

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

Determinação e quantificação das vitaminas C e E associadas
em produtos cosméticos

Mariana Mandelli de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2008

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

A447d Almeida, Mariana Mandelli de
Determinação e quantificação das vitaminas C e E associadas
em produtos cosméticos / Mariana Mandelli de Almeida. -- São
Paulo, 2008.
83p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria

1. Vitamina : Cosméticos : Tecnologia 2. Cromatografia
líquida de alta eficiência : Química analítica 3. Eletroforese
capilar : Química Analítica 4. Espectrometria no ultravioleta
5. Termoanálise : Química I. T. II. Kedor-Hackmann, Érika
Rosa Maria, orientador.

668.55 CDD

Mariana Mandelli de Almeida

Determinação e quantificação das vitaminas C e E associadas em
produtos cosméticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientador/presidente

Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez
1º. examinador

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
2º. examinador

São Paulo, 18 de setembro de 2008.

***“Se você pode sonhar é porque pode realizar. É só acreditar em você. É só acreditar no seu sonho.”
(Autor desconhecido)***

Aos Espíritos de Luz que me iluminaram e me guiaram até aqui, me dando força, determinação e fé na minha capacidade de realização.

Dedico esta dissertação aos meus pais Sônia e Mário, pelo amor e apoio. Aos meus irmãos Maximiliano e Maria Eduarda pelo carinho. Vocês são à base de tudo na minha vida.

***À Profa. Dra. Erika Rosa
Maria Kedor-Hackmann pela
orientação.***

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, por ter me recebido no Laboratório de Controle Físico-Químico de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Ao Prof. Dr. Jailson Binttencourt de Andrade e a doutoranda Lílian Lefol do LPQ - Laboratório de Pesquisa em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, pelo uso do cromatógrafo à líquido e apoio prestados.

Aos Doutorandos Ingrid Graça e Ednaldo Sousa e a Profa. Dra. Heloysa Andrade do LABCAT – Laboratório de Catálise e Materiais do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, pela ajuda na realização das medidas de análise térmica.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos e a Profa. Dra. Lucildes Pita Mercuri, pelo apoio.

À Profa. Dra. Marina Tavares e ao Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago pela ajuda com a eletroforese capilar.

À colega e amiga Msc. Joyce Quenca pela ajuda, apoio, amizade na luta da realização deste mestrado.

À colega e amiga Cibele pela amizade, apoio e ajuda com os gráficos.

Ao colega e amigo João Marcel pelo apoio e ajuda com o trabalho.

À amiga Daniela pela ajuda com as correções da dissertação.

Aos colegas de laboratório Carla, Ivani, Helen, Ricardo, Pedro, Fábio, Renata, Angel, Nayane, Magali, Karina pela amizade, ajuda e apoio em todos os momentos.

À Profa. Dra. Maria Segunda Aurora Prado pela colaboração com a Eletroforese Capilar.

Aos professores Jorge Luiz Seferin Martins e Anil Kumar Singh e as técnicas Iria Raimunda da Silva e Regina Maura Rojas, pela colaboração e amizade.

À empresa Cosmotec pela doação dos ativos usados nesse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro recebido.

A todas as demais pessoas que direta ou indiretamente tornaram a realização deste trabalho possível.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vi
I- INTRODUÇÃO	01
II- REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 – Pele	03
2.2 – Envelhecimento Cutâneo	06
2.3 – Emulsões	08
2.3.1 – Análise das matérias-primas da emulsão	10
2.4 – Vitaminas	11
2.4.1 – Vitamina E	12
2.4.2 – Vitamina C	13
2.5 – Vitaminas utilizadas como padrão	14
2.5.1 – Tetraisopalmitato de ascorbila	14
2.5.2 – Acetato de Tocoferila	14
2.6 – Espectrofotometria derivada no ultravioleta (UVD)	16
2.7 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	17
2.7.1 – Vantagens e Limitações da CLAE	19
2.8 – Eletroforese Capilar (CE)	19
2.8.1 – Fluxo eletrosmótico	21
2.8.2 – Sistemas de detecção	22
2.8.2.1 – Detecção Condutométrica sem contato	22
2.8.3 – Classificação da eletroforese capilar	24
2.8.4 – Vantagens e limitações da CE	25
III- OBJETIVOS	26
IV- MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 – Material	27
4.1.1 – Solventes, reagentes e materiais	27
4.1.2 – Equipamentos e acessórios	27
4.1.3 – Substâncias empregadas como padrão	28
4.1.4 – Matérias-primas	28
4.1.5 – Amostras	29
4.1.6 – Desenvolvimento da formulação	29
4.1.6.1 – Formulação manipulada e utilizada como excipiente	29
4.1.6.2 – Preparação da formulação	29

4.2 – Métodos analíticos	30
4.2.1 – Caracterização do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila	30
4.2.1.1 – Espectrofotometria no ultravioleta (UV)	30
4.2.2 – Método espectrofotométrico	30
4.2.2.1 – Ensaio preliminares	30
4.2.2.2 – Otimização das condições experimentais	31
4.2.2.3 – Construção da curva analítica	31
4.2.2.4 – Interferência dos excipientes	32
4.2.3 – Método cromatográfico	32
4.2.3.1 – Ensaio cromatográficos preliminares	32
4.2.3.2 – Sistemas testados	33
4.2.3.3 – Otimização das condições experimentais	33
4.2.3.4 – Validação do método CLAE para análise do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila	34
4.2.4 – Método eletroforético	38
4.2.4.1 – Ensaio eletroforéticos preliminares	38
4.2.4.2 – Parâmetros experimentais	40
4.2.5 – Análise térmica do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila	41
4.2.5.1 – Estudo termogravimétrico (TG/DTG)	41
4.2.5.2 – Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	41
V- RESULTADOS	43
5.1 – Métodos analíticos	43
5.1.1 – Caracterização	43
5.1.1.1 – Espectrofotometria no UV	43
5.2.1 – Método espectrofotométrico direto no UV	44
5.2.2 – Método espectrofotométrico derivado no UV	45
5.2.3 – Interferência dos excipientes	47
5.2.4 – Método cromatográfico	49
5.2.4.1 - Validação do método CLAE para análise do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila	52
5.2.5 – Método eletroforético	57
5.2.6 – Análise Térmica (curvas TG/DTG e DSC)	60
5.2.6.1 – Caracterização via Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	60
5.2.6.2 – Caracterização via Termogravimetria (TG) Termogravimetria Derivada (DTG)	63
VI- DISCUSSÃO	66
VII- CONCLUSÕES	73
VIII- REFERÊNCIAS	75
IX- PERSPECTIVAS	81
ANEXO	82

RESUMO

A vitamina C e a vitamina E são antioxidantes naturais encontrados em diversas frutas e verduras frescas, em óleos vegetais e germen de trigo. Produtos cosméticos, contendo essas vitaminas em forma de ésteres, têm sido desenvolvidos e disponibilizados comercialmente, ressaltando-se que o aspecto “natural” dessas induz seu uso em cremes e loções. Por isso, torna-se necessário a validação de metodologias analíticas para identificar essas vitaminas em preparações cosméticas, tanto para o controle da qualidade do produto como para a segurança do consumidor. O presente trabalho tem como objetivo a validação das metodologias analíticas para determinação e quantificação do derivado do ácido ascórbico, tetraisopalmitato de ascorbila e o princípio ativo acetato de tocoferila que estão associados nas formulações cosméticas. A técnica de espectrofotometria no ultravioleta (UV) e a análise térmica foram empregadas na caracterização desses princípios ativos. Para a quantificação dos ativos foram desenvolvidas metodologias analíticas empregando as seguintes técnicas: espectrofotometria derivada no UV; eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia desenvolvida por espectrofotometria derivada no UV não demonstrou ser aplicável devido à interferência dos excipientes presentes na formulação. Para determinação dos ativos tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila, foi validado um método por CLAE em fase reversa, empregando-se a coluna Synergi Hidro[®] C₁₈, fase móvel metanol:2-propanol (25:75), vazão 1,0 mL/min e detecção UV à 222 nm. As amostras foram extraídas sem grande complexidade e os ativos puderam ser determinados em 3 min e 6 min, para o acetato de tocoferila e o tetraisopalmitato de ascorbila respectivamente. O desenvolvimento da metodologia por eletroforese capilar utilizando-se a técnica de MEEKC (Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão) usando a microemulsão óleo-aquosa não demonstrou ser adequada para determinação dos princípios ativos em estudo, sendo que o trabalho terá como perspectivas a tentativa da MEEKC usando a microemulsão aquosa-oleosa.

Palavras-chave: Cosméticos, Vitaminas, Cromatografia líquida de alta eficiência, Eletroforese Capilar, Espectrofotometria UV e Termoanálise.

ABSTRACT

Vitamin C and vitamin E are natural antioxidants found in many fruits and fresh vegetables, vegetable oils and seed wheat. Cosmetics containing these vitamins in the form of esters have been developed and made available commercially, highlighting the fact that the "natural" induces its use in these creams and lotions. Then, it is necessary the validation of analytical methodologies to identify these vitamins in cosmetic preparations, both for the control of product quality and for the safety of consumers. The present work aims the validation of analytical methodologies for determining and quantifying the derivative of ascorbic acid, ascorbyl tetraisopalmitate and the active tocopheryl acetate that are associated in cosmetic formulations. The techniques of UV spectrophotometry and the thermal analysis were used in the characterization of these active ingredients. For the quantification of the actives, analytical methodologies were developed using the following techniques: the UV first-derivative spectrophotometry (UVD), high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). The methodology developed by UV first-derivative spectrophotometry do not showed to be applicable due to the interference of excipients in the formulation. To determine the actives ascorbyl tetraisopalmitate and tocopheryl acetate, a method has been validated by reverse-phase HPLC, using the column Synergi Hidro® C18, mobile phase methanol :2-propanol (25:75), flow rate 1.0 mL / min and UV detection 222 nm. The samples were extracted without great complexity and the actives could be determined in 3 min and 6 min, for the tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate respectively. The development of methodology for capillary electrophoresis using the technique of MEEKC (Microemulsion Electrokinetic Chromatography) using the oil-in-water (o/w) microemulsion do not showed to be suitable for determination of active ingredients in the study, and that the work will attempt the prospects of using MEEKC the water-in-oil (w/o) microemulsion.

Key-words: Cosmetics, Vitamins, High performance liquid chromatography, Capillar electrophoresis, Spectrophotometry UV and Termoanalysis.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura. 1 Fotomicrografia de fragmento de pele humana mostrando a epiderme e suas diferentes camadas; coloração HE. X150 (RIBEIRO, 2006)	4
Figura. 2 Camadas da pele	6
Figura. 3 Espectro eletromagnético	7
Figura. 4 Fórmula estrutural do tetraisopalmitato de ascorbila	14
Figura. 5 Fórmula estrutural do acetato de tocoferila	15
Figura. 6 (a) fluxo parabólico, típico na técnica de CLAE (b) fluxo radial, típico na técnica de CE (CARVALHO, 2003)	22
Figura. 7 Equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato utilizado durante o trabalho (NOGUEIRA, 2006)	24
Figura. 8 Espectro de absorção no ultravioleta da solução de tetraisopalmitato de ascorbila (50µg/mL) em etanol, pico máximo em 222,10 nm	43
Figura. 9 Espectro de absorção no ultravioleta da solução de acetato de tocoferila (50µg/mL) em etanol, picos máximos 1- (284,80 nm) , 2- (278,70 nm) e 3- (208,70 nm)	43
Figura. 10 Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta do tetraisopalmitato de ascorbila concentrações de 10 a 90 µg/mL em etanol	44
Figura. 11 Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta do acetato de tocoferila concentrações de 10 a 90 µg/mL em etanol	44
Figura. 12 Sobreposição dos espectros no ultravioleta da terceira derivada do tetraisopalmitato de ascorbila em etanol. Leituras efetuadas a 233,2 nm. Intervalo de concentração de 10 a 90 µg/mL	45
Figura. 13 Sobreposição dos espectros no ultravioleta da terceira derivada do acetato de tocoferila em etanol. Leituras efetuadas a 282,6 nm. Intervalo de concentração de 10 a 90 µg/mL	45
Figura. 14 Curva analítica obtida pelo método espectrofotométrico derivado. Concentração das soluções de 10 a 90 µg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila em etanol. Leituras efetuadas a 233,2 nm	46

- Figura. 15 Curva analítica obtida pelo método espectrofotométrico derivado. Concentração das soluções de 10 a 90 µg/mL do acetato de tocoferila em etanol. Leituras efetuadas a 282,6 nm 46
- Figura. 16 Espectro da absorção derivada de terceira ordem do tetraisopalmitato de ascorbila a 50 µg/mL (—), da amostra de creme a 50 µg/mL (___) e do placebo (___), etanol. Ponto de anulação do placebo a 233,2 nm (método quantitativo “zero crossing”) 47
- Figura. 17 Espectro da absorção derivada de terceira ordem do acetato de tocoferila a 50 µg/mL (___), da amostra de creme a 50 µg/mL (___) e do placebo (___), etanol. Ponto de anulação do placebo a 282,6 nm (método quantitativo “zero crossing”) 47
- Figura. 18 Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta da amostra de creme com os ativos tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila em etanol, concentrações de 10 a 90 µg/mL 48
- Figura. 19 Sobreposição dos espectros no ultravioleta da terceira derivada da amostra de creme com os ativos tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila em etanol. Intervalo de concentração de 10 a 90 µg/mL 48
- Figura. 20 Cromatograma do padrão de 200 µg/mL do tetraisopalmitato de ascorbila. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 µm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex®; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 222 nm; temperatura ambiente ± 25°C; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU® 49
- Figura. 21 Cromatograma do padrão de 40 µg/mL do acetato de tocoferila. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 µm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex®; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 222 nm; temperatura ambiente ± 25°C; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU® 50
- Figura. 22 Cromatograma do acetato de tocoferila (40 µg/mL) e do tetraisopalmitato de ascorbila (200 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 µm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex®; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 222 nm; temperatura ambiente ± 25°C; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU® 51
- Figura. 23 Curva de calibração do acetato de tocoferila para o método cromatográfico, concentrações de 10 a 70 µg/mL 52
- Figura. 24 Curva de calibração do tetraisopalmitato de ascorbila para o método cromatográfico, concentrações de 50 a 350 µg/mL 52

- Figura. 25 (A) Cromatograma obtido do placebo. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 222 nm; temperatura ambiente $\pm 25^\circ\text{C}$; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU[®] 54
- Figura. 25 (B) Cromatograma obtido do padrão de VC-IP (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e vitamina E (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 222 nm; temperatura ambiente $\pm 25^\circ\text{C}$; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU[®] 54
- Figura. 25 (C) Cromatograma obtido da amostra manipulada (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 222 nm; temperatura ambiente $\pm 25^\circ\text{C}$; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU[®] 55
- Figura. 26 Eletroferograma para a separação dos padrões de vitaminas E e VC-IP (detecção condutométrica), utilizando como eletrólito de corrida 10 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, 6,6% de butanol, 3,3% de Dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,8% de n-octano, e pH 9,2. Capilar de 50 cm (40 cm até o detector) e 50 μm de d.i. Potencial aplicado: +10 kV. Injeção hidrodinâmica 10 cmH_2O por 30s, 25 $^\circ\text{C}$ de temperatura 57
- Figura. 27 Eletroferograma para a separação dos padrões de vitaminas E e VC-IP (detecção DAD), utilizando como eletrólito de corrida 10 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, 6,6% de butanol, 3,3% de Dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,8% de n-octano, e pH 9,2. Capilar de 40,2 cm (30 cm até o detector) e 75 μm de d.i. Potencial aplicado: 22 kV, 0,5 psi/3s, detecção UV 222 nm, 25 $^\circ\text{C}$ de temperatura. 58
- Figura. 28 Eletroferograma para a separação dos padrões de vitaminas E e VC-IP (detecção DAD), utilizando como eletrólito de corrida 15 mL de 2-propanol, 0,5% acetato de etila, 1,2% de butanol, 0,6% Dodecil sulfato de sódio (SDS) e 97,7% de tetraborato de sódio 10mM e pH 9,2. Capilar de 40,2 cm (30 cm até o detector) e 75 μm de d.i. Potencial aplicado: 22 kV, 0,5 psi/3s, detecção UV 214 nm, 25 $^\circ\text{C}$ de temperatura 59
- Figura. 29 Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio as amostras de vitamina E, creme base e creme base associada à vitamina E 60
- Figura. 30 Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio as amostras de creme base, VC-IP e creme base associado ao VC-IP 61

- Figura. 31 Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio as amostras de creme base, VC-IP, vitamina E e creme base associado ao VC-IP e a vitamina E 62
- Figura. 32 Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 20 mL/min e nitrogênio 50 mL/min das amostras de creme base, vitamina E e creme base associado a vitamina E 63
- Figura. 33 Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 20 mL/min e nitrogênio 50 mL/min das amostras de creme base, VC-IP e creme base associado ao VC-IP 64
- Figura. 34 Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 20 mL/min e nitrogênio 50 mL/min das amostras de creme base, VC-IP, vitamina E e creme base associado ao VC-IP e a vitamina E 65

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela. 1 Características físico-químicas das vitaminas C e E	15
Tabela. 2 Fórmula: Emulsão O/A	29
Tabela. 3 Sistemas de fases móveis empregadas	33
Tabela. 4 Sistemas eletrólitos utilizados para a separação do tetraisopalmitato de ascorbila e do acetato de tocoferila usando o método de detecção condutométrica	38
Tabela. 5 Sistemas eletrólitos utilizados para a separação do tetraisopalmitato de ascorbila e do acetato de tocoferila usando o método de detecção por arranjo de diodos (DAD)	39
Tabela. 6 Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila aplicando o método cromatográfico	53
Tabela. 7 Resultados obtidos para o cálculo do limite de detecção e quantificação do método cromatográfico para o acetato de tocoferila e para o tetraisopalmitato de ascorbila	53
Tabela. 8 Resultados obtidos na determinação do teor de acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila na amostra pelo método cromatográfico	56
Tabela. 9 Resultados obtidos do teste de recuperação realizado nas amostras contendo acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
C ⁴ D	<i>Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CEC	<i>Capillary Electrochromatography</i>
CGE	<i>Capillary Gel Electrophoresis</i>
CHCl ₃	Clorofórmio
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing
CITP	Capillary Isotacopheresis
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
EtOH	Etanol
FEO	Fluxo Eletrosmótico
FSCE	<i>Free Solution Capillary Electrophoresis</i>
g	Grama
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>
kV	Kilovolt
MECK	<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>
MEEKC	<i>Microemulsion Electrokinetic Chromatography</i>
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MM	Massa Molecular
Na ₂ B ₄ O ₇	Tetraborato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de amônio monobásico
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
p.a.	Padrão analítico
pH	Logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio
SDS	Dodecilsulfato de sódio

UV	Ultravioleta
UVD	Espectrofotometria Derivada no Ultravioleta
VC-IP	<i>Ascorbyl Tetraisopalmitate</i> (tetraisopalmitato de ascorbila)
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
qsp	Quantidade suficiente para
d.i.	Diâmetro interno

INTRODUÇÃO

I-INTRODUÇÃO

A pele tem a função principal de atuar como barreira protetora do organismo contra agressões do meio externo; além de possuir também importante papel na auto-estima, nas relações sociais e na qualidade de vida do ser humano. Possuindo uma aparência mais jovial, nos sentimos mais confiantes e seguros para enfrentar a vida cotidiana e sermos aceitos melhor pela sociedade (GARCIA, 1998;ROBERT, 1994).

Independente de fatores externos existe um processo natural que traduz-se pelo decaimento das funções vitais do corpo, a este processo denominamos envelhecimento intrínseco. Na pele, este, é evidenciado pela diminuição da síntese de colágeno, de elastina e de outras macromoléculas, menor regeneração celular, diminuição das defesas antioxidantes, espessamento dos vasos, fibras de colágeno quebradiças e fibras de elastina fragmentadas, dentre outras alterações (MAGALHÃES, 2000).

De forma semelhante, o processo de envelhecimento tem grande parcela ocasionada por agressões que o organismo sofre do meio ambiente, este é denominado envelhecimento extrínseco, como exemplos, poluentes ambientais, álcool, tabaco e sol, são alguns dos principais fatores causais (ROBERT, 1994).

No envelhecimento extrínseco destacamos o foto envelhecimento, causado pela radiação solar; os raios UVA e UVB são os mais preocupantes em cuidados cosmetológicos, devido à sua maior incidência na superfície terrestre (EVANS, 2000).

Os produtos cosméticos antienvhecimento atuam de várias formas: reforçam a defesa antioxidante, estimulam a renovação celular, promovem a

hidratação da epiderme, oferecem fotoproteção, atenuam rugas, estimulam a síntese de macromoléculas como o colágeno (GAREWAL e DIPLOCK, 1995).

As vitaminas são indicadas topicamente para o tratamento de doenças de pele, especialmente com ação preventiva, para retardar ou evitar certas alterações degenerativas associadas ao processo de envelhecimento, como a pele seca e descamativa, e a formação de rugas. As vitaminas são compostos orgânicos necessários para o crescimento e manutenção da vida dos animais, incluindo o homem, e são produzidos principalmente pelas plantas e devem ser supridos pela dieta alimentar (MAIA CAMPOS, 2006).

Estudos indicam que certas vitaminas e seus derivados melhoram o desempenho de cosméticos e artigos de higiene pessoal. Além disto, os testes laboratoriais e clínicos fornecem forte evidência de que estas vitaminas, em níveis adequados, têm importante papel nos processos protetores, corretivos e de renovação do cabelo, pele e unhas (IDSON, 1994).

A preocupação com a qualidade destes produtos, aumenta a importância dos laboratórios de controle de qualidade, em desenvolver e validar metodologias analíticas para identificar e quantificar as vitaminas C e E contidas em preparações cosméticas, tanto para a garantia da qualidade destes produtos como para a segurança do consumidor.

O presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a determinação e quantificação das vitaminas C e E presentes em preparações cosméticas, empregando-se a espectrofotometria UV, eletroforese capilar (CE) e cromatografia à líquida de alta eficiência (CLAE).

REVISÃO DA LITERATURA

II-REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, constituindo 16% do peso corporal. Além de revestir a superfície externa do corpo, protegendo-o, outras funções atribuídas a este órgão são: controle da temperatura, sensorial, estética, absorção da radiação ultravioleta (UV), síntese da vitamina D, absorção e eliminação de substâncias químicas (ERHART, 1976; HARRIS, 2003).

A pele possui uma estrutura complexa, sendo formada por três camadas: a epiderme (epitelial de revestimento), a derme e a hipoderme. É um órgão que possui dois tipos de envelhecimento, o intrínseco, comum a todos os órgãos, relacionado com a idade, e o envelhecimento extrínseco, onde destacamos o foto envelhecimento, causado pela radiação solar. O envelhecimento causado pela idade é mais suave, causando danos estéticos pequenos. Porém, o foto envelhecimento é mais agressivo a superfície da pele, estimulando a formação de radicais livres que são instáveis devido às suas características quânticas e reagem com moléculas orgânicas, podendo lhes causar dano e acelerando o envelhecimento (BUCHLI, 2002).

A espessura da pele varia a depender da área do corpo onde se encontra, sendo a pele mais espessa encontrada nas regiões sujeitas a pressões e atritos constantes (ERHART, 1976). A pele pode, ainda, ser classificada como pilosa, que reveste a maior parte do corpo, glabra, encontrada nas palmas das mãos e planta dos pés, e orificial, que se encontra entre a pele pilosa e as mucosas (MICHALANY, 2002).

Em análises histológicas da pele pode-se observar duas camadas básicas: a epiderme e a derme, logo abaixo, uma camada formada por tecido adiposo considerada como uma camada subcutânea, a hipoderme (MICHALANY, 2002; FORSLIND, 1995).

A epiderme consiste em uma complexa estrutura constituída de diferentes camadas formadas pelos queratinócitos, células epiteliais estratificadas que sofrem diferenciação à medida que vão da camada basal até a superfície da pele, quando descamam em numerosas camadas de células queratinizadas, anucleadas e sem organelas chamadas de corneócitos (GARTNER e HIATT, 1999; MORETTO et al., 1999).

As camadas que formam a epiderme são conhecidas como basal, espinhosa, granulosa e córnea (Figura 1). Uma quinta camada, a lúcida, é encontrada entre as camadas córnea e granulosa na palma das mãos e sola dos pés, conferindo maior espessamento da pele nestas regiões (pele espessa), ao contrário das demais regiões do corpo onde a pele é mais fina (pele delgada) (GARTNER e HIATT, 1999).

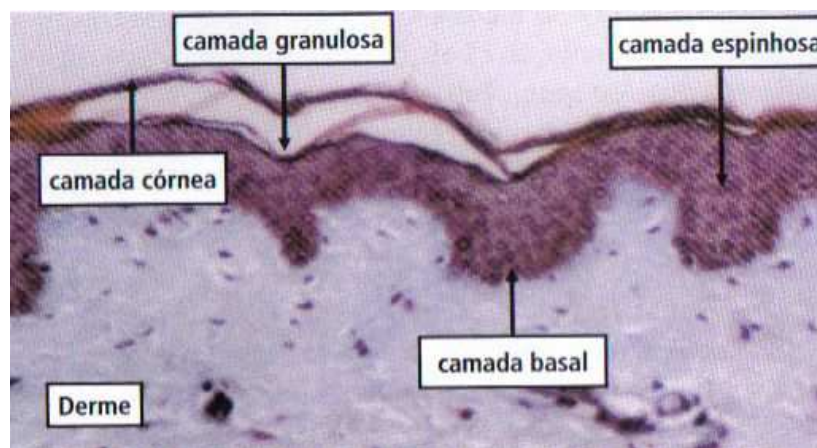


Figura 1. Fotomicrografia de fragmento de pele humana mostrando a epiderme e suas diferentes camadas; coloração HE. X150 (RIBEIRO, 2006).

A camada basal ou estrato germinativo é constituído por estrutura vascularizada muito importante, que apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme e demais camadas. Basicamente é formado por colágeno tipo IV e proteoglicanos.

As células da camada espinhosa possuem muitas expansões citoplasmáticas que se aproximam e mantêm as células unidas através de desmossomos, estrutura importante na manutenção e coesão entre as células.

A camada granulosa é formada por células que secretam grânulos de substância fosfolipídica e glicosaminoglicanas. Esta substância veda a camada de células granulosas, impedindo a passagem de algumas substâncias, e inclusive de água entre elas.

Na camada lúcida, os núcleos e organelas começam a desaparecer (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990; ROBERT, 1994).

A camada córnea é a mais fina e superficial, composta por células mortas, queratinócitos que vão sendo modificados e transformados progressivamente em queratina. A hidratação dessa camada é assegurada por um líquido chamado filme cutâneo de superfície, que é denominado manto hidrolipídico, composto por água, sais minerais, vitaminas, enzimas e gorduras.

Os queratinócitos da camada basal, apoiados na lâmina derme-epiderme, proliferam de maneira contínua para substituir a queratina de superfície, constantemente esfoliada. Este processo de renovação prolonga-se por toda vida, porém o desaceleramento dessa função com o envelhecimento é um dos principais fatores que explica o afinamento da pele, que é a primeira manifestação do envelhecimento cutâneo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990; ROBERT, 1994).

A derme consiste em um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente a agressões mecânicas, fornece nutrientes à epiderme e abriga os apêndices cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos, células de natureza conjuntiva e de origem sanguínea (PUGLIESE, 1996). É na derme também que ocorre a produção de melanina (ROBERT, 2001).

A hipoderme é considerada uma camada isolante, cuja atividade básica é amortizar traumas mecânicos ou físicos (WILKINSON e MOORE, 1990). (Figura 2)

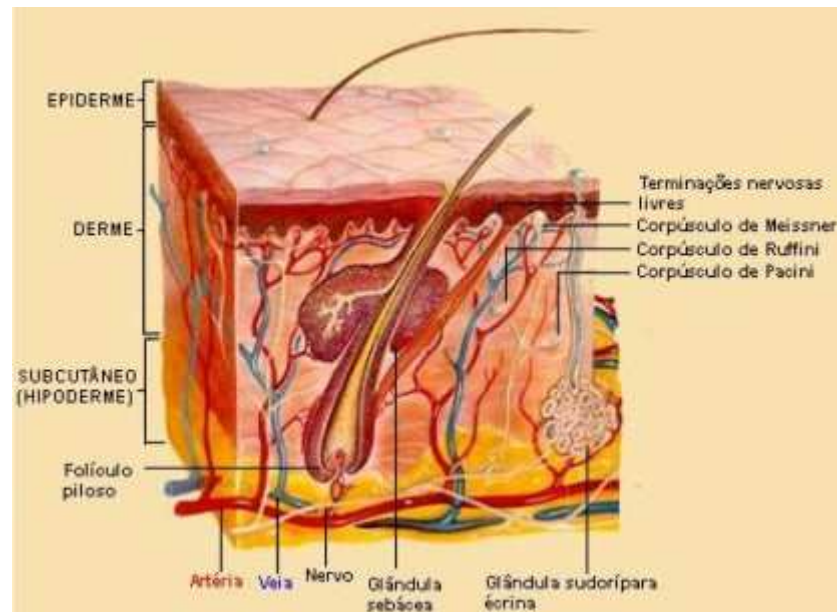


Figura 2. Camadas da pele. (<<http://www.solamigo.org/Pele.htm>>)

2.2 O Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento é um processo sistêmico global a que todo ser vivo está sujeito com o avançar da idade, tendo como consequência várias alterações que podem ser perceptíveis ou silenciosas. Entre elas, observam-se várias modificações que comprometem o bom funcionamento do organismo, mudando o biorritmo de todos os sistemas orgânicos, como circulatório, ósseo e nervoso. Porém, a aparência externa também fica comprometida, pois a pele sofre alterações visíveis (MAGALHÃES, 2000; ROBERT, 1994).

A partir dos 20 anos, sem que se perceba, a pele começa a perder lentamente algumas propriedades de resistência e auto-regeneração. O processo é lento e irreversível, e distinto segundo o tipo de pele de cada um. Neste processo influem de forma decisiva as doenças, os medicamentos, a contaminação ambiental, as condições climáticas e, além disso, a alimentação e a qualidade de vida.

À medida que as fibras de colágeno e elastina, que formam o chamado tecido de sustentação, reduzem sua eficácia, a pele perde, pouco a pouco, sua capacidade

de manter a flexibilidade, elasticidade e firmeza naturais. Os sinais mais significativos de envelhecimento da pele são: rugas, mancha, pele seca, perda de luminosidade, flacidez etc (BUCHLI, 2002).

A maior parte dos sinais visíveis do envelhecimento é causada pelos raios UV. Não somente o excesso de sol ou as queimaduras que ocasionalmente causam danos graves, como também as doses moderadas de sol que as pessoas recebem diariamente, a longo prazo, constituem ameaça efetiva para a saúde e a beleza da pele. A Figura 3 mostra os espectros com os comprimentos de onda visíveis ao olho humano, sendo que os raios UVB possuem comprimento de onda 280-320 nm e os raios UVA 320-400 nm, não sendo visíveis aos olhos humanos.

Através de estudos recentes tem se demonstrado que as alterações podem ser prevenidas pelo uso de produtos que contenham ativos hidratantes, nutritivos e que sejam protetores como filtros solares, vitaminas e alfa-hidroxiácidos (BENY, 2003; MAIA CAMPOS 2006).

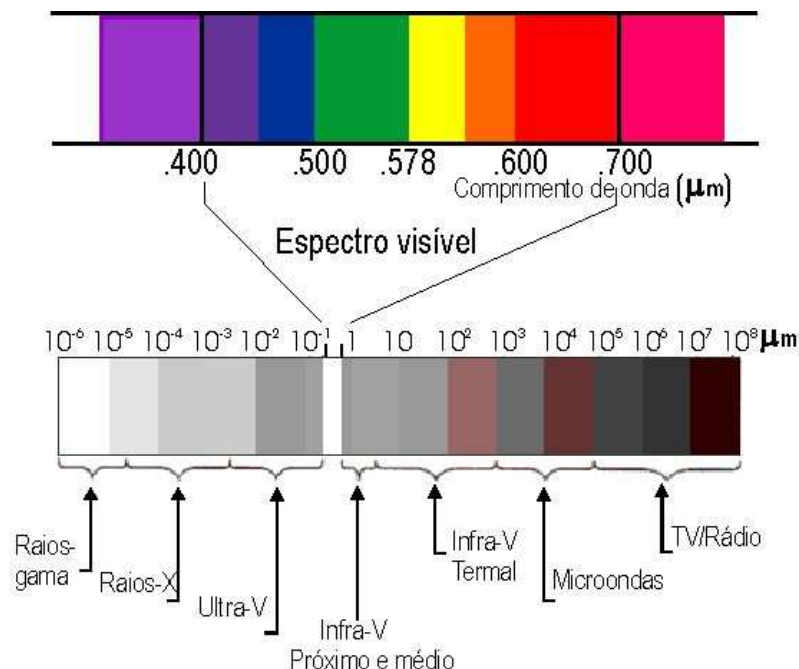


Figura 3. Espectro eletromagnético.

(<http://www.dpi.inpe.br/~carlos/Academicos/Cursos/Pdi/pdi_cores.html>)

2.3 Emulsões

Em 1925, Hatschek (RAM e SHAH, 1984) definiu emulsão como um sistema de duas fases, consistindo de uma dispersão completamente grosseira de um líquido em outro, na qual o primeiro líquido não era miscível.

Lissant (1970) relata o estudo de emulsões como construções geométricas, com ênfase ao comportamento e propriedades das mesmas, sendo que emulsão é definida como uma dispersão razoavelmente estável de uma fase líquida em outra líquida, imiscível.

A emulsão deve conter no mínimo três componentes: a fase dispersa, o meio dispersor e o agente emulsificante (REMINGTON'S 1990 e RIEGER 1986). A determinação da fase dispersa dependerá primariamente do agente emulsificante usado e das quantidades relativas das duas fases. Desta maneira, uma emulsão na qual o óleo é disperso em gotículas na fase aquosa é chamada de emulsão óleo em água ou O/A. Quando a água é dispersa no meio oleoso, a emulsão é chamada de água em óleo ou A/O. A maioria das emulsões via oral são do tipo O/A; já as loções e cremes emulsificadas podem ser do tipo O/A ou A/O, dependendo do uso. Observa-se também que emulsões A/O ocasionalmente mudam para emulsões O/A e vice-versa. Esta mudança na emulsão é chamada inversão. Nos últimos anos tem se desenvolvido das emulsões múltiplas, onde três fases estão presentes podendo apresentar-se como A/O/A ou O/AO.

Quando dois líquidos imiscíveis são mecanicamente agitados, ambas as fases tendem, inicialmente, a formar gotículas. Quando a agitação é cessada, as gotículas rapidamente coalescem e os dois líquidos se separam. O tempo de vida das gotículas é aumentado pela presença de um emulsificante, uma vez adicionado aos dois líquidos imiscíveis. Normalmente, apenas uma fase persiste sob a forma de gotículas por um prolongado período de tempo. Esta fase é chamada interna (dispersa ou descontínua) e encontra-se circundada por uma fase externa (contínua). Um emulsificante funciona e é operacionalmente definido como sendo um estabilizador das gotículas ou glóbulos da fase interna. Com base nas suas

estruturas, os emulsificantes podem ser descritos como moléculas contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas. Por esta razão, tal grupo de compostos é denominado frequentemente anfifílico (RIEGER, 1986, RUBINSTEIN, 1989, TRADOS e VICENT 1983).

Cremes são emulsões semisólidas, de consistência e características reológicas dependentes do tipo de emulsão e da natureza dos sólidos da fase interna. Afirma-se que bases de cremes farmacêuticos são essencialmente sistemas de emulsões semi-sólidas (BREUER, 1985, O'LAUGHLIN et al, 1989, PRISTA et al, 1990). Os cremes mais comuns são sistemas óleo em água (O/A), nos quais a estrutura ou o caráter semi-sólido é dependente ou das gotículas líquidas emulsificadas ou partículas que compreendem a fase interna. São usualmente preparados em altas temperaturas (método de fusão), usando materiais na fase interna tais como óleos vegetal ou mineral; ésteres; ácidos graxos; alcoóis; etc. Após resfriamento estes elementos permanecem como dispersos ou como gotículas microscópicas emulsificadas, cristais líquidos, partículas sólidas ou esferas, criando uma estrutura tridimensional ou matriz, que invade a fase aquosa externa (FLYNN, 1989).

Geralmente, os produtos hidratantes são encontrados na forma de emulsões (cremes e loções), sendo que a fase lipídica promove a oclusão e a fase aquosa possui ingredientes higroscópicos que propiciam a umectação da epiderme. Dentre os mecanismos de ação desses produtos podemos citar:

- **Oclusão:** promovida por componentes lipídicos, como vaselina, lanolina, óleos entre outros (LIBARDI, 1999).
- **Umectação:** ocorre com a aplicação de substâncias higroscópicas que retém água na superfície da pele, como glicerina, propilenoglicol e sorbital.
- **Hidratação ativa:** oferecida por componentes ativos intracelulares com capacidade higroscópica ou através da ação na estrutura celular como os alfa-hidroxiácidos, vitamina E, uréia, lactato de amônio entre outros.

2.3.1 Análise das matérias-primas da emulsão

Fase aquosa:

- **umectante**: diminuem a perda de água dos produtos acabados e impedem a ruptura e formação de crostas superficiais na emulsão; facilitam o espalhamento e ação lubrificante dos cremes; atuam melhorando a aderência dos pós; retêm a umidade junto à pele, prevenindo o seu ressecamento.
- **quelante**: formam complexos solúveis com certos componentes da fórmula, podendo ser usados para eliminar da preparação substâncias indesejáveis ou facilitar a dissolução das mesmas.
- **conservante**: Impedir proliferação bacteriana.
- **veículo**: meio de dispersão dos componentes.

Fase oleosa:

- **emoliente**: Possuem ação amaciante da pele, ajudam a hidratar e a restaurar a oleosidade perdida devido ao seu ressecamento; responsável também pelo espalhamento da emulsão.
- **emulsionante**: São tensoativos ou substâncias anfifílicas responsáveis pela redução da tensão superficial entre água e óleo permitindo que se misturem e formem uma emulsão.
- **polímero doador de viscosidade**: Doa viscosidade à formulação.

2.4 Vitaminas

Vitaminas são substâncias constituídas por moléculas orgânicas, apresentam funções muito importantes e indispensáveis no metabolismo dos seres vivos; são necessárias apenas pequenas quantidades e não são sintetizadas pelos mesmos (SILVA FILHO e PIRES, 2002).

Esses compostos são efetivos em pequenas quantidades, não fornecem energia e não são utilizados como unidades construtoras para a estrutura do organismo, mas são essenciais para a transformação da energia e para a regulação do metabolismo da unidade estrutural (MAIA CAMPOS, 2006).

Casimir Funk cunhou a palavra vitamina em 1911 estudando a obtenção de um produto originado da casca e da película do arroz, que continha um grupo funcional amina, que foi capaz de reduzir os sintomas de uma doença muito comum nos marinheiros japoneses conhecida como beribéri (LEHNINGER, 1983).

A associação entre vitaminas e a boa saúde foi determinada há algum tempo. Entretanto as vitaminas não eram usadas até recentemente de forma ampla em cosméticos, devido à crença de que não poderiam penetrar na pele e à atividade metabólica da pele não ser adequadamente conhecida.

Estudos de laboratório e clínicos indicaram a utilidade das vitaminas aplicadas topicamente no combate a várias doenças de pele, especialmente para ajudar prevenir, retardar ou impedir certas mudanças degenerativas associadas ao processo de envelhecimento, como a pele seca e escamosa, e a formação de rugas.

O caráter “natural” das vitaminas induziu o seu uso em cremes e loções para manter a maciez e a suavidade da pele por meio do “suprimento da umidade natural” (IDSON, 1994).

2.4.1 Vitamina E

A vitamina E foi descoberta em 1922 pelo Dr. Herbert Evans (professor de Bioquímica da Universidade da Califórnia). O estudo demonstrou a necessidade dessa vitamina nos processos normais de reprodução em ratos, advindo daí o nome tocoferol (do grego *tocos* = parto + *phercin* = levar adiante + *ol* = pela natureza alcoólica da substância).

Principais fontes: óleo de germen de trigo, óleo de soja, semente de girassol, óleo de semente de algodão, óleo de milho, amêndoa, óleo de açafrão, azeite de oliva, amendoim, batata inglesa, ovos e folhas verdes (MAIA CAMPOS, 2006).

A vitamina E ou α -tocoferol é potencialmente uma das vitaminas mais interessantes na luta contra o envelhecimento cutâneo. O α -tocoferol, a principal molécula constituinte da vitamina E, é um álcool que pode ser sintetizado e obtido da natureza, é instável e comercializado na forma de acetato de tocoferila, que não possui a mesma ação que o tocoferol quando avaliado *in vitro* (SCOTTI e VELASCO, 2003).

A vitamina E funciona basicamente *in vivo* como um antioxidante, inibindo a oxidação de lipídeos insaturados, funciona como doador de elétron e, como tal, reage diretamente com os radicais livres.

A vitamina E atua sinergicamente com a glutathione peroxidase, sendo dependente do selênio e da glutathione, e com a vitamina C, reduzindo a vitamina E oxidada e deixando-a novamente com ação antioxidante. Ao mesmo tempo que o tocoferol protege a membrana celular é regenerado pelo ubiquinol e/ou ácido ascórbico e o ascorbil é recuperado pela glutathione reduzida e esta é regenerada por grupamentos tióis (FUCHS, 1998; GARCIA, 1996; KAMAL-ELDIN, 1996).

Agentes protetores como os tocoferóis, são vistos como componentes essenciais da bicamada lipídica das membranas biológicas, associados em particular com a proteção contra níveis aumentados de radicais livres e com a

interrupção de reações de radicais livres. Quando adicionado a cosméticos, fornece proteção contra aquelas partículas químicas destrutivas que comprometem a integridade da pele e do cabelo (IDSON, 1994).

2.4.2. Vitamina C

É uma vitamina hidrossolúvel presente em grande parte dos vegetais e frutos, desempenha papel fundamental nas reações de oxido-redução nas células, agindo como um transportador de hidrogênio ou como um captor de moléculas isoladas de oxigênio (O₂).

A vitamina C é uma das mais utilizadas em produtos tópicos de cuidados da pele, pois permite alcançar níveis da vitamina que não seriam possíveis com a ingestão diária por meio de alimentação ou suplementação oral.

Compostos derivados do ácido ascórbico, como por exemplo: fosfatos, palmitatos, ascorbatos entre outros, vem sendo usados para compensar a alta instabilidade da vitamina C quando utilizada em aplicações tópicas. Como exemplo o tetraisopalmitato de ascorbila, atua na pele estimulando a renovação celular e aumentando a hidratação cutânea nas camadas mais profundas da epiderme.

Além disso, a vitamina C pode ser associada com a vitamina E, as quais apresentam efeitos sinérgicos contra os danos da radiação ultravioleta (MAIA CAMPOS, 2006).

A vitamina C tem sido importante no tratamento de patologias variando de câncer ao resfriado comum, presumivelmente devido às suas funções antioxidantes. Além disto, os pesquisadores demonstraram que o tratamento com ácido ascórbico tópico pode retardar de forma significativa os danos causados pelos raios UVA à pele, agindo como um fotoprotetor biológico de amplo espectro e/ou um antiinflamatório (IDSON, 1994).

2.5 Vitaminas utilizadas como padrão no trabalho

2.5.1 Tetraisopalmitato de ascorbila

É um derivado lipossolúvel do ácido ascórbico, solúvel em vários tipos de óleos cosméticos e altamente estável ao calor, quando comparado a outros derivados da vitamina C. É absorvido pela epiderme, lá sendo hidrolisado, liberando o ácido ascórbico, que penetra rapidamente até a junção epiderme-derme, onde libera a vitamina C intacta. É usado em produtos cosméticos em concentração a partir de 1%. Possui aspecto incolor a amarelo claro, teor de no mínimo 95%, não sofre interferência de pH, não necessita de sistema tampão ou antioxidante. Pode ser aquecido dentro da fase oleosa em emulsões, até aproximadamente 80°C (Ficha técnica Nikkol). (Figura 4)

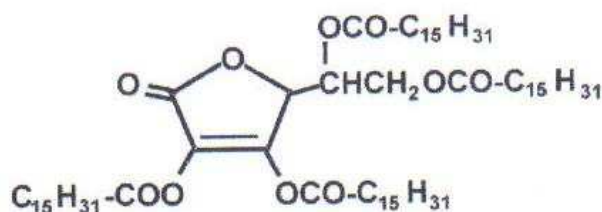


Figura 4. Fórmula estrutural do tetraisopalmitato de ascorbila

2.5.2. Acetato de tocoferila

Atualmente, o acetato de tocoferila é considerado essencial para a estabilização das membranas biológicas, especialmente aquelas contendo grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Possui efeitos no crescimento piloso, melhora na microcirculação da pele, proteção contra raios UVB, aumento da hidratação da camada córnea da pele e efeitos antiinflamatórios. É usado em produtos cosméticos em concentração a partir de 0,50%. Possui aspecto líquido oleoso levemente amarelo a esverdeado, teor de pureza 96 – 102 %. (Figura 5)

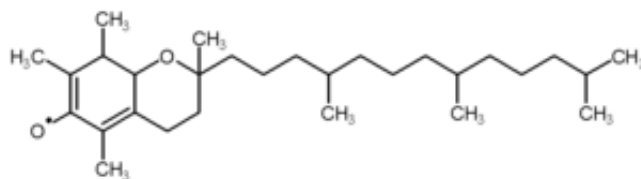


Figura 5. Fórmula estrutural do tocoferol

Algumas características físico-químicas das vitaminas em estudo estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas das vitaminas C e E.

Vitaminas	Denominação INCI	MM	Aspecto físico	Solubilidade
C	<i>Ascorbyl Tetraisopalmitate</i>	1129.8	Líquido incolor a amarelo claro	Solúvel em óleo mineral, óleo de rícino, alguns silicones e etanol
E	<i>Tocopheryl acetate</i>	472.75	Líquido oleoso levemente amarelo a esverdeado	Solúvel em álcool, miscível em éter e clorofórmio

Legenda: MM=massa molecular;INCI=*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*. (Ficha técnica Nikkol)

2.6 Espectrofotometria derivada no ultravioleta (UVD)

A técnica de espectrofotometria é uma das mais frequentemente empregadas em análises farmacêuticas. Envolve a medida da quantidade de radiação ultravioleta ou radiação visível (UV-VIS) absorvida pela substância em solução (BECKETT e STENLAKE, 1988).

A espectrofotometria baseia-se na medida de transmitância ou absorbância de uma radiação monocromática que atravessa uma solução contendo uma substância absorvente e na relação entre estas medidas e a concentração da espécie absorvente. Essa energia absorvida pela substância em análise provoca a excitação dos elétrons do seu estado fundamental ou normal a estados de maior energia ou estado excitado, fenômeno conhecido como transição eletrônica (BECKETT e STENLAKE, 1988; SILVERSTEIN et al., 1994).

Uma larga variedade de compostos orgânicos e inorgânicos pode ser determinada quantitativamente, através da medida da absorção baseada na radiação UV-VIS. As variáveis que influenciam o espectro de absorção de uma substância incluem o pH da solução, a temperatura, a natureza do solvente empregado, a concentração de eletrólitos e os componentes da amostra (SKOOG et al, 2002).

A espectrofotometria direta muitas vezes não pode caracterizar uma mistura de princípios ativos ou mesmo um só em uma matriz complexa, devido a sobreposição das bandas, impedindo a absorção do componente de interesse.

Com o desenvolvimento da espectroscopia acoplada a computadores, foi possível o desenvolvimento de técnicas que permitiram a análise direta de misturas, dentre as quais pode-se citar a espectrofotometria derivada.

O termo espectrofotometria derivada se refere à técnica de medida espectral na qual a inclinação do espectro, ou seja, a taxa de alteração da absorbância que ocorre com a mudança do comprimento de onda durante a varredura, é medida em

função do comprimento de onda. A derivação do espectro original (zero-ordem) dá origem ao espectro de primeira derivada, que após derivação originará o de segunda derivada e assim, sucessivamente (PERKAMPUS, 1992).

O espectro derivado é obtido se a diferença de absorbância for calculada em vários pontos para um intervalo dado de λ . Os máximos de absorbância do espectro original corresponderão à zero no espectro derivado. Se a medida da altura de um pico derivado for realizada no comprimento de onda no qual o espectro dos demais componentes cruza a linha do zero, a medida é proporcional somente à concentração do composto analisado. Tal abordagem de determinação quantitativa é denominada de método “zero-crossing” ou ponto de anulação (THOMAS, 1996; KARPINSKA, 2004).

Como inconveniente da técnica derivada, tem-se que o sinal de ruído aumenta progressivamente com o aumento da ordem da derivada. A forma do espectro depende do sinal de ruído de um espectro derivado (SANCHEZ, et al., 1988).

2.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

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

A descoberta da cromatografia como uma técnica analítica é geralmente atribuída ao botânico russo M. Tswett, o qual conseguiu separar pigmentos de cloroplastos contidos em folhas de plantas utilizando um tubo de vidro preenchido com carbonato de cálcio. Empregando o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna de vidro (MORHY, 1976).

A separação cromatográfica é o resultado de interações específicas entre as moléculas da amostra e as fases móvel e estacionária. Uma vez que a migração diferencial é dinâmica e depende do equilíbrio de distribuição de cada componente entre a fase móvel e a fase estacionária, a composição de ambas as fases, o fluxo e a temperatura de separação serão as variáveis que afetarão o processo. A mobilidade exibida pelo soluto dar-se-á em função de diferenças na adsorção, partição, solubilidade, pressão de vapor, tamanho da molécula ou densidade de carga iônica (CASS; DEGANI, 2001; USP 2005).

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

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

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

Os detectores fotométricos UV medem as mudanças na absorção de luz monocromática na região de 190-350nm e são os mais empregados em CLAE. Este detector mede a absorbância indicando a mudança de concentração ou a massa dos

compostos da amostra que estará deixando a coluna cromatográfica (COLLINS, 1995).

2.7.1 Vantagens e Limitações da CLAE

As vantagens da CLAE são:

- Alta resolução na separação;
- Alta precisão nas análises quantitativas;
- Boa sensibilidade;
- Versatilidade, pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como inorgânicos;
- Alta reprodutibilidade;

Dentre as limitações pode-se citar:

- Alto custo da instrumentação;
- Grande volume de fase móvel descartada;

2.8 Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*) é definida como o movimento diferencial de espécies carregadas sob o efeito de um campo elétrico e trata-se de um fenômeno conhecido há muitas décadas. O responsável pela introdução desta técnica para a separação de espécies foi Arne Tiselius, 1937 (TISELIUS, 1930). Neste trabalho, misturas de proteínas foram separadas em tubos contendo soluções tampão, sob o efeito de um campo elétrico.

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

Apenas próximo aos anos 80 a eletroforese começaria a desenvolver contornos de uma técnica de separação de alta eficiência. Jorgenson e Lukacs demonstraram que o uso de tubos com diâmetros ainda menores ($<100\mu\text{m}$) produzia alta eficiência nas separações eletroforéticas (JORGENSON e LUKACS, 1981). Por apresentarem pequeno diâmetro interno, foram denominados de capilar.

A eletroforese capilar pode ser considerada um avanço recente entre as técnicas analíticas que tem despertado interesse de diversos grupos de pesquisa em todo mundo, aumentando de forma vertical sua aplicação e utilidade. A CE vem sendo aplicada na separação desde íons inorgânicos até células inteiras, compreendendo espécies orgânicas e inorgânicas de interesse de todas as áreas relacionadas às ciências naturais.

A instrumentação consiste em fornecedor de alta voltagem, capilar de diâmetro estreito (25 – 100 μm), eletrodos (geralmente de platina), e um detector apropriado. A aplicação de um potencial de 10-30 kV sobre o capilar provoca movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos, resultando em movimento das espécies iônicas da amostra ao longo do capilar e passando através do detector. A passagem pelo detector é chamada de eletroferograma (ALTRIA, 1996).

A mobilidade dos íons do soluto depende do tamanho das partículas, seguido do número de cargas iônicas. Sendo assim um íon muito pequeno movimenta-se mais rapidamente do que um maior, com o mesmo número de cargas.

2.8.1 Fluxo eletrosmótico

A sílica fundida tem sido o material mais empregado, dentre os vários materiais empregados na fabricação de capilares e a utilização deste é responsável por um importante fenômeno em CE, o fluxo eletrosmótico (FEO).

O fluxo eletrosmótico tem sua origem na atuação de um campo elétrico sobre as espécies carregadas na região difusa da dupla camada elétrica, formada devido à carga da parede interna do capilar. Para um capilar de sílica fundida em contato com uma solução com valor de pH acima de 2, os grupos silanol da superfície apresentam-se desprotonados e proporcionam carga negativa à parede. Para contrabalancear as cargas da parede há, na região próxima a esta, o excesso de cargas positivas, provenientes dos cátions da solução. A aplicação do campo elétrico ao longo do capilar causa a movimentação dos íons positivamente carregados, presentes na camada difusa, no sentido do cátodo (DA SILVA, 2007). Desta maneira a movimentação dos íons dentro do capilar passa a depender não somente da sua própria mobilidade, mas também da mobilidade do fluxo eletrosmótico.

O FEO ocorre do ânodo (pólo positivo) para o cátodo (pólo negativo) em condições de polaridade normal. O fluxo formado origina um perfil de fluxo planar (radial) (Figura 6), diferente do perfil do fluxo parabólico observado nos sistemas de alta pressão, como CLAE, o que contribui para a alta eficiência dos picos obtidos (CAMILLERI, 1998).

A presença do FEO permite a separação e detecção de cátions, ânions e substâncias neutras numa análise simples. A migração, portanto ocorre pela movimentação eletroforética de cada uma delas e pela velocidade do fluxo eletrosmótico (SANTORO et al, 2000; ALTRIA, 1996).

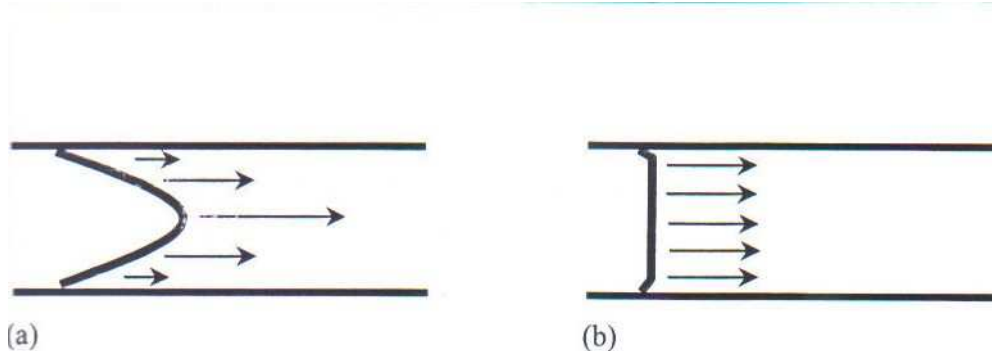


Figura 6. (a) fluxo parabólico, típico na técnica de CLAE (b) fluxo radial, típico na técnica de CE (CARVALHO, 2003).

2.8.2 Sistemas de detecção

Os detectores podem ser classificados em dois tipos: os universais e os específicos. Os detectores universais medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução. Desta maneira o sinal não depende das propriedades do soluto, mas da diferença entre as propriedades do soluto e solução. Este modo de detecção é interessante para a determinação quando a separação das espécies é completa. Nesta classe estão incluídos os detectores de índice de refração e condutividade, entre outros que empregam métodos indiretos. Os detectores específicos medem uma propriedade específica do soluto, que não são semelhantes em todas as espécies. A detecção é, portanto, limitada aos solutos que possuem a referida propriedade. Um sistema de detecção seletivo é interessante quando a separação total das espécies presentes na amostra não ocorre. Nesta classe estão incluídos os fotodetectores baseados na absorção na região do UV/VIS, na fluorescência, ou no espalhamento Raman, os espectrômetros de massas, os detectores amperométricos e os radiométricos (TAVARES, 1996).

2.8.2.1 Detecção condutométrica sem contato

A detecção condutométrica tem demonstrado um grande potencial na análise de íons (MIKKERS,1979;HUANG,1987), sendo amplamente utilizada em cromatografia de íons.

Esse tipo de detecção é uma boa alternativa à detecção fotométrica, principalmente na análise de soluções de baixa concentração, quando a falta de sensibilidade é o principal obstáculo para a detecção indireta na região do UV. Por outro lado, a interferência do elevado campo elétrico para a separação dos analitos e os danos causados aos pequenos eletrodos expostos as amostras podem gerar problemas adicionais.

Fracassi da Silva e colaboradores, assim como, Zemmann e colaboradores demonstraram, quase que simultaneamente e totalmente independentes, a possibilidade da detecção condutométrica sem contato dos eletrodos em solução (DA SILVA et al, 1998) (ZEMANN et al, 1998).

Neste tipo de detecção o aumento da frequência do sinal durante as medidas de condutividade (oscilometria) possibilita a instalação dos eletrodos fora do capilar, superando os problemas de interferência. A detecção condutométrica sem contato (*capacitively coupled contactless conductivity detection – C⁴D*) é proporcionada através do acoplamento dos dois eletrodos, em forma de anel, em torno do revestimento interno de poliimida do capilar de sílica fundida. A resposta do detector é devida, essencialmente, às diferenças de condutividade entre o eletrólito e o analito, ou seja, a detecção é baseada na substituição do co-íon presente no eletrólito pelo analito. Nos casos em que o analito apresenta maior mobilidade que o co-íon do eletrólito ocorre um aumento da condutividade nessa região, o qual é registrado com sinal positivo. Por outro lado, quando o co-íon apresenta maior mobilidade que o analito, o pico é registrado como um sinal negativo, portanto, quanto maior a diferença entre as mobilidades, maior a sensibilidade obtida.

A CE- C⁴D destaca-se pela simplicidade em relação ao instrumental utilizado quando comparado aos métodos com detecção óptica, que dependem de lâmpadas, monocromadores e fotocélulas.

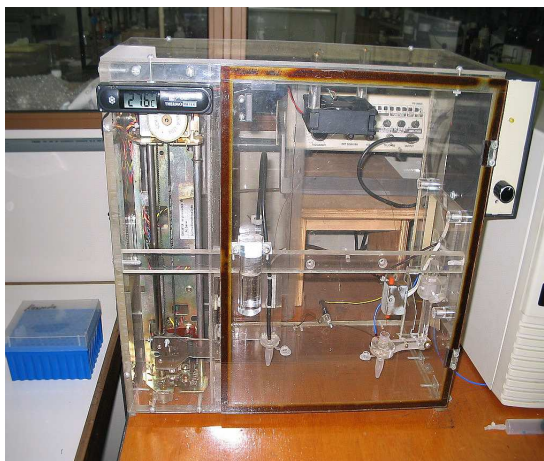


Figura 7. Equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato utilizado durante o trabalho (NOGUEIRA, 2006).

2.8.3 Classificação da Eletroforese Capilar

A CE possui diferentes técnicas especializadas com vários mecanismos de separação. De acordo com o modo de separação pode ser classificada em:

- Eletroforese capilar em solução livre (FSCE; *free solution capillary electrophoresis*);
- Eletroforese Capilar em gel (CGE; *capillary gel electrophoresis*);
- Focalização isoelétrica capilar (CIEF; *capillary isoelectric focusing*);
- Isotacoforese capilar (CITP; *capillary isotacophoresis*);
- Cromatografia eletrocínética micelar (MECK: *micellar electrokinetic chromatography*);
- Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão (MEEKC: *microemulsion electrokinetic chromatography*);
- Eletrocromatografia capilar (CEC; *capillary electrochromatography*);

2.8.4 Vantagens e Limitações da CE

Algumas vantagens da CE são:

- Baixo custo, não apenas pelo equipamento, mas por utilizar baixos volumes de reagentes, particularmente comparando com a CLAE;
- Separação de alta eficiência;
- Versatilidade, já que um único capilar pode ser utilizado para a separação de compostos completamente diferentes, bastando apenas a adequação do eletrólito de corrida para a separação;
- Geralmente não é necessário um pré-tratamento da amostra;
- Exige pequeno volume de amostra;
- Tempo de análise bem reduzido;
- As análises podem ser realizadas em grande intervalo de pH.

Dentre as limitações podemos citar:

- Baixa sensibilidade quando se usa detecção UV.

OBJETIVOS

III- OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- Objetivo Geral:

- Desenvolver e validar metodologias analíticas empregando as técnicas de Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Eletroforese capilar (EC), Espectrofotometria Derivada no Ultravioleta (UVD) para a determinação do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila em formulações cosméticas.

- Objetivos Específicos:

- Desenvolver formulações cosméticas para incorporar os princípios ativos: acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila.
- Quantificar o acetato de tocoferila e o tetraisopalmitato de ascorbila simultaneamente empregando diferentes técnicas analíticas.

MATERIAL E MÉTODOS

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os reagentes e solventes usados foram de grau analítico.

4.1.1 Solventes, reagentes e outros:

- Acetonitrila grau cromatográfico (Merck[®]);
- Água purificada MilliQ[®];
- Álcool isopropílico (Merck[®]);
- Clorofórmio grau cromatográfico (Merck[®]);
- Dodecilsulfato de sódio (Synth[®]);
- Etanol (p.a.) grau cromatográfico (Merck[®]);
- Filtro de papel qualitativo grau 104 (Millipore[®]);
- Fosfato de sódio monobásico (Synth[®]);
- Membrana filtrante HV Millex 0,45 µm 47mm (Millipore);
- Metanol grau cromatográfico (Merck[®]);
- Seringa de vidro 100 µL (Hamilton);
- Tetraborato de sódio (Synth[®]);
- Unidade filtrante HV em PE com membrana Durapore 0,45 µm 13 mm, não estéril (Millipore[®]);
- Vidrarias usuais e volumétricas.

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico modelo 103 (Nova Ética[®]);
- Aparelho de Eletroforese Capilar com detecção condutométrica sem contato construído no Laboratório de automação e instrumentação analítica – LAIA, pertencente ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo;
- Balança Analítica- marca Sartorius[®], capacidade 100g, precisão ±0,0001;
- Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (5µm) 125mm x 4,6mm,(Merck[®]);

- Coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]
- Cromatógrafo à líquido modelo CG 480 C. com “loop” fixo de 20 μL , detector UV, modelo CG 435, integrador CG modelo 200;
- Cromatógrafo líquido modelo Intralab 5100, válvula de injeção Rheodyne 30 μL , detector UV;
- Espectrofotômetro Shimadzu[®] UV 1601 – PC, duplo feixe, acoplado a computador e impressora, com cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico;
- Sistema de purificação de água MilliQ – Plus, Millipore[®] para obtenção da água;
- Tubo de capilar de sílica fundida (Polymicro Technology[®]). Capilar para EC com diâmetro interno de 50 μm , diâmetro externo de 375 μm e comprimento total de 57 cm;

4.1.3 Substâncias empregadas como padrão

- Acetato de tocoferila, Cosmotec[®], teor 96%
- Tetraisopalmitato de ascorbila, Cosmotec[®], teor 95%

4.1.4 Matérias-primas

- Vitamina E óleo (Acetato de tocoferila);
- Tetraisopalmitato de ascorbila (VC-IP);
- EDTA;
- Phenoben;
- Glicerina;
- Água destilada;
- Ciclometicone;
- Isonanoato de cetoestearila;
- Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico;
- Hostacerin SAF;

4.1.5 Amostras

As amostras contendo as vitaminas E e C associadas foram preparadas em pequena escala no laboratório enquanto o placebo preparado em farmácia de manipulação “idônea” (ISO 9001 de qualidade).

4.1.6 Desenvolvimento da formulação:

4.1.6.1 Formulação manipulada e seus respectivos excipientes

Tabela 2. Fórmula: Emulsão O/A

	Substância	%	Função
	Ciclometicone	2,0	emoliente
	Isonanoato de cetoesterila	3,0	emoliente
Fase	Triglicérides dos ácidos	4,0	emoliente/emulsificante
Oleosa:	Cáprico/caprílico		
	Hostacerin SAF	5,0	polímero doador de viscosidade/emulsificante
	Phenoben	qs.	conservante
Fase	EDTA	0,1	quelante
Aquosa:	Glicerina	4,0	umectante
	Água purificada	qsp. 80,0	veículo

4.1.6.2 Preparação da formulação

Aquecer as fases à 75°C, verter a fase aquosa na oleosa, homogenizar até esfriar, adicionar o ciclometicone e o Hostacerin SAF.

As vitaminas foram adicionadas no momento em que eram analisadas, na concentração de 3% cada.

4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Caracterização do acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila

4.2.1.1 Espectrofotometria no ultravioleta (UV)

As substâncias de referência foram analisadas por espectrofotometria no ultravioleta (UV) na faixa de comprimento de onda de 200 a 350 nm, tendo o etanol como veículo. A velocidade de varredura utilizada foi de 370 nm/min, intervalo de leitura de 0,2 nm, usando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

4.2.2 Método espectrofotométrico

4.2.2.1 Ensaios preliminares

As seguintes condições iniciais foram usadas para desenvolver o método de doseamento do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila por espectrofotometria no ultravioleta.

Intervalo de varredura: 200 - 350 nm

Velocidade de varredura: 370 nm/min

Ordem do espectro: ordem zero e terceira derivada

Solventes testados: álcool isopropílico e etanol

Cubeta de quartzo de 1 cm

Intervalo de leitura: 0,2 nm

4.2.2.2 Otimização das condições experimentais

Após realização dos ensaios preliminares, as seguintes condições foram adotadas:

Velocidade de varredura: 370 nm/min

Intervalo de varredura: 200 – 350 nm

Solvente: etanol

Ordem do espectro: terceira derivada

$\Delta\lambda$: 8 nm

Assentamento das ordenadas: - 1,0 a 3,0

O uso do etanol foi preferível pelo fato de ser o solvente que melhor solubilizou as amostras.

As leituras foram realizadas usando-se o etanol como branco.

4.2.2.3 Construção da curva analítica

Foram pesados exatamente cerca de 25 mg de acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila e transferidos cada um para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se quantidade suficiente de etanol até dissolução total e completou-se com o volume. Desta solução foram transferidas 5 alíquotas, cujos volumes variavam entre 0,5 e 4,5 mL para balões volumétricos de 25 mL. Os volumes destes balões foram completados com etanol, obtendo-se assim, soluções com intervalo de concentração variável entre 10 e 90 $\mu\text{g/mL}$ de acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila. Após o aparelho ter sido calibrado com solução de etanol, realizou-se a varredura das soluções no intervalo de 200 a 350 nm. Com esses espectros traçaram-se as derivadas de 3ª ordem, sendo realizadas as leituras a 233,2 nm para o tetraisopalmitato de ascorbila e a 282,6 nm para o acetato de tocoferila.

Foram obtidos os resultados do conteúdo dos balões nas condições experimentais mencionadas no item 4.2.2.2.

4.2.2.4 Interferência dos excipientes

Para verificação da interferência dos excipientes no método pesou-se 0,833 g da amostra especificada no item 4.1.6.2 adicionando-se as vitaminas estudadas na pesquisa (VC-IP e Vitamina E óleo), pesando as quantidades de 0,025 g cada, no mesmo béquer. O etanol foi adicionado aos poucos e a dispersão da emulsão foi realizada com o auxílio de um bastão de vidro e em banho-maria à aproximadamente 50°C. Transferiu-se o conteúdo do béquer para um balão volumétrico âmbar de 50 mL, completando-se o volume com etanol. Pipetou-se 5 alíquotas cujos volumes variavam entre 0,5 e 4,5 mL para balões volumétricos de 25 mL. A amostra da emulsão foi obtida da mesma maneira do item anterior.

4.2.3 Método cromatográfico

4.2.3.1 Ensaaios cromatográficos preliminares

Para a separação cromatográfica do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila foram usadas as seguintes condições:

- coluna: Sinergy Hidro RP-18- (4 µm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]
- modo: fase reversa
- fluxo de coluna: 1,0 mL/min
- temperatura: ambiente
- comprimentos de onda testados: 222, 235, 240, 243, 245 e 254 nm.

4.2.3.2 Sistemas testados

Foram testados os seguintes sistemas fases móveis com coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®] para separação do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila.

Tabela 3. Sistemas de fases móveis empregadas.

Sistema	Fase Móvel
1	ACN:MeOH (50:50)
2	ACN:MeOH (25:75)
3	ACN:MeOH:CHCl ₃ (45:45:10)
4	MeOH:2-propanol (45:55)
5	MeOH:2-propanol (35:65)
6	MeOH:2-propanol (25:75)

Legenda: ACN= acetonitrila; MeOH= metanol; CHCl₃= clorofórmio.

4.2.3.3 Otimização das condições experimentais

Após a realização dos ensaios preliminares, as seguintes condições foram adotadas para a validação do método:

- equipamento: Cromatógrafo a líquido SHIMADZU[®]
- modo: fase reversa
- método: isocrático
- fase móvel: MeOH:2-propanol (25:75)
- fluxo de trabalho: 1,0 mL/min
- injeção: automática
- volume injetado ("loop"): 20 μL
- detecção UV: 222 nm
- temperatura: ambiente

4.2.3.4 Validação do método CLAE para análise do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila

a) Curva de calibração

Preparação das soluções dos padrões

Foram pesados, analiticamente, 10 mg de acetato de tocoferila e 25 mg de tetraisopalmitato de ascorbila e, transferidos para balões volumétricos de 50 mL e 25 mL respectivamente, dissolvendo-se e completando-se com isopropanol, obtendo-se concentração final de 200 µg/mL de acetato de tocoferila e 1000 µg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila.

Alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mL das soluções padrão (200:1000 µg/mL) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 µg/mL de acetato de tocoferila e 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350 µg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila.

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

b) Determinação do limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando-se soluções padrão de baixa concentração, considerando a capacidade do método para detectar e quantificar baixas concentrações das vitaminas nas amostras.

O cálculo para o LD e LQ foi realizado pelo método baseado em parâmetros da curva analítica:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

onde “s” é a estimativa do desvio padrão da resposta e “S” é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica.

O mesmo critério do LD foi adotado para o LQ utilizando a relação 10:1

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

O método baseado nos parâmetros da curva analítica é estatisticamente confiável (RIBANI et al, 2004).

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

As análises foram realizadas com a solução padrão de cada vitamina, do placebo (creme sem o padrão) e da amostra manipulada.

d) Precisão

Preparação das soluções dos padrões

Foram utilizadas soluções padrão contendo 800 µg/mL de acetato de tocoferila e 800 µg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila. A seguir transferiu-se 0,5 mL de acetato de tocoferila e 2,5 mL de tetraisopalmitato de ascorbila destas soluções padrão para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel.

Preparação das soluções das amostras

Foi pesada amostra contendo 40 mg de acetato de tocoferila e 40 mg de tetraisopalmitato de ascorbila, esta foi dissolvida em isopropanol e colocada em

banho-maria à 50 °C, após quebra da emulsão transferiu-se a solução para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se 800 µg/mL da amostra. A solução foi então filtrada em papel de filtro. Do filtrado tomou-se alíquotas de 0,5 mL e de 2,5 mL e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, completaram-se os volumes com a fase móvel, obtendo-se as concentrações de 40 µg/mL e 200 µg/mL do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila respectivamente.

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

Foram realizadas dez determinações e os resultados analisados estatisticamente.

e) Exatidão – Teste de recuperação

Preparação das soluções dos padrões

Foram pesados exatamente cerca de 10 mg de acetato de tocoferila e 25 mg de tetraisopalmitato de ascorbila transferidas para balão volumétrico de 50 mL e 25 mL respectivamente, completando-se com isopropanol, obtendo-se 200 µg/mL de acetato de tocoferila e 1000 µg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila. Alíquotas de 0,5 a 3,5 mL das soluções anteriores foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL para o acetato de tocoferila e 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL para o tetraisopalmitato de ascorbila.

Preparação das soluções das amostras

Foi pesado do creme o equivalente a 10 mg de acetato de tocoferila e 25 mg de tetraisopalmitato de ascorbila cada um em beakers de 30 mL. Adicionou-se aproximadamente 20 mL de isopropanol, agitou-se, e aqueceu-se em banho-maria à 50 °C. Após a quebra da emulsão transferiu-se o creme com o acetato de tocoferila para um balão volumétrico de 50 mL e o creme com o tetraisopalmitato de ascorbila para balão volumétrico de 25 mL e completados com isopropanol. Ambos os balões foram filtrados em papel de filtro e em unidades filtrantes HV Millex 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore®). Obteve-se uma concentração analítica de 200 µg/mL da amostra com o acetato de tocoferila e 1000 µg/mL da amostra com o tetraisopalmitato de ascorbila.

Alíquotas das soluções padrão e amostras foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se o volume com a fase móvel, conforme esquema a seguir:

Balão	Solução padrão 200 µg/mL de acetato de tocoferila	Solução amostra 10 µg/mL
1	10,0	-----
2	-----	10,0
3	10,0	10,0
4	30,0	10,0
5	50,0	10,0

Balão	Solução padrão 1000 µg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila	Solução amostra 50 µg/mL
1	50,0	-----
2	-----	50,0
3	50,0	50,0
4	150,0	50,0
5	250,0	50,0

4.2.4 Método eletroforético

4.2.4.1 Ensaio eletroforético preliminares

Foram testados alguns sistemas tampões:

Tabela 4. Sistemas eletrólitos utilizados para a separação do tetraisopalmitato de ascorbila e do acetato de tocoferila usando o método de detecção condutométrica.

Sistema	Eletrólitos	pH
1	NaH ₂ PO ₄ 0,1M(20%),EtOH(20%),H ₂ O(60%)	7,0
2	NaH ₂ PO ₄ (20%),SDS100mM(50%),EtOH(20%),H ₂ O(10%)	7,0
3	NaH ₂ PO ₄ 10mM(10%),NaHPO ₄ (10%),SDS 50mM(20%), H ₂ O(60%)	2,5
4	NaH ₂ PO ₄ (10%),NaHPO ₄ (10%),SDS(10%), H ₂ O(70%)	7,0
5	n-octano(0,8%), SDS(3,3%), butanol(6,6%), Na ₂ B ₄ O ₇ 10mM(89,27%), H ₂ O	9,2

Legenda: NaH₂PO₄= Fosfato monobásico de sódio; EtOH=Etanol; SDS=Dodecilsulfato de sódio; Na₂B₄O₇= Tetraborato de sódio.

Para a realização das medidas por eletroforese capilar usando detecção condutométrica, utilizou-se um capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento e 50 µm de diâmetro interno (d.i.).

O capilar foi condicionado antes de cada ciclo de análises com fluxo constante de solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 15 minutos e, pelo mesmo período, com água deionizada e eletrólito de corrida. Posteriormente aplicou-se a alta tensão até a estabilização da linha base.

As medidas da tabela 4 foram realizadas em equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato construído no Laboratório de automação e instrumentação analítica – LAIA, pertencente ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Tabela 5. Sistemas eletrólitos utilizados para a separação do tetraisopalmitato de ascorbila e do acetato de tocoferila usando o método de detecção por arranjo de diodos (DAD).

Sistema	Eletrólitos	pH
1	20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 30 mM SDS, 10% MeOH, H_2O	9,2
2	n-octano(0,8%), SDS(3,3%), butanol(6,6%), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10mM(89,27%), H_2O	9,2
3	2-propanol(15%), acetato de etila(0,5%), butanol(1,2%), SDS(0,6%), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10mM (97,7%)	9,2

Para a realização das medidas por eletroforese capilar usando o sistema de detecção por arranjo de diodos (DAD), utilizou-se o seguinte:

Um equipamento de eletroforese capilar PACE/MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), equipado com um sistema de detecção por arranjo de diodos (DAD). Um software para o tratamento e aquisição de dados 32 Karat TM). As amostras foram introduzidas no capilar por injeção hidrodinâmica aplicando 0,5 psi/3s (1 psi = 6894,76 Pa). O instrumento foi operado sob polaridade positiva.

Condicionamento do capilar:

Foi utilizado capilar de sílica fundida com 75 μm de diâmetro interno (d.i.) e um comprimento total de 40,2 cm (30 cm até o detector). A temperatura do capilar foi mantida a 25 °C. Novos capilares foram acondicionados com uma solução de NaOH

0,1 mol.L⁻¹ durante 30 min, água deionizada por 20 min e solução eletrólito por 30 min. Ao iniciar o dia o capilar foi acondicionado com a solução de NaOH 0,1mol L⁻¹ por 10 minutos, 5 minutos com água deionizada e 10 minutos com o eletrólito de corrida. Entre corrida e corrida o capilar foi lavado com a solução de NaOH 0,1mol L⁻¹ por 1 min e 2 min como eletrólito de corrida. Ao final do dia o capilar foi lavado com a solução de NaOH 0,1mol L⁻¹ por 5 min e 5 min com água deionizada.

As medidas da tabela 5 foram realizadas em equipamento de eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos pertencente ao próprio laboratório.

4.2.4.2 Parâmetros experimentais

Método de detecção condutométrica

Tensão aplicada: -20 a 20 kV;

Tempo de injeção: 20 e 30 segundos;

Temperatura: 25°C;

Capilar: 50 µm d.i., e 50 cm de comprimento;

Polaridade:positiva;

Gravidade:100 mm de altura.

Método de detecção por arranjo de diodos

Tensão aplicasa: 18 kV , 22 kV e 25kV;

Tempo de injeção: 3 seg/0,5 psi;

Temperatura: 25°C;

Capilar: 75 µm d.i., 40,2 cm de comprimento total (30 cm até o detector);

Polaridade: positiva;

Comprimento de onda: 214nm, 222 nm e 235 nm.

4.2.5 Análise térmica do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila

4.2.5.1 Estudo termogravimétrico

O estudo termogravimétrico foi realizado nas seguintes condições:

- amostra: em torno de 5 mg
- razão de aquecimento: 10 °C/min (temperatura ambiente a 600 °C)
- atmosfera: ar (20mL/min) N₂ (50mL/min)
- vazão: 50 mL/min (TG/DTG)
- cadinho: platina

As curvas do branco para os ensaios foram obtidas nas mesmas condições utilizando um cadinho vazio.

As amostras estudadas foram:

- creme base
- creme base + VC-IP (3%)
- creme base + acetato de tocoferila (3%)
- creme base + VC-IP (3%) + acetato de tocoferila (3%)
- VC-IP (substância de referência)
- Acetato de tocoferila (substância de referência)

4.2.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O estudo de calorimetria exploratória diferencial foi realizado nas seguintes condições:

- amostra: em torno de 2 mg
- razão de aquecimento: 10 °C/min (temperatura ambiente a 600 °C)
- atmosfera: N₂
- vazão: 100 mL/min
- cadinho: alumínio

O branco das análises foi obtido nas mesmas condições, com o cadinho vazio.

As amostras estudadas foram:

- creme base
- creme base + VC-IP (3%)
- creme base + acetato de tocoferila (3%)
- creme base + VC-IP (3%) + acetato de tocoferila (3%)
- VC-IP (substância de referência)
- Acetato de tocoferila (substância de referência)

RESULTADOS

V- RESULTADOS

5.1 Métodos Analíticos

5.1.1 Caracterização

5.1.1.1 Espectrofotometria no UV

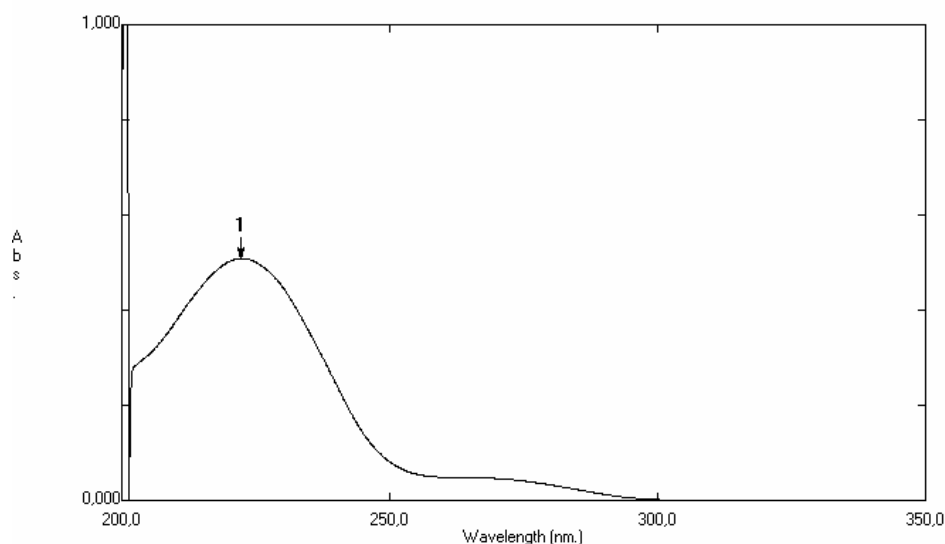


Figura 8. Espectro de absorção no ultravioleta da solução de tetraisopalmitato de ascorbila (50 μ g/mL) em etanol, pico máximo em 222,10 nm.

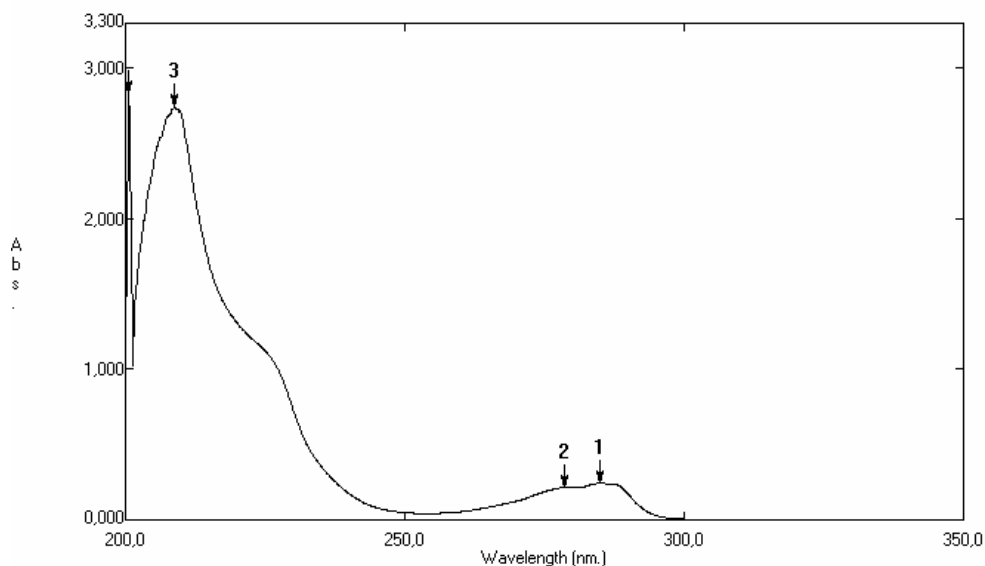


Figura 9. Espectro de absorção no ultravioleta da solução de acetato de tocoferila (50 μ g/mL) em etanol, picos máximos 1-(284,80 nm), 2- (278,70 nm) e 3- (208,70 nm).

5.2.1 Método espectrofotométrico direto no UV

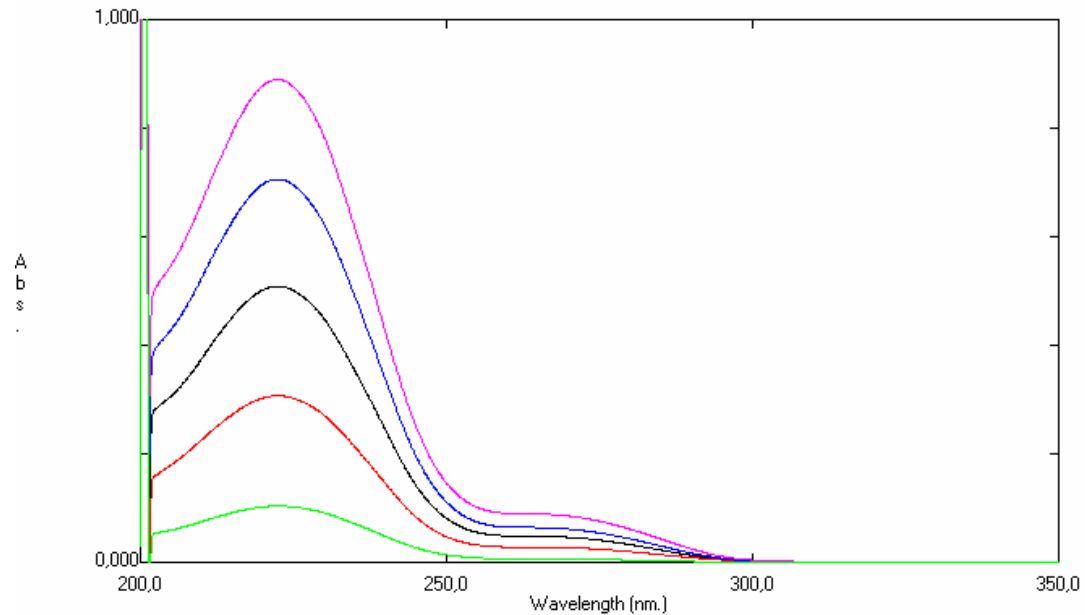


Figura 10. Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta do tetraispalmitato de ascorbila concentrações de 10 a 90 µg/mL em etanol.

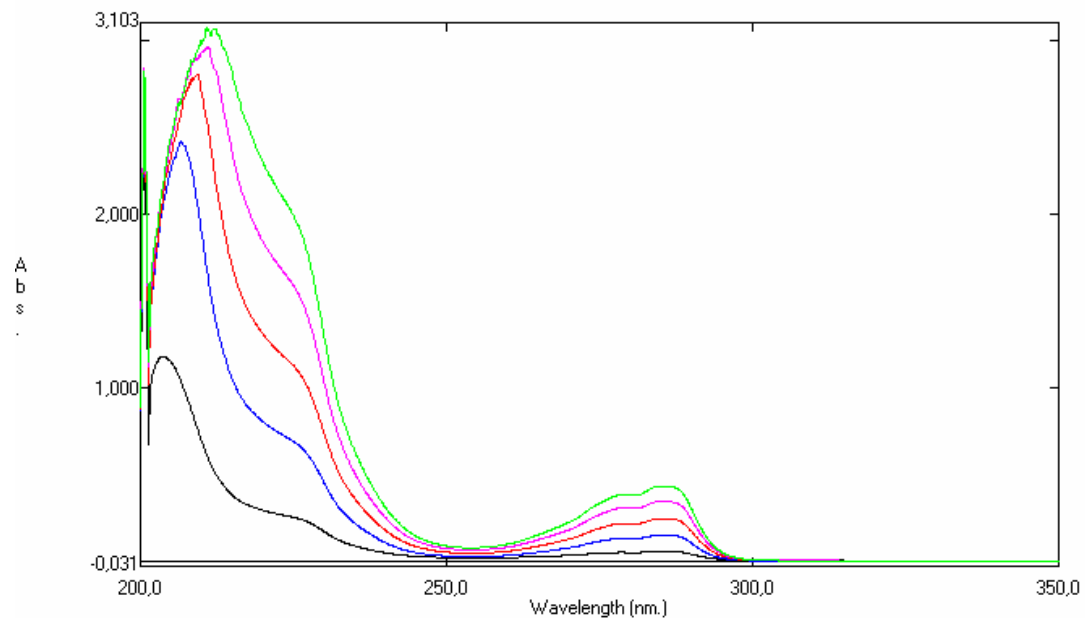


Figura 11. Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta do acetato de tocoferila concentrações de 10 a 90 µg/mL em etanol.

5.2.2 Método espectrofotométrico derivado no UV

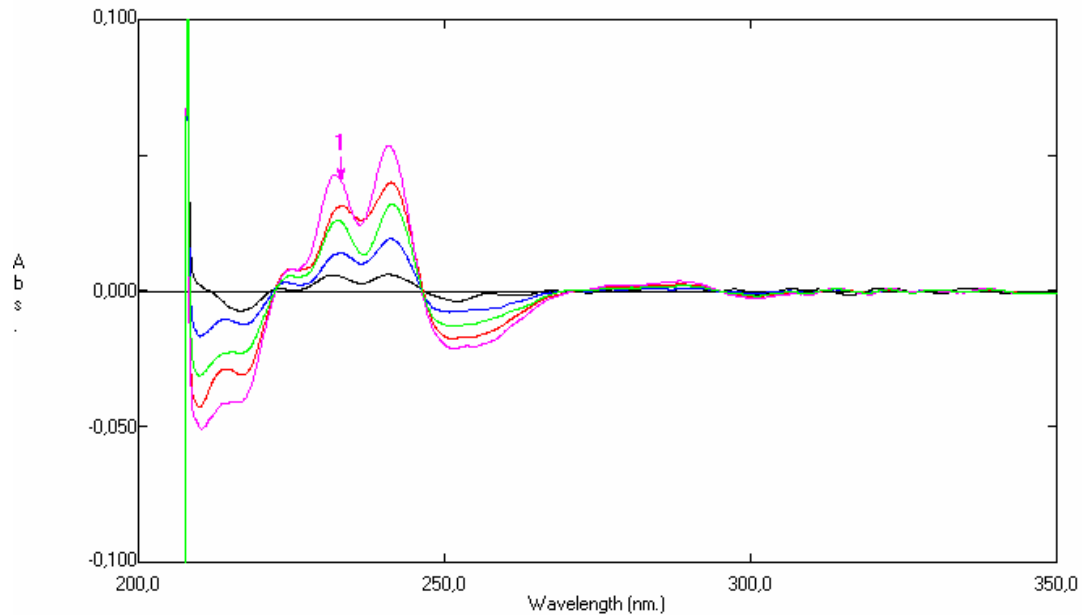


Figura 12. Sobreposição dos espectros no ultravioleta da terceira derivada do tetraisopalmitato de ascorbila em etanol. Leituras efetuadas a 233,2 nm. Intervalo de concentração de 10 a 90 $\mu\text{g/mL}$.

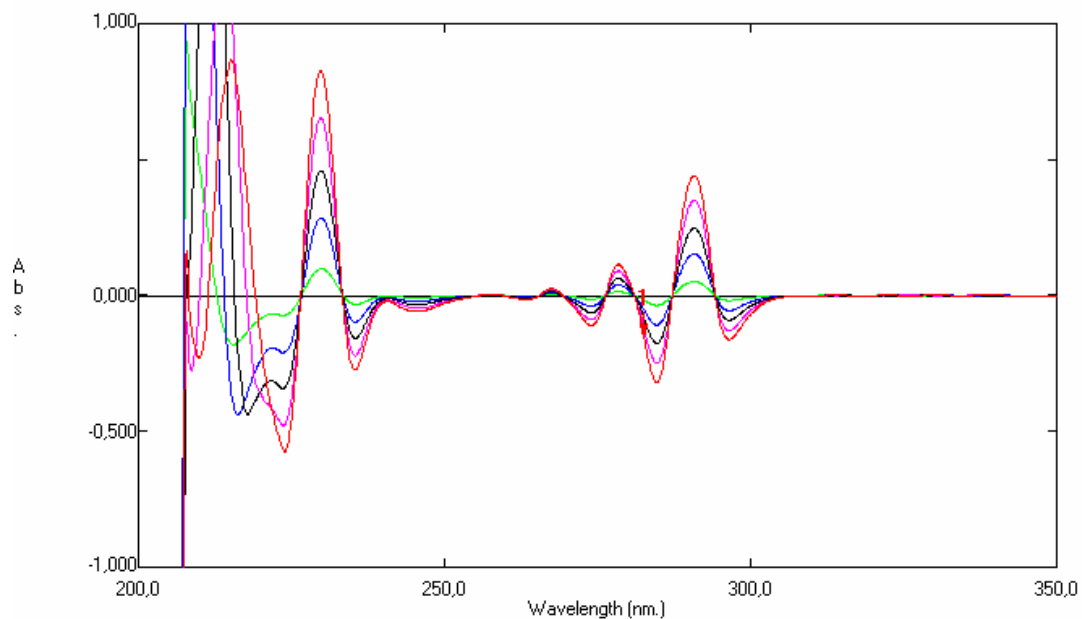


Figura 13. Sobreposição dos espectros no ultravioleta da terceira derivada do acetato de tocoferila em etanol. Leituras efetuadas a 282,6 nm. Intervalo de concentração de 10 a 90 $\mu\text{g/mL}$.

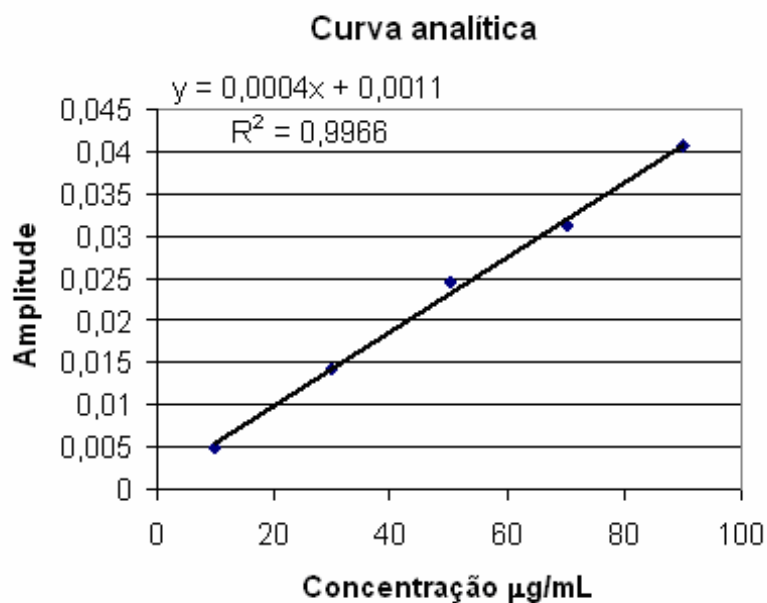


Figura 14. Curva analítica obtida pelo método espectrofotométrico derivado. Concentração das soluções de 10 a 90 µg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila em etanol. Leituras efetuadas a 233,2 nm.

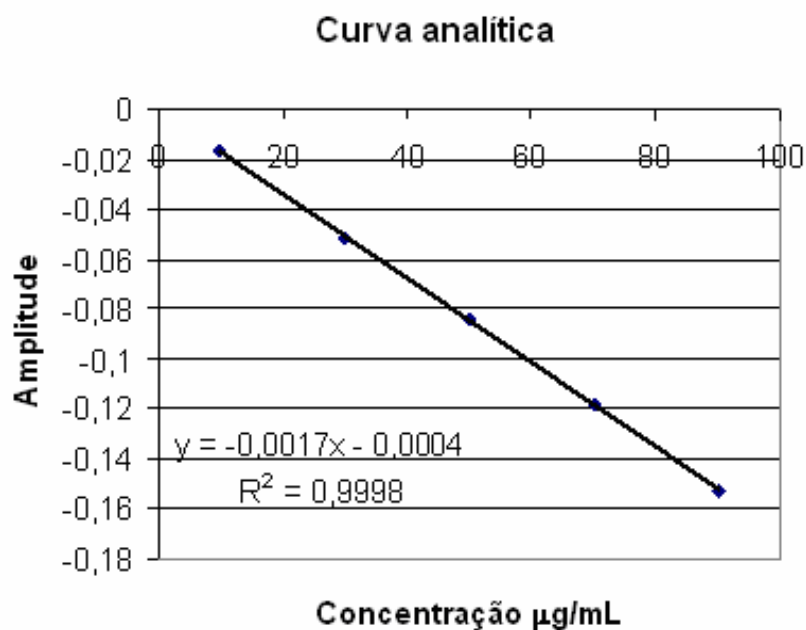


Figura 15. Curva analítica obtida pelo método espectrofotométrico derivado. Concentração das soluções de 10 a 90 µg/mL do acetato de tocoferila em etanol. Leituras efetuadas a 282,6 nm.

5.2.3 Interferência dos excipientes

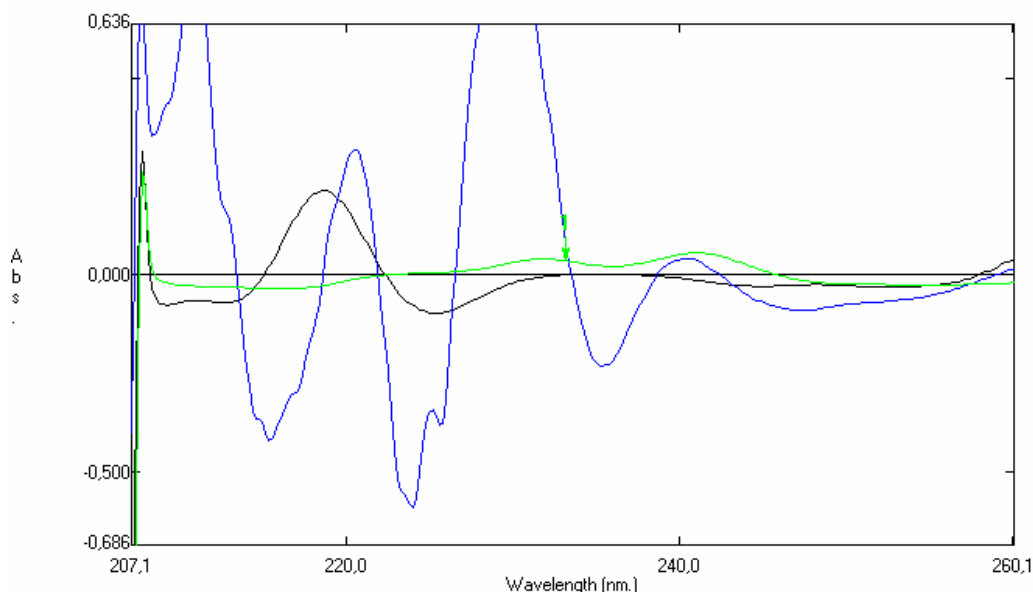


Figura 16. Espectro da absorção derivada de terceira ordem do tetraisopalmitato de ascorbila a 50 µg/mL (—), da amostra de creme a 50 µg/mL (—) e do placebo (—), etanol. Ponto de anulação do placebo a 233,2 nm (método quantitativo “zero crossing”).

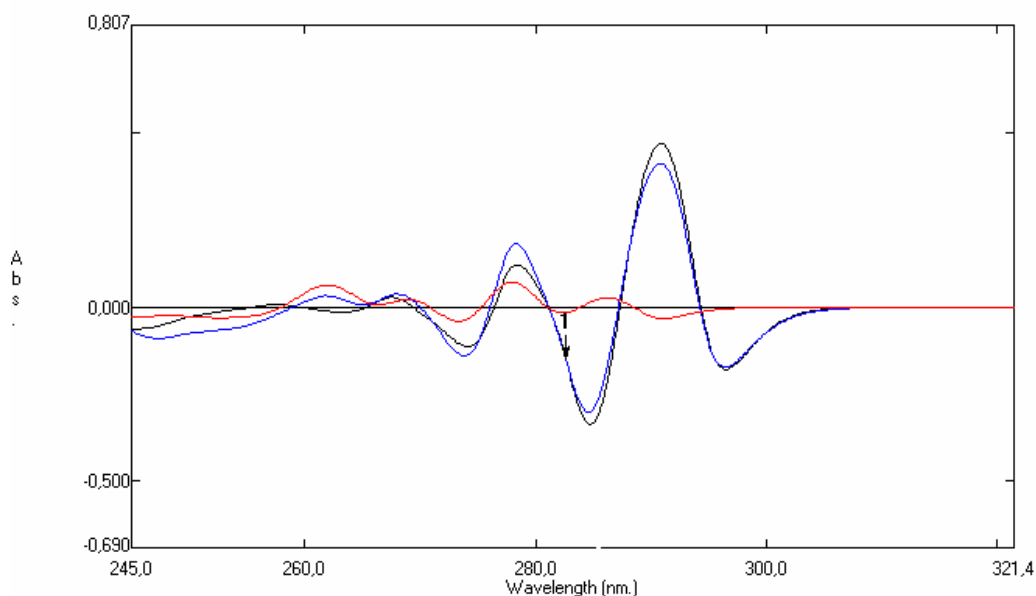


Figura 17. Espectro da absorção derivada de terceira ordem do acetato de tocoferila a 50 µg/mL (—), da amostra de creme a 50 µg/mL (—) e do placebo (—), etanol. Ponto de anulação do placebo a 282,6 nm (método quantitativo “zero crossing”).

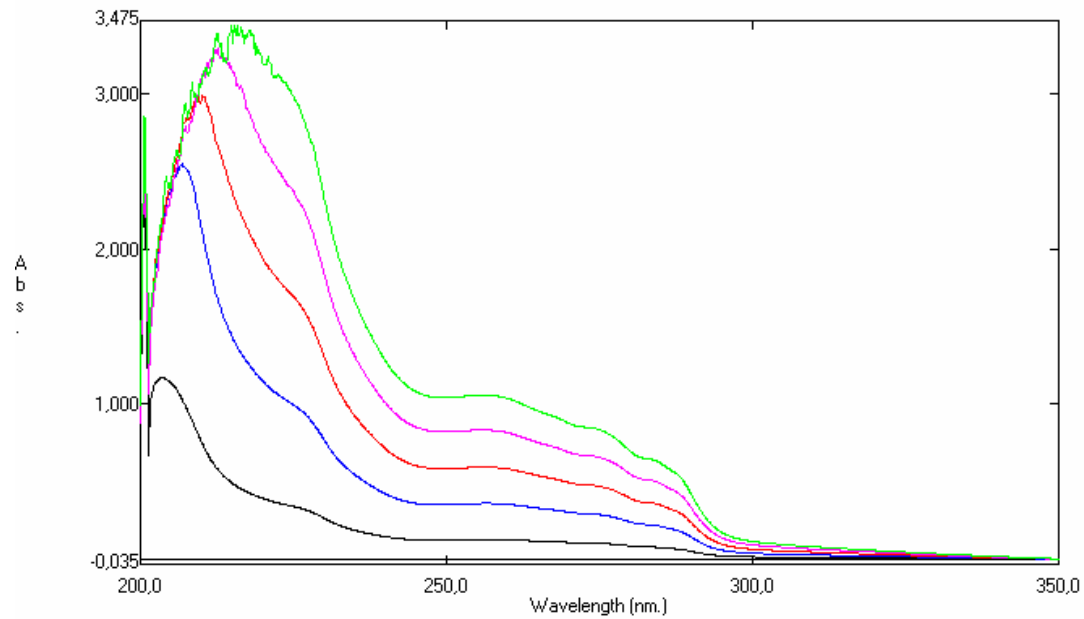


Figura 18. Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta da amostra de creme com os ativos tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila em etanol, concentrações de 10 a 90 $\mu\text{g/mL}$.

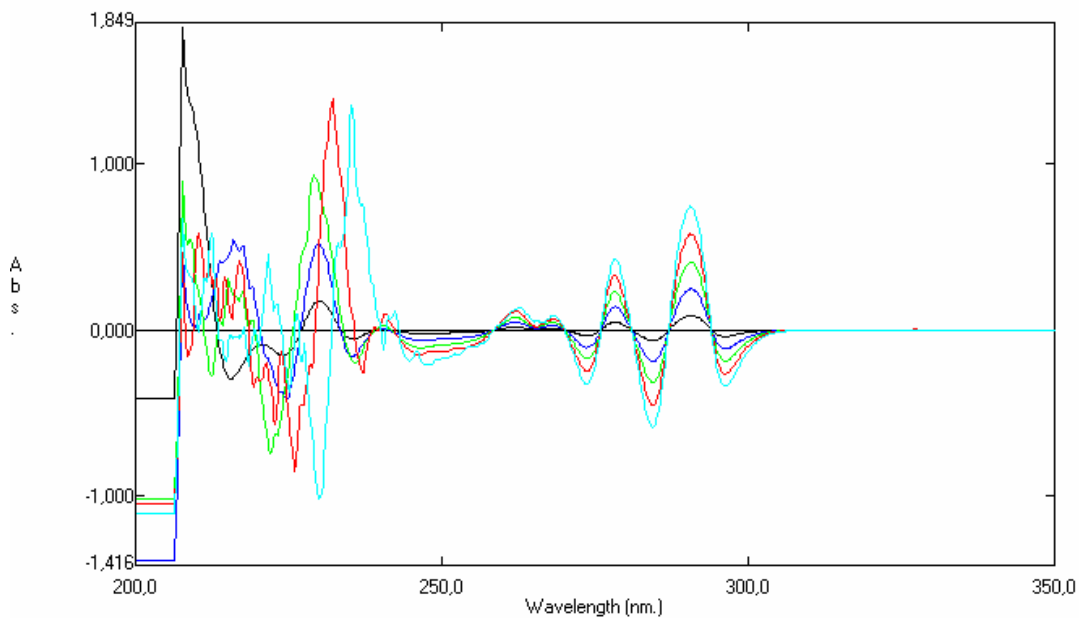


Figura 19. Sobreposição dos espectros no ultravioleta da terceira derivada da amostra de creme com os ativos tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila em etanol. Intervalo de concentração de 10 a 90 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.4 Método cromatográfico

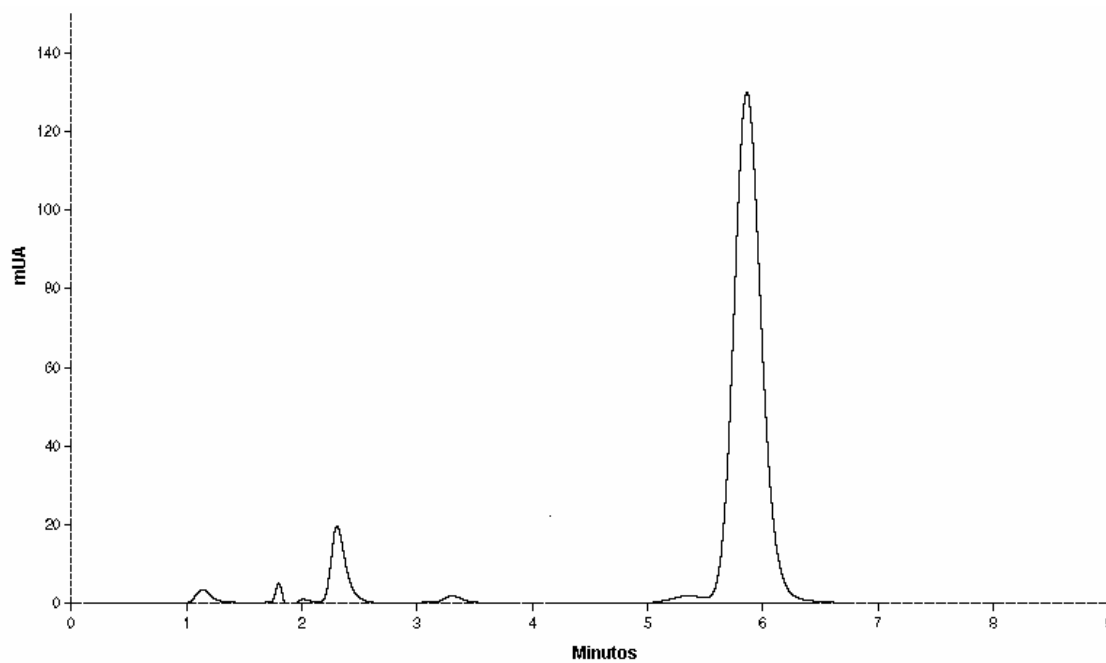


Figura 20. Cromatograma do padrão de 200 µg/mL do tetraisopalmitato de ascorbila. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 µm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex®; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 µL; detecção 222 nm; temperatura ambiente ± 25°C; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU®.

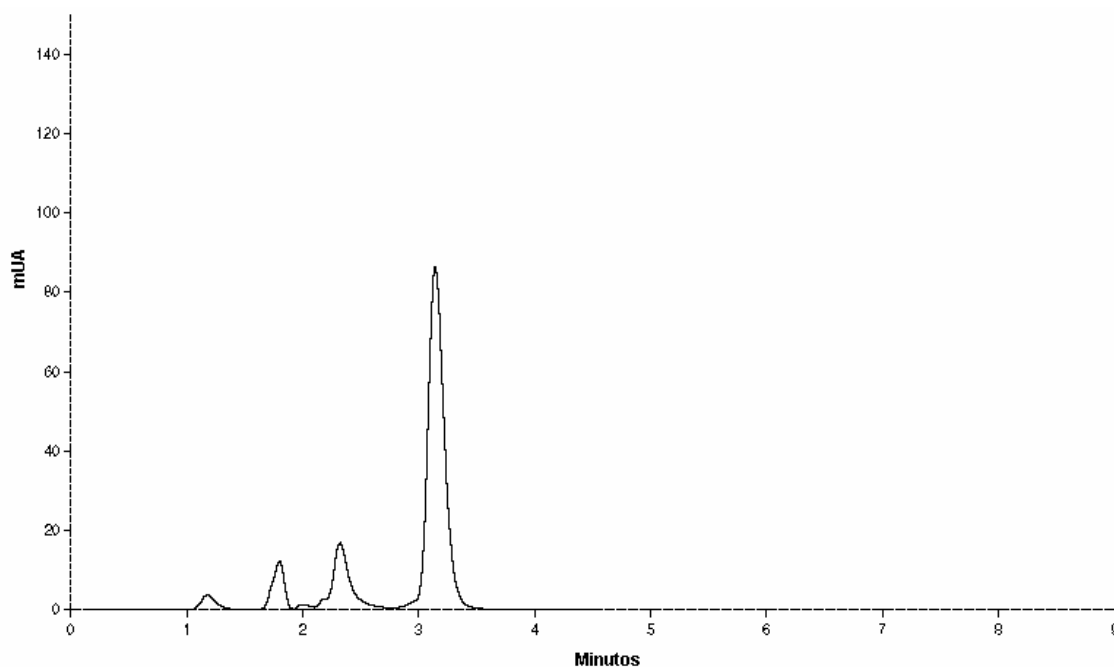


Figura 21. Cromatograma do padrão de 40 $\mu\text{g/mL}$ do acetato de tocoferila. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 222 nm; temperatura ambiente \pm 25°C; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU[®].

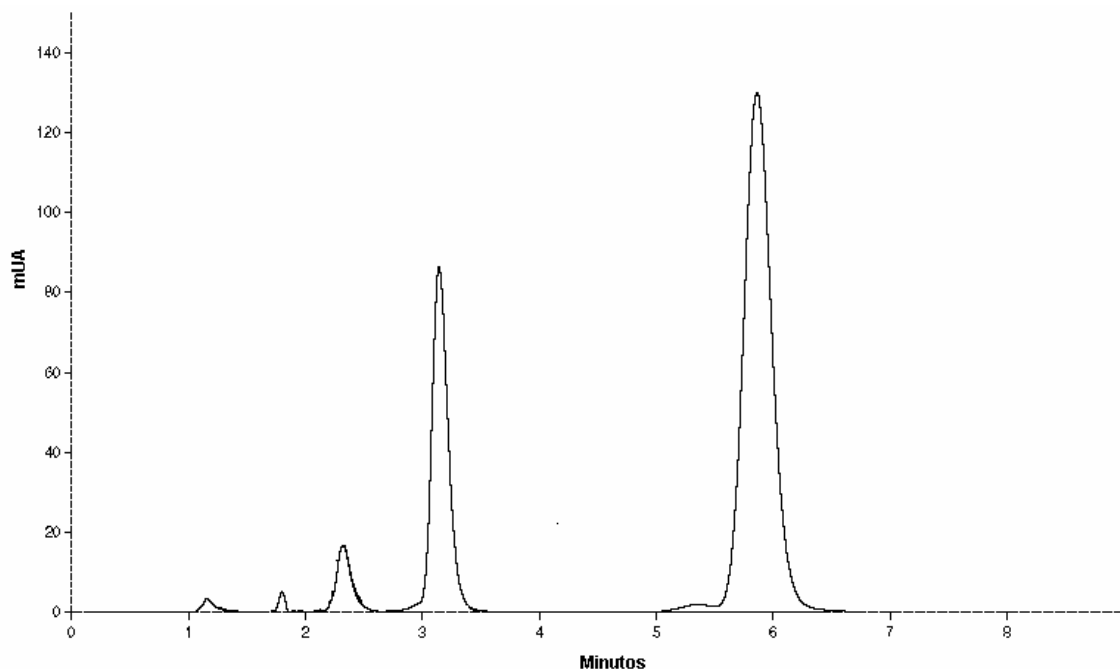


Figura 22. Cromatograma do acetato de tocoferila (40 $\mu\text{g/mL}$) e do tetraisopalmitato de ascorbila (200 $\mu\text{g/mL}$). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μm) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 μL ; detecção 222 nm; temperatura ambiente $\pm 25^\circ\text{C}$; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU[®].

5.2.4.1 Validação do método cromatográfico para análise do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila

a) Curva de calibração

Acetato de tocoferila

A Figura 23 representa a curva de calibração do acetato de tocoferila.

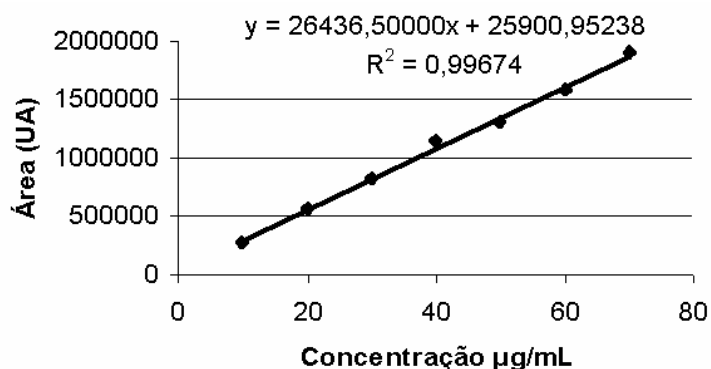


Figura 23. Curva de calibração do acetato de tocoferila para o método cromatográfico, concentrações de 10 a 70 µg/mL.

Tetraisopalmitato de ascorbila

A Figura 24 representa a curva de calibração do tetraisopalmitato de ascorbila.

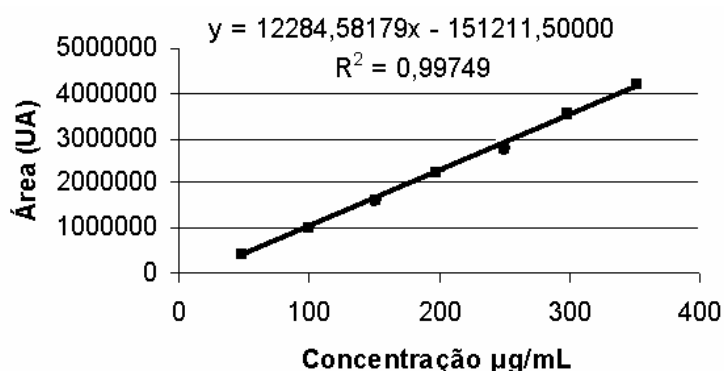


Figura 24. Curva de calibração do tetraisopalmitato de ascorbila para o método cromatográfico, concentrações de 50 a 350 µg/mL.

Os dados estatísticos obtidos para as curvas de calibração do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros estatísticos obtidos para curvas de calibração do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila aplicando o método cromatográfico

	a	b	r
Vitamina E	25900,95	26436,5	0,99674
VC-IP	151211,5	12284,58	0,99749

a= interseção da reta; b= inclinação da reta; r= coeficiente de correlação;

b) Determinação do limite de detecção e quantificação

A Tabela 7 apresenta os dados obtidos para o limite de detecção e quantificação.

Tabela 7. Resultados obtidos para o cálculo do limite de detecção e quantificação do método cromatográfico para o acetato de tocoferila e para o tetraisopalmitato de ascorbila.

	Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de Detecção ($\mu\text{g/mL}$)
Vitamina E	11,445	3,4336
VC-IP	50,172	15,052

c) Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Os cromatogramas referentes à solução placebo, solução padrão da vitamina E e do VC-IP e solução amostra manipulada, estão representados na Figura 25.

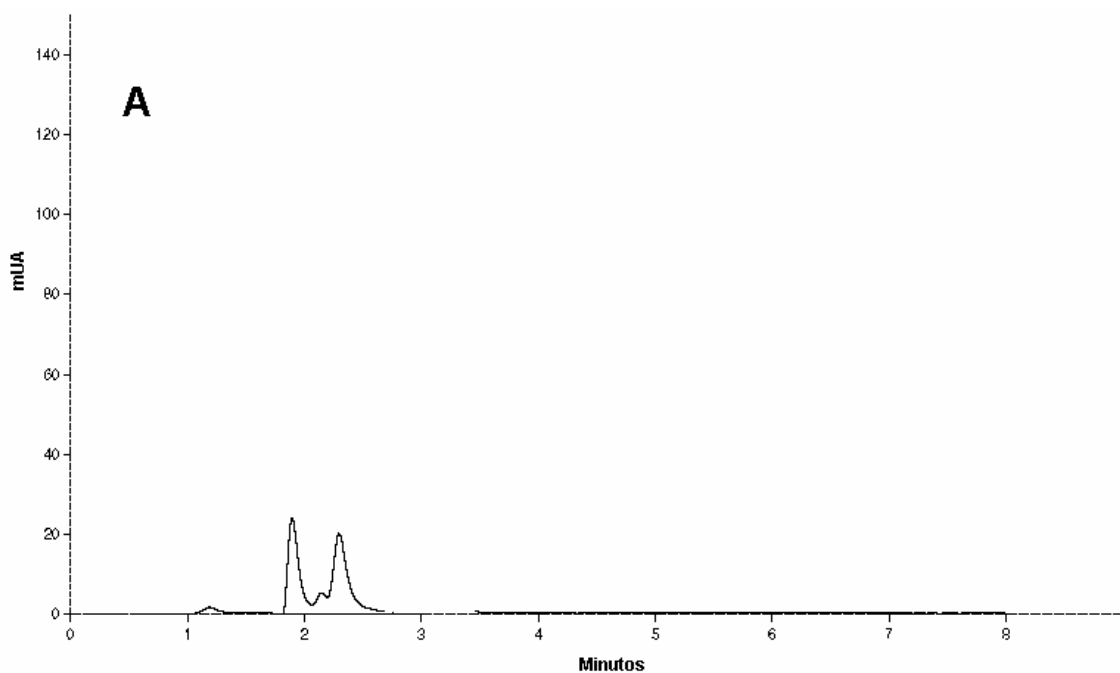


Figura. 25 (A) Cromatograma obtido do placebo. Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 222 nm; temperatura ambiente \pm 25^oC; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU[®].

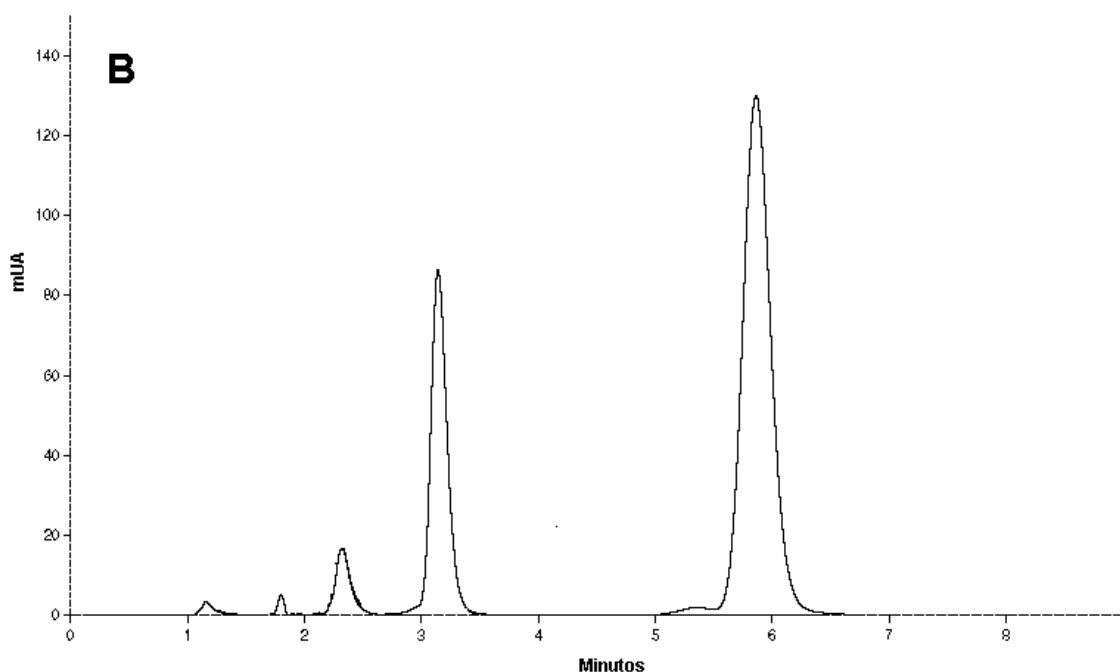


Figura 25. (B) Cromatograma obtido do padrão de VC-IP (200 μ g/mL) e vitamina E (40 μ g/mL). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex[®]; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão

1,0mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 222 nm; temperatura ambiente \pm 25°C; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU®.

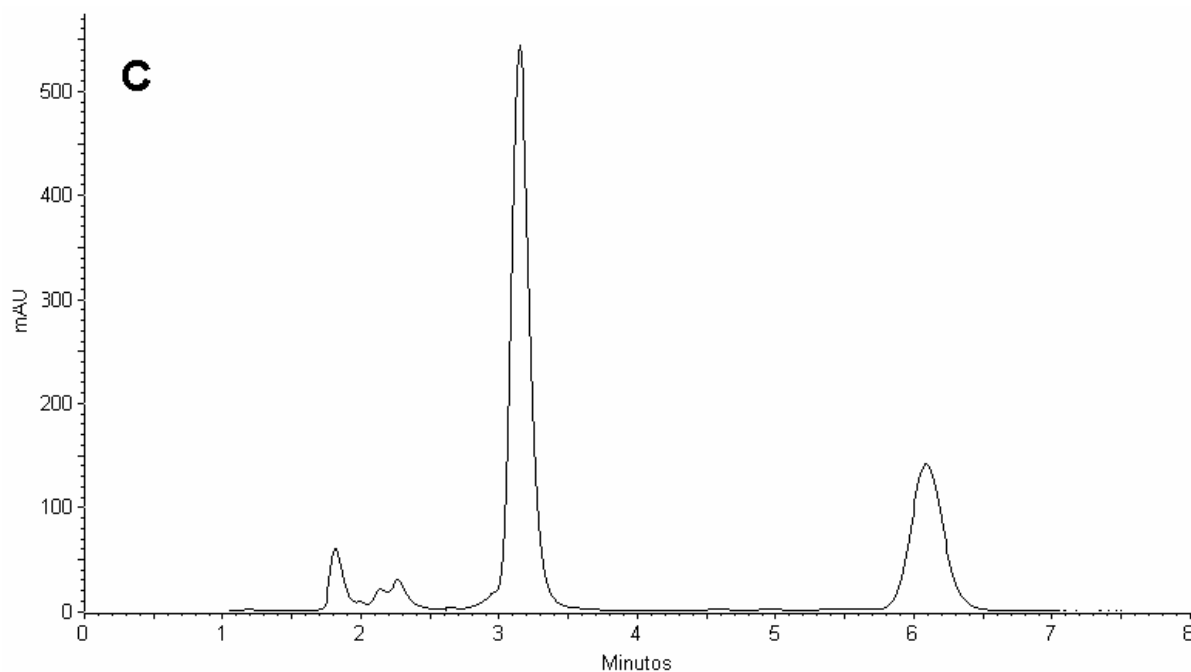


Figura. 25 (C) Cromatograma obtido da amostra manipulada (200 μ g/mL). Condições cromatográficas: coluna Sinergy Hidro RP-18- (4 μ m) 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex®; fase móvel MeOH:2-propanol (25:75); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 20 μ L; detecção 222 nm; temperatura ambiente \pm 25°C; equipamento:cromatógrafo à líquido modelo SHIMADZU®.

d) Precisão

Tabela 8. Resultados obtidos na determinação do teor de acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila na amostra pelo método cromatográfico.

	AMOSTRA VC-IP	AMOSTRA VIT E
Intra-dia*	(mg/g creme)	(mg/g creme)
Dia 1	217,97±3,54	47,52±0,32
RSD (%)	1,76	0,74
Dia 2	220,17±4,48	49,15±0,57
RSD (%)	2,20	1,25
Dia 3	223,15±3,88	47,57±0,66
RSD (%)	1,88	1,50
Inter-dia**	220,43±0,62	48,08±0,29
RSD (%)	1,48	0,69

RSD – Desvio padrão relativo

e) Exatidão – Teste de recuperação

Tabela 9. Resultados obtidos do teste de recuperação realizado nas amostras contendo acetato de tocoferila e tetraisopalmitato de ascorbila.

HPLC				
AMOSTRA	Amostra adicionada (µg)	Amostra encontrada (µg)	Recuperação %	RSD^(a)
VC-IP	50	52,17	104,34	1,12
	150	149,10	99,40	0,33
	250	244,66	97,86	0,11
VIT E	10	10,05	100,45	0,92
	30	28,76	95,87	0,20
	50	47,71	95,42	0,62

(a) Média de 10 preparações independentes

5.2.5 Método eletroforético

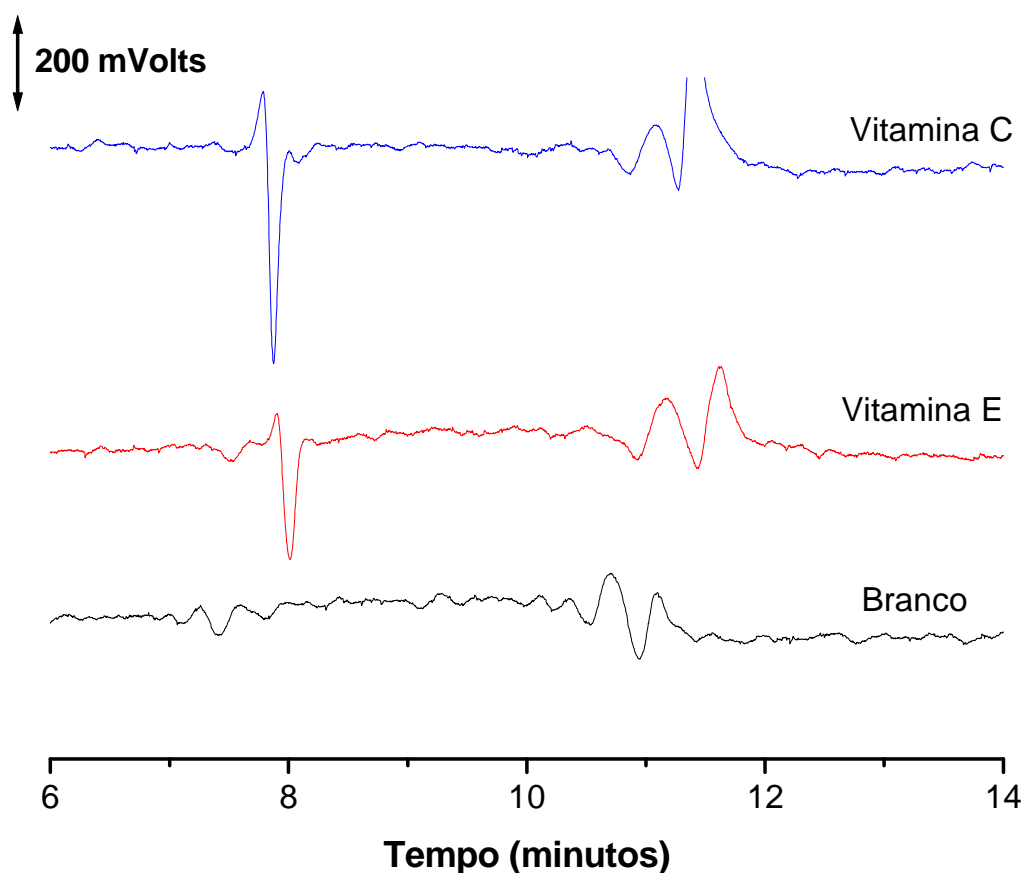


Figura 26. Eletroferograma para a separação dos padrões de vitaminas E e VC-IP (detecção condutométrica), utilizando como eletrólito de corrida 10 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio pH 9,2, 6,6% (p/p) de butanol, 3,3% (p/p) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,8% (p/p) de n-octano,. Capilar de 50 cm (40 cm até o detector) e 50 µm de d.i. Potencial aplicado: +10 kV. Injeção hidrodinâmica 10 cmH₂O por 30s, 25°C de temperatura.

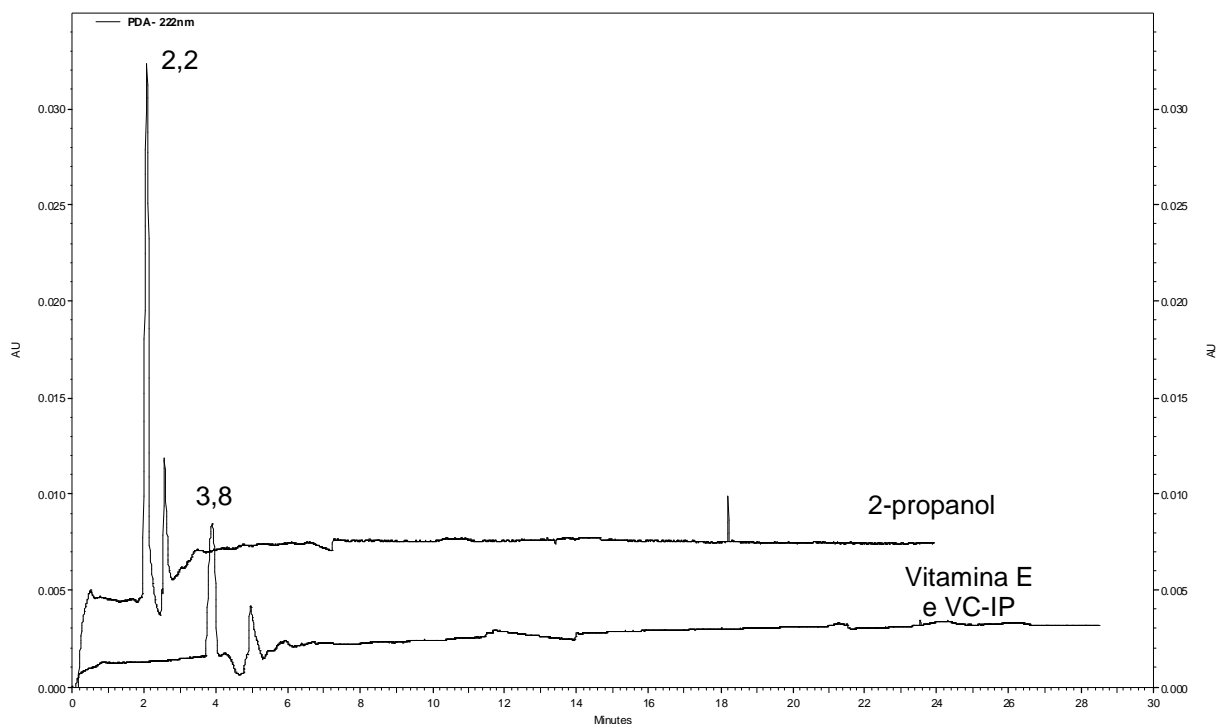


Figura 27. Eletroferograma para a separação dos padrões de vitaminas E e VC-IP (detecção DAD), utilizando como eletrólito de corrida 10 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, 6,6% (p/p) de butanol, 3,3% (p/p) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,8% (p/p) de n-octano, e pH 9,2. Capilar de 40,2 cm (30 cm até o detector) e 75 µm de d.i. Potencial aplicado: 22 kV, 0,5 psi/3s, detecção UV 222 nm, 25°C de temperatura.

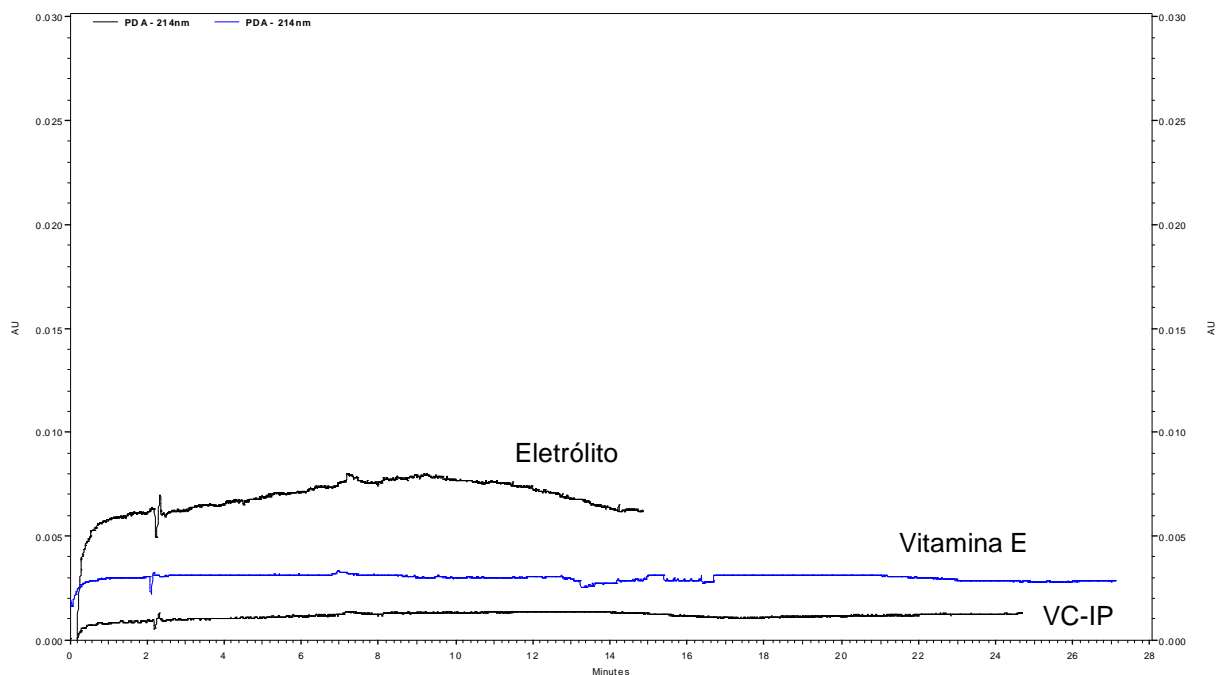


Figura 28. Eletroferograma para a separação dos padrões de vitaminas E e VC-IP (detecção DAD), utilizando como eletrólito de corrida 15 mL de 2-propanol, 0,5% (v/v) acetato de etila, 1,2% (p/p) de butanol, 0,6% dodecil sulfato de sódio (SDS) (p/p) e 97,7% de tetraborato de sódio 10mM e pH 9,2. Capilar de 40,2 cm (30 cm até o detector) e 75 μ m de d.i. Potencial aplicado: 25 kV, 0,5 psi/3s, detecção UV 222nm, 25°C de temperatura.

5.2.6 Análise térmica (curvas TG/DTG e DSC)

5.2.6.1 Caracterização via Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As figuras a seguir caracterizam o comportamento térmico das amostras.

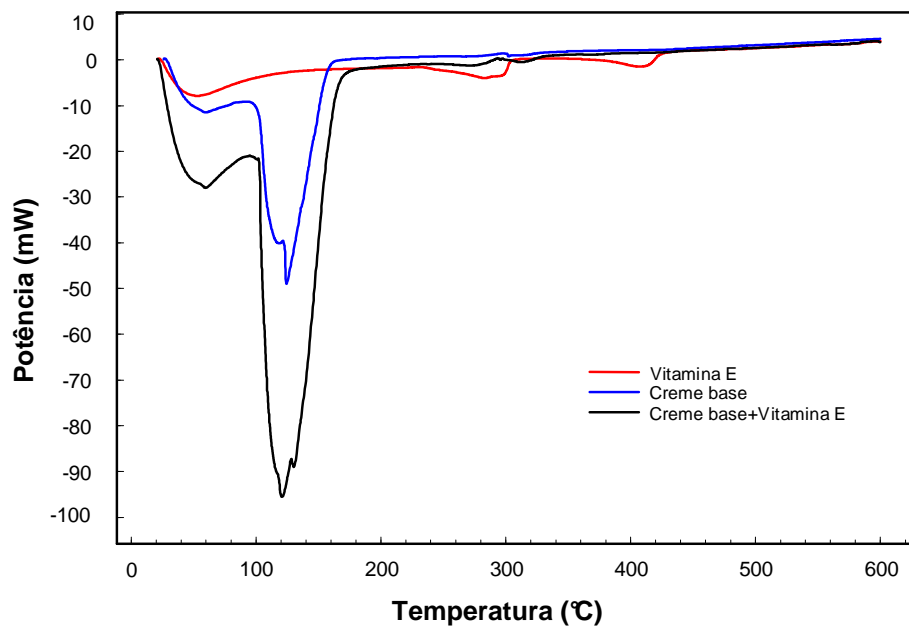


Figura 29. Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio as amostras de vitamina E, creme base e creme base associado à vitamina E.

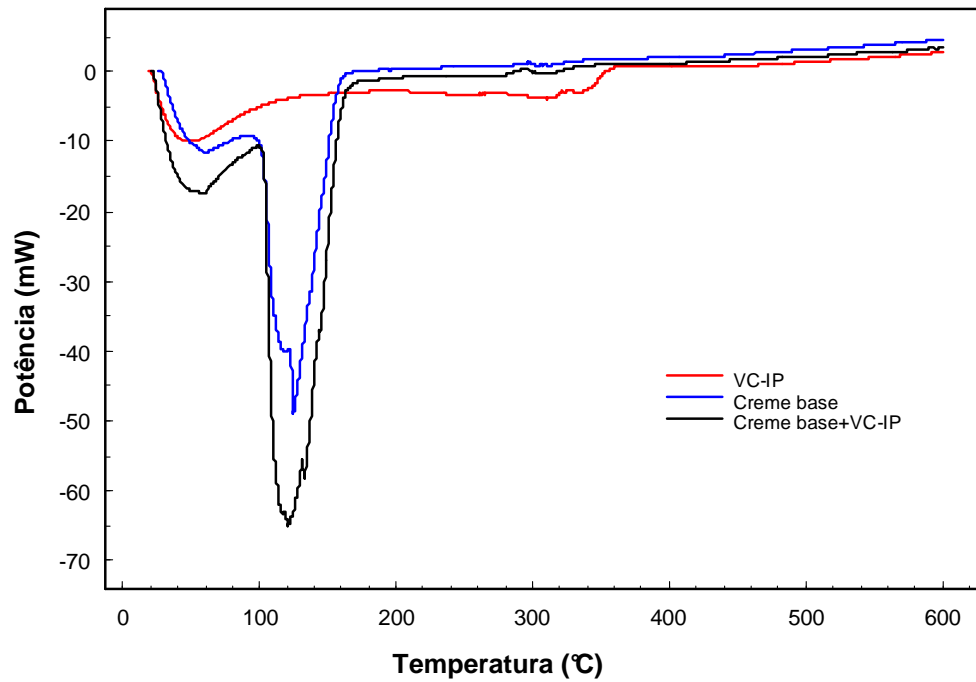


Figura 30. Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio as amostras de creme base, VC-IP e creme base associado ao VC-IP.

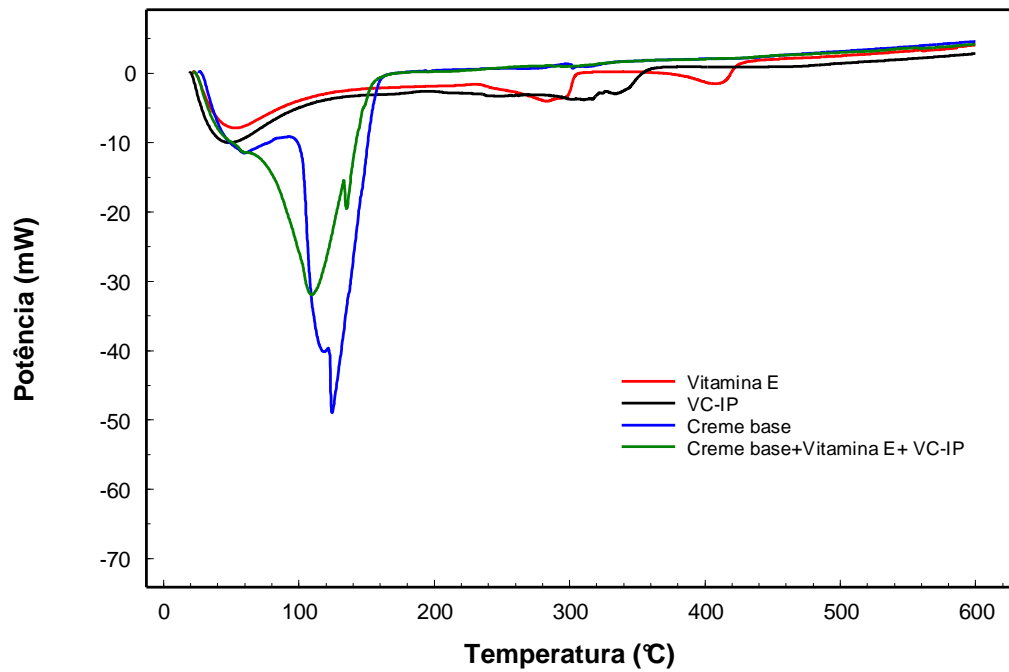


Figura 31. Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio as amostras de creme base, VC-IP, vitamina E e creme base associado ao VC-IP e a vitamina E.

5.2.6.2 Caracterização via Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

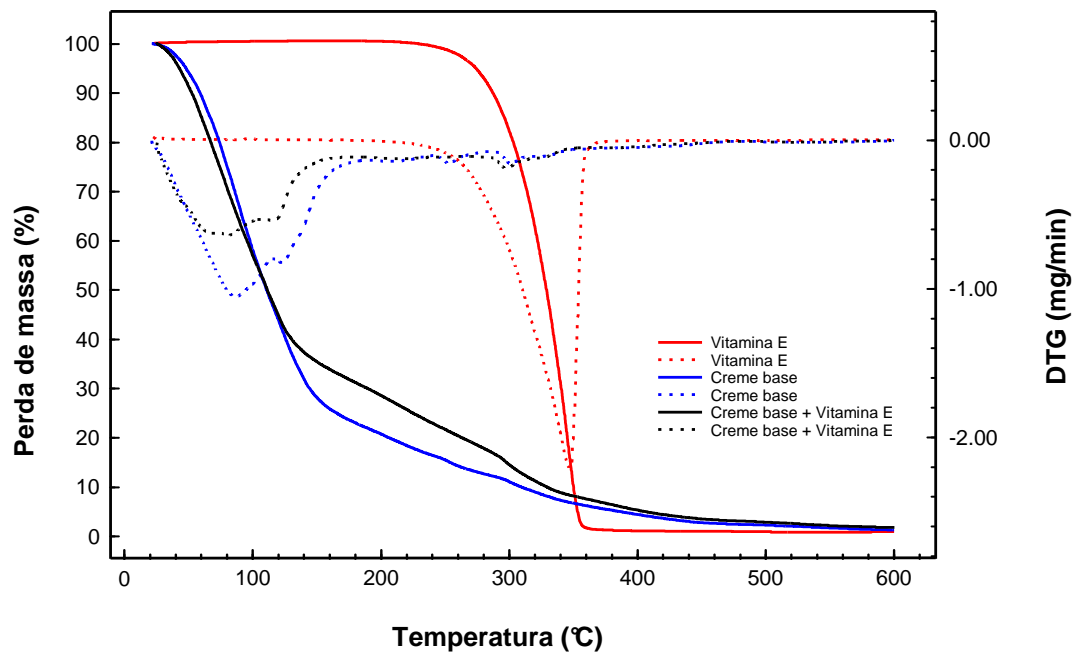


Figura 32. Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 20 mL/min e nitrogênio 50 mL/min das amostras de creme base, vitamina E e creme base associado a vitamina E.

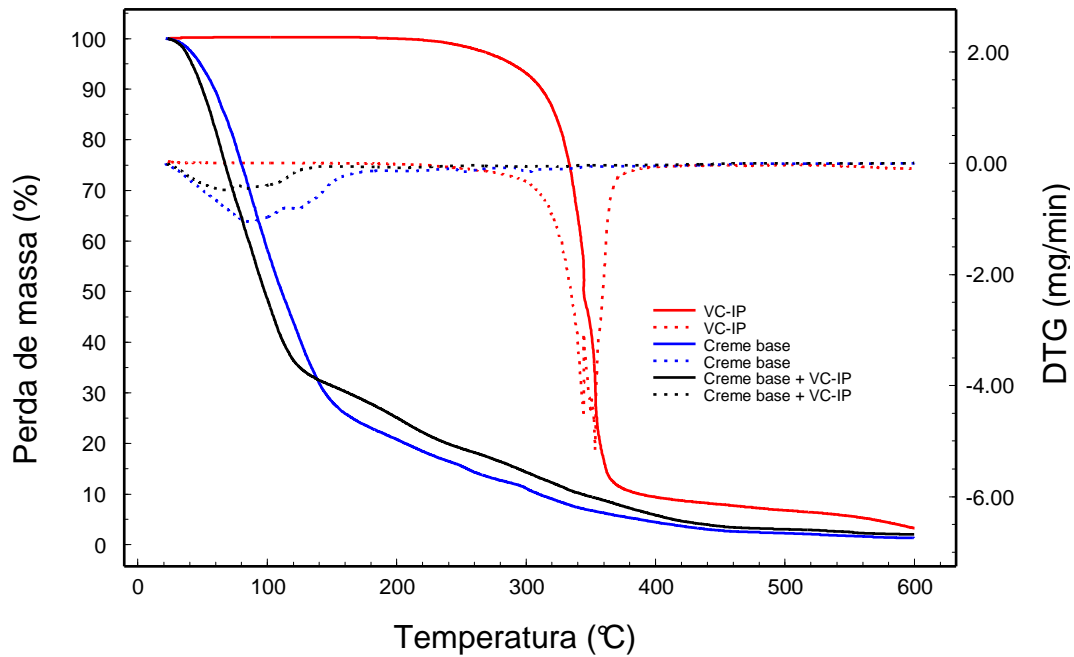


Figura 33. Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 20 mL/min e nitrogênio 50 mL/min das amostras de creme base, VC-IP e creme base associado ao VC-IP.

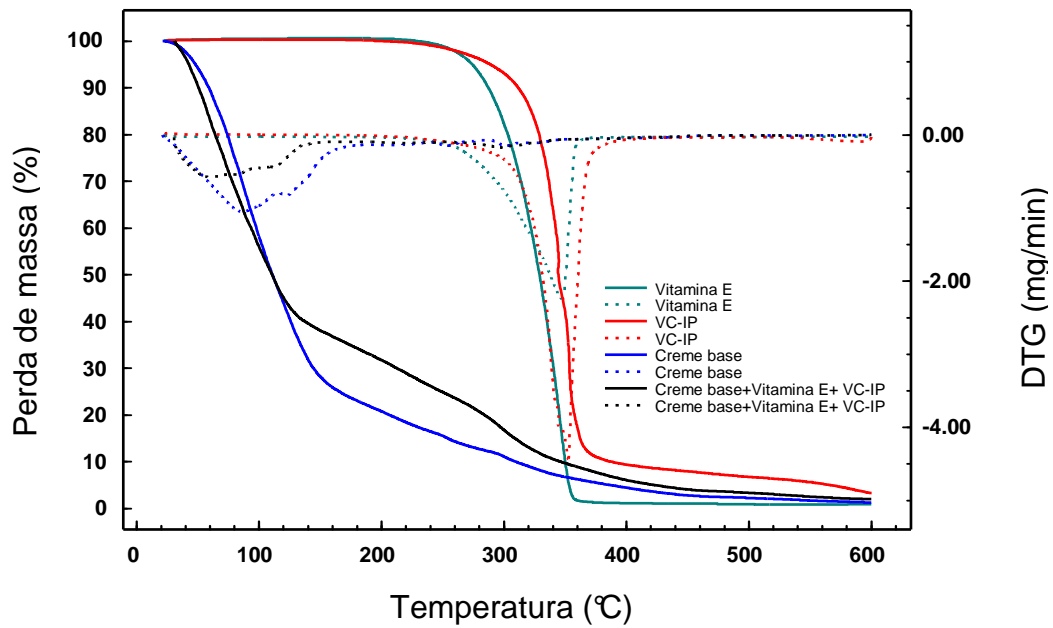


Figura 34. Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 20 mL/min e nitrogênio 50 mL/min das amostras de creme base, VC-IP, vitamina E e creme base associado ao VC-IP e a vitamina E.

DISCUSSÃO

VI- DISCUSSÃO

Nos últimos anos é comum encontrar produtos cosméticos com apelo de serem “anti-radicais livres”, ou que contenham vitaminas. Na realidade, são produtos cujas fórmulas contêm ingredientes ativos, nutritivos e hidratantes, e filtros solares que ajudam a prevenir o envelhecimento prematuro da pele.

Atualmente a preocupação com a saúde e com a beleza, tem levado os indivíduos a uma maior preocupação com a aparência e isto tem impulsionado os pesquisadores e as indústrias cosméticas a desenvolverem produtos anti-envelhecimento.

As vitaminas têm sido utilizadas em cosméticos como ingredientes ativos devido ao seu apelo natural, sua ação multivariada e seu papel essencial à saúde (BRANDOLINI, 1998). Produtos comerciais são comumente produzidos com vitaminas lipossolúveis na forma de ésteres mais estáveis (MENEGATTI, 1995). A esta grande variedade de preparações cosméticas disponíveis no comércio conteúdo vitaminas torna-se necessário e urgente à padronização de metodologias analíticas para sua identificação e quantificação.

Técnicas como a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), e a eletroforese capilar (CE) são amplamente usadas para a separação de compostos presentes em diferentes tipos de amostra com uma alta eficiência.

Até o momento a literatura não faz referência de estudos tratando da determinação do tetraisopalmitato de ascorbila e do acetato de tocoferila associados em formulações cosméticas e nem de validação dos métodos empregados para sua determinação e quantificação.

O objetivo principal desta pesquisa foi o desenvolvimento de metodologias analíticas por espectrofotometria derivada no UV, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (CE) para identificação e quantificação do

tetraisopalmitato de ascorbila (VC-IP) e do acetato de tocoferila em produtos cosméticos.

Vários testes de solubilidade para a identificação das vitaminas VC-IP e E foram realizados. Contudo, verificou-se que estas foram pouco solúveis em álcool isopropílico, sendo mais solúveis em etanol e clorofórmio como especificado na Tabela 1. O teste de solubilidade indicou quais solventes podem ser usados durante o desenvolvimento das metodologias.

Os espectros de absorção no ultravioleta das vitaminas em questão apresentaram absorbâncias máximas a 222,10 nm para o tetraisopalmitato de ascorbila e a 1-(284,80 nm), 2-(278,70 nm) e 3-(208,70 nm) para o acetato de tocoferila em etanol (Figuras 8 e 9).

O uso da espectrofotometria direta no UV para dosagem das vitaminas nas formulações propostas não foi possível em função dos excipientes absorverem na mesma região do espectro que o analito.

A obtenção dos espectros em derivada de terceira ordem, usando-se o etanol como solvente, permitiu escolher o ponto de anulação da formulação base (método “*zero crossing*”) a 233,2 nm para o tetraisopalmitato de ascorbila e a 282,6 nm para o acetato de tocoferila (Figuras 16 e 17). A interferência foi identificada, posteriormente, como sendo dos excipientes presentes na formulação.

As curvas analíticas do tetraisopalmitato de ascorbila e do acetato de tocoferila foram obtidas por espectrofotometria derivada de terceira ordem (Figuras 14 e 15), na faixa de concentração de 10 a 90 µg/mL, apresentando coeficientes de correlação de 0,9966 e 0,9998 respectivamente.

Na Figura 18 pode-se observar os espectros de absorção no ultravioleta da amostra de creme com os ativos tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila em etanol, concentrações de 10 a 90 µg/mL. A Figura 19 mostra os espectros no ultravioleta da terceira derivada da amostra de creme com os ativos

tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila em etanol, concentrações de 10 a 90 µg/mL. Pode-se verificar na Figura 19 que o ponto em 233,2 nm, escolhido para anulação do tetraisopalmitato de ascorbila, sofre interferências na faixa de 200 a 250 nm aproximadamente. Portanto, o ponto não é conveniente para a validação do método, não podendo ser realizada tal validação, devido à interferência dos excipientes na formulação.

O segundo método desenvolvido foi a cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE), empregando a modalidade de fase reversa não aquosa, devido a alta hidrofobicidade dos padrões utilizados no trabalho, já que a fase móvel da fase reversa é polar e os compostos hidrofóbicos serão mais retidos.

O sistema 6 da Tabela 3 apresentou resultado satisfatório como foi mostrado no item otimização das condições experimentais (4.2.3.3). Foram fixados, portanto parâmetros para se obter um tempo de medida adequado, boa resolução e forma dos picos como se pode observar nos cromatogramas das Figuras 20, 21 e 22. O comprimento de onda selecionado foi 222 nm, a vazão utilizada foi de 1,0 mL/min, sendo que o tempo de retenção do tetraisopalmitato de ascorbila permaneceu em torno de 6 min e do acetato de tocoferila em torno de 3 min.

Com os parâmetros de análises estabelecidos, foram construídas curvas de calibração para o acetato de tocoferila num intervalo de 10 a 70 µg/mL e para o tetraisopalmitato de ascorbila num intervalo de 50 a 350 µg/mL (Figuras 23 e 24 e Tabela 6). Obteve-se uma boa linearidade entre as áreas versus a concentração, existindo um aumento proporcional a medida que as concentrações aumentavam, com um coeficiente de correlação de 0,99674 para o acetato de tocoferila e de 0,99749 para o tetraisopalmitato de ascorbila (Tabela 6) dentro das especificações da ANVISA que recomenda coeficiente de correlação 0,99 (ANVISA, 2003).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental, enquanto que o limite de quantificação

(LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al, 2004).

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para o limite de detecção e limite de quantificação do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila no método cromatográfico. O LD foi 3,4336 µg/mL e o LQ foi 11,445 µg/mL para a Vitamina E e o LD foi 15,052 µg/mL e o LQ foi 50,172 µg/mL para o VC-IP .

A Figura 25 representa os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes da amostra. Pode-se observar que o placebo da amostra não apresenta nenhum componente que possa interferir com o pico máximo da vitamina E e do VC-IP. Portanto, o método pode ser aplicado para identificação e quantificação das vitaminas na formulação.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos na determinação do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila na amostra pesquisada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado empregando-se 10 determinações, a média intradia do RSD obtido foi 1,16% para vitamina E e 1,95% para o VC-IP, indicando uma boa reprodutibilidade do método e concordância entre os resultados obtidos (VALENTE, 2001).

A Tabela 9 mostra o resultado obtido para o teste de recuperação da amostra pesquisada. Observa-se boa dispersão nos resultados, sendo entre 95,42 e 104,34% para a amostra de creme com tetraisopalmitato de ascorbila e a vitamina E, estando dentro dos limites estabelecidos. Com base nesse resultado pode-se afirmar que o método pode ser aplicado ao doseamento das vitaminas na amostra pesquisada. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método (BRITAIN, 1998).

Para o desenvolvimento da metodologia analítica em eletroforese capilar, escolheu-se inicialmente o modo de separação MECK (Cromatografia eletrocínética micelar), introduzido em 1984 por Terabe (TERABE, 1985) este método separa tanto espécies iônicas quanto substâncias neutras. Esse modo de separação se baseia no

uso de eletrólitos contendo um determinado surfactante ou tensoativo (mistura de surfactantes) em uma concentração acima de sua concentração micelar crítica. As micelas carregadas atuam como fase estacionária. Portanto, os compostos mais hidrofóbicos permanecem mais tempo na micela carregada negativamente e, conseqüentemente eluem por último. Os compostos mais hidrofílicos, não são solubilizados na micela, sendo separados de acordo com a mobilidade eletroforética.

Quando o SDS (surfactante aniônico) é utilizado, a ordem de eluição é a inversa da obtida na eletroforese capilar de solução livre (FSCE) devido à repulsão eletrostática entre o SDS e os ânions presentes na amostra. Moléculas neutras podem ser separadas por MEKC em função da hidrofobicidade. Os cátions são retidos mais fortemente no capilar devido à atração eletrostática entre as micelas do SDS e a carga positiva do íon. Contudo, os compostos muito hidrofóbicos permanecerão o tempo total de corrida no interior das micelas, sendo com elas eluídos. Quando se trata da separação de compostos muito hidrofóbicos, é conveniente adicionar um solvente orgânico à fase móvel. Tal adição permite diminuição do tempo que o composto permanece na micela, determinando assim, aumento da seletividade.

Através do modo de separação por MEKC não se obteve resultado, partindo-se para a tentativa de separação por MEEKC (Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão).

A Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão é um caso especial de cromatografia eletrocínética, no qual uma microemulsão é empregada como fase dispersa, esse método é especialmente utilizado para espécies neutras e insolúveis em água (HANSEN, 2003).

A adição de cadeias pequenas ou médias de álcoois como butanol e pentanol são comumente empregadas na MEEKC como co-surfactante para reduzir a tensão superficial entre o óleo e a água na preparação de dispersões de microemulsão (ALTRIA, 2004).

Na Tabela 4 sistema 5, verificou-se que foi adicionado butanol e n-octano ao sistema, na tentativa de se obter a separação através da MEEKC, obtendo-se resultados positivos (Figura 26) mas que não foram reproduzíveis posteriormente, já os sistemas de 1 a 4 não demonstraram ser capazes de separar as vitaminas, devido a não obtenção de picos.

Na Tabela 5 os sistemas não obtiveram resultados positivos, sendo que os sistemas 2 e 3 estão representados nas Figuras 27 e 28 respectivamente. Na Figura 27 observam-se os picos do 2-propanol na solução eletrólito do sistema 3, não aparecendo nenhum pico das vitaminas. Na Figura 28 observam-se as curvas do eletrólito e das vitaminas separadamente, não sendo possível, também, a detecção de picos dos ativos. Portanto, pode-se concluir que as tentativas através da técnica de MEEKC com os sistemas estudados usando a microemulsão óleo-aquosa (o/a) não deram bons resultados isto pode ser devido ao modo de preparação da microemulsão e também à alta lipofilicidade dos ativos utilizados na presente pesquisa. Segundo ALTRIA a separação de compostos neutros e lipofílicos obtêm melhores respostas quando a MEEKC é feita utilizando a microemulsão aquosa-oleosa (a/o). Sendo assim as perspectivas futuras para o presente trabalho são: ter em conta o modo de preparação das microemulsões e também a utilização das microemulsões a/o para a separação das vitaminas.

Com base na técnica de DSC pôde-se observar na Figura 29 que o comportamento térmico do acetato de tocoferila apresenta três eventos térmicos, o primeiro próximo de 50 °C, que coincide com o primeiro evento térmico do creme base e dois característicos, próximos de 300 °C e 400 °C. O creme base também apresenta mais dois eventos sobrepostos próximos da temperatura de 120 °C. Observa-se que o acetato de tocoferila mostra uma intensidade diminuída referente aos picos característicos quando associada à formulação.

A Figura 30 mostra o comportamento térmico do VC-IP em relação ao creme base. Observa-se dois eventos endotérmicos. O pico próximo à 320 °C é característico do VC-IP. Como ocorre com o acetato de tocoferila, a intensidade do pico característico do VC-IP diminui quando se encontra associado ao creme base.

De forma semelhante, não se observa os picos das vitaminas na curva do creme associada ao VC-IP e à vitamina E (Figura 31). Essas diminuições de intensidade dos picos característicos dos ativos acetato de tocoferila e VC-IP podem ser devido à baixa concentração dos ativos no creme base (apenas 3%).

Em relação à análise termogravimétrica, observa-se na Figura 32 que o creme base apresenta perda de massa desde o início da análise e se decompõe em duas etapas (próximo de 280 e 300 °C). O acetato de tocoferila é estável até 250°C e se decompõe em apenas uma etapa. O creme associado à 3% de acetato de tocoferila apresenta processo térmico de decomposição em três etapas.

Através da Figura 33 é possível verificar que o VC-IP também é estável até 250°C e se decompõe em duas etapas distintas, mas sobrepostas.

Na Figura 34 nota-se que as vitaminas estudadas no trabalho decompõem-se quase na mesma temperatura, e observa-se que as vitaminas na concentração de 3 % na formulação não são identificadas.

CONCLUSÕES

VII- CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais e nos resultados obtidos pode-se concluir nesse trabalho que:

- Formulação cosmética foi desenvolvida para a incorporação dos princípios ativos: tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila.
- Os princípios ativos em estudo foram caracterizados empregando-se a técnica de Espectrofotometria no UV e da análise térmica através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) e da termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG).
- Metodologia analítica foi desenvolvida para validação, empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Método CLAE foi validado para análise do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila.
- A linearidade do método está dentro das especificações da ANVISA, sendo 0,99674 para o acetato de tocoferila e 0,99749 para o tetraisopalmitato de ascorbila.
- O tempo de retenção do acetato de tocoferila foi 3 min e do tetraisopalmitato de ascorbila 6 min.
- Os excipientes presentes na amostra não interferiram com a determinação das vitaminas.
- A metodologia desenvolvida para a Espectrofotometria Derivada no Ultravioleta (UVD) não se mostrou aplicável devido à interferência dos excipientes presentes na formulação.

- O desenvolvimento de metodologia analítica para a Eletroforese Capilar (CE) não obteve bons resultados através da técnica MEECK utilizando a microemulsão óleo-aquosa (o/a).

REFERÊNCIAS

VIII- REFERÊNCIAS

ALTRIA, K.D. *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications*. Methods in Molecular Biology. New Jersey: Humana Press, 349p,1996.

ALTRIA, K.D., BRODERICK, M. F., DONEGAN, S., POWER, J. The use of novel water-in-oil microemulsions in microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 25, p. 645-652, 2004.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

BECKETT, A. H., STENLAKE, J. B., *The basis of spectrophotometry*, 4º ed., Practical Pharmaceutical Chemistry, p.274-278,1988.

BENY, M.G. Considerações sobre a pele seca. *Cosmet. Toiletries*, São Paulo, v.15, n.3/4, p.42-46, 2003.

BRANDOLINI V., MENZIANI E., GUARNERI M., BADER S., ZANOTTI F., *International Journal of Cosmetic Science*, Ferrara, 20, 69-72,1998.

BREUER, M.M. – Cosmetic emulsions. In: BECHER, P., Ed. *Encyclopedia of emulsion technology*. New York: Marcel Dekker, v. 2, p. 385-424, 1985.

BRITTAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharm. Technol. ed. Port.*, Marina del Rey, jun., p.4-28, 1998.

BUCHLI L. Radicais livres e antioxidantes. *Cosmet & toil Ed. Port* 14(2):54-57, 2002.

CAMILLERI, P. *Capillary electrophoresis: theory and practice*, 2ª ed., Boca Raton, New York, 552p,1998.

CARVALHO, A.,Z. Aplicação de Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica Sem Contato à Determinação de Espécies Neutras. (Dissertação de mestrado), Universidade de São Paulo – Instituto de Química, São Paulo, 2003.

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

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas:UNICAMP, p.183-238,1995.

DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L., An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 70, (20), 4339-4343, 1998.

DA SILVA, J. A. F.; Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.3, p.2, 2007.

ERHART, E.A. *Elementos de anatomia humana*. 5.ed. São Paulo:Ateneu, 1976.

EVANS, W.J. Vitamin E, vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr* 72(2-suppl):647S-652S, 2000. Disponível em: http://www.science.com.br/henrys_corner/artigos_tecnicos/novos/vitamin_E_vitamin_C_and_exercise.pdf.

FLYNN, G.L. - Unique physicochemical systems used topically. In: BANKER, G.S., RHODES, C.T., eds. *Modern pharmaceuticals*. v.7, p. 298 – 309. Apud: O'LAUGHLIN, R., SACHS, C., BRITAIN, H., et al. New York: Marcel Dekker, 1979. Effects of variations in physicochemical properties of glyceryl monoostearate on the stability of an oil-in-water cream. *J.Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.40, p.215-229, 1989.

FORSLIND, B. The skin: upholder of physiological homeostasis. A physiological and (bio)physical study program. *Thromb. Res.*, v.80, n.1, p.1-22,1995.

FUCHS J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radical Biol Med* 25(7):848-873, 1998.

GARCIA C.R.C. Atualização em princípios ativos antienvhecimento. *Rev Cosmiatria Med Estetica* v.4, n.4, p.9-20, 1996.

GARCIA S. Lipossomas com filtro solar: preparação e controle de qualidade. São Paulo, 161p. (Tese de Doutorado – faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP), 1998.

GAREWAL, H.S.; DIPLOCK, A.T. How “safe” are antioxidant vitamins? *Drug saf* 13(1):8-14, 1995

GARTNER, L.P.; HIATT J.L. *Tratado de histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

HANSEN, S.H. Recent applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 24, p.3900-3907, 2003.

HARRIS, M.I.N. de C. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento. São Paulo: Senac.2003.

HUANG, X. H.; PANG, T. K. J.; GORDON, M. J.; ZARE, R. N., On-Column Conductivity Detector for Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 59, (23), 2747-2749, 1987.

IDSON, B. Vitaminas e a pele. *Cosmet & Toiletries Ed Port* 6:59-68, 1994.

JORGENSON, J.W.; LUKACS, K.D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.*, Washington DC, v.53, p.1298-1302, 1981.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. *Histologia básica*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.272-280, 1990.

KAMAL-ELDIN A., Appelqvist L. The Chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31(7):671-701, 1996.

KARPINSKA,J. Derivative spectrophotometry:recent applications and directions of developments. *Talanta*, London, v.64, n.4, p.801-822, 2004.

LEHNINGER A.L. *Princípios de bioquímica*, Sarvier Editora, São Paulo, 184-204, 1983.

LIBARDI F. S. Lactato de amônio. *Cosmet. & Toiletries*. Ed Port 11, p.50-53, 1999.

MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: __Cosmetologia, com questões de avaliação. Rio de Janeiro: Rubio, p.33-42, 61-145 , 2000.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; Vitaminas em cosméticos. *Cosmet.& Toiletries*, São Paulo, v.18, n.6, p.52-62, 2006.

MENEGATTI E., BONINA F., RUBERTO G., RENDA A., SCALIA S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Italy, 13, 273-277,1995.

MICHALANY J.; MICHALANY N.S. *Anatomia e histologia da pele*. São Paulo: Lemos, 2002.

MIKKERS, F.E.P.; EVERAERTS, F.M.; VERHEGGEN, T. P. E. M., High-performance Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* .169, (Feb), 11-20. 1979.

MORETTO,P.; SURLEVE-BAZEILLE, J.E.;LICU,D.;MICHELET, C.;STOEDZEL,P. Microanalysis of the human skin structure: preliminary results. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, n.158, p.386-392, 1999.

MORHY, L. Cromatografia (I): evolução histórica: a fase antiga. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v.28, n.10, p.1185-1189, 1976.

NOGUEIRA, T. Determinação de cafeína e identificação de adulterações no café empregando a eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato. (Dissertação de mestrado), Universidade de São Paulo – Instituto de Química, São Paulo, 2006.

O'LAUGHLIN, R., SACHS, C., BRITAIN, H., COHEN, E., TIMMINS, P., VARIA, S. Effects of variations in physicochemical properties of glyceryl monoostearate on the stability of an oil-in-water cream. *J.Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.40, p.215-229, 1989.

PERKAMPUS, H.H. UV-VIS spectroscopy and its applications. Berlin: Springer-Verlag, 244p.,1992.

PRISTA, L.V.N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M.R. – Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Goulbenkian, v.3, p. 385-397, 1990.

PUGLIESE, P.T. Physiology of the skin. Illinois: Allured Publishing, 1996.

RAM, A.N.S., SHAH, D.O. - Emulsions in tertiary oil recovery. In: LISSANT, K.J., ed. Emulsions and emulsion technology. Surfactant Science Series. Nova York: Marcel Dekker, v.6, pt.3, p. 139-180, 1984.

REMGINGTON'S pharmaceutical sciences. 18 ed., p. 200. Easton: Mack, 1990.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*. São Paulo, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. *Cosmetologia aplicada a dermoestética*. 1 ed, 2006.

RIEGER, M.M. – Emulsions. In: LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANIG, J.L. *The theory and practice of industrial pharmacy*. Philadelphia: Lea & Fabiger, 3 ed., p. 502-533, 1986.

ROBERT , L. Extracellular matrix and aging: a review of mechanisms and interventions. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.116, jan., p. 61-70, 2001.

ROBERT, L. *O envelhecimento*. Lisboa: Instituto Piaget, p.21-330,1994.

RUBINSTEIN, M.H. – *Pharmaceutical technology: drug stability*. Liverpool: Ellis Horwood. p. 167, 1989.

SANCHEZ, R.F.; BOSCH, O.C.; CANO, P.J.M. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, Amsterdam, v.35,n.10,p.753-761, 1998.

SANTORO, M.I.R.M., AURORA-PRADO, M.S., STEPPE, M., KEDOR-HACKMANN, E.R. Eletroforese Capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.36, n.1, p.97-110, 2000.

SCOTTI L.; VELASCO M.V.R., *Envelhecimento Cutâneo à Luz da Cosmetologia*. 1.ed. São Paulo: abc tecnopress, p.71, 2003.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.203-223,1994.

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

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, p836, 2002.

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

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, São Paulo, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

TERABE, S.; OTSUDA, K.; ANDO, T. *Anal. Chem.*, 57, 834-841, 1985.

THOMAS, M. *Ultraviolet and visible spectroscopy*. 2.ed. West Sussex: Wiley, 229p. 1996.

TISELIUS, A., "The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins", Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia, 1930.

TADROS, T.F., VICENT, B. – Emulsion stability. In: BECHER, P., ed. *Encyclopedia of emulsion technology*. New York: Marcel Dekker, v. 1, p. 1-56, 1983.

UNITED States Pharmacopeia. 28.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VALENTE, S.L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.60, n.1, p.79-84, 2001.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. *Cosmetologia de Harry*. Madri: Diaz de Santos, p.249-288, 747-779, 807-837, 1990.

ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 70, (3), 563-567, 1998.

PERSPECTIVAS

IX- PERSPECTIVAS

- Utilizar outros aditivos (surfactantes, óleos e solventes orgânicos) para otimizar a separação das vitaminas (E e VC-IP) utilizando o método MEECK óleo em água.
- Desenvolver o método MEECK água em óleo para a separação das vitaminas.
- Validar o método desenvolvido e aplicar a amostras comerciais.

ANEXO

TRABALHOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO, APRESENTADOS E ENVIADOS PARA CONGRESSOS

1- Trabalhos apresentados em congressos:

- **XVIII COLAMIQC.** Validação de metodologia analítica para determinação do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa por pareamento iônico. *Quenca-Guillen, J.; Guimarães, C.; López G., P.; da Silva J., P.; Almeida, M.M.; Santoro, M.; Matos, J.; Mercuri, L.; dos Santos, P.; Kedor-Hackmann, E.* Guatemala, período 21 a 24 de outubro de 2007.
- **22º Congresso Brasileiro de Cosmetologia.** Contribuição da análise térmica na avaliação da estabilidade do acetato de tocoferila e do tetraisopalmitato de ascorbila isolados e incorporados em formulações cosméticas. *Almeida, M.M.; Quenca-Guillen, J.S.; Graça, I.; Mercuri, L.P.; Kedor-Hackmann, E.R.M.* Brasil, período de 27 a 29 de maio de 2008.
- **22º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. Trabalho ganhador do prêmio de reconhecimento e incentivo a pesquisa em cosméticos.** Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* das amostras óleo de buriti, óleo de castanha do Brasil, óleo de açaí e manteiga de tucumã pelo método ORAC. *Quenca-Guillen, J.S.; Guimarães, C.; Almeida, M.M.; Lima, C.R.R.C.; Kedor-Hackmann, E.R.M.; Pineda, D.R.; Almeida, R.L.; Silva, E.C.; Barros, S.B.M.* Brasil, período de 27 a 29 de maio de 2008.

2- Trabalhos enviados para apresentação em congresso:

- **14th ICTAC – International Congress in Thermal Analysis and Calorimetry.** Thermoanalytical evaluation of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate isolated and associated in cosmetic formulations. *Almeida, M.M.; Lima, C.R.R.C.; Quenca-Guillen, J.S.; Sousa, E.; Matos, J.R.; Mercuri, L.P.; Kedor-Hackmann, E.R.M.* Brasil, período de 14 a 18 de setembro de 2008.
- **14th ICTAC – International Congress in Thermal Analysis and Calorimetry.** Kinetic study on the isothermal decomposition of nut brazil oil edible by thermogravimetry. *Lima, C.R.R.C.; Almeida, M.M.; Quenca-Guillen, J.S.; Kedor-Hackmann, E.R.M.; Mercuri, L.P.; Matos, J.R.* Brasil, período de 14 a 18 de setembro de 2008.

- **25th IFSCC congress – The International Federation of Societies of Cosmetic Chemists.** Evaluation of antioxidant capacity *in vitro* of monomethylsilanetriol ascorbate and its stability study in cosmetic formulations. *Quenca-Guillen, J.S.; Guimarães, C.; Ropke, C.D.; Rivelli, D.P.; Rosseti, F.C.; Almeida, M.M.; Lima, C.R.R.C.; Silva, I.P.; Bentley, M.V.L.B.; Barros, S.B.M.; Mercuri, L.P.; Matos, J.R.; Kedor-Hackmann, E.R.M.* Barcelona, período de 6 a 9 de outubro de 2008.

3- Trabalhos enviados para publicação:

- Determination of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in cosmetic formulations by HPLC. **M. M. Almeida**, J.M.P. Alves, C.R.R.C. Lima, J.S. Quenca-Guillen, M.I.M.Santoro, E.R.M. Kedor-Hackmann.(artigo em status de revisão por revista)
- Inovação Tecnológica no setor cosmético. **M. M. Almeida**; E.R. Dal'Maso; J.S. Araújo; M.M. Lattaro.