeo.

Parte da planta: Fruto

Lote de Fabricação: 205099

País de Origem: FRANÇA

Ordem/Data de Fracionamento: 03033101001/28/08/2020

DCB: 11056

Peso Molecular: -

ENSAIOS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
LABORATORIO FISICO-QUIMICO		
- MATERIA SECA * (0)	Não menos que 90,00 %	94,67 %
- CINZAS (0)	Não mais que 20,00 %	16,09 %
- ARSENIO * (0)	Não mais que 2 ppm	Não mais que 2 ppm
- CADMIO * (0)	Não mais que 1 ppm	Não mais que 1 ppm
- CHUMBO * (0)	Não mais que 3 ppm	Não mais que 3 ppm
- MERCURIO * (0)	Não mais que 0,1 ppm	Não mais que 0,1 ppm
- DENSIDADE COMPACTADA (0)	Não menos que 0,30 g/mL	0,60 g/mL
- RESIDUO DE PESTICIDAS * (0)	Conforme	Conforme
- ASPECTO (0)	Po fino	Po fino
- COR (0)	Marron	Marron
- ODOR (0)	Característico	Característico
- SABOR (0)	Ligeiramente salgado	Ligeiramente salgado
- AFLATOXINAS * (0)	Não mais que 4 ppb	Não mais que 4 ppb
- BENZO (A) PIRENO * (0)	Não mais que 10 ppb	< 10 ppb
- SOMA DE 4 HPA * (0)	Não mais que 50 ppb	< 50 ppb
- HIDROXITIROSOL E TIROSOL (BASE SECA) * (0)	Não menos que 3,00 %	3,32 %
- POLIFENOLIS TOTAIS POR UV (BASE SECA) * (0)	Não menos que 18,00 %	25,50 %

Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda CNPJ: 57.442.774/0001-90
 Endereço: Rua Pedro Stancato, 860, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.092-050
 Fone: +55 19 3746-770 SAC: 0800 771 4270 E-Mail: sac@galena.com.br
 Site: www.galena.com.br





Certificado de Análise

Nr.Ctrl.: 0000629/202012G060694202

OLI OLA (NEXIRA HEALTH) - 0,020 KG

Página: 02

- POLIF. TOTAIS POR FOLIN CIOCALTEU (B.S.) * (0)	Não menos que 8,00 %	11,59 %
LABORATORIO MICROBIOLÓGICO		
- CONTAGEM TOTAL DE BACTERIAS (0)	Não mais que 10000 UFC/g	Menor que 10 UFC/g
- BOLORES E LEVEDURAS (0)	Não mais que 1000 UFC/g	Menor que 10 UFC/g
- E. COLI (0)	Negativo UFC/g	Negativo UFC/g
- S. AUREUS (0)	Negativo UFC/g	Negativo UFC/g
- SALMONELLA SP * (0)	Negativo UFC/25g	Negativo UFC/25g
- ENTEROBACTERIAS (0)	Não mais que 1000 UFC/g	Menor que 10 UFC/g

Referências:

0) Conforme Metodologia Propria do Fabricante;

Observações

- Análises de acordo com o certificado de análise do fabricante.
As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.
Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Condições de Armazenamento: Armazenar em temp. amb. controlada, emb. fechada, protegida da luz e umidade

fitrocópio: (X) Sim () Não **Fotosensível:** () Sim (X) Não

Conclusão: (X) **Aprovado** () **Reprovado** **Data de emissão do Certif:** 28/08/2020



UQG - Unidade da Qualidade Galena

Responsável pelo Fracionamento

Lúcia Eli Scarelli
Farmacêutica responsável
CRF/SP 16.148

Responsável pela Unidade da Qualidade

Regina Carla Santero
Farmacêutica co-responsável
CRF/SP 28.236

Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda **CNPJ:** 57.442.774/0001-90
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.082-050
Fone: +55 19 3746-770 **SAC:** 0800 771 4270 **E-Mail:** sao@galena.com.br
Site: www.galena.com.br





Certificado de Análise

Nr.Ctrl.: 0001003/201902G031355000

VERSAPRO CREAM BASE® (MEDISCA) - 0,500 KG

Página: 01

Data de Fabricação: 18/04/2019	Lote de Fabricação: 158867
Data de Validade: 31/03/2021	País de Origem: CANADA
Lote Galena (CIQ): 2008028801	Ordem/Data de Fracionamento: 03021001001/25/08/2020
CAS: -	DCB: -
Fórmula Molecular: -	Peso Molecular: -
Nome Químico: -	
Informações Complementares: -	

ENSAIOS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
LABORATORIO FISICO-QUIMICO		
- pH (0)	4,25 a 5,50	4,38
- ASPECTO (0)	Creme viscoso liso	Creme viscoso liso
- COR (0)	Branco brilhante	Branco brilhante
- ODOR (0)	Inodoro	Inodoro
- GRAVIDADE ESPECIFICA (0)	0,96 a 1,10	0,97 g/mL
LABORATORIO MICROBIOLÓGICO		
- CONTAGEM DE AEROBICOS TOTAIS (0)	Não mais que 10 UFC/g	Menor que 10 UFC/g
- BOLORES E LEVEDURAS (0)	Não mais que 10 UFC/g	Menor que 10 UFC/g
- E. COLI (0)	Ausente	Ausente
- P. AERUGINOSA (0)	Ausente	Ausente
- S. AUREUS (0)	Ausente	Ausente
- SALMONELLA SP (0)	Ausente	Ausente

Referências:

0) Conforme Metodologia Propria do Fabricante;

Observações

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.

Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Condições de Armazenamento: Armazenar em temp. amb. controlada, emb. fechada, protegida da luz e umidade

Microscópico: () Sim (X) Não **Fotosensível:** () Sim (X) Não

Conclusão: (X) **Aprovado** () **Reprovado**

Data de emissão do Certif: 25/08/2020



Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda **CNPJ:** 57.442.774/0001-90
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.092-050
Fone: +55 19 3746-770 **SAC:** 0800 771 4270 **E-Mail:** sac@galena.com.br
Site: www.galena.com.br



**Certificado de Análise**

Nr.Ctrl.: 0001003/201902G031355000

VERSAPRO CREAM BASE® (MEDISCA) - 0,500 KG

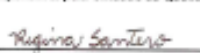
Página: 02

UQG - Unidade da Qualidade Galena

Responsável pelo Fracionamento


Lúcia Eli Scarelli
Farmacêutica responsável
CRF/SP 16.148

Responsável pela Unidade da Qualidade


Regina Carla Santero
Farmacêutica co-responsável
CRF/SP 28.236

Razão Social: Galena Química e Farmacêutica Ltda **CNPJ:** 57.442.774/0001-90
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860, Campinas, SP, Brasil - CEP: 13.082-050
Fone: +55 19 3746-770 **SAC:** 0800 771 4270 **E-Mail:** sac@galena.com.br
Site: www.galena.com.br



Aqua	Água	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	-	-	-	-	-	-
Tetraisopalmitato ascorbila	de NIKKOL VC- IP®	-	3,00	10,0 0	-	-	-	-	-	3,0 0	10,0 0	-	-	-	-	3,00	10,00	-	-	-
Olea Europaea Fruit Extract – extrato seco padronizado em 3% de hidroxitirosol	OLI-OLA™	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	1,0 0	-	-	-	-	-	1,00
Olea Europaea Fruit Extract – extrato hidroglicólico padronizado em 20% de hidroxitirosol	HydrOlive+	-	-	-	0,50	1,00	-	-	-	-	0,5 0	1,0 0	-	-	-	-	-	0,50	1,00	-

APÊNDICE C. Ficha de avaliação sensorial

AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome:

Data:

Sexo:

Idade:

FORMULAÇÃO (C1)	FORMULAÇÃO (C2)	FORMULAÇÃO (C3)
Após a aplicação:	Após a aplicação:	Após a aplicação:
() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa
() Pegajosa	() Pegajosa	() Pegajosa
() Suave	() Suave	() Suave
() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar
() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida
Após 5 minutos:	Após 5 minutos:	Após 5 minutos:
() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso
() Pele macia	() Pele macia	() Pele macia
() Pele hidratada	() Pele hidratada	() Pele hidratada
() Resíduo branco	() Resíduo branco	() Resíduo branco
() Intenção de compra	() Intenção de compra	() Intenção de compra
FORMULAÇÃO (C4)	FORMULAÇÃO (C5)	FORMULAÇÃO (C6)
Após a aplicação:	Após a aplicação:	Após a aplicação:
() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa
() Pegajosa	() Pegajosa	() Pegajosa
() Suave	() Suave	() Suave
() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar
() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida
Após 5 minutos:	Após 5 minutos:	Após 5 minutos:
() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso
() Pele macia	() Pele macia	() Pele macia
() Pele hidratada	() Pele hidratada	() Pele hidratada
() Resíduo branco	() Resíduo branco	() Resíduo branco
() Intenção de compra	() Intenção de compra	() Intenção de compra

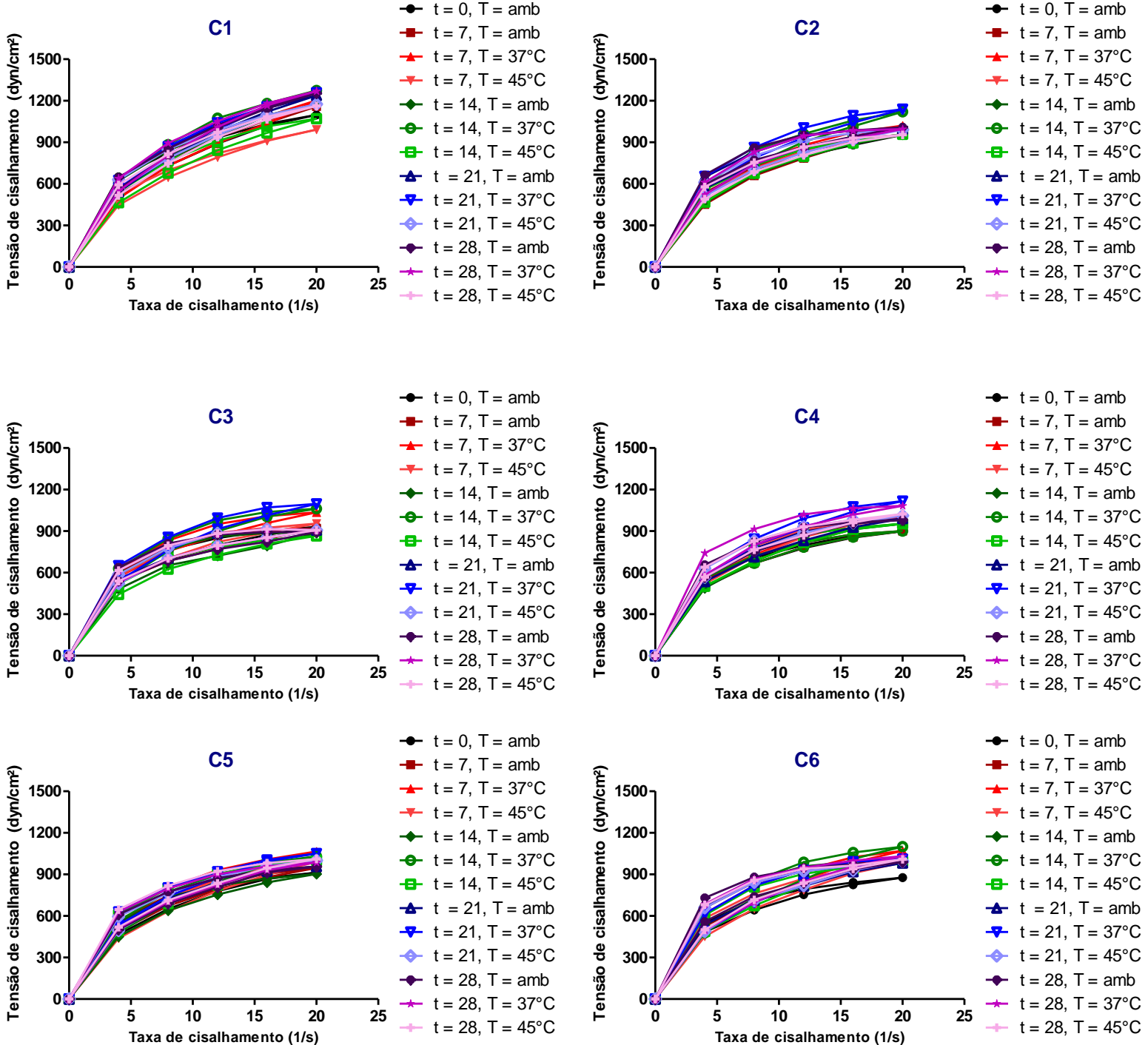
FORMULAÇÃO (GC1)	FORMULAÇÃO (GC2)	FORMULAÇÃO (GC3)
Após a aplicação:	Após a aplicação:	Após a aplicação:
() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa
() Pegajosa	() Pegajosa	() Pegajosa
() Suave	() Suave	() Suave
() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar
() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida
Após 5 minutos:	Após 5 minutos:	Após 5 minutos:
() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso
() Pele macia	() Pele macia	() Pele macia
() Pele hidratada	() Pele hidratada	() Pele hidratada
() Resíduo branco	() Resíduo branco	() Resíduo branco
() Intenção de compra	() Intenção de compra	() Intenção de compra

FORMULAÇÃO (GC4)	FORMULAÇÃO (GC5)	FORMULAÇÃO (GC6)
Após a aplicação:	Após a aplicação:	Após a aplicação:
() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa	() Oleosa/gordurosa
() Pegajosa	() Pegajosa	() Pegajosa
() Suave	() Suave	() Suave
() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar	() Fácil de espalhar
() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida	() Facilmente absorvida
Após 5 minutos:	Após 5 minutos:	Após 5 minutos:
() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso	() Resíduo oleoso
() Pele macia	() Pele macia	() Pele macia
() Pele hidratada	() Pele hidratada	() Pele hidratada
() Resíduo branco	() Resíduo branco	() Resíduo branco
() Intenção de compra	() Intenção de compra	() Intenção de compra

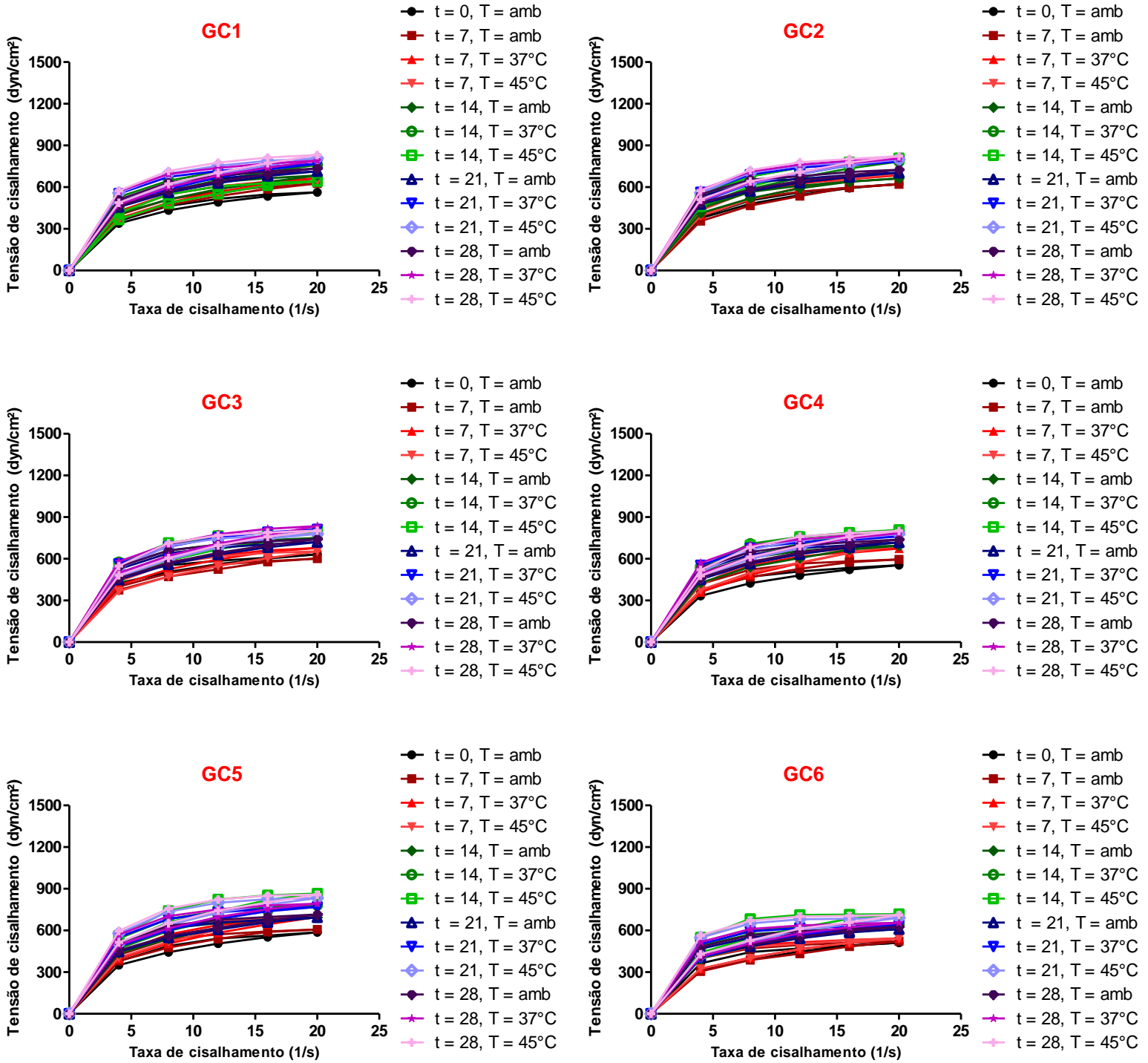
FORMULAÇÃO (T1)	FORMULAÇÃO (T2)	FORMULAÇÃO (T3)
Após a aplicação:	Após a aplicação:	Após a aplicação:
<input type="checkbox"/> Oleosa/gordurosa	<input type="checkbox"/> Oleosa/gordurosa	<input type="checkbox"/> Oleosa/gordurosa
<input type="checkbox"/> Pegajosa	<input type="checkbox"/> Pegajosa	<input type="checkbox"/> Pegajosa
<input type="checkbox"/> Suave	<input type="checkbox"/> Suave	<input type="checkbox"/> Suave
<input type="checkbox"/> Fácil de espalhar	<input type="checkbox"/> Fácil de espalhar	<input type="checkbox"/> Fácil de espalhar
<input type="checkbox"/> Facilmente absorvida	<input type="checkbox"/> Facilmente absorvida	<input type="checkbox"/> Facilmente absorvida
Após 5 minutos:	Após 5 minutos:	Após 5 minutos:
<input type="checkbox"/> Resíduo oleoso	<input type="checkbox"/> Resíduo oleoso	<input type="checkbox"/> Resíduo oleoso
<input type="checkbox"/> Pele macia	<input type="checkbox"/> Pele macia	<input type="checkbox"/> Pele macia
<input type="checkbox"/> Pele hidratada	<input type="checkbox"/> Pele hidratada	<input type="checkbox"/> Pele hidratada
<input type="checkbox"/> Resíduo branco	<input type="checkbox"/> Resíduo branco	<input type="checkbox"/> Resíduo branco
<input type="checkbox"/> Intenção de compra	<input type="checkbox"/> Intenção de compra	<input type="checkbox"/> Intenção de compra

FORMULAÇÃO (T4)	FORMULAÇÃO (T5)	FORMULAÇÃO (T6)
Após a aplicação:	Após a aplicação:	Após a aplicação:
<input type="checkbox"/> Oleosa/gordurosa	<input type="checkbox"/> Oleosa/gordurosa	<input type="checkbox"/> Oleosa/gordurosa
<input type="checkbox"/> Pegajosa	<input type="checkbox"/> Pegajosa	<input type="checkbox"/> Pegajosa
<input type="checkbox"/> Suave	<input type="checkbox"/> Suave	<input type="checkbox"/> Suave
<input type="checkbox"/> Fácil de espalhar	<input type="checkbox"/> Fácil de espalhar	<input type="checkbox"/> Fácil de espalhar
<input type="checkbox"/> Facilmente absorvida	<input type="checkbox"/> Facilmente absorvida	<input type="checkbox"/> Facilmente absorvida
Após 5 minutos:	Após 5 minutos:	Após 5 minutos:
<input type="checkbox"/> Resíduo oleoso	<input type="checkbox"/> Resíduo oleoso	<input type="checkbox"/> Resíduo oleoso
<input type="checkbox"/> Pele macia	<input type="checkbox"/> Pele macia	<input type="checkbox"/> Pele macia
<input type="checkbox"/> Pele hidratada	<input type="checkbox"/> Pele hidratada	<input type="checkbox"/> Pele hidratada
<input type="checkbox"/> Resíduo branco	<input type="checkbox"/> Resíduo branco	<input type="checkbox"/> Resíduo branco
<input type="checkbox"/> Intenção de compra	<input type="checkbox"/> Intenção de compra	<input type="checkbox"/> Intenção de compra

APÊNDICE D. Reograma das formulações creme entre os tempos $t = 0$ e $t = 28$ dias, nas temperaturas $T = \text{amb}$, $T = 37^\circ \text{C}$ e $T = 45^\circ \text{C}$. Sendo a formulação C1 = Veículo, C2 = formulação com 3 % de TIPA, C3 = formulação com 10% de TIPA, C4 = formulação com 0,5% de HC, C5 = formulação com 1,0% de HC e C6 = formulação com 1,0% de HN.



APÊNDICE E. Reograma das formulações gel creme entre os tempos $t = 0$ e $t = 28$ dias, nas temperaturas $T = \text{amb}$, $T = 37^\circ \text{C}$ e $T = 45^\circ \text{C}$. Sendo a formulação GC1 = Veículo, GC2 = formulação com 3 % de TIPA, GC3 = formulação com 10% de TIPA, GC4 = formulação com 0,5% de HC, GC5 = formulação com 1,0% de HC e GC6 = formulação com 1,0% de HN.



APÊNDICE F. Reograma das formulações transdérmica entre os tempos $t = 0$ e $t = 28$ dias, nas temperaturas $T = \text{amb}$, $T = 37^\circ \text{C}$ e $T = 45^\circ \text{C}$. Sendo a formulação T1 = Veículo, T2 = formulação com 3 % de TIPA, T3 = formulação com 10% de TIPA, T4 = formulação com 0,5% de HC, T5 = formulação com 1,0% de HC e T6 = formulação com 1,0% de HN.

